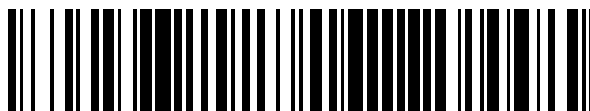


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 177**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 06723937 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1866335**

54 Título **Medios para la inhibición de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico**

30 Prioridad:

**31.03.2005 EP 05007056**

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

**03.02.2014**

73 Titular/es:

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
WÜRZBURG (100.0%)  
SANDERRING 2  
97070 WÜRZBURG, DE**

72 Inventor/es:

**JAHNS, ROLAND;  
JAHNS, VALÉRIE;  
LOHSE, MARTIN J. y  
PALM, DIETER**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 441 177 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

Medios para la inhibición de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico

La presente invención se refiere a péptidos, a su uso en la detección y la inhibición de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico y a agentes de diagnóstico y a composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

5 Cardiomiopatía dilatada (DCM) es una enfermedad cardíaca grave de jóvenes adultos que dará como resultado una disminución continua de la función cardíaca si no se trata. Dicha disminución se basa en una función cardíaca reducida junto con una dilatación del músculo cardíaco. En aproximadamente el 30% de los casos la cardiomiopatía dilatada es de origen genético, aproximadamente el 10% de los casos están provocados por sustancias tóxicas tales como alcohol y agentes quimioterápicos y el 60% restante de los casos están provocados por infección aguda o crónica del músculo cardíaco y reacciones secundarias inmunológicas que se producen de manera concomitante. En última instancia, el trasplante de corazón es el medio de elección para el tratamiento de cardiomiopatía dilatada. Sin tratamiento el paciente se enfrenta a una muerte prematura (Richardson *et al.* (1996) *Circulation*, 93, 841 - 842).

10 En la cardiomiopatía dilatada idiopática que se caracteriza por una pérdida de la función cardíaca sin etiología definida, se encontró una correlación de cardiopatía y reacciones autoinmunitarias contra diversos antígenos de miocardio, tales como autoanticuerpos contra la cadena pesada de miosina, laminina y el transportador de ADP/ATP (Schulze *et al.* (1990) *Circulation*, 81, 859 - 869). Sin embargo, no hubo ninguna evidencia de que ninguno de estos antígenos sea relevante en cuanto a la patogénesis. En contraste con esto, se ha mostrado que anticuerpos funcionalmente activos contra receptores  $\beta$ 1 cardíacos desempeñan un papel importante en la patogénesis de la cardiomiopatía dilatada. Análisis inmunológicos han mostrado que el segundo de un a total de tres dominios extracelulares del receptor  $\beta$ 1-adrenérgico muestra tanto un epítipo de células T como un epítipo de células B (Hoebecke *et al.* (1994), *Methods Neurosci.* 25, 345 - 365) y cumple por tanto con los criterios para un auto-antígeno según el primer postulado de Witebsky.

15 Con el fin de proporcionar evidencias experimentales de que este auto-antígeno es relevante para la etiología de la cardiomiopatía dilatada, se intentó inducir cardiomiopatía inmunitaria según el segundo postulado de Witebsky. En un modelo de rata se proporcionaron evidencias experimentales de que los anticuerpos anti- $\beta$ 1-AR estimulantes contra el segundo dominio extracelular del receptor  $\beta$ 1-adrenérgico están implicados en la etiología de la cardiomiopatía dilatada ( $\beta$ 1-EC<sub>II</sub>) (Jahns *et al.* (2004) *J. Clin. Invest.* 113, 1419 - 1429). La proteína de fusión  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub>-GST usada mostró una homología del 100% entre seres humanos y ratas. Cada uno de los animales inmunizados contra  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> desarrolló anticuerpos anti- $\beta$ 1 estimulantes y un fallo de la función de bombeo y dilatación progresiva grave del ventrículo izquierdo correspondiente a la cardiomiopatía inmunitaria que podía detectarse mediante ecocardiografía y se confirmó mediante mediciones invasivas y análisis histológicos de los animales. Con el fin de estimular los autoanticuerpos  $\beta$ 1, se transfirió el suero de animales positivos para anticuerpos  $\beta$ 1 por vía intravenosa a ratas genéticamente idénticas cada cuatro semanas. De nuevo, se observó una cardiomiopatía inmunitaria dilatada lentamente progresiva nueve meses tras la transferencia de suero tal como se demostró mediante ecocardiografía y también se confirmó mediante mediciones invasivas y estudios morfológicos e histológicos de los corazones de los animales sometidos a transferencia. Usando este enfoque, por primera vez se mostró que la cardiomiopatía inmunitaria inducida por anticuerpos  $\beta$ 1 podía transferirse y cumple por tanto el tercer postulado clásico de Witebsky para una patogénesis autoinmunitaria de cardiomiopatía dilatada (Freedman & Lefkowitz (2004) *J. Clin. Invest.* 113, 1378 - 1382).

25 Además de los estudios con animales, se analizaron muestras de sangre de pacientes para determinar anticuerpos contra receptor  $\beta$ 1. Jahns *et al.* detectaron auto-anticuerpos contra receptores  $\beta$ 1 humanos recombinantes en aproximadamente el 30% de todos los pacientes que padecían insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía dilatada idiopática. Estos pacientes muestran una función cardíaca significativamente disminuida en comparación con pacientes sin tales anticuerpos contra receptor  $\beta$ 1 (Jahns *et al.* (1999) *Circulation* 99, 649 - 654). El efecto estimulante de los anticuerpos pudo erradicarse mediante el bloqueante de receptor  $\beta$ 1 cardiosselectivo bisoprolol. En vista de esto, Jahns *et al.* (Jahns *et al.* (1999), *Circulation* 99, 649 - 654; Jahns *et al.* (2000) *JACC* 36, 1280 - 1287; Jahns *et al.* (2004) *JCI* 113, 1419 - 1429) sugirieron el uso de antagonistas de receptor  $\beta$ 1 tales como bisoprolol como inhibidores de la interacción entre anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico y los receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos nativos recombinantes y no recombinantes.

30 Un enfoque terapéutico alternativo para el tratamiento de cardiomiopatía dilatada es la eliminación de los anticuerpos de la circulación de pacientes con anticuerpos contra receptor  $\beta$ 1 funcionalmente activos y potencialmente dañinos usando inmunoadsorción o inmunofaéresis. En un procedimiento de este tipo, se hace pasar la sangre del paciente a través de columnas que eliminan el auto-anticuerpo contra receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos usando un péptido homólogo distinto de receptor acoplado a la matriz o eliminando de manera inespecífica anticuerpos de la subclase IgG uniendo los anticuerpos a columnas de proteína A o a anticuerpo de cabra anti-IgG humana acoplado a matriz. Sin embargo, tal procedimiento requiere tanto mucho tiempo como mucho trabajo. Adicionalmente, debido a la eliminación no específica de todas las inmunoglobulinas de la sangre de los pacientes así tratados, surgen numerosos inconvenientes tales como un sistema inmunitario y respuesta inmunitaria desequilibrados. No obstante, parece que los pacientes con DCM positivos para anticuerpos tienen al menos un



Ala-x<sub>l</sub>-Cys-x<sub>m</sub>-Cys-x-x-x-Pro-x-Cys-Cys-x<sub>n</sub>-Gln (IV)

en la que l es cualquier número entero desde 0 hasta 9, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 9, más preferiblemente n = 9;

5 en la que m es cualquier número entero desde 0 hasta 4, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 4, más preferiblemente m = 4;

en la que n es cualquier número entero desde 0 hasta 6, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 6, más preferiblemente n = 6;

en la que x es cualquier aminoácido, preferiblemente cualquier aminoácido que se produce de manera natural, más preferiblemente cualquier L-aminoácido que se produce de manera natural.

10 El péptido dado a conocer en el presente documento puede ser un péptido cíclico de fórmula Ia:

ciclo(Ala-x<sub>2</sub>-x-x<sub>1</sub>-x-x<sub>1</sub>-x-x<sub>2</sub>-x<sub>2</sub>-Cys-x-x-x<sub>1</sub>-Pro-x-Cys-Cys-x<sub>k</sub>-Gln) (Ia)

en la que k es cualquier número entero desde 0 hasta 6, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 6, más preferiblemente k = 6;

en la que x<sub>1</sub> se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos ácidos; y

15 x<sub>2</sub> se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos básicos.

En una realización el péptido es un péptido de fórmula Ic:

ciclo(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) (Ic)

20 En una realización preferida al menos uno de los residuos de aminoácido ácido se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos ácidos.

En una realización preferida al menos uno de los residuos de aminoácido básico se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos básicos.

En una realización preferida al menos uno de los residuos de aminoácido alifático se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos alifáticos.

25 En una realización más preferida al menos un residuo de aminoácido Ala se sustituye por Glu.

El péptido dado a conocer en el presente documento puede ser un péptido cíclico de fórmula IIa:

ciclo(Ala-x<sub>4</sub>-x<sub>2</sub>-Trp-x<sub>1</sub>-x<sub>3</sub>-Gly-x<sub>4</sub>-Phe-x<sub>3</sub>-Cys-x<sub>n</sub>-Gln) (IIa)

en la que n es cualquier número entero desde 0 hasta 2, preferiblemente 1 ó 2;

en la que x<sub>1</sub> se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos ácidos;

30 x<sub>2</sub> se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos básicos;

x<sub>3</sub> se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Leu, Ile, Val, Met, Trp, Tyr y Phe; y

x<sub>4</sub> se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Ser, Thr, Ala y Gly.

El péptido dado a conocer en el presente documento puede ser un péptido de fórmula IIb:

ciclo(Ala-Gly-Arg-Trp-Glu-Tyr-Gly-Ser-Phe-Phe-Cys-Glu-Leu-Gln) (IIb)

35 o un péptido de fórmula IIc:

ciclo(Ala-Gly-Arg-Trp-Glu-Tyr-Gly-Ser-Phe-Phe-Cys-Gln) (IIc)

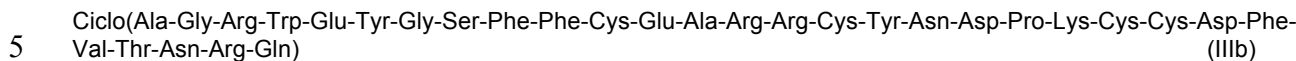
En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos uno de los residuos de aminoácido ácido puede sustituirse por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos ácidos.

40 En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos uno de los residuos de aminoácido básico puede sustituirse por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos básicos.

En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos uno de los residuos de aminoácido alifático puede sustituirse por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos alifáticos.

En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos un residuo de aminoácido Ala puede sustituirse por Glu.

En una realización preferida el péptido es un péptido de fórmula IIIb:



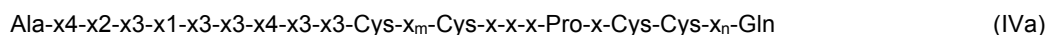
En una realización más preferida al menos uno de los residuos de aminoácido ácido se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos ácidos.

En otra realización más preferida al menos uno de los residuos de aminoácido básico se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos básicos.

10      En otra realización más preferida al menos uno de los residuos de aminoácido alifático se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos alifáticos.

En otra realización más preferida al menos un residuo de aminoácido Ala se sustituye por Glu.

El péptido dado a conocer en el presente documento puede ser un péptido lineal de fórmula IVa:



15      en la que n es cualquier número entero desde 0 hasta 6, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 6, más preferiblemente n = 6;

en la que m es cualquier número entero desde 0 hasta 4, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 4, más preferiblemente m = 4;

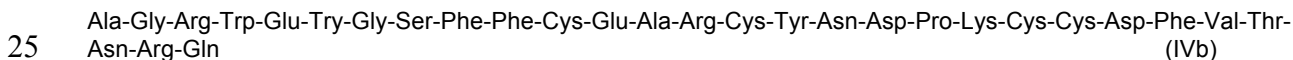
en la que x<sub>1</sub> se selecciona del grupo que comprende aminoácidos ácidos;

20      x<sub>2</sub> se selecciona del grupo que comprende aminoácidos básicos;

x<sub>3</sub> se selecciona del grupo que comprende Leu, Ile, Val, Met, Trp, Tyr y Phe; y

x<sub>4</sub> se selecciona del grupo que comprende Ser, Thr, Ala y Gly.

El péptido dado a conocer en el presente documento puede ser un péptido de fórmula IVb:



En el presente documento se dan a conocer además péptidos cíclicos que tienen cualquiera de las dos fórmulas siguientes, mediante lo cual debe reconocerse que ambos péptidos quedan cubiertos por la fórmula IV pero son péptidos cíclicos adicionales:



30      Ciclo(Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Tyr-Gln)

En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos uno de los residuos de aminoácido ácido puede sustituirse por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos ácidos.

En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos uno de los residuos de aminoácido básico puede sustituirse por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos básicos.

35      En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos uno de los residuos de aminoácido alifático puede sustituirse por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos alifáticos.

En el péptido dado a conocer en el presente documento al menos un residuo de aminoácido Ala puede sustituirse por Glu.

40      En una realización, en el caso de que el péptido sea un péptido cíclico, la ciclización se produce mediante una unión que es un enlace covalente seleccionado del grupo que comprende uniones S-S, enlaces peptídicos, enlaces de carbono tales como C-C o C=C, enlaces éster, enlaces éter, enlaces azo, uniones C-S-C, uniones C-N-C y uniones C=N-C.

En una realización preferida la unión S-S se forma mediante dos residuos de Cys del péptido.

45      En una realización preferida alternativa el enlace peptídico se forma por el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido N-terminal y el grupo COOH del aminoácido C-terminal.

En otra realización preferida alternativa se forman enlaces adicionales por la cadena lateral de grupos NH<sub>2</sub> y grupos COOH de los aminoácidos constituyentes.

El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un segundo aspecto mediante una composición que comprende al menos uno de los péptidos según el primer aspecto de la presente invención y un portador.

- 5 El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un tercer aspecto mediante un agente de diagnóstico que comprende al menos uno de los péptidos según el primer aspecto de la presente invención.

En una realización el agente de diagnóstico es para la detección de anticuerpos anti-receptores β-adrenérgicos.

En una realización preferida el agente de diagnóstico comprende al menos un compuesto biológicamente activo adicional.

- 10 El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un cuarto aspecto mediante un kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-receptor β1-adrenérgico que comprende un péptido según el primer aspecto de la presente invención o un agente de diagnóstico según el tercer aspecto de la presente invención.

El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un quinto aspecto mediante una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos según el primer aspecto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 15 En una realización la composición farmacéutica comprende además un agente farmacéuticamente activo adicional.

En una realización preferida el agente farmacéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que comprende un bloqueante de receptores beta, preferiblemente bloqueantes de receptor β1-adrenérgico selectivos.

- 20 En una realización más preferida el agente farmacéuticamente activo adicional se selecciona del grupo de bloqueantes de receptor β1-adrenérgico selectivos que comprende atenolol, metoprolol, nebivolol y bisoprolol o el beta-bloqueante no selectivo carvedilol.

El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un sexto aspecto mediante el uso de un péptido según el primer aspecto de la presente invención, para la fabricación de un medicamento.

- 25 En una realización el medicamento es para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, en el que tal enfermedad se selecciona del grupo de cardiopatías, que comprende cardiopatía infecciosa y no infecciosa, cardiopatía isquémica y no isquémica, cardiopatía inflamatoria y miocarditis, dilatación cardíaca, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada idiopática, cardiomiopatía inmunitaria, insuficiencia cardíaca y cualquier arritmia cardíaca incluyendo latidos de captura prematura ventriculares y supraventriculares.

- 30 En una realización preferida la enfermedad es cardiomiopatía dilatada idiopática y preferiblemente cardiomiopatía inmunitaria dilatada inducida por anticuerpos anti-β-AR.

En una realización el medicamento comprende al menos un compuesto farmacéuticamente activo adicional.

En una realización el medicamento es para el tratamiento y/o la prevención de pacientes que tienen anticuerpos contra receptores β-adrenérgicos, preferiblemente receptores β1-adrenérgicos.

En una realización el medicamento es para inducir tolerancia inmunitaria.

- 35 El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un séptimo aspecto mediante el uso de un péptido según el primer aspecto de la presente invención para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para inducir tolerancia inmunitaria, preferiblemente mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptores β-adrenérgicos y más preferiblemente mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptor β1-adrenérgico.

- 40 El problema subyacente a la presente invención se soluciona en un octavo aspecto mediante el uso de un péptido según el primer aspecto de la presente invención para inducir tolerancia inmunitaria mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptor β1-adrenérgico mediante bloqueo de los sitios de reconocimiento de antígeno de las células pre-B productoras de anticuerpos.

- 45 Todavía en un aspecto adicional el problema subyacente a la presente invención se soluciona mediante el uso de un péptido según la presente invención en un método de diagnóstico *in vitro*.

En una realización el método es para el diagnóstico de cardiomiopatía dilatada idiopática, preferiblemente cardiomiopatía inmunitaria dilatada inducida por anticuerpos anti-β-AR.

En una realización preferida el método es un método basado en FRET.

Sin desear limitarse a ninguna teoría a continuación, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que varios péptidos tanto cíclicos como también lineales son, en principio, activos como inhibidores de anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos, más particularmente como inhibidores de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico. Sin embargo, la figura 2 demuestra que los péptidos cíclicos se reconocen aparentemente de dos a tres veces mejor (es decir proporcionan valores de DO 2-3 veces superiores a la misma concentración de anticuerpo) que los péptidos lineales por anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos, más particularmente por anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico. Además, se piensa que la arquitectura molecular de una característica de cabeza a cola junto con puentes de cisteína intramoleculares proporcionan a los péptidos cíclicos una resistencia aumentada frente a la degradación térmica, química y enzimática *in vivo* (Ireland D.C. *et al.* (2006) J Mol Biol 12, 1-14).

Tiene que reconocerse que, tal como también se muestra en la figura 12 y la figura 13, y se describe en los ejemplos 3 y 4, agentes de la técnica anterior, es decir beta-bloqueantes, que pueden usarse para el tratamiento de cardiomiopatía dilatada y otras enfermedades que se provocan por anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico estimulantes, tales como bisoprolol, redujeron significativamente tanto la frecuencia cardiaca como la tensión arterial. Por tanto, en pacientes que padecen asma bronquial que representa una contraindicación para agentes beta-bloqueantes debido a una posible inducción de broncoespasmo o en pacientes que ya padecen una frecuencia cardiaca baja y/o una tensión arterial sistémica baja no es posible usar bisoprolol y compuestos que actúan de manera similar, ya que una disminución adicional de la frecuencia cardiaca o la tensión arterial podría tener graves consecuencias, incluyendo muerte o necesidad de procedimientos quirúrgicos, es decir la implantación de marcapasos. Al contrario que esto, los péptidos de la presente invención no tienen un impacto negativo sobre la función pulmonar, la frecuencia cardiaca o la tensión arterial y, por tanto, son adecuados para el tratamiento de distintos grupos de pacientes que de otro modo no podrían tratarse usando un beta-bloqueante, es decir pacientes que ya padecen bradicardia para los que el uso de beta-bloqueantes de la técnica anterior, tales como bisoprolol, no es posible.

Además, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los péptidos según la presente invención actúan obviamente mediante un mecanismo adicional diferente de una captura de los autoanticuerpos que activan los receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos que da como resultado, entre otras cosas, cardiomiopatía inmunitaria dilatada e insuficiencia cardiaca. En vez de eso, los péptidos según la presente invención parecen ser adecuados para inducir tolerancia inmunitaria dado que la producción endógena de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico disminuyó rápidamente y finalmente se detuvo en el plazo de 5-6 meses en animales tratados tanto de manera profiláctica (figura 4) como terapéutica (figura 8). Para gran sorpresa de los presentes inventores, en el plazo de tan sólo unos pocos meses ya no se observaron respuestas inmunitarias significativas tras refuerzos con antígenos (administrados cada 4 semanas) tal como se muestra en la figura 4 y figura 8. Esto significa que se produjo algún tipo de tolerancia inmunológica comparable a la hiposensibilización con anergia consecutiva frente al antígeno de receptor  $\beta$ 1, un efecto lo más probablemente debido a una reducción significativa y/o supresión, quizás incluso apoptosis, de las células B productoras de anticuerpos anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub>. De hecho, un análisis adicional de la naturaleza de esta tolerancia inmunológica reveló una disminución significativa en las células B esplénicas productoras de anticuerpos específicos de antígeno en presencia del péptido cíclico (figura 20), mientras que las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras y/u otros mecanismos de tolerancia inducida por células T obviamente no explican este estado insensible. La figura 19 muestra ensayos de memoria de células T representativos llevados a cabo con células T CD4<sup>+</sup> aisladas a partir de animales inmunizados positivos para anticuerpos anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> tratados de manera profiláctica (figura 19a) o de manera terapéutica (figura 19b). El ensayo se realizó según la publicación de Schmidt, J. *et al.* J. of Neuroimmunology 140, 143 - 152 (2003). En la incubación de células T CD4<sup>+</sup> aisladas con los péptidos cíclicos, especialmente el péptido beta 1-EC<sub>II</sub> de 25 AA (aminoácidos), denominado péptido con o de fórmula Ic, ningún grupo de tratamiento dio como resultado una estimulación significativa y posterior proliferación de las células T en comparación con la reacción de proliferación celular dependiente de la dosis observada tras la incubación de las células T con el antígeno de proteína de fusión  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub>/GST (FP 1,0  $\mu$ g/ml o 0,1  $\mu$ g/ml), o el estimulante de células T no específico concanavalina A (ConA, control positivo). En cambio, la figura 20 muestra los resultados de ensayos de ELISPOT con células B esplénicas que demuestran que las células B que secretan específicamente IgG anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> se vieron afectadas notablemente y reducidas significativamente en el bazo de animales tratados con 1 mg/kg del péptido cíclico EC<sub>II</sub> de 25 AA de fórmula I c, mientras que las células B de memoria específicas anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> perpetuas en la médula ósea de animales tratados no se vieron afectadas por el péptido cíclico. Las células B productoras de IgG no específica de  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub>, es decir IgG total, en el bazo o la médula ósea necesarias para cualquier clase de respuesta humoral contra antígenos foráneos (incluyendo microbianos) no se vieron afectadas en absoluto en todos los animales tratados con 1 mg/kg del péptido cíclico de fórmula Ic, excluyendo un efecto inmunosupresor general del péptido cíclico.

Se entenderá que para los diversos péptidos de la presente invención, es posible una determinada flexibilidad y variabilidad en la secuencia primaria, es decir la secuencia de aminoácidos, siempre que se garantice la estructura secundaria y terciaria global de los péptidos respectivos que se define por al menos algunos residuos de aminoácido fijos y por su disposición espacial. Además el número de aminoácidos y por tanto la longitud de la estructura primaria parecen ser cruciales para los efectos biológicos de los diversos péptidos de la presente invención. Se piensa que una longitud de péptido igual o superior a 26 aminoácidos (estructura primaria) puede estimular directamente (es decir, sin el uso de proteínas portadoras) células T inmunocompetentes y por tanto puede provocar un aumento

paradójico en la producción de anticuerpos anti-receptor  $\beta 1$  mediante estimulación de células B mediada por células T (datos no mostrados). Por tanto, en el estudio de terapia posterior usando un número limitado de animales control complementarios, se sometieron a prueba variantes peptídicas más cortas del péptido  $\beta 1$ -EC<sub>II</sub> de 25 aminoácidos, es decir variantes peptídicas cíclicas que comprendían o bien 18 o bien 16 aminoácidos (AA). Los constructos generados fueron: EC<sub>II</sub> de 18 AA, ciclo(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Gln); y EC<sub>II</sub> de 16 AA, ciclo(Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Tyr-Gln). Aunque se redujeron los títulos de anticuerpos anti- $\beta 1$ -EC<sub>II</sub> circulantes aproximadamente en la misma medida con cualquiera del péptido cíclico de 25 AA Ic o el constructo de 18 AA (véase la figura 8b), proporcionando ambos también una eficacia biológica similar (es decir inversión del fenotipo cardiomiopático; véase la figura 10d), el constructo de 16 AA parece ser menos eficaz con respecto tanto a la reducción continua de títulos de anticuerpos anti- $\beta 1$ -EC<sub>II</sub> circulantes (véanse los rombos grises, figura 8b: tras la inyección del péptido los títulos de anticuerpos permanecen estables en lugar de disminuir) como a la eficacia biológica (es decir, resultados ambiguos en 2 ratas tratadas teniendo un animal una inversión completa del fenotipo cardiomiopático, el otro animal una disfunción y dilatación del LV progresiva; véase la figura 10d) lo que indica que parece ser necesaria una determinada longitud de los péptidos homólogos de receptor cíclicos para obtener los efectos biológicos beneficiosos.

Por tanto, los péptidos específicos en cuanto a secuencias de aminoácidos definidas son ejemplos particularmente preferidos de los péptidos más generales, es decir los péptidos representados por las fórmulas genéricas en el presente documento.

De acuerdo con lo mismo, las diversas fórmulas genéricas se refieren a una estructura peptídica básica tal como se refleja por las fórmulas I, II, III y IV, en las que fórmulas más específicas y por tanto péptidos que se definen adicionalmente de una manera menos genérica, pero todavía cubiertos por las fórmulas I, II, III y IV, se denominan en el presente documento Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa y IVb, respectivamente. También entenderán los expertos en la técnica que el aminoácido individual puede sustituirse por otro aminoácido sintético o que se produce de manera natural, preferiblemente si ambos aminoácidos pertenecen a la misma categoría de aminoácidos. De acuerdo con lo mismo, por ejemplo, un aminoácido ácido puede sustituirse por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico puede sustituirse por otro aminoácido básico, etcétera. También reconocerán los expertos en la técnica que uno o varios de los aminoácidos que forman el péptido de la presente invención pueden modificarse. De acuerdo con lo mismo cualquier aminoácido tal como se usa en el presente documento también representa preferiblemente su forma modificada. Por ejemplo, un residuo de alanina tal como se usa en el presente documento también comprende alanina modificada. Tales modificaciones pueden ser, entre otras, una metilación o acilación o similar, en la que tal modificación o aminoácido modificado está comprendido preferiblemente por la presente invención siempre que el aminoácido así modificado y más particularmente el péptido que contiene dicho aminoácido así modificado todavía sea funcionalmente activo tal como se define en el presente documento, más manera más particular funcionalmente activo como inhibidor de receptores  $\beta 1$ -adrenérgicos e incluso más preferiblemente activo en la inhibición de la interacción entre receptores  $\beta 1$ -adrenérgicos y anticuerpos, más preferiblemente autoanticuerpos dirigidos contra receptores  $\beta 1$ -adrenérgicos. El experto en la técnica conoce ensayos respectivos para determinar si tal péptido, es decir un péptido que comprende uno o varios aminoácidos modificados, cumple con este requisito, y también se describen, entre otros, en el presente documento, particularmente en la parte de ejemplos del mismo.

La invención también comprende derivados de los péptidos tales como sales con ácidos fisiológicos orgánicos e inorgánicos tales como HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ácido málico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido acético.

Tal como se usa en el presente documento, las secuencias de los diversos péptidos se indican desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, mediante lo cual 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.

Preferiblemente un aminoácido ácido es un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asp, Asn, Glu y Gln; preferiblemente un aminoácido básico es un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Arg y Lys; preferiblemente un aminoácido neutro es un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile; preferiblemente un aminoácido alifático es un aminoácido que se selecciona del grupo que comprende Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Lys, Cys y Met.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión de que un aminoácido particular, tal como, por ejemplo, un aminoácido básico, se sustituye por un aminoácido diferente que se selecciona de un grupo de aminoácidos particular respectivo, tal como, por ejemplo, el grupo que comprende aminoácidos básicos, significa preferiblemente que el aminoácido particular se sustituye por otro, es decir un aminoácido diferente con la condición de que tal aminoácido diferente sea parte del grupo de aminoácidos particular respectivo. En la medida indicada en el presente documento, esto es aplicable a cada uno de los aminoácidos particulares y, en principio, cada sustitución de este tipo es independiente de cualquier otra sustitución realizada opcionalmente en relación con otros aminoácidos que forman el péptido respectivo.

Los péptidos según la presente invención pueden usarse como agente de diagnóstico y para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o pueden usarse en una composición, preferiblemente una



composición farmacéutica, una composición de diagnóstico y un kit de diagnóstico, preferiblemente para la detección de anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos, más preferiblemente para la detección de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico. Tales enfermedades son preferiblemente aquellas en las que el receptor  $\beta$ 1-adrenérgico se activa de una manera no fisiológica, más particularmente se activa por anticuerpos, más preferiblemente por auto-anticuerpos que se dirigen contra el receptor  $\beta$ 1-adrenérgico. Más específicamente, tales enfermedades comprenden el, sin embargo, no se limitan al, grupo de cardiopatías, que comprende cardiopatía infecciosa y no infecciosa, cardiopatía isquémica y no isquémica, cardiopatía inflamatoria y miocarditis, dilatación cardiaca, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada idiopática, cardiomiopatía inmunitaria, insuficiencia cardiaca y cualquier arritmia cardiaca incluyendo captura prematura ventricular y supraventricular. Tal composición farmacéutica también puede usarse adicional o alternativamente para el tratamiento de pacientes que tienen anticuerpos contra receptores  $\beta$ -adrenérgicos, preferiblemente receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos. Un subgrupo adicional de pacientes que pueden tratarse mediante la composición farmacéutica según la presente invención son aquellos pacientes que padecen cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, más particularmente el grupo de cardiopatías, que comprende cardiopatía infecciosa y no infecciosa, cardiopatía isquémica y no isquémica, cardiopatía inflamatoria y miocarditis, dilatación cardiaca, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada idiopática, cardiomiopatía inmunitaria, insuficiencia cardiaca y cualquier arritmia cardiaca incluyendo captura prematura ventricular y supraventricular y que tienen al mismo tiempo los anticuerpos dirigidos contra receptores  $\beta$ -adrenérgicos, más preferiblemente anticuerpos contra el receptor  $\beta$ 1-adrenérgico, mediante lo cual en una realización preferida los anticuerpos son auto-anticuerpos. Lo que se menciona en el presente documento para la composición farmacéutica también se aplica al medicamento para cuya fabricación se usan los péptidos de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, compuestos y péptidos se usan de una manera intercambiable en el presente documento.

Aparte de contener al menos un péptido de la presente invención, la composición puede comprender o bien dos o bien una pluralidad de péptidos cíclicos de la presente invención y/u otros bloqueantes de receptor  $\beta$ , más particularmente bloqueantes de receptor  $\beta$ 1-adrenérgico. Por tanto, ejemplos son, entre otros, bisoprolol, metoprolol, atenolol, nebivolol y carvedilol. Esta clase de combinación proporciona la protección frente a regulación por disminución de receptor  $\beta$ 1 selectiva inducida por anticuerpos mediante los péptidos (véanse las figuras 17 y 18) junto con la regulación por incremento de receptor  $\beta$ 1 sinérgico mediante beta-bloqueantes tales como bisoprolol o metoprolol (véanse las figuras 17 y 18) y en última instancia da como resultado un efecto sinérgico tal como se observa en el modelo animal (véanse las figuras 10, 11 y 13). De acuerdo con lo mismo, la inversión del fenotipo cardiomiopático sólo se produce mediante monoterapia con ciclopéptido o mediante terapia de combinación con  $\beta$ -bloqueante/péptido, pero no con monoterapia con betabloqueante solo que se ha demostrado que es beneficiosa en la insuficiencia cardiaca y la cardiomiopatía dilatada en seres humanos, notificado en los estudios CIBIS I, II y III y el estudio MERIT-HF.

La composición farmacéutica comprende normalmente un portador, más preferiblemente un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Para la inyección s.c. o i.v., pueden formularse compuestos de la invención en disolución acuosa, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón fisiológicamente salino. Para la administración transmucosa y transpulmonar, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que debe penetrarse. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

El uso de portadores farmacéuticos aceptables para formular los compuestos según la presente invención para dar dosificaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración sistémica, es decir intravenosa/intraarterial o subcutánea, está dentro del alcance de la presente invención. Con una elección apropiada del portador y práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente invención, en particular aquellas formuladas como disoluciones, pueden administrarse por vía parenteral, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos pueden formularse fácilmente usando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica para dar dosificaciones adecuadas para su administración subcutánea u oral. Tales portadores permiten formular los compuestos según la presente invención como comprimidos, pastillas, cápsulas, grageas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un sujeto que va a tratarse.

Los compuestos según la presente invención o medicamentos que los comprenden, previstos para administrarse por vía intracorporal/intracelular, pueden administrarse usando técnicas bien conocidas por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, tales agentes pueden encapsularse para dar liposomas, después administrarse tal como se describió anteriormente. Los liposomas son bicapas lipídicas esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una disolución acuosa en el momento de la formación del liposoma se incorporan en el interior acuoso. El contenido del liposoma tanto queda protegido del entorno externo como, debido a que los liposomas se fusionan con membranas celulares, se suministran eficazmente cerca de la superficie celular. Se dan a conocer sistemas de suministro que implican liposomas en la patente estadounidense n.º 4.880.635 de Janoff *et al.* Las publicaciones y patentes proporcionan descripciones útiles de técnicas para el suministro de fármacos con liposomas y se incorporan como referencia en el presente documento en su totalidad.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la presente invención para su administración parenteral y/o subcutánea incluyen disoluciones acuosas del/de los compuesto(s) activo(s) en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. 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 aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas y para permitir una liberación constantemente lenta de la sustancia en el organismo.

Pueden obtenerse composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la presente invención para su uso oral combinando el/los compuesto(s) activo(s) con excipiente sólido, triturando opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir adyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas.

Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol y similares; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona (PVP) y similares, así como mezclas de dos cualesquiera o más de los mismos. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio, y similares.

Se proporcionan recubrimientos adecuados a núcleos de grageas como composición farmacéutica que comprende un compuesto según la presente invención. Para este fin, pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca, disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes, y similares. Preferiblemente se usa un recubrimiento resistente a jugos gástricos tal como derivados de celulosa Aquateric®, HP50® o HP55®, polímero de ácido metacrílico y ésteres de ácido metacrílico Eutragid® L, Eutragid® S; formas retardadas Eutragid® RL y Eutragid® RS o derivados de polivinilo. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la presente invención que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes.

La composición farmacéutica puede estar presente en el intervalo de 10 µg/kg a 100 mg/kg dependiendo de la forma de aplicación, preferiblemente aplicación s.c. o i.v. cada dos o cuatro semanas. En la rata, 1 mg/kg s.c. o i.v. cada dos meses fue suficiente para obtener niveles terapéuticos de los compuestos según la presente invención, siendo la dosificación respectiva para seres humanos preferiblemente de aproximadamente 1-10 mg/kg i.v. o s.c.

Queda dentro de la presente invención que la composición farmacéutica se use para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y grupos de pacientes tal como se definieron anteriormente incluyendo la detección de anticuerpos anti-receptor β en estos pacientes usando los compuestos mencionados anteriormente. Además, los péptidos según la presente invención pueden usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de cualquiera de las enfermedades y grupos de pacientes tal como se definieron anteriormente en relación con la composición farmacéutica.

Finalmente, la presente invención se refiere a un péptido de la presente invención, o a la composición farmacéutica o al medicamento dados a conocer en el presente documento, para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen o que corren el riesgo de desarrollar una enfermedad tal como se da a conocer en el presente documento, más particularmente cardiopatías, que comprenden cardiopatía infecciosa y no infecciosa, cardiopatía isquémica y no isquémica, cardiopatía inflamatoria y miocarditis, dilatación cardíaca, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada idiopática, cardiomiopatía inmunitaria, insuficiencia cardíaca y cualquier arritmia cardíaca incluyendo latidos de captura prematura ventriculares y supraventriculares, en el que el paciente necesita tal tratamiento y en el que debe administrarse a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de dicho péptido, composición farmacéutica o medicamento. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del principio activo que produce una mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia de un sujeto que puede determinar un experto en la técnica realizando pruebas rutinarias.

Un "paciente" para los fines de la presente invención, es decir a quién se le administra un compuesto según la presente invención o una composición farmacéutica según la presente invención, incluye tanto seres humanos como

- 5 otros animales y organismos. Por tanto los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los métodos pueden aplicarse a, o en relación con, aplicaciones de terapia tanto en seres humanos como veterinaria incluyendo diagnóstico(s), métodos y procedimientos de diagnóstico así como métodos y procedimientos de estadificación. Por ejemplo, las aplicaciones veterinarias incluyen, pero no se limitan a, animales caninos, bovinos, felinos, porcinos, caprinos, equinos y ovinos, así como a otros animales domesticados incluyendo reptiles, tales como iguanas, tortugas y serpientes, aves tales como fringílidos y miembros de la familia del loro, lagomorfos tales como conejos, roedores tales como ratas, ratones, cobayas y hámsteres, anfibios, peces y artrópodos. También pueden tratarse animales no domesticados valiosos, tales como animales de zoo. En la realización preferida el paciente es un mamífero, y en la realización más preferida el paciente es un ser humano.
- 10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un péptido, composición farmacéutica y medicamento según la presente invención para su uso en un método para diagnosticar a un paciente que puede tratarse usando dicho péptido, composición farmacéutica o medicamento. Preferiblemente, esto comprende que tengan que aplicarse las etapas tal como se describen en la parte de ejemplos del presente documento. En un aspecto la presente invención se refiere por tanto al uso de péptidos según la presente invención como diagnóstico o para la
- 15 fabricación de una prueba de diagnóstico. El fundamento detrás de este uso de diagnóstico de los péptidos según la presente invención es su interacción con las estructuras descritas anteriormente y en particular con los anticuerpos anti-receptor  $\beta$ -adrenérgico.
- Hasta ahora, la definición de positividad para anticuerpos depende de métodos de examen altamente divergentes tales como, por ejemplo, ELISA con péptidos receptores, inmunotransferencia de tipo Western de tejidos cardiacos, ensayos funcionales con cardiomiocitos de rata neonatales, o detección mediante resonancia de plasmón superficial. Hasta ahora, no se ha resuelto satisfactoriamente este asunto.
- 20 Un enfoque para usar los péptidos según la presente invención como diagnóstico y en un método de diagnóstico, respectivamente, es un procedimiento de examen de tres etapas que comprende realizar un ELISA con los péptidos según la presente invención así como determinar la inmunofluorescencia y determinar las respuestas de cAMP en células que expresan beta-AR humano nativo. Debe reconocerse que todas y cada una de las etapas mencionadas anteriormente pueden realizarse como tales para la detección de dichos anticuerpos usando los péptidos según la presente invención. Por tanto puede examinarse un gran número de pacientes con insuficiencia cardiaca para detectar Acs anti-beta1 funcionalmente activos. En relación con tal método de diagnóstico la definición de Acs anti-beta1 funcionalmente activos se basa preferiblemente en sus efectos sobre la señalización mediada por receptores, es decir, sus efectos sobre los niveles de cAMP celular y la actividad de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA). AMP cíclico es un segundo mensajero universal de muchos receptores acoplados a proteína G incluyendo la familia de receptores beta-adrenérgicos. Ejerce sus efectos mediante PKA, canales de iones regulados por cAMP, fosfodiesterasas y proteínas de intercambio activadas directamente por cAMP, conocidas como Epac1 y 2. La técnica anterior describe varios métodos de fluorescencia para medir el cAMP en células intactas, todos los cuales pueden usarse en relación con el método de diagnóstico de la presente invención. Se ha descrito la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre variantes de proteína fluorescente verde (GFP) fusionadas a subunidades reguladoras y catalíticas de PKA para estudiar la dinámica espaciotemporal de cAMP 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).
- 25 Más recientemente, se han descrito indicadores de fluorescencia monocatenarios en la técnica que se caracterizan por tener una proteína fluorescente amarilla (YFP) o cian (CFP) potenciada fusionada directamente al dominio de unión a cAMP de proteínas Epac, lo que permitió alcanzar una mayor sensibilidad y una mejor resolución temporal de las mediciones de cAMP. Tal sistema se describe, entre otros, en el documento WO2005/052186, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Tal sistema puede usarse en relación con cualquier procedimiento de diagnóstico usando los péptidos según la presente invención. Además, tal sistema puede usarse para, sin embargo no se limita a ello, analizar la prevalencia de Acs anti-beta1 funcionalmente activos. Preferiblemente tal método de diagnóstico se aplica a una cohorte de pacientes con DCM clasificados anteriormente en cuanto a anticuerpos o a cualquier individuo que va a evaluarse de ese modo o cualquier individuo que se sospecha que padece cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento o que corre riesgo de padecerlas. En una etapa adicional del método de diagnóstico y método de examen, puede evaluarse y determinarse la capacidad de beta-bloqueantes para inhibir la activación de receptores inducida por Acs anti-beta1, respectivamente.
- 30 El ensayo descrito anteriormente que es un método basado en FRET tal como se describe en el documento WO 2005/052186 que usa péptidos según la presente invención es ventajoso en la medida en que es más sencillo, requiere menos tiempo y al mismo tiempo da a conocer o identifica a todos los pacientes con DCM que se consideraba anteriormente que eran positivos para anticuerpos anti-beta1-EC<sub>II</sub>. Esta realización de un método de diagnóstico basado en FRET que usa uno o varios de los péptidos según la presente invención se basa en detectar aumentos inducidos por anticuerpos de cAMP. Este segundo mensajero representa lo más probablemente los efectos perjudiciales provocados por Acs anti-beta1 activantes. Por tanto, resulta ventajoso que este método, que se usa preferiblemente como método de diagnóstico, y que cuantifica las señales de cAMP inducidas por anticuerpos, permite diferenciar entre clases de Acs anti-beta1 funcionales. De hecho, aplicando este método se ha detectado una población de paciente no detectada anteriormente caracterizada por la presencia de autoanticuerpos "poco"
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

activantes que seleccionan supuestamente como diana un dominio de receptor diferente. Adicionalmente, este método sugiere que estas clases se dirigen preferiblemente contra epítomos diferentes del receptor. Tomado en conjunto, el examen mediante Epac-FRET parece representar un enfoque de una única etapa muy sensible, que permite detectar diferentes clases de anticuerpos activantes dirigidos contra el beta1-AR humano. Por tanto, la presente invención también se refiere al uso de uno o varios de los péptidos según la presente invención para su uso en un ensayo de Epac-FRET. Más preferiblemente tal ensayo de Epac-FRET se usa para el diagnóstico, incluso más preferiblemente para el diagnóstico de pacientes que padecen o se sospecha que padecen cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento.

Un hallazgo adicional subyacente a la presente invención es que se detectaron Acs anti-beta 1 funcionales en casi dos tercios de los pacientes con DCM (aproximadamente la mitad de ellos eran IgG "muy" activante, lo que significa dirigido contra beta 1-EC<sub>II</sub>, y aproximadamente otra mitad IgG "poco" activante, lo que significa dirigido contra beta 1-EC<sub>I</sub>). Por tanto, estos pacientes definen grupos de pacientes que pueden diagnosticarse y tratarse, respectivamente, con los péptidos según la presente invención. Las curvas de mortalidad para las dos poblaciones clasificadas mediante FRET demostraron que los pacientes con IgG "poco" activante no se diferencian significativamente en cuanto a la mortalidad de los pacientes con DCM sin auto-anticuerpos activantes, mientras que los pacientes con IgG "muy" activante tienen una mortalidad significativamente superior. Por tanto, los Acs anti-beta 1 dirigidos contra beta 1-EC<sub>II</sub> son particularmente relevantes desde el punto de vista clínico y, por tanto, son un marcador particularmente preferido y una diana, respectivamente, en o sometida a los métodos de diagnóstico dados a conocer en el presente documento. La capacidad del enfoque basado en FRET que es un método de diagnóstico preferido según la presente invención para diferenciar entre Acs anti-beta1 de pronóstico distinto en insuficiencia cardiaca, preferiblemente debida a DCM, proporciona la relevancia clínica de este método.

Todavía en un aspecto adicional la presente invención se refiere a un agente de diagnóstico. Tal agente de diagnóstico consiste en o comprende al menos un péptido de la presente invención. Preferiblemente el agente de diagnóstico consiste en un péptido de la presente invención, en el que el péptido comprende preferiblemente una etiqueta. Tal etiqueta puede seleccionarse del grupo que comprende etiquetas radiactivas y etiquetas fluorescentes. Los expertos en la técnica conocen etiquetas respectivas. Normalmente, el péptido es la parte del agente de diagnóstico que confiere características de unión específica al agente de diagnóstico, uniéndose preferiblemente a anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico, mientras que la etiqueta confiere las características de señalización al agente de diagnóstico.

El agente de diagnóstico puede comprender, aparte del péptido con etiqueta o sin etiqueta de la presente invención, un compuesto biológicamente activo adicional. Tal compuesto biológicamente activo adicional, en una realización preferida, es un medio para conferir características de señalización al agente de diagnóstico, particularmente en caso de que el péptido de la presente invención no tenga etiqueta. Por ejemplo, el compuesto biológicamente activo adicional puede ser un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, y más preferiblemente un anticuerpo con etiqueta que se une específicamente a un péptido de la presente invención o a un complejo que consiste en un péptido de la presente invención y un anticuerpo anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos, preferiblemente un anticuerpo anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico.

El kit según la presente invención comprende al menos una característica que se selecciona del grupo que comprende un péptido de la presente invención y un agente de diagnóstico según la presente invención. En una realización el kit comprende además un folleto de instrucciones, y/o un tampón para su uso en la aplicación del kit, y/o al menos un recipiente de reacción para llevar a cabo la reacción de detección para la que se usa o debe usarse el kit. En una realización adicional, parte o la totalidad de los reactivos usados en relación con la aplicación de dicho kit están presentes como porciones útiles para llevar a cabo la(s) reacción/reacciones para la(s) que debe usarse el kit.

En realizaciones preferidas, las siguientes abreviaturas tendrán los siguientes significados: Acs o acs: anticuerpo, Acs o acs: anticuerpos, AR: receptor adrenérgico, EC: extra celular y AA: aminoácido.

Ahora se ilustrará adicionalmente la presente invención mediante las siguientes figuras y ejemplos, de los cuales pueden tomarse ventajas, características y realizaciones adicionales, mediante lo cual

la figura 1 muestra diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de cardiomiopatía inmunitaria dilatada inducida por autoanticuerpos. Se demuestra la cascada de señalización mediada por receptor beta-adrenérgico (se representan el beta-receptor (beta-AR), la proteína G (subunidades G-alfa y beta, gamma, y la adenilil ciclasa (AC)) y su bloqueo mediante un agente beta-bloqueante (panel izquierdo) o un péptido cíclico (panel derecho). Se ilustra un modo de acción terapéutico del péptido, que es capturar anticuerpos contra el receptor beta1-adrenérgico mediante el péptido cíclico.

La figura 2 demuestra la diferencia en el reconocimiento de péptido beta 1-EC<sub>II</sub> lineal frente al cíclico de 25 AA, concretamente el péptido Ic, mediante anticuerpos anti-receptor beta1-EC<sub>II</sub> específicos generados en ratas de Lewis CrIBR usando beta1-EC<sub>II</sub>/GST como antígeno. Las columnas representan la cantidad de anticuerpos anti-beta 1-EC<sub>II</sub> específicos unidos a péptidos beta 1-EC<sub>II</sub> o bien lineales (negras) o bien cíclicos (blancas). Se muestran los resultados representativos obtenidos a partir de seis ratas diferentes.

La figura 3 es una representación esquemática de las diversas configuraciones experimentales para la prevención y/o la terapia de cardiomiopatía inmunitaria, en la que “cardiomiopatía inmunitaria” significa animales inmunizados no tratados (fenotipo cardiomiopático); “prevención/terapia con bisoprolol” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica o terapéutica usando bisoprolol; y “prevención/terapia con péptido” significa animales inmunizados tratados usando un péptido según la presente invención; terapia de “adición” significa tratamiento paralelo de animales inmunizados con bisoprolol (15 mg/kg, administrados por vía oral) y el péptido cíclico Ic (1 mg/kg, por vía intravenosa). Se usaron ratas de Lewis CriBR como animales. Se indican los números de animales usados en las diversas ramas del experimento y el final de cada rama de tratamiento; los datos mostrados en todas las figuras siguientes se refieren a estos números; los controles de bisoprolol se trataron con 15 mg/kg administrados por vía oral, los controles de péptido con 1 mg/kg i.v. o s.c. y los controles de NaCl/GST s.c.

La figura 4 es un diagrama que indica el transcurso de títulos de anticuerpos anti-1-EC<sub>II</sub> específicos en la rama de prevención del estudio, en el que “beta1, sin tratar” significa animales inmunizados que no se tratan, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados que se tratan de manera profiláctica usando bisoprolol a una dosificación de 15 mg/kg, y “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA i.v.” y “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA s.c.” significa animales inmunizados que se tratan de manera profiláctica por vía intravenosa (i.v.) o por vía subcutánea (s.c.) usando el péptido Ic a una dosificación de 1 mg/kg cada uno.

La figura 5 es el transcurso de tiempo de la frecuencia cardiaca de animales en la rama de prevención del estudio, en el que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados no tratados, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con bisoprolol, los 4 primeros meses con 10 mg/kg después con 15 mg/kg, “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con el péptido Ic (1 mg/kg; n=4 por vía subcutánea, n=4 por vía intravenosa); y “Cont.” significa grupos control correspondientes; “lpm” significa latidos por minuto.

La figura 6 es un diagrama que muestra los diámetros internos del ventrículo izquierdo telesistólicos y telediastólicos determinados mediante ecocardiografía (sistema ecocardiográfico: Vivid Seven, GE Vingmed Ultrasound, Horten, Noruega, equipado con un transductor de 10-12,5 MHz), en el que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados no tratados, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con bisoprolol, “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con el péptido de 25 AA Ic; y “Cont.” significa grupos control correspondientes, en el que LVES/LVED es el diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo/ diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.

La figura 7 es un diagrama que muestra el “índice cardiaco” en ml/min./g (peso corporal) determinado mediante ecocardiografía (sistema ecocardiográfico, véase anteriormente), en el que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados no tratados, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con bisoprolol, “Beta1/pépt.” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con el péptido beta 1-EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic; y “Cont.” significa grupos control correspondientes.

La figura 8a es un diagrama que indica el transcurso de títulos de anticuerpos anti-EC<sub>II</sub> específicos en la rama de terapia del estudio, facilitado como % de los títulos respectivos en el punto de tiempo en el que se inició el tratamiento (“valor inicial”), en el que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados, “Beta1/ bisop.” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con bisoprolol (15 mg/kg, por vía oral), “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con el péptido de 25 AA Ic a una dosificación de 1 mg/kg por vía intravenosa, y “Beta1/bisop. + pépt. de 25 AA” significa tratamiento con una combinación de bisoprolol y el péptido de 25 AA Ic. La terapia se inició tras 8 meses de inmunización regular (1x cada mes). Se continuó la inmunización mensual con terapia.

La figura 8b es un diagrama que compara el transcurso de títulos de anticuerpos anti-EC<sub>II</sub> específicos dependientes de las diferentes variantes peptídicas usadas en la rama de terapia del estudio, en el que 25 AA significa el péptido cíclico Ic, 18 AA significa la variante de 18 aminoácidos más corta, y 16 AA la variante de 16 aminoácidos más corta del péptido. “Beta 1 no tratados” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados, “Beta1/pépt. EC<sub>I</sub>” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con un péptido correspondiente al primer bucle de receptor extracelular (1 mg/kg, por vía intravenosa, control negativo, se supone y se muestra que no afecta a los títulos de anticuerpos anti-EC<sub>II</sub>), “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA, EC<sub>II</sub> de 18 AA, EC<sub>II</sub> de 16 AA” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con el péptido de 25 AA, 18 AA o 16 AA, respectivamente.

La figura 9 es un diagrama que indica la frecuencia cardiaca de los animales a partir del estudio de terapia, en el que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados; “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con bisoprolol (15 mg/kg) tras 8 meses; “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA, 18 AA, 16 AA” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con 1 mg/kg del péptido de 25 AA, 18 AA o 16 AA, respectivamente, tras 8 meses de inmunización, y “Cont.” significa los grupos control respectivos; “Beta1/bisop. + Pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con una combinación de bisoprolol y el péptido beta 1-EC<sub>II</sub> de 25 AA tras 8 meses.

- La figura 10 está dividida en 4 diagramas, que muestran cada uno el transcurso de tiempo de diámetros internos del ventrículo izquierdo telesistólicos y telediastólicos determinados mediante ecocardiografía, en los que “beta 1 no tratados” significa inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados, y “Cont.” animales control no inmunizados trazados junto con (a) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con bisoprolol 15 mg/kg (“Beta1/bisop.”), animales control no inmunizados tratados con bisoprolol (“Bisop. cont.”), (b) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con péptidos cíclicos de 25 AA, concretamente péptido Ic, (1 mg/kg, comenzando 8 meses tras la inmunización; “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA”), y animales control no inmunizados en los que se inyectó el mismo péptido (“Pépt. cont.”), (c) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con bisoprolol (“Beta1/bisop.”), péptidos cíclicos de 25 AA (“Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA”), o una combinación de bisoprolol/péptido cíclico (Beta1/bisop. + Pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA), y (d) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con péptidos EC<sub>II</sub> de 25 AA/18 AA/16 AA, o el péptido EC<sub>I</sub>, concretamente péptido 1Ib o 1Ic, respectivamente (“Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA, EC<sub>II</sub> de 18 AA, EC<sub>II</sub> de 16 AA”, o “Beta1/pépt. EC<sub>I</sub>”). LVES significa diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo y LVED significa diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.
- La figura 11 está dividida en 4 diagramas que representan el transcurso de tiempo del “índice cardiaco” en ml/min./g (peso corporal) determinado mediante ecocardiografía (sistema ecocardiográfico, véase anteriormente), en los que “beta 1 no tratados” significa inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados, y “Cont.” animales control no inmunizados trazados junto con (a) animales inmunizados positivos para anticuerpos anti-1 tratados con bisoprolol 15 mg/kg (“Beta1/bisop.”), animales control no inmunizados tratados con bisoprolol (“Bisop. cont.”), (b) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con péptidos cíclicos de 25 AA, concretamente péptido Ic, (1 mg/kg, comenzando 8 meses tras la inmunización; “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA”), y animales control no inmunizados en los que se inyectaron péptidos cíclicos de 25 AA (“Pépt. cont.”), (c) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con bisoprolol (“Beta1/bisop.”), péptidos cíclicos de 25 AA (“Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA”), o una combinación de bisoprolol/péptido cíclico (Beta1/bisop. + Pep. EC<sub>II</sub> de 25 AA) tras 8 meses, y (d) animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados con péptidos EC<sub>II</sub> de 25 AA/18 AA/16 AA, o el péptido beta 1-EC<sub>I</sub>, preferiblemente péptido 1Ib y 1Ic, respectivamente (“Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA, EC<sub>II</sub> de 18 AA, EC<sub>II</sub> de 16 AA”, o “Beta1/pépt. EC<sub>I</sub>” (control negativo)).
- La figura 12 muestra parámetros hemodinámicos obtenidos en el estudio de prevención, en detalle la frecuencia cardiaca (a), la tensión arterial sistólica del LV (b), la tensión telediastólica del LV (c) y la contractilidad/relajación (d), en la que “no tratados con beta 1” significa animales inmunizados no tratados, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con bisoprolol, “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con el péptido cíclico beta 1-EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic y “Cont.” significa grupos control respectivos.
- La figura 13 muestra parámetros hemodinámicos obtenidos en el estudio de terapia, en detalle la frecuencia cardiaca (a), la tensión arterial sistólica del LV (b), la tensión telediastólica del LV (c) y la contractilidad/relajación (d), en la que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-beta1 no tratados, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con bisoprolol, “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con el péptido cíclico beta1-EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic, o con una combinación de bisoprolol/ péptido cíclico (“adición”) tras 8 meses de inmunización, y “Cont.” significa los grupos control respectivos.
- La figura 14 muestra diferentes parámetros de laboratorio determinados en el suero de animales al final del estudio de prevención (paneles superiores) y el de terapia (paneles inferiores), respectivamente, en la que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados positivos para anticuerpos anti-1 no tratados, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados de manera profiláctica (paneles superiores) o de manera terapéutica (paneles inferiores) tratados con bisoprolol, “Beta1/pépt.” significa animales inmunizados de manera profiláctica (paneles superiores) o de manera terapéutica (paneles inferiores) tratados con el péptido de 25 AA Ic, “adición” significa animales inmunizados positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con una combinación de bisoprolol y el péptido cíclico de 25 AA Ic tras 8 meses de inmunización, y “Cont.” significa los grupos control respectivos tanto en el estudio de prevención como en el de terapia. Crea significa creatinina, Hst-N significa urea, GOT significa transaminasa glutámica oxaloacética, Bili significa bilirrubina, GLDH significa glutamato lactato deshidrogenasa.
- La figura 15 muestra parámetros macroanatómicos de los animales del estudio de prevención como columnas. Se determinaron los pesos relativos de diferentes órganos en g, en la que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados que no se tratan, “Beta1/bisop.” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica con bisoprolol a una dosificación de 15 mg/kg y “Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA” significa animales inmunizados tratados de manera profiláctica usando el péptido EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic a una dosificación de 1 mg/kg cada uno; “Cont.” significa los grupos control respectivos; Riñón D significa derecho y Riñón I significa izquierdo.
- La figura 16 muestra parámetros macroanatómicos de los animales del estudio de terapia como columnas. Se determinaron los pesos relativos de diferentes órganos en g, en la que “beta 1 no tratados” significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 que no se tratan, “Beta1/bisop.” significa animales

5 inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con bisoprolol a una dosificación de 15 mg/kg, "Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA" significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con el péptido EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic a una dosificación de 1 mg/kg cada uno, "adición" significa tratamiento terapéutico de animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 con una combinación de bisoprolol/péptido cíclico tras 8 meses de inmunización, y "Cont." significa los grupos control respectivos. Riñón D significa derecho y Riñón I significa izquierdo.

10 La figura 17 muestra densidades de receptores beta-adrenérgicos cardiacos en el corazón de los animales del estudio de prevención como columnas. El panel superior muestra la cantidad total de beta-AR de membrana cardiaca, dada en femtomoles por miligramo (fmol/mg) de proteína de membrana. El panel inferior muestra la cantidad de los subtipos beta2-AR (izquierda) y beta1-AR (derecha), respectivamente. "Beta 1 no tratados" significa animales inmunizados positivos para anticuerpos anti-1 que no se tratan, "Beta1/bisop." significa animales inmunizados positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera profiláctica con bisoprolol a una dosificación de 15 mg/kg y "Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA" significa animales inmunizados positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera profiláctica usando el péptido EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic a una dosificación de 1 mg/kg cada uno, "Cont." significa los grupos control respectivos.

15 La figura 18 muestra densidades de receptores beta-adrenérgicos cardiacos en el corazón de los animales del estudio de terapia como columnas. El panel superior muestra la cantidad total de beta-AR de membrana cardiaca, dada en femtomoles por miligramo (fmol/mg) de proteína de membrana. El panel inferior muestra la cantidad de los subtipos beta2-AR (izquierda) y beta1-AR (derecha), respectivamente. "Beta 1 no tratados" significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 que no se tratan, "Beta1/bisop." significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con bisoprolol a una dosificación de 15 mg/kg y "Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA" significa animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica usando el péptido EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic a una dosificación de 1 mg/kg cada uno; "adición" significa tratamiento terapéutico de animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 con una combinación de bisoprolol/péptido cíclico tras 8 meses de inmunización, y "Cont." significa los grupos control respectivos.

20 La figura 19 muestra los resultados de ensayos de memoria de células T llevados a cabo con células T preparadas a partir del bazo de animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados ("Beta1 no tratados") en comparación con los de animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados (a) de manera profiláctica o (b) de manera terapéutica con bisoprolol (Beta1/bisop.) o el ciclopéptido cíclico EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic ("Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA"). "Cont." significa los animales control no inmunizados respectivos. Los ensayos se llevaron a cabo según Schmidt J. *et al.* (2003) J Neuroimmunol 140, 143- 152. En resumen, para purificar células T CD4+ a partir de preparaciones de células del bazo, se redujeron las células B y células T CD8+ mediante perlas magnéticas disponibles comercialmente (MACS®), proporcionando una pureza de células CD4+ > 85%. Entonces se incubaron conjuntamente 1x10<sup>5</sup> CD4+ de las células T purificadas en placas de 96 pocillos con 1x10<sup>6</sup> células presentadoras de antígeno tímicas irradiadas (preparadas a partir de una rata más joven). Los reactivos añadidos en los diferentes ensayos (condiciones) fueron: glutatión-S-transferasa (GST) 10 µg/ml, concanavalina A (ConA, control positivo) 2 µg/ml, péptido EC<sub>II</sub> de 25 AA (Pépt. de 25 AA) 10 µg/ml y proteína de fusión GST/beta1-EC<sub>II</sub> (FP) a una concentración de 1,0 y 0,1 µg/ml, respectivamente. Se normalizaron las reactividades de células T medidas con respecto a las reactividades de células T respectivas obtenidas con derivado de proteína purificado (PPD) 10 µg/ml empleado en paralelo en cada condición. Tras 48 horas de incubación, se retiró el 50% de los sobrenadantes y volvieron a colocarse en medio reciente. Entonces se pulsaron las células con [3H]-timidina 1,25 µCi/pocillo y se incubaron adicionalmente durante 16 horas antes de recoger las células, y se midió la radiactividad incorporada en el ADN usando una placa beta.

25 La figura 20 muestra los resultados de ensayos ELISPOT llevados a cabo con células B preparadas a partir o bien del bazo o bien de la médula ósea de animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 no tratados ("beta1 no tratados") en comparación con las aisladas a partir de animales inmunizados cardiomiopáticos positivos para anticuerpos anti-1 tratados de manera terapéutica con el péptido EC<sub>II</sub> de 25 AA Ic ("Beta1/pépt. EC<sub>II</sub> de 25 AA"). Para los ensayos, se recubrieron placas de ELISPOT durante la noche o bien con 1,8 µg/ml de anticuerpo anti-IgG de rata (H+L) o bien el antígeno específico (GST/beta1-EC<sub>II</sub>-FP) en tampón Tris 0,05 mol/l, pH 9,4. Entonces se lavaron las placas 3 veces y se bloquearon con BSA durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, se incubaron las placas durante la noche a 37°C con células B o bien del bazo o bien de la médula ósea (cultivadas en medio RPMI 1640/X-VIVO-15 complementado con suero de ternero fetal (FCS)) al 10% con de 1x10<sup>6</sup> a 1x10<sup>3</sup> células por pocillo. Tras 12 horas se descartaron las células B y se lavaron las placas con la IgG secretada a partir de células B unida varias veces (PBS/Tween al 0,5%) antes de la adición de anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con fosfatasa alcalina (0,3 µg/ml) para detectar IgG de rata unida. Entonces se incubaron las placas durante otras 3 horas a 37°C, se lavaron varias veces con PBS/Tween al 0,5% y se revelaron usando LMP/BICP 5:1 (1 ml por pocillo; "LMP" significa agarosa de bajo punto de fusión, y "BICP" significa sal de p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, un colorante de color azul) permitiendo una cuantificación de los puntos azules obtenidos, representando cada punto o bien (a) una IgG o bien (b) una célula de bazo o de médula ósea que secreta IgG específica de antígeno, respectivamente. El panel a representa la cantidad total de células que secretan IgG por 104 células recubiertas, el panel b representa la fracción de células que secretan específicamente IgG anti-beta1-

EC<sub>II</sub>; "BM" significa médula ósea.

La figura 21 muestra ejemplos representativos de la caracterización espectroscópica del EC<sub>II</sub> de 25 AA, concretamente el péptido cíclico Ic mediante (a) cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y (b) método de espectroscopía de masas (MALDI-TOF). Se llevó a cabo HPLC en un instrumento Separation Modul 2690 de Waters junto con un detector de UV Dual Lambda de Waters, con una longitud de onda fijada a 220 nm. Tras la síntesis y ciclización de péptidos, se disolvieron las muestras en H<sub>2</sub>O/acetonitrilo al 5% (ACN) y se cargaron sobre una columna de fase inversa (Nuclosil 100 - 5/C18, Macherey-Nagel Inc., Alemania; longitud de columna de 250 mm, diámetro de 4 mm) con un flujo de 1 ml/min. Para la separación se usó un gradiente del 5% al 60% de ACN con TFA al 0,2%. Se observó un pico muy pequeño de péptido  $\alpha$ 1- EC<sub>II</sub> lineal de 25 AA, normalmente entre 14 y 16 min., mientras que las fracciones que contenían el péptido beta1-EC<sub>II</sub> cíclico de 25 AA aparecieron en un intervalo de desde 18 hasta 22 min. Se analizaron adicionalmente alícuotas de estas fracciones que contenían 20-80  $\mu$ g/ml del péptido cíclico mediante espectroscopía de masas. Las masas moleculares esperadas del péptido beta1-EC<sub>II</sub> de 25 AA lineal frente al cíclico son de 2948-2949 frente a 2929-2930, respectivamente. El ejemplo dado en la figura 21b muestra un espectro de masas representativo de un péptido beta1-EC<sub>II</sub> cíclico de 25 AA. Las ordenadas muestran intensidades de señal ("u.a." significa unidades arbitrarias), las abscisas la masa molecular (m/z).

La figura 22 muestra un enfoque basado en células para la detección de Acs anti-beta1 funcionales. a, la activación de receptor inducida por la unión de anticuerpos a sus bucles extracelulares accesibles conduce a un aumento de cAMP mediante activación secuencial de proteínas G y adenilil ciclasa (AC) que se detecta mediante FRET como cambio conformacional en el dominio de unión a cAMP de Epac1 fusionado entre proteínas CFP (cian) e YFP (amarillo) (Epac1- camps). b, medición de los niveles de cAMP (fmol/célula) en células HEK $\beta$ 1AR estimuladas con isoproterenol mediante radioinmunoensayo convencional (Amersham) o c, Epac-FRET. Se muestra uno de 3 experimentos independientes (CE50 = 0,53  $\pm$  0,19 nM). El intervalo de cAMP que puede monitorizarse mediante Epac-FRET se presenta mediante la barra gris horizontal en la figura 22b. A isoproterenol 0,1 nM, Epac1-camps se satura indicando una concentración de cAMP intracelular a  $\sim$ 20  $\mu$ M. Este sensor extremadamente sensible se caracteriza por un alto intervalo dinámico a concentraciones de cAMP fisiológicamente relevantes de 0,1-20  $\mu$ M (que sólo se cubren por el 10% de la señal de cAMP-RIA máxima), haciendo que cambios de cAMP minoritarios, no significativos en ensayos convencionales, puedan detectarse bien mediante Epac-FRET. d, se sometió a prueba IgG preparada a partir de ratas inmunizadas con el segundo bucle extracelular del beta1-AR humano (beta1-EC<sub>II</sub>) para determinar la actividad usando células HEK $\beta$ 1AR transfectadas con Epac1-camps, y se comparó con animales no inmunizados para evaluar la fiabilidad del método. Se presentan perfiles de razón de FRET (% corresponde al cambio relativo en la razón de intensidad de YFP/CFP; Iso, (-) Isoproterenol). La disminución de FRET refleja un aumento de cAMP intracelular (experimentos representativos, n=6).

Figura 23 muestra que la medición de cAMP mediante Epac-FRET detecta Acs anti-beta 1 en pacientes con DCM. a, ninguna de las IgG preparadas a partir de controles sanos (n=40) indujo una respuesta de cAMP significativa en células vivas (izquierda). La IgG de pacientes con DCM que se consideró anteriormente que eran positivos para Acs anti-beta1 5 (Acs+) provocaron respuestas de cAMP notables (49,5 $\pm$ 3,8% de la señal de Iso máxima, centro). La IgG del 33,9% de pacientes que se consideró anteriormente que eran negativos para Acs anti-beta 1 (Acs-) demostró un aumento robusto pero significativamente menor de cAMP (30,7 $\pm$ 5,6%, P<0,01). Experimentos representativos de al menos 3 células para cada suero. b, histograma con curvas de normalidad de la intensidad de la señal de FRET en controles sanos y pacientes con DCM. Las respuestas de FRET inducidas por anticuerpos permiten diferenciar entre controles y tres grupos de actividad: sin actividad (n=17), actividad baja (n=19), actividad alta (n=20); P<0,01 para la diferencia entre "muy" y "poco" activantes). c, relación de concentración-respuesta entre IgG "muy" y "poco" activante que demuestra las diferentes capacidades de activación en un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo. Se presenta el %  $\pm$  EEM de la respuesta de cAMP inducida por Iso máxima (normalizada con respecto a cambios máximos en FRET producidos por un anticuerpo "muy" activante) (experimentos representativos, n=4).

La figura 24 muestra experimentos de bloqueo para diferentes clases de Acs anti-beta1. a, la producción de cAMP inducida por un anticuerpo "muy" activante sólo se atenúa mediante un péptido específico derivado del segundo bucle de beta1-AR extracelular (beta 1-EC<sub>II</sub>). b, las señales "poco" activantes pueden bloquearse en todos los casos mediante un péptido correspondiente al primer bucle extracelular (beta1-EC<sub>I</sub>) pero no mediante péptidos beta1-EC<sub>II</sub> (experimentos representativos de al menos 3 células por condición). c, resultados de los experimentos de bloqueo cruzado con IgG obtenida de n=7 pacientes con DCM "muy", y n=8 "poco" activantes representativos.

#### Ejemplo 1: Síntesis peptídica

Se sintetizan péptidos lineales usando el protocolo de Fmoc en fase sólida con un sintetizador peptídico múltiple (SYROII, MultiSynTech GmbH, Witten). Se realizó la síntesis usando derivados de aminoácidos con Fmoc protegidos en la cadena lateral con resinas de amida de Rink o de amida MBHA de Rink (Novabiochem-Merk Biosciences GmbH, Bad Soden). Se activan los aminoácidos con Fmoc mediante diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazol o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio.

Para la síntesis de péptidos cíclicos en la fase sólida, se incorpora Fmoc-Glu-ODmab u otro aminoácido con Fmoc que tiene un grupo protector de cadena lateral que puede escindirse selectivamente de manera ortogonal, en el extremo C-terminal del péptido lineal. Tras la eliminación selectiva de la cadena lateral de Dmab usando



monohidrato de hidrazina al 2% en N, N'-dimetilformamida, se trata el péptido lineal unido a resina en presencia de diisopropilcarbodiimida y N-hidroxi-9-azabenzotriazol en N,N'-dimetilformamida durante varias horas. Se monitorizó la ciclización tomando muestras y realizando la prueba de Kaiser y, si era necesario, se repitió. La escisión del péptido cíclico de la resina de síntesis genera una amida peptídica y la eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral se realiza mediante tratamiento de la resina con ácido trifluoroacético/triisopropilsilano/etanoditio/agua durante 2 horas.

#### Ejemplo 2: Modelo animal

El modelo animal usado en este ejemplo y cualquier otro ejemplo descrito en el presente documento, si no se indica lo contrario, es el modelo de rata análogo a seres humanos. Antes de evaluar y someter a prueba, respectivamente, este modelo de rata análogo de seres humanos usando bisoprolol y los diversos compuestos de la presente invención, más particularmente compuestos de fórmula Ic, se trataron los animales de la siguiente manera.

Con el fin de generar anticuerpos anti-receptor  $\beta_1$ , se inmunizaron los animales contra el segundo bucle del receptor  $\beta_1$ . En animales que no recibieron ni bisoprolol ni ningún péptido según la presente invención, se observó cardiomiopatía inmunitaria dilatada progresiva tras 8 meses de inmunización (figura 6). Tanto en el estudio de prevención como de terapia todos los animales inmunizados desarrollaron altos títulos de anticuerpos anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> estimulantes. El título de anticuerpos anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> específicos alcanzó un máximo entre 6 y 9 meses de refuerzo continuo de los animales cada 4 semanas (figuras 4 y 8).

Ejemplo 3: Prevención de cardiomiopatía inmunitaria en el modelo de rata análogo de seres humanos usando o bien bisoprolol o bien un péptido según la presente invención.

El tratamiento profiláctico de los animales administrando 1 mg/kg del péptido cíclico de fórmula Ic o bien por vía subcutánea (n=4) o bien por vía intravenosa (n=4) cada 4 semanas previno un aumento adicional del título de anticuerpos anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> específicos, incluso disminuyendo el título continuamente en el transcurso adicional del estudio (figura 4).

Para gran sorpresa de los presentes inventores, a partir del quinto mes no se observó más respuesta inmunitaria con el refuerzo con antígeno cada 4 semanas tal como se muestra en la figura 4. Esto significa que se produjo alguna clase de tolerancia inmunológica en el sentido de una hiposensibilización con anergia consecutiva, es decir supresión o activación reducida de las células B productoras de anticuerpos anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub>. Un análisis adicional de la naturaleza de esta "anergia inmunológica" reveló una importante disminución de las células B esplénicas productoras de anticuerpos específicos de antígeno en presencia del péptido cíclico (figura 20), mientras que células T CD4+ reguladoras y/u otros mecanismos de tolerancia inducida por célula T no explican de manera obvia este estado no sensible (figura 19a). La figura 20 muestra que las células B productoras específicamente de anticuerpos anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> se redujeron significativamente en el bazo de animales tratados con 1 mg/kg del péptido cíclico de fórmula Ic.

Tal como se muestra en las figuras 5 y 12, el péptido cíclico no disminuyó ni la frecuencia cardiaca ni la tensión arterial. Al contrario que esto, la administración profiláctica de bisoprolol, tal como también se muestra en las figuras 5 y 12, dio como resultado una reducción significativa de la frecuencia cardiaca siendo el nivel de significación de  $p < 0,01$ . Tal como puede extraerse de la figura 6, hay una diferencia significativa en el fenotipo ecocardiográfico entre animales positivos para anticuerpos anti- $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> que se sometieron a profilaxis y los que no recibieron tratamiento.

Ejemplo 4: Tratamiento de cardiomiopatía inmunitaria en el modelo de rata análogo de seres humanos usando bisoprolol y un péptido según la presente invención

Tras la administración del péptido de la presente invención, péptido Ic, cada 4 semanas, se observó una disminución sorprendentemente rápida del título de anticuerpos anti-beta 1-EC<sub>II</sub> específicos tal como se muestra en las figuras 8a y b. En comparación con animales tratados con péptido, los grupos que recibieron bisoprolol tenían títulos de anticuerpos contra beta1 incluso superiores. Tal como se muestra en las figuras 10 y 11, tanto con la administración de bisoprolol como también del péptido de la presente invención (tras la inmunización y generación de dilatación del LV significativa) no hubo progresión según se monitorizó mediante ecocardiografía en el plazo de 12 meses durante los cuales se sometieron los animales a esta clase de tratamiento, en comparación con animales positivos para anticuerpos anti-beta-1-EC<sub>II</sub> no tratados. Incluso más sorprendentemente, hubo una regresión significativa de la dilatación del LV en todos los animales tratados con péptido siendo  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> de 16 AA obviamente menos eficaz que  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> de 25 AA o  $\beta_1$ -EC<sub>II</sub> de 18 AA (figura 11), mientras que cuando se usó bisoprolol como único agente terapéutico no pudo invertirse completamente la dilatación del LV. Estos resultados indican que con bisoprolol solo puede estabilizarse la enfermedad, o, usando el péptido de la presente invención, puede incluso alcanzarse una regresión del fenotipo cardiomiopático.

Ejemplo 5: Administración de una combinación que consiste en un péptido cíclico de la presente invención y bisoprolol

Tanto en el modelo de rata como también en pacientes con DCM pueden eliminarse los efectos estimulantes, es

decir alostéricos, de anticuerpos contra  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> con un beta-bloqueante cardioselectivo (usado según medicación convencional). A partir de esto se concluyó que los pacientes positivos para (auto)anticuerpos contra  $\beta$ 1 se beneficiarán de la presente invención más que los pacientes negativos para (auto)anticuerpos  $\beta$ 1. Esto sugiere una eficacia incluso superior de una terapia de combinación que consiste en bisoprolol y un péptido de la presente invención para pacientes positivos para anticuerpos anti-beta-1-EC<sub>II</sub>. Los supuestos mecanismos aditivos pueden ser, entre otros, protección frente a la regulación por disminución de receptores inducida por anticuerpos por parte del péptido junto con una regulación por incremento de receptores  $\beta$ 1 sinérgica mediante los beta-bloqueantes (como bisoprolol o metoprolol, véase la figura 18). Para los efectos sinérgicos en el modelo de animal, véanse las figuras 10c, 11c y 13.

5 Ejemplo 6: Administración de variantes más cortas del péptido cíclico de la presente invención (es decir péptidos cíclicos de 16 aminoácidos frente a 18 aminoácidos frente a 25 aminoácidos)

En general, el número de aminoácidos y por tanto la longitud de la estructura primaria parece ser crucial para los efectos biológicos de los péptidos de la presente invención. Se piensa que una longitud de péptido igual o superior a 26 aminoácidos (estructura primaria) puede estimular directamente (es decir, sin el uso de proteínas portadoras) células T inmunocompetentes y por tanto provocar un aumento paradójico de la producción de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1 mediante la estimulación de células B mediada por célula T. Por tanto, en el contexto del estudio de terapia, se trató un número limitado de animales piloto con variantes peptídicas más cortas que el péptido de 25 aminoácidos 1c, es decir variantes que comprendían o bien 18 o bien 16 aminoácidos del péptido cíclico. Los constructos usados fueron: EC<sub>II</sub> de 18 AA, ciclo(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Gln) ; y EC<sub>II</sub> de 16 AA, ciclo(Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Tyr-Gln)). Tras la administración de variantes peptídicas más cortas del péptido de la presente invención cada 4 semanas, también se observó una rápida disminución del título de anticuerpos anti-beta 1-EC<sub>II</sub> específicos en el plazo de los 6 primeros meses de terapia. Mientras que en los siguientes meses los títulos de anticuerpos anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> circulantes se redujeron aproximadamente en el mismo grado con cualquiera del péptido cíclico de 25 AA 1c o el constructo de 18 AA (véase la figura 8b), proporcionando ambos también una eficacia biológica similar (es decir inversión del fenotipo cardiomiopático; véase la figura 10d), el constructo de 16 AA tendió a ser menos eficaz con respecto tanto a la reducción continua de títulos de anticuerpos anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> circulantes (véanse los rombos grises, figura 8b: tras la inyección de péptido los títulos de anticuerpos permanecen estables en vez de disminuir) como a la eficacia biológica (es decir resultados ambiguos en 2 ratas tratadas, teniendo un animal una inversión completa del fenotipo cardiomiopático, y el otro animal disfunción y dilatación del LV progresiva; véanse las figuras 10d y 11d). Estos resultados preliminares indican que parece ser necesaria una determinada longitud de los péptidos homólogos del receptor cíclicos para obtener los efectos biológicos beneficiosos. Sin embargo, debe indicarse que con los 16 AA al menos se detuvo o se estabilizó la progresión de la enfermedad (comparable con los efectos de una monoterapia con agentes beta-bloqueantes), según se monitorizó mediante ecocardiografía en el plazo de 12 meses durante los cuales se sometieron los animales a esta clase de tratamiento, en comparación con animales positivos para anticuerpos anti-beta 1-EC<sub>II</sub> no tratados (figura 10d).

Ejemplo 7: Ensayo de diagnóstico para anticuerpos contra el receptor  $\beta$  usando el sistema de cAMP

Esta detección de anticuerpos contra el receptor  $\beta$  (Acs anti- $\beta$ 1) en líquidos corporales se basa en la medición del impacto de anticuerpos sobre la transducción de señales mediada por el receptor  $\beta$  mediante detección óptica de cambios en la concentración del mensajero intracelular adenosina monofosfato cíclico (cAMP). En principio, se describe un sistema de prueba de cAMP de este tipo en la solicitud de PCT WO 2005/052186.

Para detectar Acs anti- $\beta$ 1 mediante su capacidad para inducir aumentos de cAMP mediados por receptor  $\beta$ 1, se emplea un nuevo sensor de cAMP altamente sensible (Epac1-camps) usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Con esta tecnología, se analizó un total de 56 sueros de pacientes y 40 sueros de control de un colectivo usando este método, en el que el colectivo de pacientes es el mismo que el ya publicado por Jahns *et al.* en 1999 y se sometieron a ensayo usando un inmunoensayo peptídico (ELISA) y ensayos de cAMP marcado con <sup>125</sup>yodo para detectar anticuerpos contra receptor  $\beta$  (Jahns *et al.*, Circulation 1999, citado anteriormente). Todos estos pacientes que habían sido positivos para anticuerpos contra receptor  $\beta$  (n = 17) en este estudio anterior, también mostraron una señal de Epac-1 significativa (49 ± 4%). Las IgG de controles y de aproximadamente la mitad (17/39) de los pacientes con DCM que se consideró anteriormente que eran negativos para anticuerpos anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> no afectaron significativamente al cAMP celular.

Sorprendentemente, la nueva tecnología detectó Acs anti- $\beta$ 1 en más de la mitad (22/39) de los pacientes con DCM que anteriormente se consideró que eran negativos para anticuerpos, pero las señales de cAMP inducidas por estos anticuerpos eran generalmente menores (31±5%) que en el grupo anterior.

55 Los betabloqueantes no lograron prevenir completamente la activación de receptor  $\beta$ 1 inducida por anticuerpos, siendo carvedilol más eficaz que otros  $\beta$ -bloqueantes. Los experimentos de bloqueo demostraron que IgG "muy" o "poco" activantes se bloqueaban mejor mediante péptidos correspondientes al segundo o al primer bucle del receptor  $\beta$ 1 extracelular, respectivamente.

Tomados en conjunto, los análisis de señales de Epac-FRET de los 56 pacientes revelaron una prevalencia de Ac anti-beta 1 de casi el 70% (n=39/56) en DCM, lo que es muy superior a lo detectado mediante ELISA, inmunofluorescencia y cAMP-RIA, lo que demuestra la idoneidad de los péptidos según la presente invención para el diagnóstico de DCM. El grupo Acs+ puede separarse en dos subgrupos basándose en los datos de FRET, que se clasificaron como “poco” (amplitud de FRET del 20-40% de isomax) y “muy” activantes (amplitud de FRET  $\geq$ 40% de isomax).

Se estudiaron con más detalle las dos poblaciones positivas para FRET recién identificadas. Analizando la relación de concentración-respuesta se encontró que la IgG “poco” activante, incluso a concentraciones superiores, no alcanzó niveles de cAMP de un orden de magnitud similar al inducido por IgG “muy” activante (figura 23). Este hallazgo hace que los títulos menores de Acs anti-beta1 en sueros de pacientes “poco” activantes como posible explicación para la respuesta de cAMP “inferior” sea más bien poco probable, y sugiere un mecanismo de acción diferencial de este tipo de Acs anti-beta1 a nivel del receptor.

Un motivo para las diferencias cualitativas entre anticuerpos en cuanto a la actividad de FRET puede ser las diferencias en los epítomos de receptor seleccionados como diana por diferentes Acs anti- $\beta$ 1. Anteriormente también se han generado satisfactoriamente Acs anti- $\beta$ 1 funcionales contra los epítomos  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> y  $\beta$ 1-EC<sub>I</sub> en animales mediante inmunización, lo que sugiere una determinada antigenicidad de estos dos epítomos (Mobini R, *et al.*, J. Autoimmun. 1999; 13: 179-186). Para analizar si diferentes epítomos seleccionados como diana pueden explicar las capacidades de activación de FRET “altas” o “bajas” de Acs anti- $\beta$ 1, se incubaron con péptidos sintéticos correspondientes a  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> o a  $\beta$ 1-EC<sub>I</sub>, y se analizó el efecto de bloqueo de cada uno de estos péptidos. Estos experimentos de bloqueo revelaron que las señales de FRET de IgG “muy” activante podían atenuarse mediante péptidos correspondientes a  $\beta$ 1-EC<sub>II</sub>, pero no mediante péptidos  $\beta$ 1-EC<sub>I</sub> (7 pacientes sometidos a prueba; figura 24). En cambio, la IgG “poco” activante sólo se inhibió mediante péptidos correspondientes a  $\beta$ 1-EC<sub>I</sub> (8 pacientes sometidos a prueba; figura 24). Todos los sueros de pacientes con DCM con Acs anti- $\beta$ 1 que proporcionaban señales de cAMP cerca del valor de corte entre los anticuerpos “muy” y “poco” activantes se estudiaron en tales experimentos de bloqueo para determinar la exactitud de la clasificación. Se confirmó que los tres pacientes que se consideró anteriormente que eran positivos para Acs, que mostraban fuertes señales de Epac-FRET (respuesta de FRET de entre el 40-60%), eran positivos para Acs anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> “muy” activantes, mientras que todas las IgG “poco” activantes (que proporcionaban respuestas de Epac-FRET de entre el 20-40%) se inhibieron mediante el péptido  $\beta$ 1-EC<sub>I</sub>. Estos datos concuerdan con la hipótesis de que las diferencias en la producción de cAMP de anticuerpos “muy” y “poco” activantes se basan lo más probablemente en los diferentes epítomos seleccionados como diana, y por tanto en diferentes conformaciones de receptores activos inducidas. Para tratar la cuestión de si las diferencias en el tipo y la capacidad de activación de Acs anti- $\beta$ 1 puede ser relevante para el transcurso clínico de la insuficiencia cardiaca debida a DCM se empleó una regresión de Cox de múltiples variables en un análisis retrospectivo sobre la mortalidad por cualquier causa en los 56 pacientes con DCM analizados en este caso a lo largo de un periodo de seguimiento de 10 años. La figura 4 representa las curvas de supervivencia agrupadas según “sin” anticuerpos, anticuerpos “poco” y “muy” activantes, ajustados para la edad, sexo, clase funcional según la Asociación Cardiaca de Nueva York, estado hemodinámico y medicación. El riesgo de mortalidad en el grupo de anticuerpos “poco” activantes no fue significativamente diferente de pacientes negativos para Acs anti- $\beta$ 1 activantes. En cambio, los anticuerpos “muy” activantes tuvieron una mortalidad significativamente superior a la de anticuerpos “poco” activantes, lo que sugiere que los Acs anti- $\beta$ 1-EC<sub>II</sub> están asociados con un peor pronóstico en DCM. Esto corrobora la posible relevancia fisiopatológica y clínica de Acs anti-beta 1 activantes en la insuficiencia cardiaca.

En este ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se mide la producción de cAMP inducida por anticuerpos en células individuales tales como, por ejemplo, células HEK 293 o células CHW que expresan el receptor  $\beta$ -adrenérgico preferiblemente en una concentración de 0,15 bis 0,3 pmol/mg de proteína de membrana y se transfectan transitoriamente con un sensor de Epac-1.

El sensor de Epac-1 usado es una proteína de fusión de Epac (proteína de intercambio 1 activada directamente por cAMP) y el dominio de unión E157-E316 acoplado a una proteína fluorescente amarilla (YFP) y la proteína fluorescente cian (CFP) tal como se describe en el artículo de Nicolaev *et al.* (JBC, 2004, 279 (36), 37215-8).

Estas células se transfectan preferiblemente con 10  $\mu$ g de sensor de Epac-1/placa de 10 cm (diámetro) usando preferiblemente precipitación con fosfato de calcio. Preferiblemente se cambia el medio de 12 a 18 horas tras la transfección. Preferiblemente, de 24 a 48 horas tras la transfección se determina la transducción de señal mediada por receptor inducida por anticuerpo midiendo los cambios en el título de cAMP celular usando la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia descrita en Nikoaev *et al.* (citado anteriormente).

El ensayo se realiza preferiblemente usando muestras de suero de pacientes que padecen cardiomiopatía dilatada y controles sanos. Se aíslan anticuerpos de IgG preferiblemente a partir del suero usando el método de ácido caprílico, tal como se describe en el artículo de Jahns *et al.* (Eur. J. Pharmacol., 1996, 113, 1419-1429). Antes de usar las muestras, preferiblemente se diluyen con tampón PBS 1:6. Tras la adición de los anticuerpos puede detectarse un aumento del nivel de cAMP intracelular tras de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 segundos, según se expresa mediante una disminución en la señal de fluorescencia generada por la unión de cAMP al sensor de Epac-1 (correspondiente a la activación del receptor). Se calcula el valor inducido por

anticuerpos como porcentaje del valor obtenido tras la adición de 5  $\mu$ M del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol.

- 5 Aparte de esto, usando este ensayo particular se identificaron dos grupos adicionales de pacientes positivos para anticuerpos: tres pacientes tenían un anticuerpo contra receptor que tenía un efecto similar sobre el aumento de cAMP intracelular ( $44 \pm 2\%$ ) y otros 19 pacientes tenían anticuerpos positivos para Epac-1-FRET que tenían un efecto significativamente inferior sobre el aumento de cAMP ( $31 \pm 5\%$ ). Los experimentos de bloqueo usando péptidos homólogos de epítipo mostraron que los anticuerpos del primer grupo se dirigen contra el segundo bucle de receptor  $\beta$ 1 extracelular, mientras que los anticuerpos del segundo grupo se dirigen contra el primer bucle de receptor  $\beta$ 1 extracelular.
- 10 Este método novedoso de detección de Acs anti-beta1 demostró ser mucho más rápido y más sensible que métodos anteriores y es adicionalmente adecuado para identificar anticuerpos contra receptor  $\beta$  funcionalmente activos contra diversos dominios de receptor. También reveló una capacidad insuficiente de  $\beta$ -bloqueantes para prevenir la activación de receptor inducida por Acs anti-beta1. Esto abre nuevos escenarios para la investigación sobre Acs anti-beta1 en la insuficiencia cardíaca y eventuales opciones de tratamiento.
- 15 Las características de la presente invención dadas a conocer en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y/o los dibujos pueden ser pertinentes, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, para la realización de la invención en diversas formas de la misma.

## REIVINDICACIONES

1. Péptido seleccionado del grupo que consiste en
- a) un péptido cíclico de fórmula Ib:
- Ciclo(Ala-x2-x4-x1-x4-x1-x1-x4-x2-x2-Cys-x3-x5-x1-Pro-x2-Cys-Cys-x1-x3-x3-x4-x5-x2-Gln) (Ib)
- 5 en la que x1 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos ácidos;
- x2 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos básicos;
- x3 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Leu, Ile, Val, Met, Trp, Tyr y Phe;
- 10 x4 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Ser, Thr, Ala y Gly; y
- x5 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Gln y Asn; y
- b) un péptido cíclico de fórmula IIIa:
- Ciclo(Ala-x4-x2-x3-x1-x3-x3-x4-x3-x3-Cys-x<sub>j</sub>-Cys-x-x-x-Pro-x-Cys-Cys-x<sub>i</sub>-Gln) (IIIa)
- 15 en la que i es cualquier número entero desde 0 hasta 6, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 6, más preferiblemente i = 6;
- en la que j es cualquier número entero desde 0 hasta 4, preferiblemente cualquier número entero desde 1 hasta 4, más preferiblemente j = 4;
- en la que x1 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos ácidos;
- 20 x2 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende aminoácidos básicos;
- x3 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Leu, Ile, Val, Met, Trp, Tyr y Phe; y
- x4 se selecciona individual e independientemente del grupo que comprende Ser, Thr, Ala y Gly,
- 25 en la que x es cualquier aminoácido, preferiblemente cualquier aminoácido que se produce de manera natural, más preferiblemente cualquier L-aminoácido que se produce de manera natural, y
- donde dicho péptido es capaz de actuar como inhibidor de anticuerpos anti-receptor β1-adrenérgico.
2. Péptido según la reivindicación 1, siendo el péptido un péptido de fórmula Ic:
- ciclo(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) (Ic)
- 30 3. Péptido según la reivindicación 2, en el que al menos uno de los residuos de aminoácido ácido se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos ácidos.
4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos uno de los residuos de aminoácido básico se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos básicos.
- 35 5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos uno de los residuos de aminoácido alifático se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos alifáticos.
6. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos un residuo de aminoácido Ala se sustituye por Glu.
- 40 7. Péptido según la reivindicación 1, siendo el péptido un péptido de fórmula IIIb:
- Ciclo(Ala-Gly-Arg-Trp-Glu-Tyr-Gly-Ser-Phe-Phe-Cys-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln) (IIIb)
8. Péptido según la reivindicación 7, en el que al menos uno de los residuos de aminoácido ácido se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos ácidos.

9. Péptido según la reivindicación 7 u 8, en el que al menos uno de los residuos de aminoácido básico se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos básicos.
- 5 10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que al menos uno de los residuos de aminoácido alifático se sustituye por un aminoácido diferente seleccionado del grupo que comprende aminoácidos alifáticos.
11. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que al menos un residuo de aminoácido Ala se sustituye por Glu.
- 10 12. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la ciclización se produce mediante una unión que es un enlace covalente seleccionado del grupo que comprende uniones S-S, enlaces peptídicos, enlaces carbono-carbono tales como C-C o C=C, enlaces éster, enlaces éter, enlaces azo, uniones C-S-C, uniones C-N-C y uniones C=N-C.
13. Péptido según la reivindicación 12, en el que la unión S-S se forma por dos residuos de Cys del péptido.
14. Péptido según la reivindicación 12, en el que el enlace peptídico se forma por el grupo NH<sub>2</sub> del aminoácido N-terminal y el grupo COOH del aminoácido C-terminal.
- 15 15. Péptido según la reivindicación 12, en el que se forman enlaces adicionales por los grupos NH<sub>2</sub> y grupos COOH de la cadena lateral de los aminoácidos constituyentes.
16. Composición que comprende al menos uno de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un portador.
- 20 17. Agente de diagnóstico que comprende al menos uno de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
18. Agente de diagnóstico según la reivindicación 17, siendo el agente de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
19. Agente de diagnóstico según la reivindicación 17 ó 18, comprendiendo el agente de diagnóstico al menos un compuesto biológicamente activo adicional.
- 25 20. Kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o un agente de diagnóstico según la reivindicación 17 ó 18.
21. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, que comprende además un agente farmacéuticamente activo adicional.
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, en la que el agente farmacéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que comprende un bloqueante de receptores beta, preferiblemente bloqueantes de receptor  $\beta$ 1-adrenérgico selectivos.
- 35 24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, en la que el agente farmacéuticamente activo adicional se selecciona del grupo de bloqueantes de receptor  $\beta$ 1-adrenérgico selectivos que comprende atenolol, metoprolol, nebivolol y bisoprolol.
25. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la fabricación de un medicamento.
26. Medicamento que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 40 27. Uso según la reivindicación 25 o medicamento según la reivindicación 26, siendo el medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, en el que tal enfermedad se selecciona del grupo de cardiopatías, que comprenden cardiopatía infecciosa y no infecciosa, cardiopatía isquémica y no isquémica, cardiopatía inflamatoria y miocarditis, dilatación cardiaca, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada idiopática, cardiomiopatía inmunitaria, insuficiencia cardiaca y cualquier arritmia cardiaca incluyendo latidos de captura prematura ventriculares y supraventriculares.
- 45 28. Uso o medicamento según la reivindicación 27, en el que la enfermedad es cardiomiopatía dilatada idiopática y preferiblemente cardiomiopatía inmunitaria dilatada inducida por anticuerpos anti- $\beta$ -AR.
29. Uso o medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, comprendiendo el medicamento al menos un compuesto farmacéuticamente activo adicional.

30. Uso o medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, siendo el medicamento para el tratamiento y/o la prevención de pacientes que tienen anticuerpos contra receptores  $\beta$ -adrenérgicos, preferiblemente receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos.
- 5 31. Uso o medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, siendo el medicamento para inducir tolerancia inmunitaria.
32. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para inducir tolerancia inmunitaria, preferiblemente mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos y más preferiblemente mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico.
- 10 33. Medicamento que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, siendo el medicamento para inducir tolerancia inmunitaria, preferiblemente mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptores  $\beta$ -adrenérgicos y más preferiblemente mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico.
- 15 34. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en la inducción de tolerancia inmunitaria mediante supresión de la producción de anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgico mediante bloqueo de los sitios de reconocimiento de antígeno de las células pre-B productoras de anticuerpos.
35. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en un método de diagnóstico *in vitro*.
36. Uso según la reivindicación 35, en el que el método es para el diagnóstico de cardiomiopatía dilatada idiopática, preferiblemente cardiomiopatía inmunitaria dilatada inducida por anticuerpos anti- $\beta$ -AR.
- 20

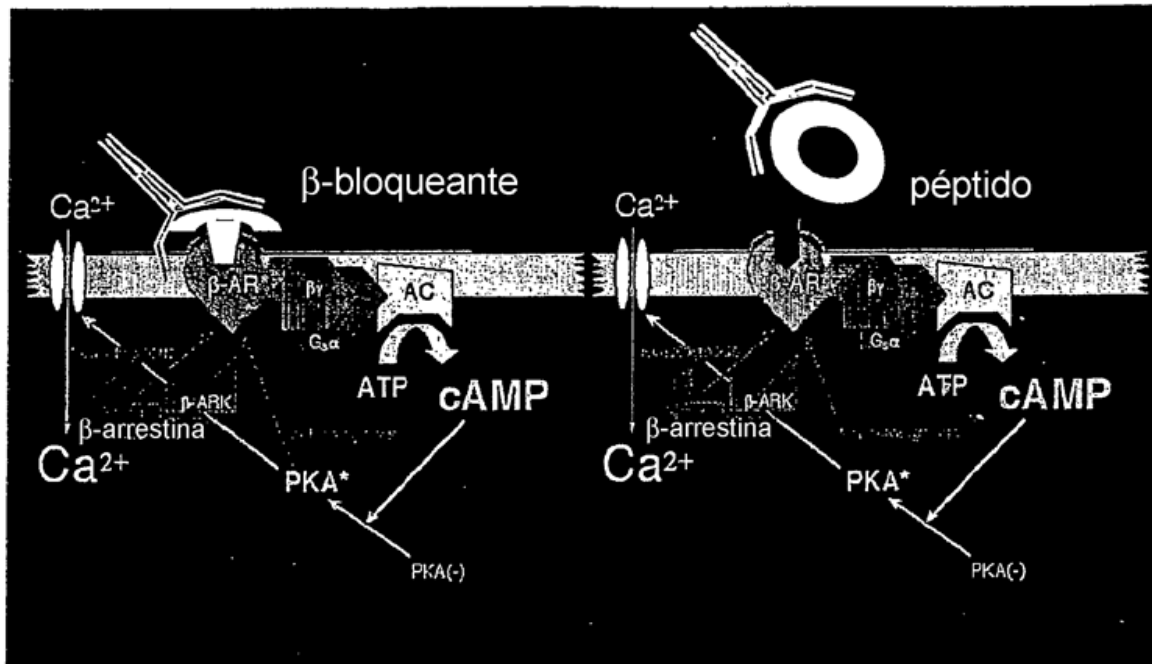


Fig. 1



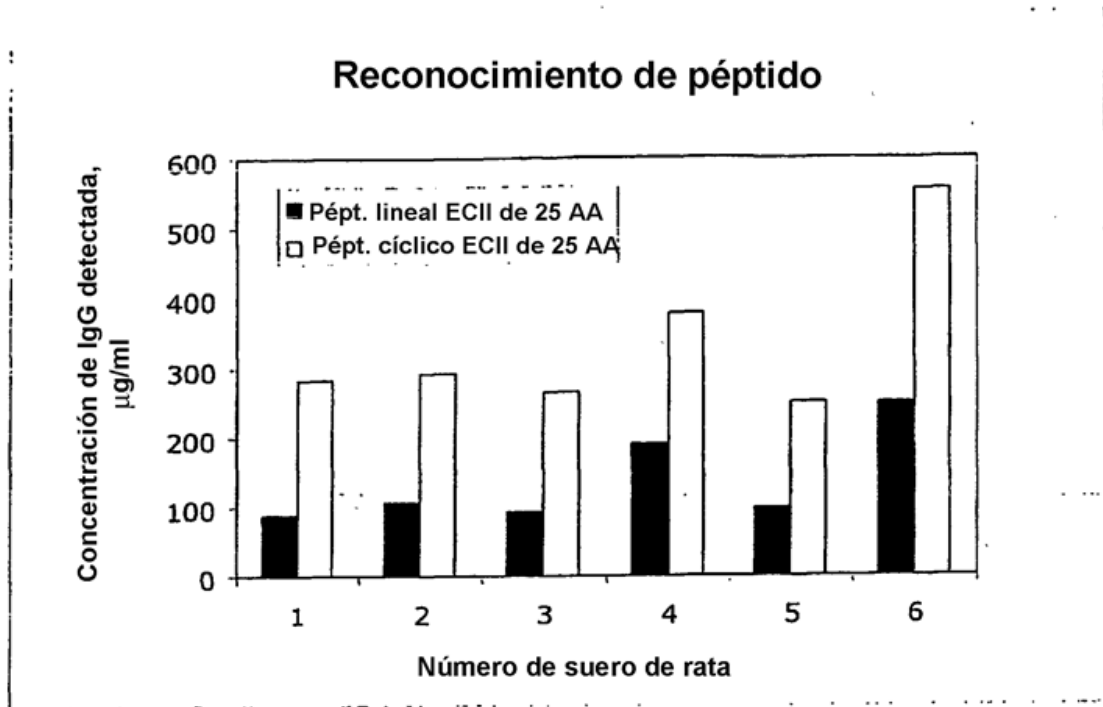


Fig. 2

Prevención / terapia de cardiomiopatía inmunitaria

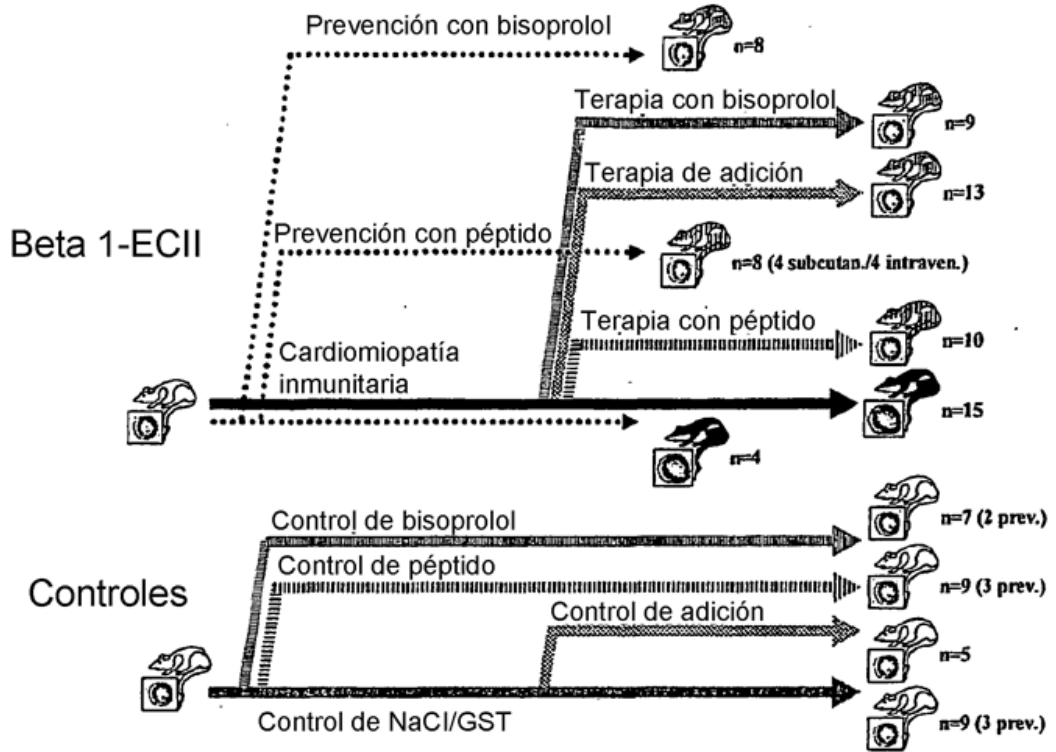


Fig. 3

Anticuerpos anti-beta 1-ECII específicos

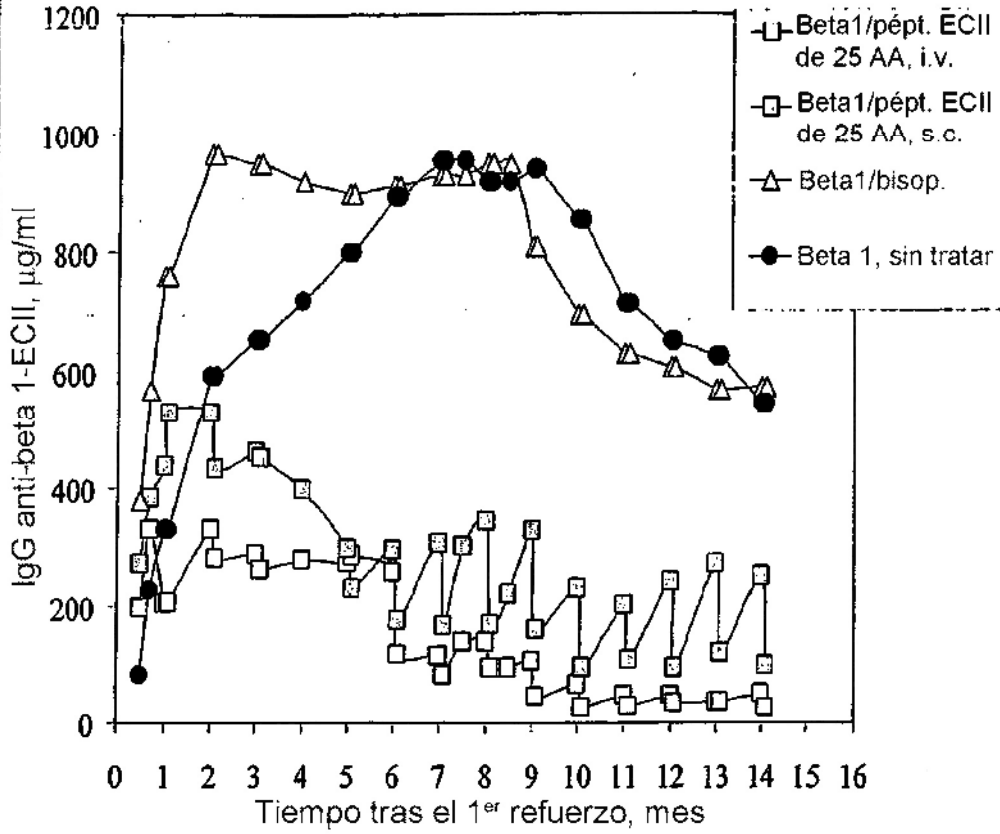


Fig. 4

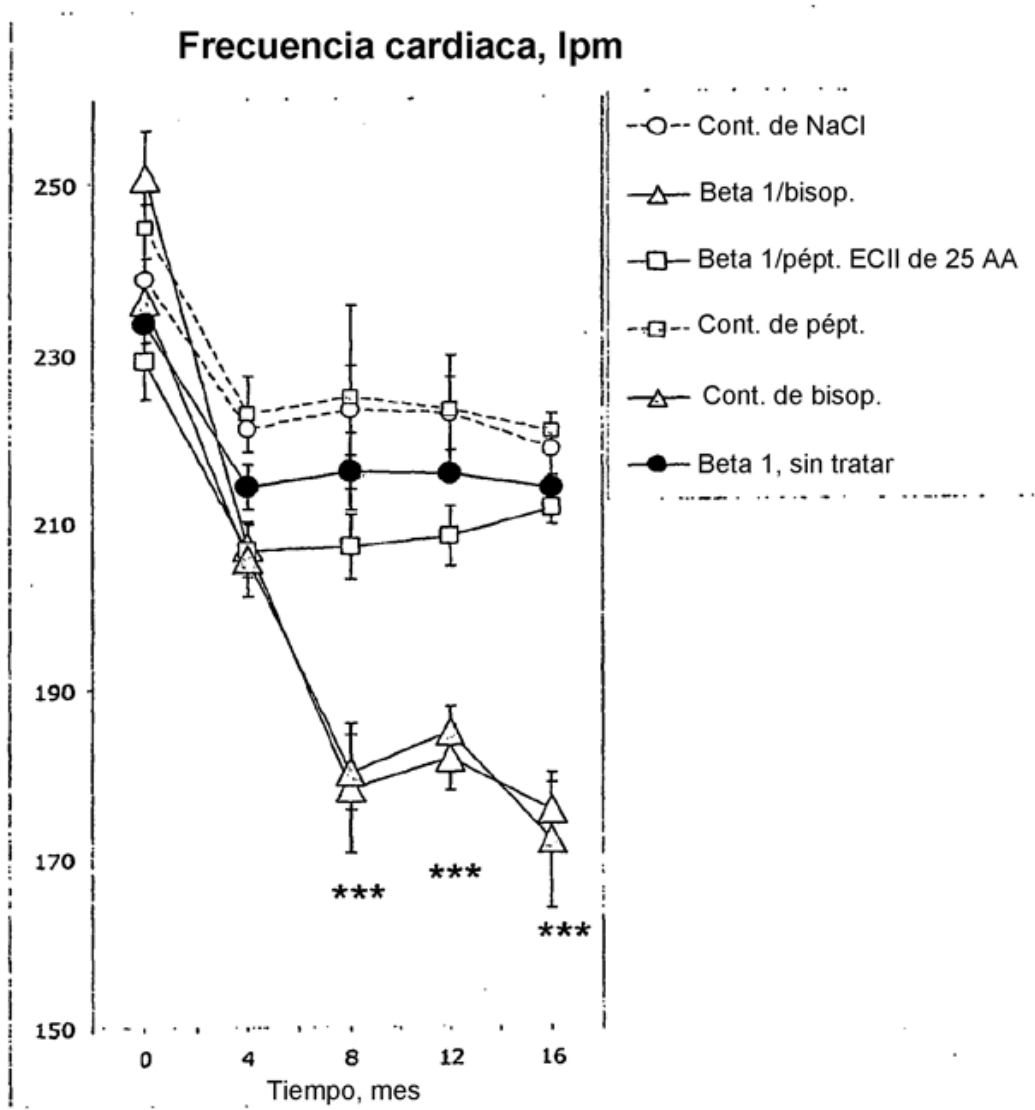


Fig. 5

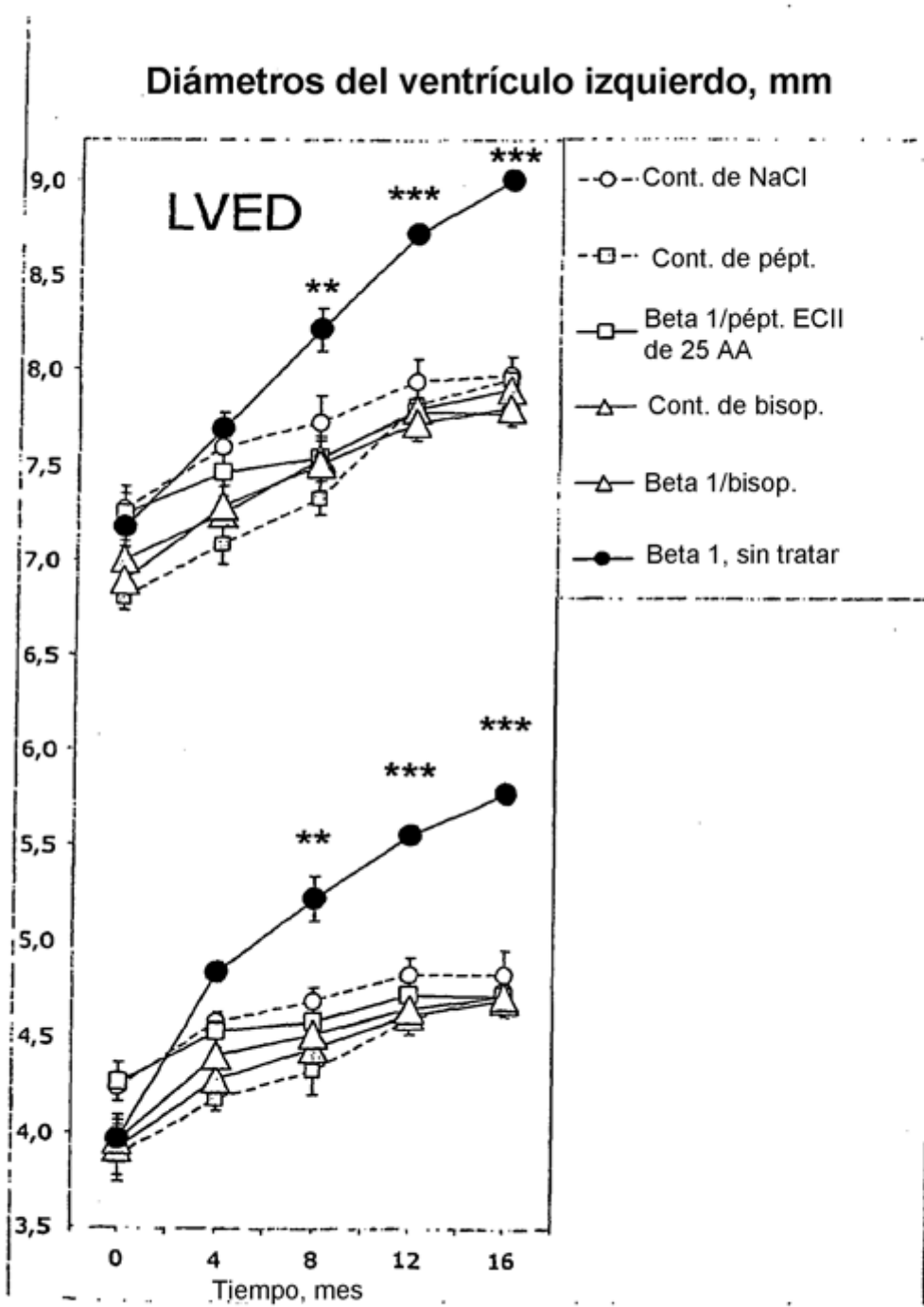


Fig. 6

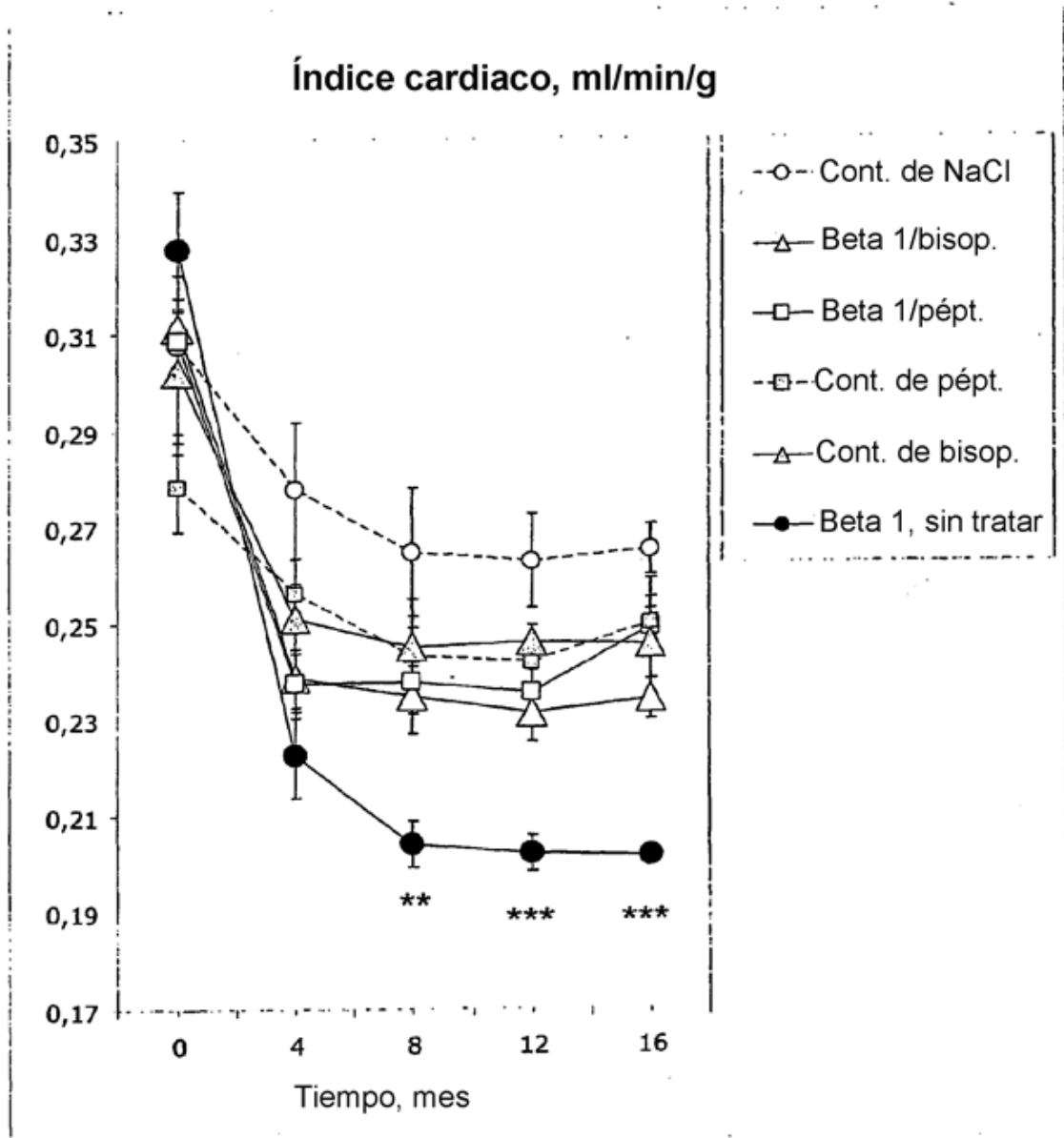


Fig. 7

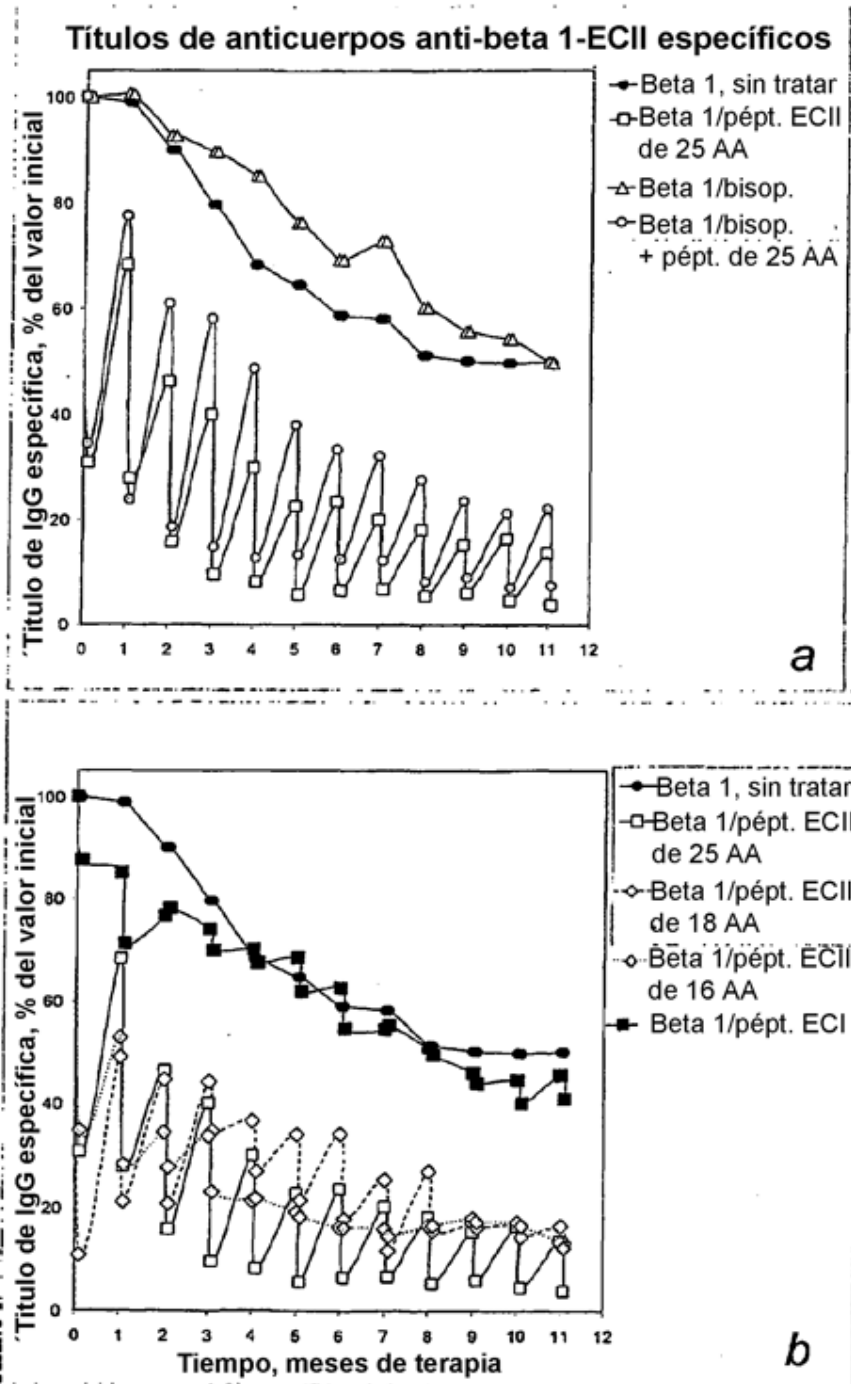


Fig. 8

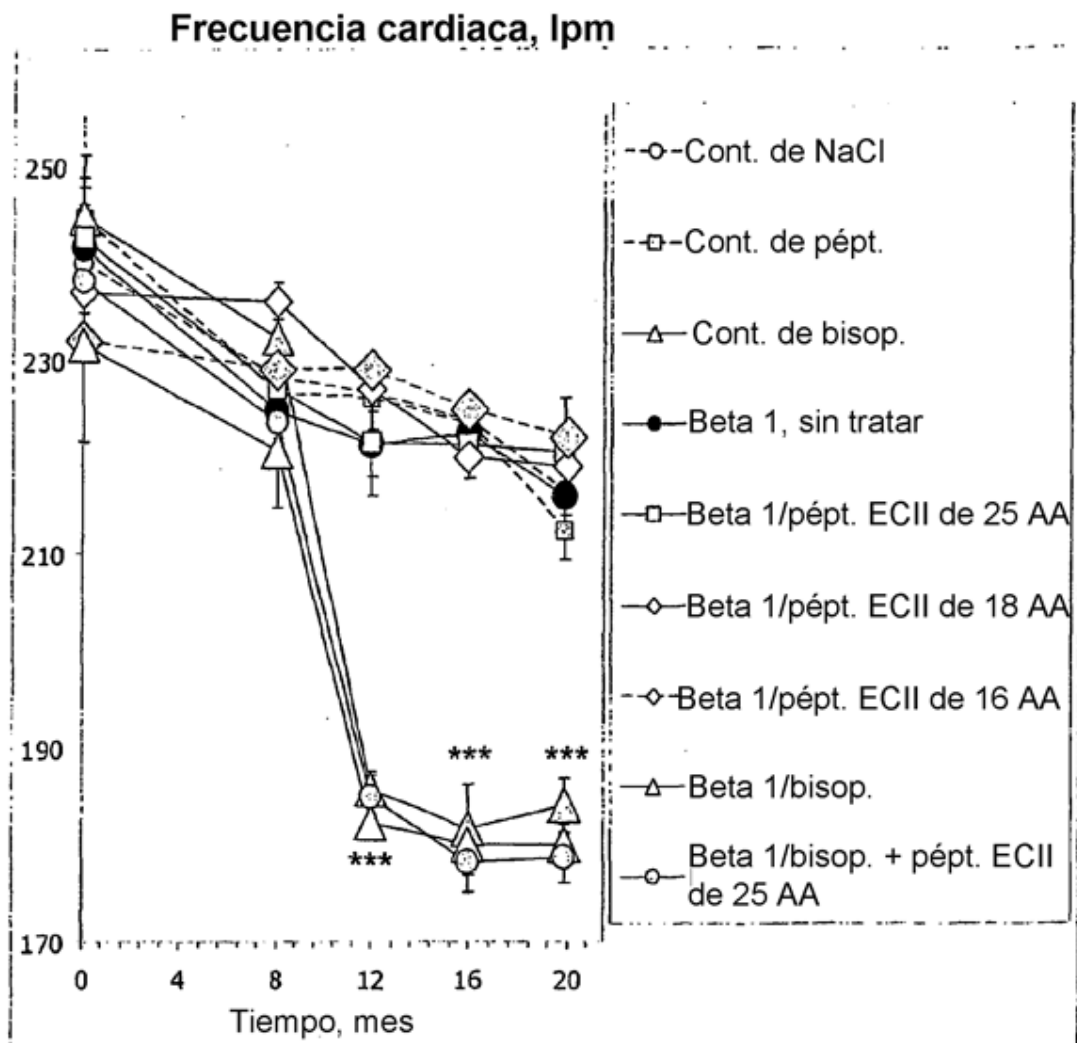


Fig. 9



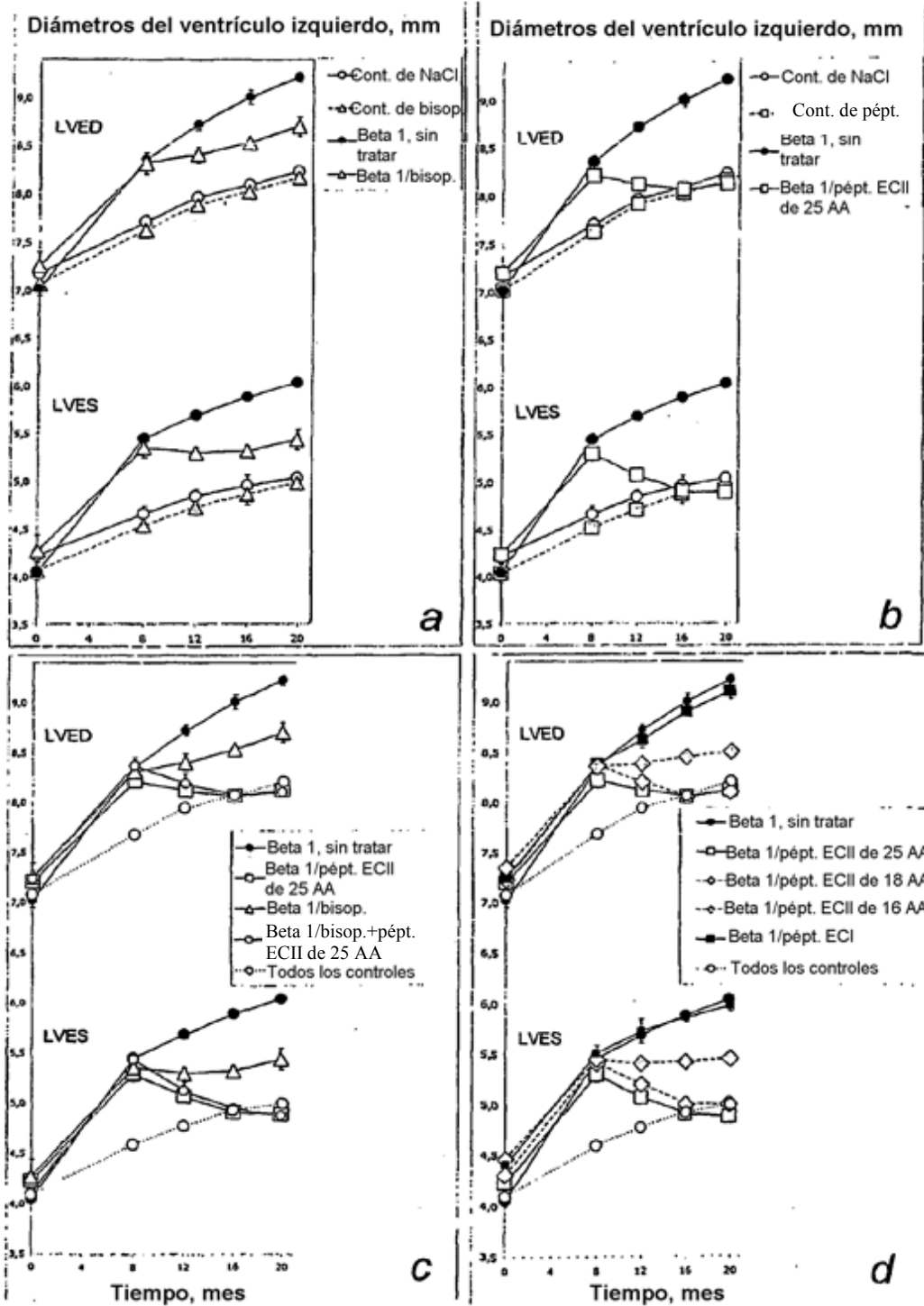


Fig. 10

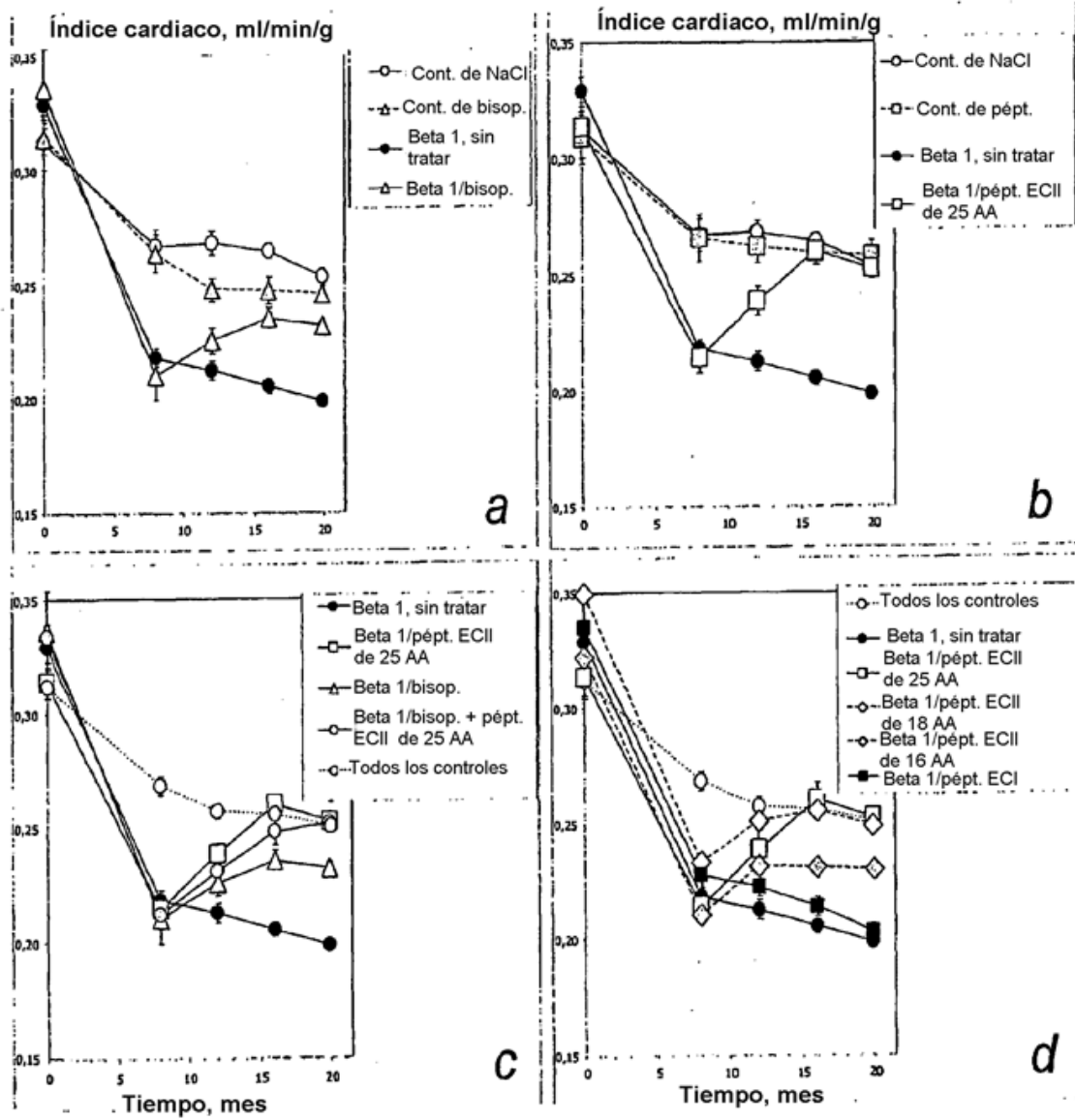


Fig. 11

Parámetros hemodinámicos - Estudio de prevención

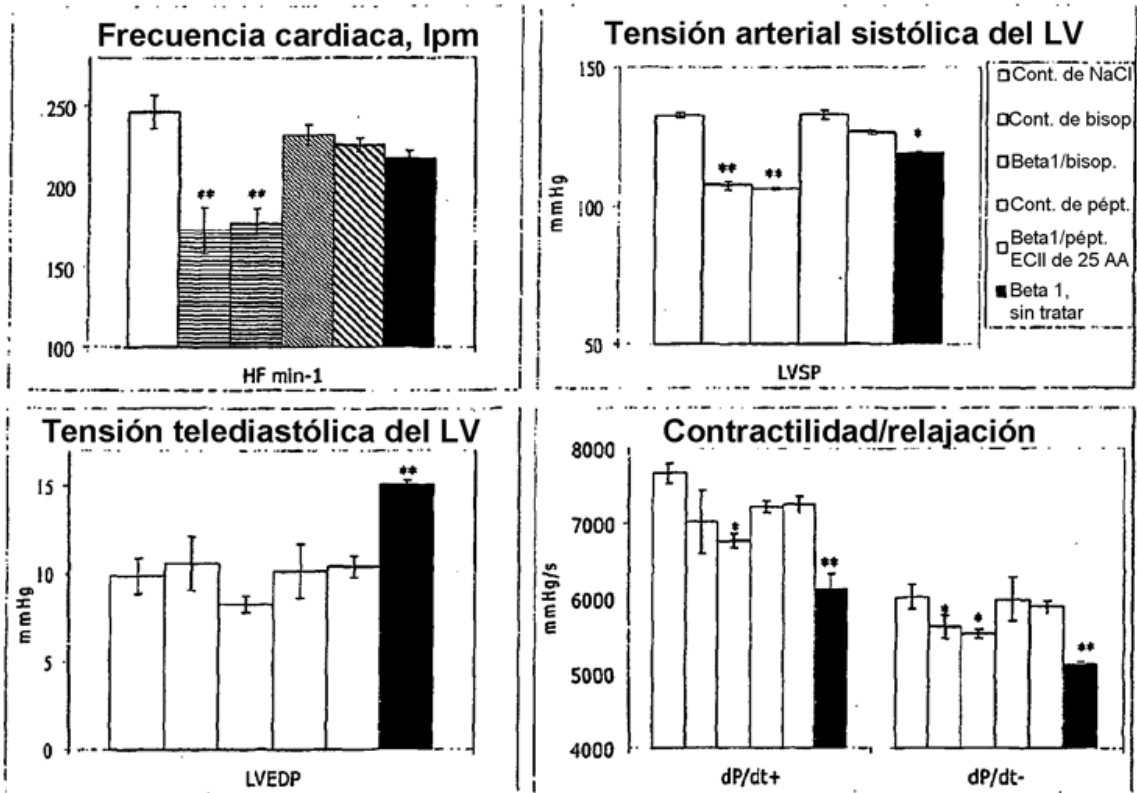


Fig.12

Parámetros hemodinámicos - Estudio de terapia

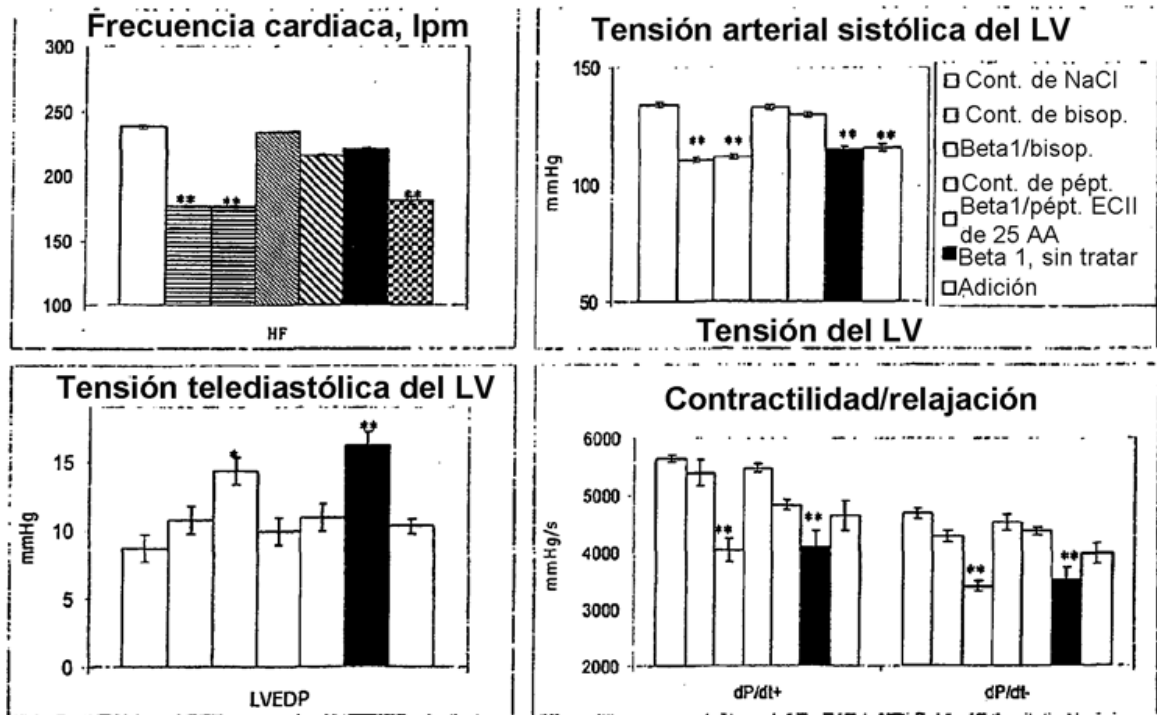


Fig. 13

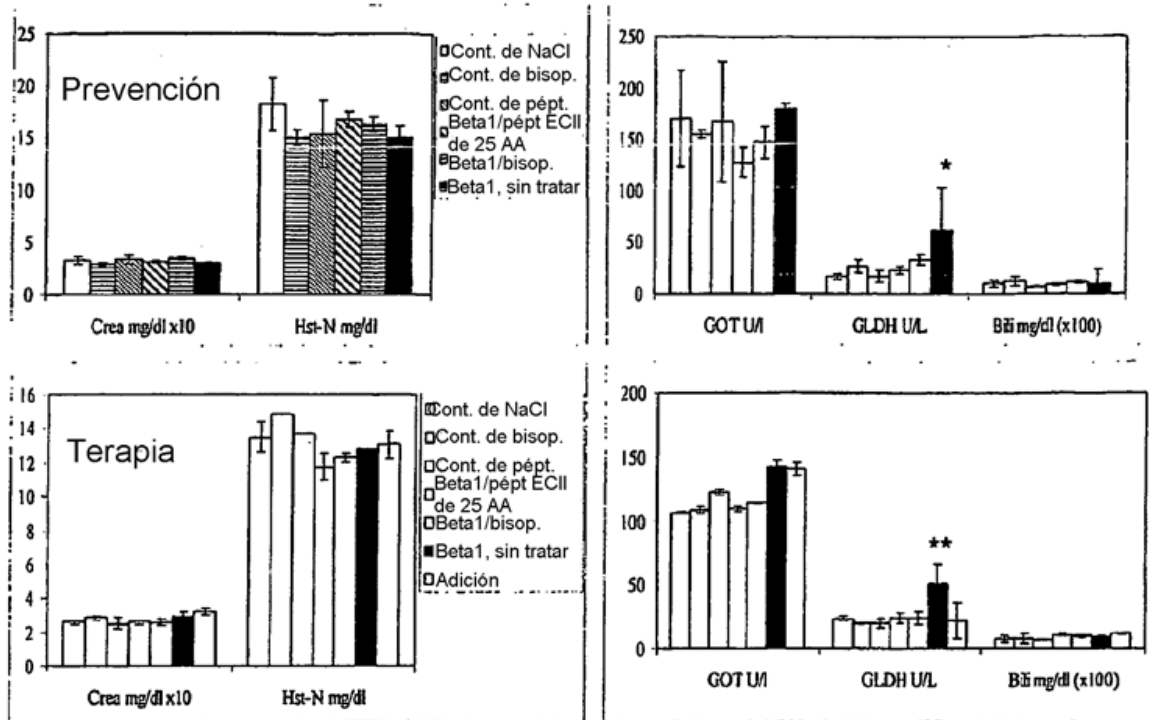


Fig. 14

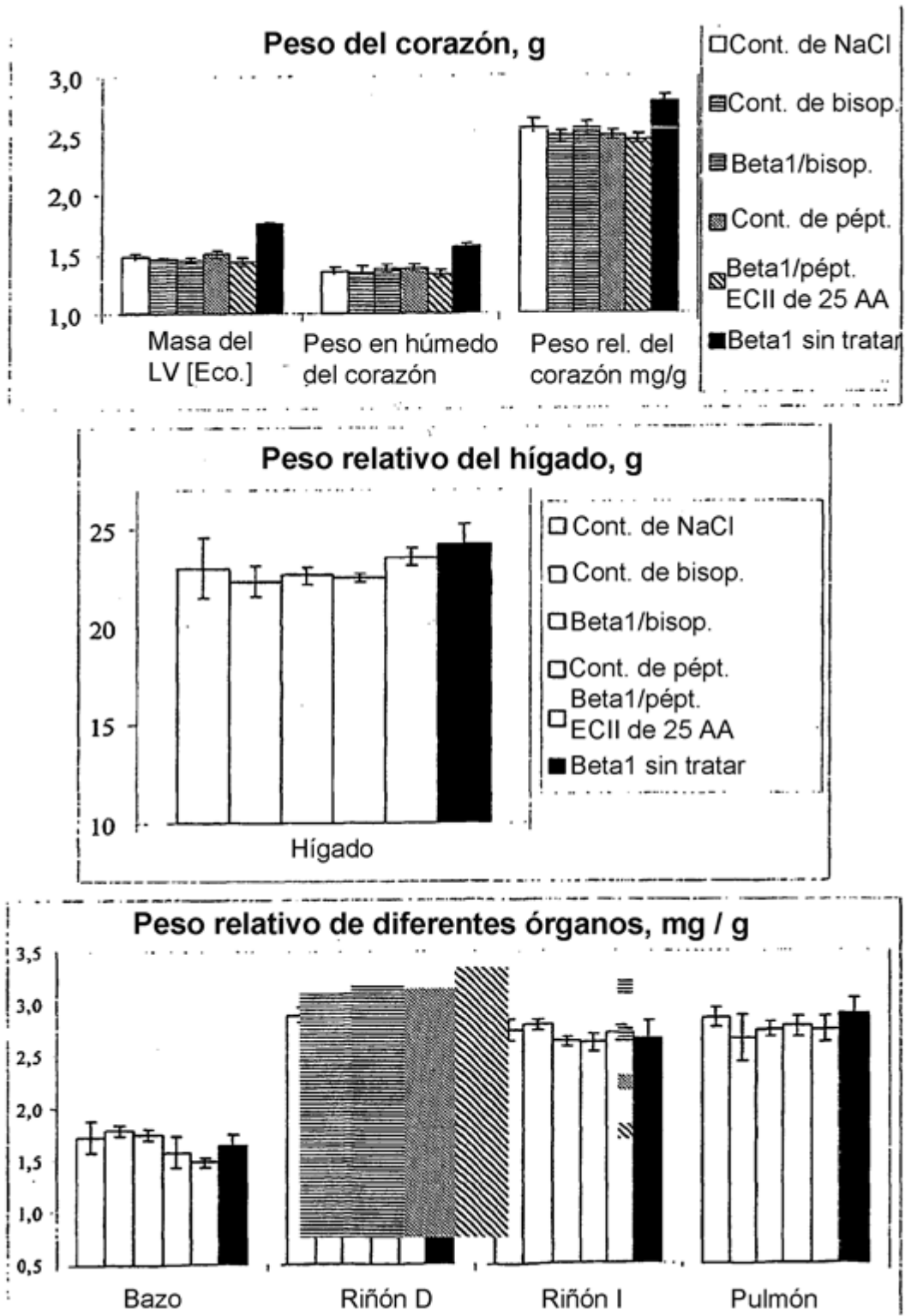


Fig. 15

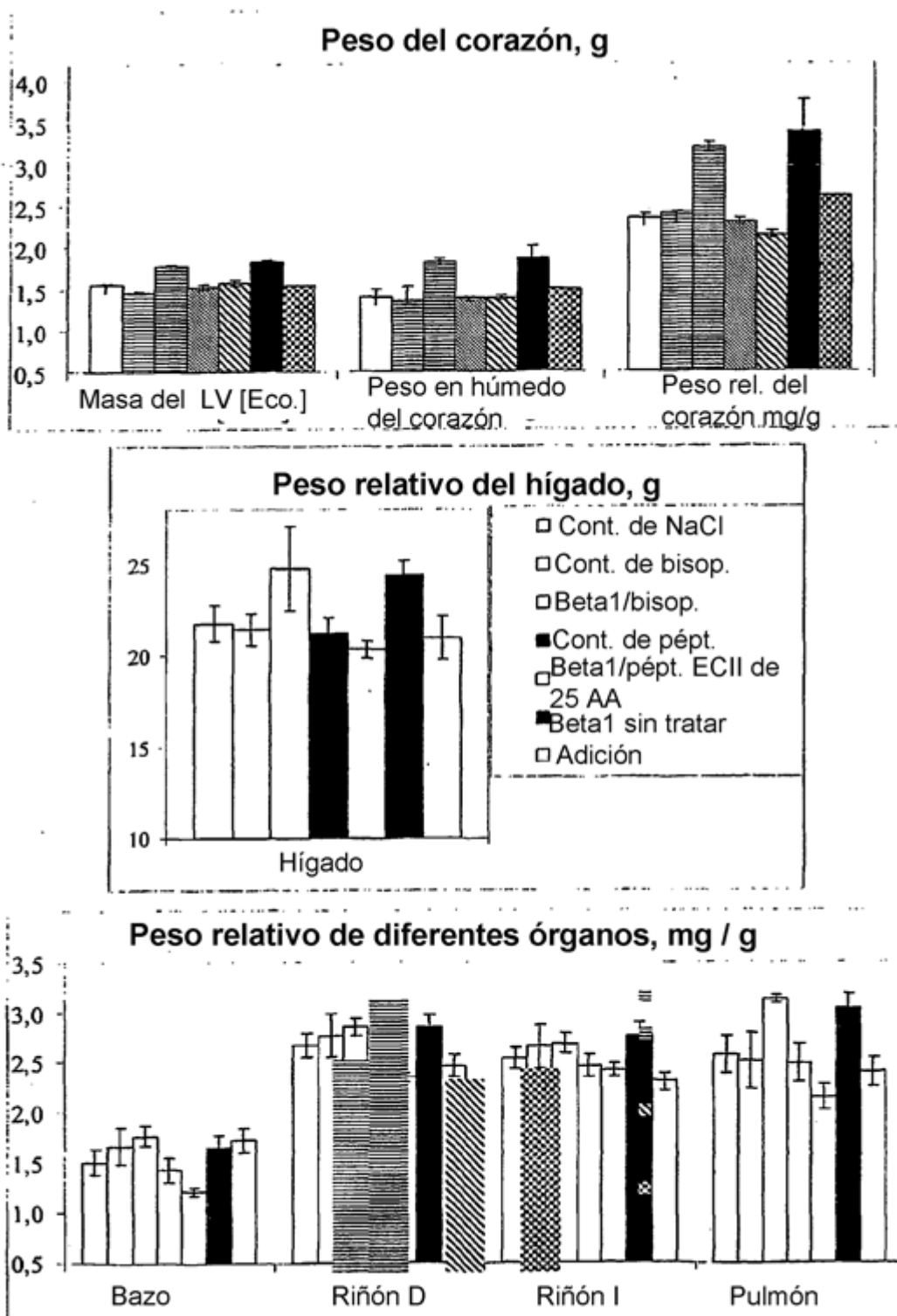


Fig. 16

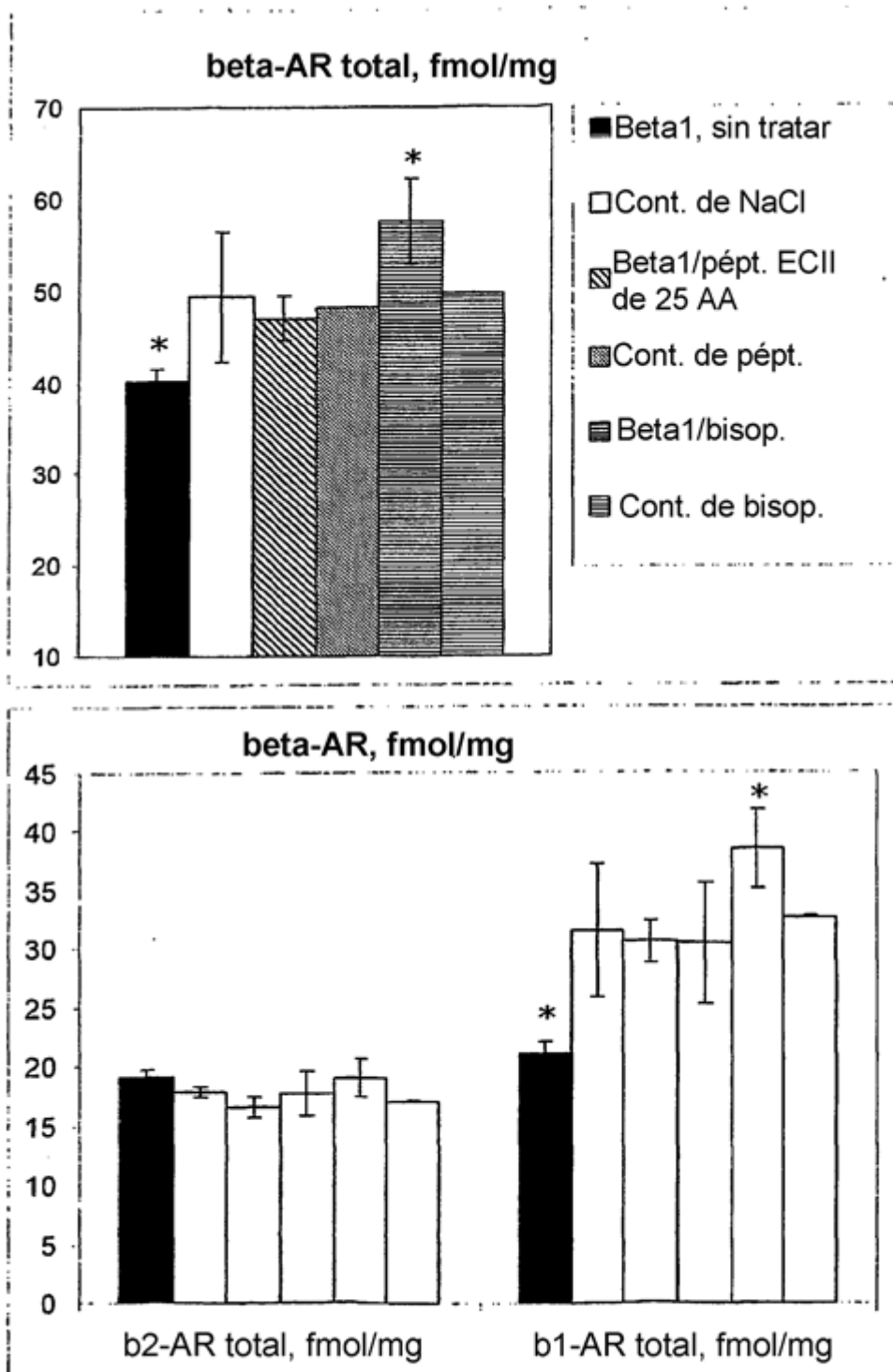


Fig. 17



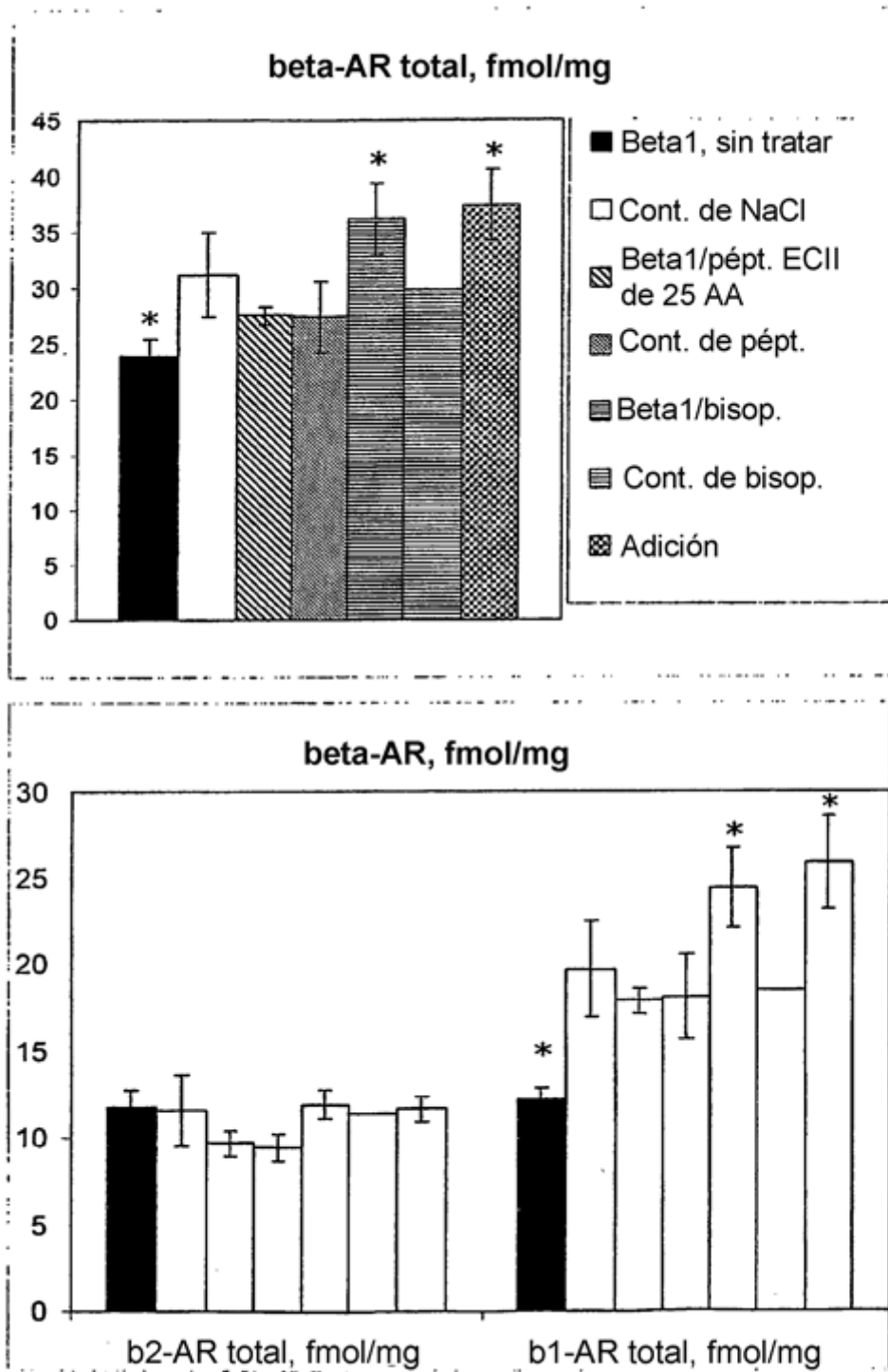


Fig. 18

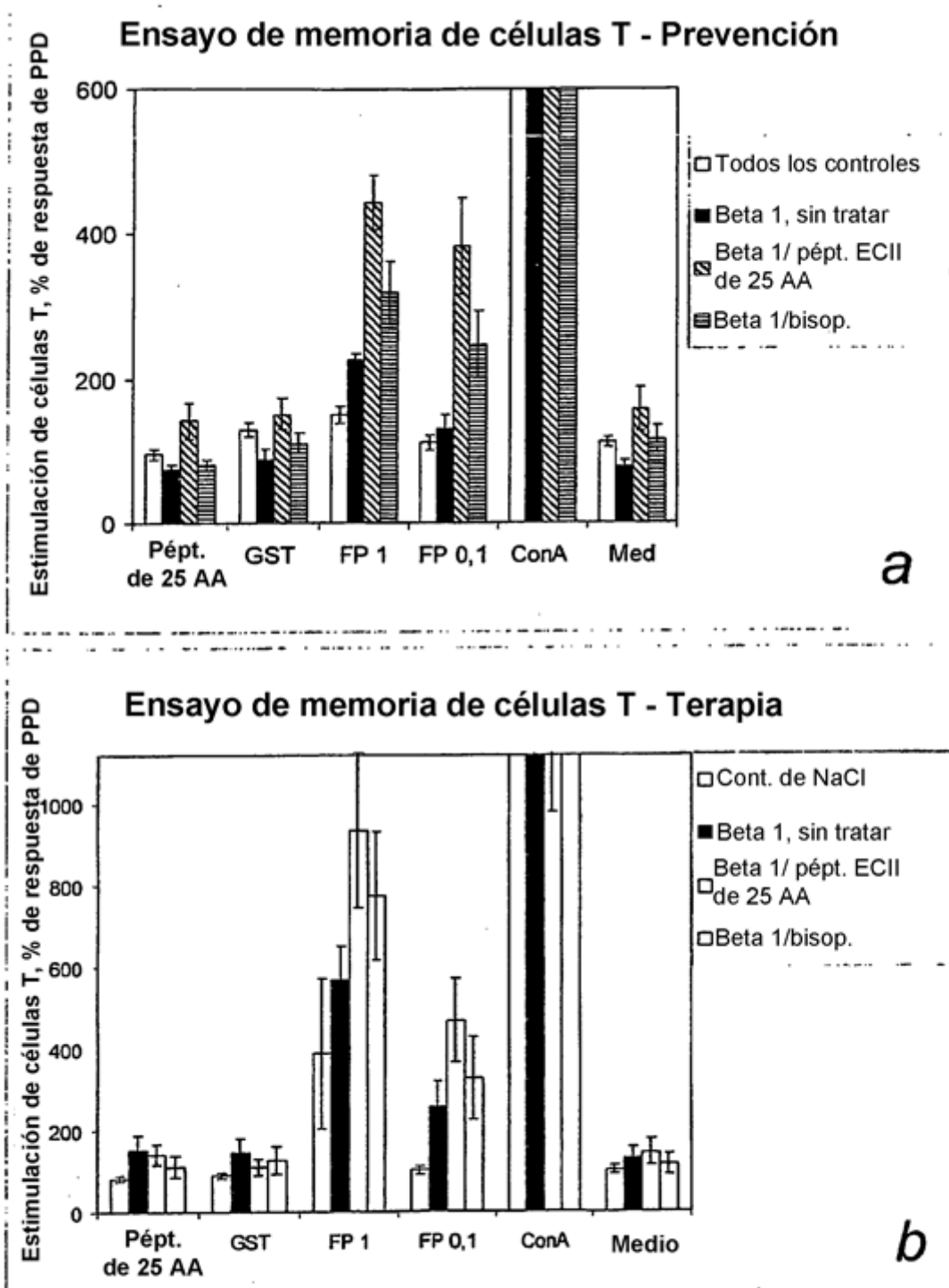


Fig. 19

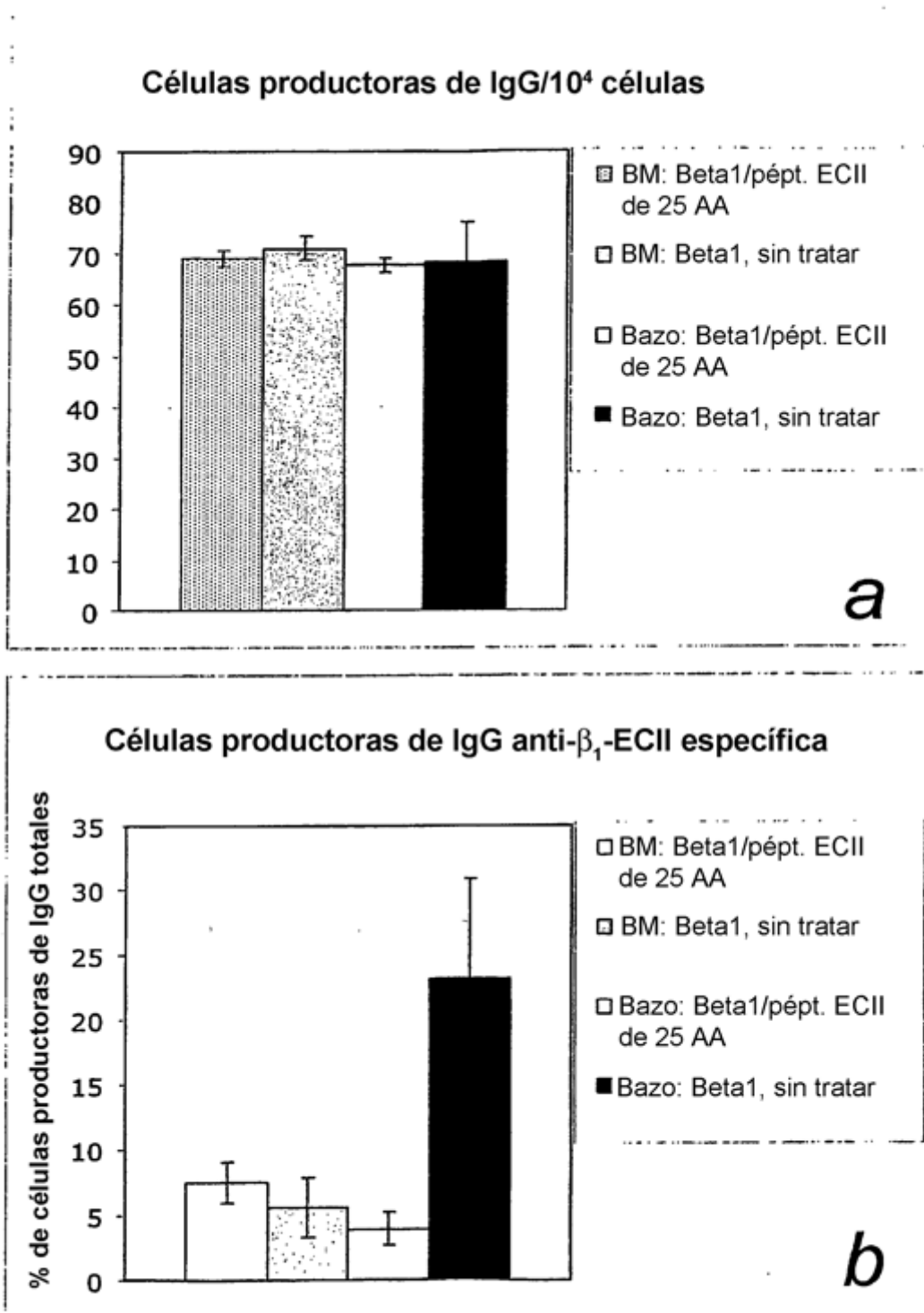


Fig. 20

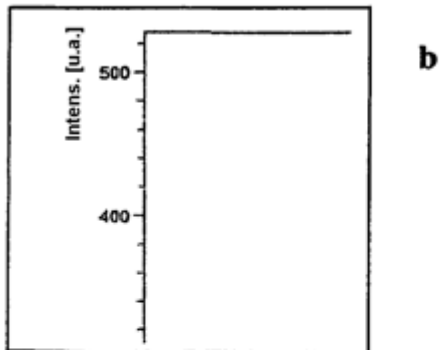
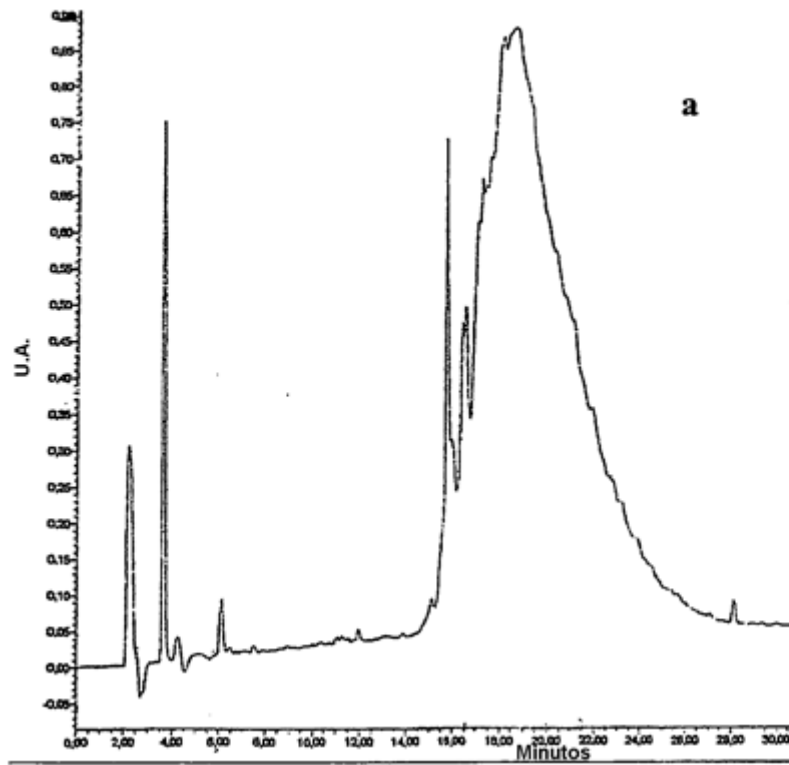


Fig. 21

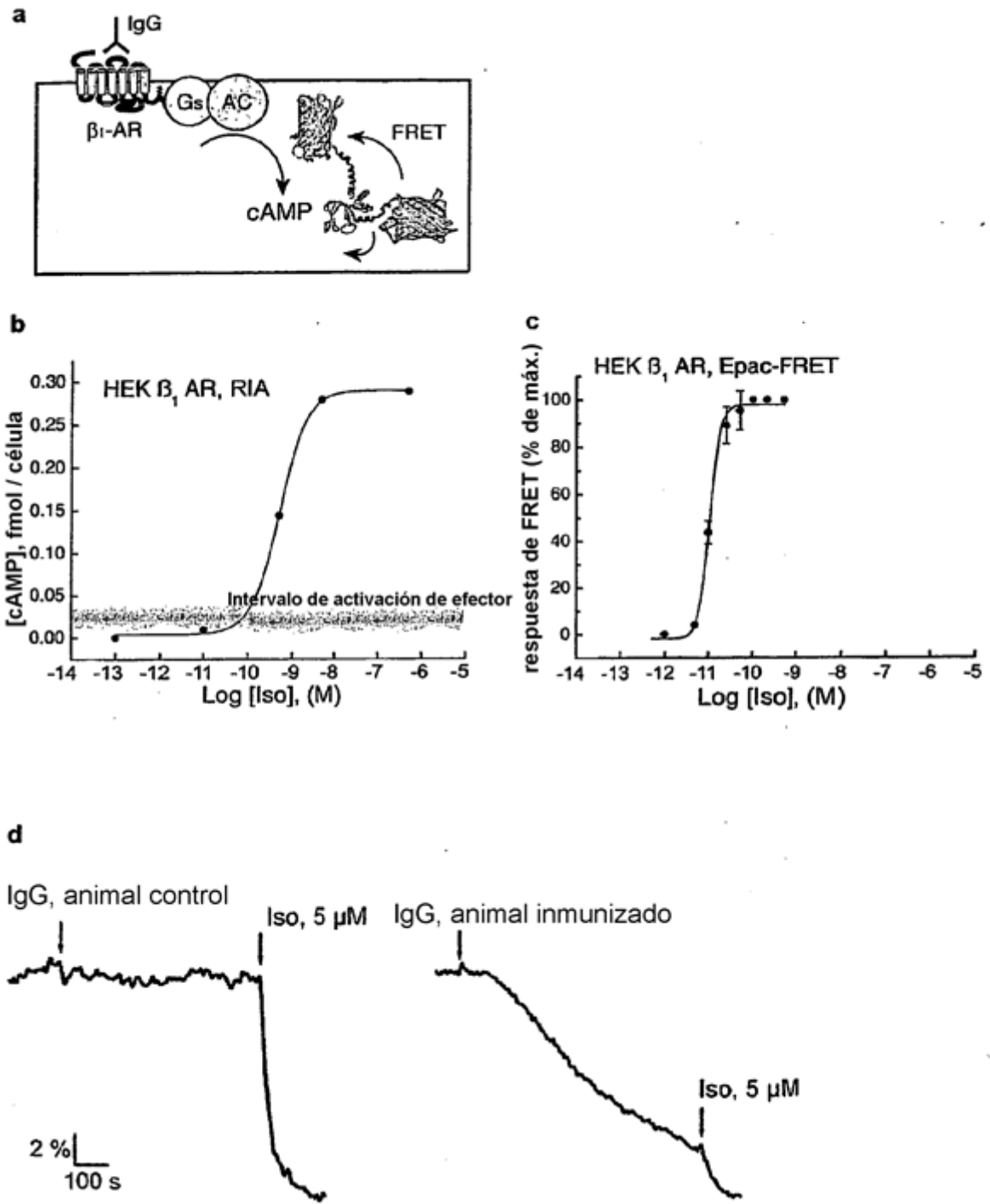
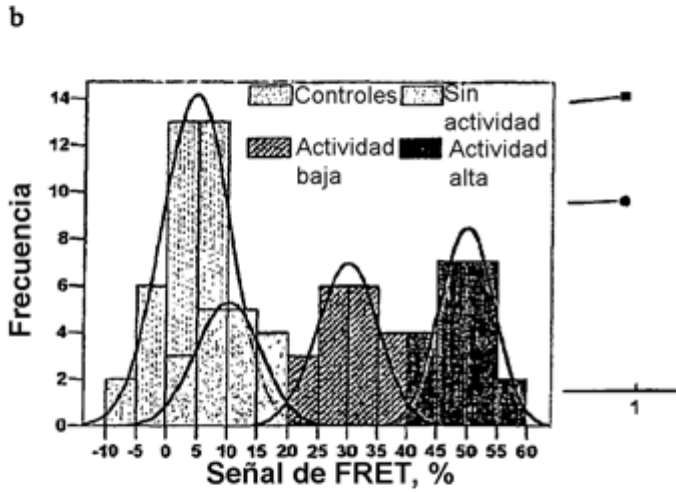
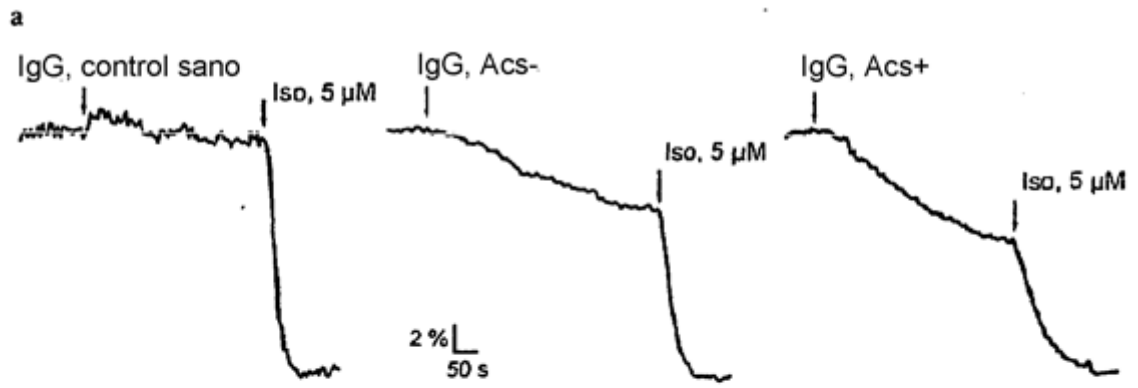


Fig. 22



Percentil	Actividad de señal de FRET, %			
	Controles	Pacientes con DCM		
		Negativa	Baja	Alta
1	-8.2	0	20.5	40.3
25	1.0	5.2	26.1	45.3
50 (Mediana)	4.8	10.7	30.1	48.9
75	8.8	17.9	35.4	51.1
99	18.8	18.6	39.4	58.6

Fig. 23

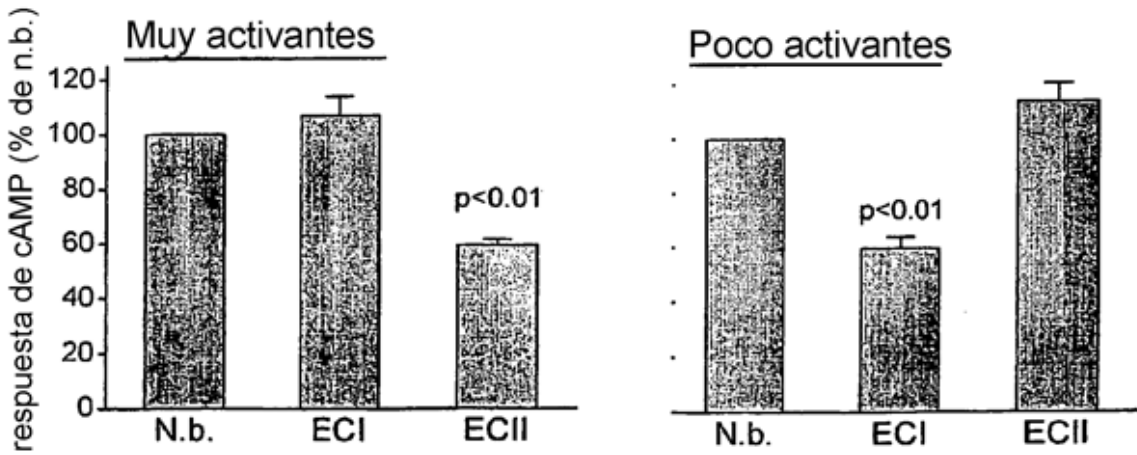
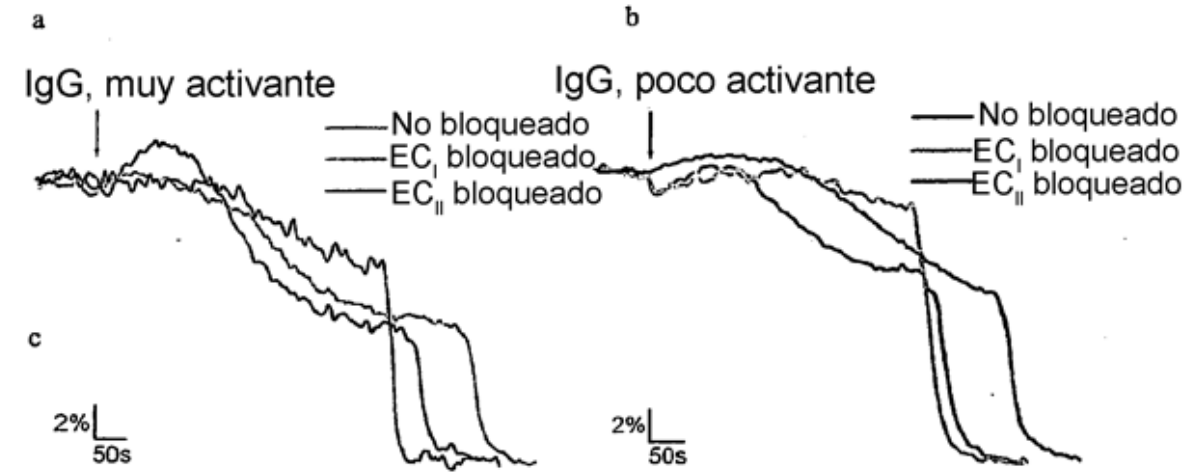


Fig. 24