

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 739**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2016 PCT/EP2016/072934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17121502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2016 E 16775169 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3402810**

54 Título: **Uso terapéutico de inhibidores de la activación o estimulación de células T**

30 Prioridad:

**15.01.2016 EP 16151539**

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

**12.07.2024**

73 Titular/es:

**HUMANITAS MIRASOLE S.P.A. (100.0%)  
Via Alessandro Manzoni, 56  
20089 Rozzano (MI), IT**

72 Inventor/es:

**KALLIKOURDIS, MARINOS y  
CONDORELLI, GIANLUIGI**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

**ES 2 975 739 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

Uso terapéutico de inhibidores de la activación o estimulación de células T

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea n.º 16151539.0, presentada a nombre de HUMANITAS MIRASOLE S.P.A. el 15 de enero de 2016.

**Antecedentes de la técnica**

10 La insuficiencia cardíaca (HF) es una causa principal de hospitalización, morbilidad y mortalidad; con frecuencia se encuentra en el estadio final de hipertrofia cardíaca patológica y fibrosis provocada por sobrecarga hemodinámica (Zarrinkoub *et al.*, 2013). Algunas formas de miocardiopatía (denominadas miocardiopatías inflamatorias) están provocadas por autoinmunidad o por respuestas inmunitarias frente a infección, indicando que la disfunción cardíaca también puede resultar de enfermedad del sistema inmunitario (Bulut *et al.*, 2012). De manera enigmática, estudios recientes han descubierto que la HF inducida por sobrecarga hemodinámica también implica un componente inflamatorio significativo (Shioi *et al.*, 1997) (Oka *et al.*, 2012) (Hofmann y Frantz, 2013). Esta inflamación está caracterizada por la presencia en el miocardio de células del sistema inmunitario innato (macrófagos) y la regulación por incremento de citocinas proinflamatorias, tales como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , que tienen un impacto negativo sobre el desenlace de la enfermedad (Shioi *et al.*, 1997) (Ancey *et al.*, 2002) (Souders *et al.*, 2012). Aunque puede compensarse su ausencia congénica (Lai *et al.*, 2012), la administración de IL-6 es suficiente para iniciar el proceso que conduce a hipertrofia cardíaca patológica (Melendez *et al.*, 2010). Se cree que las citocinas y células inmunitarias innatas fomentan la inflamación en el corazón, empeorando el desenlace de la enfermedad. Aunque el concepto de inflamación como componente principal de HF está consolidado (Mann, 2002), ensayos clínicos que intentan combatir HF bloqueando citocinas no han sido satisfactorios (Yndestad *et al.*, 2006) (Hofmann y Frantz, 2013). El motivo para este fallo puede ser la función redundante de citocinas individuales (Lai *et al.*, 2012). Por tanto, con el fin de identificar dianas de inmunoterapia más adecuadas para HF, se necesita caracterizar mejor la implicación y jerarquía de diferentes mediadores inmunitarios solubles y de las células del sistema inmunitario innato y adaptivo en la enfermedad.

30 El sistema inmunitario innato actúa mediante la producción de citocinas como línea de defensa no específica, pero eficaz y rápida, contra patógenos. Sin embargo, durante respuestas de larga duración, se somete al control de los linfocitos T del sistema inmunitario adaptivo (células T) (Loke *et al.*, 2007), que, junto con las células B, median en respuestas inmunitarias específicas de antígeno. Por tanto, las células T, si están implicadas en la patogénesis de HF, pueden llegar a ser dianas inmunológicas atractivas y más específicas para la intervención terapéutica. Esta suposición está soportada por la implicación de células T en la fibrosis cardíaca inducida por sobrecarga de presión (Yu *et al.*, 2006).

El documento WO 2011/103584 (Lazar y Bennett, 2011) se refiere a inmunoadhesinas de CTLA4-Ig que seleccionan como diana CD80 y CD86, y a su uso, particularmente con fines terapéuticos.

40 Pieper *et al.* (2013) se refiere a terapia con CTLA4-Ig (abatacept) que modula funciones efectoras de células T en pacientes con artritis reumatoide positiva para autoanticuerpos (Pieper, Jennifer, *et al.*, BMC immunology 14,1 (2013): 1-9).

45 Nevers *et al.* 2015 se refiere a cómo contribuye la inclusión de células T de ventrículo izquierdo a la patogénesis de la insuficiencia cardíaca (Nevers, Tania, *et al.*, Circulation: Heart Failure 8,4 (2015): 776-787).

Laroumanie *et al.* (2014) se refiere a células T CD4+ que fomentan la transición de hipertrofia a insuficiencia cardíaca durante sobrecarga de presión crónica (Laroumanie, Fanny, *et al.*, Circulation 129,21 (2014): 2111-2124).

50 Yndestad *et al.* (2006) revisan la inflamación en insuficiencia cardíaca (Yndestad, Arne, *et al.* Heart Failure reviews 11,1 (2006): 83-92).

Peterson (2002) comenta sobre la hipertrofia por sobrecarga de presión y la insuficiencia cardíaca congestiva (Peterson, Kirk L., Journal of the American College of Cardiology 39,4 (2002): 672-675).

Takeishi *et al.* (2001) se refieren a la activación de Src y múltiples MAP cinasas en hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca congestiva en sobrecarga de presión crónica y a la comparación con estiramiento mecánico agudo (Takeishi, Yasuchika, *et al.*, Journal of molecular and cellular cardiology 33,9 (2001): 1637-1648).

60 Vinh *et al.* (2010) se refieren a la inhibición y a la ablación genética del eje de coestimulación de células T de B7/CD28 que previene la hipertensión experimental (Vinh, Antony, *et al.*, Circulation 122,24 (2010): 2529-2537).

65 Diamanti *et al.* (2014) se refieren a abatacept (antígeno 4-inmunoglobulina con linfocito T citotóxico) que mejora la función de células B y la capacidad inhibidora de células T reguladoras en pacientes con artritis reumatoide que no responden a agentes anti-factor a de necrosis tumoral (Picchianti Diamanti, A., *et al.*, Clinical & Experimental

Immunology 177,3 (2014): 630-640.

### Sumario de la invención

- 5 La presente invención se define en las reivindicaciones y, por tanto, proporciona un inhibidor de la coestimulación y/o activación de células T para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión, en el que el inhibidor inhibe CD80 y/o CD86. Otros aspectos de la invención también se definen en las reivindicaciones.
- 10 Para realizar esta invención, los inventores identificaron mediadores inmunitarios implicados en la HF inducida por sobrecarga de presión, encontrando que las células T se infiltraban en el miocardio patológicamente hipertrofico, en línea con su función en la inflamación de larga duración. De hecho, la inflamación es un factor clave que distingue la hipertrofia patológica de la hipertrofia "benigna" fisiológica, que se produce durante ejercicios de entrenamiento. Aprovechando la presencia de células T, los inventores usaron abatacept (una proteína de fusión de CTLA4-Ig aprobada por la FDA (comercializada con el nombre comercial ORENCIA®) que bloquea la coestimulación de células T, inhibiendo de manera selectiva la función de células T proinflamatorias (Moreland *et al.*, 2006)) para reducir significativamente la disfunción cardíaca en un modelo de HF de ratón. Abatacept inhibió de manera sistémica la activación de células T y redujo la infiltración de células T cardíacas, conduciendo a una muerte reducida de cardiomiocitos, mediante un mecanismo dependiente de la citocina anti-inflamatoria interleucina 10 (IL-10). Tomados en conjunto, los hallazgos de los presentes inventores indican que las células T están implicadas en el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica y que interferir con su activación, usando, por ejemplo, estrategias existentes clínicamente validadas, tiene la posibilidad de pasar a ser una opción terapéutica para la insuficiencia cardíaca.
- 20 Por tanto, la invención es tal como se define en las reivindicaciones.

25

### Descripción detallada de la invención

- Por tanto, un objeto de la invención es un inhibidor de la coestimulación y/o activación de células T para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Preferiblemente, dicho inhibidor es un inhibidor de al menos una molécula que fomenta la coestimulación de células T, con la condición de que el inhibidor para su uso según la invención inhiba CD80 y/o CD86. Más preferiblemente, dicho inhibidor aumenta los niveles de IL-10 en el corazón. Los niveles de IL-10 se refieren a niveles de ARNm o de proteína. Un inhibidor puede comprender o consistir en al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en: CTLA4, PD-1, PD-L1 o PD-L2, BTLA, CD160, LAG-3, 2B4, B7-H3, B7-H4, B7S3, BTNL2, anticuerpos anti-CD28 bloqueantes, un fragmento funcional, un derivado funcional o un análogo funcional de los mismos, con la condición de que el inhibidor inhiba CD80 y/o CD86. En una realización preferida de la invención, el inhibidor es al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en: anticuerpo bloqueante o fragmento funcional del mismo, o inhibidor de molécula pequeña o polinucleótido. Preferiblemente, dicho inhibidor es una molécula que comprende o que consiste en CTLA4 o un fragmento funcional o un derivado funcional o un análogo funcional del mismo. Más preferiblemente, el inhibidor es una molécula de CTLA4-Ig o un fragmento funcional o un derivado funcional de la misma o un análogo funcional de la misma. Preferiblemente, dicha molécula de CTLA4-Ig es una proteína de fusión que comprende una primera secuencia de aminoácidos que contiene residuos de aminoácido correspondientes al dominio extracelular de CTLA4 y una segunda secuencia de aminoácidos que contiene la región de Fc de la inmunoglobulina IgG1. Más preferiblemente, dicha molécula de CTLA4-Ig comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un fragmento funcional o un derivado funcional de la misma o un análogo funcional de la misma. En una realización más preferida, dicho inhibidor es abatacept. Otros objetos de la invención son una molécula de ácido nucleico que codifica para el inhibidor tal como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión; un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico o que codifica para el inhibidor tal como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión; una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa el inhibidor tal como se definió anteriormente, o nanopartícula o microvesícula que comprende dicho inhibidor, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Un objeto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende el inhibidor tal como se definió anteriormente, o la molécula de ácido nucleico tal como se definió anteriormente, o el vector de expresión tal como se definió anteriormente, o la célula huésped modificada por ingeniería genética o nanopartícula o microvesícula tal como se definió anteriormente, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. El inhibidor tal como se definió anteriormente se selecciona preferiblemente de:
- 60 a) polinucleótido;
- b) un polipéptido;
- 65 c) un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido;
- d) un vector que comprende o que expresa dicho polinucleótido de a) o c);

e) una célula huésped modificada por ingeniería genética capaz de expresar en condiciones adecuadas dicho polipéptido o dicho polinucleótido de a) o c);

5 f) una molécula pequeña;

g) un anticuerpo o derivado sintético o recombinante del mismo.

10 Las patologías cardíacas comprenden al menos una patología seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades de insuficiencia cardíaca; insuficiencia cardíaca tras miocarditis; arteriopatía coronaria, que puede conducir a infartos de miocardio y debilidad del músculo cardíaco; debilidad del músculo cardíaco primaria que puede derivarse de infecciones virales o toxinas, tales como exposición prolongada a alcohol; valvulopatía cardíaca que provoca debilidad del músculo cardíaco que puede deberse a demasiada fuga de sangre o rigidez del músculo cardíaco a partir de una válvula bloqueada; e hipertensión (alta tensión arterial). Las causas menos frecuentes de  
15 dichas patologías incluyen hipertiroidismo (alto nivel de hormona tiroidea), deficiencia de vitamina y exceso de anfetamina ("speed"). Los síntomas relacionados de patologías cardíacas pueden ser fibrosis cardíaca y/o falta de aire (disnea) y/o asma debido al corazón (asma cardíaca) y/o acumulación de sangre (estasis) en la circulación genera del organismo (sistémica) o en la circulación en el hígado (portal) y/o hinchamiento (edema) y/o color azulado u oscuro (cianosis), y/o agrandamiento (hipertrofia) del corazón. En algunos casos, la insuficiencia cardíaca no es una miocardiopatía inflamatoria provocada por autoinmunidad. En algunos casos, la insuficiencia cardíaca no es una miocardiopatía inflamatoria provocada por una respuesta inmunitaria frente a infección. Tal uch infección puede ser, por ejemplo, infección viral o, por ejemplo, infección bacteriana. En algunos casos, la insuficiencia cardíaca no es una miocardiopatía inflamatoria provocada por autoinmunidad o por una respuesta inmunitaria frente a infección (por ejemplo: no provocada por una respuesta inmunitaria frente a infección viral).

20 La presente invención se define en las reivindicaciones y, por tanto, se refiere al tratamiento y/o a la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

25 En el contexto de la presente invención, un "inhibidor de la activación de células T" significa un agente capaz de inhibir o reducir la activación de células T. Con el propósito de esta invención, la "activación" se define como la señal estimulante (también conocida como "señal 1") recibida por las células T mediante su receptor de células T (por ejemplo, mediante antígeno complejo con una molécula mayor de histocompatibilidad, o mediante anticuerpos anti-CD3), que no es suficiente por sí misma para impulsar una respuesta de células T en células T vírgenes. Para una respuesta de células T completamente funcional, se requiera una segunda señal (también conocida como "señal 2"), que no depende de antígeno y que estimula conjuntamente el receptor de células T. Esta segunda señal se denomina, con el propósito de esta invención, "coestimulación". Para más detalles sobre esta definición de coestimulación, véase A Sharpe 2009 Immunological Reviews 2009: 229(1): 5-11.

30 Tras activarse y coestimularse, las células T muestran un fenotipo de una célula T activada (o funcional). La expresión "célula T activada (o funcional)" describe células T o células B que pueden mostrar algunos de los siguientes fenotipos: la activación de células T puede medirse mediante métodos no limitados a los siguientes: expresión de CD69, CD25, HLA-DR, CD62L y/o CDI 54 y/o la producción de IL-2, movilización de calcio, fosforilación de ZAP-70, fosforilación de LAT, fosforilación de Lck, activación de NF-[kappa]B, activación de MEK, activación de NFAT, activación de Ap-I; proliferación y citotoxicidad de células T (definida como la capacidad para destruir células diana).

35 En el contexto de la presente invención, un "inhibidor de la coestimulación de células T" significa un agente capaz de inhibir o reducir la coestimulación de células T. En el contexto de la presente invención, un "inhibidor de la función de células T" significa un agente capaz de inhibir o reducir activación, coestimulación, diferenciación o función de células T. El término "inhibir", "disminuir", "reducir" o "suprimir" se refiere a una disminución del parámetro especificado (por ejemplo, una disminución de al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,25 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, doce veces o incluso quince veces o más) y/o una disminución o reducción de la actividad especificada de al menos aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 25 %, el 35 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 75 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 %. En realizaciones particulares, la inhibición o reducción da como resultado poca o esencialmente ninguna actividad detectable (como máximo, una cantidad insignificante, por ejemplo, de menos de aproximadamente el 10 % o aproximadamente el 5 %). Ejemplos no limitativos de inhibidor son un anticuerpo o fragmento del mismo u otro ligando o fragmento del mismo que se une específicamente a y/o inhibe la actividad de proteína CD3, proteína CD40, proteínas de la familia de B7 y/o proteínas de la familia de CD28; ciclosporina; FK504; esteroides; y/o sustancias que seleccionan como diana moléculas de MHC-I y/o MHC-II, fármacos inmunosupresores, interferones, corticosteroides, azatioprina, ciclofosfamida, etc., con la condición de que el inhibidor para su uso según la invención inhiba CD80 y/o CD86. También se incluyen inhibidores que reducen o inhiben la actividad de CD3 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal OKT<(R)>3), CD40, B7 y/o CD28 en células T a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y/o postraduccional, terapias que seleccionan como diana factores de transcripción de la activación de células T, tales como inhibidores de IKB cinasa (IKK), que también inhibirán el factor de transcripción, potenciador de cadena ligera kappa de factor nuclear en células B (NF-[kappa]b), o ciclosporina, que inhibe la ruta de calcineurina

importante para la activación del factor de transcripción, factor nuclear de células T activadas, con la condición de que el inhibidor para su uso según la invención inhiba CD80 y/o CD86.

También se incluyen como ejemplos basiliximab (anticuerpo anti-CD25), alefacept (fusión de LFA3-Ig; bloques CD2), daclizumab (anticuerpo anti-CD25), tysabri (anticuerpo anti-VLA4) y Ac anti-CTLA4, con la condición de que el inhibidor para su uso según la invención inhiba CD80 y/o CD86. Otros inhibidores incluyen, pero no se limitan a, omalizumab (AcM anti-IgE; selecciona como diana mastocitos y basófilos) y lumiliximab (anticuerpo anti-CD23; selecciona como diana mastocitos y basófilos), con la condición de que el inhibidor para su uso según la invención inhiba CD80 y/o CD86.

La proteína precursora de IL-10 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_000563.1 GI: 10835141. CTLA4 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_005205.2 GI: 21361212 y NP\_001032720.1 GI: 83700231. PD-1 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_005009.2 GI: 167857792. PD-L1 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001300958.1 GI: 930425329, NP\_001254635.1 GI: 390979639, NP\_054862.1 GI: 7661534. PD-L2 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_079515.2 GI: 190014605. BTLA puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_861445.3 GI: 145580621, NP\_001078826.1 GI: 145580619. CD160 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_008984.1 GI: 5901910. LAG-3 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_002277.4 GI: 167614500. 2B4 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_057466.1 GI: 7706529, NP\_001160136.1 GI: 262263438, NP\_001160135.1 GI: 262263435. B7-H3 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001019907.1 GI: 67188443, NP\_079516.1 GI: 13376852. B7-H4 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001240779.1 GI: 359718947, NP\_001240778.1 GI: 359718944, NP\_078902.2 GI: 99028881. B7S3 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001272892.1 GI: 552953846, NP\_001272894.1 GI: 552953752. BTN2L2 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001291490.1 GI: 752292706.

B7-1 (también conocido como CD80) puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_005182.1 GI: 4885123. B7-2 (también conocido como CD86) puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001193854.1 GI: 332634954, NP\_001193853.1 GI: 332634950, NP\_795711.1 GI: 332634944, NP\_787058.4 GI: 332634934, NP\_008820.3 GI: 332634929. CD40 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001289682.1 GI: 720642787, NP\_690593.1 GI: 23312371, NP\_001241.1 GI: 4507581. CD40L (también conocido como CD154) puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_000065.1 GI: 4557433. OX40 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_003318.1 GI: 4507579. OX40L puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001284491.1 GI: 662033902, NP\_003317.1 GI: 4507603. CD30 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001268359.2 GI: 597709797, NP\_001234.3 GI: 597709795. CD30L puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001239219.1 GI: 356582497, NP\_001235.1 GI: 4507607. 4-1BB puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001552.2 GI: 5730095. 4-BBL puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_003802.1. GITR puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_683700.1 GI: 23238197, NP\_683699.1 GI: 23238194, NP\_004186.1 GI: 4759246. El ligando de GITR puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_005083.2 GI: 157419142. LIGHT puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_742011.2 GI: 291045244, NP\_003798.2 GI: 25952144. CD27 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001233.1 GI: 4507587. CD45RB puede representarse mediante la secuencia del número de registro de NCBI: NG\_007730. CD2 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001758.2 GI: 156071472. LFA-3 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001138294.1 GI: 221316575, NP\_001770.1 GI: 4502677. B7-H3 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001019907.1 GI: 67188443, NP\_079516.1 GI: 13376852. B7-H4 puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001240779.1 GI: 359718947, NP\_001240778.1 GI: 359718944, NP\_078902.2 GI: 99028881. ICOS (también conocido como B7-H2) puede representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_036224.1 GI: 15029518. Los ligandos de ICOS pueden representarse mediante la secuencia de los números de registro de NCBI: NP\_001269981.1 GI: 545688894. Los inhibidores según la invención son preferiblemente anticuerpos de bloqueo monoclonales o fragmentos de los mismos, ScFv o proteínas de fusión solubles de las moléculas inhibidoras. El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), que también se conoce como CD152, es una proteína implicada en la regulación del sistema inmunitario. CTLA4 que se produce de manera natural se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.434.131, 5.844.095 y 5.851.795. Las proteínas CTLA4 naturales se codifican por el gen de CTLA4. CTLA4 es una proteína de superficie celular, que tiene un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal. El dominio extracelular se une a, y/o interfiere con, antígenos diana, tales como CD80 y CD86, sirve como interrupción natural de la estimulación de células T. En algunas realizaciones, el dominio extracelular de la molécula de CTLA4 comienza con metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; en otras realizaciones, el dominio extracelular comienza con alanina en la posición ~1 y termina en ácido aspártico en la posición +124.

Una molécula de CTLA4 es una molécula que comprende un dominio extracelular de antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4). En algunas realizaciones, el dominio extracelular de CTLA4 comprende una porción de la proteína de CTLA4 que reconoce y se une a al menos un antígeno de B7 (CD80/86) tal como un antígeno de B7 expresado en células B y APC. El dominio extracelular también puede incluir fragmentos o derivados de CTLA4 que se unen a un antígeno de B7. El dominio extracelular de CTLA4 también puede reconocer y unirse a CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2). El dominio extracelular también puede incluir fragmentos o derivados de CTLA4 que se unen a CD80 y/o CD86. La molécula de CTLA4 puede ser una proteína de fusión, en la que una proteína de fusión se define como una o más secuencias de aminoácidos unidas entre sí usando métodos bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos unidas forman de ese modo una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la molécula de CTLA4 contiene al menos una porción de una inmunoglobulina, tal como la porción de Fc de una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la molécula de CTLA4 es una molécula de CTLA4 aislada y purificada. En una realización preferida, el inhibidor de la coestimulación de células T comprende el dominio extracelular de CTLA4, o un fragmento funcional o variante inmunológicamente activa del mismo. El inhibidor de la coestimulación de células T puede unirse a un antígeno de B7 expresado en células B u otras células presentadoras de antígenos (APC). En algunas realizaciones, el antígeno de B7 se expresa en células B y en APC. En algunas realizaciones, la proteína de fusión es abatacept. Abatacept es una proteína de fusión soluble que consiste en el dominio extracelular de CTLA-4 humano unido a la porción de Fc modificada (dominios de bisagra, CH2 y CH3) de inmunoglobulina humana G1 (IgG1). Abatacept se produce mediante tecnología de DA recombinante en un sistema de expresión de células de mamífero. El peso molecular aparente de abatacept es de 92 kilodalton. Abatacept se desarrolló por Bristol-Myers Squibb y se divulga, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.851.795, la patente estadounidense 7.455.835 y la publicación de patente estadounidense 2001 1/31 1529. Abatacept se une de manera selectiva a CD80 y CD86, bloqueando de ese modo la interacción con CD28 e interfiriendo con la activación de células T. Inhibe la activación de células T vírgenes, teniendo por tanto el potencial para inhibir de manera selectiva la respuesta de células T frente a antígenos específicos en lugar de inmunosupresión amplia. En algunas realizaciones, la composición comprende además un portador basado en aceite tal como una emulsión de agua en aceite (por ejemplo, IFA o Montamida ISA). La composición puede administrarse mediante infusión intravenosa, tal como en aproximadamente de 50 a 200 ml de solución salina fisiológica o a una dosis que oscila desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg o a una dosis que oscila desde aproximadamente 250 hasta 2000 mg, o a una dosis de 500 mg, 750 mg o 1000 mg.

Las dosificaciones de los agentes pueden variar dependiendo del sujeto y del modo de administración, la solicitud de patente estadounidense con el número de publicación estadounidense US 2003/0083246 y la solicitud de patente estadounidense con el número de publicación estadounidense US 2004/0022787 enseñan calendarios de dosificación y de administración para CTLA4Ig que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 para tratar enfermedades reumáticas, tales como artritis reumatoide. Una cantidad eficaz de molécula de CTLA4Ig puede ser una cantidad de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso de un sujeto. En otra realización, la cantidad eficaz es una cantidad de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso de un sujeto. En una realización específica, la cantidad eficaz de CTLA4Ig es de aproximadamente 2 mg/kg de peso de un sujeto. En otra realización específica, la cantidad eficaz de CTLA4Ig es de aproximadamente 10 mg/kg de peso de un sujeto. En otra realización específica, una cantidad eficaz de CTLA4Ig es de 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60 kg, 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg y 1000 mg para un sujeto que pesa más de 100 kg. Una cantidad eficaz de molécula de CTLA4Ig puede administrarse a un sujeto cada día, cada semana, cada mes y/o cada año, en una única o múltiples veces por hora/día/semana/mes/año, dependiendo de las necesidades. Por ejemplo, en una realización, una cantidad eficaz de la molécula de CTLA4Ig puede administrarse inicialmente una vez cada dos semanas durante un mes, y a continuación una vez al mes después de eso. La administración de las moléculas de CTLA4Ig de la invención puede ser mediante una infusión intravenosa de 30 minutos a una hora o más. Alternativamente, de una única a múltiples inyecciones subcutáneas pueden administrar la dosificación requerida. Normalmente, una infusión intravenosa de 30 minutos es la vía de administración usada durante la fase temprana de tratamiento. La dosis puede repetirse 2 y 4 semanas después de la dosis inicial, a continuación cada 4 semanas después de eso. Puede administrarse sola o con fármacos que modifican la enfermedad distintos de antagonistas de TNF. La inyección subcutánea es el modo de administración típico usado durante la fase de mantenimiento. Por ejemplo, tras una única infusión intravenosa como dosis de carga (según las categorías de peso corporal anteriores), pueden administrarse 125 mg administrados mediante inyección subcutánea dentro del plazo de un día, seguido por 125 mg por vía subcutánea una vez por semana. Los pacientes que no pueden recibir una infusión pueden iniciar inyecciones semanales por vía subcutánea sin una dosis de carga intravenosa. A los pacientes que pasan de la terapia intravenosa a la administración subcutánea se les puede administrar la primera dosis subcutánea en lugar de la siguiente dosis intravenosa planificada.

El monómero de abatacept comprende un polipéptido de CTLA4-Ig de la siguiente secuencia:

MHVAQPAVV LASSRG IASFVCEY ASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMM  
 GNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIGNGT  
 QIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL  
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNV  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

El dominio extracelular de CTLA4 corresponde a los aa 1-125 de SEQ ID NO: 1. Los derivados funcionales de CTLA4 comprenden variantes del mismo. Las moléculas de CTLA4-Ig pueden tener secuencias de tipo natural o mutantes, por ejemplo, con respecto a las secuencias de dominio extracelular de CTLA4 y de región constante de inmunoglobulina. Una molécula de monómero de CTLA4-Ig puede comprender un dominio extracelular de CTLA4 humano. En una realización, el dominio extracelular puede comprender la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 89-463 de SEQ ID NO: 1 tal como se divulga en el documento EP1962886 que codifican para SEQ ID NO: 1. En otra realización, el dominio extracelular puede comprender secuencias mutantes de CTLA4 humano. En otra realización, el dominio extracelular puede comprender cambios de nucleótidos con respecto a los nucleótidos 89-463 de SEQ ID NO: 1 tal como se divulga en el documento EP1962886 de tal manera que se realizan cambios de aminoácidos conservativos. En otra realización, el dominio extracelular puede comprender una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a los nucleótidos 89-463 de SEQ ID NO: 1 tal como se divulga en el documento EP1962886. En una realización, una molécula de monómero de CTLA4-Ig comprende una región bisagra de IgG humana modificada (nucleótidos 464-508 de SEQ ID NO: 1 tal como se divulga en el documento EP1962886; aminoácidos 152-166 de SEQ ID NO: 2) en la que las serinas en los residuos de aminoácido 156, 162 y 165 de SEQ ID NO: 1 se han modificado por ingeniería a partir de cisteínas presentes en la secuencia de tipo natural. Las variantes de CTLA4 comprenden opcionalmente al menos una modificación de aminoácido en una proteína de CTLA4 nativa o en SEQ ID NO: 1. En esta realización, se realizan una o más modificaciones en una o más de las siguientes posiciones (numeración como en la SEQ ID NO: 1): 29, 30, 31, 33, 35, 49, 51, 53, 59, 61, 63, 64, 93, 95, 97, 98, 102, 103, 104, 105 ó 106. En algunas realizaciones, la modificación es una o más de las siguientes sustituciones: A29E, A29F, A29H, A29K, A29N, A29Q, A29R, T30E, T30H, T30R, T30V, E31D, E31I, E31M, E31T, E31V, R33E, R33F, R33I, R33L, R33M, R33Q, R33T, R33W, R33Y, T35D, T35E, T35F, T35M, T35V, T35Y, A49D, A49E, A49F, A49T, A49W, A49Y, T51D, T51E, T51H, T51L, T51N, T51Q, T51R, T51S, T51V, M53E, M53F, M53H, M53Q, M53W, M53Y, T59H, T59I, T59L, T59N, T59Q, T59V, T59Y, L61A, L61D, L61E, L61F, L61G, L61H, L61I, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93N, K93Q, K93R, K93S, K93T, K93V, K93W, K93Y, E95D, E95H, E95L, E95Q, E95Y, M97D, M97F, M97I, M97N, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103D, Y103E, Y103F, Y103H, Y103N, Y103Q, Y103W, L104F, L104H, L104M, L104V, L104Y, G105D, G105E, I106E e I106Y. En algunas realizaciones son particularmente útiles las variantes de CTLA4 que tienen una o más sustituciones seleccionadas de A29H, T51N, M53Y, L61E y K93Q, incluyendo combinaciones particularmente útiles A29H/K93Q, A29H/M53Y, A29H/T51N, T51N/K93Q, T51N/M53Y, A29H/L61E/K93Q, A29H/M53Y/K93Q, A29H/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E, M53Y/L61E/K93Q, T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/M53Y/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q y A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q.

Puede realizarse cualquier combinación de sustituciones individuales, de todas y cada una de las combinaciones posibles, y puede incluirse o excluirse independientemente una posición o sustitución individual de la lista de posibilidades. En general, en comparación con CTLA4 (o región de Fc) de tipo natural u original, generalmente las variantes de la invención tienen 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácido en la región CTLA4, aunque en algunos casos pueden usarse más sustituciones, siempre que se conserve la función deseada. De manera similar, el dominio de Fc también puede tener sustituciones de esta manera. Las variantes de CTLA4 conservan o potencian generalmente la unión a uno o más de los ligandos de CTLA4, tal como unión potenciada a B7-1 y/o B7-2. La porción de Fc está compuesta por la región de Fc o alguna porción de la región de Fc de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, los polipéptidos son proteínas que son fusiones de CTLA4 con la región de Fc de un anticuerpo. Por "Fc" o "región de Fc", tal como se usa en el presente documento, quiere decirse el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y el extremo N-terminal de bisagra flexible con respecto a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Por "polipéptido de Fc", tal como se usa en el presente documento, quiere decirse un polipéptido que comprende la totalidad o parte de una región de Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc. Las proteínas de CTLA4 pueden unirse a regiones de Fc mediante un ligador. El término "ligador" se usa para designar polipéptidos que comprenden dos o más residuos de aminoácido unidos mediante enlaces peptídicos y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Una variedad de ligadores pueden encontrar uso en algunas realizaciones descritas en el presente documento para unir de manera covalente regiones de Fc a una pareja de fusión. "Ligador" en el presente documento también se

denomina "secuencia de ligador", "espaciador", "secuencia de anclaje" o equivalentes gramaticales de los mismos. Pueden usarse varias estrategias para unir de manera covalente moléculas entre sí. Estas incluyen, pero no se limitan a, uniones de polipéptido entre extremos N y C-terminales de proteínas o dominios de proteína, unión mediante enlaces disulfuro, y unión mediante reactivos de reticulación química. En un aspecto de esta realización, el ligador es un enlace peptídico, generado mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El péptido ligador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácido: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido ligador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal manera que adopten la conformación correcta una con respecto a otra de modo que puedan conservar la actividad deseada. En una realización, el ligador tiene desde aproximadamente 1 hasta 50 aminoácidos de longitud, de manera preferible de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una realización, pueden usarse ligadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los ligadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, donde n es un número entero de al menos uno, polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros ligadores flexibles. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, incluyendo, pero sin limitarse a, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como ligadores, es decir pueden encontrar uso como ligadores.

Las proteínas de CTLA4-Ig divulgadas en el presente documento pueden comprender un CTLA4 variante, una región de Fc variante, o tanto un CTLA4 variante como una región de Fc variante. Una variante comprende una o más modificaciones de aminoácido con respecto a una proteína de CTLA4-Ig original, en la que la(s) modificación/modificaciones de aminoácido proporciona(n) una o más propiedades descritas. Una modificación de aminoácido puede ser una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en una secuencia de polipéptido. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" en el presente documento quiere decirse el remplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido original por otro aminoácido. Por "inserción de aminoácido" o "inserción", tal como se usa en el presente documento, quiere decirse la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido original. Por "delección de aminoácido" o "delección", tal como se usa en el presente documento, quiere decirse la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido original. Las regiones de Fc de anticuerpo contienen hidratos de carbono en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada. Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad diferenciada de estructuras de hidratos de carbono unidas en N. Aparte del hidrato de carbono unido a la cadena pesada, hasta el 30 % de las IgG humanas tienen una región de Fab glicosilada. IgG tiene un único hidrato de carbono biantenarico unido en N en Asn297 del dominio CH2. Para IgG o bien de suero o bien producida *ex vivo* en hibridomas o células modificadas por ingeniería, las IgG son heterogéneas con respecto al hidrato de carbono unido en Asn297. Para IgG humana, el oligosacárido principal consiste normalmente en GlcNAc2Man3GlcNAc, con diferentes números de residuos externos. Los términos "CTLA4-Ig" o "molécula de CTLA4-Ig" o "molécula de CTLA4Ig" o "proteína de fusión de CTLA4-Ig" o "proteína de CTLA4-Ig" se usan de manera intercambiable, y se refieren a una molécula de proteína que comprende al menos un polipéptido que tiene un dominio extracelular de CTLA4 o porción o derivados del mismo y una región constante de inmunoglobulina o porción o derivados de la misma. El dominio extracelular y la región constante de inmunoglobulina pueden ser de tipo natural o mutantes o modificados, y de mamífero, incluyendo de humano o ratón. El polipéptido puede comprender además dominios de proteína adicionales. Una molécula de CTLA4-Ig también puede referirse a formas multiméricas del polipéptido, tales como dímeros, tetrámeros y hexámeros. Una molécula de CTLA4-Ig también es capaz de unirse a CD80 y/o CD86. El término "B7-1" también se refiere a CD80; el término "B7-2" también se refiere a CD86; y el término "B7" se refiere tanto a B7-1 como a B7-2 (CD80 y CD86). El término "B7-1-Ig" o "B7-1lg" se refiere a CD80-Ig; el término "B7-2-Ig" o "B7-2lg" se refiere a CD86-Ig.

Mediadores de la coestimulación e inhibidores de la coestimulación se refieren a las moléculas que afectan, de manera positiva o negativa, al proceso de coestimulación de células T, tal como se describe en (Sharpe, 2009) y (Pilat *et al.*, 2012). En una realización, "CTLA4Ig" se refiere a una molécula de proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de residuos: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2; (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, o (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2, o (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. En forma monomérica, estas proteínas pueden denominarse en el presente documento "monómeros de SEQ ID NO: 2" o monómeros "que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 2". Estos monómeros de SEQ ID NO: 2 pueden dimerizarse, de tal manera que las combinaciones de dímeros pueden incluir, por ejemplo: (i) y (i); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) y (ii); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi); (iii) y (iii); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (iv); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (v); (v) y (vi); y, (vi) y (vi). Estas diferentes combinaciones de dímeros también pueden asociarse entre sí para formar moléculas de CTLA4Ig tetraméricas. Estos monómeros, dímeros, tetrámeros y otros multímeros pueden denominarse en el presente documento "proteínas de SEQ ID NO: 2" o proteínas "que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 2". La secuencia SEQ ID NO: 2 se divulga, por ejemplo, en los documentos WO/2007/076354 y WO/2002/002638 y consiste en: MGVLLTQRTLLSLVLLALLFPSMAMHVAQPAVV LASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY MMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPYPYILGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKSSD KTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 2). La secuencia de nucleótidos correspondiente se divulga en el documento WO/2002/002638. Tal como se usa en el presente documento, "abatacept" se refiere preferiblemente a proteínas de SEQ ID NO: 1. Tal como se usa

en el presente documento, el término “insuficiencia cardíaca” también comprende “insuficiencia cardíaca congestiva, (CHF)”, “insuficiencia cardíaca crónica”, “insuficiencia cardíaca aguda”, y se refiere a cualquier estado en el que el corazón es incapaz de bombear sangre a una tasa adecuada o hacerlo únicamente en presencia de presiones de llenado del ventrículo izquierdo aumentadas. Cuando el corazón es incapaz de bombear sangre de manera adecuada al resto del organismo a presiones de llenado del ventrículo izquierdo normales, la sangre puede retroceder a los pulmones, provocando que los pulmones se congestionen con líquido. Los síntomas típicos de insuficiencia cardíaca incluyen falta de aire (disnea), fatiga, debilidad, dificultad para respirar al estar tumbado e hinchamiento de las piernas, tobillos o abdomen (edema). Las causas de la insuficiencia cardíaca están relacionadas con diversos trastornos incluyendo arteriopatía coronaria, hipertensión sistémica, miocardiopatía o miocarditis, cardiopatía congénita, válvulas cardíacas anómalas o cardiopatía valvular, enfermedad pulmonar grave, diabetes, hipertiroidismo con anemia grave, arritmia o disritmia e infarto de miocardio. Puede producirse insuficiencia cardíaca en presencia de una fracción de eyección del ventrículo izquierdo normal (>50 %) o reducida (<50 %). Hay un reconocimiento aumentado de que estas dos condiciones representan dos estados patológicos diferentes, en vez de un continuo (Borlaug BA, Redfield MM. *Circulation*. 10 de mayo de 2011; 123(18):2006- 13).

La insuficiencia cardíaca incluye insuficiencia cardíaca sintomática y/o avanzada. En la insuficiencia cardíaca sintomática, el sujeto muestra síntomas de insuficiencia cardíaca tal como conoce el experto en la técnica. HF puede clasificarse en diversos grados de intensidad. Según la clasificación de la NYHA (Asociación Cardiológica de Nueva York), los pacientes con insuficiencia cardíaca se clasifican como pertenecientes a las clases I, II, III y IV de la NYHA. Un paciente que tiene insuficiencia cardíaca ya ha experimentado cambios estructurales y funcionales en su pericardio, miocardio, circulación coronaria o válvulas cardíacas. No será capaz de recuperar completamente su salud y necesita un tratamiento terapéutico. Los pacientes con clase I de la NYHA no tienen síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular pero ya tienen evidencias objetivas de insuficiencia funcional. Los pacientes con clase II de la NYHA tienen una ligera limitación de la actividad física. Los pacientes con clase III de la NYHA muestran una notable limitación de la actividad física. Los pacientes con clase IV de la NYHA son incapaces de llevar a cabo ninguna actividad física sin molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo. Esta clasificación funcional se complementa mediante la clasificación más reciente del Colegio de Cardiología de los Estados Unidos y la Asociación Estadounidense de Cardiología (véase *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38; 2101-2113, actualizado en 2005, véase *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 46; e1-e82). Se definen 4 estadios A, B, C y D. Los estadios A y B no son HF pero se considera que ayudan a identificar a pacientes de manera temprana antes de desarrollar “realmente” HF. Los pacientes con estadios A y B se definen mejor como aquellos con factores de riesgo para el desarrollo de HF. Por ejemplo, los pacientes con arteriopatía coronaria, hipertensión o diabetes mellitus que aún no demuestran una función de ventrículo izquierdo (LV) alterada, hipertrofia o distorsión de la cámara geométrica se considerarán en el estadio A, mientras que los pacientes que son asintomáticos pero demuestran hipertrofia de LV y/o función de LV alterada se designará como de estadio B. Entonces, el estadio C designa pacientes con síntomas actuales o pasados de HF asociados con cardiopatía estructural subyacente (la gran mayoría de los pacientes con HF), y el estadio D designa pacientes con HF realmente resistente al tratamiento. Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” pueden usarse de manera intercambiable y, en el presente documento, se usan en el sentido más amplio y abarcan diversos anticuerpos y estructuras miméticas de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticalinas, DARPinas, aficuerpos, afininas, afímeros, afitinas, alfacerpos, avímeros, finómeros, monocuerpos y otros dominios de unión, siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada. Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto.

Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, v, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Fv de VH o VL también se denominan “nanocuerpos”.

El término “miméticos de anticuerpos” se refiere a los compuestos orgánicos o dominios de unión que no son derivados de anticuerpo pero que pueden unirse específicamente a un antígeno como lo hacen los anticuerpos. Incluyen anticalinas, DARPinas, aficuerpos, afininas, afímeros, afitinas, alfacerpos, avímeros, finómeros, monocuerpos y otros. El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una especie o fuente particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una especie o fuente diferente.

Un anticuerpo de esta invención puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM5, IgA, IgD y/o IgE.

En el contexto de la presente invención, el término “polinucleótido” incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm, ARNip, ARNhp) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. El polinucleótido puede ser monocatenario o bicatenario. El polinucleótido puede sintetizarse usando análogos o derivados de oligonucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de inosina o fosforotioato). El término polinucleótido y polipéptido también incluye derivados y fragmentos funcionales de los mismos. Un “derivado” puede ser una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ADN, que codifica para el

polinucleótido tal como se definió anteriormente, o una molécula de ácido nucleico que comprende el polinucleótido tal como se definió anteriormente, o un polinucleótido de secuencia complementaria. En el contexto de la presente invención, el término "derivados" también se refiere a polinucleótidos y/o polipéptidos más largos o más cortos que tienen, por ejemplo, un porcentaje de identidad de al menos el 41 %, el 50 %, el 60 %, el 65 %, el 70 % o el 75 %, más preferiblemente de al menos el 85 %, como ejemplo de al menos el 90 %, e incluso más preferiblemente de al menos el 95 % o el 100 % con secuencias mencionadas o con su secuencia complementaria o con su secuencia de ADN o ARN correspondiente. El término "derivados" y el término "polinucleótido" también incluyen oligonucleótidos sintéticos modificados. El término "derivado" también puede incluir análogos de nucleótido, es decir un ribonucleótido o desoxirribonucleótido que se produce de manera natural sustituido por un nucleótido que no se produce de manera natural. El término "derivados" también incluye ácidos nucleicos o polipéptidos que pueden generarse mutando uno o más nucleótidos o aminoácidos en sus secuencias, equivalentes o secuencias precursoras. El término "derivados" también incluye al menos un fragmento funcional del polinucleótido.

La proteína mencionada en la presente invención también incluye la proteína correspondiente codificada a partir de genes ortólogos y homólogos correspondientes, mutantes funcionales, derivados funcionales, fragmentos funcionales o análogos, isoformas de los mismos.

El término "análogo", tal como se usa en el presente documento haciendo referencia a una proteína, significa un péptido modificado en el que uno o más residuos de aminoácido del péptido se han sustituido por otros residuos de aminoácido y/o en el que uno o más residuos de aminoácido se han delecionado del péptido y/o en el que uno o más residuos de aminoácido se han añadido al péptido. Tal adición o delección de residuos de aminoácido puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal del péptido.

El término "derivado", tal como se usa en el presente documento en relación con una proteína, significa un péptido químicamente modificado o un análogo del mismo, en el que al menos un sustituyente no está presente en el péptido sin modificar o un análogo del mismo, es decir un péptido que se ha modificado de manera covalente. Modificaciones típicas son amidas, hidratos de carbono, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres y similares. Tal como se usa en el presente documento, el término "derivados" también se refiere a polipéptidos más largos o más cortos que tienen, por ejemplo, un porcentaje de identidad de al menos el 41 %, preferiblemente al menos 41,5 %, el 50 %, 54,9 %, el 60 %, 61,2 %, 64,1 %, el 65 %, el 70 % o el 75 %, más preferiblemente de al menos el 85 %, como ejemplo de al menos el 90 %, e incluso más preferiblemente de al menos el 95 % con las proteínas anteriormente definidas o con una secuencia de aminoácidos de la región correspondiente codificada a partir de un gen ortólogo u homólogo. El término "derivado" también incluye ácidos nucleicos o polipéptidos que pueden generarse mutando uno o más nucleótidos o aminoácidos en sus secuencias, equivalentes o secuencias precursoras. El término "derivado" también incluye mutantes funcionales de la proteína.

En la presente invención "mutantes funcionales" de la proteína son mutantes que pueden generarse mutando uno o más aminoácidos en sus secuencias y que mantienen su actividad, por ejemplo, la capacidad de inhibir la coestimulación de células T. De hecho, la proteína definida en la invención, si se requiere, puede modificarse *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo mediante glicosilación, miristoilación, amidación, carboxilación o fosforilación, y puede obtenerse, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis o recombinantes conocidas en la técnica.

En la presente invención, "funcional" se entiende, por ejemplo, como "que mantiene su actividad", por ejemplo la capacidad de inhibir la coestimulación de células T.

Tal como se usa en el presente documento, "fragmentos" se refiere a polipéptidos que tienen preferiblemente una longitud de al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente al menos 15, al menos 17 aminoácidos o al menos 20 aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos o al menos 37 ó 40 aminoácidos, y más preferiblemente de al menos 50 ó 100 ó 150 ó 200 ó 250 ó 300 ó 350 ó 400 ó 450 ó 500 aminoácidos.

Según la presente invención, una "cantidad eficaz" de una composición es una que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado, en este caso una mejora o el tratamiento de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

Se entiende que la dosificación eficaz dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, clase de tratamiento simultáneo, si lo hay, frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. No se pretende que los intervalos proporcionados de dosis eficaces del inhibidor o la molécula de la invención (por ejemplo, desde 1 mg/kg hasta 100 mg/kg, en particular administradas de manera sistémica) limiten la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosificación preferida puede personalizarse para el sujeto individual, tal como se entiende y puede determinarse por un experto en la técnica, sin experimentación excesiva.

La administración de polinucleótidos de la presente invención puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos, en los que se introduce un ácido nucleico en una célula diana deseada *in vitro* o *in vivo*.

Un aspecto de la presente invención comprende un constructo de ácido nucleico comprendido dentro de un vehículo

de administración. Un vehículo de administración es una entidad mediante la cual puede transportarse una secuencia de nucleótidos desde al menos un medio hasta otro. Los vehículos de administración pueden usarse generalmente para la expresión de las secuencias codificadas dentro del constructo de ácido nucleico y/o para la administración intracelular del constructo. Se encuentra dentro del alcance de la presente invención que el vehículo de administración pueda ser un vehículo seleccionado del grupo de vehículos basados en ARN, vehículos/vectores basados en ADN, vehículos basados en lípidos, vehículos basados en virus y vehículos basados en células. Los ejemplos de tales vehículos de administración incluyen: microesferas de polímero biodegradable, formulaciones basadas en lípidos tales como portadores de liposomas, recubrimiento del constructo sobre partículas de oro coloidal, lipopolisacáridos, polipéptidos, polisacáridos, pegilación de vehículos virales. En una realización de la presente invención puede comprender un virus como vehículo de administración, en el que el virus puede seleccionarse de: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus vaccinia, espumavirus, citomegalovirus, virus del bosque Semliki, poxvirus, vector de virus de ARN y vector de virus de ADN. Tales vectores virales se conocen bien en la técnica.

Las técnicas de transferencia génica habitualmente usadas incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano, transfección, electroporación y microinyección y métodos virales. Otra técnica para la introducción de ADN en células es el uso de liposomas catiónicos. Formulaciones de lípidos catiónicos comercialmente disponibles son, por ejemplo, Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin 2000 (Life Technologies).

Las composiciones farmacéuticas anteriores son preferiblemente para administración sistémica, oral, local, preferiblemente rectal, o tópica.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de una disolución, por ejemplo una disolución inyectable, una crema, pomada, comprimido, suspensión o similar. La composición puede administrarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo mediante inyección, particularmente mediante inyección intraocular, mediante aplicación oral, tópica, nasal, rectal, etc. El portador puede ser cualquier portador farmacéutico adecuado. Preferiblemente, se usa un portador que es capaz de aumentar la eficacia del polinucleótido para entrar en las células diana. Ejemplos adecuados de tales portadores son liposomas, particularmente liposomas catiónicos.

El vector de expresión de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión, o ambos, tales como plásmidos y virus. Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Pueden prepararse constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procarionta o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2  $\mu$ ,  $\lambda$ , SV40, virus del papiloma bovino y similares.

De manera deseable, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos para el tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que va a introducirse el vector, según sea apropiado y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o en ARN. El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes de marcadores, que permiten la selección de huéspedes transformados o transfectados. Los genes de marcadores incluyen resistencia a biocida, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes de marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina. El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica para el inhibidor (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a, o que se hibrida con, la secuencia de nucleótidos que codifica para el inhibidor. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos de desarrollo, se encuentra dentro de las capacidades habituales del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también se encuentra dentro de las capacidades del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas. Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden diseñarse para expresión transitoria, para expresión estable o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinante pueden realizarse para expresión constitutiva o para expresión inducible.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica, por inhalación (por ejemplo, mediante un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleural, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial o intravenosa), tópica y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá, tal como se conoce en la técnica, de factores tales como la especie, edad, sexo y estado global del sujeto, la naturaleza y gravedad del estado que está tratándose y/o de la naturaleza de la composición particular (es decir, dosificación, formulación) que está administrándose. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden presentarse en unidades diferenciadas, tales como cápsulas, obleas, pastillas para chupar o comprimidos,

que contienen, cada uno, una cantidad predeterminada del inhibidor de esta invención; como polvo o gránulos; como disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. La administración oral puede realizarse complejando un inhibidor de la presente invención con un portador capaz de resistir la degradación por enzimas digestivas en el intestino de un animal.

Los ejemplos de tales portadores incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, tal como se conoce en la técnica. Tales formulaciones se preparan mediante cualquier método adecuado de farmacia, lo cual incluye la etapa de poner en asociación la composición y un portador adecuado (que puede contener uno o más componentes auxiliares tal como se indicó anteriormente). Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen pastillas para chupar que comprenden la composición de esta invención en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o goma tragacanto; y pastillas que comprenden la composición en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga. Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para administración parenteral pueden comprender disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas de la composición de esta invención, preparaciones que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos, que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones, disoluciones y emulsiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, solución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolito (tales como los basados en solución de Ringer con dextrosa) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, en ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase anteriormente descrita. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición inyectable, estable, estéril de esta invención en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. La composición puede proporcionarse en forma de un liofilizado, que puede reconstituirse con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para inyección en un sujeto. La forma de dosificación unitaria puede ser de desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 10 gramos de la composición de esta invención. Normalmente, las dosis para pacientes para administración parenteral de los compuestos descritos en el presente documento oscilan desde aproximadamente 1 mg/día hasta aproximadamente 10.000 mg/día, más normalmente desde aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 1.000 mg/día y lo más normalmente desde aproximadamente 50 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día. Mencionado en cuanto al peso corporal del paciente, las dosificaciones típicas oscilan desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 150 mg/kg/día, más normalmente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 15 mg/kg/día y lo más normalmente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, por ejemplo 5 mg/kg/día o 3 mg/kg/día.

Cuando la composición es sustancialmente insoluble en agua, puede incluirse una cantidad suficiente de agente emulsionante, que es fisiológicamente aceptable, en una cantidad suficiente para emulsionar la composición en un portador acuoso. Un agente emulsionante útil de este tipo es fosfatidil-colina. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Pueden prepararse mezclando la composición con uno o más portadores sólidos convencionales, tales como, por ejemplo, manteca de cacao y después conformando la mezcla resultante. Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para aplicación tópica a la piel adoptan preferiblemente la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de dos o más de los mismos. En algunas realizaciones, por ejemplo, puede realizarse la administración tópica mezclando una composición farmacéutica de la presente invención con un reactivo lipófilo (por ejemplo, DMSO) que es capaz de pasar a la piel. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración transdérmica pueden estar en forma de parches diferenciados adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del sujeto durante un periodo de tiempo prolongado. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden administrarse mediante iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3:318 (1986)) y normalmente adoptan la forma de una disolución acuosa opcionalmente tamponada de la composición de esta invención. Además, las composiciones de esta invención pueden administrarse por vía oral, intranasal, parenteral (por ejemplo, intravenosa), mediante inyección intramuscular, mediante inyección intraperitoneal, por vía transdérmica, extracorpórea, tópica o similar. La cantidad exacta del ácido nucleico o vector requerido tal como se definió anteriormente variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, el ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada ácido nucleico o vector. Sin embargo, un experto habitual en la técnica puede determinar una cantidad apropiada usando tan sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. En las composiciones anteriores, materiales adicionales así como técnicas de procesamiento y similares

pueden exponerse en la parte 5 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, 2000, Marck Publishing Company, Easton, Pensilvania.

Los compuestos de esta invención también pueden administrarse en formas de liberación sostenida o a partir de sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. También puede encontrarse una descripción de materiales de liberación sostenida representativos en los materiales incorporados en Remington's Pharmaceutical Sciences. Además, pueden prepararse formulaciones farmacéuticas usando un procedimiento, que se conoce generalmente en la técnica farmacéutica. La composición farmacéutica para su uso según la invención puede comprender además una cantidad eficaz de al menos otro agente terapéutico. Dicho agente terapéutico puede ser uno o más de: b-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, inhibidores de ACE, bloqueantes de receptor de angiotensina, diuréticos, digitálicos, inhibidores de fosfodiesterasa, hidralazina y dinitrato de isosorbida, o administración de apoyo mecánico. En la presente invención, cuando la molécula de la invención se administra con otro agente terapéutico, puede administrarse de manera simultánea o secuencial.

La activación de células T puede medirse mediante métodos no limitados a los siguientes: detección y/o cuantificación de proteína y/o ARNm de marcadores de superficie celular tales como CD69, CD25, HLA-DR, CD62L, CD 154 y/o la producción de IL-2, movilización de calcio, fosforilación de ZAP-70, fosforilación de LAT, fosforilación de Lck; activación de NF-[kappa]B, activación de MEK, activación de NFAT, activación de Ap-I; proliferación y citotoxicidad de células T (esta última sólo en el caso de células T CD8\*) (definida como la capacidad para destruir células diana). Pueden detectarse cambios en la cantidad de las moléculas anteriores a nivel de proteína y/o ARNm, mediante lo cual un aumento o disminución en su cantidad puede identificar un aumento o disminución, respectivamente, en la activación de una célula T a lo largo del tiempo.

En una realización preferida, el vector según la invención es un vector de expresión seleccionado del grupo que consiste en: plásmidos, partículas viral y fagos.

Preferiblemente, dicha célula huésped se selecciona del grupo que consiste en: células bacterianas, células fúngicas, células de insecto, células animales, células vegetales, siendo preferiblemente una célula animal, más preferiblemente una célula humana. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped modificada por ingeniería genética" se refiere a células huésped que se han transducido, transformado o transfectado con el polinucleótido o con el vector descritos anteriormente. Como ejemplos representativos de células huésped apropiadas, pueden mencionarse células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas tales como levadura, células de insecto tales como Sf9, células animales tales como CHO o COS, células vegetales, etc. Se considera que la selección de un huésped apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas en el presente documento. Preferiblemente, dicha célula huésped es una célula animal, y lo más preferiblemente una célula humana.

En una realización preferida, el inhibidor tal como se definió anteriormente se combina con al menos un agente terapéutico, preferiblemente al menos uno de: b-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, inhibidores de ACE, bloqueantes de receptor de angiotensina, diuréticos, digitálicos, inhibidores de fosfodiesterasa, hidralazina y dinitrato de isosorbida, apoyo mecánico.

En la invención, el sujeto (o paciente) es un mamífero, preferiblemente un humano.

Ahora se ilustrará la invención por medio de ejemplos no limitativos haciendo referencia a las siguientes figuras.

Figura 1. Caracterización de la firma inflamatoria en ventrículo izquierdo hipertrófico de ratones. Análisis de expresión génica (qPCR en tiempo real de TaqMan) de mediadores de la inflamación dentro del ventrículo izquierdo de ratones C57BL6/J. Expresión de ARNm relativa en ratones de control operados de manera simulada (barras blancas) y ratones operados por TAC (barras negras) a las 1 y 4 semanas tras la cirugía, normalizada de manera interna con respecto a la expresión de ARNr de 18s. Tnfa, Il6, Tgfb1, Ccl2, Ccl4, Ccl5, Cxcl10, Cxcl11 y el marcador celular innato Itgam (CD11b) estaban significativamente aumentados en el grupo de TAC en comparación con el simulado, 1 semana tras la TAC. Cuatro semanas tras la operación, Il4 y el marcador de células T Cd3e estaban significativamente aumentados. Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=7-9). ANOVA de dos factores, prueba a posteriori de Bonferroni: \*, valor de p <0,05; \*\*, valor de p <0,01; \*\*\*, valor de p <0,001.

Figura 2. La asociación entre inflamación y disfunción cardíaca. Índice de disfunción cardíaca (HDI) representado gráficamente en el eje de las y, calculado como  $(-1) \times (\% \text{ de acortamiento fraccional})$ , para todos los modelos de ratón analizados en este estudio (normalizado con respecto a sus grupos de control coincidentes) frente a un índice de inflamación en el eje de las x, calculado como nivel de ARNm de la citocina proinflamatoria IL-6 dividido entre el nivel de ARNm de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Cada punto representa datos de un ratón. Los puntos más grandes indican la media de cada grupo, mientras que las elipses sombreadas representan una desviación estándar con respecto a la media. Los valores de HDI se normalizaron para evitar variaciones específicas de trasfondo de raza. Sano se refiere a animales de control operados de manera simulada (tratados con PBS). El modelo de TAC de HF se refiere a ratones de control operados por TAC (tratados con PBS). La normalización del HDI para cada ratón se calculó con la siguiente fórmula:  $[(\text{HDI de muestra} - \text{HDI media de control coincidente}) / \text{HDI media de control}]$

coincidente]. Se usaron los siguientes grupos como controles coincidentes para la normalización: para ratones operados por TAC a 1 ó 4 semanas tras la operación: ratones operados de manera simulada antes de la operación (lectura basal); para ratones sanos (operados de manera simulada): operados de manera simulada antes de la operación (lectura basal); para transgénicos para Akt: control WT; para ratones corredores: ratones sedentarios congénicos.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Figura 3. Infiltrado de células T en ventrículo izquierdo deficiente. (A) Tinción inmunohistoquímica (IHC) representativa de ventrículos izquierdos para detectar el marcador de células T CD3e (coloración marrón) en ratones simulados y con TAC a las 4 semanas. Aumento original de 10X; barras = 200  $\mu$ m. (B) Resumen de análisis de IHC. Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=6). Prueba de la t para datos independientes: \*\*, valor de p <0,01. (C) Tinción para detectar el marcador de células T CD3e (coloración marrón) en ratones operados por TAC, 1 semana tras la operación. Aumento original de 10X; barra = 200  $\mu$ m. (D) Análisis de FACS representativo de células CD3e<sup>+</sup>, enriquecidas en un gradiente de Lympholyte-M a partir de una suspensión de células cardíacas de ratones 1 semana tras la TAC. (E) Se extirparon ganglios linfáticos mediastinales (que drenan al corazón), ganglios linfáticos inguinales y bazo 2 días tras la operación de TAC o simulada, se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia medias de CD25 en células CD3e<sup>+</sup> se representan gráficamente como media  $\pm$  EEM; simulado (barras blancas), TAC (barras negras) (n=4). Prueba de la t para datos independientes \*, valor de p <0,05. (F) Tinción tricrómica de Azan representativa de biopsias cardíacas de donantes de tejido de ventrículo sanos (n=3), de pacientes con miocardiopatía dilatada debido a una mutación en lamina A/C, antes de la colocación de un dispositivo de asistencia de ventrículo izquierdo (HF LVAD 1M) (n=4), y de pacientes con miocardiopatía dilatada grave debido a una mutación en lamina A/C y una mutación en titina, antes de la colocación de un dispositivo de asistencia de ventrículo izquierdo (HF LVAD 2M) (n=2). Las zonas azules (más oscuras) indican deposición de colágeno (aumento original, 20X; barra = 100  $\mu$ m). (G) Análisis estadístico de deposición de colágeno en regiones de interés idénticas. Los valores son la media  $\pm$  EEM. Prueba exacta de Fisher para la presencia frente a la ausencia de fibrosis: \*, valor de p <0,05; \*\*, valor de p <0,01. También se asoció de manera positiva la cantidad de colágeno con el grado de HF (ANOVA de un factor con prueba a posteriori para detectar una tendencia lineal: p<0,001). (H) Tinción representativa para detectar el marcador de células T CD3e (coloración marrón; es decir los puntos marrones/más oscuros en el panel de la derecha "insuficiencia cardíaca grave") en las mismas muestras que en (F). (I) Análisis estadístico de IHC de CD3e. Los valores son la media  $\pm$  EEM. ANOVA de un factor con prueba a posteriori de Dunn: \*, valor de p <0,05. (J) Análisis estadístico de deposición de colágeno, en regiones de interés idénticas, en biopsias cardíacas de tejidos de ventrículo sanos (n=3) y pacientes con HF debida a estenosis aórtica (n=2) con tinción tricrómica de Azan. Los valores son la media  $\pm$  EEM. Tejidos de ventrículo sanos (barra blanca), HF con estenosis aórtica (barras negras). Prueba exacta de Fisher para la presencia frente a la ausencia de fibrosis: \*\*\*, valor de p <0,001. (K) Análisis estadístico de análisis de IHC de CD3e en las mismas muestras que en (J). Tejidos de ventrículo sanos (barra blanca), HF debida a estenosis aórtica (barras negras). Los valores son la media  $\pm$  EEM. Prueba de Mann-Whitney; \*, valor de p <0,05.

40  
45  
50  
55  
60

Figura 4. Abatacept reduce la progresión de la disfunción cardíaca en ratones con sobrecarga de presión. Se sometieron los ratones a operación de TAC o simulada; 2 días tras la operación, se trataron los ratones con tres inyecciones intraperitoneales por semana de 200  $\mu$ g de abatacept o PBS, durante 4 semanas. (A) Acortamiento fraccional (% de FS), (B) fracción de eyección (% de EF), (C) dimensión interna de ventrículo izquierdo en diástole (LVIDd), y (D) dimensión interna de ventrículo izquierdo en sístole (LVIDs) en ratones operados por TAC y de manera simulada en el nivel inicial y en los puntos de tiempo de 1, 3 y 4 semanas tras la operación, con y sin administración de abatacept. Los datos muestran la media de % de FS, % de EF, LVIDd y LVIDs para cada grupo experimental en todos los puntos de tiempo  $\pm$  EEM (n=7-9). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni: valores de p mostrados en el panel. Abatacept mejora la fibrosis cardíaca inducida por sobrecarga de presión en ratones. (E) Imágenes macroscópicas representativas del corazón de ratones no tratados, tratados con PBS y con inyección de abatacept 4 semanas tras la simulación o TAC (barra de escala = 2 mm). (F) Secciones cardíacas de ratones operados por TAC o de manera simulada no tratados, tratados con PBS o tratados con abatacept, a las 4 semanas tras la operación, se tiñeron con tinción tricrómica de Azan (n=2). Se aplicaron cinco regiones de interés idénticas (ROI) a todas las muestras. Se cuantificó la intensidad de tinción de colágeno mediante software de adquisición de imágenes; los puntos de la representación gráfica indican el % de píxeles de colágeno en cada ROI. Las barras rojas indican la media de % colágeno en cada grupo experimental. Las ROI con una señal de colágeno superior a cero se consideraron fibróticas. Se aplicaron pruebas exactas de Fisher para la presencia o ausencia de fibrosis a grupos operados de manera simulada frente a TAC para cada categoría de tratamiento. La línea roja discontinua separa ROI fibróticas de no fibróticas. \*, valor de p <0,05. (G-H) Se sometieron ratones a TAC, 2 semanas tras la operación, se trataron los ratones con tres inyecciones intraperitoneales por semana de 200  $\mu$ g de abatacept o PBS, durante 2 semanas. Se midieron (G) el acortamiento fraccional (% de FS) y (H) la fracción de eyección (% de EF) en el nivel inicial y a las 2 y 4 semanas tras la operación. Los datos muestran la media de % de FS y % de EF para cada grupo experimental en todos los puntos de tiempo  $\pm$  EEM (n=7). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni: \*\*\*, valor de p <0,001.

65

Figura 5. La administración de abatacept suprime la respuesta inmunitaria en ratones operados por TAC. (A) Se extirparon ganglios linfáticos mediastinales (que drenan al corazón), inguinales y bazo 1 semana tras la operación de TAC o simulada, se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo. Se representan gráficamente el porcentaje de células CD25<sup>+</sup> a partir de las CD3e<sup>+</sup> como media  $\pm$  EEM; simulado (barras blancas), TAC con

abatacept (barras grises) y TAC con PBS (barras negras) (n=3-4). ANOVA de un factor con prueba a posteriori de Tukey: \*, valor de  $p < 0,05$ ; \*\*, valor de  $p < 0,01$ ; \*\*\*, valor de  $p < 0,001$ . (B) Análisis estadístico de tinción inmunohistoquímica de ventrículos izquierdos para detectar el marcador de células T CD3e en ratones con TAC a las 4 semanas tras la operación, tratados con abatacept o PBS, e imágenes representativas de la tinción (coloración marrón; aumento original de 40X; barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ). Se representa gráficamente el número de células CD3e+ como media  $\pm$  EEM; TAC con abatacept (barras blancas); TAC con PBS (barras negras). Prueba de la t para datos independientes; \*, valor de  $p < 0,00$  (n=2). (C) Análisis estadístico de tinción inmunohistoquímica de ventrículos izquierdos para detectar el marcador de macrófagos AIF-1 en ratones con TAC a 1 semana tras la operación, tratados con abatacept o PBS, e imágenes representativas de la tinción (coloración marrón; aumento original de 20X; barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ ). Densidad de AIF-1 representada gráficamente como media  $\pm$  EEM; TAC con abatacept (barras blancas); TAC con PBS (barras negras). Prueba de la t para datos independientes; \*\*, valor de  $p < 0,001$  (n=2). (D) Análisis de expresión génica (qPCR en tiempo real de TaqMan) del ventrículo izquierdo de ratones C57BL6/J, 1 semana tras la operación de TAC o simulada, con tratamiento con abatacept o PBS. Las barras muestran la media relativa de la expresión de Il6 e Il10, normalizada de manera interna con respecto a la expresión de ARNr de 18s. Los valores son la media  $\pm$  EEM (simulado n=5; TAC n=8). ANOVA de un factor, prueba a posteriori de Dunn: \*, valor de  $p < 0,05$ ; n.s., no significativo. (E-F) Se tiñeron suspensiones de células cardíacas individuales de ratones operados por TAC, 1 semana tras la operación, y se analizaron mediante citometría de flujo. Se representa gráficamente el porcentaje de células vivas F4-80+ Ly6C+ a partir de CD11b+ CD45+ (E) y de células vivas F4-80+ Ly6C- a partir de CD11b+ CD45+ (F) como media  $\pm$  EEM; TAC con abatacept (círculos negros); TAC con PBS (cuadrados negros). Prueba de la t para datos independientes; \*, valor de  $p < 0,05$ ; \*\*, valor de  $p < 0,01$  (n=4, 3).

Figura 6. Abatacept atenúa HF mediante la acción de IL-10. (A) Tinción inmunohistoquímica de ventrículos izquierdos para detectar el marcador de células T CD3e en ratones K/O para IL-10 operados por TAC tratados con abatacept o PBS, a las 4 semanas tras la operación. Los valores muestran la media  $\pm$  EEM (n=2). Prueba de la t para datos independientes; no significativo (ns). Tinción representativa para detectar el marcador de células T CD3e (coloración marrón; adquisición de imágenes con aumento de 40x; barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ). (B-E) La funcionalidad cardíaca no se conserva en ratones K/O para IL-10 con TAC tras el tratamiento con abatacept. Se sometieron ratones a operación de TAC o simulada; 2 días tras la operación, se trataron los ratones con tres inyecciones intraperitoneales por semana de 200  $\mu\text{g}$  de abatacept o PBS, durante 4 semanas. (B) Acortamiento fraccional (% de FS). (C) Fracción de eyección (% de EF). (D) Dimensión interna de ventrículo izquierdo en diástole (LVIDd). (E) Dimensión interna de ventrículo izquierdo en sístole (LVIDs). Los datos muestran la media  $\pm$  EEM (n=5-9). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; O, valor de  $p < 0,05$  frente a TAC WT con abatacept;  $\diamond$ , valor de  $p < 0,01$  frente a TAC WT con abatacept; \*, valor de  $p < 0,001$  frente a TAC WT con abatacept; +, valor de  $p < 0,05$  frente a simulado no tratado;  $\bullet$ , valor de  $p < 0,01$  frente a simulado no tratado; #, valor de  $p < 0,001$  frente a simulado no tratado; §, valor de  $p < 0,01$  frente a TAC WT con PBS. (F) El tratamiento con abatacept en presencia pero no en ausencia de IL-10 reduce la apoptosis de cardiomiocitos en ratones operados por TAC. Se realizó la tinción de ensayo de TUNEL en portaobjetos para la evaluación de la apoptosis de cardiomiocitos en corazones de ratones tratados 4 semanas tras la operación de TAC, en ratones tanto de tipo natural como K/O para IL10. Las barras muestran la media  $\pm$  EEM de células positivas para TUNEL (n=2); barras blancas, ratones operados por TAC tratados con abatacept; barras negras, ratones operados por TAC tratados con PBS. ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; \*, valor de  $p < 0,05$ . (G-H) La transferencia de células B de tipo natural pero no de células T en ratones operados por TAC KO para IL-10 restaura los efectos terapéuticos de abatacept. Ratones KO para IL-10 recibieron células T o B de tipo natural. Posteriormente, se sometieron a operación de TAC o simulada; 2 días tras la operación, se trataron los ratones con tres inyecciones intraperitoneales por semana de 200  $\mu\text{g}$  de abatacept o PBS, durante 1 semana. Se midieron (G) el acortamiento fraccional (% de FS) y (H) la fracción de eyección (% de EF) en el nivel inicial y a 1 semana tras la operación. Los datos muestran la media de % de FS y % de EF para cada grupo experimental en todos los puntos de tiempo  $\pm$  EEM (n=3-7). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni, \*, datos estadísticos para KO para IL10 con TAC con abatacept; +, células B WT; #, datos estadísticos para WT con TAC con abatacept; §, datos estadísticos para simulado no tratado.

Figura 7. Abatacept reduce la disfunción cardíaca suprimiendo la respuesta inmunitaria (A, B) Índice de disfunción cardíaca (HDI) (eje de las y) frente a un índice de inflamación (eje de las x), calculado según la figura 2. Cada punto representa datos de un ratón. Los puntos grandes representan la media de cada grupo, mientras que las elipses sombreadas representan una desviación estándar con respecto a la media. Se usaron los siguientes grupos como controles coincidentes para los conjuntos experimentales: para ratones operados por TAC tratados con abatacept o con PBS a 1 semana (A) o 4 semanas (B) tras la operación: ratones operados de manera simulada tratados con abatacept o con PBS, antes de la operación (lectura basal); para sanos (operados de manera simulada tratados con PBS): operados de manera simulada tratados con PBS antes de la operación (lectura basal). (C) Dibujo esquemático del mecanismo de acción de abatacept en insuficiencia cardíaca, CM: cardiomiocito, T: célula T, M $\Phi$ : macrófago; APC: célula presentadora de antígeno. En hipertrofia patológica, se activan células T (mediante su TCR) y reciben coestimulación mediante CD28 a partir de células presentadoras de antígenos que expresan CD80/CD86 (macrófagos, células B, células dendríticas). La activación completa de células T, identificada mediante altos niveles de CD25, potencia la cronicidad de la respuesta inflamatoria cardíaca. Esto también implica la acción proinflamatoria de macrófagos cardíacos. Como resultado, hay un aumento de la apoptosis de cardiomiocitos, fibrosis y reducción de la funcionalidad cardíaca. Durante el tratamiento con abatacept, el fármaco bloquea la coestimulación mediada

por CD80/CD86 mediante macrófagos y células B, conduciendo a la inhibición de la activación, proliferación y/o infiltración de células T. Los efectos sobre macrófagos (que pueden ser tanto directos como indirectos) conducen a una maduración e infiltración inferiores. Los efectos directos sobre células B conducen a la producción de citocina anti-inflamatoria IL-10, que también puede producirse en menor medida por células T. Como consecuencia del efecto sobre células T, células B y macrófagos, se bloquea la progresión de patología cardíaca, aunque el fármaco se administre en un estadio tardío. El efecto protector depende de la presencia de IL-10.

Figura 8. Los mediadores inmunitarios están ausentes en modelos de hipertrofia fisiológica. (A) Análisis de expresión génica de mediadores de la inflamación en el ventrículo izquierdo de ratones entrenados con ejercicio (corredores) en comparación con ratones sedentarios (sedentarios). Las barras muestran la media relativa de la expresión de ARNm, normalizada de manera interna con respecto a la expresión de ARNr de 18s. La expresión de *Tnfa*, *Il6*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il4*, *Itgam* (CD11b) o *Cd3e* no cambió significativamente, mientras que *Ccl2* disminuyó significativamente en el grupo de ratones entrenados. Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=3). Prueba de la t para datos independientes: \*, valor de  $p < 0,05$ . (B) Análisis de expresión génica de mediadores inflamatorios mediante qPCR en tiempo real de TaqMan en el ventrículo izquierdo de ratones transgénicos para Akt de 8 semanas de edad (Akt-Tg, blanco) (n=6) en comparación con ratones de tipo natural (WT, negro) (n=7). Las barras muestran la media relativa de la expresión de ARNm normalizada de manera interna con respecto a la expresión de ARNr de 18s. La expresión relativa de *Tnfa*, *Il6*, *Il1b*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Cxcl11* y el marcador celular innato *Itgam* (CD11b) no aumentó, mientras que *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl10*, *Il4* y *Cd3e* aumentaron significativamente. Los valores se indican como la media  $\pm$  EEM. Prueba de Mann-Whitney: \*, valor de  $p < 0,05$ ; \*\*, valor de  $p < 0,01$ .

Figura 9. La progresión de hipertrofia cardíaca en el corazón se limita mediante abatacept. Razones de (A) peso de corazón con respecto a peso corporal (mg/g), (B) ventrículo izquierdo con respecto a peso corporal (mg/g), (C) peso de corazón con respecto a longitud de tibia (mg/cm) en ratones operados por TAC tratados con abatacept o PBS, 4 semanas tras la operación. Los valores se indican como la media  $\pm$  EEM (n=5-7). Prueba de la t para datos independientes: \*, valor de  $p < 0,05$ . Expresión génica relativa mediante qPCR en tiempo real normalizada de manera interna con respecto a 18S para genes que expresan (D)  $\beta$ -miosina (*Mhy7*), (E) péptido natriurético cerebral (*Nppb*) y (F) factor natriurético auricular (*Nppa*) en los mismos ratones. Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=5-8). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; \*, valor de  $p < 0,05$ ; \*\*, valor de  $p < 0,01$ .

Figura 10. La funcionalidad cardíaca no cambia en ratones no operados tras el tratamiento con abatacept o isotipo de IgG humana. (A) Acortamiento fraccional (% de FS) y (B) fracción de eyección (% de EF) en ratones no operados tratados con abatacept o control de isotipo de IgG humana, o ratones operados de manera simulada no tratados (incluido por comparación). Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=3-5). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; no se observan diferencias significativas. (C) Acortamiento fraccional (% de FS), (D) fracción de eyección (% de EF), (E) dimensión interna de ventrículo izquierdo en sístole (LVIDs) y (F) dimensión interna de ventrículo izquierdo en diástole (LVIDd) en ratones operados por TAC tratados con abatacept, PBS o control de isotipo de IgG humana durante 1 semana empezando 2 días tras la operación. Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=6-9). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; \*, valor de  $p < 0,05$ ; \*\*, valor de  $p < 0,01$ ; \*\*\*, valor de  $p < 0,001$ . (G) Dimensión interna de ventrículo izquierdo en sístole (LVIDs) y (h) dimensión interna de ventrículo izquierdo en diástole (LVIDd) en ratones operados por TAC tratados con abatacept o PBS durante 2 semanas empezando 2 semanas tras la operación. Los valores son la media  $\pm$  EEM (n=7-9). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; \*, valor de  $p < 0,05$ .

Figura 11. Abatacept atenúa las respuestas de células T *in vitro* e induce la producción de IL-10. (A) Se analizaron los esplenocitos totales de ratones C57BL/6J de 8 semanas de edad activados con anticuerpo anti-CD3 y cultivados con abatacept 20  $\mu$ g/ml o control de isotipo de IgG durante 72 horas mediante FACS para detectar la expresión de CD3e. Las barras muestran la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes (n=4). Prueba de medidas repetidas de ANOVA de un factor con prueba a posteriori de Tukey; \*, valor de  $p < 0,05$ ; \*\*\*, valor de  $p < 0,001$ . (B) Después se analizaron los esplenocitos totales para detectar la producción de IL-10. Se analizaron frecuencias de poblaciones específicas entre los esplenocitos que expresaban IL-10 (células B CD19+, células dendríticas CD11c+, monocitos CD11b+ y células derivadas de mieloides, macrófagos F4/80+, células T CD3e+, y células Treg CD3e+ Foxp3+). Las barras muestran la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes (n=3).

Figura 12. Presencia de células T reguladoras en ratones operados por TAC y de manera simulada. Análisis de expresión génica mediante qPCR de TaqMan en tiempo real para detectar el marcador de células T reguladoras Foxp3 en el ventrículo izquierdo de ratones C57BL6/J, 1, 4 y 8 semanas tras la operación de TAC o simulada. Las barras muestran la expresión de ARNm normalizada de manera interna con respecto a expresión de ARNr de 18s. Los valores muestran la media  $\pm$  EEM (n=7-9). ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni; \*, valor de  $p < 0,05$ .

Figura 13. Regresión lineal de la expresión de ARNm de IL-6 y CD3e en ventrículos izquierdos de ratones operados por TAC y de manera simulada. Círculos y línea de regresión correspondiente: regresión lineal entre la expresión de *Cd3e* e *Il6* en ventrículo izquierdo de ratones C57BL6/J operados por TAC 4 semanas tras la operación (n=9). Prueba de regresión lineal; valor de  $p = 0,0002$ . Cuadrados y línea de regresión correspondiente: regresión lineal entre la expresión de *Cd3e* e *Il6* en ventrículo izquierdo de ratones C57BL6/J operados de manera simulada

4 semanas tras la operación (n=7). Prueba de regresión lineal; valor de  $p = 0,0037$ .

Figura 14. Imágenes representativas y análisis estadístico de la tinción inmunohistoquímica de AIF-1 (coloración marrón; aumento original de 20X; barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ ) en ventrículos izquierdos de ratones con TAC a las 4 semanas tras la operación, tratados con abatacept o PBS. Densidad de AIF-1 representada gráficamente como la media  $\pm$  EEM; TAC con abatacept (barras blancas); TAC con PBS (barras negras). Prueba de la t para datos independientes. (n=2).

Figura 15. Estrategia de selección para análisis por citometría de flujo de suspensiones de células cardíacas individuales a partir de ratones operados por TAC 1 semana tras la operación, correspondiente a datos en las figuras 5e, 5f. Se seleccionaron células basándose en dispersión directa y lateral, se excluyeron dobletes y se seleccionaron células individuales vivas. Se seleccionaron células que expresaban CD45 y CD11b y se identificaron basándose en la expresión de Ly6C y F4-80: monocitos Ly6C<sup>+</sup> F4-80<sup>-</sup>, macrófagos inmaduros Ly6C<sup>+</sup> F4-80<sup>+</sup> y macrófagos maduros Ly6C<sup>-</sup> F4-80<sup>+</sup>.

Figura 16. Se activaron esplenocitos totales o esplenocitos con agotamiento de células T de ratones C57BL/6J de 8 semanas de edad con anticuerpo anti-CD3 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS. Después de 48 horas en cultivo con o sin abatacept 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se analizaron mediante citometría de flujo para detectar la producción de IL-10. Las barras muestran la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes (n=3) del porcentaje de células productoras de IL10 a partir de los esplenocitos totales. Prueba de medidas repetidas de ANOVA de un factor con prueba a posteriori de Tukey; \*, valor de  $p < 0,05$ .

## Ejemplos

### MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: todos los procedimientos se realizaron cumpliendo con la legislación nacional y de la UE y con los reglamentos institucionales.

Constricción aórtica transversal (TAC): se realizaron procedimientos según (Condorelli *et al.*, 2001). Se realizó TAC en ratones C57BL/6J macho de 8-10 semanas de edad (Charles River, Francia) y en ratones IL-10<sup>-/-</sup> C57BL6/J macho de 8-10 semanas de edad (Jackson Laboratories, EE.UU.). Se examinaron todos los animales antes de la operación mediante ecocardiografía para establecer su nivel inicial. Se anestesió a los ratones mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Se abrió la cavidad torácica mediante una pequeña incisión a nivel del primer espacio intercostal. Tras el aislamiento del arco aórtico, se colocó una sutura de Prolene 8-0 alrededor de la aorta y se colocó una aguja de 27G entre medias. Se retiró inmediatamente la aguja para producir una aorta con una luz estenótica. Después se cerró la cavidad torácica con una sutura de nailon 6-0 y se cerraron todas las capas de músculo y piel con suturas absorbibles y de nailon continuas 6-0, respectivamente. Se usó un grupo simulado, que se sometió a cirugía sin cerclaje aórtico, como control.

Ecocardiografía: se usó un sistema de obtención de imágenes *in vivo* de alta resolución Vevo 2100 (VisualSonics Fujifilm) con un cabezal de exploración de "armazón alto" de sonda MS550S para el análisis ecocardiográfico. Se anestesió a los ratones con isoflurano al 1,0 % para la obtención de imágenes en modo M. Se determinaron gradientes de presión (de 60 a 90 mm de Hg), un índice de estrés biomecánico, mediante ecocardiografía Doppler en todos los animales que se sometieron a cirugía de TAC.

Tratamiento con abatacept: empezando en el día 2 ó 2 semanas desde la cirugía de TAC/simulada, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal o bien 100  $\mu\text{l}$  de PBS o bien 200  $\mu\text{g}$  de CTLA-4 Ig (abatacept) en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, tres veces por semana durante 4 semanas.

Abatacept es una fusión de CTLA-4-Ig humana, aunque, debido a la alta similitud (75 %) entre CTLA-4 humano y de ratón, también funciona en ratones. Abatacept tiene generalmente eficacia *in vivo* en ratones (en diversos contextos patológicos) usando dosis en el intervalo, por ejemplo, de 100-400  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ . Puede administrarse cada 2 días. 200  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  cada 2 días es (a aproximadamente 8 mg/kg) similar a la dosis en humanos usada en pacientes con artritis reumatoide (8-10 mg/kg). Por tanto, esta dosis es "relevante desde el punto de vista de la aplicación" y se ha usado en el presente documento. Transferencia adoptiva de células T y B de tipo natural en ratones KO para IL10: se aislaron células B y T de tipo natural a partir de ratones macho C57BL6/J respectivamente con kit de aislamiento de células B y kit de aislamiento de células pan-T II (Miltenyi Biotec) en un dispositivo AutoMACS. Se evaluó la pureza mediante tinción con anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  de ratón (145-2C11, BioLegend) o anticuerpo anti-CD19 de ratón (eBio1D3, eBioscience) y se analizó mediante citometría de flujo. A ratones macho C57BL6/J KO para IL-10, antes de la exploración por ecocardiografía basal, se les inyectaron por vía intravenosa  $2 \cdot 10^6$  células T o B WT. Se sometieron los ratones a cirugía de TAC y se les inyectó abatacept empezando en el día 2 tras la cirugía.

Biopsias humanas: se obtuvieron las muestras de pacientes con miocardiopatía grave (HF LVAD) a partir de pacientes que padecían mutaciones de lamina A/C, que provocaban miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca (HF LVAD 1M). Un subconjunto de las mismas portaban una segunda mutación en titina (HF LVAD 2M),

conduciendo a una miocardiopatía dilatada más grave. Todas las muestras se obtuvieron después del consentimiento informado según los protocolos del estudio aprobados por el comité ético del hospital, tal como se describe en otra parte (Roncarati *et al.*, 2013). También se obtuvieron muestras ventriculares de estenosis aórtica después del consentimiento informado según los protocolos del estudio aprobados por el comité ético del hospital.

5 Análisis de RT-PCR cuantitativa: se congelaron rápidamente ventrículos izquierdos en nitrógeno líquido tras la extirpación y se almacenaron a -80 °C. Se homogeneizaron los tejidos en 1 ml de reactivo de aislamiento de ARN PureZol (Biorad) con tubos GentleMACS y GentleMACS M (Miltenyi Biotec). Tras el aislamiento de la fase acuosa con cloroformo, se extrajo el ARN usando kit RNeasy Mini (Qiagen). Se sometió la misma cantidad de ARN a retrotranscripción con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se realizaron reacciones de qPCR en tiempo real usando sondas de TaqMan y mezcla maestra universal de TaqMan en un ciclador REALTIME AB 7900HT (todos de Applied Biosystems). Se usaron los siguientes ensayos de la expresión génica de TaqMan: Rn18S (Mm03928990\_g1) como control interno, Cd3e (Mm005996484\_g1), Foxp3 (Mm00475162\_g1), Itgam (Mm00434455\_m1), Tnfa (Mm00443260\_g1), Il-4 (Mm00445259\_m1), Il-17 (Mm00439618\_m1), Ifng (Mm01168134\_m1), Tgfb1 (Mm01227699\_m1), Il-10 (Mm00439614\_m1), Il-6 (Mm00446190\_m1), Il-1b (Mm00434228\_m1), Ccl2 (Mm00441242\_m1), Ccl4 (Mm00443111\_m1), Ccl5 (Mm01302427\_m1), Cxcl10 (Mm00445235\_m1), Cxcl11 (Mm00444662\_m1). Se sometió a prueba la expresión de genes que codifican para la expresión de péptido natriurético cerebral (Nppb), factor natriurético auricular (Nppa) y cadena pesada  $\beta$  de miosina (Myh7) con cebadores (IDT) usando mezcla maestra de selección de Sybr (Applied Biosystems) en un instrumento ViiA7 (Applied Biosystems). Las secuencias se indican en la tabla 3.

Ratones transgénicos para Akt (Akt Tg): se usaron ratones Akt Tg macho, que sobreexpresan de manera constitutiva el mutante de Akt E40K activo (Akt-E40K), tal como se describió anteriormente (Condorelli *et al.*, 2002), a las 8 semanas de edad.

25 Ratones entrenados con ejercicio: Los ratones BKS.Cg-m +/- Lepdb/+db son heterocigóticos para la mutación de receptor de leptina pero presentan un fenotipo metabólico de tipo natural cuando se alimentan con una dieta normal. Se usaron ratones macho de 8 semanas de edad que se asignaron de manera arbitraria a uno de dos grupos: sedentarios y entrenados con ejercicio 80 minutos/día, 5 días/sem., durante 8 semanas, tal como se describió anteriormente (Stolen *et al.*, 2009). Debido a la diferencia en el trasfondo genético (BKS), todos los análisis de estos ratones se realizaron comparándolos con sus controles coincidentes, para evitar efectos específicos de trasfondo genético.

35 Análisis inmunohistoquímico: se fijaron muestras de corazón de ratón en formalina al 4 % a 4 °C, se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones a 4  $\mu$ m. Se tiñeron los portaobjetos con tinción tricrómica de Azan para detectar colágeno (BioOptica). Se digitalizaron imágenes de portaobjetos y se analizaron cinco campos para secciones de ratón y diez campos para biopsias humanas para cuantificar la fibrosis, con un programa de análisis de imágenes (ImageJ). Se evaluó la fibrosis cardíaca midiendo la zona teñida con tinción tricrómica de Azan como porcentaje de área de miocardio total. Para análisis de inmunohistoquímica, se desparafinizaron secciones de muestra en portaobjetos y se hidrataron mediante una escala descendente de alcoholes. Se realizó la recuperación de antígeno usando DIVA (Biocare Medical) para muestras de ratón y W-Cap (Biocare Medical) para muestras humanas. Se enfriaron las secciones y después se lavaron con PBS (Lonza) que contenía Tween 20 al 0,05 % (Sigma). Se bloqueó peroxidasa endógena mediante incubación con peroxidasa I (Biocare Medical) durante 20 min a temperatura ambiente (TA) y se bloquearon los sitios no específicos con Rodent Block y Background Sniper (Biocare Medical) para muestras de ratón y humanas, respectivamente, durante 20 min a TA. Después se incubaron las secciones durante 1 h a TA con anticuerpo de rata anti-CD3 humano (Serotec) diluido 1:1000 o AIF-1 (Wako) diluido 1:250 o anticuerpo policlonal de conejo anti-CD3 humano (Dako) diluido 1:50, se lavaron y se incubaron durante 30 min a TA con polímero de HRP de rata sobre ratón (Biocare Medical) o con polímero de HRP Mach1 (Biocare Medical) o con sistema anti-HRP de conejo Envision+ (Dako). Finalmente, se incubaron secciones con DAB (Biocare Medical), se sometieron a contratinción con hematoxilina, se deshidrataron mediante una escala ascendente de alcoholes y xileno, y se montaron con cubreobjetos usando Eukitt (Fluka). Se observaron todas las muestras y se fotografiaron con un microscopio Olympus BX53 con una cámara digital.

55 Ensayo TUNEL con muestras de corazón de ratón: se desparafinizaron secciones de muestra sobre portaobjetos y se hidrataron mediante una escala descendente de alcoholes y se realizó un ensayo TUNEL (ensayo Click-it plus TUNEL C10617, Life technology).

60 Estimulación *in vitro* de esplenocitos con abatacept: se purificaron esplenocitos totales a partir de bazo de ratones C57BL/6J macho de 8 semanas de edad. Se agotaron las células T usando perlas magnéticas en un dispositivo AutoMACS (Miltenyi Biotec). Se estimularon esplenocitos totales o esplenocitos con agotamiento de células T con 2  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-CD3 y se cultivaron con 20  $\mu$ g/ml de abatacept o control de isotipo de IgG. Después de 72 horas de cultivo, se añadió brefeldina A (eBioscience) durante las últimas 4 horas de cultivo y se prepararon esplenocitos para análisis mediante FACS.

65 Citometría de flujo: se obtuvieron suspensiones de células individuales a partir de bazo y ganglios linfáticos mediante pase a través de tamices celulares de 70  $\mu$ m en PBS/-/ frío. Se extirparon corazones y se sometieron a

digestión con Liberase TM (Roche). Se retiraron los eritrocitos con tampón de lisis (BD Biosciences) a partir de suspensiones celulares de bazo y corazón. Se tiñeron las células con colorante reactivo fluorescente Live/dead Aqua (Life Technologies), anticuerpo anti-CD3ε de ratón con PerCP (145-2C11, BioLegend), anticuerpo anti-CD19 de ratón eFluor450 (eBio1D3, eBioscience), anticuerpo anti-CD11b de ratón con Pacific Blue (M1/70, Biolegend), APC CD11c (Bu15, eBioscience), F4/80 Alexa488 (Cl:A3-1, Serotec) en la figura 11a, F4/80 (BM8, eBioscience) en las figuras 6d,e y 15, IL-10 PE (JES5-16E3, eBioscience), FoxP3 Alexa488 (FJK-165, eBioscience), Ly6C (HK1.4, eBioscience) o anticuerpo anti-CD86 con Pacific Blue (GL-1, Biolegend), anticuerpo anti-CD80 con FITC (16-10A1, BD Pharmingen) o anticuerpo anti-CD25 con PE (PC61.5, eBioscience). Se usó un kit de tinción intracelular de eBioscience cuando fue aplicable. Se adquirieron muestras en un instrumento FACS Canto II (BD) y se analizaron con Flow Jo 10.

Datos estadísticos: se realizó un análisis estadístico en GraphPad Prism. Se sometieron todos los conjuntos de datos a prueba para detectar la distribución normal con pruebas de normalidad antes de proceder con análisis paramétricos o no paramétricos. Se realizó una prueba de Grubb con el fin de excluir datos aberrantes falsos. Se sometió a prueba la significación estadística usando una prueba de la t para datos independientes, ANOVA de un factor con prueba a posteriori de Tukey y ANOVA de dos factores con prueba a posteriori de Bonferroni para conjuntos de datos con distribuciones normales. Se sometió a prueba la significación estadística con prueba de Mann-Whitney y ANOVA de un factor con prueba a posteriori de Dunn para conjuntos de datos sin una distribución normal. Se usaron pruebas exactas de Fisher en el análisis de la deposición de colágeno, sometiendo a prueba para detectar la presencia o ausencia de tinción de colágeno. La representación gráfica de la desviación estándar en la figura 2 y las figuras 7A,B se calculó usando una secuencia de comandos personalizada en R.

## RESULTADOS

Ejemplo 1. El análisis de mediadores inmunitarios solubles y celulares es compatible con una respuesta inmunitaria de tipo M1 que cambia a una respuesta de tipo Th2 con la progresión hasta insuficiencia cardíaca

Se sometieron ratones a constricción aórtica transversal (TAC), el modelo convencional para hipertrofia cardíaca patológica, y se evaluó la presencia de mediadores inmunitarios solubles y celulares dentro del miocardio mediante qPCR a las 1 y 4 semanas tras la cirugía de TAC (figura 1). Se monitorizó la funcionalidad cardíaca mediante ecocardiografía transtorácica regular (tabla 1). A 1 semana tras la TAC, se encontró una regulación por incremento significativa de Tnfa y Il6, tal como se describió anteriormente (Souders *et al.*, 2012) (Kuang *et al.*, 2013). Se reclutan células del sistema inmunitario a, y/o se retienen en, sus sitios de acción mediante quimiocinas. Se encontró una expresión temprana significativa de Ccl2 y Cxcl11 (Xia *et al.*, 2009) así como de Ccl4, Ccl5 y Cxcl10 (figura 1), la mayoría de los cuales son marcadores de una respuesta inflamatoria polarizada por (M1/Th1) de tipo 1 (Mantovani *et al.*, 2004). Itgam (CD11b), un indicador de la presencia de células inmunitarias innatas, tales como macrófagos o monocitos, también estaba regulado por incremento 1 semana tras la TAC, sugiriendo que se reclutan de manera temprana células inmunitarias innatas polarizadas de tipo 1 en el miocardio estresado.

Se observó una regulación por incremento significativa del marcador específico de células T Cd3e a las 4 semanas tras la operación, sugiriendo que las células T se expanden o se reclutan en el ventrículo izquierdo estresado en este punto de tiempo posterior. La regulación por incremento concurrente de Il4, un indicador de respuestas polarizadas por (M2/Th2) de tipo 2, sugiere un desplazamiento gradual desde una respuesta M1 hasta una M2/Th2 a medida que el miocardio progresa hacia HF. De hecho, se ha notificado que las células T polarizadas por Th2 fomentan la fibrosis en otros estados patológicos (Wynn, 2004). Los transcritos de citocinas que caracterizan las respuestas de Th1 y Th17, tales como Ifng e Il17, o de la citocina anti-inflamatoria Il10, no se vieron significativamente alterados en ningún punto de tiempo.

Ejemplo 2. El inicio de la inflamación está correlacionado con la con infiltración de células T

Dado que se generaron datos sobre la expresión de Cd3e (indicativo de la presencia de células T) y la expresión de il6 (indicativo de inflamación), se cuestionó si el inicio de la inflamación se correlacionaba con la infiltración y/o proliferación de células T. Suponiendo un modelo de regresión lineal, en primer lugar se examinó la correlación entre Cd3e e il6 en muestras derivadas de ratones operados por TAC, 4 semanas tras la operación. Los resultados (figura 13, círculos y línea de regresión correspondiente) muestran una pendiente positiva significativa, sugiriendo que existe una correlación de este tipo. Una interpretación probable sería que la inflamación impulsa la infiltración y/o proliferación de células T al interior del miocardio. Repetir el análisis para animales operados de manera simulada (figura 13, cuadrados y línea de regresión correspondiente) también proporcionó una pendiente positiva significativa, sin embargo con valores de il6 y cd3e medios inferiores. Esto sugiere que, incluso en ausencia de la constricción aórtica, la inflamación limitada (pero no obstante presente) generada por la operación simulada (que implica cirugía, aunque sin constricción permanente) puede conducir a una infiltración/proliferación limitada de células T, aunque sea significativamente menor que en TAC (tal como se muestra en la figura 1).

Ejemplo 3. El perfil de mediadores de respuesta inmunitaria distingue hipertrofia cardíaca patológica de fisiológica

Lo anterior muestra que la hipertrofia cardíaca patológica, que conduce a fibrosis y HF, está asociada con

inflamación. Pero también existen formas no patológicas de hipertrofia cardíaca, que no conducen a fibrosis o disfunción cardíaca. El modelo fisiológicamente más relevante para esto es el entrenamiento con ejercicio. Los ratones sometidos a un programa de correr muestran hipertrofia "fisiológica" en la que el aumento del tamaño de cardiomiocitos va acompañado por una funcionalidad aumentada de las células y ausencia de fibrosis (Perrino *et al.*, 2006) (Kemi *et al.*, 2008). Por tanto, se cuestionó si los mediadores inmunitarios que se identificaron en el modelo de TAC de HF también estaban presentes en ratones entrenados con ejercicio. No se encontró ninguna regulación por incremento significativa de los transcritos de mediadores de respuesta inmunitaria en estos ratones (figura 8A). Este hallazgo sugiere fuertemente que, a diferencia de hipertrofia patológica, la hipertrofia fisiológica presenta una ausencia completa no sólo de fibrosis sino también de una respuesta inmunitaria innata y adaptiva.

Para visualizar mejor estas diferencias, se representó gráficamente un índice de disfunción cardíaca (pérdida en porcentaje de acortamiento fraccional, es decir, la disminución del volumen de bombeo del ventrículo) frente a un índice de inflamación (es decir, la razón de expresión de transcrito de la citocina proinflamatoria IL-6 con respecto a la citocina anti-inflamatoria IL-10) (figura 2). El gráfico de puntos resultante, en el que cada punto representa un animal y las elipses representan una desviación estándar para ambas variables, ilustra claramente el vínculo entre inflamación y función cardíaca alterada. Aunque tanto los ratones entrenados con ejercicio (figura 2: ratones con ejercicio (corredores)) como los ratones operados por TAC (figura 2: modelo de TAC de HF) están caracterizados por hipertrofia cardíaca, los ratones operados por TAC con hipertrofia patológica tenían índices de inflamación aumentados (valores desplazados hacia la derecha en comparación con controles sanos) y disfunción cardíaca aumentada (valores desplazados hacia arriba en comparación con controles sanos). Por otro lado, los ratones con ejercicio tenían un índice de inflamación similar al de controles sanos pero una función cardíaca mejorada (desplazamiento hacia abajo en el eje de las y). Un modelo de hipertrofia no patológica, más "artificial", inducido mediante sobreexpresión específica cardíaca del mutante E40K activo de manera constitutiva de la serina-treonina cinasa Akt en el corazón (Condorelli *et al.*, 2002), presentó una serie incompleta de mediadores proinflamatorios presentes en el ventrículo izquierdo de ratones transgénicos para Akt de 8 semanas de edad (figura 8B). Por tanto, estos ratones ocuparon un estado intermedio en el gráfico de puntos de disfunción cardíaca frente a inflamación, es decir, uno entre los dos extremos de hipertrofias inducidas por TAC y por correr. Por tanto, los presentes resultados soportan una asociación positiva entre inflamación y la naturaleza patológica de hipertrofia cardíaca.

#### Ejemplo 4. Las células T están presentes en el miocardio estresado en ratones y humanos

Los hallazgos anteriores motivan la noción de que la inhibición de la inflamación puede ser una estrategia prometedora contra HF. Este enfoque se ha intentado anteriormente, pero las dianas identificadas resultaron ser inadecuadas para este fin (Yndestad *et al.*, 2006) (Hofmann y Frantz, 2013). Se requieren células T para el mantenimiento de respuestas inmunitarias a largo plazo (Loke *et al.*, 2007) y, por tanto, pueden representar una mejor diana terapéutica. Motivado por el hallazgo de la regulación por incremento de ARNm de Cd3e específico de células T en ratones con TAC a las 4 semanas tras la TAC, se investigó adicionalmente la presencia de células T en hipertrofia patológica. Examinando los ventrículos izquierdos de ratones mediante inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpo anti-CD3e (figura 3A), se encontró que las células T eran visible y significativamente más abundantes en ratones con TAC frente a simulados a las 4 semanas (figura 3B), confirmando los datos de ARNm. Durante el transcurso de tiempo de la patología, las células T reaccionan supuestamente de una manera específica de antígeno, implicando pocos clones específicos cuyo número se expande posteriormente. Por tanto, se planteó la hipótesis de que las células T también deben poder detectarse en un estadio temprano de desarrollo de la enfermedad. Se realizó el análisis de IHC en ratones a 1 semana tras la TAC y de hecho pudieron detectarse células T (figura 3C). También se realizó una purificación en gradiente de enriquecimiento de linfocitos con suspensiones cardíacas derivadas de corazones de ratones a 1 semana tras la TAC y se observó que las poblaciones de célula resultantes incluían células que expresaban CD3e cuando se examinaron mediante citometría de flujo (figura 3D). Por tanto, las células T estaban presentes en el miocardio hipertrófico incluso en un estadio temprano de la patología. Estudios anteriores en el modelo de TAC han identificado que la disfunción cardíaca puede detectarse a los 2 días tras la TAC, la activación de células T se inicia con frecuencia en los ganglios linfáticos que drenan al sitio de inflamación. Por tanto, se examinó mediante citometría de flujo si, a los 2 días tras la TAC, se activaban células T en los ganglios linfáticos (mediastinales) que drenan al corazón. También se examinaron ganglios linfáticos (inguinales) que no drenan así como bazo de los mismos animales. Se encontró que, en el día 2, puede observarse una regulación por incremento significativa del marcador de activación CD25 entre células T CD3+ en los ganglios linfáticos que drenan al corazón, aunque no en los compartimentos linfáticos más distal que no drenan (figura 3e). Por tanto, la presencia temprana de células T, y la identificación de la presencia de células T en el afectado, crea una oportunidad para intentar una manipulación de su función con fines terapéuticos.

Con el fin de confirmar la relevancia clínica de los presentes hallazgos en el entorno humano, se examinó la abundancia de células T en tejido cardíaco derivado de pacientes con insuficiencia cardíaca que padecen miocardiopatía primaria, que comparte rasgos con el presente modelo de ratón experimental. Se examinó tejido de pacientes que portaban mutaciones de lamina A/C, que conducen a miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. Un subconjunto de los mismos portaban una segunda mutación en titina, conduciendo a una miocardiopatía dilatada más grave. Se eligieron estos pacientes ya que su miocardiopatía está provocada por una causa no inmunológica, a diferencia de las miocardiopatías inflamatorias, autoinmunitarias o virales. Por tanto, la detección de células T en el ventrículo izquierdo de estos pacientes sugerirá que la presencia de células T está correlacionada no sólo con

miocardiopatías iniciadas por respuestas inmunitarias excesivas, sino también con miocardiopatías desencadenadas por causas no inmunitarias. Las muestras cardíacas se obtuvieron durante la cirugía para la colocación de un dispositivo de asistencia de ventrículo izquierdo (LVAD), avalando el estadio avanzado de su disfunción cardíaca. El análisis tricrómico de Azan para detectar colágeno (figura 3G) confirmó la presencia de fibrosis en estas muestras (figura 3F). El análisis de la abundancia de células T mediante IHC de CD3e (figura 3I) en las mismas muestras reveló la presencia de células T infiltrantes, como en los corazones de ratones a las 4 semanas tras la TAC (figura 3B). Además de las muestras de pacientes con LVAD HF anteriores, también se examinaron muestras de pacientes que padecían estenosis aórtica. La estenosis aórtica conduce a insuficiencia cardíaca 24 y representa el estado clínico que es mecánicamente más próximo al modelo de ratón de TAC. Se encontró que los ventrículos izquierdos de pacientes con esta forma de miocardiopatía también demostraron una fibrosis aumentada de manera similar (figura 3j) y presencia de células T (figura 3k). Tomados en conjunto, estos resultados respaldan adicionalmente un vínculo entre presencia de células T, fibrosis cardíaca e hipertrofia patológica.

Ejemplo 5. El bloqueo de la coestimulación de células T reduce la gravedad y retrasa la progresión e HF en ratones

Se planteó la hipótesis de que la inhibición específica de la función de células T tendrá un efecto beneficioso sobre el desarrollo de HF. CTLA4 es una de las moléculas inhibitoras a través de las cuales células T reguladoras que se producen de manera natural suprimen la activación de células T en condiciones fisiológicas (Wing y Sakaguchi, 2010). Bloquea las señales de coestimulación de CD80/CD86 que deben recibir las células T a partir de células presentadoras de antígenos (células dendríticas, células B o macrófagos) con el fin de activarse completamente (Moreland *et al.*, 2006). La proteína de fusión CTLA4-Ig (abatacept, un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de artritis reumatoide, una enfermedad autoinmunitaria) es una forma soluble estable de CTLA4. Por tanto, se sometió a prueba si la administración de abatacept producía un efecto beneficioso en el modelo de TAC de HF. Se trató a ratones que se habían operado por TAC o de manera simulada con tres inyecciones intraperitoneales por semana de 200 microgramos de abatacept, durante 4 semanas, empezando 2 días tras la operación. Como controles, ratones operados por TAC y de manera simulada recibieron PBS, en los mismos puntos de tiempo. Se monitorizó la función cardíaca mediante ecocardiografía transtorácica (véase la tabla 2). Se eligió el día 2 tras la operación como primer punto de tiempo del tratamiento ya que la disfunción cardíaca significativa (aumento del grosor del ventrículo izquierdo) ya puede detectarse a los 2 días tras la TAC mediante técnicas de diagnóstico clínicamente relevantes (ecocardiografía).

Los ratones operados por TAC tratados con PBS a las 1 y 4 semanas tras la operación presentaron una reducción significativa en la función cardíaca, expresada como porcentaje de acortamiento fraccional (FS) o fracción de eyección (EF) en comparación con controles simulados, mientras que los ratones tratados con abatacept no tenían ninguna diferencia significativa en FS o EF con respecto a controles simulados (figura 4A-B). La diferencia de FS fue evidente desde la primera semana tras la operación de TAC hasta el final del experimento (figura 4A); además la diferencia de EF aumentó de significación con el tiempo entre los grupos tratados con PBS y con abatacept (figura 4B). Por tanto, administrando abatacept a partir de 2 días tras la cirugía de TAC, pudo reducirse significativamente el grado y retrasarse la progresión de la degradación de la función cardíaca. El efecto beneficioso de abatacept también fue evidente analizando otros parámetros hemodinámicos, incluyendo el diámetro interno de ventrículo izquierdo telediastólico (LVIDd) (figura 4C) y el telesistólico (LVIDs) (figura 4D). Otros parámetros medidos se notifican en la tabla 2. A las 3 semanas tras la operación, pudo observarse una diferencia transitoria pero significativa entre animales tratados con abatacept y de control simulado. Al final de la cuarta semana, se evaluaron los indicadores morfométricos de hipertrofia cardíaca: razón de peso de corazón con respecto a peso corporal (figura 9A), razón de ventrículo izquierdo con respecto a peso corporal (figura 9B), razón de peso de corazón con respecto a longitud de la tibia (figura 9C). Los ratones operados por TAC tratados con abatacept mostraron hipertrofia significativamente menor que los controles tratados con PBS, según la mayoría de estos parámetros. El análisis de "genes de estrés" de miocardio, un indicador de insuficiencia e hipertrofia cardíaca, en los ventrículos izquierdos mediante qPCR también mostró una regulación por incremento significativa de ARNm de cadena pesada de  $\beta$ -miosina (Mhy7) (figura 9D), péptido natriurético cerebral (Nppb) (figura 9E) y factor natriurético auricular (Nppa) (figura 9F) para el grupo tratado con PBS pero no para el tratado con abatacept. Por tanto, el tratamiento con abatacept reduce significativamente la gravedad y retrasa la progresión de la disfunción cardíaca provocada por la sobrecarga de presión ventricular.

También se examinaron secciones con tinción tricrómica de Azan con el fin de evaluar los niveles de fibrosis (Condorelli *et al.*, 1999). Una comparación de la intensidad de colágeno en regiones idénticas tomadas como muestra para todos los grupos de tratamiento identificó aumentos significativos en los niveles de fibrosis para todos los grupos operados por TAC excepto por los ratones tratados con abatacept (figura 4F). Estos resultados sugieren que el efecto beneficioso de abatacept también se refleja en la protección frente a fibrosis cardíaca, una respuesta biológica invariablemente vinculada a insuficiencia cardíaca (Kong *et al.*, 2014). De manera importante, abatacept se basa en CTLA-4 humano fusionado con inmunoglobulina humana y, por tanto, es adecuado para uso en humanos, pero se ha mostrado extensamente que funciona en ratones, debido a la alta similitud de CTLA-4 humano y de ratón (Dhirapong *et al.*, 2013). Dado que la administración de Ig humana puede ser inmunogénica en ratones, se incluyó un conjunto adicional de ratones no operados que recibieron abatacept o una inmunoglobulina de control de isotipo (Ig), para evaluar cualquier reactividad de los receptores frente a la Ig humana usada en la proteína de fusión. Ni las inyecciones de abatacept solo ni las de control de IgG humana condujeron a ningún cambio significativo en la

función cardíaca (figura 10), lo que significa que cualquier alorreactividad frente a la inmunoglobulina tenía efectos limitados. No obstante, el potencial para alorreactividad del control de IgG, en ausencia del dominio de CTLA-4 inmunosupresor, puede empeorar posiblemente la inflamación inducida por TAC. Por este motivo, se eligió usar la administración de PBS en vez de la administración de IgG como control para los presentes experimentos, para evitar cualquier efecto perjudicial sobre los controles creando la aparición de un efecto terapéutico más fuerte en el grupo tratado con abatacept. De hecho, cuando se evaluó el efecto *in vivo* de abatacept en ratones operados por TAC, se encontró que su efecto protector parecía ser incluso más significativo en comparación con ratones tratados con control de isotipo en lugar de los operados por TAC tratados con PBS (figuras 10c,d,e,f). Esto confirmó la validez de la presente elección de controles.

Ejemplo 6. La inhibición de la coestimulación de células T es eficaz en una enfermedad de estadio avanzado.

A continuación se consideró si el tratamiento con abatacept sería capaz de bloquear la progresión de la disfunción cardíaca si se administraba únicamente en un punto de tiempo posterior, cuando la enfermedad está más avanzada. Por este motivo, se repitió el tratamiento *in vivo* con abatacept, aunque comenzando el primer tratamiento a las 2 semanas tras la TAC, en lugar de 2 días tras la TAC. Tal como puede observarse (figuras 4g, h), el tratamiento en un punto de tiempo posterior fue no obstante capaz de bloquear significativamente la reducción adicional de FS y EF en los animales tratados. También se observó un efecto protector significativo en LVIDs (figura 10g). Estos resultados demuestran que incluso un tratamiento tardío con el fármaco puede tener efectos beneficiosos sustanciales en la limitación de la progresión de HF.

Ejemplo 7. Abatacept protege frente a hipertrofia patológica inhibiendo la activación de células T, así como afectando a macrófagos

Estudios extensos han mostrado que CTLA4-Ig inhibe la función de células T, bloqueando los receptores coestimulantes en células presentadoras de antígenos, que se requieren para la activación completa de células T proinflamatorias (Linsley *et al.*, 1991) (Moreland *et al.*, 2006). De hecho, la molécula de CTLA-4 representa uno de los principales mecanismos disponibles a través de los cuales pueden regularse fisiológicamente por disminución las respuestas de células T ya iniciadas (Bluestone, 1997) (Krummey y Ford, 2014). Por tanto, se buscó analizar minuciosamente cómo estaba afectando abatacept a la activación de células T en hipertrofia cardíaca patológica. Para ello, se examinó mediante citometría de flujo la expresión de marcador de activación CD25 en células T en un punto de tiempo temprano (1 semana tras la TAC), que es probable que sea el intervalo de tiempo relevante para acontecimientos de activación. Abatacept redujo significativamente el porcentaje de células CD25+ entre células T, no sólo en los ganglios linfáticos (mediastinal) que drenan al corazón, sino también en los ganglios linfáticos inguinales y bazo (figura 5A). Esto sugiere que abatacept ejercía una amortiguación sistémica de la activación de células T. La expresión de CD25 en las células T que infiltran en el corazón no pudo evaluarse de manera fiable debido al bajo número de células T encontradas en el corazón a 1 semana tras la TAC, lo cual hace que los análisis por citometría de flujo de subpoblaciones sean técnicamente difíciles.

Es probable que la activación reducida de células T conduzca a una proliferación reducida y números inferiores de células T en puntos de tiempo posteriores. De hecho, a las 4 semanas tras la cirugía, el miocardio de ratones tratados con abatacept presentó significativamente menos células T infiltrantes que los ratones tratados con PBS (figura 5B). Debe observarse que el control de isotipo de IgG para abatacept no tuvo ningún efecto sobre respuestas de células T *in vitro*, a diferencia del propio abatacept (figura 11A). También se consideró si la supresión mediada por abatacept de células T conducía a un efecto inhibitorio posterior sobre la activación de macrófagos, que recientemente se ha mostrado que contribuye a la patología cardíaca (Epelman *et al.*, 2014). Se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de AIF-1 (Iba-1), un marcador de la activación de macrófagos activada por células T (Utans *et al.*, 1995) (Tian *et al.*, 2006), en los corazones de ratones operados. En ratones operados por TAC, el tratamiento con abatacept condujo a una reducción significativa en la señal de AIF-1 en comparación con controles tratados con PBS (figura 5C). Los ratones operados de manera simulada tenían señales despreciables de células AIF-1+. A las 4 semanas tras la cirugía, la diferencia en los macrófagos AIF-1+ entre los dos grupos era mínima (figura 14), lo más probablemente ya que los niveles globales de macrófagos AIF-1+, o de hecho de células inmunitarias innatas CD11b+ totales (figura 1) en ratones operados por TAC se reducen en este estadio tardío de la patología.

A continuación se examinó el estado de maduración de los macrófagos<sup>38</sup> encontrados en los ventrículos izquierdos de ratones con TAC tratados con abatacept o con control a 1 semana tras la operación, mediante análisis por citometría de flujo. Se consideró el porcentaje de células Ly6C<sup>+</sup>F4-80<sup>+</sup> (macrófagos inmaduros) o Ly6C<sup>-</sup>F4-80<sup>+</sup> (macrófagos maduros) a partir de células individuales vivas CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (estrategia de selección mostrada en la figura 15). Se encontró que los corazones de animales tratados con abatacept tenían un porcentaje significativamente superior de macrófagos inmaduros (figura 5e) y un porcentaje significativamente inferior de macrófagos maduros (figura 5f), en comparación con controles.

Este hallazgo sugiere que la inhibición de células T según la invención también puede tener efectos posteriores sobre los macrófagos patógenos en el miocardio, incluyendo, por ejemplo, sobre el estado de activación y maduración de macrófagos en el miocardio.

## Ejemplo 8. El efecto protector de abatacept depende de IL-10

5 El efecto de abatacept sobre la activación de células T se produce mediante la eliminación de señales coestimulantes proinflamatorias (Krummey y Ford, 2014) en células presentadoras de antígenos, pero puede depender adicionalmente de la producción de señales anti-inflamatorias, inhibiendo de manera activa la respuesta patógena (Linsley *et al.*, 1991) (Sage *et al.*, 2014). Para investigar esto adicionalmente, se examinó la presencia de mediadores inmunitarios mediante qPCR en tiempo real en los animales operados por TAC tratados. A 1 semana tras la operación, un punto de tiempo en el que abatacept ya conduce a efectos cardioprotectores, la expresión de ARNm para la citocina proinflamatoria IL-6 estaba significativamente reglada por incremento en ratones operados por TAC tratados tanto con abatacept como con PBS (figura 5d: *il6*). Esto no es sorprendente ya que ambos grupos de animales se sometieron al mismo tratamiento de TAC, en el que IL-6 tiene una implicación central en la repuesta de miocardio estresado (Melendez *et al.*, 2010). Sin embargo, tan sólo en el grupo tratado con abatacept pudo observarse una regulación por incremento significativa de ARNm para la citocina IL-10 (figura 5d: *il10*). Por tanto, abatacept produjo una regulación por incremento significativa de IL10 en ratones operados por TAC (figura 5D; *il10*). IL-10 es una de las citocinas anti-inflamatorias más potentes usadas por el sistema inmunitario para detener respuestas no deseadas o ya no necesarias y se ha mostrado que media en efectos cardioprotectores en HF (Verma *et al.*, 2012), siendo su efecto sobre la función de cardiomiocitos opuesta a la de IL-6 (Melendez *et al.*, 2010). La administración de abatacept en sí misma no tuvo ningún efecto directo sobre cardiomiocitos neonatales ya que *in vitro* no afectó a su estado hipertrófico. Estos hallazgos, tomados en conjunto, sugirieron que abatacept podía mediar en efectos anti-inflamatorios y posteriores anti-hipertróficos mediante IL-10. Dado que IL10 estaba regulada por incremento en ratones con TAC tratados con abatacept, se evaluó qué subconjunto de células inmunitarias podían funcionar como fuentes de IL-10. Se examinó la expresión de IL-10 intracelular mediante citometría de flujo en esplenocitos expuestos *in vitro* a abatacept. Se encontró que abatacept indujo IL-10 principalmente en células presentadoras de antígenos, la gran mayoría de las cuales eran células B, mientras que también pudieron identificarse unas pocas células T productoras de IL-10 (figura 11B).

Por tanto, se examinó si IL-10 era necesaria para los efectos protectores de abatacept. Para abordar esto, se analizó el efecto de abatacept sobre ratones deficientes en IL-10 (KO para IL-10) sometidos a TAC. Tal como se expuso anteriormente, el indicador de la función de abatacept es la supresión de respuestas de células T. De manera interesante, en ratones KO para IL-10 abatacept ya no pudo inhibir la presencia de células T en el corazón de ratones operados por TAC (figura 6A), demostrando que se requiere IL-10 para la atenuación de células T, efecto anti-inflamatorio del fármaco. Posteriormente, se cuestionó si IL-10 era necesaria para los efectos mediados por abatacept sobre la hipertrofia cardíaca. Análisis ecocardiográficos de ratones KO para IL-10, operados por TAC, confirmaron que se requería IL-10 para el efecto beneficioso de abatacept sobre el corazón (figura 6B-E). Finalmente, la apoptosis de cardiomiocitos es un indicador de hipertrofia patológica (Condorelli *et al.*, 1999). Aunque abatacept redujo significativamente el alcance de apoptosis de cardiomiocitos en ratones de tipo natural operados por TAC, esto no se produjo en ratones KO para IL-10, que eran resistentes al tratamiento (figura 6F).

Los presentes resultados, tomados en conjunto, sugieren que abatacept puede proteger frente a la progresión de HF eliminando e invirtiendo activamente la respuesta inmunitaria patógena, afectando por consiguiente a la hipertrofia cardíaca, de una manera dependiente de la citocina IL-10. Calcular y representar gráficamente los índices de disfunción cardíaca y de inflamación (figuras 7A,B) muestra que abatacept conduce a una reducción en la inflamación (desplazamiento hacia la izquierda en comparación con ratones tratados con PBS) y, por consiguiente, a una mejora de la función cardíaca, evaluada como reducción de la disfunción cardíaca (desplazamiento hacia valores inferiores en el eje de las y). La función cardíaca también se mejoró a las 4 semanas tras la TAC, indicando un retraso en la progresión del síndrome (figura 7B).

Ejemplo 9. Proporcionar células B de tipo natural de IL-10 es suficiente para rescatar la pérdida de efecto protector mediado por abatacept

Entonces, se buscó confirmar si las células productoras de IL-10 identificadas anteriormente (es decir, principalmente células B y, en menor medida, células T) podían ser suficientes para rescatar la pérdida de efecto protector en animales KO para IL-10. Para lograr esto, en primer lugar se transfirieron  $2 \cdot 10^6$  células B de tipo natural (suficientes para IL-10) o  $2 \cdot 10^6$  células T de tipo natural (suficientes para IL-10) a receptores KO para IL-10. Después se procedió a realizar cirugía de TAC seguida por tratamiento con abatacept o control, empezando a partir del día 2 tras la operación. La transferencia de células B de tipo natural de IL-10 fue suficiente para rescatar la pérdida del efecto protector mediado por abatacept en ratones KO para IL-10 operados por TAC (figuras 6g,h: cuadrados negros). Por otro lado, a transferencia de células T de tipo natural de IL10 no pudo rescatar el efecto protector (figuras 6g,h: cuadrados blancos). A partir de esto, se concluye que IL-10 producida por células B en respuesta a abatacept debe participar en el mecanismo del efecto cardioprotector mediado por abatacept. Para evaluar si este efecto mediado por células B dependía del efecto del fármaco sobre células T o si podía ser un efecto directo sobre células B, se evaluó la capacidad de los esplenocitos para producir IL-10 tras la administración de abatacept *in vitro*, en presencia o ausencia de células T. Se encontró que la producción de IL-10 no se veía afectada por la ausencia de células T (figura 16), lo que sugiere que el efecto mediado por células B puede ser directo.

Los presentes resultados, tomados en conjunto, sugieren que abatacept puede proteger frente a la progresión de HF inhibiendo la respuesta inmunitaria patógena mediada por células T y macrófagos, al tiempo que también induce directamente la producción beneficiosa de citocina anti-inflamatoria IL-10 mediante células B.

## 5 DISCUSIÓN

Los inventores en el presente documento demuestran cómo abatacept, un fármaco aprobado por la FDA que inhibe la coestimulación de células T, reduce la gravedad y retrasa la progresión de hipertrofia cardíaca y fibrosis inducidas por sobrecarga de presión. Este desenlace fue posible porque los inventores en el presente documento encontraron que la patogénesis de HF está asociada con una respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Abatacept reduce esta respuesta y, por tanto, inhibe la progresión de la patología cardíaca, mediante un mecanismo dependiente de la acción de IL-10.

Se cree que la inflamación cardíaca asociada con HF se desencadena mediante la secreción de citocinas proinflamatorias por cardiomiocitos estresados (Shioi *et al.*, 1997,) (Ancy *et al.*, 2002) (Souders *et al.*, 2012). La presencia de tales citocinas se ha usado para distinguir entre hipertrofia fisiológica y patológica (Serra *et al.*, 2010). Al tiempo que se confirma y se amplía el conocimiento de la asociación entre inflamación y patología cardíaca, de manera importante, en el presente documento se muestra que, seleccionando como diana las células del sistema inmunitario adaptativo, es posible interferir con el remodelado cardíaco reduciendo la respuesta inflamatoria. Esto contrasta con intentos no satisfactorios de limitar la patología seleccionando como diana las citocinas, que se ha demostrado que son dianas más imprecisas (Yndestad *et al.*, 2006) (Hofmann y Frantz, 2013).

Una característica clínica principal de la de hipertrofia cardíaca patológica es la fibrosis. La formación de fibrosis en otros contextos parece requerir la acción combinada de células T polarizadas por Th2 y células inmunitarias innatas (Wynn, 2004) (Niedermeier *et al.*, 2009). Se describió cómo la inflamación cardíaca está inicialmente mediada por células inmunitarias innatas polarizadas por M1 y puede cambiar posteriormente a una polarización por M2/Th2 a medida que avanza el tiempo. Esto concuerda con dos estudios anteriores que notifican HF peor en ratones BALB/c en comparación con C57BL/6, atribuible a un mayor sesgo de Th2 en la primera raza (Yu *et al.*, 2006) (Peng *et al.*, 2011). También se demostró la presencia de células T en biopsias de pacientes de HF humanos, tanto de pacientes con miocardiopatía dilatada grave derivada de causas no inmunológicas así como también de pacientes que padecían estenosis aórtica.

Uno de los principales medios del sistema inmunitario para regular la acción de células T es mediante células T reguladoras inmunosupresoras (Treg), que suprimen las respuestas perjudiciales o no deseadas (Wing y Sakaguchi, 2010). De manera enigmática, evidencias han vinculado la deficiencia de Treg con HF crónica (Tang *et al.*, 2010). Se detectó la presencia de Treg, mediante la expresión de su marcador genético Foxp3, en ratones con TAC, pero sólo a las 8 semanas tras la cirugía (figura 12). Esto puede ser una indicación de un intento inmunosupresor natural que se produce demasiado tarde para bloquear la respuesta inmunitaria patógena (Garetto *et al.*, 2015). Ha habido dos intentos experimentales satisfactorios para usar la administración de Treg singénicas (terapia celular adoptiva de Treg) en modelos de HF (Kvakan *et al.*, 2009) (Kanellakis *et al.*, 2011). Sin embargo, la terapia celular adoptiva, aunque muy prometedora, es un procedimiento complejo y costoso que todavía necesita refinamiento antes de que pueda pasar a uso clínico. Unos medios alternativos de aprovechar la función supresora de Treg es activarlas de manera selectiva mediante anticuerpos anti-CD28 super-activantes. Esto se ha usado dos veces en modelos de reparación cardíaca tras infarto de miocardio (MI) (Tang *et al.*, 2012) (Weirather *et al.*, 2014). Aunque el estrés cardíaco inducido por MI y su respuesta inmunitaria asociada tienen varias diferencias clave en comparación con HF inducida por sobrecarga de presión, el éxito de estos estudios representa no obstante un hito alentador. Sin embargo, una advertencia importante de este enfoque se encuentra en el hecho de que los pacientes humanos tienen números mucho mayores de células T de memoria proinflamatorias, que en ensayos clínicos anteriores se han activado mediante clones anti-CD28 super-activantes, con consecuencias casi mortales para los pacientes (Suntharalingam *et al.*, 2006). Aunque actualmente esta cuestión está abordándose con el uso de reactivos más precisos (Weirather *et al.*, 2014), esta solución aún no es completamente aplicable en la clínica. Por tanto, buscando una solución más fácilmente aplicable, se eligió usar una proteína de fusión basada en CTLA-4, una de las moléculas efectoras de células Treg. Treg se suprimen mediante CTLA-4 unido a superficie así como IL-10 o TGF $\beta$  solubles, inhibiendo la función de células inmunitarias tanto innatas como adaptativas (Wing y Sakaguchi, 2010). CTLA-4 inhibe específicamente la función de células T bloqueando la capacidad de células T para coestimularse. La proteína de fusión de CTLA4-Ig, abatacept, se administra fácilmente y ya está en uso clínico para suprimir respuestas autoinmunitarias (Moreland *et al.*, 2006). Dado que el fármaco es funcional en ratones, para la presente terapia intentada se eligió usar el modelo de ratón con TAC de HF. Se considera que el modelo de TAC es el modelo de referencia de HF inducida por sobrecarga y, de hecho, se ha usado en un número muy grande de estudios en una amplia gama de estados asociados con HF.

Aunque se observó una supresión sistémica de células T evidente incluso en órganos linfoides no drenantes de ratones operados por TAC tratados con abatacept, el registro de seguridad clínica establecido de abatacept reduce el riesgo de que este tratamiento inmunosupresor pueda exponer al organismo a infecciones oportunistas.

Se demostró que abatacept reducía la gravedad de la patología cardíaca y retrasaba el desarrollo de síntomas de

patología cardíaca derivada de sobrecarga. De manera importante, pudo demostrarse que el fármaco podía limitar significativamente la progresión de la patología incluso cuando la administración comenzó en un estadio tardío de la enfermedad.

5 Se sabe que el fármaco inhibe la función de células T bloqueando los ligandos coestimulantes CD80 y CD86 en células presentadoras de antígenos (Moreland *et al.*, 2006). Por consiguiente, se encontró que abatacept inhibió las respuestas de células T *in vivo* (figura 5), incluyendo en ganglios linfáticos que drenan al corazón, en los que parece iniciarse la activación de células T (figura 3e). También se observó una inhibición de la activación y maduración de macrófagos cardíacos (figuras 5c,e,f). Se atenuó la inflamación en ratones tratados con abatacept, afectando a la  
 10 activación de macrófagos cardíacos (figura 5C) así como al equilibrio de niveles de citocinas pro- frente a anti-, tal como puede visualizarse fácilmente en los gráficos de disfunción cardíaca frente a inflamación (figuras 7A,B). Abatacept también indujo señales anti-inflamatorias activas, tales como la citocina IL-10, que se detectó *in vivo* (figura 5D) y que pudo producirse tanto por células T como por células presentadoras de antígenos (figura 11B). IL-10 (figuras 6b-d) era necesaria para que se produjeran los efectos protectores y pudo producirse IL-10 por células B tras el tratamiento *in vitro* con el fármaco (figura 11b). Las células B suficientes para IL-10 parecieron ser suficientes para rescatar la pérdida de efectos cardioprotectores en animales KO para IL-10 operados por TAC tratados con abatacept (figuras 6a-h). Dado que las células T y las células presentadoras de antígenos actúan conjuntamente para su activación completa mutua (Linsley *et al.*, 1991), no es sorprendente que ambas poblaciones puedan estar implicadas en la inducción de señales anti-inflamatorias. El resumen esquemático de esta eliminación combinada de activación proinflamatoria de células T e inducción de señales anti-inflamatorias (en células B) se facilita en la figura 7C. Dado que se ha mostrado que IL-10 es directamente cardioprotectora y antifibrótica (Verma *et al.*, 2012) (Wynn, 2004), el beneficio conferido por el tratamiento con abatacept puede deberse a un efecto combinado de la eliminación de las señales proinflamatorias, así como efectos protectores directos de IL-10. Ambos de estos efectos dependían de IL-10 porque, en ratones deficientes para la citocina, el tratamiento con abatacept ya no suprimió la expansión de células T ni protegió frene a la pérdida de funcionalidad cardíaca o apoptosis de cardiomiocitos.  
 25

Aunque se ha mostrado que abatacept induce células T reguladoras (Ko *et al.*, 2010), no se observó ninguna inducción significativa de la expresión de ARNm de Foxp3 en el presente sistema. Sin embargo, sí se observó producción de IL-10 a partir de células Treg Foxp3+ *in vitro* tras la administración de abatacept, de modo que no puede excluirse formalmente este mecanismo paralelo. Dado que los macrófagos cardíacos, que se encontró que se suprimían por abatacept, pueden actuar como células presentadoras de antígenos que expresan CD80/CD86, tampoco puede excluirse que el fármaco suprima macrófagos tanto mediante su efecto sobre células T como también actuando directamente sobre los propios macrófagos.  
 30

El tratamiento según la invención selecciona como diana la coestimulación de células T y, por tanto, su activación óptima. La activación de células T también puede ser relevante para la cronicidad de la enfermedad cardíaca subyacente, y la presencia continua de antígenos relacionados reconocidos por células T puede obstaculizar la resolución. Como ejemplo de un inhibidor de la coestimulación y/o activación y/o función de células T que ya está en uso clínico, moléculas derivadas de CTLA4 tales como CTLA4-Ig, por ejemplo, abatacept, pueden ser más relevantes desde el punto de vista de la aplicación que otros medios de seleccionar como diana células T que están explorándose actualmente para el tratamiento de HF inducida por sobrecarga de presión. Además, la coestimulación requiere interacciones entre células T y células presentadoras de antígenos. Por tanto, seleccionar como diana la coestimulación requiere seleccionar como diana macrófagos que portan CD80/CD86 y células B, lo cual contribuye al efecto terapéutico, ya que afecta a las respuestas de macrófagos y células B asociadas con células T.  
 35  
 40  
 45

IL-10 es directamente cardioprotectora y antifibrótica. Los presentes resultados mostraron que la presencia IL-10 era necesaria para los efectos cardioprotectores de abatacept y también para la supresión de la expansión de células T (figura 6a). Pero IL-10 actúa posteriormente a la administración del fármaco. Por tanto, la regulación de la inducción de IL-10 dependerá de la ubicación y abundancia de las dianas del fármaco. Un inhibidor de la coestimulación de células T, tal como el inhibidor de células T de tipo CTLA4-Ig, abatacept, aunque las células B y los macrófagos sean sus dianas directas, afecta únicamente a respuestas asociadas con células T. Abatacept no afectó a la activación de células T de manera sistémica (tal como se muestra en la figura 5a) sino que, extrapolando a partir de los datos en patologías autoinmunitarias mencionadas anteriormente, se predice que no afectará a las respuestas inmunitarias innatas independientes de células T, aunque su acción dependa de IL-10. El perfil de seguridad demostrado de abatacept en la clínica ofrece respaldo sustancial para la interpretación de que el equilibrio de inmunosupresión útil frente a inducción de inmunodeficiencia funcional puede ser satisfactorio en una molécula inhibidora de células T basada en CTLA4 tal como CTLA4-Ig, por ejemplo, abatacept.  
 50  
 55

Tomados en conjunto, los hallazgos del presente estudio demuestran cómo un fármaco aprobado por la FDA que inhibe la función proinflamatoria de células T puede proporcionar beneficios terapéuticos significativos en un modelo de HF inducida por sobrecarga de presión. El motivo subyacente para esto es que una respuesta inmunitaria adaptiva está vinculada de manera causante a la patogénesis de la hipertrofia cardíaca y fibrosis inducidas por sobrecarga de presión. Dado que las células T contribuyen en gran medida a la cronicidad de la respuesta inmunitaria, su selección como diana parece ser eficaz para controlar la progresión de la patología.  
 60  
 65

La inducción de una respuesta inmunitaria como reacción frente a sobrecarga de presión cardíaca puede ser una

consecuencia no deseada de una respuesta originalmente evolucionada para enfrentarse a infecciones patógenas. Puede suceder que el organismo no sea capaz de distinguir entre señales de estrés inducidas por infección y por sobrecarga de presión. Sin embargo, afortunadamente, este vínculo entre inmunidad e hipertrofia cardíaca patológica también crea una oportunidad: terapias funcionales y validadas (actualmente en uso clínico para tratar afecciones mediadas por el sistema inmunitario) pueden convertirse en una herramienta importante en la lucha contra la insuficiencia cardíaca.

Por tanto, en resumen, los inventores describen en el presente documento que un inhibidor de la coestimulación y/o activación de células T es eficaz en el tratamiento o la prevención de patologías de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión que no están inducidas por miocardiopatías inflamatorias provocadas por autoinmunidad o por respuestas inmunitarias frente a infección (por ejemplo: no por infección viral).

Evidentemente, se entenderá que la presente invención se ha descrito anteriormente tan sólo a modo de ejemplo y que pueden realizarse modificaciones de detalles dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tablas

Tabla 1: parámetros hemodinámicos de ratones operados por TAC y de manera simulada a las 1, 3 y 4 semanas tras la operación.

	SIMULADO				TAC			
	Basal (n=3)	1 semana tras la simulación (n=3)	3 semanas tras la simulación (n=3)	4 semanas tras la simulación (n=3)	Basal (n=7)	1 semana tras la TAC (n=7)	3 semanas tras la TAC (n=7)	4 semanas tras la TAC (n=7)
Edad	8,7±0,0	9,6±0,1	11,7±0,1	12,6±0,0	8,6±0,1	9,6±0,1	11,6±0,1	12,6±0,0
Peso	22,0±1,0	22,4±0,8	23,6±0,9	23,9±1,1	22,8±1,6	22,3±1,3	24,0±1,5	24,6±1,5
HR, modo M	545,7±71,1	507,7±93,9	549,7166,0	598,0±29,0	577,0166,4	530,1±48,7	517,9187,1	606,0±36,6
% de FS	43,4±3,1	43,3±1,4	42,9±3,0	40,3±1,7	40,5±2,4	37,7±1,2 <sup>§†</sup>	33,2±1,5 <sup>§</sup>	30,6±2,2 <sup>§</sup>
% de EF	75,7±3,5	75,6±1,5	75,0±3,5	72,1±2,1	72,3±3,6	69,0±1,6 <sup>§†</sup>	62,7±2,1 <sup>§</sup>	58,8±3,5 <sup>§</sup>
LVIDd	3,4±0,1	3,4±0,1	3,5±0,1	3,4±0,0	3,4±0,1	3,4±0,2	3,7±0,1 <sup>+</sup>	3,7±0,3 <sup>+</sup>
LVIDs	1,9±0,1	1,9±0,1	2,0±0,2	2,0±0,1	2,0±0,2	2,1±0,1 <sup>°</sup>	2,5±0,1 <sup>§*</sup>	2,6±0,3 <sup>**</sup>
IVSd	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,7±0,1	0,8±0,1	0,7±0,0	0,9±0,1 <sup>*</sup>	0,9±0,1 <sup>*</sup>	1,0±0,1 <sup>#</sup>
IVSs	1,1±0,1	1,2±0,0	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1 <sup>†</sup>	1,3±0,1 <sup>+</sup>	1,4±0,1 <sup>+</sup>
LVPWd	0,7±0,1	0,8±0,0	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1 <sup>#</sup>	0,9±0,1 <sup>†</sup>
LVPWs	1,2±0,1	1,3±0,0	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1 <sup>+</sup>	1,3±0,1 <sup>†</sup>

° p<0,05 TAC frente a simulado en el mismo punto de tiempo

# p<0,01 TAC frente a simulado en el mismo punto de tiempo

§ p<0,001 TAC frente a simulado en el mismo punto de tiempo

† p<0,05 TAC basal frente a TAC en cada punto de tiempo

+ p<0,01 TAC basal frente a TAC en cada punto de tiempo

\* p<0,001 TAC basal frente a TAC en cada punto de tiempo

Prueba de la t para datos independientes

Tabla 2: parámetros hemodinámicos de ratones operados por TAC y de manera simulada tratados con abatacept o PBS a las 1, 3 y 4 semanas tras la operación.

	SIMULADO				PBS			
	Abatacept				PBS			
	Basal (n=8)	1 semana tras la simulación (n=7)	3 semanas tras la simulación (n=8)	4 semanas tras la simulación (n=8)	Basal (n=8)	1 semana tras la simulación (n=5)	3 semanas tras la simulación (n=7)	4 semanas tras la simulación (n=7)
Edad (sem)	9,0±0,3	9,9±0,0	12,0±0,0	12,9±0,0	9±0,3	10,1±0,0	12,0±0,1	13,0±0,0
Peso (g)	22,611,4	22,111,3	23,5±1,5	23,7±1,7	22,6±1,4	21,7±1,4	23,11±2,1	24,0±1,9
HR, modo	564,4175,8	514,0±56,4	602,8168,6	614,4±44,5	564,4±75,8	579,0±18,9	577,3±69,9	575,2185,6

ES 2 975 739 T3

M (bpm)								
% de FS	41,413,8	43,0±4,1	42,6±1,5	40,7±2,0	41,4±3,8	43,3±2,5	40,6±2,5	41,4±1,7
% de EF	73,2±4,8	75,2±4,8	74,911,6	72,8±2,4	73,2±4,8	75,8±2,6	72,713	73,811,9
LVIDd (mm)	3,4±0,1	3,3±0,2	3,3±0,2	3,2±0,2	3,4±0,1	3,1±0,2	3,2±0,1	3,1±0,3
LVIDs (mm)	2±0,2	1,9±0,2	1,9±0,1	1,9±0,1	2,0±0,2	1,8±0,1	1,9±0,1	1,8±0,2
IVSd (mm)	0,8±0,0	0,7±0,1	0,8±0,0	0,8±0,0	0,8±0,0	0,8±0,1	0,8±0,0	0,8±0,0
IVSs (mm)	1,2±0,1	1,2±0,0	1,3±0,0	1,2±0,0	1,2±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1
LVPWd (mm)	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,0	0,8±0,1	0,8±0,0	0,8±0,1	0,9±0,1
LVPWs (mm)	1,2±0,0	1,3±0,0	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,0	1,2±0,0	1,2±0,0	1,2±0,0
	TAC							
	Abatacept				PBS			
	Basal (n=9)	1 semana tras la TAC (n=8)	3 semanas tras la TAC (n=7)	4 semanas tras la TAC (n=7)	Basal (n=10)	1 semana tras la TAC (n=10)	3 semanas tras la TAC (n=10)	4 semanas tras la TAC (n=10)
Edad (sem)	8,9±0,0	9,9±0,0	11,9±0,0	12,9±0,0	9,0±0,3	10,1±0,0	12,1±0,0	12,9±0,0
Peso (g)	22,5±1,6	22,1±1,4	23,4±1,3	24±1,8	22,6±1,4	21,6±1,8	23,6±1,6	24,2±1,4
HR, modo M (bpm)	556,9±86,1	546,6±55,8	597,9194,6	561,4±66,0	564,4±75,8	544,7±46,2	575,2185,6	558,3160,9
% de FS	42,0±1,5	41,3±3,2 <sup>#</sup>	37,3±1,6 <sup>#</sup>	36,5±3,7 <sup>#</sup>	41,4±3,8	34,9±1,3 <sup>§</sup>	30,7±3,0 <sup>§</sup>	27,5±3,8 <sup>§</sup>
% de EF	74,1±1,8	73,4±3,9 <sup>#</sup>	68,3±2,2 <sup>#§</sup>	67,2±4,8 <sup>#</sup>	73,2±4,8	65,2±1,8 <sup>§</sup>	58,9±4,6 <sup>§</sup>	53,9±6,2 <sup>§</sup>
LVIDd (mm)	3,4±0,1	3,3±0,2	3,5±0,2 <sup>†</sup>	3,5±0,1 <sup>#</sup>	3,4±0,1	3,5±0,2 <sup>+</sup>	3,8±0,3 <sup>§</sup>	3,8±0,2 <sup>§</sup>
VIDs (mm)	1,9±0,1	1,9±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	2,0±0,2	2,3±0,1	2,6±0,3	2,8±0,3
IVSd (mm)	0,8±0,1	0,9±0,1 <sup>§</sup>	0,9±0,1 <sup>°</sup>	1,0±0,0 <sup>§</sup>	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9±0,1 <sup>+</sup>	1,0±0,1 <sup>§</sup>
IVSs (mm)	1,2±0,1	1,3±0,0 <sup>§</sup>	1,3±0,1	1,4±0,0 <sup>§</sup>	1,2±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1 <sup>°</sup>	1,3±0,1
LVPWd (mm)	0,7±0,1	0,9±0,1 <sup>+</sup>	1±0,1 <sup>§</sup>	0,9±0,0 <sup>§</sup>	0,8±0,1	0,9±0,1 <sup>§</sup>	1,0±0,1 <sup>§</sup>	1,0±0,1 <sup>+</sup>
LVPWs (mm)	1,2±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,4±0,0	1,2±0,0	1,4±0,1	1,4±0,0	1,4±0,1

° p<0,05 TAC con abatacept/PBS frente a simulado con abatacept/PBS en el mismo punto de tiempo

+ p<0,01 TAC con abatacept/PBS frente a simulado con abatacept/PBS en el mismo punto de tiempo

5

§ p<0,001 TAC con abatacept/PBS frente a simulado con abatacept/PBS en el mismo punto de tiempo

† p<0,05 TAC con abatacept frente a TAC con PBS en el mismo punto de tiempo

10

\* p<0,01 TAC con abatacept frente a TAC con PBS en el mismo punto de tiempo

# p<0,001 TAC con abatacept frente a TAC con PBS en el mismo punto de tiempo

Tabla 3: lista de cebadores usados.

15

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
β-Miosina ( <i>Mhy7</i> )	5'-CGCATCAAGGAGCTCACC-3' (SEQ ID NO: 3)	5'-CTGCAGCCGCAGTAGCTT-3' (SEQ ID NO: 4)
Péptido natriurético cerebral ( <i>Nppb</i> )	5'-GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC-3' (SEQ ID NO: 5)	5'-AGACCCAGGCAGAGTCAGAA-3' (SEQ ID NO: 6)
Péptido natriurético auricular ( <i>Nppa</i> )	5'-CACAGATCTGATGGATTCAAGA-3' (SEQ ID NO: 7)	5'-CCTCATCTTCTACCGGCATC-3' (SEQ ID NO: 8)
ARN ribosómico de 18S (18S)	5'-AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGT C-3' (SEQ ID NO: 9)	5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCA A-3' (SEQ ID NO: 10)

## Bibliografía

- Ancey, C., P. Corbi, J. Froger, A. Delwail, J. Wijdenes, H. Gascan, D. Potreau, y J.C. Lecron. 2002. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine*. 18:199-205.
- 5 Bluestone, J.A. 1997. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol*. 158:1989-1993.
- Bulut, D., G. Creutzenberg, y A. Mugge. 2012. The number of regulatory T cells correlates with hemodynamic improvement in patients with inflammatory dilated cardiomyopathy after immunoadsorption therapy. *Scand J Immunol*. 77:54-61. doi: 10.1111/sji.12000.
- 10 Condorelli, G., A. Drusco, G. Stassi, A. Bellacosa, R. Roncarati, G. Iaccarino, M.A. Russo, Y. Gu, N. Dalton, C. Chung, M.V. Latronico, C. Napoli, J. Sadoshima, C.M. Croce, y J.J. Ross. 2002. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:12333-12338. doi: 10.1073/pnas.172376399.
- 15 Condorelli, G., C. Morisco, G. Stassi, A. Notte, F. Farina, G. Sgaramella, A. de Rienzo, R. Roncarati, B. Trimarco, y G. Lembo. 1999. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*. 99:3071-3078.
- 20 Condorelli, G., R. Roncarati, J. Ross, A. Pisani, G. Stassi, M. Todaro, S. Trocha, A. Drusco, Y. Gu, M.A. Russo, G. Frati, S.P. Jones, D.J. Lefer, C. Napoli, y C.M. Croce. 2001. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:9977-9982. doi: 10.1073/pnas.161120198.
- 25 Dhirapong, A., G.X. Yang, S. Nadler, W. Zhang, K. Tsuneyama, P. Leung, S. Knechtle, A.A. Ansari, R.L. Coppel, F.T. Liu, X.S. He, y M.E. Gershwin. 2013. Therapeutic effect of cytotoxic T lymphocyte antigen 4/immunoglobulin on a murine model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 57:708-715. doi: 10.1002/hep.26067.
- 30 Epelman, S., K.J. Lavine, A.E. Beaudin, D.K. Sojka, J.A. Carrero, B. Calderon, T. Brija, E.L. Gautier, S. Ivanov, A.T. Satpathy, J.D. Schilling, R. Schwendener, I. Sergin, B. Razani, E.C. Forsberg, W.M. Yokoyama, E.R. Unanue, M. Colonna, G.J. Randolph, y D.L. Mann. 2014. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 40:91-104. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
- 35 Garetto, S., A.E. Trovato, A. Lleo, F. Sala, E. Martini, A.G. Betz, G.D. Norata, P. Invernizzi, y M. Kallikourdis. 2015. Peak inflammation in atherosclerosis, primary biliary cirrhosis and autoimmune arthritis is counter-intuitively associated with regulatory T cell enrichment. *Immunobiology*. 220:1025-9. doi: 10.1016/j.imbio.2015.02.006.
- 40 Hofmann, U., y S. Frantz. 2013. How can we cure a heart "in flame"? A translational view on inflammation in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 108:356. doi: 10.1007/s00395-013-0356-y.
- 45 Kanellakis, P., T.N. Dinh, A. Agrotis, y A. Bobik. 2011. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells suppress cardiac fibrosis in the hypertensive heart. *J Hypertens*. 29:1820-1828
- Kemi, O.J., M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G.L. Smith, G. Condorelli, y O. Ellingsen. 2008. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*. 214:316-321. doi: 10.1002/jcp.21197.
- 50 Ko, H.J., M.L. Cho, S.Y. Lee, H.J. Oh, Y.J. Heo, Y.M. Moon, C.M. Kang, S.K. Kwok, J.H. Ju, S.H. Park, K.S. Park, y H.Y. Kim. 2010. CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population. *J Autoimmun*. 34:111-120. doi: 10.1016/j.jaut.2009.07.006.
- Kong, P., P. Christia, y N.G. Frangogiannis. 2014. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 71:549-574. doi: 10.1007/s00018-013-1349-6.
- 55 Krummey, S.M., y M.L. Ford. 2014. Braking bad: novel mechanisms of ctla-4 inhibition of T cell responses. *Am J Transplant*. 14:2685-2690. doi: 10.1111/ajt. 12938.
- 60 Kuang, S.Q., L. Geng, S.K. Prakash, J.M. Cao, S. Guo, C. Villamizar, C.S. Kwartler, A.M. Peters, A.R. Brasier, y D.M. Milewicz. 2013. Aortic remodeling after transverse aortic constriction in mice is attenuated with AT1 receptor blockade. *Arterioscler Thromb Vase Biol*. 33:2172- 2179. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301624.
- Kvakan, H., M. Kleinewietfeld, F. Qadri, J.K. Park, R. Fischer, I. Schwarz, H.P. Rahn, R. Plehm, M. Wellner, S. Elitok, P. Gratze, R. Dechend, F.C. Luft, y D.N. Muller. 2009. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation*. 119:2904-2912. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832782.
- 65 Lai, N.C., M.H. Gao, E. Tang, R. Tang, T. Guo, N.D. Dalton, A. Deng, y T. Tang. 2012. Pressure overload-induced

- cardiac remodeling and dysfunction in the absence of interleukin 6 in mice. *Lab Invest.* 92:1518-1526. doi: 10.1038/labinvest.2012.97.
- 5 Linsley, P.S., W. Brady, M. Umes, L.S. Grosmaire, N.K. Damle, y J.A. Ledbetter. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 174:561-569.
- Loke, P., I. Gallagher, M.G. Nair, X. Zang, F. Brombacher, M. Mohrs, J.P. Allison, y J.E. Allen. 2007. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol.* 179:3926-3936.
- 10 Mann, D.L. 2002. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res.* 91:988-998.
- 15 Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, y M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677- 686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
- Melendez, G.C., J.L. McLarty, S.P. Levick, Y. Du, J.S. Janicki, y G.L. Brower. 2010. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension.* 56:225-231. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.148635.
- 20 Moreland, L., G. Bate, y P. Kirkpatrick. 2006. Abatacept. *Nat Rev Drug Discov.* 5:185-186. doi: 10.1038/nrd1989.
- Niedermeier, M., B. Reich, M. Rodriguez Gomez, A. Denzel, K. Schmidbauer, N. Gobel, Y. Talke, F. Schweda, y M. Mack. 2009. CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:17892-17897. doi: 10.1073/pnas.0906070106.
- 25 Oka, T., S. Hikoso, O. Yamaguchi, M. Taneike, T. Takeda, T. Tamai, J. Oyabu, T. Murakawa, H. Nakayama, K. Nishida, S. Akira, A. Yamamoto, I. Komuro, y K. Otsu. 2012. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* 485:251- 255. doi: 10.1038/nature10992.
- 30 Peng, H., X.P. Yang, O.A. Carretero, P. Nakagawa, M. D'Ambrosio, P. Leung, J. Xu, E.L. Peterson, G.E. Gonzalez, P. Harding, y N.E. Rhaleb. 2011. Angiotensin II-induced dilated cardiomyopathy in Balb/c but not C57BL/6J mice. *Exp Physiol.* 96:756-764. doi: 10.1113/expphysiol.2011.057612.
- 35 Perrino, C., S.V. Naga Prasad, L. Mao, T. Noma, Z. Yan, H.S. Kim, O. Smithies, y H.A. Rockman. 2006. Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest.* 116:1547-1560. doi: 10.1172/JCI25397.
- 40 Pilat, N, C Schwarz, y T Wekerle (2012), 'Modulating T-cell costimulation as new immunosuppressive concept in organ transplantation.', *Curr Opin Organ Transplant*, 17 (4), 368-75.
- Roncarati, R., C. Viviani Anselmi, P. Krawitz, G. Lattanzi, Y. von Kodolitsch, A. Perrot, E. di Pasquale, L. Papa, P. Portararo, M. Columbaro, A. Forni, G. Faggian, G. Condorelli, y P.N. Robinson. 2013. Doubly heterozygous LMNA and TTN mutations revealed by exome sequencing in a severe form of dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet.* 21:1105-1111. doi: 10.1038/ejhg.2013.16.
- 45 Sage, P.T., A.M. Paterson, S.B. Lovitch, y A.H. Sharpe. 2014. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity.* 41:1026-1039. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.005.
- 50 Serra, A.J., M.H. Santos, D.S. Bocalini, E.L. Antonio, R.F. Levy, A.A. Santos, M.L. Higuchi, J.A. Silva, F.C. Magalhaes, V.G. Barauna, J.E. Krieger, y P.J. Tucci. 2010. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol.* 588:2431-2442. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187310.
- 55 Sharpe, AH (2009), "Mechanisms of costimulation", *Immunol Rev*, 229 (1), 5-11.
- Shioi, T., A. Matsumori, Y. Kihara, M. Inoko, K. Ono, Y. Iwanaga, T. Yamada, A. Iwasaki, K. Matsushima, y S. Sasayama. 1997. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ Res.* 81:664-671.
- 60 Souders, C.A., T.K. Borg, I. Banerjee, y T.A. Baudino. 2012. Pressure overload induces early morphological changes in the heart. *Am J Pathol.* 181:1226-1235. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.015.
- 65 Stolen, T.O., M.A. Hoydal, O.J. Kemi, D. Catalucci, M. Ceci, E. Aasum, T. Larsen, N. Rolim, G. Condorelli, G.L.

- Smith, y U. Wisloff. 2009. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca<sup>2+</sup> control, and SR Ca<sup>2+</sup> release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res.* 105:527-536. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.199810.
- 5 Suntharalingam, G., M.R. Perry, S. Ward, S.J. Brett, A. Castello-Cortes, M.D. Brunner, y N. Panoskaltis. 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 355:1018-1028. doi: 10.1056/NEJMoa063842.
- 10 Tang, T.T., Y.J. Ding, Y.H. Liao, X. Yu, H. Xiao, J.J. Xie, J. Yuan, Z.H. Zhou, M.Y. Liao, R. Yao, Y. Cheng, y X. Cheng. 2010. Defective circulating CD4CD25+Foxp3+CD127(low) regulatory T-cells in patients with chronic heart failure. *Cell Physiol Biochem.* 25:451-458. doi: 10.1159/000303050.
- 15 Tang, T.T., J. Yuan, Z.F. Zhu, W.C. Zhang, H. Xiao, N. Xia, X.X. Yan, S.F. Nie, J. Liu, S.F. Zhou, J.J. Li, R. Yao, M.Y. Liao, X. Tu, Y.H. Liao, y X. Cheng. 2012. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 107:232. doi: 10.1007/s00395-011-0232-6.
- 20 Tian, Y., S.E. Kelemen, y M.V. Autieri. 2006. Inhibition of AIF-1 expression by constitutive siRNA expression reduces macrophage migration, proliferation, and signal transduction initiated by atherogenic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C1083-91. doi: 10.1152/ajpcell.003.81.2005.
- 25 Utans, U., R.J. Arceci, Y. Yamashita, y M.E. Russell. 1995. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest.* 95:2954-2962. doi: 10.1172/JCI118003.
- 30 Verma, S.K., P. Krishnamurthy, D. Barefield, N. Singh, R. Gupta, E. Lambers, M. Thal, A. Mackie, E. Hoxha, V. Ramirez, G. Qin, S. Sadayappan, A.K. Ghosh, y R. Kishore. 2012. Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB. *Circulation.* 126:418-429. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.112185.
- 35 Weirather, J., U. Hofmann, N. Beyersdorf, G.C. Ramos, B. Vogel, A. Frey, G. Ertl, T. Kerkau, y S. Frantz. 2014. Foxp3+CD4+ T Cells Improve Healing after Myocardial Infarction by Modulating Monocyte/Macrophage Differentiation. *Circ Res.* 115:55-67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303895.
- 40 Wynn, T.A. 2004. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 4:583-594. doi: 10.1038/nri1412.
- 45 Xia, Y., K. Lee, N. Li, D. Corbett, L. Mendoza, y N.G. Frangogiannis. 2009. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol.* 131:471-481. doi: 10.1007/s00418-008-0541-5.
- 50 Yndestad, A., J.K. Damas, E. Oie, T. Ueland, L. Gullestad, y P. Aukrust. 2006. Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores. *Heart Fail Rev.* 11:83-92. doi: 10.1007/s10741-006-9196-2.
- 55 Yu, Q., K. Horak, y D.F. Larson. 2006. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling. *Hypertension.* 48:98-104. doi: 10.1161/01.HYP.0000227247.27111.b2.
- Zarrinkoub, R., B. Wettermark, P. Wandell, M. Mejhert, R. Szulkin, G. Ljunggren, y T. Kahan. 2013. The epidemiology of heart failure, based on data for 2.1 million inhabitants in Sweden. *Eur J Heart Fail.* 15:995-1002. doi: 10.1093/eurjhf/hft064.
- 60 Documento WO 2011/103584
- Pieper, Jennifer, *et al.* "CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients." *BMC immunology* 14.1 (2013): 1-9.
- 65 Nevers, Tania, *et al.* "Left ventricular T-cell recruitment contributes to the pathogenesis of heart failure." *Circulation: Heart Failure* 8.4 (2015): 776-787.
- Laroumanie, Fanny, *et al.* "CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload." *Circulation* 129.21 (2014): 2111-2124.
- Yndestad, Arne, *et al.* "Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores." *Heart failure reviews* 11.1

(2006): 83-92.

Peterson, Kirk L. "Pressure overload hypertrophy and congestive heart failure: where is the "Achilles' heel"?" Journal of the American College of Cardiology 39.4 (2002): 672-675.

5 Takeishi, Yasuchika, *et al.* "Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch." Journal of molecular and cellular cardiology 33.9 (2001): 1637-1648.

10 Vinh, Antony, *et al.* "Inhibition and genetic ablation of the B7/CD28 T-cell costimulation axis prevents experimental hypertension." Circulation 122.24 (2010): 2529-2537.

Picchianti Diamanti, A., *et al.* "Abatacept (cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin) improves B cell function and regulatory T cell inhibitory capacity in rheumatoid arthritis patients non-responding to anti-tumour necrosis factor- $\alpha$  agents." Clinical & Experimental Immunology 177.3 (2014): 630-640.

15

**Lista de secuencias**

20 <110> Humanitas Mirasole S.p.A.

<120> USO TERAPÉUTICO DE INHIBIDORES DE LA ACTIVACIÓN O ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T

<130> 192353

25 <150> Documento EP16151539.0

<151> 15/01/2016

30 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

35 <211> 357

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CTLA4-Ig

45 <400> 1

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
 20 25 30  
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
 35 40 45  
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
 50 55 60  
 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu  
 85 90 95  
 Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
 100 105 110  
 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys  
 115 120 125  
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu  
 130 135 140  
 Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys  
 355

<210> 2

5 <211> 383

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

ES 2 975 739 T3

<223> CTLA4-Ig

<400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala  
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro  
20 25 30

5 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu



ES 2 975 739 T3

305					310					315					320
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				325					330					335	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			340					345					350		
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
		355					360					365			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
	370					375					380				

<210> 3

5 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador sintético

15 <400> 3

cgcatcaagg agctcacc 18

20 <210> 4

<211> 18

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador sintético

30

<400> 4

ctgcagccgc agtaggtt 18

35 <210> 5

<211> 21

<212> ADN

40

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> cebador sintético

ES 2 975 739 T3

<400> 5  
gtcagtcggt tgggctgtaa c 21  
5  
<210> 6  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
15 <223> cebador sintético  
<400> 6  
20 agaccacaggc agagtcagaa 20  
<210> 7  
<211> 23  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30 <220>  
<223> cebador sintético  
<400> 7  
35 cacagatctg atggatttca aga 23  
<210> 8  
40 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
45 <220>  
<223> cebador sintético  
50 <400> 8  
cctcatcttc taccggcacc 20  
55 <210> 9  
<211> 24  
<212> ADN  
60 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador sintético

ES 2 975 739 T3

<400> 9

aaatcagtta tgggtccttt ggtc ..... 24

5

<210> 10

<211> 26

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> cebador sintético

<400> 10

20

gctctagaat taccacagtt atccaa ..... 26

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de la coestimulación y/o activación de células T para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión, en el que el inhibidor inhibe CD80 y/o CD86.
2. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es un inhibidor de la coestimulación de células T.
3. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor aumenta los niveles de IL-10 en el corazón.
4. Inhibidor para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el inhibidor comprende un dominio extracelular de CTLA4 o derivado funcional del mismo que se une a CD80 y/o CD86.
5. Inhibidor para su uso según la reivindicación 4, en el que el dominio extracelular de CTLA4 tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con respecto a los aminoácidos 1-125 de SEQ ID NO: 1.
6. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el inhibidor es una molécula de CTLA4-Ig o un derivado funcional de la misma que se une a CD80 y/o CD86.
7. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que el inhibidor tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con respecto a SEQ ID NO: 1.
8. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el inhibidor comprende los aminoácidos 1-125 de SEQ ID NO: 1,  
 opcionalmente en el que el inhibidor comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1,  
 de manera adicionalmente opcional en el que el inhibidor es abatacept.
9. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se tratan y/o se previenen hipertrofia cardíaca y fibrosis inducidas por sobrecarga de presión.
10. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la insuficiencia cardíaca es  
 (a) de clase III o IV de la Asociación Cardiológica de Nueva York, o de estadio C o D según la clasificación del Colegio de Cardiología de los Estados Unidos y la Asociación Estadounidense de Cardiología, y/o  
 (b) de clase I o II de la Asociación Cardiológica de Nueva York, o de estadio A o B según la clasificación del Colegio de Cardiología de los Estados Unidos y la Asociación Estadounidense de Cardiología.
11. Molécula de ácido nucleico que codifica para un inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.
12. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 11 o que codifica para el inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.
13. Célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa el inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o nanopartícula o microvesícula que comprende dicho inhibidor, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.
14. Composición farmacéutica que comprende el inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11, o el vector de expresión según la reivindicación 12, o la célula huésped modificada por ingeniería genética o nanopartícula o microvesícula según la reivindicación 13, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

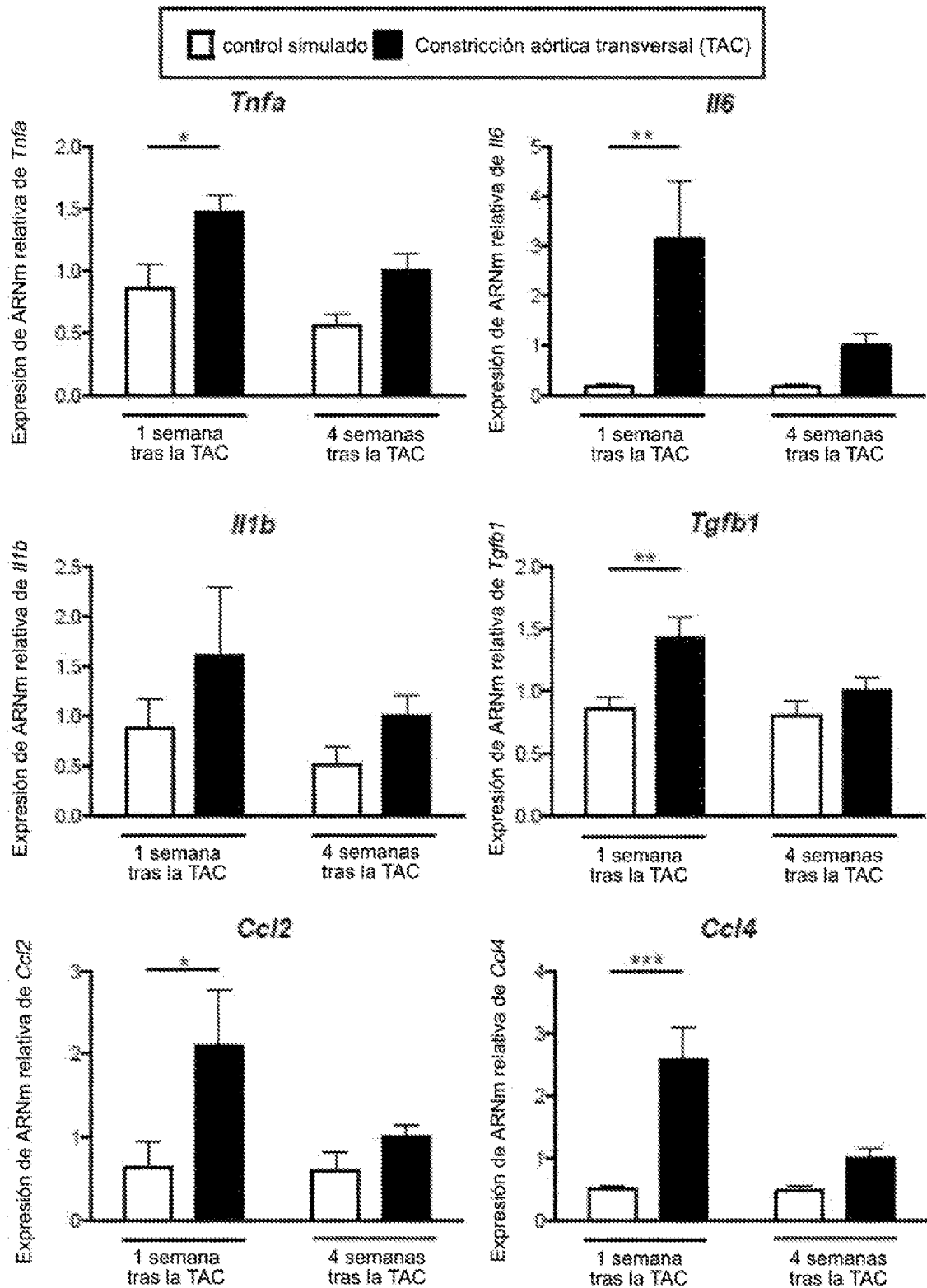


Fig. 1 (1/2)

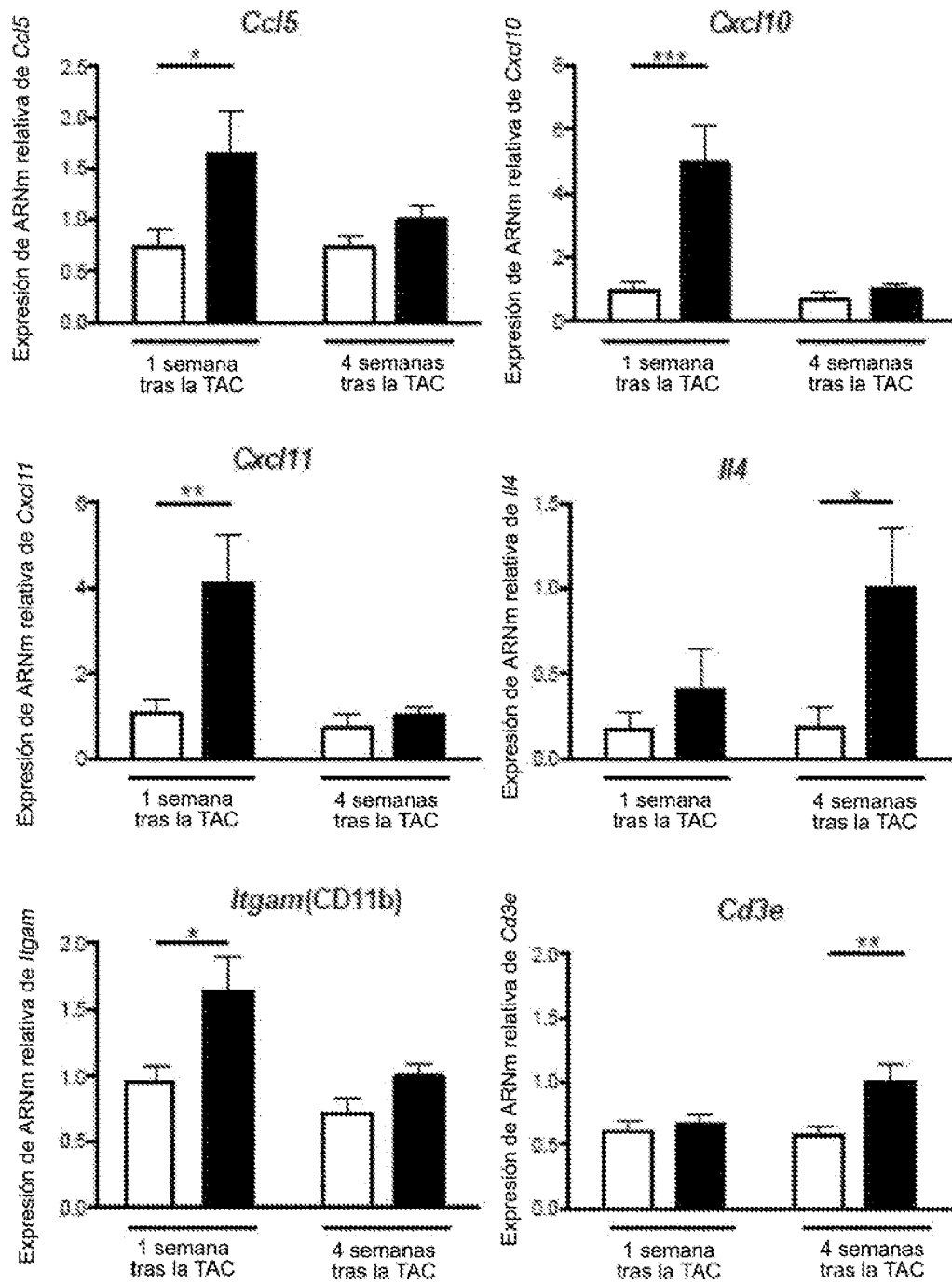


Fig. 1 (2/2)

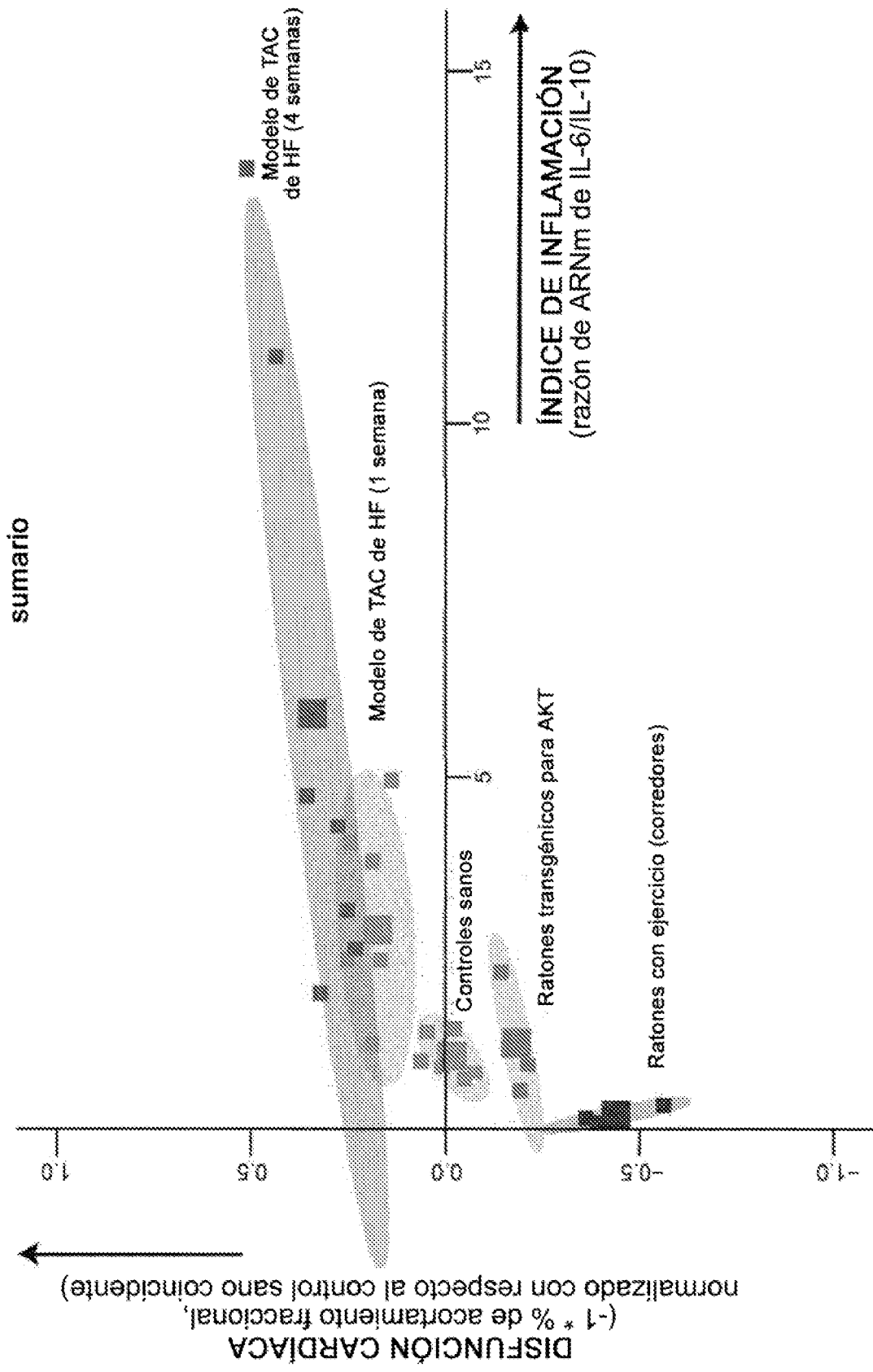


Fig. 2

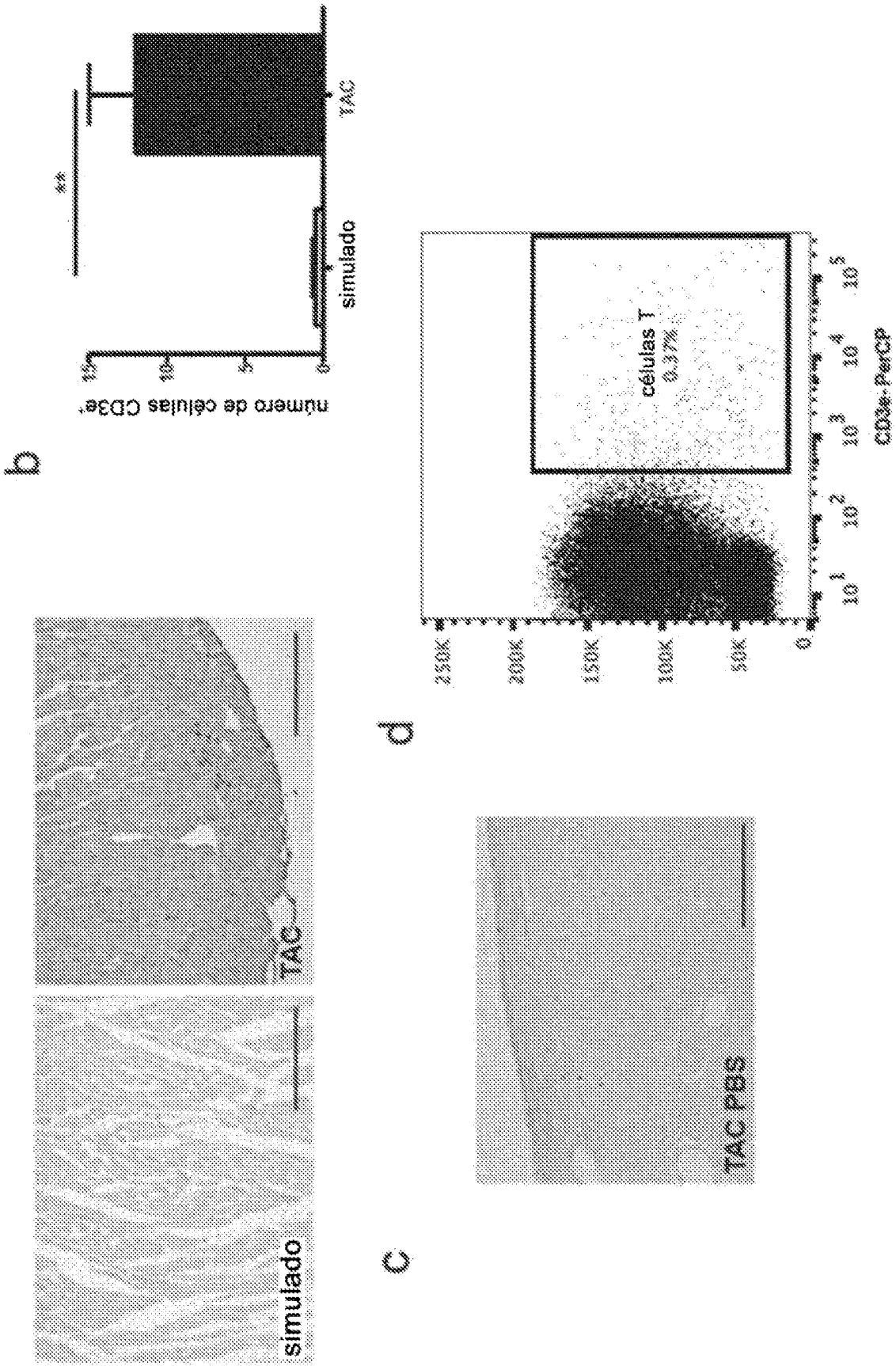


Fig. 3 (1/4)

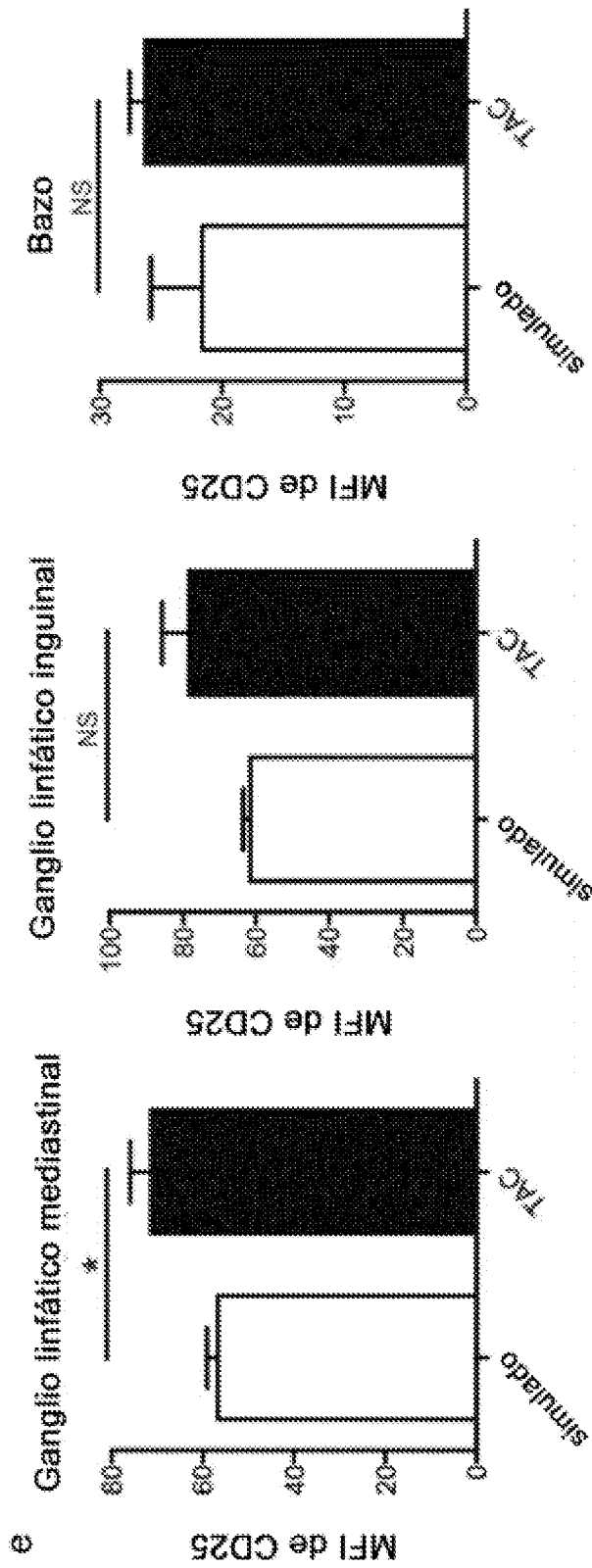


Fig. 3 (2/A)

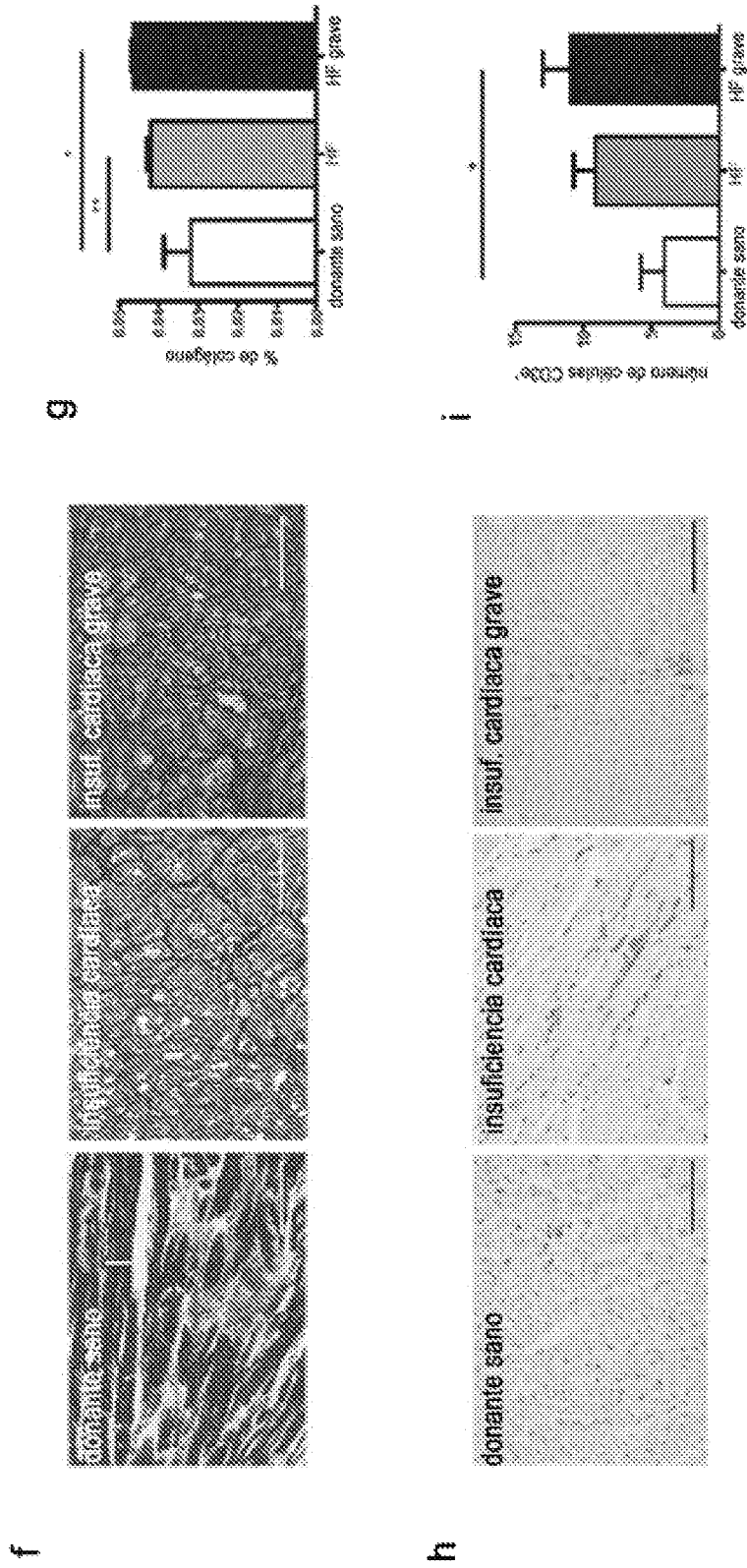
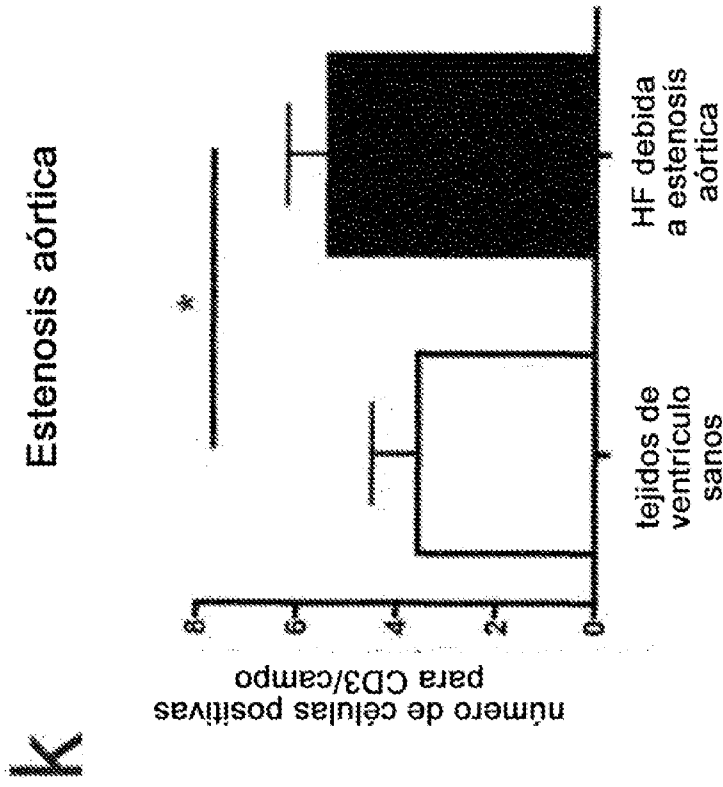


Fig. 3 (3/4)



**k**

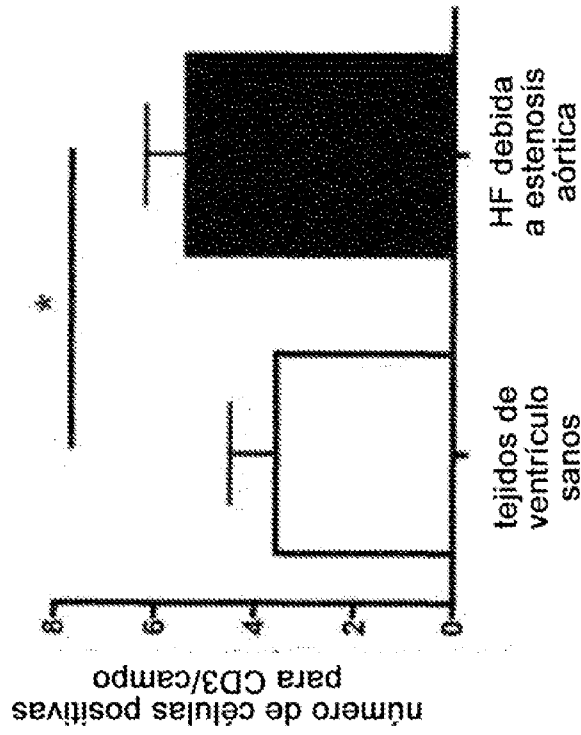


Fig. 3 (4/4)

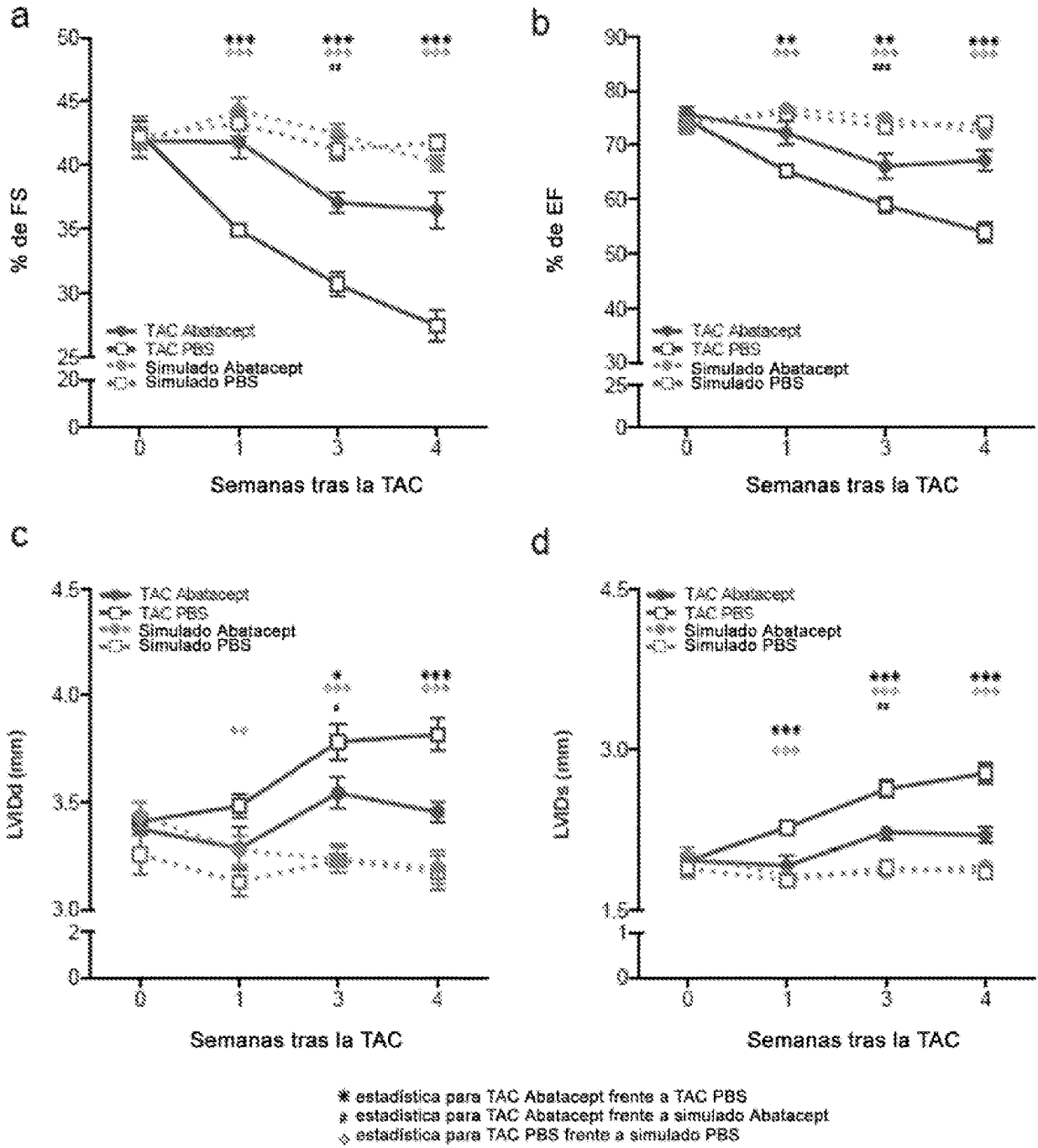
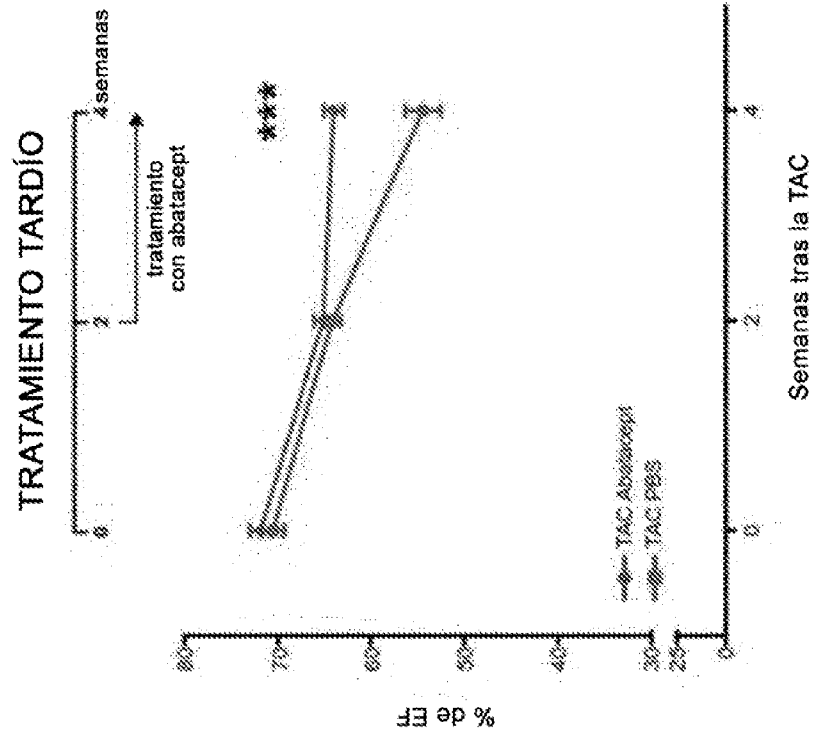


Fig. 4 (1/3)



h



g

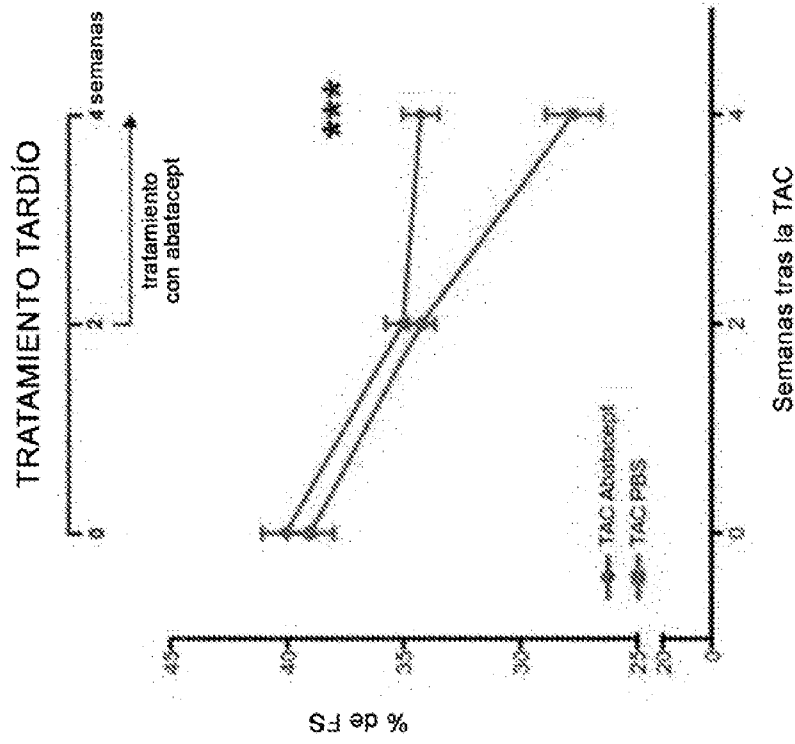


Fig. 4 (3/3)

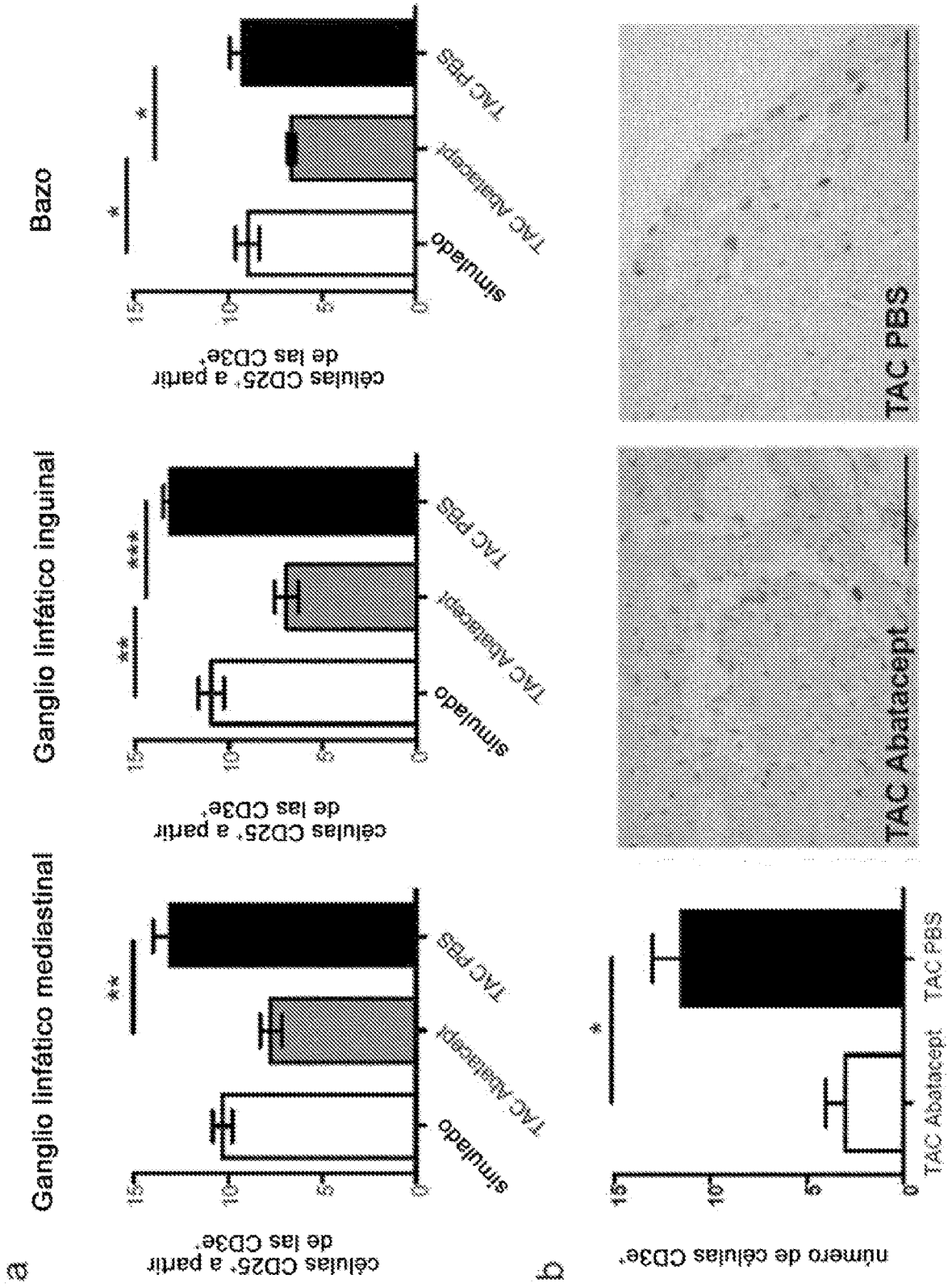


Fig. 5 (1/3)

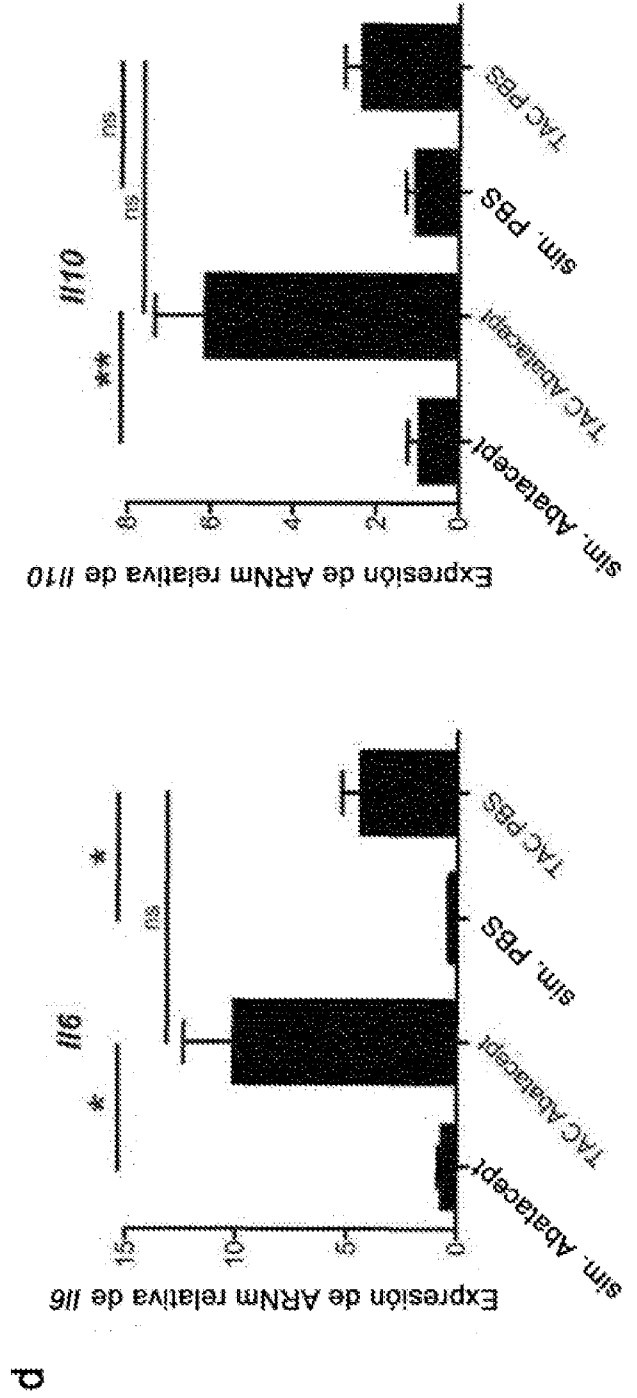
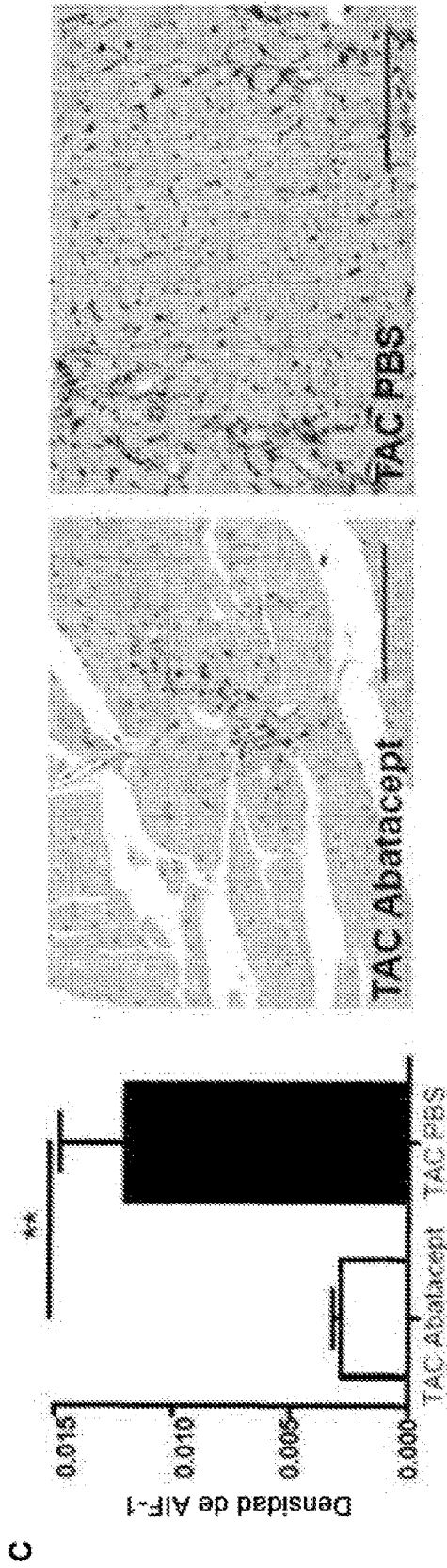


Fig. 5 (2/3)

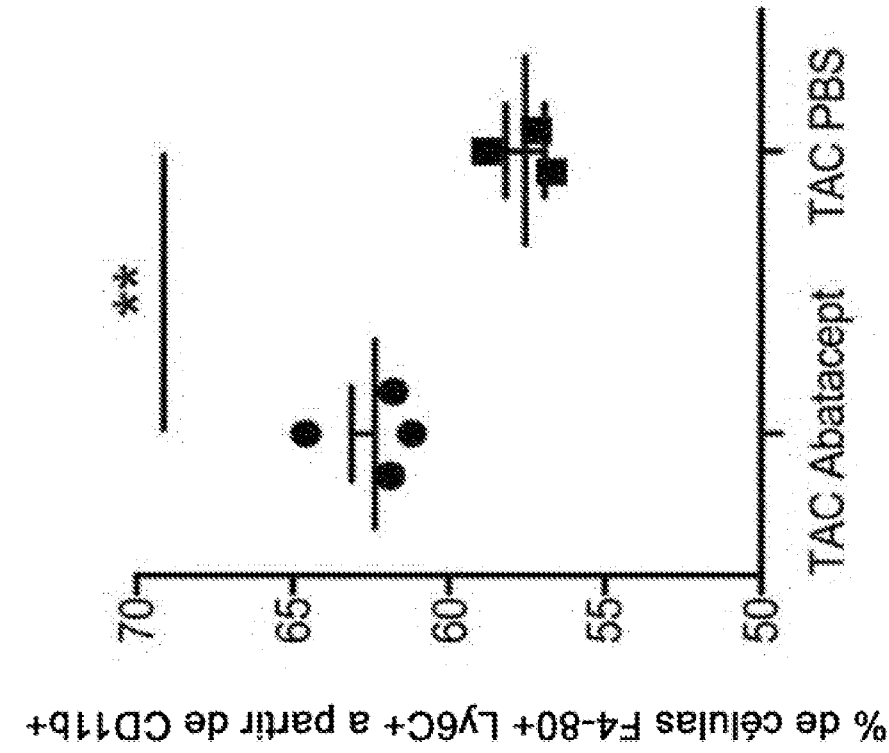
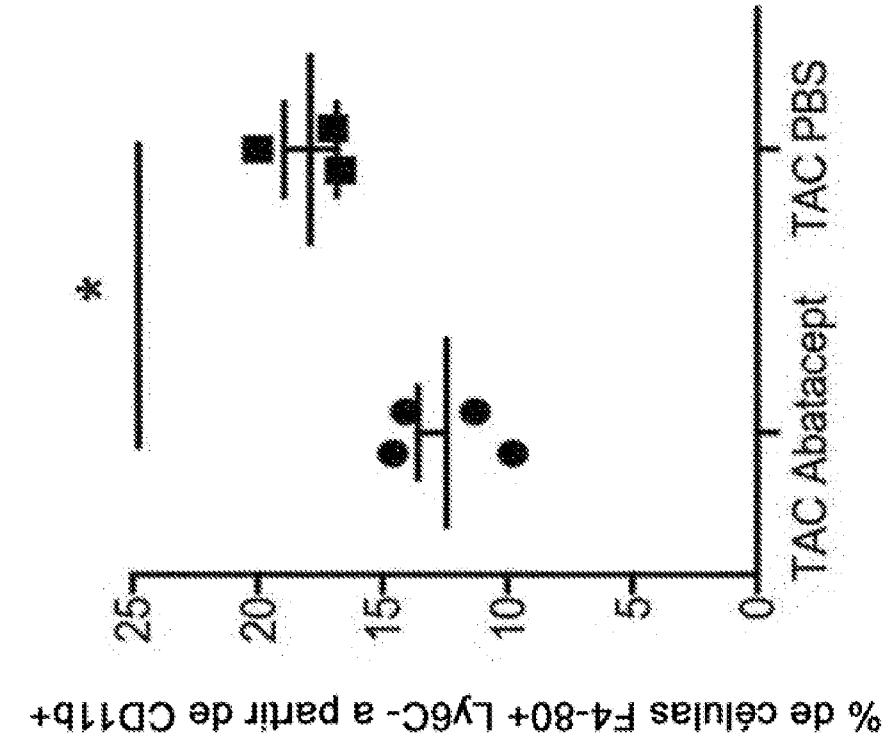


Fig. 5 (3/3)

a

### IHC para células T

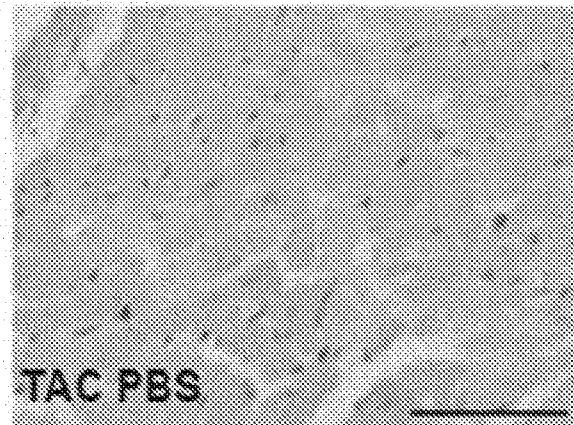
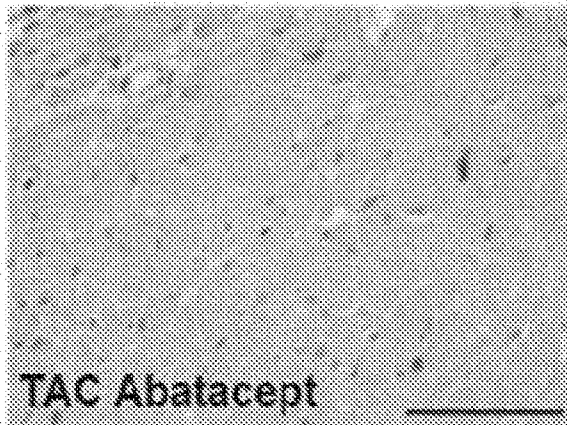
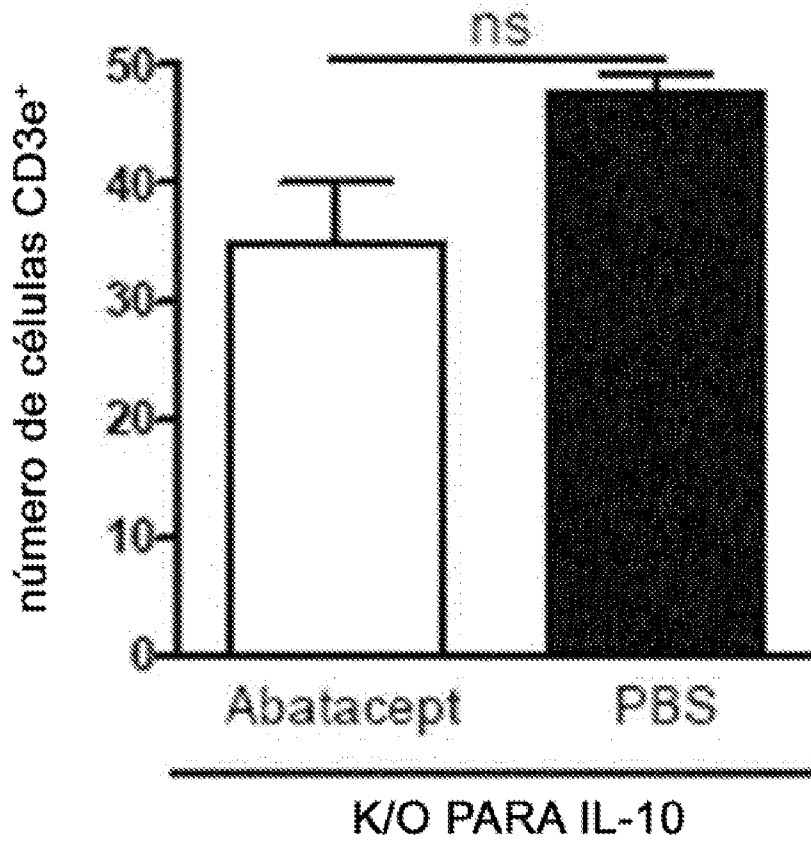


Fig. 6 (1/5)

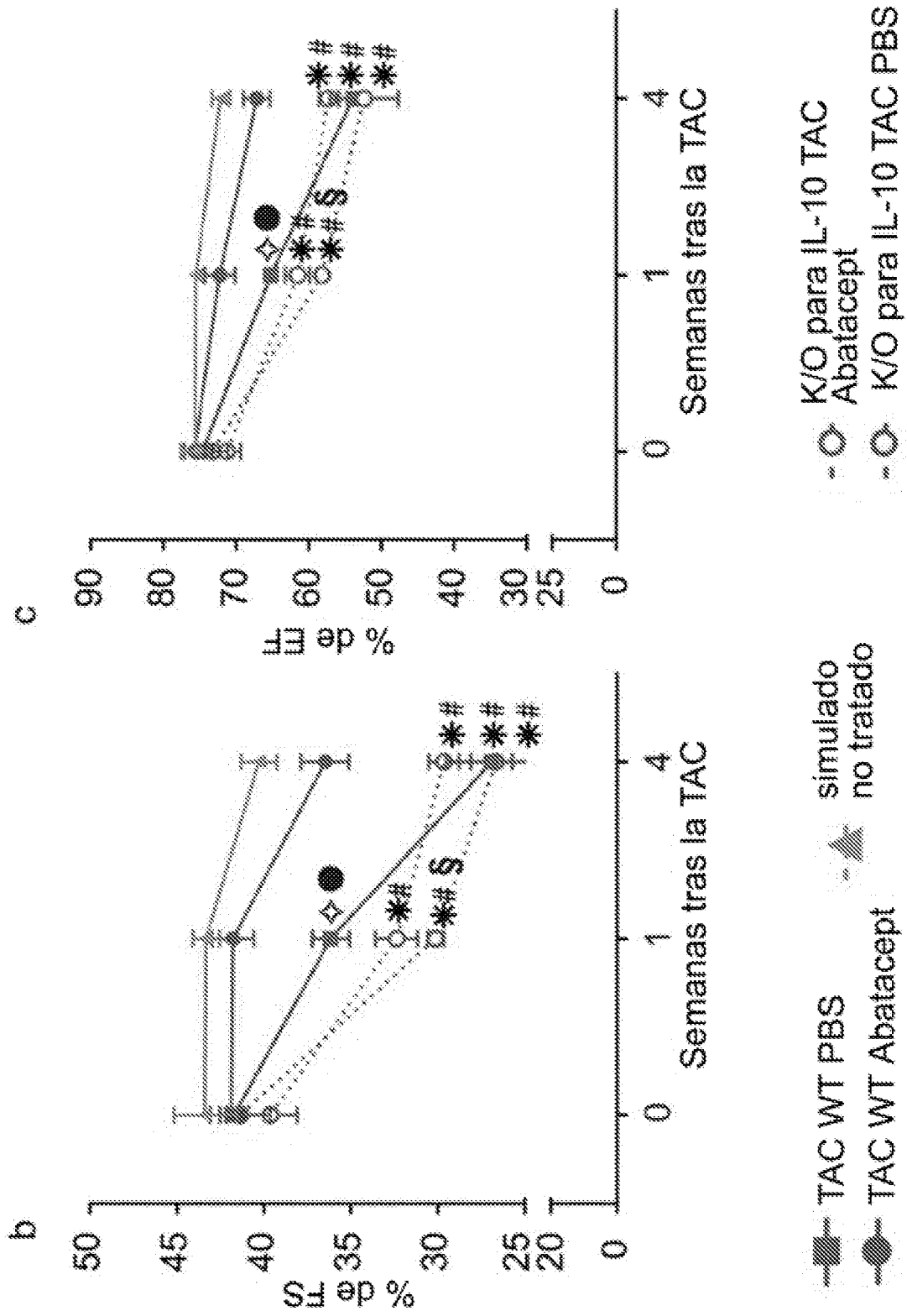


Fig. 6 (2/5)

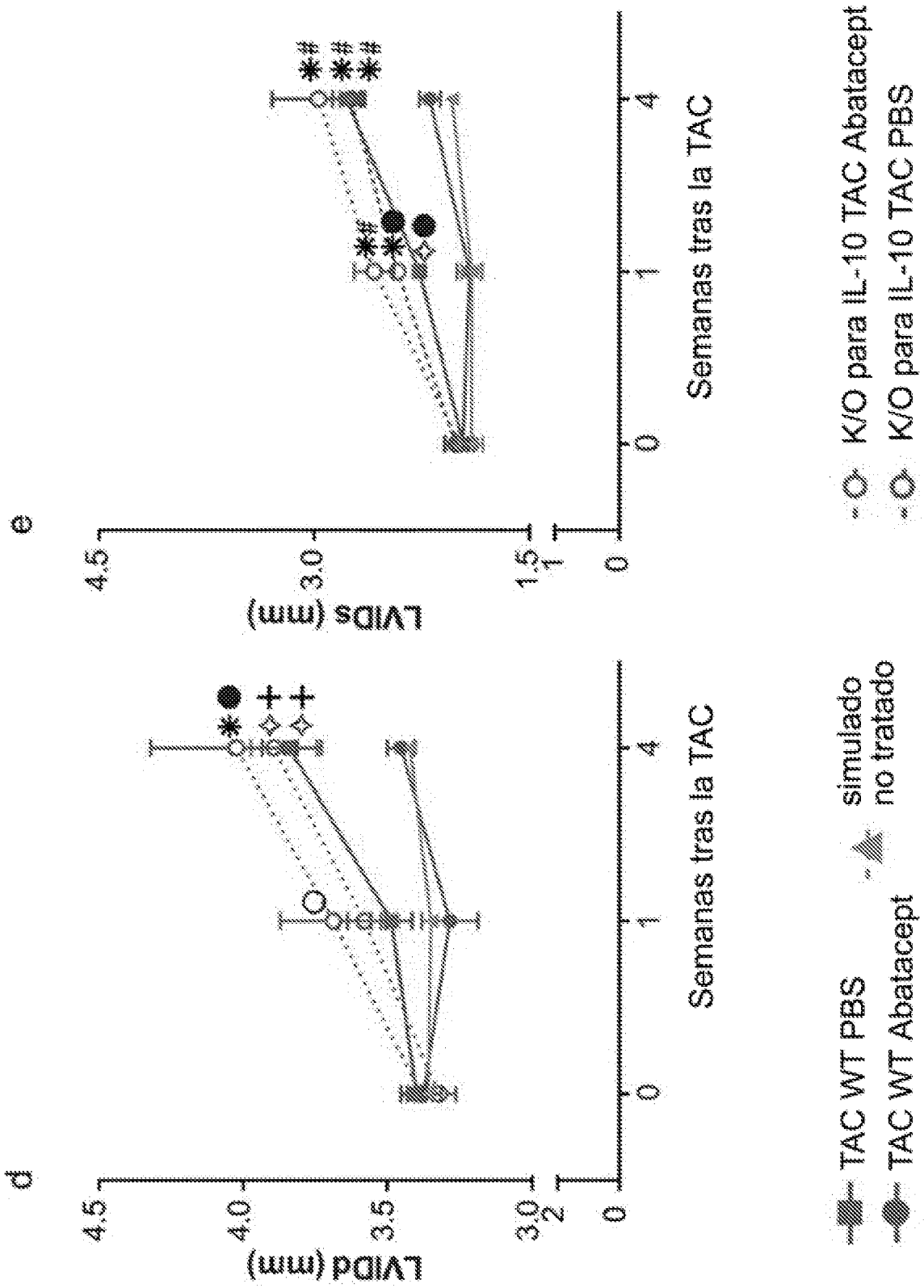


Fig. 6 (3/5)

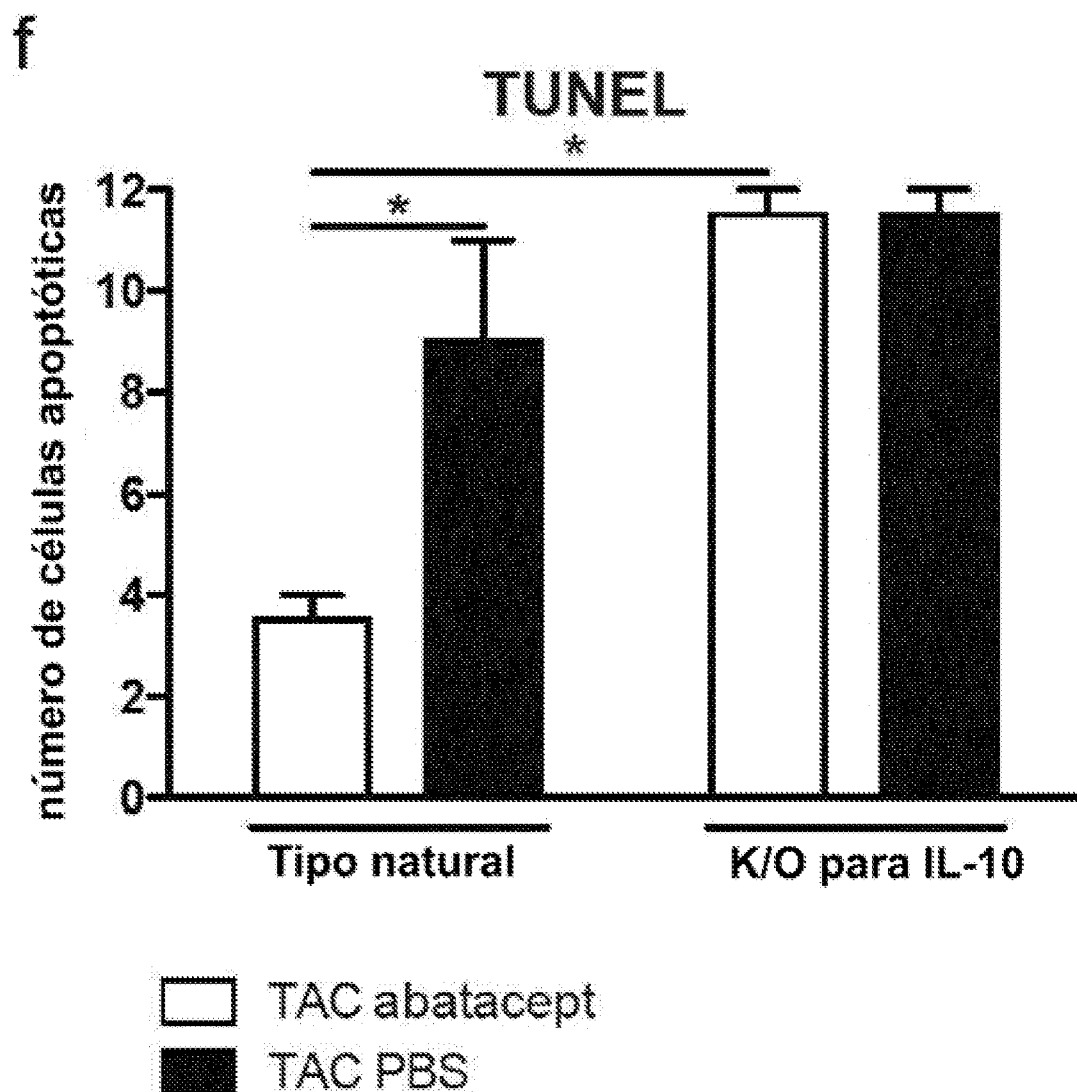


Fig. 6 (4/5)

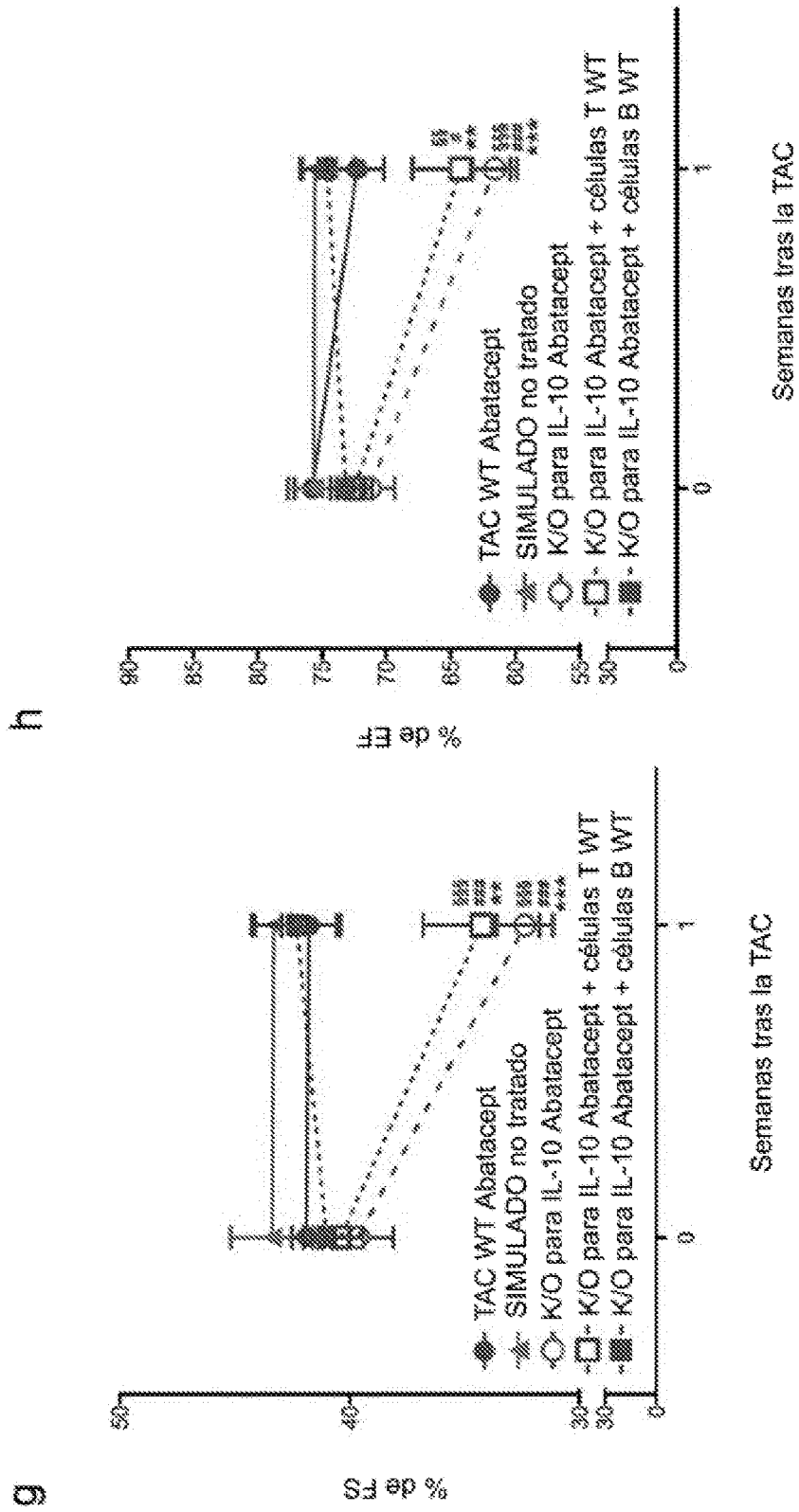


Fig. 6 (5/5)

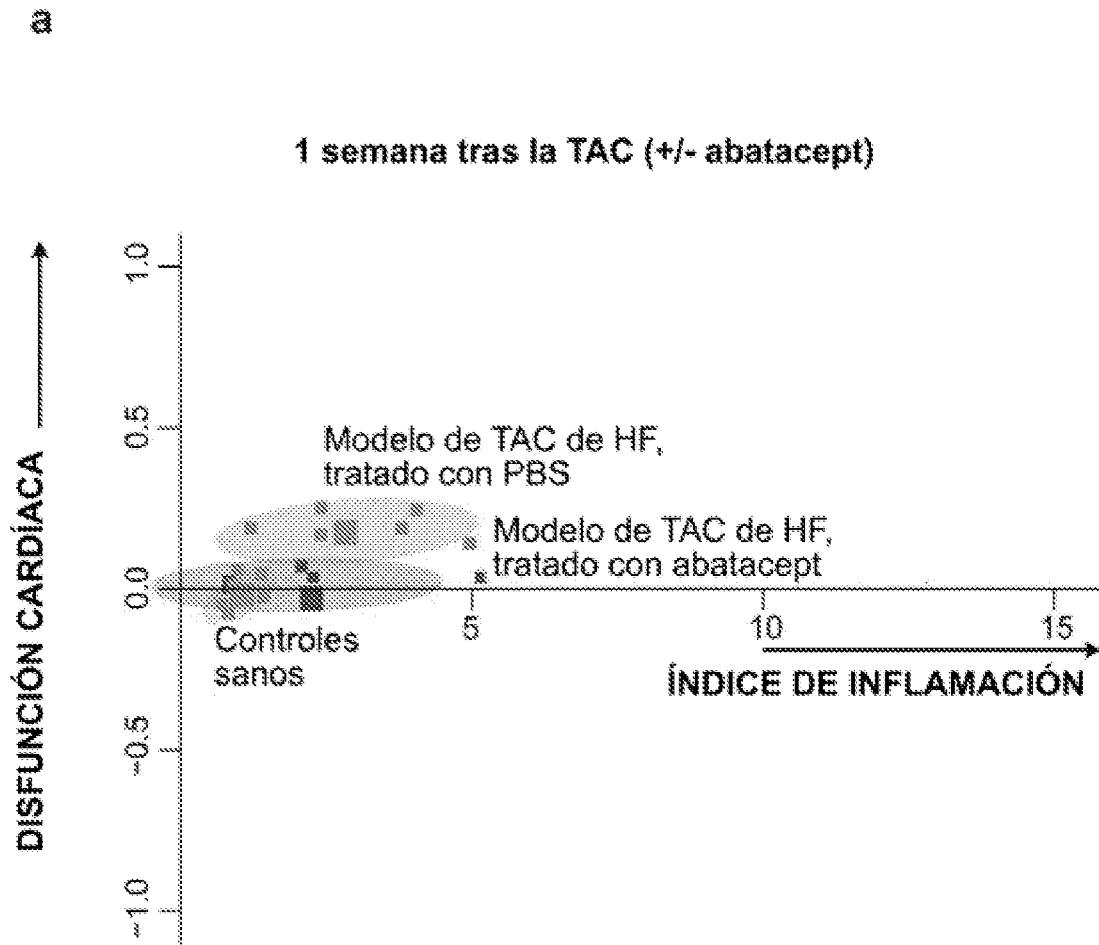


Fig. 7 (1/3)

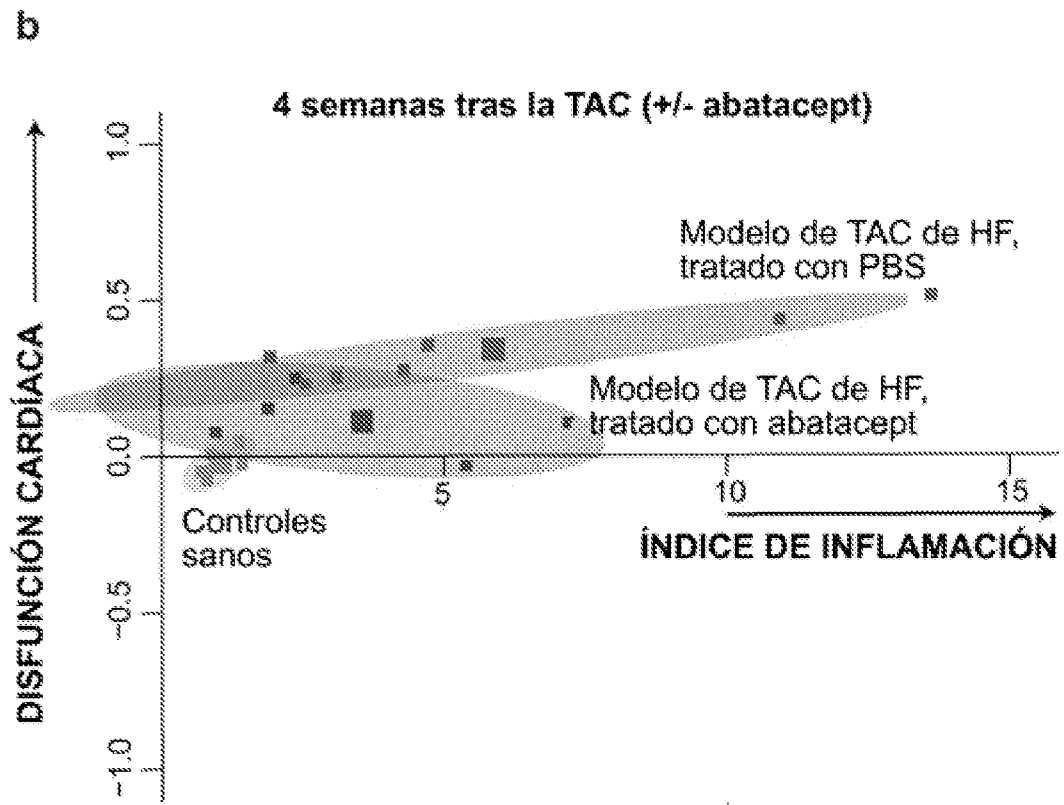


Fig. 7 (2/3)

C

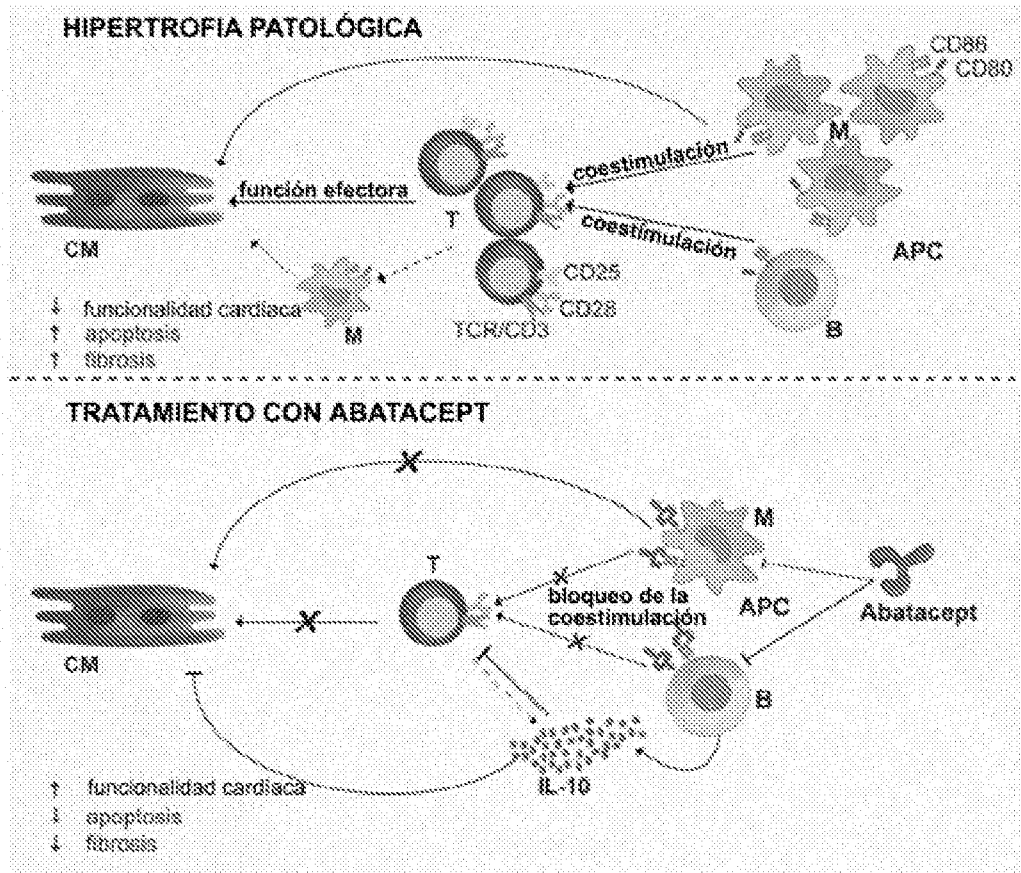


Fig. 7 (3/3)

a

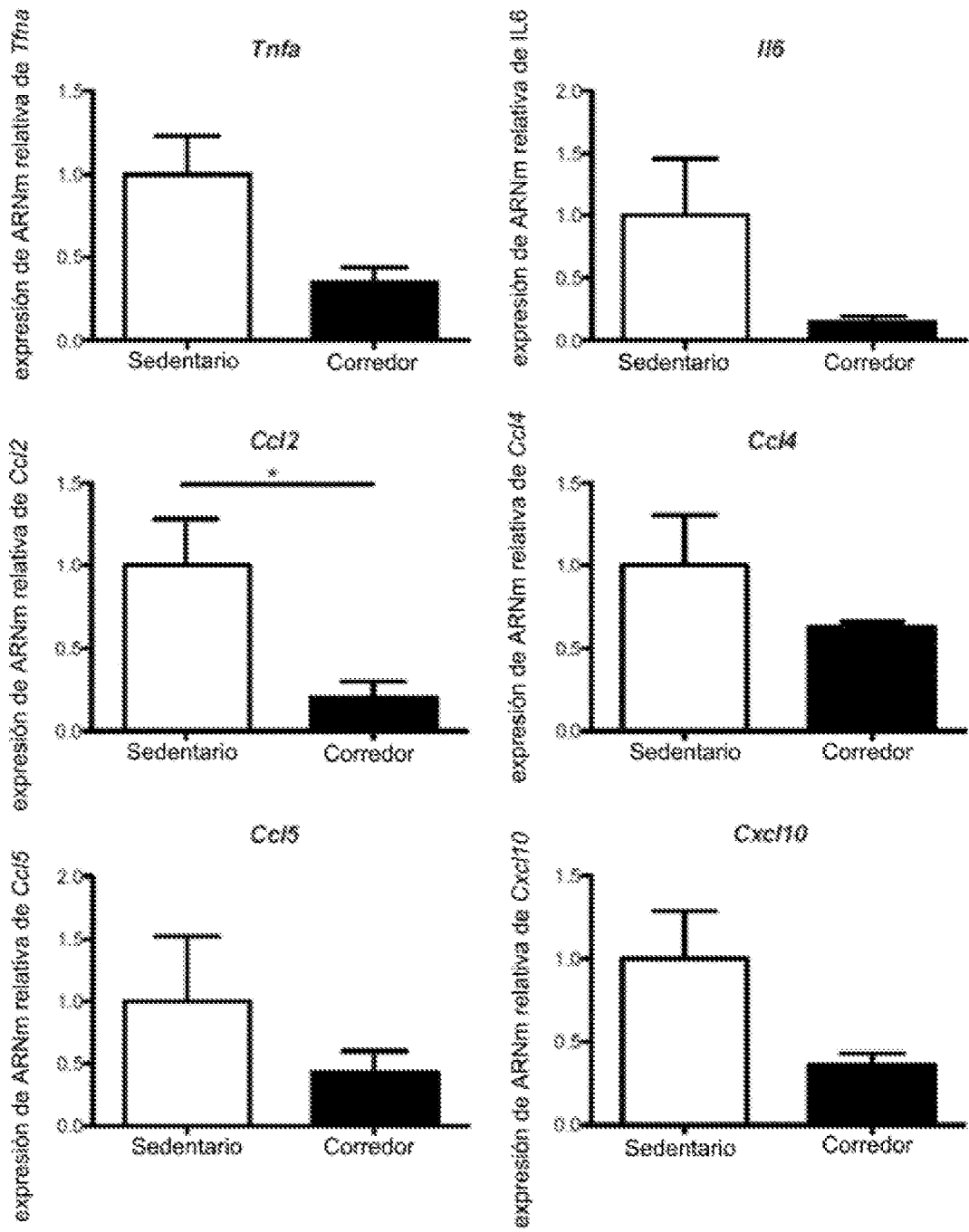


Fig. 8a (1/4)

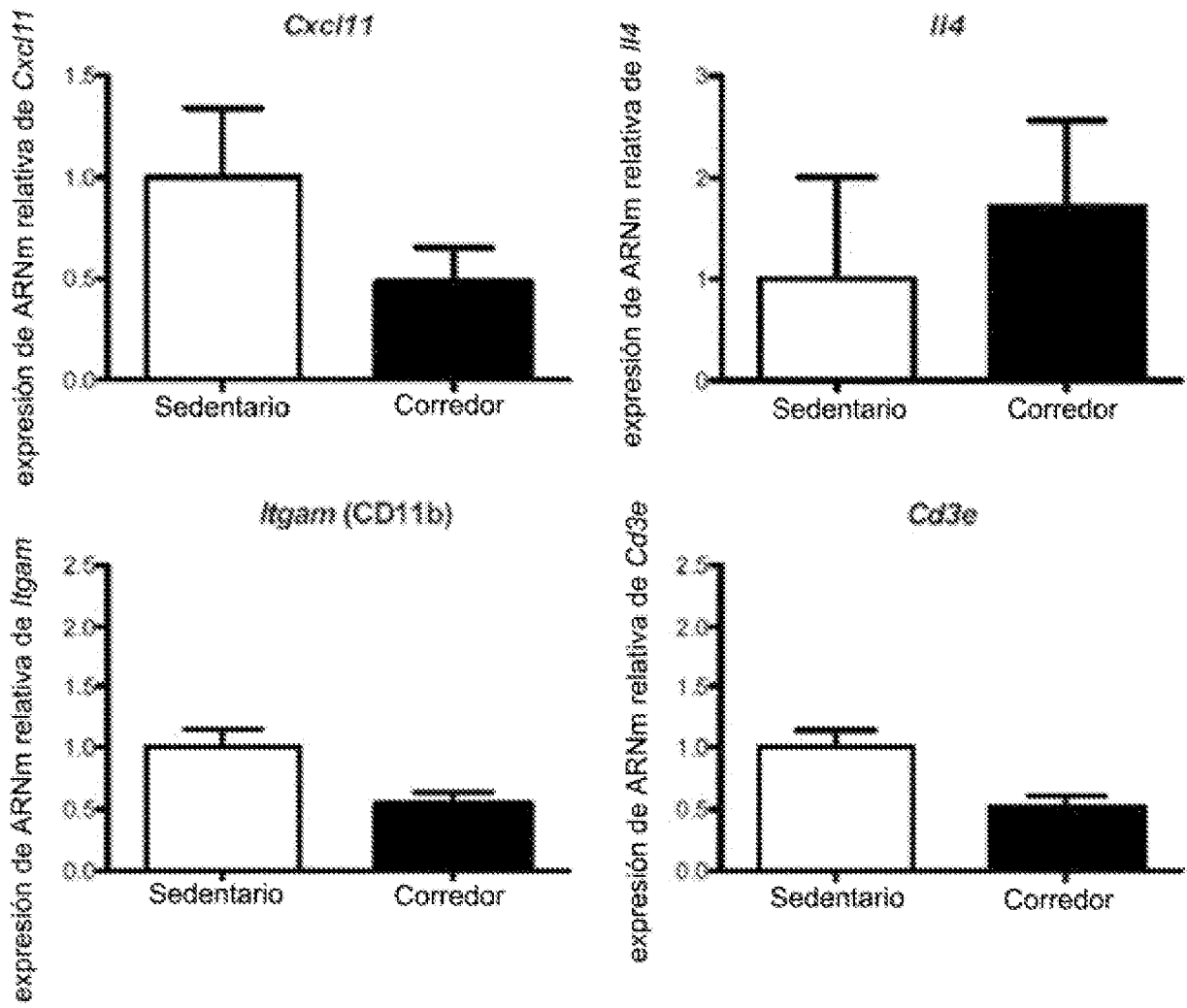


Fig. 8a (2/4)

**b**

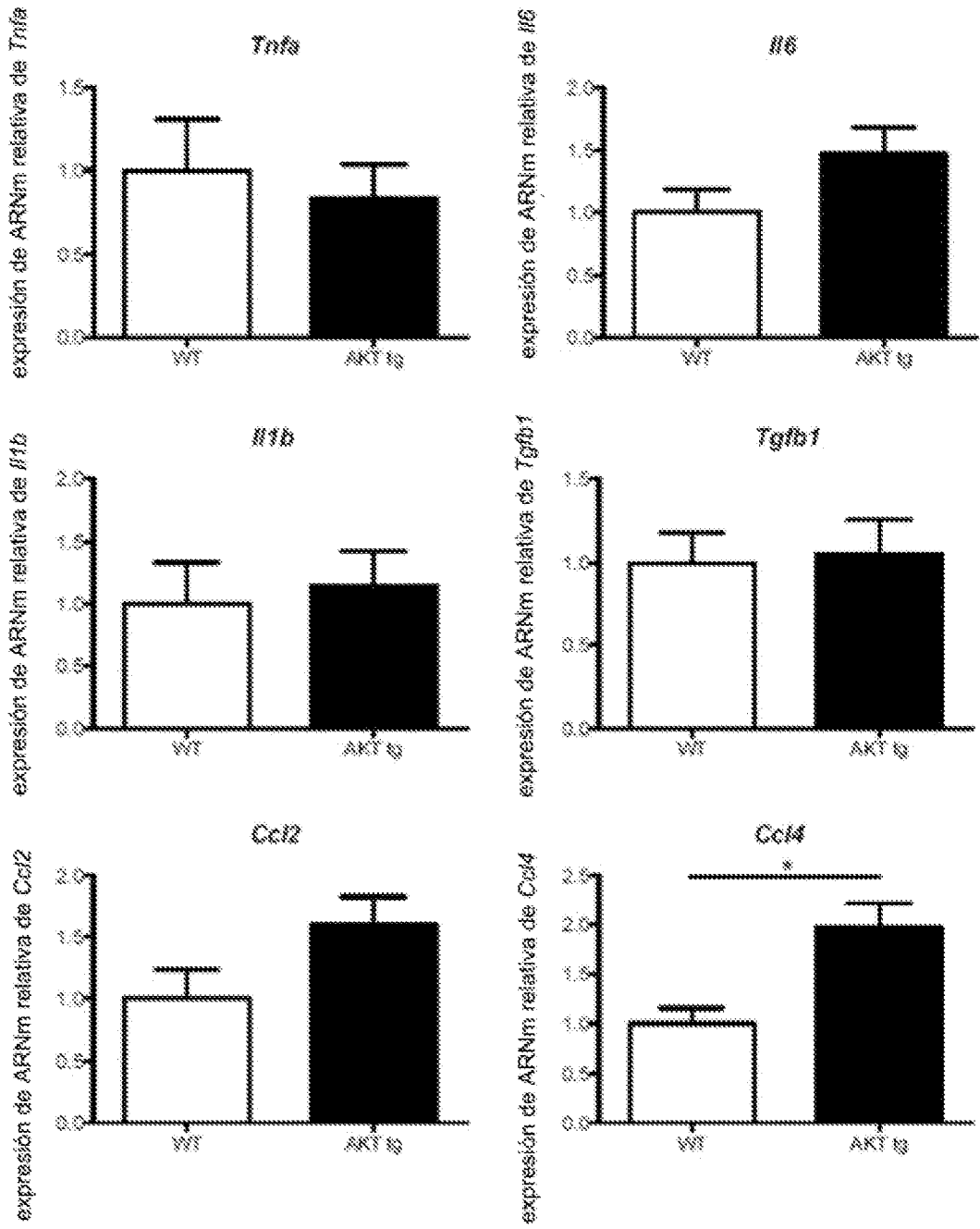


Fig. 8b (3/4)

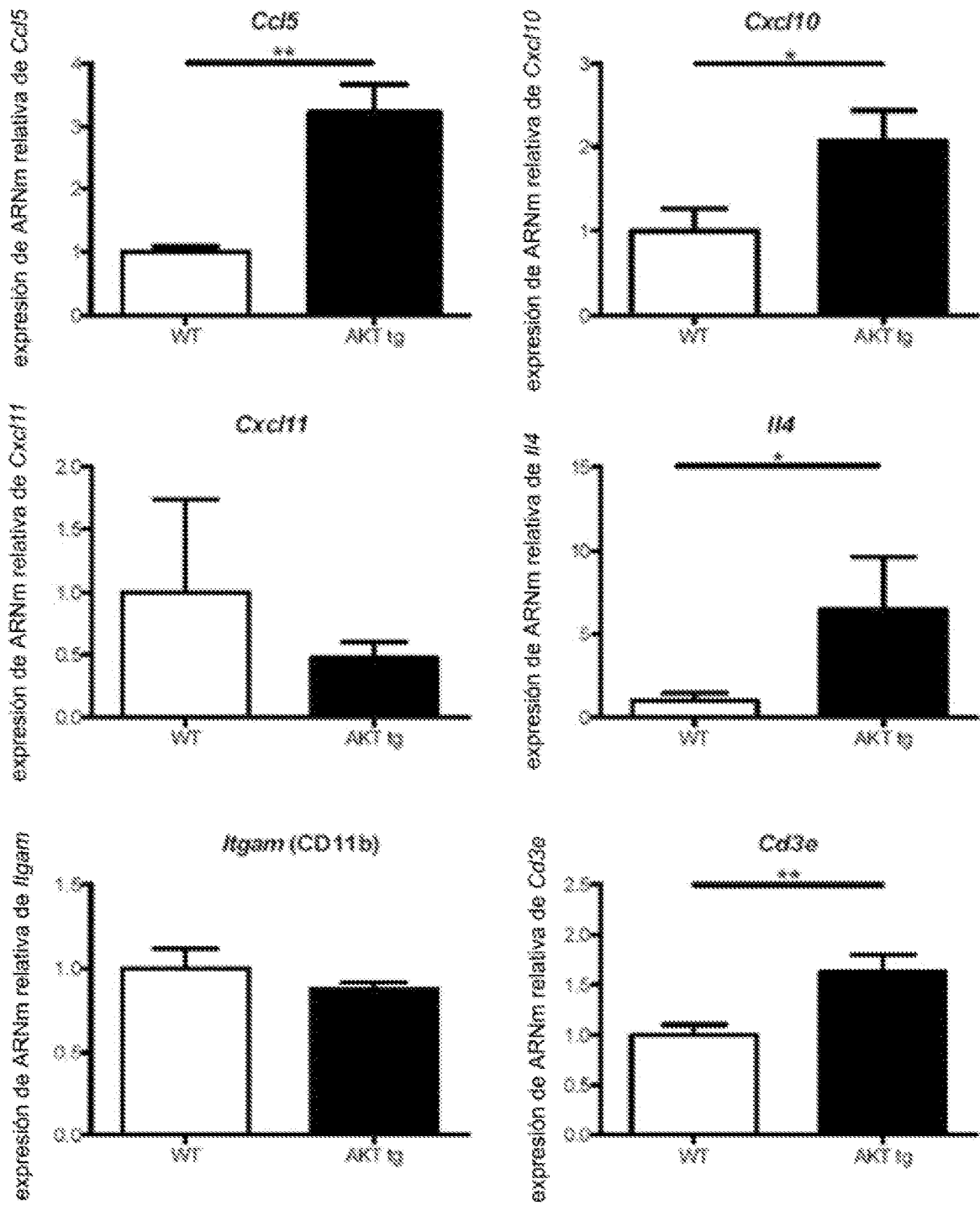


Fig. 8b (4/4)

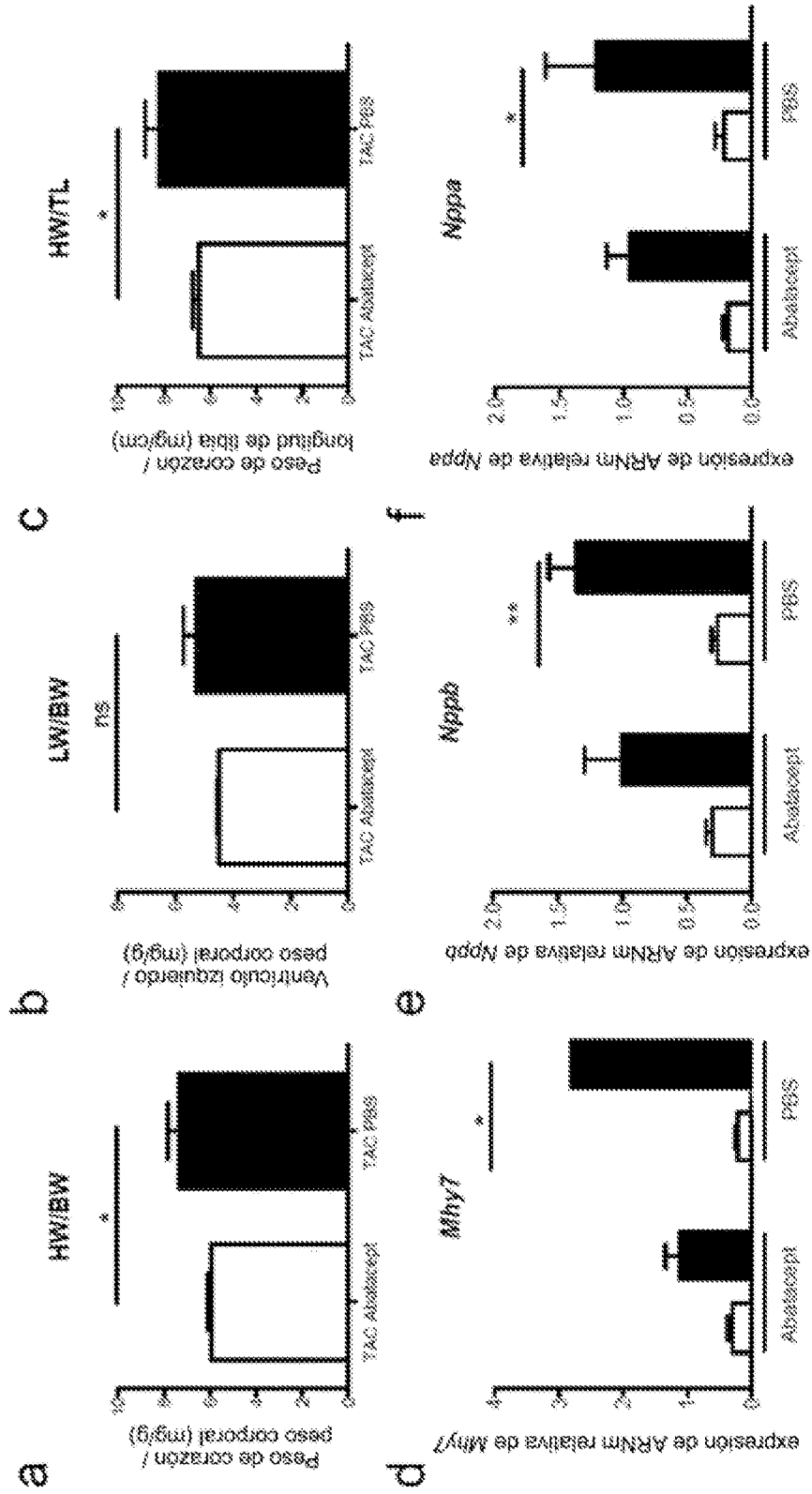


Fig. 9

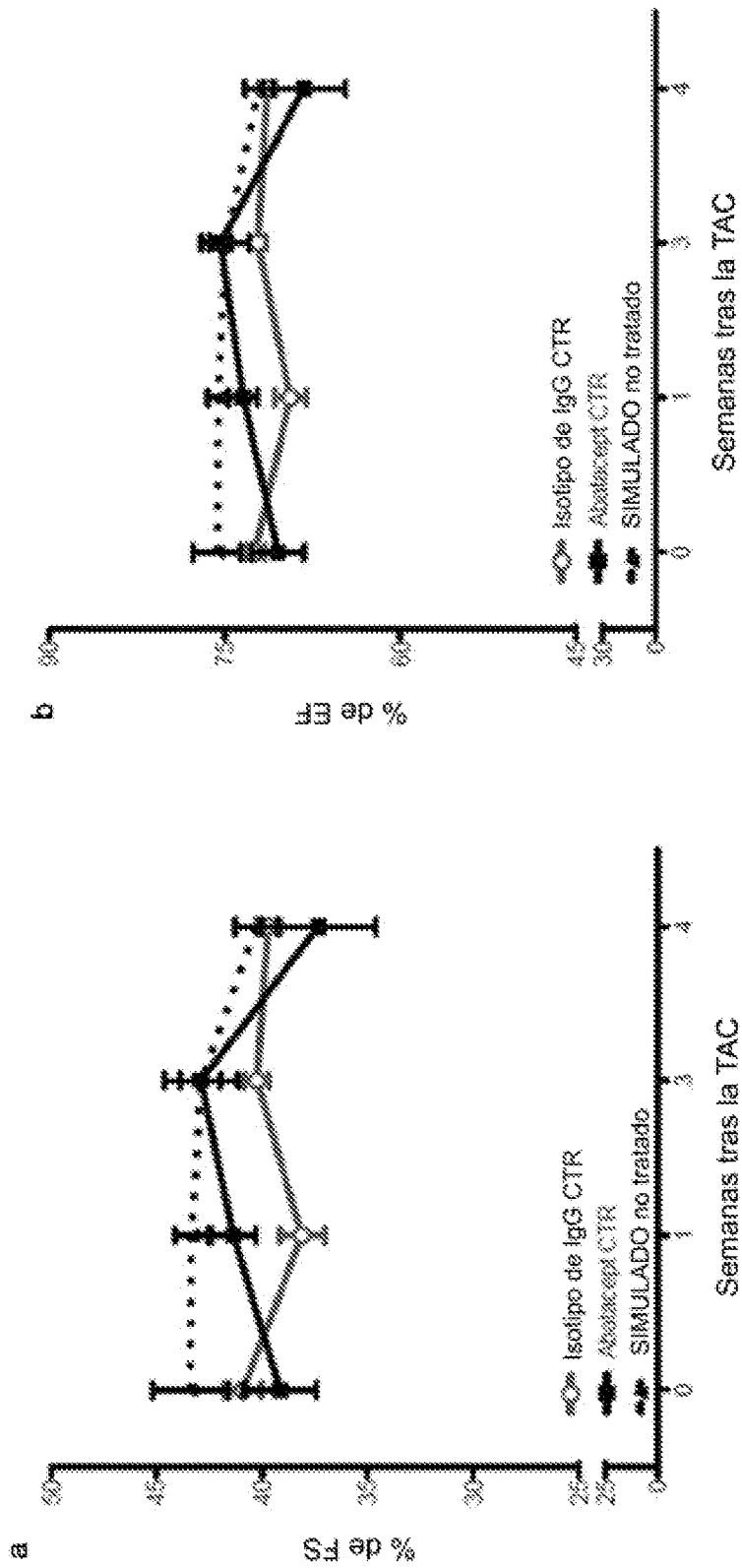


Fig. 10 (1/4)

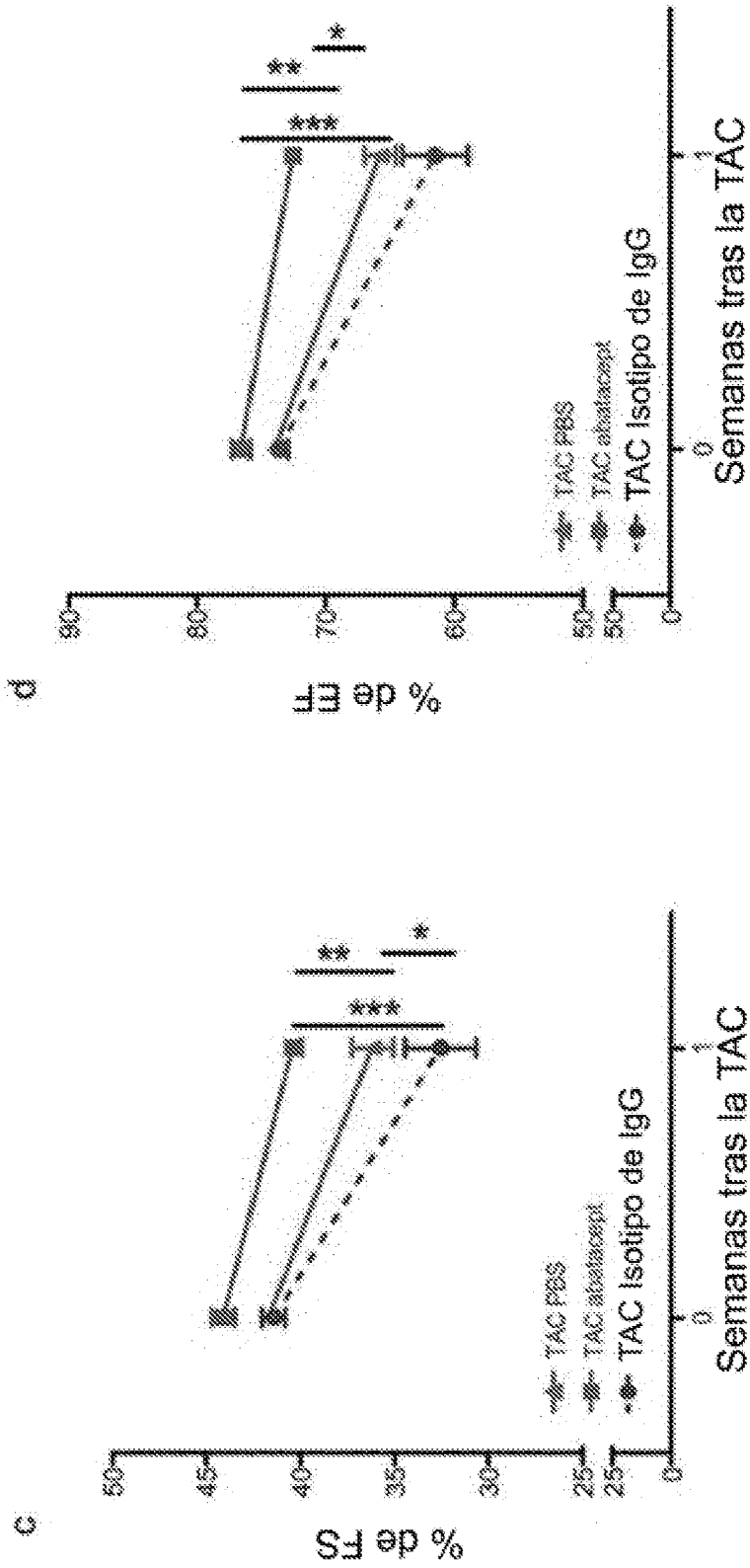


Fig. 10 (2/4)

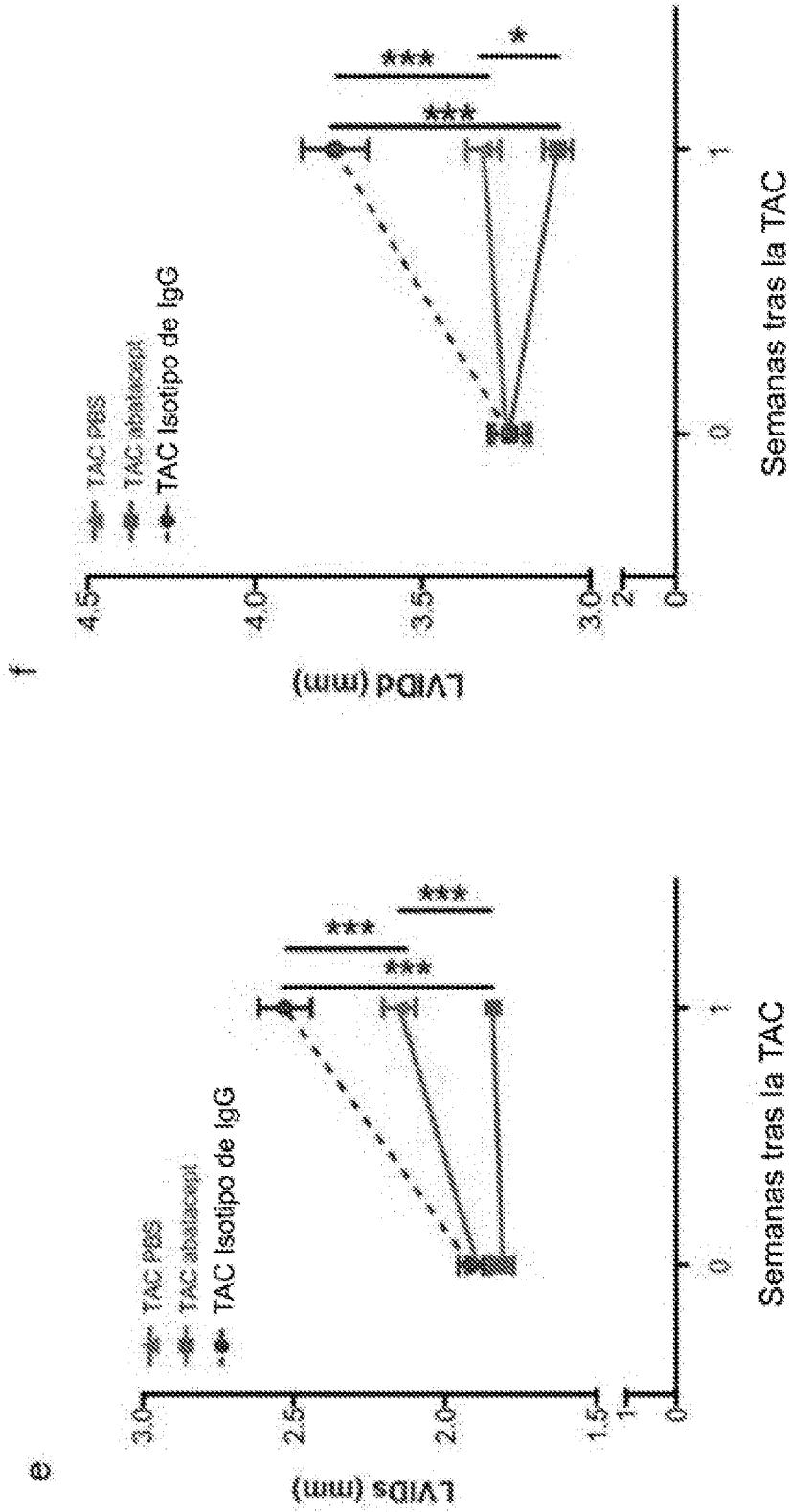


Fig. 10 (3/4)

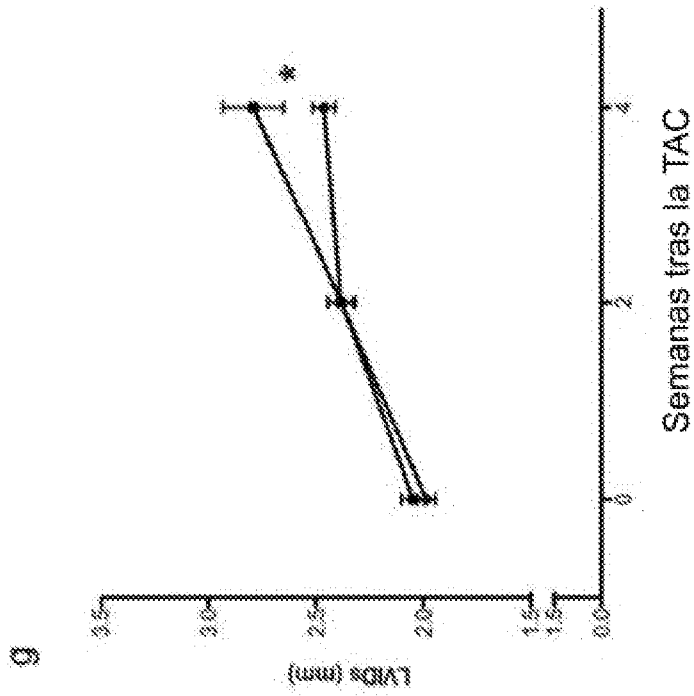
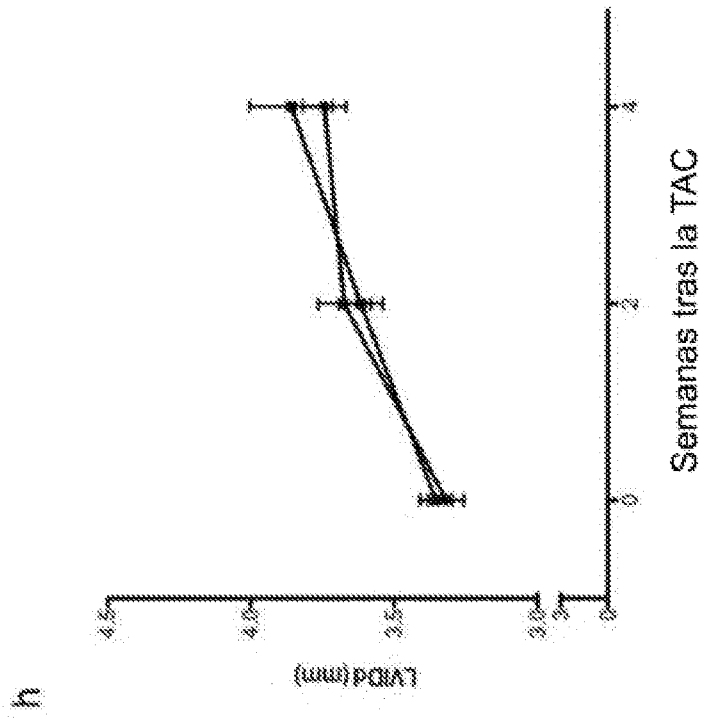


Fig. 10 (4/4)

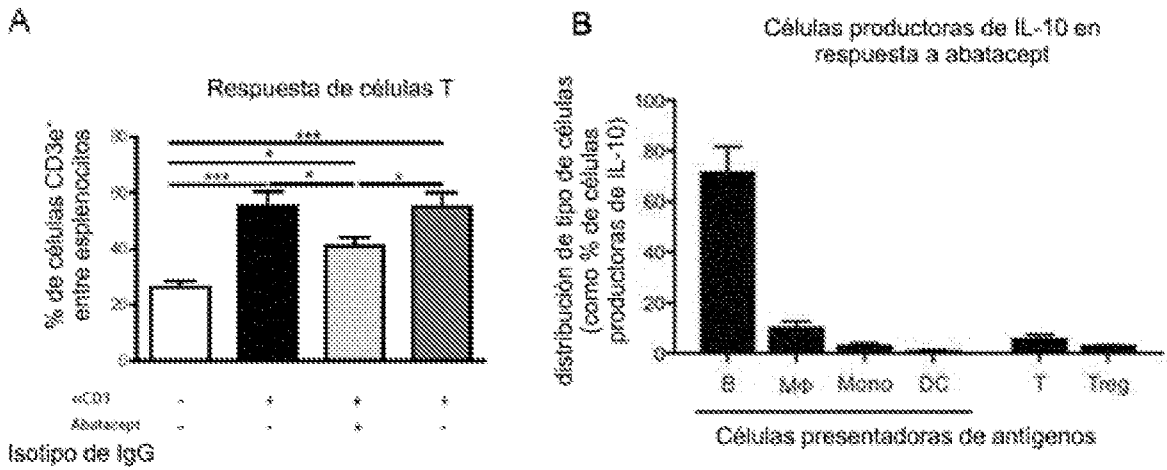


Fig. 11

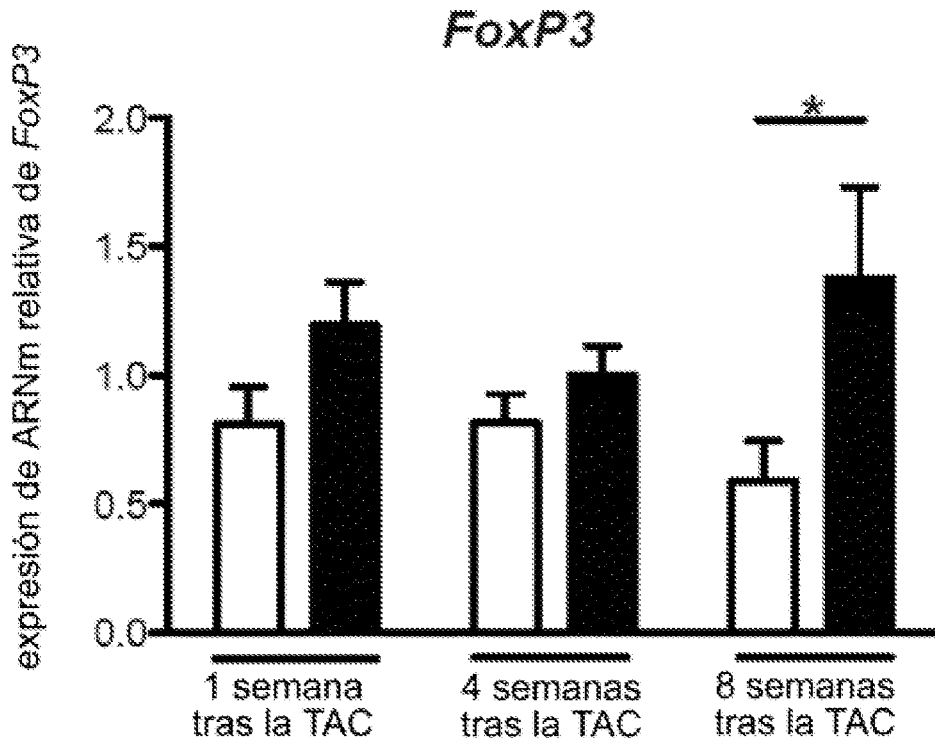


Fig. 12

### Regresión lineal de IL-6 / CD3e

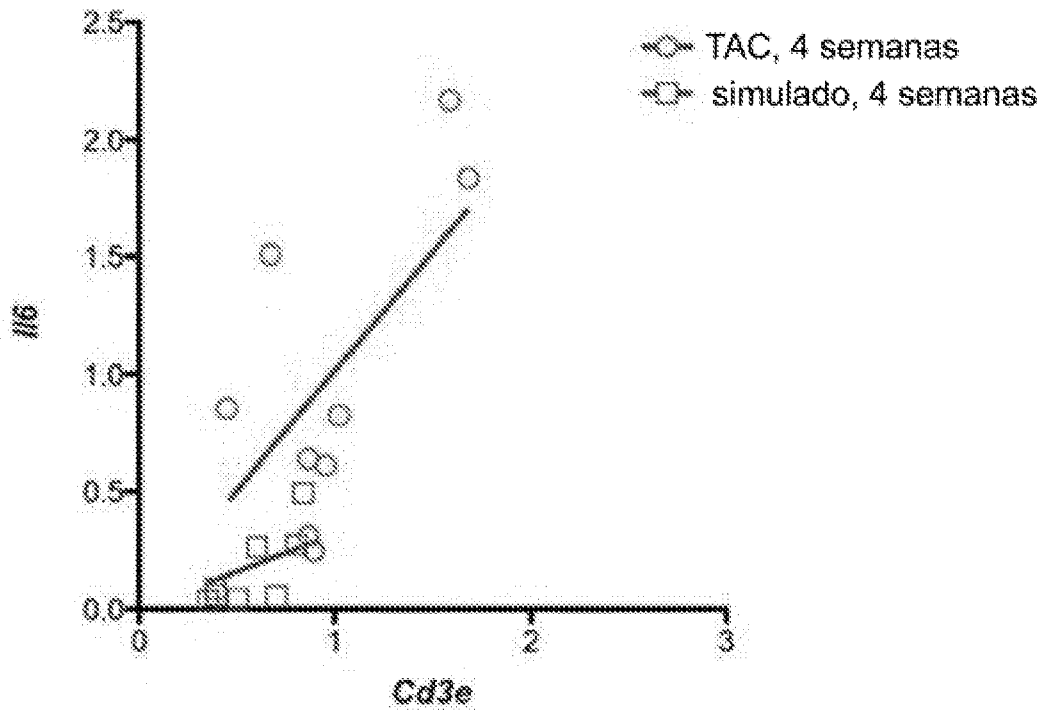


Fig. 13

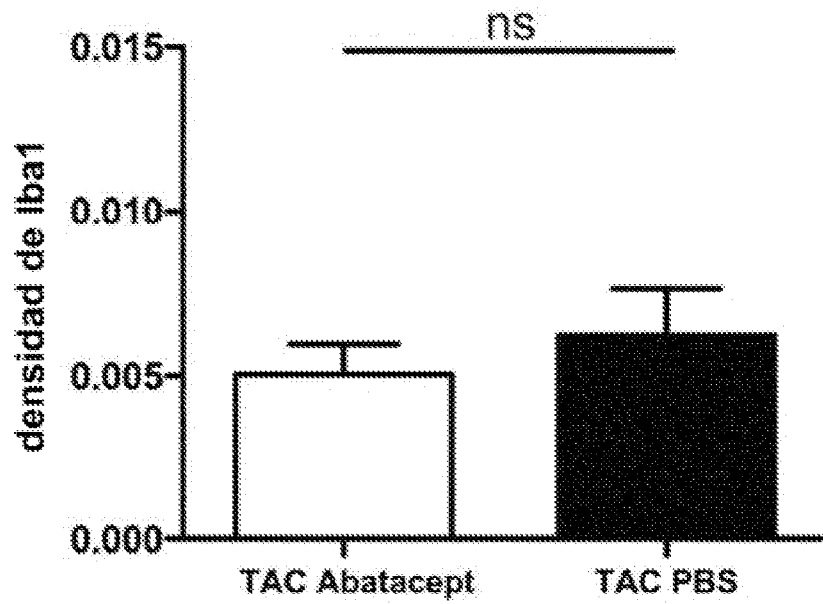
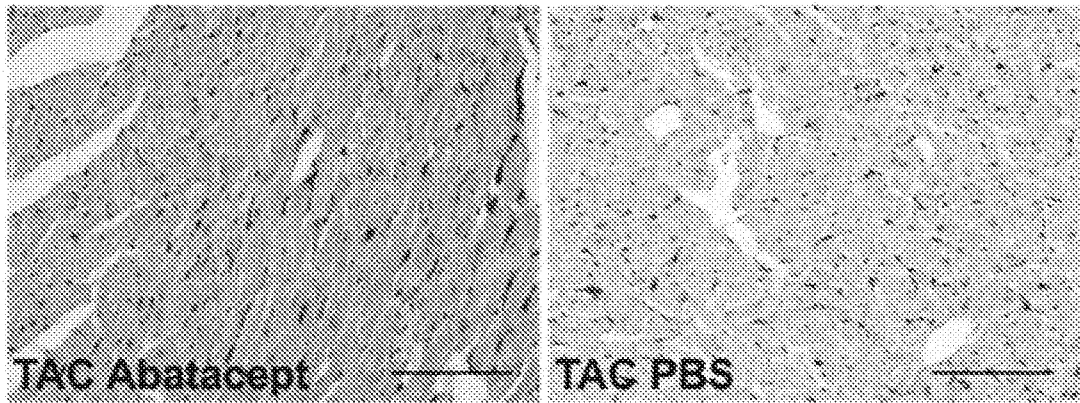


Fig. 14

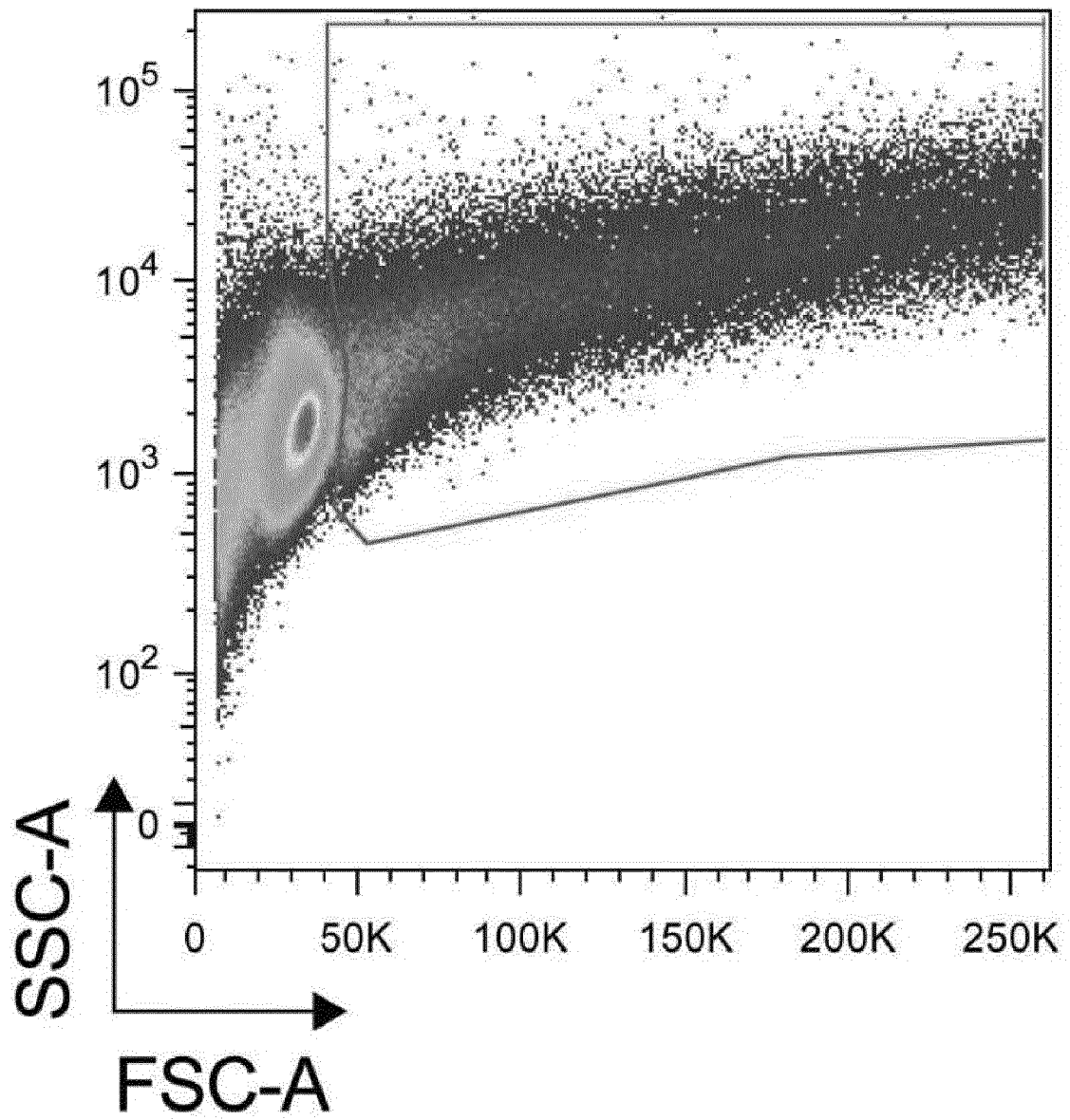


Fig. 15 (1/6)

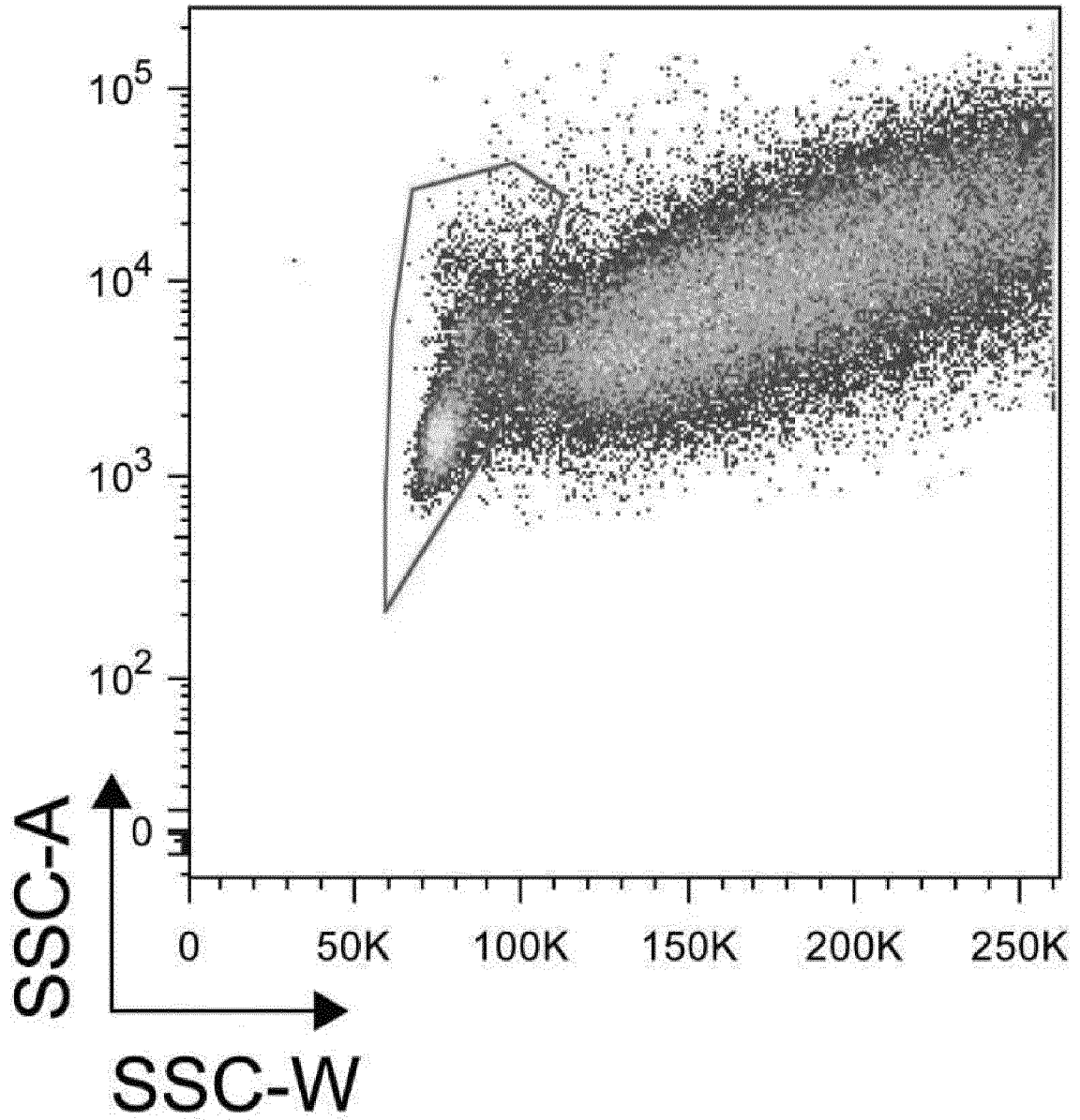


Fig. 15 (2/6)

## células individuales

---

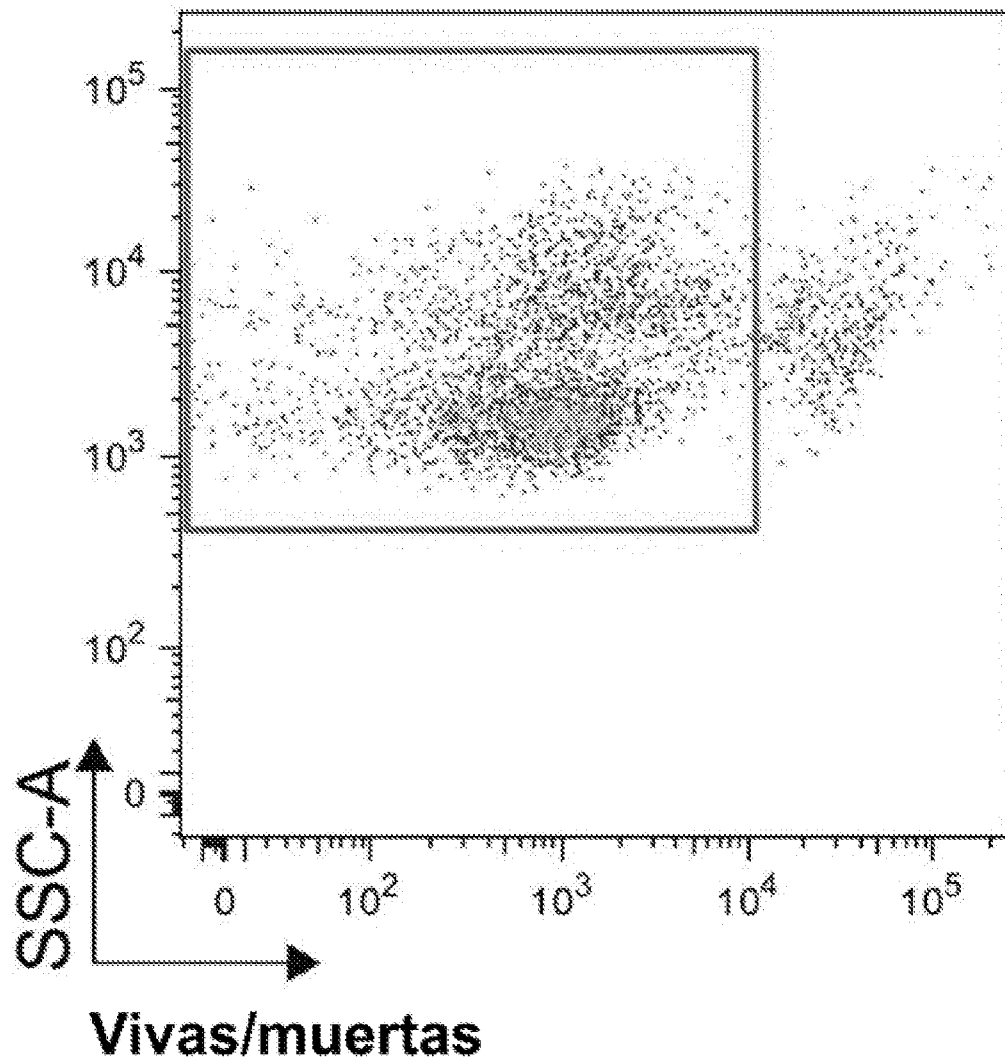


Fig. 15 (3/6)

# células vivas

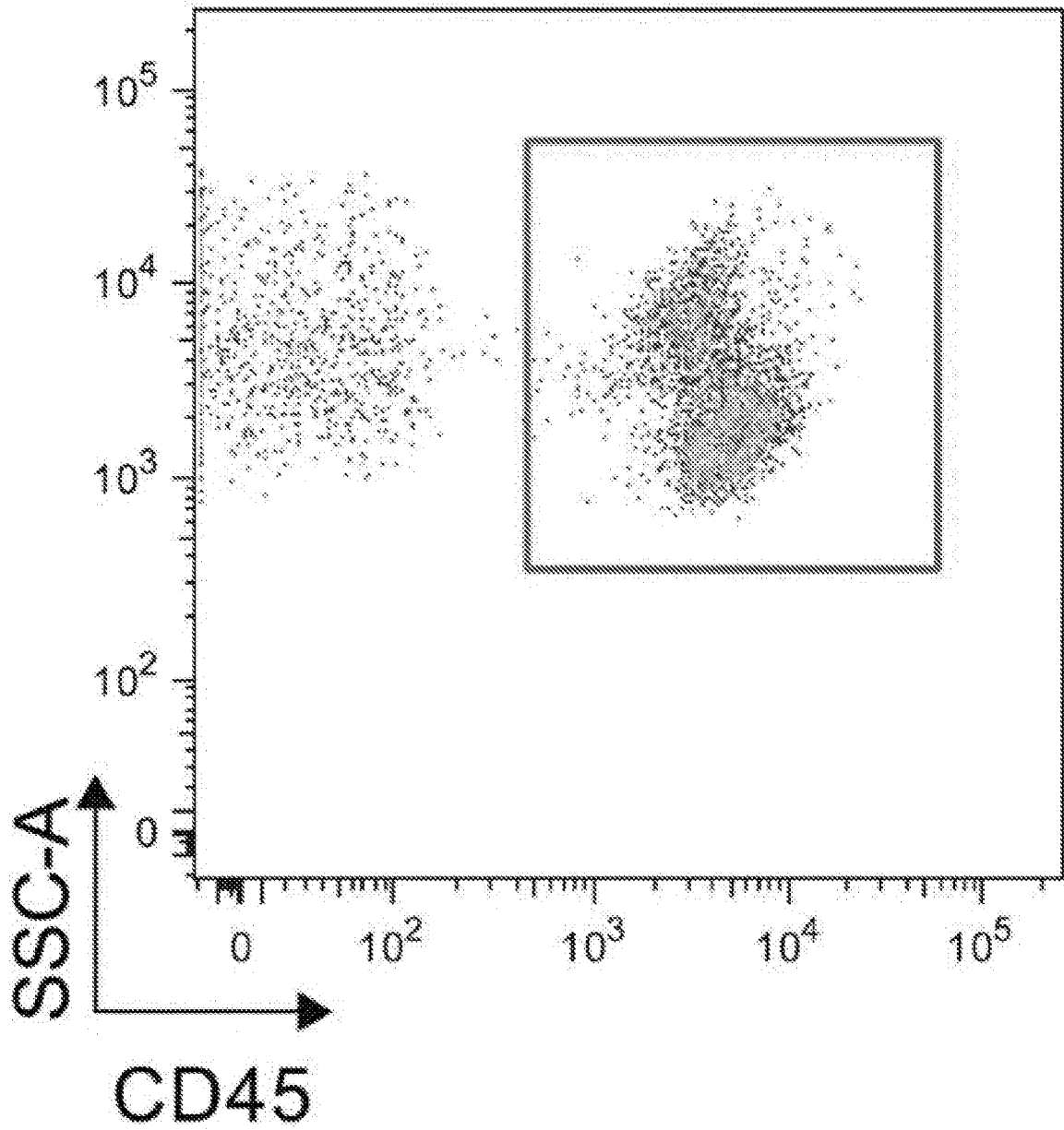


Fig. 15 (4/6)

CD45<sup>+</sup>

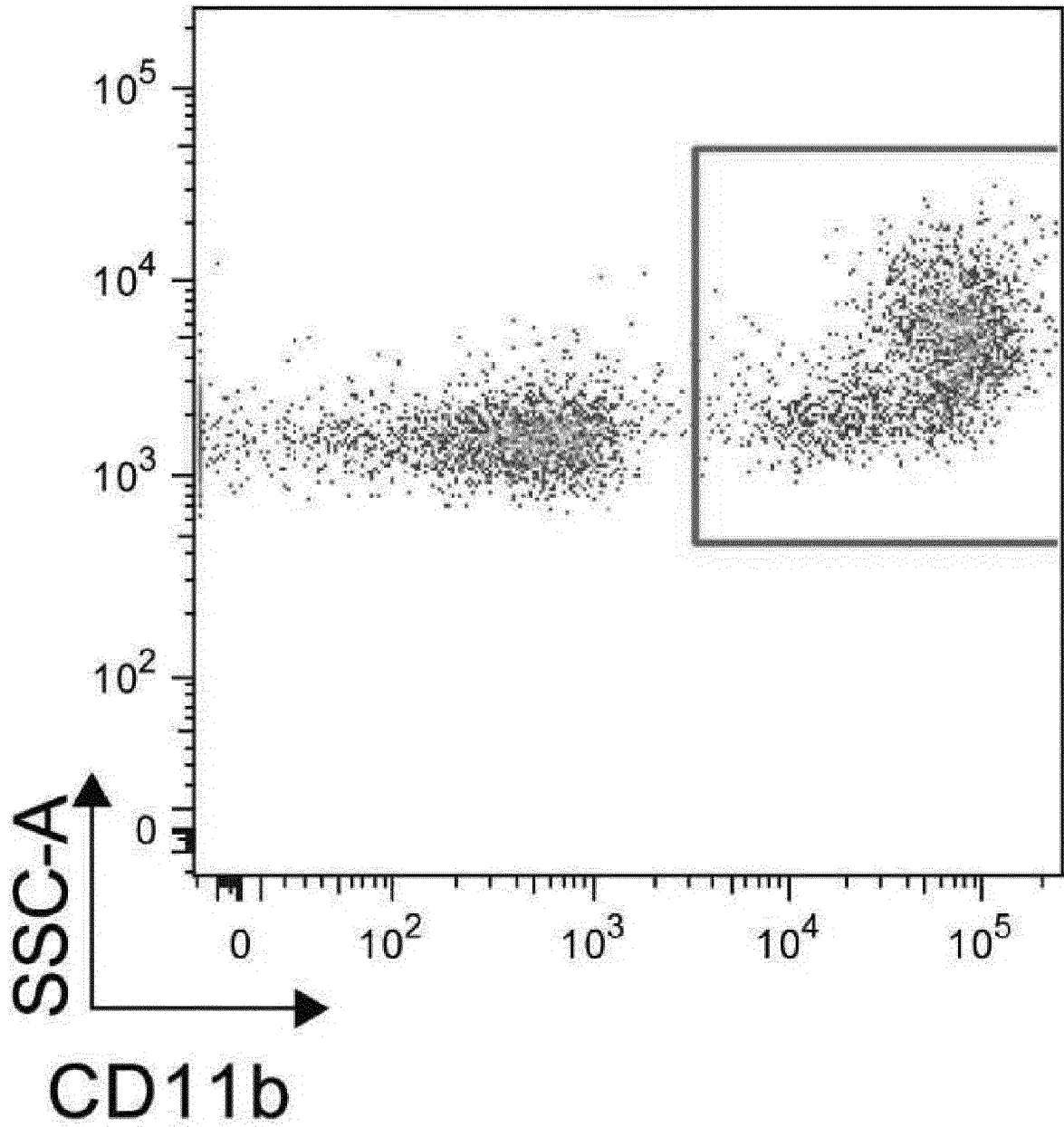


Fig. 15 (5/6)

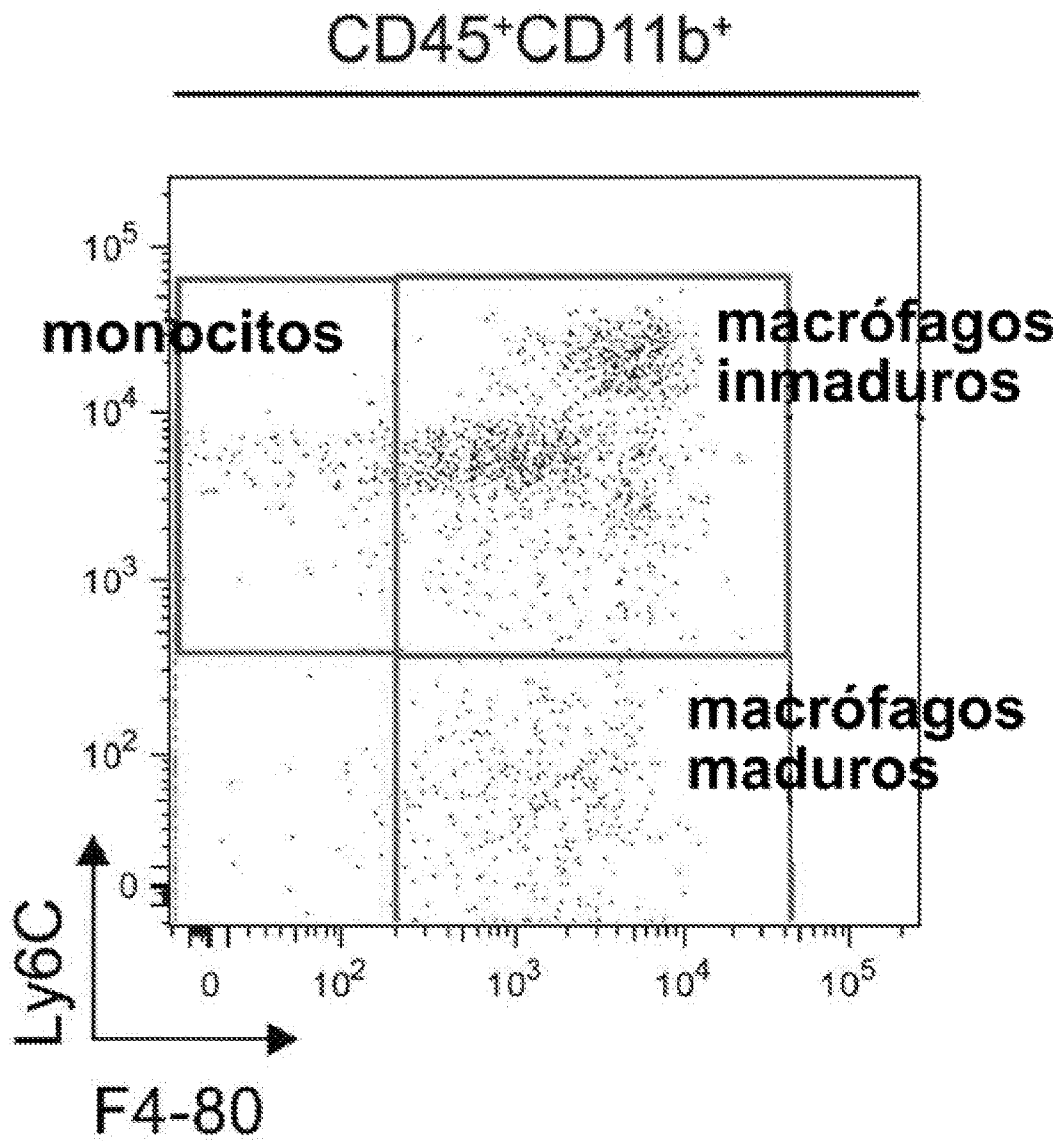


Fig. 15 (6/6)

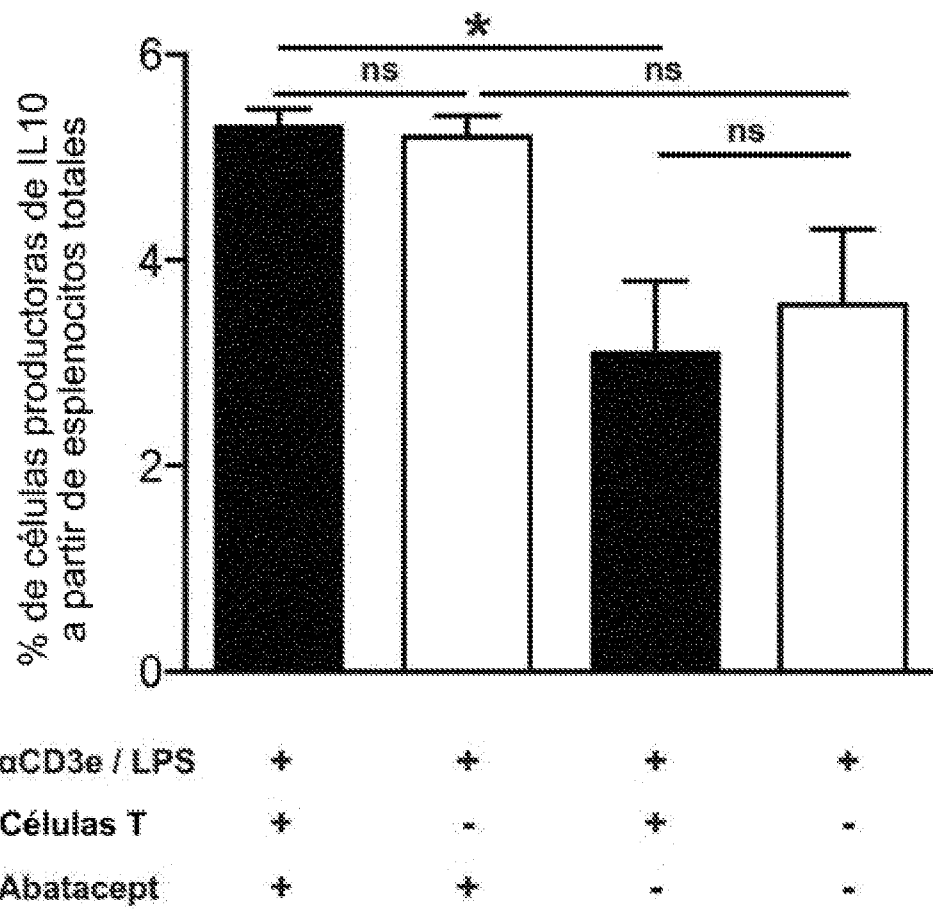


Fig. 16