

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 803**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2007 E 09012826 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2135949**

54 Título: **Ácidos nucleicos de unión a MCP-1**

30 Prioridad:

14.02.2006 EP 06002935

22.11.2006 EP 06024202

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**NOXXON PHARMA AG (100.0%)
MAX-DOHRN-STRASSE 8-10
10589 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**PURSCHE, WERNER;
JAROSCH, FLORIAN;
EULBERG, DIRK;
KLUSMANN, SVEN;
BUCHNER, KLAUS y
MAASCH, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 803 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

Ácidos nucleicos de unión a MCP-1

5 La presente invención se refiere a un ácido nucleico L que es capaz de unirse a MCP-1, a una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico, al uso del ácido nucleico para la fabricación de un medicamento, al uso del ácido nucleico para la fabricación de un medio de diagnóstico, a un complejo que comprende una quimiocina y el ácido nucleico, al uso del ácido nucleico para la detección de una quimiocina, a un método para el escrutinio de un agonista de quimiocina y/o un antagonista de quimiocina, a un kit para la detección de una quimiocina que comprende el ácido nucleico, y a un método para la detección del ácido nucleico en una muestra.

10 La MCP-1 humana (proteína quimiotáctica de monocitos 1; nombres alternativos, MCAF [factor quimiotáctico y activador de monocitos]; CCL2; SMC-CF [factor estimulante de la colonia de células de músculo liso]; HC-11; LDCF; GDGF; TSG-8; SCYA2; A2; código de acceso SwissProt, P13500) ha sido caracterizada por tres grupos independientes (Matsushima 1988; Rollins 1989; Yoshimura 1989). Ésta consiste en 76 aminoácidos y pone de relieve un sitio de unión a heparina como todas las quimiocinas. Los dos puentes de disulfuro intramoleculares confieren a la molécula una estructura rígida, estable. Además, la MCP-1 porta un piroglutamato en su extremo amino. En la Thr 71, se localiza un sitio potencial de glicosilación unido a O. Existen miembros adicionales de la familia MCP tanto en seres humanos (MCP-2, -3, -4) como en ratones (MCP-2, -3, -5). Las proteínas humanas son homólogas en aproximadamente un 70% a la MCP-1 humana.

20 La estructura de la MCP-1 ha sido dilucidada mediante RMN (Handel 1996) y rayos X (Lubkowski 1997). El monómero de MCP-1 tiene el típico pliegue de las quimiocinas en donde las cisteínas amino-terminales van seguidas de un bucle largo que produce tres láminas plegadas $\alpha\beta$ antiparalelas en un motivo de llave griega. La proteína finaliza en una hélice α que se superpone a las tres láminas β (código de acceso PDB 1DOK).

25 Si bien las estructuras tridimensionales de las formas de MCP-1 de diferentes especies de mamíferos generalmente se han mantenido, la secuencia de aminoácidos no se ha conservado particularmente bien en la evolución. Los resultados del alineamiento de secuencias demuestran una semejanza de secuencia global del 55% entre MCP-1 humana y murina (también llamada JE) dentro de los primeros 76 aminoácidos. Aparte de la secuencias de aminoácidos, la MCP-1 murina difiere de la MCP-1 humana en el tamaño molecular (125 aminoácidos) y en el grado de glicosilación. La MCP-1 murina contiene un dominio carboxiterminal de 49 aminoácidos que no está presente en la MCP-1 humana y que no es requerido para la bioactividad *in vitro*. La MCP-1 humana comparte los siguientes porcentajes de aminoácidos idénticos con la MCP-1 de:

30	• <i>Macaca mulatta</i> (mono Rhesus) MCP-1	97%
	• <i>Sus scrofa</i> (cerdo) MCP-1	79%
	• <i>Equus caballus</i> (caballo)	78%
	• <i>Canis familiaris</i> (perro) MCP-1	76%
	• <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) MCP-1	75%
35	• <i>Bos Taurus</i> (bovino)	72%
	• <i>Homo sapiens</i> MCP-3	71%
	• <i>Homo sapiens</i> Eotaxina	64%
	• <i>Homo sapiens</i> MCP-2	62%
	• <i>Mus musculus</i> (ratón) MCP-1	55%
40	• <i>Rattus norvegicus</i> (rata) MCP-1	55%

Dado este alto grado de divergencia puede ser necesario generar antagonistas de la MCP-1 de roedores para la realización exitosa de estudios farmacológicos en modelos de roedores.

45 La MCP-1 es una potente atractora de monocitos/macrófagos, basófilos, células T activadas y células NK. Una amplia variedad de tipos celulares expresan MCP-1, tales como células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, queratinocitos, células sinoviales, células del mesangio, osteoblastos, células del músculo liso, además de una multitud de células tumorales (Baggiolini 1994). Su expresión está estimulada por varios tipos de agentes proinflamatorios tales como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , LPS (lipopolisacáridos) y GM-CSF.

50 Bastante inusual en la promiscua estructura de la quimiocina, la MCP-1 es muy específica en su uso como receptor, se une solo al receptor de quimiocina CCR2 con alta afinidad. Como todos los receptores de quimiocina, el CCR2 es un GPCR (Dawson 2003). El CCR2 parece expresarse en dos formas ligeramente diferentes debido a la división alternativa del ARNm que codifica la región carboxiterminal, CCR2a y CCR2b (Charo 1994). Estos receptores se expresan en monocitos, células precursoras mieloideas y células T activadas (Myers 1995; Qin 1996). La constante de disociación del MCP-1 al receptor transfectado en las células HEK-293 es de 260 pM, lo que está de acuerdo con los valores medidos en monocitos (Myers 1995; Van Riper 1993). La activación de CCR2b en células HEK-293 transfectadas con MCP-1 inhibe la adenilil ciclasa a una concentración de 90 pM, y moviliza el calcio intracelular a concentraciones ligeramente superiores, aparentemente de forma independiente a la hidrólisis de fosfatidil inositol. Los efectos en la adenilil ciclasa y en la liberación de calcio intracelular son fuertemente inhibidos por la toxina de la

tosferina, lo que implica la participación de las proteínas G heterotriméricas de tipo G_i en la transducción de señales (Myers 1995).

La MCP-1 está involucrada en el reclutamiento de monocitos en los tejidos inflamados. Allí, los macrófagos residentes liberan quimiocinas tales como MCP-1 y otras, y citocinas como TNF, IL-1 β y otras, que activan a las células endoteliales para que expresen una batería de moléculas de adhesión. El endotelio "pegajoso" resultante hace que los monocitos de los vasos sanguíneos lleguen a su superficie. Aquí, los monocitos encuentran a la MCP-1 presente en la superficie endotelial, que se une al CCR2 de los monocitos y los activa. Esto finalmente conduce al frenado estricto, la propagación de monocitos por todo el endotelio y la trans migración al tejido circundante, donde los monocitos se diferencian en macrófagos y migran hacia el sitio de concentración máxima de MCP-1.

La MCP-1 es un miembro de la familia de las quimiocinas que es una familia de moléculas pequeñas (aproximadamente 8-14 kDa) principalmente básicas y relacionadas estructuralmente que se unen a heparina. Se forman predominantemente en tejidos inflamados y regulan el reclutamiento, la activación y la proliferación de células sanguíneas blancas (leucocitos) (Baggiolini 1994; Springer 1995; Schall 1994). Las quimiocinas inducen selectivamente la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, mastocitos, células T y B. Además de su efecto quimiotáctico, pueden ejercer selectivamente otros efectos en células sensibles, como cambios en la forma, aumento transitorio en la concentración de iones de calcio intracelular libre, desgranulación, regulación por aumento de las integrinas, formación de lípidos bioactivos tales como leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos o estallido respiratorio (liberación de especies de oxígeno reactivo para la destrucción de los organismos patógenos o células tumorales). De este modo, al provocar la liberación de mediadores proinflamatorios adicionales, la quimiotaxis y extravasación de leucocitos hacia los sitios de infección o inflamación, las quimiocinas desencadenan la escalada de la respuesta inflamatoria.

En base a la disposición de los dos primeros, de cuatro, residuos conservados de cisteína, las quimiocinas se dividen en cuatro clases: CC o β -quimiocinas en las que las cisteínas están en tándem, CXC o α -quimiocinas, donde están separadas por un residuo de aminoácido adicional, χ C o γ -quimiocinas con la linfotactina como único representante hasta la fecha, que poseen un único puente de disulfuro, y quimiocinas CX3C, que se caracterizan por tres residuos de aminoácidos entre las cisteínas, siendo la fractalquina unida a membrana el único miembro de la clase conocido hasta la fecha (Bazan 1997).

Las quimiocinas CXC actúan principalmente sobre neutrófilos, en particular las quimiocinas CXC que portan la secuencia de aminoácidos ELR en sus extremos amino. Los ejemplos de quimiocinas CXC que son activas sobre neutrófilos son IL-8, GRO α , β , y γ , NAP-2, ENA-78 y GCP-2. Las quimiocinas CC actúan sobre una mayor variedad de leucocitos, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, además de los linfocitos T y B (Oppenheim 1991; Baggiolini 1994; Miller 1992; Jose 1994; Ponath 1996a). Ejemplos de éstas son I-309; MCP-1, -2, -3, -4, MIP-1 α y β , RANTES, y eotaxina.

Las quimiocinas actúan a través de receptores que pertenecen a una superfamilia de siete receptores acoplados a la proteína G que abarcan la transmembrana (GPCRs; Murphy 2000). En términos generales, las interacciones de quimiocina y receptor de quimiocina tienden a ser promiscuas en el sentido en que una quimiocina se puede unir a muchos receptores de quimiocina e, inversamente, un único receptor de quimiocina puede interactuar con varias quimiocinas. Algunos receptores conocidos para las quimiocinas CC incluyen CCR1, que se une a MIP-1 α y RANTES (Neote 1993; Gao 1993); CCR2, que se une a quimiocinas que incluyen MCP-1, -2, -3, y -4 (Charo 1994; Myers 1995; Gong 1997; Garcia-Zepeda 1996); CCR3, que se une a quimiocinas que incluyen eotaxina, RANTES y MCP-3 (Ponath 1996b); CCR4, que se halló que indica la respuesta a MCP-1, MIP-1 α , y RANTES (Power 1995); y CCR5, que se halló que indica la respuesta a MIP-1 α y β , y RANTES (Boring 1996; Raport 1996; Samson 1996).

Como se ha mencionado anteriormente, los cuatro miembros de la familia MCP y (1-4) se unen a CCR2, mientras que MCP-2, MCP-3, y MCP-4 también pueden interactuar con CCR1 y CCR3 (Gong 1997; Heath 1997; Uguccioni 1997) y, en el caso de MCP-2, con CCR5 (Ruffing 1998). Otra quimiocina CC que muestra alta homología con la familia MCP es la eotaxina, que originalmente se halló en el líquido de lavado broncoalveolar tomado de cobayas sensibilizadas estimuladas con alérgenos (Jose 1994). Se ha demostrado que la eotaxina también puede activar a CCR2 (Martinelli 2001).

El problema esencial de la presente invención es proporcionar un medio que interactúe específicamente con la MCP-1. Más específicamente, problema esencial de la presente invención es proporcionar un medio sobre la base de un ácido nucleico que interactúe específicamente con la MCP-1.

Otro problema esencial de la presente invención es proporcionar un medio para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas o no humanas, en donde la enfermedad se caracteriza porque la MCP-1 unida tanto de forma directa como indirecta participa en el mecanismo patogénico de dicha enfermedad.

Otro problema esencial adicional de la presente invención es proporcionar un medio para la fabricación de un agente diagnóstico para el tratamiento de una enfermedad, en donde la enfermedad se caracteriza porque la MCP-1 unida tanto de forma directa como indirecta participa en el mecanismo patogénico de tal enfermedad.

Estos y otros problemas subyacentes de la presente invención se resuelven a través del contenido de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas se pueden adoptar a partir de las reivindicaciones dependientes. El ácido nucleico según la presente invención también se denomina en la presente memoria como ácido(s) nucleico(s) de tipo 2.

5 Más específicamente, el problema esencial de la presente invención se resuelve en un primer aspecto que también es la primera realización del primer aspecto, mediante un ácido nucleico L capaz de unirse a MCP-1, en donde el ácido nucleico comprende en la dirección 5'→3' una primera extensión de Caja B1A, una segunda extensión de Caja B2 y una tercera extensión de Caja B1B, en donde
 10 la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en ACGCA, CGCA y GCA,
 la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de ácido nucleico de CSUCCCUCACCGGUGCAAGUGAAG-CCGYGGCUC,
 y
 15 la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en UGCGU, UGCG y UGC.

En una segunda realización del primer aspecto que también es una realización de la primera realización del primer aspecto, la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de CGUCCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUC.

20 En una tercera realización del primer aspecto que también es una realización de la primera y de la segunda realizaciones del primer aspecto,

a) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de ACGCA,
 y
 la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGCGU; o

25 b) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de CGCA,
 y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGCG; o

c) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GCA,
 y
 la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGC ó UGCG.

30 En una cuarta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, la segunda y la tercera realizaciones del primer aspecto, la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GCA.

En una quinta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera y cuarta realizaciones del primer aspecto, y preferiblemente de la cuarta realización del primer aspecto de la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGCG.

35 En una sexta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta realizaciones del primer aspecto, el ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 116, SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 278, o un ácido nucleico homólogo a las mismas, en donde la homología es de al menos un 85%.

40 En una séptima realización del primer aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta realizaciones del primer aspecto, el ácido nucleico es capaz de unirse a una quimiocina, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que consiste en eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

En una octava realización del primer aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima realización del primer aspecto, el ácido nucleico es capaz de unirse a MCP-1 humana.

45 En una novena realización del primer aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava realizaciones del primer aspecto, el ácido nucleico comprende una modificación, en donde la modificación es preferiblemente un resto de elevado peso molecular y/o en donde la modificación preferiblemente permite modificar las características del ácido nucleico según cualquiera de las realizaciones primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava del primer aspecto en términos de tiempo de residencia en el cuerpo humano o animal, preferiblemente en el cuerpo humano.

50 En una décima realización del primer aspecto que también es una realización de la novena realización del primer aspecto, la modificación se selecciona del grupo que comprende un residuo HES y un residuo PEG.

En una undécima realización del primer aspecto que también es una realización de la décima realización del primer aspecto, la modificación es un residuo PEG que consta de un PEG lineal o ramificado, en donde el peso molecular del residuo PEG preferiblemente está entre aproximadamente 20 y 120 kD, más preferiblemente entre

aproximadamente 30 y 80 kD y lo más preferiblemente aproximadamente 40 kD.

5 En una duodécima realización del primer aspecto, que también es una realización de la décima realización del primer aspecto, la modificación es un residuo de HES, en donde preferiblemente el peso molecular del residuo de HES va de aproximadamente 10 a 130 kD, más preferiblemente entre aproximadamente 30 y 130 kD y lo más preferiblemente aproximadamente 100 kD.

En una decimotercera realización del primer aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima y duodécima realizaciones del primer aspecto, la primera extensión Caja B1A y la tercera extensión Caja B1B se hibridan opcionalmente una con la otra, con lo cual a través de dicha hibridación se forma una estructura de cadena doble.

10 En una decimocuarta realización del primer aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, el ácido nucleico es para uso en un método de tratar una enfermedad.

15 En una decimoquinta realización del primer aspecto que también es una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico es para uso en un método de diagnóstico.

20 El problema esencial de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto que también es la primera realización del segundo aspecto, mediante una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto y opcionalmente un constituyente adicional, en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos farmacéuticamente aceptables y agentes farmacéuticamente activos.

25 El problema esencial de la presente invención se soluciona en un tercer aspecto que también es la primera realización del tercer aspecto, mediante el uso de un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto para la fabricación de un medicamento.

El problema esencial de la presente invención se soluciona en un cuarto aspecto que también es la primera realización del cuarto aspecto, mediante el uso de un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto para la fabricación de un medio de diagnóstico.

30 En una segunda realización del tercer aspecto, que también es una realización de la primera realización del tercer aspecto, el medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, encefalomiелitis autoinmune, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple aguda y crónica, inflamación crónica, artritis reumatoide, enfermedades renales, restenosis, restenosis después de la angioplastia, reacciones alérgicas agudas y crónicas, reacciones inmunológicas y alérgicas primarias y secundarias, asma, conjuntivitis, bronquitis, cáncer, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca cardiovascular arteriosclerótica o accidente cerebrovascular, psoriasis, artritis psoriática, inflamación del sistema nervioso, dermatitis atópica, colitis, endometriosis, uveítis, trastornos retinianos que incluyen degeneración macular, desprendimiento de retina, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, retinitis pigmentaria, vitreoretinopatía proliferativa y coriorretinopatía serosa central; fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, polimiositis, dermatomiositis, anulación de la inmunosupresión, reducción del riesgo de infección, sepsis, inflamación renal, glomerulonefritis, glomerulonefritis progresiva rápida, glomerulonefritis proliferativa, neuropatía diabética, nefropatía obstructiva, necrosis tubular aguda y glomeruloesclerosis difusa, lupus eritematoso sistémico, bronquitis crónica, enfermedad de Behçet, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aterosclerosis prematura después de la enfermedad de Kawasaki, infarto de miocardio, obesidad, enfermedad hepática crónica, enfermedad de Peyronie, lesión de médula espinal aguda, trasplante de pulmón o riñón, miocarditis, enfermedad de Alzheimer y neuropatía, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, hamartoma, carcinoma colorrectal, adenoma colónico, pancreatitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa.

50 El problema esencial de la presente invención se resuelve en un quinto aspecto que también es la primera realización del quinto aspecto, mediante un complejo que comprende una quimiocina y un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, decimosegunda y decimotercera realizaciones del primer aspecto, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3, en donde el complejo preferiblemente es un complejo cristalino.

55 El problema esencial de la presente invención se resuelve en un sexto aspecto que también es la primera realización del sexto aspecto mediante el uso de un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto para la detección in vitro de una quimiocina, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

El problema esencial de la presente invención se resuelve en un séptimo aspecto que también es la primera realización del séptimo aspecto, mediante un método para el escrutinio de un antagonista de quimiocina o un agonista de quimiocina que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un candidato de antagonista de quimiocina y/o un candidato de agonista de quimiocina,
- 5 - proporcionar un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima o decimotercera realizaciones del primer aspecto,
- proporcionar un sistema de ensayo que proporcione una señal en presencia de un agonista de quimiocina y/o de un antagonista de quimiocina, y
- 10 - determinar si el antagonista de quimiocina candidato es un antagonista de quimiocina y/o si el agonista de quimiocina candidato es un agonista de quimiocina,

en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

El problema esencial de la presente invención se resuelve en un octavo aspecto que también es la primera realización del octavo aspecto, mediante un método para el escrutinio de un agonista de quimiocina y/o un antagonista de quimiocina que comprende las siguientes etapas:

- 15 - proporcionar una quimiocina inmovilizada en una fase, preferiblemente una fase sólida,
- proporcionar un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto,

preferiblemente un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, que es marcado,

- 20 - añadiendo un agonista de quimiocina candidato y/o un antagonista de quimiocina candidato, y
- determinando si el agonista de quimiocina candidato es un agonista de quimiocina y/o si el antagonista de quimiocina candidato es un antagonista de quimiocina,

en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

- 25 El problema esencial de la presente invención se resuelve en un noveno aspecto que también es la primera realización del noveno aspecto, mediante un kit para la detección de una quimiocina que comprende un ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

- 30 El problema esencial de la presente invención se resuelve en un décimo aspecto que también es la primera realización del décimo aspecto mediante un método para la detección del ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto en una muestra, en donde el método comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico según la presente invención;
- 35 b) proporcionar una sonda de captura, en donde la sonda de captura es complementaria al menos parcialmente a una primera parte del ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, y una sonda de detección, en donde la sonda de detección es complementaria al menos parcialmente a una segunda parte del ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, o, alternativamente, la sonda de captura es complementaria al menos parcialmente a una segunda parte del ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto y la sonda de detección es complementaria al menos parcialmente a una primera parte del ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto;
- 40 c) dejar que la sonda de captura y la sonda de detección reaccionen simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden con el ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, o con una parte del mismo;
- 45 d) opcionalmente detectar si la sonda de captura se ha hibridado o no con el ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima,
- 50

duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto proporcionado en la etapa a); y

e) detectar el complejo formado en la etapa c) que consiste en el ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, y la sonda de captura y la sonda de detección.

5 En una segunda realización del décimo aspecto, que también es una realización de la primera realización del décimo aspecto, la sonda de detección comprende un medio de detección, y/o en donde la sonda de captura se puede inmovilizar sobre un soporte, preferiblemente un soporte sólido.

10 En una tercera realización del décimo aspecto, que también es una realización de la primera y segunda realizaciones del décimo aspecto, se elimina de la reacción toda sonda de detección que no forme parte del complejo de tal modo que en la etapa e) sólo se detecte una sonda de detección que forme parte del complejo.

15 En una cuarta realización del décimo aspecto que también es una realización de la primera, segunda y tercera realizaciones del décimo aspecto, la etapa e) comprende la etapa de comparar la señal generada por el medio de detección cuando la sonda de captura y la sonda de detección son hibridadas en presencia del ácido nucleico según cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones del primer aspecto, o parte del mismo, y en ausencia de dicho ácido nucleico o parte del mismo.

20 En una quinta realización del décimo aspecto, que también es una realización de la primera, segunda, tercera y cuarta realizaciones del décimo aspecto, el ácido nucleico que se va a detectar es el ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico según las SEC ID N°: 37, 116, 117 ó 278, y la sonda de captura o la sonda de detección comprenden una secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N°: 255 o la SEC ID N°: 256.

También se describe un ácido nucleico de tipo 1A, en donde el ácido nucleico tipo 1A comprende en dirección 5'→3' una primera extensión Caja B1A, una segunda extensión Caja B2, una tercera extensión Caja B3, una cuarta extensión Caja B4, una quinta extensión Caja B5, una sexta extensión Caja B6 y una séptima extensión Caja B1B, en donde

25 la primera extensión Caja B1A y la séptima extensión Caja B1B opcionalmente se hibridan entre sí, en donde en la hibridación se forma una estructura de cadena doble,
la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de AGCRUG,
la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de CCCGGW,
30 la tercera extensión Caja B3 comprende una secuencia de nucleótidos de GUR,
la cuarta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos de RYA,
la quinta extensión Caja B5 comprende una secuencia de nucleótidos de GGGGGRCGCGAYC
la sexta extensión Caja B6 comprende una secuencia de nucleótidos de UGCAAUAAUG ó URYAWUUG, y
la séptima extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de CRYGCU.

35 En una realización preferida
la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de AGCGUG.

En una realización
la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de CCCGGU.

En una realización
la tercera extensión Caja B3 comprende una secuencia de nucleótidos de GUG.

40 En una realización
la cuarta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos de GUA.

En una realización
la quinta extensión Caja B5 comprende una secuencia de nucleótidos de GGGGGGCGCGACC.

45 En una realización
la sexta extensión Caja B6 comprende una secuencia de nucleótidos de UACAUUUG.

En una realización
la séptima extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de CACGCU.

En una realización el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N°: 21.

50 También se describe un ácido nucleico tipo 1B, en donde el ácido nucleico tipo 1B comprende en dirección 5'→3' una primera extensión Caja B1A, una segunda extensión Caja B2, una tercera extensión Caja B3, una cuarta extensión Caja B4, una quinta extensión Caja B5, una sexta extensión Caja B6 y una séptima extensión Caja B1B, en donde
la primera extensión Caja B1A y la séptima extensión Caja B1B opcionalmente se hibridan entre sí, en donde con la

ES 2 397 803 T3

- hibridación se forma una estructura de cadena doble,
la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de AGYRUG,
la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de CCAGCU ó CCAGY,
la tercera extensión Caja B3 comprende una secuencia de nucleótidos de GUG,
5 la cuarta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos de AUG,
la quinta extensión Caja B5 comprende una secuencia de nucleótidos de GGGGGGCGCGACC,
la sexta extensión Caja B6 comprende una secuencia de nucleótidos de CAUUUUA ó CAUUUA, y
la séptima extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de CAYRCU.
- En una realización
10 la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de AGCGUG.
- En una realización
la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de CCAGU.
- En una realización
la sexta extensión Caja B6 comprende una secuencia de nucleótidos de CAUUUUA.
- 15 En una realización
la séptima extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de CACGCU.
- En una realización el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N°: 28 y
la SEC ID N°: 27.
- 20 También se describe un ácido nucleico tipo 3, en donde el ácido nucleico tipo 3 comprende en dirección 5'→3' una
primera extensión Caja B1A, una segunda extensión Caja B2A, una tercera extensión Caja B3, una cuarta extensión
Caja B2B, una quinta extensión Caja B4, una sexta extensión Caja B5A, una séptima extensión Caja B6, una octava
extensión Caja B5B y una novena extensión Caja B1B,
- en donde la primera extensión Caja B1A y la novena extensión Caja B1B opcionalmente se hibridan entre sí, en
donde con la hibridación se forma una estructura de cadena doble,
25 la segunda extensión Caja B2A y la cuarta Caja B2B opcionalmente se hibridan entre sí, en donde con la hibridación
se forma una estructura de cadena doble,
la sexta extensión Caja B5A y la octava Caja B5B opcionalmente se hibridan entre sí, en donde con la hibridación se
forma una estructura de cadena doble,
30 la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que
comprende GURCUGC, GKSYGC, KBBSC y BNGC,
la segunda extensión Caja B2A comprende una secuencia de nucleótidos de GKMGU,
la tercera extensión Caja B3 comprende una secuencia de nucleótidos de KRRAR,
la cuarta extensión Caja B2B comprende una secuencia de nucleótidos de ACKMC,
35 la quinta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende
CURYGA, CUWAUGA, CWRMGACW y UGCCAGUG,
la sexta extensión Caja B5A comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende GGY
y CWGC,
la séptima extensión Caja B6 comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende
40 YAGA, CKAAU y CCUUUUAU,
la octava extensión Caja B5B comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende
GCYR y GCWG, y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende
GCAGCAC, GCRSMC, GSVVM y GCNV.
- En una realización
45 la tercera extensión Caja B3 comprende una secuencia de nucleótidos de GAGAA o UAAAA
- En una realización
la quinta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos de CAGCGACU o CAACGACU.
- En una realización
50 la quinta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos de CAGCGACU y la Caja B3 comprende una
secuencia de nucleótidos de UAAAA.
- En una realización
la quinta extensión Caja B4 comprende una secuencia de nucleótidos de CAACGACU y la Caja B3 comprende una
secuencia de nucleótidos de GAGAA.
- En una realización
55 la séptima extensión Caja B6 comprende una secuencia de nucleótidos de UAGA.

En una realización

- 5 a) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GURCUGC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCAGCAC; o
- b) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GKS YGC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCRSMC; o
- 10 c) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de KBBSC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GSVVM; o
- d) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de BNGC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCNV.

En una realización preferida

- 15 a) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GUGCUGC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCAGCAC; o
- b) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GUGC GC,
y
20 la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCGCAC; o
- c) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de KKSSC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GSSMM; o
- 25 d) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de SNGC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCNS.

En una realización preferida adicional

- 30 la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GGGC,
y
la novena extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GCCC.

En una realización la segunda extensión Caja B2A comprende una secuencia de nucleótidos de GKMGU y la cuarta extensión Caja B2B comprende una secuencia de nucleótidos de ACKMC.

En una realización preferida la segunda extensión Caja B2A comprende una secuencia de nucleótidos de GUAGU y la cuarta extensión Caja B2B comprende una secuencia de nucleótidos de ACUAC.

35 En una realización

- a) la sexta extensión Caja B5A comprende una secuencia de nucleótidos de GGY,
y
la octava extensión Caja B5B comprende una secuencia de nucleótidos de GCYR; o
- 40 b) la sexta extensión Caja B5A comprende una secuencia de nucleótidos de CWGC,
y
la octava extensión Caja B5B comprende una secuencia de nucleótidos de GCWG.

En una realización preferida

- 45 la sexta extensión Caja B5A comprende una secuencia de nucleótidos de GGC,
y
la octava extensión Caja B5B comprende una secuencia de nucleótidos de GCCG.

En una realización más preferida la sexta extensión Caja B5A se hibrida con los nucleótidos GCY de la octava extensión Caja B5B.

En una realización el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N°: 56.

- 50 En una realización el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con las SEC ID N°: 57 a 61, SEC ID N°: 67 a 71 y SEC ID N°: 73.

También se describe un ácido nucleico de tipo 4, en donde el ácido nucleico de tipo 4 comprende en dirección 5'→3' una primera extensión Caja B1A, una segunda extensión Caja B2, una tercera extensión Caja B1B, en donde la primera extensión Caja B1A y la tercera extensión Caja B1B opcionalmente se hibridan entre sí, en donde con la hibridación se forma una estructura de cadena doble,

5 la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende AGCGUGDU, GCGCGAG, CSKSUU, GUGUU, y UGUU;

la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende AGNDRDGBKGGURGYARGUAAAG, AGGUGGGUGGUAGUAAGUAAAG y CAGGUGGGUGGUAGAAUGUAAAGA, y

10 la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende GNCASGCU, CUCGCGUC, GRSMSG, GRCAC, y GGCA.

En una realización

15 a) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GUGUU, y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GRCAC;

b) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GCGCGAG, y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de CUCGCGUC; o

20 c) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de CSKSUU, y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GRSMSG, o

d) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de UGUU, y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GGCA, o

25 e) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de AGCGUGDU, y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GNCASGCU.

En una realización preferida la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de CSKSUU y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GRSMSG.

30 En una realización más preferida la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de CCGCUU y la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de GGGCGG.

En una realización

la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de AGGUGGGUGGUAGUAAGUAAAG.

En una realización el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N°: 80.

35 En una realización el ácido nucleico es capaz de unirse a MCP-1, con preferencia a la MCP-1 humana.

En una realización el ácido nucleico es capaz de unirse a una quimiocina, donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

En una realización el ácido nucleico es capaz de unirse a una quimiocina, donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende a eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

40 En una realización el ácido nucleico es capaz de unirse a MCP-1, donde MCP-1 con preferencia se selecciona del grupo que comprende MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina y MCP-1 humana.

En una realización el ácido nucleico es capaz de unirse a MCP-1 humana.

En una realización preferida la MCP-1 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1.

45 También se describe un ácido nucleico, que preferiblemente se une a MCP-1 murina, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las SEC ID N°: 122, SEC ID N°: 253 y SEC ID N°: 254.

También se describe un ácido nucleico, que preferiblemente se une a MCP-1 murina, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N°: 127.

En una realización la MCP-1 murina comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 2.

50 En una realización del primer aspecto la modificación se acopla al ácido nucleico mediante un conector.

En una realización del primer aspecto la modificación se acopla al ácido nucleico en su nucleótido 5'-terminal y/o en su nucleótido 3'-terminal y/o a un nucleótido del ácido nucleico entre el nucleótido 5'-terminal y el nucleótido 3'-terminal.

5 En una realización del primer aspecto los nucleótidos del ácido nucleico, o los nucleótidos que forman el ácido nucleico, son nucleótidos L.

En una realización del primer aspecto el residuo del ácido nucleico capaz de unirse a MCP-1 consiste en nucleótidos L.

En una realización del segundo aspecto la composición farmacéutica comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

10 En una realización del tercer aspecto el medicamento es para uso en medicina humana o para uso en medicina veterinaria.

En una realización del cuarto aspecto y de los medios diagnósticos, es para la diagnosis de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, encefalomiелitis autoinmune, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple aguda y crónica, inflamación crónica, artritis reumatoide, enfermedades renales, restenosis, restenosis después de la angioplastia, reacciones alérgicas aguda y crónica, reacciones inmunológicas y alérgicas primarias y secundarias, asma, conjuntivitis, bronquitis, cáncer, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca cardiovascular arteriosclerótica o accidente cerebrovascular, psoriasis, artritis psoriática, inflamación del sistema nervioso, dermatitis atópica, colitis, endometriosis, uveítis, trastornos retinianos que incluyen degeneración macular, desprendimiento de retina, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, retinitis pigmentaria, vitreorretinopatía proliferativa y coriorretinopatía serosa central; fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, polimiositis, dermatomiositis, anulación de la inmunosupresión, reducción del riesgo de infección, sepsis, inflamación renal, glomerulonefritis, glomerulonefritis progresiva rápida, glomerulonefritis proliferativa, neuropatía diabética, nefropatía obstructiva, necrosis tubular aguda y glomeruloesclerosis difusa, lupus eritematoso sistémico, bronquitis crónica, enfermedad de Behçet, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aterosclerosis prematura después de la enfermedad de Kawasaki, infarto de miocardio, obesidad, enfermedad hepática crónica, enfermedad de Peyronie, lesión de médula espinal aguda, trasplante de pulmón o riñón, miocarditis, enfermedad de Alzheimer y neuropatía, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, hamartoma, carcinoma colorrectal, adenoma colónico, pancreatitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.

15
20
25
30

Sin pretender establecer una teoría, la adecuación de los ácidos nucleicos de la presente invención para los propósitos diagnósticos se basa principalmente en el aumento o la disminución del nivel de quimiocina, en donde dicha quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3, más específicamente MCP-1. Será reconocido por el experto en la técnica que la mayoría de las enfermedades antes mencionadas muestran tal aumento o disminución del nivel de quimiocina.

35

En una realización del quinto aspecto la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

En una realización del quinto aspecto la quimiocina es MCP-1, donde MCP-1 se selecciona preferiblemente del grupo que comprende MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina y MCP-1 humana. En una realización del sexto aspecto, la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

40

En una realización del sexto aspecto la quimiocina es MCP-1, donde MCP-1 se selecciona preferiblemente del grupo que comprende MCP-1 humana, MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina y MCP-1 humana.

45 En una realización del octavo aspecto la determinación se realiza de modo que se evalúa si el ácido nucleico es reemplazado por el agonista de quimiocina candidato o por un antagonista de quimiocina candidato.

En una realización del séptimo aspecto y del octavo aspecto la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

En una realización del séptimo aspecto y del octavo aspecto la quimiocina es MCP-1, donde MCP-1 se selecciona preferiblemente del grupo que comprende MCP-1 humana, MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina, más preferiblemente MCP-1 es MCP-1 humana.

50

En una realización del noveno aspecto la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

En una realización del noveno aspecto la quimiocina es MCP-1, donde la MCP-1 se selecciona preferiblemente del

grupo que comprende MCP-1 humana, MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina, más preferiblemente MCP-1 es MCP-1 humana.

También se describe un antagonista de quimiocina obtenible por el método de acuerdo con el séptimo aspecto o el octavo aspecto, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

- 5 En una realización la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

En una realización la quimiocina es MCP-1, donde la MCP-1 se selecciona preferiblemente del grupo que comprende MCP-1 humana, MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina, más preferiblemente MCP-1 es MCP-1 humana.

- 10 También se describe un agonista de quimiocina obtenible por el método de acuerdo con el séptimo aspecto o el octavo aspecto, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

En una realización la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana y MCP-3 humana.

- 15 En una realización la quimiocina es MCP-1, en donde MCP-1 se selecciona preferiblemente del grupo que comprende MCP-1 humana, MCP-1 de mono, MCP-1 de caballo, MCP-1 de conejo, MCP-1 bovina, MCP-1 canina, MCP-1 porcina, más preferiblemente MCP-1 es MCP-1 humana.

- 20 Será reconocido por los expertos en la técnica que un agonista de quimiocina y/o un antagonista de quimiocina preferiblemente es un agonista y un antagonista, respectivamente, que se dirige a la quimiocina respectiva como se especifica en la presente memoria. Por consiguiente, el agonista de quimiocina y el antagonista de quimiocina son, por ejemplo, un agonista de MCP-1 y un antagonista de MCP-1, respectivamente.

En una realización del décimo aspecto el ácido nucleico detectado es el ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las SEC ID N°: 122, 253 ó 254 y la sonda de captura o la sonda de detección comprenden una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N°: 281 y la SEC ID N°: 282.

- 25 Las características del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención descritas en la presente memoria se pueden realizar en cualquier aspecto de la presente invención donde se usa el ácido nucleico, tanto solo como en alguna combinación.

La MCP-1 humana, así como también la murina, son proteínas básicas que tienen la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente.

- 30 El hallazgo de que se podían identificar ácidos nucleicos cortos de alta afinidad con la MCP-1, en lo que es sorprendente, ya que Eaton et al. (1997) observaron que la generación de aptámeros, es decir, ácidos D-nucleicos que se unen a una molécula diana, dirigida a una proteína básica es en general muy difícil porque esta clase de diana produce una relación señal-ruido alta aunque no específica. Esta relación señal-ruido alta proviene de la alta afinidad no específica mostrada por los ácidos nucleicos hacia dianas básicas tales como la MCP-1.

- 35 Como se describe con más detalle en las reivindicaciones y en el ejemplo 1, los presentes inventores pudieron identificar de forma sorprendente una variedad de diferentes moléculas de ácidos nucleicos de unión a MCP-1, en donde la mayoría de los ácidos nucleicos se podían caracterizar en términos de extensiones de nucleótidos que en la presente memoria también se denominan Cajas. Las diversas moléculas de ácidos nucleicos de unión a MCP-1 se pueden clasificar en base a dichas Cajas y algunos rasgos y elementos estructurales, respectivamente. Las diversas categorías definidas de este modo también se denominan en la presente memoria tipos, y más específicamente, tipo 1A, tipo 1B, tipo 2, tipo 3 y tipo 4.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también comprenderán ácidos nucleicos que son esencialmente homólogos a las secuencias particulares descritas en la presente memoria. El término sustancialmente homólogo se entenderá de modo tal que la homología es de al menos 75%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente más de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ó 99%.

- 45 El porcentaje real de los nucleótidos homólogos presentes en el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención dependerá de la cantidad total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico. El porcentaje de modificación se puede basar en la cantidad total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico.

- 50 La homología se puede determinar de modos conocidos por los expertos en la técnica. Más específicamente, un algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados. La secuencia de ensayo es preferiblemente la secuencia o molécula de ácido nucleico que es homóloga o se debe ensayar si es homóloga, y si es así, en qué grado, con respecto a otra molécula de ácido nucleico, en donde dicha otra molécula de ácido nucleico también se define como secuencia de referencia. En una realización, la secuencia de referencia es una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria, más preferiblemente una molécula de ácido

nucleico que tiene una secuencia de acuerdo con alguna de las SEC ID N°: 10 a 129, 132 a 256 y 278 - 282. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (Smith & Waterman, 1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970), mediante el método de búsqueda de semejanza de Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, 1988), mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o a través de inspección visual.

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es el algoritmo usado en la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (de aquí en adelante "BLAST"), véase, por ej., Altschul et al (Altschul et al. 1990 y Altschul et al, 1997). El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (de aquí en adelante "NCBI"). Los parámetros por defecto que se usan para determinar la identidad de secuencia mediante el programa de computación disponible en NCBI, por ej., BLASTN (para secuencias de nucleótidos) y BLASTP (para secuencias de aminoácidos) se describen en McGinnis et al (McGinnis et al, 2004).

El término ácido nucleico inventivo o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también comprenderá a los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria o parte de las mismas, preferiblemente en la medida en que los ácidos nucleicos o dichas partes participen en la unión a MCP-1. El término ácido nucleico inventivo usado preferiblemente en la presente memoria, en una realización también comprenderá un ácido nucleico adecuado para unirse a cualquier molécula seleccionada del grupo que comprende a MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina. Será reconocido por los expertos en la técnica que los ácidos nucleicos individuales de acuerdo con la presente invención se unirán a una o varias de estas moléculas. Dicho ácido nucleico es, en una realización, una de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria o un derivado y/o un metabolito del mismo, en donde dicho derivado y/o metabolito preferiblemente son un ácido nucleico truncado en comparación con las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. El truncamiento puede estar referido a uno o a ambos extremos de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. También, el truncamiento se puede referir a la secuencia interior de los nucleótidos del ácido nucleico, es decir, se puede referir a el(los) nucleótido(s) entre el nucleótido 5' y el 3' del extremo terminal respectivamente. Además, el truncamiento comprenderá la supresión de tan solo un único nucleótido de la secuencia de los ácidos nucleicos descrita en la presente memoria. El truncamiento también puede estar referido a más de una extensión de el(los) ácido(s) nucleico(s) de la invención, donde la extensión puede ser de tan solo un nucleótido de largo. La unión del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, con preferencia a una molécula seleccionada del grupo que comprende MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina, puede ser determinada por los expertos en la técnica mediante experimentos de rutina, o mediante el uso o la adopción de un método como el descrito en la presente memoria, preferiblemente como el descrito en la presente memoria en la parte de los ejemplos. Está incluido en una realización de la presente invención, a menos que se indique explícitamente lo contrario, que siempre que se mencione en la presente memoria la unión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención a o con MCP-1, esto también se aplica a la unión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención a o con cualquier molécula seleccionada del grupo que comprende MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden ser tanto ácidos nucleicos D o ácidos nucleicos L. Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son ácidos nucleicos L. Además, es posible que una o varias partes del ácido nucleico estén presentes como ácidos nucleicos D o al menos una o varias partes de los nucleicos sean ácidos nucleicos L. El término "parte" de los ácidos nucleicos significará hasta solo un nucleótido. Tales ácidos nucleicos generalmente se mencionan en la presente memoria como ácidos nucleicos D y L, respectivamente. En consecuencia, en una realización particularmente preferida, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención consisten en nucleótidos L y comprenden al menos un nucleótido D. Dicho nucleótido D preferiblemente se une a una parte diferente de las extensiones que definen a los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, preferiblemente a las partes de los mismos en las que está involucrada una interacción con otras partes del ácido nucleico. Preferiblemente, dicho nucleótido D está unido a un extremo terminal de cualquiera de las extensiones y de cualquier ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, respectivamente. En una realización preferida adicional, dichos nucleótidos D pueden actuar como un espaciador o un conector, preferiblemente al unir modificaciones tales como PEG y HES a los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención.

También se engloba dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son parte de un ácido nucleico más largo en donde dicho ácido nucleico más largo comprende varias partes, en donde al menos una de dichas partes es un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, o una parte del mismo. La(s) otra(s) parte(s) de dichos ácidos nucleicos más largos pueden ser uno o varios ácidos nucleicos D o uno o varios ácidos nucleicos L. Se puede usar cualquier combinación en relación a la presente invención. Estas otras partes del ácido nucleico más largo tanto solas como consideradas en conjunto, tanto al completo como en una combinación particular, pueden exhibir una función que es diferente de la unión, preferiblemente de la unión a MCP-1. Una posible función es permitir la interacción con otras moléculas, en donde dichas otras moléculas preferiblemente son diferentes a la MCP-1, tal como, por ejemplo, para inmovilización, reticulado, detección o amplificación. En una realización adicional de la presente invención los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprenden, como restos individuales o combinados, varios de los ácidos nucleicos de la presente invención. Dicho

ácido nucleico que comprende varios de los ácidos nucleicos de la presente invención también está abarcado por la expresión "ácido nucleico más largo".

Los ácidos nucleicos L usados en la presente memoria son ácidos nucleicos que consisten en nucleótidos L, que preferiblemente consisten por completo en nucleótidos L.

- 5 Los ácidos nucleicos D usados en la presente memoria son ácidos nucleicos que consisten en nucleótidos D, que preferiblemente consisten por completo en nucleótidos D.

Los términos ácido nucleico y molécula de ácido nucleico se usan en la presente memoria en forma indistinta si no se indica explícitamente lo contrario.

- 10 Asimismo, si no se indica lo contrario, cualquier secuencia de nucleótidos se expone en la presente memoria en dirección 5' → 3'.

Con independencia de si el ácido nucleico de la invención consiste en nucleótidos D, nucleótidos L o una combinación de ambos, siendo una combinación por ej., una combinación al azar o una secuencia definida de extensiones que consisten en por lo menos un nucleótido L y por lo menos un ácido nucleico D, el ácido nucleico puede consistir en desoxirribonucleótido(s), ribonucleótido(s) o combinaciones de los mismos.

- 15 El diseño de ácidos nucleicos inventivos como el ácido nucleico L es ventajoso por diversas razones. Los ácidos nucleicos L son enantiómeros de los ácidos nucleicos naturales. Los ácidos nucleicos D, sin embargo, no son muy estables en disoluciones acuosas y en particular en sistemas biológicos o muestras biológicas debido a la extendida presencia de nucleasas. Las nucleasas naturales, en particular las nucleasas de células animales, no son capaces de degradar ácidos nucleicos L. Debido a esto, la vida media biológica del ácido nucleico L aumenta significativamente en dicho sistema, que incluye al cuerpo animal y humano. Debido a la falta de degradabilidad del ácido nucleico L, no se generan productos de degradación de nucleasas y por tanto no se observan efectos secundarios provenientes de los mismos. Este aspecto delimita al ácido nucleico L entre objetivamente todos los otros compuestos que se usan en la terapia de enfermedades y/o trastornos que involucran la presencia de MCP-1. Los ácidos nucleicos L que se unen específicamente a una molécula diana a través de un mecanismo diferente del emparejamiento de bases Watson Crick, o aptámeros que consisten de forma parcial o completa en nucleótidos L, en particular con las partes del aptámero que están involucradas en la unión del aptámero a la molécula diana, también se llaman en spiegelmeros.
- 20
- 25

- También está incluido en la presente invención que los ácidos nucleicos de la invención, también denominados en la presente memoria ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, sin tener en cuenta si están presentes como ácidos nucleicos D, ácidos nucleicos L o ácidos nucleicos D,L o si son ADN o ARN, pueden estar presentes como ácidos nucleicos de cadena simple o cadena doble. Típicamente, los ácidos nucleicos de la invención son ácidos nucleicos de cadena simple que exhiben estructuras secundarias definidas debidas a la secuencia primaria y de este modo pueden formar estructuras terciarias. Los ácidos nucleicos de la invención, sin embargo, también pueden ser de cadena doble en el sentido en que dos cadenas que son complementarias o parcialmente complementarias entre sí se hibridan entre sí. Esto confiere estabilidad al ácido nucleico que, en particular, será ventajoso si el ácido nucleico está presente en forma D más que en forma L.
- 30
- 35

- Los ácidos nucleicos de la invención se pueden modificar. Tales modificaciones se pueden referir al nucleótido único del ácido nucleico y son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de tal modificación son los que se describen, entre otros, en Venkatesan (2003); Kusser (2000); Aurup (1994); Cummins (1995); Eaton (1995); Green (1995); Kawasaki (1993); Lesnik (1993); y Miller (1993). Dicha modificación puede ser un átomo de H, un átomo de F o grupo O-CH₃ o grupo NH₂ en la posición 2' del nucleótido individual que forma parte del ácido nucleico. Asimismo, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos un nucleótido LNA. En una realización el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención consiste en nucleótidos LNA.
- 40

- En una realización, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden ser un ácido nucleico multiparte. Un ácido nucleico multiparte tal como se usa en la presente memoria, es un ácido nucleico que consiste en al menos dos cadenas de ácido nucleico. Dichas al menos dos cadenas de ácido nucleico forman una unidad funcional donde la unidad funcional es un ligando de una molécula diana. Las al menos dos cadenas de ácido nucleico pueden derivar de cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención tanto por ruptura del ácido nucleico para generar dos cadenas o por síntesis de un ácido nucleico correspondiente a una primera parte de la invención, es decir, un ácido nucleico total y otro ácido nucleico correspondiente a la segunda parte del ácido nucleico total. Se reconoce que se puede aplicar tanto la ruptura como la síntesis para generar un ácido nucleico multiparte donde hay más de dos cadenas como se ejemplificó anteriormente. En otras palabras, las al menos dos cadenas de ácido nucleico son típicamente diferentes de las dos cadenas que son complementarias y que se hibridan entre sí, si bien puede existir un cierto grado de complementariedad entre las diversas partes de ácido nucleico.
- 45
- 50

- Finalmente también está incluido en la presente invención que se realice una estructura completamente cerrada, es decir una estructura circular, para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, es decir, que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención están cerrados, preferiblemente mediante una unión
- 55

covalente, en donde más preferiblemente dicha unión covalente se realiza entre el extremo 5' y el extremo 3' de las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria.

Los presentes inventores han descubierto que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención exhiben un rango de valores de K_D muy favorable.

5 Una posibilidad para determinar la constante de unión es el uso del llamado dispositivo biacore, que también es conocido por los expertos en la técnica. La afinidad, tal como se usa en la presente memoria, también se midió mediante el uso del "ensayo de unión" descrito en los ejemplos. Una medida apropiada para expresar la identidad de la unión entre el ácido nucleico según la diana que en el presente caso es MCP-1, es el llamado valor de K_D que tanto como tal como el método para su determinación son conocidos por los expertos en la técnica.

10 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se caracterizan por un determinado valor de K_D . Preferiblemente, el valor de K_D mostrado por los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención es inferior a 1 μM . Se dice que un valor de K_D de aproximadamente 1 μM es característico de una unión no específica de un ácido nucleico a una diana. Como reconocerán los expertos en la técnica, el valor de K_D de un grupo de compuestos tal como los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención está dentro de un rango determinado. La K_D mencionada anteriormente de aproximadamente de 1 μM es un límite superior preferido para el valor de K_D . El límite inferior preferido para el K_D de los ácidos nucleicos que se unen a diana puede ser aproximadamente 10 picomolar o superior. Está incluido en la presente invención que los valores de K_D de los ácidos nucleicos individuales que se unen a MCP-1 preferiblemente están dentro de este rango. Los rangos preferidos se pueden definir por la elección de un primer número dentro de este rango y cualquier segundo número dentro de este rango. Los valores superiores preferidos son 250 nM y 100 nM, los valores inferiores preferidos son 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM y 10 pM.

Las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden tener cualquier longitud con la condición de que todavía sean capaces de unirse a la molécula diana. En la técnica se reconocerá que existen longitudes preferidas de los ácidos nucleicos de acuerdo con las presentes invenciones. Típicamente, la longitud está entre 15 y 120 nucleótidos. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier número entero entre 15 y 120 es una longitud posible para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los rangos más preferidos para la longitud de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son longitudes de aproximadamente 20 a 100 nucleótidos, aproximadamente 20 a 80 nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos, aproximadamente 20 a 50 nucleótidos y aproximadamente 30 a 50 nucleótidos.

Está incluido en la presente invención que los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria comprenden un residuo que preferiblemente es un residuo de alto peso molecular y/o que preferiblemente permite modificar las características del ácido nucleico en términos de, entre otros, tiempo de residencia en el cuerpo del animal, preferiblemente el cuerpo humano. Una realización particularmente preferida de tal modificación es la PEGilación y la HESilación de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Tal como se usan en la presente memoria PEG quiere decir poli(etilenglicol) y HES hidroxietilalmidón. La PEGilación tal como se usa preferiblemente en la presente memoria es la modificación de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención donde tal modificación consiste en un residuo PEG que está unido a un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. La HESilación tal como se usa preferiblemente en la presente memoria es la modificación de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención donde tal modificación consiste en un residuo HES que está unido a un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Estas modificaciones, además de los procesos para modificar un ácido nucleico mediante tales modificaciones, se describen en la Solicitud de Patente Europea EP 1 306 382.

Preferiblemente, el peso molecular de una modificación que consiste en, o que comprende, un residuo de alto peso molecular es aproximadamente de 2.000 a 200.000 Da, preferiblemente de 20.000 a 120.000 Da, particular en el caso de que dicho residuo de peso molecular alto sea PEG, y preferiblemente es aproximadamente de 3.000 a 180.000 Da, más preferiblemente de 5.000 a 130.000 Da, en particular en el caso de que dicho residuo de peso molecular alto sea HES. El proceso de modificación con HES, por ej., se describe en la solicitud de patente alemana DE 1 2004 006 249.8.

Está incluido en la presente invención que tanto el PEG como el HES se pueden usar en forma lineal o ramificada, tal como se describe adicionalmente en las solicitudes de patente WO2005074993 y PCT/EP02/11950. Tal modificación se puede realizar, en principio, en las moléculas de ácido nucleico de la presente invención en cualquier posición de las mismas. Preferiblemente, dicha modificación se realiza tanto en el nucleótido del extremo 5'-terminal como en el nucleótido del extremo 3'-terminal y/o cualquier nucleótido entre el nucleótido 5' y el nucleótido 3' de la molécula de ácido nucleico.

La modificación y preferiblemente el residuo PEG y/o HES se pueden unir a la molécula de ácido nucleico de la presente invención tanto de forma directa como a través de un conector. También está incluido en la presente invención que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende una o más modificaciones, preferiblemente uno o más residuos PEG y/o HES. En una realización la molécula de conector individual une más de un residuo PEG o residuo HES a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El conector usado en relación con la presente invención puede ser en sí mismo lineal o ramificado. Esta

clase de conectores son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en las solicitudes de patente WO2005074993 y PCT/EP02/11950.

Sin pretender establecer ninguna teoría, parece que al modificar los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención con un residuo de alto peso molecular tal como un polímero y más particularmente los polímeros descritos en la presente memoria, que preferiblemente son aceptables para uso fisiológico, se modifica la cinética de excreción. Más particularmente, parece que debido al aumento del peso molecular de tales ácidos nucleicos de la invención modificados y debido a que los ácidos nucleicos no se someten al metabolismo en particular cuando están en forma L, disminuye la excreción de un cuerpo de animal, preferiblemente de un cuerpo de mamífero y más preferiblemente de un cuerpo humano. Ya que la excreción típicamente se produce por medio de los riñones, los presentes inventores suponen que la velocidad de filtración glomerular del ácido nucleico modificado de este modo está significativamente reducida en comparación con los ácidos nucleicos que no tienen esta clase de modificación de alto peso molecular que produce un aumento en el tiempo de residencia en el cuerpo. En relación con lo mismo, es particularmente digno de mención que, a pesar de tal modificación de alto peso molecular, la especificidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no se ve afectada de una forma perjudicial. En la medida de lo posible, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención tienen características sorprendentes –que normalmente no se pueden esperar en los compuestos activos para uso farmacéutico– de tal modo que no es necesario que una formulación farmacéutica proporcione una liberación sostenida para proporcionar una liberación sostenida. Más bien, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención en su forma modificada que comprende un residuo de alto peso molecular, se pueden usar como tales como una formulación de liberación sostenida. En la medida de lo posible, la(s) modificación(es) de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria y las moléculas de ácidos nucleicos modificadas de este modo, y cualquier composición que comprenda las mismas, pueden proporcionar una farmacocinética y una biodistribución de la misma distintas, preferiblemente controladas. Esto también incluye el tiempo de residencia en circulación y la distribución a los tejidos. Tales modificaciones se describen adicionalmente en la Solicitud de Patente PCT/EP02/11950.

Sin embargo, también está incluido en la presente invención que los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria no comprenden cualquier modificación y en particular ninguna modificación de alto peso molecular tal como la PEGilación o la HESilación. Tal realización es particularmente preferida cuando el ácido nucleico muestra una distribución preferencial a un órgano o tejido diana cualquiera del cuerpo. Los agentes de ácido nucleico con dicho perfil distributivo permitirían el establecimiento de las concentraciones locales efectivas en el tejido diana a la vez que se mantiene una baja concentración sistémica. Esto permitiría el uso de dosis bajas, lo que no solo es beneficioso desde un punto de vista económico sino que también reduce la exposición innecesaria de otros tejidos al agente de ácido nucleico, reduciendo de este modo el riesgo potencial de efectos secundarios.

Los ácidos nucleicos de la invención, que también se denominan en la presente memoria ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, y/o los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para la generación o fabricación de un medicamento. Dicho medicamento o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene al menos uno de los ácidos nucleicos de la invención, opcionalmente junto con otros compuestos farmacéuticamente activos, donde el ácido nucleico de la invención preferiblemente actúa él mismo como compuesto farmacéuticamente activo. Tales medicamentos comprenden en realizaciones preferidas al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo puede ser, por ej., agua, disolución salina, PBS, disolución de glucosa, preferiblemente una disolución equilibrada con sal de glucosa al 5%, almidón, azúcar, gelatina o cualquier otra sustancia vehículo aceptable. Tales vehículos son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. El experto en la técnica reconocerá que cualquiera de las realizaciones, usos y aspectos del medicamento de la presente invención, o relacionados con el mismo, también son aplicables a la composición farmacéutica de la presente invención y viceversa.

La indicación, enfermedades y trastornos para el tratamiento y/o prevención para los cuales los ácidos nucleicos, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de acuerdo con la presente invención, o preparados de acuerdo con ella, provienen de la participación, tanto directa como indirecta, de la MCP-1 en el mecanismo patogénico respectivo. Sin embargo, estas indicaciones, enfermedades y trastornos también se pueden tratar y prevenir en el mecanismo patogénico en el cual MCP-2, MCP-3, MCP-4 y/o eotaxina están involucradas de forma directa o indirecta. Es obvio para los expertos en la técnica que en particular los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en la medida de lo posible, es decir, para las enfermedades en las que participan en el sentido más amplio MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina, que interactúan y se unen, respectivamente, a MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina, respectivamente.

Más específicamente, tales usos surgen, entre otros, del patrón de expresión de MCP-1 que sugiere que cumple funciones importantes en las enfermedades humanas que se caracterizan por la infiltración de células mononucleares. Tal infiltración de células está presente en muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En modelos animales, se ha demostrado que la MCP-1 se expresa en el cerebro después de una isquemia focal (Kim 1995; Wang 1995) y durante la encefalomiелitis autoinmune experimental (Hulkower 1993; Ransohoff 1993; Banisior 2005). La MCP-1 puede ser una quimiocina importante que se dirige a las células mononucleares en el proceso de la enfermedad ilustrado por estos modelos animales, tal como accidente cerebrovascular y esclerosis múltiple.

Un gran conjunto de evidencias argumenta a favor de un papel único del eje MCP-1/CCR2 en la quimiotaxis de

monocitos y, por tanto, en la inflamación crónica: (i) los ratones deficientes en MCP-1 o CCR2 muestran una respuesta quimiotáctica de macrófagos extremadamente reducida mientras que por otra parte parecen normales (Kuziel 1997; Kurihara 1997; Boring 1997; Lu 1998). (ii), a pesar de la redundancia funcional con otras quimiocinas *in vitro*, la pérdida de función efectora de la MCP-1 sola es suficiente para alterar la circulación monocítica en varios modelos inflamatorios (Lloyd 1997; Furuichi 2003; Egashira 2002; Galasso 2000; Ogata 1997; Kennedy 1998; Gonzalo 1998; Kitamoto 2003). (iii), los niveles de MCP-1 se elevan en muchas enfermedades inflamatorias. De hecho, se considera que la MCP-1 desempeña un papel en muchas enfermedades con y sin componente inflamatorio obvio tal como la artritis reumatoide (Koch 1992; Hosaka 1994; Akahoshi 1993; Harigai 1993; Rollins 1996), la enfermedad renal (Wada 1996; Viedt 2002), la restenosis después de angioplastia (Economou 2001), la alergia y el asma (Alam 1996; Holgate 1997; Gonzalo 1998), el cáncer (Salcedo 2000; Gordillo 2004), la aterosclerosis (Nelken 1991; Yla-Herttuala 1991; Schwartz 1993; Takeya 1993; Boring 1998), la psoriasis (Vestergaard 2004), la inflamación del sistema nervioso (Huang 2001), la dermatitis atópica (Kaburagi 2001), la colitis (Okuno 2002), la endometriosis (Jolicoeur 2001), la uveítis (Tuailon 2002), los trastornos retinianos (Nakazawa 2007), la fibrosis pulmonar idiopática y la sarcoidosis (Iyonaga 1994) y la polimiositis/dermatomiositis (De Bleecker 2002).

La intervención terapéutica con agentes anti-MCP-1 – o antagonistas de CCR2 – debería afectar al exceso de circulación de monocitos inflamatorios pero puede disminuir la circulación basal de fagocitos, evitando de este modo la inmunosupresión general y el riesgo aumentado de infecciones (Dawson 2003).

Además, en base al creciente conocimiento de los mecanismos moleculares del proceso inflamatorio y la interacción de los mediadores de la inflamación secretados localmente, se han identificado nuevas dianas para la terapia de las enfermedades renales (Holdsworth 2000; Segerer 2000). Una de estas dianas, para la cual existen datos rigurosos de estudios de expresión e intervención con antagonistas específicos en modelos animales apropiados, es la MCP-1. Esta proteína tiene un papel ampliamente no redundante en el reclutamiento de células inmunes a los sitios de inflamación renal. Se considera que la infiltración de células inmunes al riñón es un mecanismo principal de daño estructural renal y de deterioro de la función renal en el desarrollo de diversas formas de enfermedad renal.

Todos los tipos de células renales pueden expresar quimiocinas que incluyen a la MCP-1 tras estimulación *in vitro* (Segerer 2000); existe una larga lista de estímulos que desencadenan la expresión de MCP-1 *in vitro* que incluye a las citocinas, radicales oxígeno, complejos inmunes y mediadores lipídicos.

En riñones sanos de ratas y ratones, la MCP-1 no está expresada, pero se regula por aumento fácilmente durante el curso de inflamación renal aguda y crónica en modelos de roedores que incluyen la glomerulonefritis de complejos inmunes, la glomerulonefritis progresiva rápida, la glomerulonefritis proliferativa, la neuropatía diabética, la neuropatía obstructiva o la necrosis tubular aguda (Segerer 2000; Anders 2003). Los datos de expresión para MCP-1 en roedores se correlacionan bien con la respectiva expresión observada en biopsias renales humanas (Rovin 1994; Cockwell 1998; Wada 1999). Además, la expresión renal en riñones humanos se asocia a la actividad de la enfermedad y disminuye cuando una terapia apropiada induce la remisión de la enfermedad (Amann 2003).

La infiltración de células mononucleares glomerulares se asocia al desarrollo de una glomeruloesclerosis difusa en pacientes con nefropatía diabética. La MCP-1 cumple un papel importante en el reclutamiento y la acumulación de monocitos y linfocitos dentro del glomérulo (Banba 2000; Morii 2003).

La MCP-1 producida localmente parece estar particularmente involucrada en el inicio y la progresión del daño tubulointersticial, documentado en experimentos con ratones transgénicos con nefritis inducida por suero nefrotóxico (NSN). Se detectó MCP-1 principalmente en las células endoteliales vasculares, en las células epiteliales tubulares y en las células infiltradas mononucleares en lesiones intersticiales. La activación mediada por MCP-1 de las células epiteliales tubulares es compatible con la idea de que la MCP-1 contribuye a la inflamación tubulointersticial, un marcador de enfermedad renal progresiva (Wada 2001; Viedt 2002).

Debido a la homología entre la MCP-1 por un lado y las MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina por otro, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, al menos los que interactúan o se unen a MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina, respectivamente, se pueden usar típicamente para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de cualquier enfermedad en la que MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina, respectivamente, están involucradas de forma directa o indirecta. "Involucrado", tal como se usa preferiblemente en la presente memoria, significa que si se impide a la molécula respectiva que está involucrada en la enfermedad ejercer una, varias o todas sus funciones en relación con el mecanismo patogénico subyacente a la enfermedad, la enfermedad se curará o disminuirá el grado de la misma o se evitará el inicio de la misma; se aliviarán y mejorarán al menos los síntomas o algún indicador de dicha enfermedad, respectivamente, de modo que los síntomas e indicador, respectivamente, son idénticos o próximos a los que se observan en un sujeto que no padece la enfermedad o no está en riesgo de desarrollar tal enfermedad.

Naturalmente, debido a que los ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de acuerdo con la presente invención interactúan con, o se unen a, MCP-1 humana o murina, un experto generalmente entenderá que los ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de acuerdo con la presente invención se pueden usar con facilidad para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de cualquier enfermedad de seres humanos y animales descrita en la presente memoria.

Estos miembros de la familia de proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP), es decir, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina comparten por tanto un alto grado de semejanza de secuencia con la MCP-1. Si bien no exclusivamente, la eotaxina, MCP-2, -3, y -4 interactúan por medio de CCR3, el receptor de quimiocina característico de los eosinófilos humanos (Heath 1997). El receptor CCR3 se regula por aumento en condiciones neoplásicas, tales como el linfoma de células T cutáneo (Kleinhans 2003), el glioblastoma (Kouno 2004) o el carcinoma de células renales (Johrer 2005).

Más específicamente, los niveles aumentados de eotaxina se asocian directamente con el diagnóstico de asma y función pulmonar comprometida (Nakamura 1999). Se ha observado una expresión elevada de eotaxina en los sitios de inflamación alérgica tanto de asmáticos atópicos como no atópicos (Ying 1997; Ying 1999). También, los ARNm que codifican para MCP-2 y -4 se expresan de forma constitutiva en una variedad de tejidos; sin embargo, se desconocen sus funciones fisiológicas en estos contextos. Los niveles plasmáticos de MCP-2 están elevados en la sepsis junto con la MCP-1 (Bossink 1995); la expresión de MCP-3 se produce en asmáticos (Humbert 1997). Finalmente, la MCP-4 se puede hallar en la superficie luminal de los vasos ateroscleróticos (Berkhout 1997).

Por consiguiente, la enfermedad y/o trastornos y/o condiciones de enfermedad para el tratamiento y/o prevención de las cuales se puede usar el medicamento de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación a enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, encefalomiелitis autoinmune, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple aguda y crónica, inflamación crónica, artritis reumatoide, enfermedades renales, restenosis después de la angioplastia, reacciones alérgicas aguda y crónica, reacciones inmunológicas y alérgicas primarias y secundarias, asma, conjuntivitis, bronquitis, cáncer, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca cardiovascular arteriosclerótica o accidente cerebrovascular, psoriasis, artritis psoriática, inflamación del sistema nervioso, dermatitis atópica, colitis, endometriosis, uveítis, trastornos retinianos que incluyen degeneración macular, desprendimiento de retina, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, retinitis pigmentaria, vitreorretinopatía proliferativa y coriorretinopatía serosa central; fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, polimiositis, dermatomiositis, anulación de la inmunosupresión, reducción del riesgo de infección, sepsis, inflamación renal, glomerulonefritis, glomerulonefritis progresiva rápida, glomerulonefritis proliferativa, neuropatía diabética, nefropatía obstructiva, necrosis tubular aguda y glomeruloesclerosis difusa, lupus eritematoso sistémico, bronquitis crónica, enfermedad de Behçet, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aterosclerosis prematura después de la enfermedad de Kawasaki, infarto de miocardio, obesidad, enfermedad hepática crónica, enfermedad de Peyronie, lesión de médula espinal aguda, trasplante de pulmón o riñón, miocarditis, enfermedad de Alzheimer y neuropatía, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, hamartoma, carcinoma colorrectal, adenoma colónico, pancreatitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.

En una realización adicional, el medicamento comprende un agente adicional farmacéuticamente activo. Tales compuestos adicionales farmacéuticamente activos son, entre otros, aunque sin limitación, los conocidos para controlar la presión arterial y la diabetes, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y bloqueantes del receptor de angiotensina. El compuesto adicional farmacéuticamente activo puede ser, en una realización adicional, también uno de los compuestos que reducen la infiltración de células inmunes en los sitios de inflamación crónica o que suprimen generalmente la respuesta inmune exuberante que está presente en los estados inflamatorios crónicos y que conducen al daño de tejidos. Tales compuestos pueden ser, aunque sin limitación, esteroides o supresores inmunológicos y preferiblemente se seleccionan del grupo que comprende corticoides como prednisona, metilprednisolona, hidrocortisona, dexametasona e inmunosupresores generales tales como ciclofosfamida, ciclosporina, clorambucilo, azatioprina, tacrolimus o micofenilato de mofetilo. Adicionalmente, son útiles en realizaciones adicionales bloqueantes más específicos de la coestimulación de células T, por ej., bloqueantes de CD154 o CD40 o CD28 o CD86 o CD80; o agentes de reducción de células T- y/o B como un agente anti-CD20. Finalmente, el agente adicional farmacéuticamente activo puede ser un modulador de la actividad de cualquier otra quimiocina que puede ser un agonista o antagonista de quimiocina o un agonista o un antagonista del receptor de quimiocina. De forma alternativa, o adicional, dicho agente adicional farmacéuticamente activo es un ácido nucleico adicional de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, el medicamento comprende al menos un ácido nucleico más que se une a una molécula diana diferente de MCP-1 o que exhibe una función que es diferente a uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención.

Está incluido en la presente invención que el medicamento se usa de forma alternativa o adicional, en principio, para la prevención de cualquiera de las enfermedades descritas en relación con el uso del medicamento para el tratamiento de dichas enfermedades. Por lo tanto, los marcadores respectivos, es decir, para las enfermedades respectivas, son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el marcador respectivo es la MCP-1. De forma alternativa o adicional, el marcador respectivo se selecciona del grupo que comprende MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina. Un grupo adicional de marcadores se selecciona del grupo que comprende anticuerpos autorreactivos en el plasma, tal como, por ejemplo, anticuerpos anti-ADNs o factor reumatoide.

En una realización del medicamento de la presente invención, dicho medicamento es para uso en combinación con otros tratamientos para cualquiera de las enfermedades descritas en la presente memoria, en particular aquellas en las que se usa el medicamento de la presente invención.

"Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de un medicamento de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico para proporcionar el efecto beneficioso a partir de la co-acción de dichos agentes terapéuticos, es decir, el medicamento de la presente invención y dicho segundo agente. El efecto beneficioso de la combinación incluye, aunque sin limitación, la co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se realiza típicamente durante un período de tiempo determinado (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

"Terapia de combinación" puede, aunque generalmente no lo pretende, abarcar la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapias separadas, que en forma intencional y arbitraria producen las combinaciones de la presente invención. "Terapia de combinación" pretende abarcar la administración de dichos agentes terapéuticos de forma sucesiva, o sea, donde cada agente terapéutico se administra a un tiempo diferente, así como también la administración de dichos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una forma sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración a un sujeto de una cápsula única que tiene una proporción fija de cada agente terapéutico o en cápsulas múltiples, únicas para cada uno de los agentes terapéuticos.

La administración de forma sucesiva o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede efectuar por cualquier vía apropiada, lo que incluye, aunque sin limitación, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de las membranas mucosas de los tejidos. Los agentes terapéuticos se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, se puede administrar un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada mediante inyección mientras que los otros agentes terapéuticos de la administración se pueden administrar por vía tópica.

Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por vía tópica o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección. La secuencia en que se administran los agentes terapéuticos no es rigurosamente crítica a menos que se indique lo contrario. "Terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se describió anteriormente en otra combinación con otros componentes biológicamente activos. Cuando la terapia de combinación además comprende un tratamiento sin fármacos, el tratamiento sin fármacos se puede realizar en cualquier momento adecuado siempre que se obtenga un efecto beneficioso a partir de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármacos. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se obtiene todavía cuando el tratamiento sin fármacos se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás durante días o incluso durante semanas.

Como se describió en términos generales anteriormente, el medicamento de acuerdo con la presente invención se puede administrar, en principio, de cualquier forma conocida para los expertos en la técnica. Una vía preferida de administración es la administración sistémica, más preferiblemente por vía parenteral, preferiblemente mediante inyección. Alternativamente, el medicamento se puede administrar en forma local. Otras vías de administración comprenden la vía intramuscular, intraperitoneal, y subcutánea, por boca, intranasal, intratraqueal o pulmonar con preferencia dada para la vía de administración que sea menos invasiva, siempre que garantice la eficiencia.

La administración parenteral generalmente se usa para las inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Adicionalmente, un método para la administración parenteral emplea la implantación de sistemas de liberación lenta o liberación sostenida, que asegura que se mantenga un nivel constante de dosis, éstos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Además, los medicamentos preferidos de la presente invención se pueden administrar de forma intranasal mediante uso tópico de vehículos intranasales adecuados, inhalantes, o por vías transdérmicas, mediante las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidas por los expertos en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de aplicación transdérmica, la administración de la dosis será, naturalmente, continua más que intermitente a lo largo del régimen de dosis. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, ungüentos, lociones, sprays en aerosol y geles, donde la concentración del elemento activo típicamente variará entre 0,01% y 15%, p/p o p/v.

El medicamento de la presente invención generalmente comprenderá una cantidad efectiva de el(los) componente(s) activo(s) de la terapia, que incluyen, pero sin limitación, moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención, disueltos o dispersos en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los componentes activos suplementarios también se pueden incorporar en el medicamento de la presente invención.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica comprende al menos uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede ser cualquier vehículo o cualquier aglutinante usado y/o conocido en la técnica. Más particularmente dicho aglutinante o vehículo es cualquier vehículo

o aglutinante descrito en relación con la fabricación del medicamento descrito en la presente memoria. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende un agente farmacéuticamente activo adicional.

5 La preparación de un medicamento y una composición farmacéutica será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Típicamente, tales composiciones se pueden preparar como inyectables, tanto como disoluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para formar disoluciones, o suspensiones, 10 líquidas previas a la inyección; como comprimidos u otras formas sólidas para la administración oral; como cápsulas de liberación con el tiempo; o en cualquier otra forma usada habitualmente, que incluye gotas oculares, cremas, lociones, ungüentos, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en disoluciones salinas, por cirujanos, médicos o trabajadores de la salud para tratar un área particular en el campo de 15 operación también puede ser particularmente útil. Las composiciones también se pueden administrar por medio de microdispositivos, micropartículas o esponja.

En la formulación, se administrará un medicamento en una forma compatible con la formulación de la dosis y en tal proporción es farmacológicamente efectivo. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas 20 de dosis, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

En este contexto, la cantidad de componente activo y el volumen de la composición administrada dependen del individuo o del sujeto tratado. Las cantidades específicas del compuesto activo requeridas para la administración 25 dependen del criterio del profesional y son particulares para cada individuo.

Generalmente se utiliza un volumen mínimo del medicamento requerido para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para la administración son también variables, pero se tipificarían por la administración inicial del compuesto y la monitorización de los resultados, y después aplicando dosis controladas a intervalos adicionales. 30

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula (por ej., una cápsula de gelatina), el componente del fármaco activo, es decir, una molécula de ácido nucleico de la presente invención y/o cualquier otro agente farmacéuticamente activo, también denominado en la presente memoria agente(s) terapéutico(s) o 35 compuestos(s) activo(s), se puede combinar con un vehículo oral inerte, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y agentes colorantes adecuados a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, 40 edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y similares. Los desintegrantes incluyen, sin limitación, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantano, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o 45 mezclas efervescentes y similares. Los diluyentes incluyen, por ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

El medicamento de la invención también se puede administrar en formas de dosificación orales tales como comprimidos o cápsulas de liberación con el tiempo y liberación sostenida, pastillas, polvos, gránulos, elixires, 50 tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Los supositorios se preparan de forma ventajosa a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

La composición farmacéutica o medicamento se puede esterilizar y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, estos pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las 55 composiciones se preparan de acuerdo con los métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, y típicamente contienen aproximadamente de 0,1% a 75%, preferiblemente aproximadamente de 1% a 50%, del componente activo.

Las composiciones líquidas, en particular las inyectables, por ejemplo, se pueden preparar por disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, 60 por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar de este modo la disolución o suspensión inyectable. Adicionalmente, se pueden formular formas sólidas adecuadas para la disolución en líquido antes de la inyección.

Para las composiciones sólidas, los excipientes incluyen, en grado para uso farmacéutico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. El 65 compuesto activo definido anteriormente, también se puede formular como supositorios, usando como vehículo, por ejemplo, polialquilen glicoles, por ejemplo, propilen glicol. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan de forma ventajosa a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

Los medicamentos y las moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención también se pueden administrar en la forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como pequeñas vesículas unilaminares,

grandes vesículas unilaminares y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes lipídicos se hidrata con una disolución acuosa del fármaco para formar una capa lipídica que encapsula al fármaco, el cual es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden proporcionar como un complejo con un compuesto lipofílico o no inmunogénico, un compuesto de alto peso molecular construido mediante métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los liposomas pueden portar dichas moléculas de ácido nucleico en su superficie para identificar y transportar agentes citotóxicos internamente para mediar en la destrucción celular. Un ejemplo de complejos asociados a ácidos nucleicos se proporciona en la Patente de EE.UU. Nº 6.011.020.

Los medicamentos y las moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención también se pueden acoplar con polímeros solubles como vehículos de fármaco dirigidos. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxiethylspanamidofenol o polietilenoóxidopolilisina sustituida con residuos de palmitoilo. Además, los medicamentos y moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para obtener la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianocrilatos y copolímeros en bloque entrecruzados o anfipáticos de hidrogeles.

Si se desea, la composición farmacéutica y el medicamento, respectivamente, que se van a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulgentes, agentes tamponantes del pH y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato de sodio y oleato de trietanolamina.

El régimen de dosificación que usa las moléculas de ácido nucleico y los medicamentos, respectivamente, de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y la condición médica del paciente; la gravedad de la condición tratada; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular, o su sal, empleado. Un médico o veterinario experto puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de fármaco requerida para evitar, contrarrestar o detener el avance de la condición.

Los niveles plasmáticos efectivos del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención preferiblemente varían entre 500 fM y 500 μ M en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico y los medicamentos, respectivamente, de la presente invención preferiblemente se pueden administrar en una dosis única, cada dos o tres días, semanalmente, cada dos semanas, en una única dosis mensual o cada tres meses.

Está incluido en la presente invención que el medicamento descrito en la presente memoria constituye la composición farmacéutica descrita en la presente memoria.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un sujeto que necesita dicho tratamiento, donde el método comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de al menos uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. En una realización, el sujeto padece una enfermedad o está en riesgo de desarrollar dicha enfermedad, donde la enfermedad es alguna de las descritas en la presente memoria, en particular alguna de las enfermedades en relación con el uso de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento.

Debe entenderse que se puede usar tanto el ácido nucleico como los antagonistas de acuerdo con la presente invención no sólo como un medicamento o para la fabricación de un medicamento, sino también con propósitos cosméticos, en particular con respecto a la participación de la MCP-1 en las lesiones cutáneas regionales inflamadas. En consecuencia, una afección o enfermedad adicional para cuyo tratamiento o prevención se puede usar el ácido nucleico, el medicamento y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, son las lesiones cutáneas regionales inflamadas.

Tal como se usa preferiblemente en la presente memoria, un agente diagnóstico o medio diagnóstico es adecuado para detectar, tanto de forma directa como indirecta, la MCP-1, preferiblemente la MCP-1 descrita en la presente memoria y más preferiblemente la MCP-1 descrita en la presente memoria en relación con los diversos trastornos y enfermedades descritos en la presente memoria. Sin embargo, en la medida en que las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también se unen a cualquiera, algunas o todas las MCP-2, MCP-3, MCP-4 y eotaxina, dichas moléculas de ácido nucleico también se pueden usar para el diagnóstico de enfermedades y trastornos, respectivamente, el mecanismo patogénico está directa o indirectamente unido o asociado a la sobreexpresión o sobreactividad con MCP-2, MCP-3, MCP-4 y/o eotaxina. El diagnóstico es adecuado para la detección y/o el seguimiento de cualquiera de los trastornos y enfermedades, respectivamente, descritos en la presente memoria. Tal detección es posible a través de la unión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención a la MCP-1. Tal unión se puede detectar de forma directa o indirecta. Los métodos y medios respectivos son conocidos por los expertos en la técnica. Entre otros, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención

pueden comprender una marca que permite la detección de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, preferiblemente el ácido nucleico unido a MCP-1. Dicha marca se selecciona preferiblemente del grupo que comprende marcas radioactivas, enzimáticas y fluorescentes. En principio, todos los ensayos conocidos desarrollados para anticuerpos se pueden adoptar para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, siempre que el anticuerpo que se une a la diana se sustituya por un ácido nucleico que se una a la diana. En los ensayos de anticuerpos que usan anticuerpos que se unen a diana no marcada, la detección se realiza preferiblemente mediante un anticuerpo secundario que está modificado con marcas radiactivas, enzimáticas y fluorescentes, y se unen al anticuerpo que se une a la diana en su fragmento Fc. En el caso de un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico es modificado con dicha marca, donde preferiblemente dicha marca se selecciona del grupo que comprende biotina, Cy-3 y Cy-5, y dicha marca es detectada por un anticuerpo dirigido contra dicha marca, por ej., un anticuerpo anti-biotina, un anticuerpo anti-Cy3 o un anticuerpo anti-Cy5 ó – en el caso de que la marca sea biotina – la marca se detecta con estreptavidina o avidina que se unen de forma natural a la biotina. Tal anticuerpo, estreptavidina o avidina a su vez se modifican preferiblemente con una marca respectiva, por ej., una marca radioactiva, enzimática o fluorescente (como un anticuerpo secundario).

En una realización adicional las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se detectan o analizan mediante un segundo medio de detección, donde dicho segundo medio de detección es una baliza molecular. La metodología de la baliza molecular es conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, las sondas de ácidos nucleicos que también se mencionan como balizas moleculares son un complemento inverso de la muestra de ácidos nucleicos que se va a detectar y se hibridan por ello a una parte de la muestra de ácido nucleico que se va a detectar. Después de la unión a la muestra de ácido nucleico, los grupos fluoróforos de la baliza molecular se separan, lo que produce un cambio de la señal de fluorescencia, preferiblemente un cambio de intensidad. Este cambio se correlaciona con la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra.

Será reconocido que la detección de la MCP-1 mediante los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención permitirá en particular la detección de la MCP-1 definida en la presente memoria.

En relación con la detección de la MCP-1, un método preferido comprende los siguientes pasos:

- (a) proporcionar una muestra que se ensayará para determinar la presencia de la MCP-1,
- (b) proporcionar un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención,
- (c) hacer reaccionar la muestra con el ácido nucleico, preferiblemente en un recipiente de reacción

en donde el paso (a) se puede realizar antes del paso (b), o el paso (b) se puede realizar antes del paso (a).

En una realización preferida se proporciona un paso adicional d), que consiste en la detección de la reacción de la muestra con el ácido nucleico. Preferiblemente, el ácido nucleico del paso b) se inmoviliza en una superficie. La superficie puede ser la superficie de un recipiente de reacción tal como un tubo de reacción, un pocillo de una placa, o la superficie de un dispositivo contenido en tal recipiente de reacción, tal como, por ejemplo, una microesfera. La inmovilización del ácido nucleico en la superficie se puede realizar mediante cualquiera de los medios conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, aunque sin limitación, uniones no covalentes o covalentes. Preferiblemente, la unión se establece por medio de un enlace químico covalente entre la superficie y el ácido nucleico. Sin embargo, también está incluido en la presente invención que el ácido nucleico se inmovilice en forma indirecta a una superficie, donde tal inmovilización indirecta involucra el uso de un componente adicional o un par de compañeros de interacción. Dicho componente adicional preferiblemente es un compuesto que interactúa específicamente con el ácido nucleico inmovilizado, el cual también se denomina compañero de interacción, y de este modo media en la unión del ácido nucleico a la superficie. El compañero de interacción preferiblemente se selecciona del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos. Preferiblemente, el compañero de interacción es un anticuerpo, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Alternativamente, el compañero de interacción es un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico funcional. Más preferiblemente, dicho ácido nucleico funcional se selecciona del grupo que comprende aptámeros, spiegelmeros y ácidos nucleicos que son, al menos parcialmente, complementarios al ácido nucleico. En una realización alternativa adicional, la unión del ácido nucleico a la superficie está mediada por un compañero de interacción multiparte. Dicho compañero de interacción multi-parte preferiblemente es un par de compañeros de interacción que consisten en un primer miembro y un segundo miembro, donde el primer miembro está compuesto por o unido al ácido nucleico y el segundo miembro está comprendido por la superficie. El compañero de interacción multi-parte preferiblemente se selecciona del grupo de pares de compañeros de interacción que comprende biotina y avidina, biotina y estreptavidina, y biotina y neutravidina. Preferiblemente, el primer miembro del par de compañero de interacción es biotina.

Un resultado preferido de dicho método es la formación de un complejo inmovilizado de MCP-1 y ácido nucleico, donde más preferiblemente se detecta dicho complejo. Está incluido en una realización que a partir del complejo se detecte la MCP-1.

Un medio de detección respectivo que cumple con este requisito es, por ejemplo, cualquier medio de detección que sea específico para dicha(s) parte(s) de la MCP-1. Un medio de detección particularmente preferido es un medio de detección que se selecciona del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos, cuya

generación es conocida por los expertos en la técnica.

El método para la detección de la MCP-1 también comprende que la muestra sea eliminada del recipiente de reacción que se ha usado preferiblemente para realizar el paso c).

5 El método comprende en una realización adicional también el paso de inmovilización del compañero de interacción de la MCP-1 sobre una superficie, preferiblemente una superficie como la definida anteriormente, donde el compañero de interacción es el definido en la presente memoria y preferiblemente como se indicó anteriormente en relación con el método respectivo, y más preferiblemente comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos en sus diversas realizaciones. En esta realización, un medio de detección particularmente preferido es un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, donde dicho ácido nucleico preferiblemente puede estar marcado o no marcado. En el caso en que el ácido nucleico esté marcado, puede detectarse de forma directa o indirecta. Tal detección también puede incluir el uso de un segundo medio de detección que, preferiblemente, también se selecciona del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y realizaciones de las diversas realizaciones descritas en la presente memoria. Dichos medios de detección son preferiblemente específicos para el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. En una realización más preferida el segundo medio de detección es una baliza molecular. Tanto el ácido nucleico como el segundo medio de detección, o ambos, pueden comprender en una realización preferida una marca de detección. La marca de detección se selecciona preferiblemente del grupo que comprende biotina, una marca de bromo-desoxiridina, una marca de digoxigenina, una marca de fluorescencia, una marca UV, una radiomarca y una molécula quelante. Alternativamente, el segundo medio de detección interactúa con la marca de detección que preferiblemente está contenida, comprendida o unida al ácido nucleico. Las combinaciones particularmente preferidas son las siguientes:

la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra biotina, o en donde
 la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es una avidina o una molécula que porta avidina, o en donde
 25 la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es una estreptavidina o una molécula que porta estreptavidina, o donde
 la marca de detección es biotina y el segundo medio de detección es una neutravidina o una molécula que porta neutravidina, o en donde
 30 la marca de detección es una bromo-desoxiuridina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra bromo-desoxiuridina, o en donde
 la marca de detección es una digoxigenina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra digoxigenina, o en donde
 la marca de detección es un quelante y el segundo medio de detección es un radionucleido, en donde se prefiere que dicha marca de detección esté unida al ácido nucleico. Se debe reconocer que esta clase de combinación también es aplicable a la realización en la que el ácido nucleico está unido a la superficie. En tal realización se prefiere que la marca de detección esté unida al compañero de interacción.

Finalmente, también está incluido en la presente invención que el segundo medio de detección se detecte mediante un tercer medio de detección, preferiblemente el tercer medio de detección es una enzima, más preferiblemente que presenta una reacción enzimática después de la detección del segundo medio de detección, o el tercer medio de detección es un medio para detectar radiación, más preferiblemente radiación emitida por un radionucleido. Preferiblemente, el tercer medio de detección está detectando y/o interactuando específicamente con el segundo medio de detección.

También en la realización con un compañero de interacción de la MCP-1 que está inmovilizada en una superficie y el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, se agrega preferiblemente el complejo formado entre el compañero de interacción y la MCP-1, la muestra se puede retirar de la reacción, más preferiblemente del recipiente de reacción donde se realizan el paso c) y/o d).

En una realización el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende un residuo de fluorescencia y en donde la fluorescencia del residuo de fluorescencia es diferente después de la formación del complejo entre el ácido nucleico y MCP-1 y la MCP-1 libre.

50 En una realización adicional el ácido nucleico es un derivado del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, en donde el derivado del ácido nucleico comprende al menos un derivado fluorescente de adenosina que reemplaza una adenosina. En una realización preferida, el derivado fluorescente de adenosina es etenoadenosina.

En una realización adicional el complejo que consiste en el derivado del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la MCP-1 se detecta mediante fluorescencia.

55 En una realización del método, en el paso (c) o en el paso (d) se crea una señal y la señal se correlaciona preferiblemente con la concentración de MCP-1 de la muestra.

En un aspecto preferido, los ensayos se pueden realizar en placas de 96 pocillos, en donde los componentes se inmovilizan en los recipientes de reacción descritos anteriormente y los pocillos actúan como recipientes de reacción.

5 Será reconocido por los expertos en la técnica que lo dicho anteriormente también se aplica a MCP-2, MCP-3, MCP-4 y/o eotaxina, al menos en la medida que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también se unan a, o con, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y/o eotaxina.

10 El ácido nucleico de la invención se puede usar adicionalmente como material de partida para el diseño del fármaco. Básicamente hay dos métodos posibles. Un método es la identificación de bibliotecas de compuestos siempre que dichas bibliotecas de compuestos preferiblemente sean bibliotecas de compuestos de bajo peso molecular. En una realización, la identificación es una identificación de alto rendimiento. Preferiblemente, una identificación de alto rendimiento es la evaluación eficiente y rápida mediante prueba y error de los compuestos en un ensayo basado en la diana. En el mejor caso, los análisis se llevan a cabo mediante una medición colorimétrica. Las bibliotecas usadas en relación con los mismos son conocidas en la técnica.

15 Alternativamente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede usar para el diseño racional de fármacos. Preferiblemente, el diseño racional de fármacos es el diseño de una estructura guía de fármacos. Se parte de la estructura tridimensional de la diana que generalmente está identificada por métodos tales como cristalografía de rayos X o espectroscopía de resonancia magnética nuclear, se usan programas de computación para buscar a través de las bases de datos que contienen las estructuras de muchos compuestos químicos diferentes. La selección se hace mediante un ordenador, los compuestos identificados se pueden ensayar posteriormente en el laboratorio.

20 El diseño racional de fármacos puede iniciarse a partir del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención e involucra una estructura, con preferencia una estructura tridimensional, que es similar a la estructura de los ácidos nucleicos de la invención o idéntica a las partes que median la unión de la estructura de los ácidos nucleicos de la invención. En cualquier caso, dicha estructura todavía muestra la misma o similar unión característica de los ácidos nucleicos de la invención. En un paso adicional, o como un paso alternativo en el diseño racional de fármacos, preferiblemente la estructura tridimensional de estas partes de los ácidos nucleicos que se unen al neurotransmisor es imitada por grupos químicos que son diferentes de los nucleótidos y ácidos nucleicos. Por este mimetismo se puede diseñar un compuesto diferente de los ácidos nucleicos. Dicho compuesto preferiblemente es una molécula pequeña o un péptido.

25 En el caso de escrutinio de bibliotecas de compuestos, tal como por medio de ensayos competitivos que son conocidos por los expertos en la técnica, se pueden hallar análogos de MCP-1, agonistas de MCP-1 o antagonistas de MCP-1 apropiados. Tales ensayos competitivos se pueden ejecutar de la siguiente manera. El ácido nucleico de la invención, preferiblemente un spiegelmero que es un ácido nucleico L que se une a la diana, se acopla a una fase sólida. Para identificar los análogos de MCP-1 marcados se puede agregar MCP-1 al ensayo. Un análogo potencial debería competir con las moléculas de MCP-1 que se unen al spiegelmero, lo que debería venir acompañado de una disminución de la señal obtenida por la marca respectiva. La identificación de agonistas o antagonistas puede involucrar el uso de un ensayo de cultivo de células, conocido por los expertos en la técnica.

30 El kit de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos uno o varios de los ácidos nucleicos de la invención. Adicionalmente, el kit puede comprender al menos uno o varios controles positivos o negativos. Un control positivo, por ejemplo, puede ser MCP-1, en particular uno contra el cual se selecciona el ácido nucleico de la invención o al cual se une, preferiblemente, en una forma líquida. Un control negativo puede ser, por ej., un péptido que se define en términos de propiedades biofísicas similares a la MCP-1, pero que no es reconocido por los ácidos nucleicos de la invención. Además, dicho kit puede comprender uno o varios tampones. Los diversos componentes pueden estar contenidos en el kit en forma seca o liofilizada o disuelta en líquido. El kit puede comprender uno o varios recipientes que a su vez pueden contener uno o varios componentes del kit. En una realización adicional, el kit comprende unas instrucciones o folleto instructivo que proporcionan la información al usuario sobre cómo se usa el kit y sus diversos componentes.

35 La determinación farmacéutica y bioanalítica del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es esencial para la evaluación de su perfil farmacocinético y biodinámico en diversos humores, tejidos y órganos del cuerpo humano y no humano. Para tal propósito, se puede usar cualquiera de los medios de detección descritos en la presente memoria o conocidos por los expertos en la técnica. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un ensayo de hibridación tipo sándwich para la detección del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. En el ensayo de detección se usa una sonda de captura y una sonda de detección. La sonda de captura es complementaria con la primera parte y la sonda de detección con la segunda parte del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Tanto la sonda de captura como la de detección pueden estar formadas por nucleótidos de ADN, nucleótidos de ADN modificados, nucleótidos de ARN modificados, nucleótidos de ARN, nucleótidos LNA y/o nucleótidos de PNA.

En consecuencia, la sonda de captura comprende una extensión de secuencia complementaria con el extremo 5' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la sonda de detección comprende una extensión de

secuencia complementaria con el extremo 3' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. En este caso, la sonda de captura está inmovilizada sobre una superficie o matriz por medio de su extremo 5', en donde la sonda de captura puede estar inmovilizada directamente a su extremo 5' o por medio de un conector entre su extremo 5' y la superficie o matriz. Sin embargo, en principio el conector se puede unir a cada nucleótido de la sonda de captura.

5 El conector puede estar formado por conectores hidrofílicos conocidos por los expertos en la técnica o por nucleótidos de D-ADN, nucleótidos de D-ADN modificados, nucleótidos de D-ARN, nucleótidos de D-ARN modificados, nucleótidos de D-LNA, nucleótidos de PNA, nucleótidos de L-ARN, nucleótidos de L-ANA, nucleótidos de L-ARN modificados, nucleótidos de L-ADN modificados y/o nucleótidos de L-LNA.

10 Alternativamente, la sonda de captura comprende una extensión de secuencia complementaria con el extremo 3' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la sonda de detección comprende una extensión de secuencia complementaria con el extremo 5' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. En este caso, la sonda de captura está inmovilizada sobre una superficie o matriz por medio de su extremo 3', en donde la sonda de captura puede estar inmovilizada directamente a su extremo 3' o por medio de un conector entre su extremo 3' y la superficie o matriz. Sin embargo, en principio el conector se puede unir a cualquier nucleótido de la extensión de

15 secuencia complementaria con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El conector puede estar formado por conectores hidrofílicos conocidos por los expertos en el arte o por nucleótidos de D-ADN, nucleótidos de D-ADN modificados, nucleótidos de D-ARN, nucleótidos de D-ARN modificados, nucleótidos de D-LNA, nucleótidos de PNA, nucleótidos de L-ARN, nucleótidos de L-ADN, nucleótidos de L-ARN modificados, nucleótidos de L-ADN modificados y/o nucleótidos de L-LNA.

20 El número de nucleótidos de las sondas de captura y de detección que se pueden hibridar con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es variable y puede depender de la cantidad de nucleótidos de la sonda de captura y/o de detección y/o del propio ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El número total de nucleótidos de la sonda de captura y de detección que se pueden hibridar con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención deberá ser el número máximo de nucleótidos que están comprendidos por el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

25 El número mínimo de nucleótidos (de 2 a 10 nucleótidos) de la sonda de detección y de captura deberá permitir la hibridación en el extremo 5' o 3', respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Para obtener una alta especificidad y selectividad entre el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y otros ácidos nucleicos que aparecen en las muestras analizadas, el número total de nucleótidos de las sondas de captura y de detección deberá ser el número máximo de nucleótidos que están comprendidos por el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

30

Además, la sonda de detección preferiblemente porta una molécula marcadora o marca que se puede detectar como se ha descrito previamente en la presente memoria. La marca o molécula marcadora en principio puede unirse a cualquier nucleótido de la sonda de detección. Preferiblemente, la marca o molécula marcadora se ubica en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda de detección, en donde se puede insertar un conector entre los

35 nucleótidos de la sonda de detección que son complementarios con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la marca. El conector puede estar formado por conectores hidrofílicos conocidos en la técnica o por nucleótidos de D-ADN, nucleótidos de D-ADN modificados, nucleótidos de D-ARN, nucleótidos de D-ARN modificados, nucleótidos de D-LNA, nucleótidos de PNA, nucleótidos de L-ARN, nucleótidos de L-ADN, nucleótidos de L-ARN modificados, nucleótidos de L-ADN modificados y/o nucleótidos de L-LNA.

40 La detección del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo de la siguiente manera: El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se hibrida por uno de sus extremos a la sonda de captura y por el otro extremo a la sonda de detección. Después se elimina la sonda de detección no unida, por ej., mediante uno o varios pasos de lavado. La cantidad de sonda de detección unida, que preferiblemente porta una marca o molécula marcadora, se puede medir posteriormente.

45 Tal como se usa preferiblemente en la presente memoria, el término tratamiento comprende en una realización preferida adicional o alternativamente la prevención y/o el seguimiento.

Tal como se usa preferiblemente en la presente memoria, los términos de enfermedad y trastorno se usarán de forma indistinta, si no se indica lo contrario.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término comprende preferiblemente no pretende limitar el contenido seguido o descrito por tal término. Sin embargo, en una realización alternativa el término comprende se entenderá en el sentido de contener y por tanto como una limitación al contenido seguido o descrito por tal término.

Las diversas SEC ID N°, la naturaleza química de las moléculas del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y las moléculas MCP-1 diana tal como se usan en la presente memoria, la secuencia real y el número de referencia interno de las mismas, se sintetizan en la siguiente tabla.

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
1	L-proteína	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASRYRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQ TQTPKT	MCP-1 humana, huMCP-1, CCL2
2	L-proteína	QPDVAVNAPLTCYYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVFVTKLKREVCADPKKKEVWVQTYIKNLDLDR NQMRSEPTTLFKTASALRSSAPLNVKLRKSEANASTTFSSTTSSTSVGVTSTVN	MCP-1 de ratón, mCCL2, mMCP-1, MCP- 1 murina (Mus musculus)
3	L-proteína	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASRYRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQI QTPKP	MCP-1 de mono (Macaca mulatta)
4	L-proteína	QPDAINSPVTCCYTLTSKKISMQRMSYRRVTSSKCPKEAVIFKTIAGKEICAEPEKQKWWQDSISHLDKK NQTPKP	MCP-1 de cerdo (Sus scrofa)
5	L-proteína	QPDAIISPVTCCTYTLNKKISIQRLASRYKRVTSKCPKEAVIFKTVLNKEICADPKQKWWQDSMAHLDKKS QTQTA	MCP-1 de perro (Canis familiaris)
6	L-proteína	QPDVAVNSPVTCCTYFTNKTISVKRLMSYRRINSTKCPKEAVIFMTKLAKGICADPKQKWWQDAIANLDKK MQTPKTLTSYSTTQEHTNLSSTRTPSTTSL	MCP-1 de conejo (Oryctolagus cuniculus)
7	L-proteína	QPVGINSTTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWWQDFMKHLDKK TQTPKL	MCP-3 humana, CCL7, huMCP-3
8	L-proteína	GPASVPTTCCFNLNRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKWWQDSMKILDQKSP TPKP	eotaxina humana/CCL11
9	L-proteína	QPDSVSIPITCCFNINRKIPQIRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGEVADPKERWVRDSMKHLDQIFQ NLKP	MCP-2 humana, CCL8, huMCP-2
10	L-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGACCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	169-B1trc
11	L-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGACCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	169-F3trc
12	L-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGACCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	169-C1trc
13	L-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGACCGCGCCUGCAAUAUUGCGCGCU	169-A3trc
14	L-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUAGCAGGGGGCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	169-B2trc
15	L-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGUAGGGGGCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	176-B12trc
16	L-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGACAGGGGGCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	176-D9trc
17	L-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	176-B10trc
18	L-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	169-F2trc
19	L-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGCGCGCCUGCAAUAUUGCACGCGU	176-B9trc

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
20	L-ARN	AGCAUGCCCGGUGUGGCAGGGGGGGCGACCUGCAUUUGCAUGCU	176-H9trc
21	L-ARN	AGCGUGCCCGGUGUGGJAGGGGGCGCGACCUACAUUJGCACGGCU	176-E10trc
22	L-ARN	AGUGUGCCAGCUGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACACACACU	176-G9trc
23	L-ARN	AGUGUGCCAGCGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACACACACU	176-F9trc
24	L-ARN	AGUGUGCGAGCGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACAUAUCU	176-C11trc
25	L-ARN	AGUGUGCCAGCGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACAUAUCU	176-E11trc
26	L-ARN	AGUAUGCCAGCGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACAUAUCU	176-D10trc
27	L-ARN	AGUGUGCCAGUGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACACACACU	176-H10trc
28	L-ARN	AGCGUGCCAGUGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUUACACACGCU	176-C9trc
29	L-ARN	ACGCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGCGGCUCUGCGU	180-B1-001
30	L-ARN	ACGCACCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGCGC	180-A4-002
31	L-ARN	ACGCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGCGU	180-D1-002
32	L-ARN	GCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGCGU	180-D1-011
33	L-ARN	ACGCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGC	180-D1-012
34	L-ARN	GCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGC	180-D1-018
35	L-ARN	CGCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGCGU	180-D1-034
36	L-ARN	CGCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGCG	180-D1-035
37	L-ARN	GCACGUCUCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGUGGCUCUGCG	180-D1-036 = NOX-E36
38	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAUUGACAGCCCGAAUGCGCAGC	178-A8
39	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAUUGACAGCCUAAUGCUGGCAGC	178-F7
40	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAUUGACAGCCGAAUGCUGGCAGC	178-G7
41	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACUGCCAGUGGGUACAGAGCAGCAGC	178-C6
42	L-ARN	GUGCUGGGAGUUAAAAACUCCUAAGACAGCCAGCCGGCAGCAGC	178-E7
43	L-ARN	GUGCUGGGAGUUAAAAACUCCUAAGACAGCCAGCCAGCCGGCAGC	178-G6
44	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAUUGACAGCCUAAUGCUGGCAGC	178-A7
45	L-ARN	GUGCUGGGAGUUAAAAACUCCUAAGACAGCCUAGAGCCCGCAGC	178-C7

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
46	L-ARN	GUGCUGGGCGUGAAAAACGCCCCUGCGACUGCCUUUAUGAGGCAGGCAC	178-E5
47	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-F1
48	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACCCUGUGACAGCCGAAUUGCUGGCAGGCAC	181-B2
49	L-ARN	GUACUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGGCAC	181-C2
50	L-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGGCAC	178-A6
51	L-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAAGCGACAGGCUAGAGCCGGCAGGCAC	178-D6
52	L-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCAGGCAC	178-D5
53	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGGCAC	181-A2
54	L-ARN	GGCUGCGUAGUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCAGCC	178-D5-020
55	L-ARN	GGCGCGUAGUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCGCC	178-D5-027
56	L-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	178-D5-030
57	L-ARN	GUGCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-002
58	L-ARN	GUGCCGUAGUGAGAAAACUACCAAGGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-004
59	L-ARN	GUGCCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-005
60	L-ARN	GUGCUGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-006
61	L-ARN	UGCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCA	181-A2-007
62	L-ARN	GCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGAGC	181-A2-008
63	L-ARN	GCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGAGC	181-A2-011
64	L-ARN	GGUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGACC	181-A2-012
65	L-ARN	UGGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGC-CA	181-A2-015
66	L-ARN	GCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCC	181-A2-016
67	L-ARN	GUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-017
68	L-ARN	GG-GCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCCC	181-A2-018
69	L-ARN	GAGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCUC	181-A2-019
70	L-ARN	CGGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCCG	181-A2-020
71	L-ARN	CCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCGG	181-A2-021

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
72	L-ARN	CAGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCUG	181-A2-022
73	L-ARN	CUJCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAG	181-A2-023
74	L-ARN	AGCGGUUAGUGAAGUGGGUGGCGAGGUAAGGACACGCGU	184-B8trc
75	L-ARN	AGCGGUGUAGCGGUGUGGGUGGUAAGGUAAGGACACGCGU	184-C6trc
76	L-ARN	AGCGGAUAGAAGAGCGGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGCGU	184-H5trc
77	L-ARN	AGCGGUUAGGUAAGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACGCGU	184-A7trc
78	L-ARN	AGCGGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACACGCGU	187-A5trc
79	L-ARN	AGCGGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACACGCGU	187-H5trc
80	L-ARN	CCGCUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACACGCGG	174-D4-004
81	L-ARN	GCGCGAGCAGGUGGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACUCGCGUC	166-A4-002
82	L-ARN	CGUGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACACG	187-A5trc-001
83	L-ARN	GUGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACAC	187-A5trc-002
84	L-ARN	CGUGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACACG	187-H5trc-002
85	L-ARN	GUGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACAC	187-H5trc-003
86	L-ARN	UGUUAGGUGGGUGGUGGUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACAC	187-H5trc-004
87	L-ARN	GGACGAGAGUGACAAAUGAUUAACCCUCCUGACUAACGCGGCGGACAGG	177-B3
88	L-ARN	GGACCUAUCGCUAAGACAACCGCGAGUCUACGGGACAUUCUCCGCGGACAGG	177-C1
89	L-ARN	GGACAAUUGUUACCCCGGAGAGAGACAAAUGAGACAACCCUCCUGAAGACAGG	177-C2
90	L-ARN	GGACGAAAGUGAGAAAUGAUACAACCCUCCUGUUGGCGGAAUCCGGACAGG	177-E3
91	L-ARN	GGACGUAAAAGACGCUACCCGAAAGAAUGUCAGGAGGGUAGACCCGACAGG	177-D1
92	L-ARN	GGACUAGAAAACUACAAUAGCGGGCCAGUUGCACCCGCUUUAUCAACGACAGG	177-E1
93	L-ARN	GGACUAGUCAGCCAGUGUGUAUUCGGACGCGGGUUUAUUUACUGACAGG	177-A1
94	L-ARN	GGACUGUCCGGAGUGUAAAUCUCCCGAGACCCGCGAGGCGGGGACAGG	177-G3
95	L-ARN	GGACUUCUAUCCAGGUGGGUGGUAUUAAGGUAAGGUAAGGUAAGGACAGG	177-C3
96	L-ARN	GGACGAGCGGAACAUGAUUAACCCUCCUGACCGGAAAGAGAUUCGACAGG	177-A2
97	L-ARN	CCUGUGCUACACCGCAGUAAGAAGUGAACCGUUCAGUAUGUGGACACAGG	170-E4trc

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
98	L-ARN	CGUGAGCCAGGCACCGCAGGGCGUUAAACUGGCUGAUUGGACACGACACG	166-D2trc
99	L-ARN	CGUGAACAUUGCAGGCUAAGCGGGGCGUUGUUGUUGCUUGGCCCGCCACG	174-A2trc
100	L-ARN	CGUGCAGAGAGACCAACACCGUAAAAUCAACCUAAUUGGCCGCGCAGG	174-E2trc
101	L-ARN	CGUGCAGAGAGACCAACACCGUAAAAUCAACCUAAUUGGCCGCGCAGG	183-G3trc
102	L-ARN	CGUGAACAUUCAAGCUAAGCGGGGCGUUGUUGUUGCUUGGCCCGCCACG	183-B2trc
103	L-ARN	CGUGCCGAGGCGGCGACACGCUUACUUAAGAGAGGCUUUGGCACCCACG	166-B2trc
104	L-ARN	CGUGAUACAGCCGUCGGUCAAGAAAAACAAAGUUCGGCGCGCCACG	166-G3trc
105	L-ARN	CGUGGGUGGGCACCAGGGCGGAAAGCCACCAGUAAAGAUAGACCG	166-D1trc
106	L-ARN	CGUGUGAUCUCCUUGGGGUGAUUAGCUUAGAGACUUCGCCACACG	183-H2trc
107	L-ARN	GCACCUCCGCCUAAUACACGUGCCGGCAGCUAAUACUCGUCCGC	167-A7trc
108	L-ARN	GCACGACUUGGGCGACCAGUGAUACUUAAGAGACCAAGUCGUCGCG	167-C7trc
109	L-ARN	GCGCGCGUCAGUAAAGAAUUGAAAGUUCAGAAUUGUCGUCGCGC	167-B5trc
110	L-ARN	AGUGUGGGCAGGCUAAGGAGAUUUCGGAGACCACCGCU	184-D7trc
111	L-ARN	AGUGUGGGCAGACUUGGAUAGACUCCGAGACCACCGCU	184-D6trc
112	L-ARN	AGCGUGAGGGCACCAGCGAUUACUUAAGAGAGUCACCGCU	184-E5trc
113	L-ARN	AGCGUGAAGGGACCAGCGUUAACUUAACAGAGUUCACCGCU	184-G6trc
114	L-ARN	AGCGUGUGAUUGUAGCACCCGUAUCAGAGGACACCGCU	184-B7trc
115	L-ARN	AGCGUGAGGCGACCCGUGUUUCGUAAGAGAGUACACCGCU	184-B6trc
116	L-ARN	5'PEG-GCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUCUGCG	NOX-E36-5'PEG
117	L-ARN	GCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUCUGCG-3'PEG	NOX-E36-3'PEG
118	L-ARN	GAGUUGGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGCGGAGGCGGCCCCUUGAUUGAAUCCGGCCAUUC	188-A3-001
119	L-ARN	GAUGGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGCGGAGGCCCCUUGAUUGAAUCCGGCCAUUC	188-A3-004
120	L-ARN	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGCGGAGGCCCCUUGAUUGAAUCCGGCCAUUC	188-A3-005
121	L-ARN	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGCGGAGGCCCCUUGAUUGAAUCCGGCCAUUC	188-A3-006
122	L-ARN	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGCGGAGGCCCCUUGAUUGAAUCCGGCCAUUC	188-A3-007=tmNOX-E36
123	L-ARN	GCUGGUUACCCGAGGGGCGUUGGAGUUGGUUGGUUGUUCACCCAGC	189-G7-001

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
124	L-ARN	CUGGUUACCGAGGGGGGCGUUGGAGUUUGGUUUGGUUUGUACACCAG	189-G7-002
125	L-ARN	UGGUUACCGAGGGGGGCGUUGGAGUUUGGUUUGGUUUGGUUUGUACACCA	189-G7-003
126	L-ARN	GCCGGUUAACCGAGGGGGGCGUUGGAGUUUGGUUUGGUUUGUACACCGGC	189-G7-007
127	L-ARN	GCCGGCUAACCGAGGGGGGCGUUGGAGUUUGGUUUGGUUUGUACACCGGC	189-G7-008
128	L-ARN	GCGCGUACCGAGGGGGGCGUUGGAGUUUGGUUUGGUUUGUACACCGCG	189-G7-010
129	L-ARN	GGGCCUACCGAGGGGGGCGUUGGAGUUUGGUUUGGUUUGUACACCGCCC	189-G7-012
130	D-proteína	Biotina-QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKQWVQD-SMDHLDKQTQPKT	D-MCP-1 biotinilada humana
131	D-proteína	CYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVFVTKLKREVCADPKKEWVQTYIKNLDNRNMRSEP-Biotina	MCP-1 biotinilada de ratón
132	D-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGGACGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	169-B1trc
133	D-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGGACGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	169-F3trc
134	D-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGGACGCGACCUGAAUAAUUGCACGCU	169-C1trc
135	D-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGGACGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	169-A3trc
136	D-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUAGCAGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	169-B2trc
137	D-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGUAGGGGGGCGCGAUCAAAUUGCACGCU	176-B12trc
138	D-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGACAGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	176-D9trc
139	D-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGGCGCGACCUGAAUAAUUGCACGCU	176-B10trc
140	D-ARN	AGCGUGCCCCGGAGUGGCAGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	169-F2trc
141	D-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	176-B9trc
142	D-ARN	AGCAUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	176-H9trc
143	D-ARN	AGCGUGCCCCGGUGUGUAGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACGCU	176-E10trc
144	D-ARN	AGUGUGCCAGCUGUGAUGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACACU	176-G9trc
145	D-ARN	AGUGUGCCAGCUGAUGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACACU	176-F9trc
146	D-ARN	AGUGUGCCAGCUGAUGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACU	176-C11trc
147	D-ARN	AGUGUGCCAGCUGAUGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACU	176-E11trc
148	D-ARN	AGUAGCCAGCUGAUGGGGGGCGCGACCUGCAAUAAUUGCACU	176-D10trc

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
149	D-ARN	AGUGCCAGUGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUACACACU	176-H10trc
150	D-ARN	AGCGUGCCAGUGUGAUGGGGGGGCGACCCCAUUUUACACGCU	176-C9trc
151	D-ARN	ACGCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGU	180-B1-001
152	D-ARN	ACGCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGC	180-A4-002
153	D-ARN	ACGCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGU	180-D1-002
154	D-ARN	GCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGU	180-D1-011
155	D-ARN	ACGCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGC	180-D1-012
156	D-ARN	GCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGC	180-D1-018
157	D-ARN	CGCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGU	180-D1-034
158	D-ARN	CGCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGG	180-D1-035
159	D-ARN	GCACGUCCCCUCACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUCGCGG	(D-)180-D1-036, (D-)-NOX-E36
160	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUUGACAGCCGGAUUGCUGGCAGCAC	178-A8
161	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUUGACAGCCUAAUUGCUGGCAGCAC	178-F7
162	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUUGACAGCCGGAUUGCUGGCAGCAC	178-G7
163	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACUGCCAGUGGGUCAGAGCUGCAGCAC	178-C6
164	D-ARN	GUGCUGCGGAGUAAAAACUCCUAAAGACAGCCAGCCGGCAGCAC	178-E7
165	D-ARN	GUGCUGCGGAGUAAAAACUCCUAAAGACAGCCAGCCGGCAGCAC	178-G6
166	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUUGACAGCCUAAUUGCUGGCAGCAC	178-A7
167	D-ARN	GUGCUGCGGAGUAAAAACUCCUAAAGACAGCCUAAAGCCGGCAGCAC	178-C7
168	D-ARN	GUGCUGCGGGGUGAAAAACGCCCCUGCGACUGCCUUAUGCAGGCGCAGCAC	178-E5
169	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACCAACGACUGGCUGGACCCGGCAGCAC	181-F1
170	D-ARN	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACCUUGACAGCCGGAUUGCUGGCAGCAC	181-B2
171	D-ARN	GUACUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-C2
172	D-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-A6
173	D-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCGAGCCGACAGCCGGCAGCAC	178-D6
174	D-ARN	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCGAGCCGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-D5

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
175	D-ARN	GUGCUGGUGAGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-A2
176	D-ARN	GGCUGCGUAGUUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCAGCC	178-D5-020
177	D-ARN	GGCGGUGAGUUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCGCC	178-D5-027
178	D-ARN	GUGCGGUGAGUUAAAAACUACCAAGCGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	178-D5-030
179	D-ARN	GUGCGGUGAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-002
180	D-ARN	GUGCGGUGAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-004
181	D-ARN	GUGCGGUGAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-005
182	D-ARN	GUCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAC	181-A2-006
183	D-ARN	UGCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCA	181-A2-007
184	D-ARN	GCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGAGC	181-A2-008
185	D-ARN	GCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGAGC	181-A2-011
186	D-ARN	GGUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCACCC	181-A2-012
187	D-ARN	UGGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCC—CA	181-A2-015
188	D-ARN	GCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGC	181-A2-016
189	D-ARN	GUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAC	181-A2-017
190	D-ARN	GG—GCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCCCC	181-A2-018
191	D-ARN	GAGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCUC	181-A2-019
192	D-ARN	CGGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCCG	181-A2-020
193	D-ARN	CCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCCGG	181-A2-021
194	D-ARN	CAGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCUG	181-A2-022
195	D-ARN	CUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCCAG	181-A2-023
196	D-ARN	AGCGGUGUAGUGAAGUGGGUGGCGAGGUAAGAAAGGACACGCU	184-B8trc
197	D-ARN	AGCGGUGUAGCGGGUGUGGGUGGUAAGAAAGGCCACGCU	184-C6trc
198	D-ARN	AGCGUGAUAGAAAGAGCGGGUGGUAAGUAAAAGGUCAGGCU	184-H5trc
199	D-ARN	AGCGGUGUAGGUGGGUGGUAAGUAAAAGGACACGCU	184-A7trc
200	D-ARN	AGCGGUGUAGGUGGGUGGUAAGUAAAAGGACACGCU	187-A5trc

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
201	D-ARN	AGCGUUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGACCGCU	187-H5trc
202	D-ARN	CCGCUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGCGCGG	174-D4-004
203	D-ARN	GCGGAGCAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGACUCGCGUC	166-A4-002
204	D-ARN	CGUUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGACACG	187-A5trc-001
205	D-ARN	GUGUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGACAC	187-A5trc-002
206	D-ARN	CGUUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGCGACG	187-H5trc-002
207	D-ARN	GUGUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGGCAC	187-H5trc-003
208	D-ARN	UGUUAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGGGCA	187-H5trc-004
209	D-ARN	GGACGAGAGUGACAAAUGAUUAUACCCUCCUGACUAACGUCGCGGGGACAGG	177-B3
210	D-ARN	GGACCUAUCGUAAGACAACCGCAGUCUACGGACAUUCUCCGCGGACAGG	177-C1
211	D-ARN	GGACAAUUGUUAACCCCGAGAGACAAAUGAGACAACCUCCUGAAGACAGG	177-C2
212	D-ARN	GGACGAAAGUGAGAAUUGAUACAACCUCCUGUUGCUGCGAAUCCGGACAGG	177-E3
213	D-ARN	GGACGUAAGAGGCUACCCGAAAGAAUGUCAGGAGGUAAGCCGACAGG	177-D1
214	D-ARN	GGACUAGAAACUAACAAUAGCGGCCAGUUGCACCCGCUUAUCAACGACAGG	177-E1
215	D-ARN	GGACUAGUCAGCCAGUGUAUUCGGACGCGGGUUUUUUUACUGACAGG	177-A1
216	D-ARN	GGACUGCCGGAGUGAAACUCCCGAGACCCGAGAAAGCGGGGACAGG	177-G3
217	D-ARN	GGACUUUAUCCAGGUGGUGUAAGUAAGUAAGAGUAAGAGUAAGUACAGG	177-C3
218	D-ARN	GGACGAGAGCGAACAAUGAUUAACCUCCUGACGGAAAGAGAUCCGACAGG	177-A2
219	D-ARN	CCUGUCUACACGCAGUAAGUAAGUAAGUAAGUAAGUUGUCACAGG	170-E4trc
220	D-ARN	CGUGAGCCAGGCCAGCCGAGGCGUUAACUGGCUUAUUGGACACGACAGG	166-D2trc
221	D-ARN	CGUGAACAUCAAGCUAAGCGGGGCUUUGUUGUUGUUGCCCGCCACG	174-A2trc
222	D-ARN	CGUGCAGAGAGACCAACCCAGUAAAUAACCUAAUUGGCGCCACG	174-E2trc
223	D-ARN	CGUGCAGAGAGACCAACCCAGUAAAUAACCUAAUUGGCGCCACG	183-G3trc
224	D-ARN	CGUGAACAUUCAAGCUAAGCGGGGCUUUGUUGUUGCCCGCCACG	183-B2trc
225	D-ARN	CGUGCCGAGGCGGCGACCGUUAACUUAGAGAGGCUUUGGCACCACG	166-B2trc
226	D-ARN	CGUGAUAAACAGCCGUCGUAAGAAACAAAGUUCGGCGGGGACAGG	166-G3trc

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
227	D-ARN	CGUGGGUGGCGCACCAGGGCGAAAAGCCACCAGUAAAAGAUAGACCG	166-D1trc
228	D-ARN	CGUGUGAUCUCCUUUGGGUGAUUAGCUUAGAGACUUCGCCACACG	183-H2trc
229	D-ARN	GCACCUUCGCCUAUACACGUGCCGGCUGCUAAUACUCGUCGCCG	167-A7trc
230	D-ARN	GCACGACUUGGGCGACCAGUGAUACUAGAGAGCAAGUCGUCGCCG	167-C7trc
231	D-ARN	GCGCGCUCAGUAGAAAUUUAAAAGUUUCAGAAUUGUCGUCGCCG	167-B5trc
232	D-ARN	AGUGUGGCGAGGCUAAGGAGAUUUCGAGACCACGCU	184-D7trc
233	D-ARN	AGUGUGGCGAGACUAGGAUAGACUCCGAGACCACGCU	184-D6trc
234	D-ARN	AGCGUGAGGCGACCAGCGGAUACUAGAGAGUCACGCU	184-E5trc
235	D-ARN	AGCGUGAAGGGGACCAGCGUACUACAGAGUUUCACGCU	184-G6trc
236	D-ARN	AGCGUGUGAUGUAGUAGCACCGUACAGAGGACACGCU	184-B7trc
237	D-ARN	AGCGUGAGGCGACCCGUGUUUCGUGAGAGUACGCU	184-B6trc
238	D-ARN	5'PEG-GCACGUCCUCACACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUUCGCG	NOX-E36-5'PEG
239	D-ARN	GCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUUCGCG-3'PEG	NOX-E36-3'PEG
240	D-ARN	GAGUUGGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCAUUC	188-A3-001
241	D-ARN	GAUGGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCAUUC	188-A3-004
242	D-ARN	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCAUUC	188-A3-005
243	D-ARN	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCAUUC	188-A3-006
244	D-ARN	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCAUUC	(D-)188-A3-007 = (D-)mNOX-E36
245	D-ARN	GCUGGUUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAGC	189-G7-001
246	D-ARN	CUGGUUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAG	189-G7-002
247	D-ARN	UGGUUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAGC	189-G7-003
248	D-ARN	GCCGGUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAGC	189-G7-007
249	D-ARN	GCCGGUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAGC	189-G7-008
250	D-ARN	GCGCGUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAGC	189-G7-010
251	D-ARN	GGGCGUACCGAGGGGCGUGGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUACCCAGC	189-G7-012
252	L-proteína	QPDVAVNAPLTCYSFTGKMIPMSRLENYKRITSSRCPKEAVFVTKLKRICADPNKEWVQKYIRKLDQ	rat MCP-1

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
		NQRSET	
253	L-ARN	5'PEG-GGCGACAUUGGUUGGCAUGAGGCGAGCCUUGAUAAUCCGGCGCCA	mNOX-E36-5'PEG
254	L-ARN	GGCGACAUUGGUUGGCAUGAGGCGAGCCUUGAUAAUCCGGCGCCA-3'PEG	mNOX-E36-3'PEG
255	L-DNA	5'-GAGGGGACGTGC-(Espaciador 18) ₂ -NH ₄ ⁺ -3'	Sonda de captura NOX-E36
256	L-DNA	5'- Biotina-(Espaciador 18) ₂ -CGCAGAGCC	Sonda de detección NOX-E36
257	L-Proteína	KSMQVPFRCFCFAEQEIPLRAILCYRNTSSICNEGLIFKLRGKEACALDTVGWVQRHRKMLRHCP SKRK	CCL1/I-309
258	L-Proteína	SLAADTPTACCFYSYTSRQIPQNFADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWQKYVSDLELSA	CCL3/MIP-1α
259	L-Proteína	APMGSDPPTACCFYSY TARKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSESWWQYVYDLEL N	CCL4/MIP-1β
260	L-Proteína	SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGCSNPAVVFVTRKNRQVCANPEKQVWREYINSLEMS	CCL5/RANTES
261	L-Proteína	FNPQGLAQPDALNVPSTCCFTFSSKKISLQRLKSYVITTSRCPQKAVIFRTKLGEICADPKEKWWQNYM KHLGRKAHTLKT	CCL13/MCP-4
262	L-Proteína	TKTESSSRGYPHPSECCFTYTYKIPRQRIMDYETNSQCSKPGVIFITKRGHVSCTNPSDKWVQDYIKD MKEN	CCL14/HCC-1
263	L-Proteína	ASVATELRCQCLQLTQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKAACLNPAASPIVKKIEKMLNSDK SN	CXCL1/GROα
264	L-Proteína	APLATELRCQCLQLTQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNQKACLNPAASPMVVKKIEKMLKNG KSN	CXCL2/GROβ
265	L-Proteína	ASVATELRCQCLQLTQGIHLKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKAACLNPAASPMVVKKIEKMLKNGS TN	CXCL3/GROγ
266	L-Proteína	EAEEDGDLQCLCVKTTTSQVPRRHTSLEVIKAGPHCPTAQIATLKNRKCICLDLQAPLYKKIHKLLLES	CXCL4/PF4
267	L-Proteína	GPAAVLRELRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCCKVEVVASLKNQKIEICLDPEAPFLKVIQKILD GGNKEN	CXCL5/ENA-78
268	L-Proteína	GPVAVLTELRC TCLRVTLRVNPKTIGLQVFPAGPQCCKVEVVASLKNQKQVCLDPEAPFLKVIQKIL DSGNKKN	CXCL6/GCP-2
269	L-Proteína	SSTKGQTKRNLAKGKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIKGTGHCNQVEVIATLKDGRKIC LDPDAPRIKKIVQKLAGDESAD	CXCL7/NAP-2
270	L-Proteína	EGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSGRELCLDPKENWVQRVVEK	CXCL8/IL-8

SEC. ID.	ARN/Péptido	Secuencia	Referencia interna
		FLKRAENS	
271	L-Proteína	TPVVRKGRCSISTNGQTHLQSLKDLKQFAPSPSEKIEIIATLKNQVQTCLNPDSADVKELIKKEKQV SQKKKQKNGKKHKKVVKVRSQRKKT	CXCL9/MIG
272	L-Proteína	VPLSRTVRCCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKGKCRCLNPESKAIKNLLKAVSKER SKRSP	CXCL10/IP-10
273	L-Proteína	FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKSKQARLIKKVERKN F	CXCL11/I-TAC
274	L-Proteína	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEILEKALNKRFFK M	CXCL12a/SDF-1 α
275	L-Proteína	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEILEKALNKRFFK M	CXCL12b/SDF-1 β
276	L-Proteína	QHHGVTKNITCSKMTSKIPVALLIHYQQNQASCGKRAIILETRQHRFLFCADPKEQVVKDAMQHLDROA AALTRNG	CX ₃ CL1/ Fractalquina
277	L-Proteína	VGSEVSDKRTCVSLTTRQLPVSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRLKVCADPQATWVRDVRSMRDKSNTR NNMIQTKPTGTQQSTNTAVTLTG	XCL1/Linfotactina
278	L-ARN	5'-Biotina-GCACGUGCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGUCUGCGG	NOX-E36 biotinilada
279	L-ARN	5'-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGU AGCGCUGUGCAGAGCU	POC
280	L-ARN	5'-PEG-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGU AGCGCUGUGCAGAGCU-3'	POC-PEG
281	L-DNA	5'-CCAAATGTCGCC-(Espaciador 18) ₂ -NH ⁺ -3'	Sonda de captura mNOX-E36
282	L-DNA	5'- Biotina-(Espaciador 18) ₂ -CGCAGAGCC	Sonda de detección mNOX-E36
283	L-proteína	QPDAINSPVTCCTFTGKKISSQRLGSYKRVTSSKCPKEAVIFKTLAKEICADPEQKWVQDAVKQLDKK AQTPKP	MCP-1 de caballo (Equus caballus)
284	L-proteína	QPDAINSQVACCYTFNSKKISMQRMLMNYRRVTSSKCPKEAVIFKTLGKELCADPKQKWVQDSINILNKK NQTPKP	MCP-1 bovina (Bos Taurus)
285	L-proteína	QPDAVNAPLTCYFTGKMIPMSRLENYKRITSSRCPKEAVFVTKLREICADPNKEWVQKYIRKLDQ NQVRSETTVFYKIASTLRTSAPLNVNLTHKSEANASTLFSSTTSSTSVETSMTEN	MCP-1 de rata (Rattus norvegicus)

La presente invención está ilustrada adicionalmente por las figuras, ejemplos y el listado de secuencias del cual se pueden tomar rasgos, realizaciones y ventajas, en donde

- 5 Figura 1: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados unidos a MCP-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo 1A") que es en una realización preferida en su totalidad esencial para la unión a la MCP-1 humana;
- Figura 2: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados unidos a MCP-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo 1B") que es en una realización preferida en su totalidad esencial para la unión a MCP-1 humana y derivados de ligandos de ARN 180-D1-002;
- 10 Figura 3: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados unidos a MCP-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo 2") que es en una realización preferida en su totalidad esencial para la unión a la MCP-1 humana;
- Figura 4: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados unidos a MCP-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo 3") que es en una realización preferida en su totalidad esencial para la unión a la MCP-1 humana;
- 15 Figura 5: muestra derivados de ligandos de ARN 178-D5 y 181-A2 (ligandos de ARN de la MCP-1 humana del motivo de secuencia "Tipo 3");
- Figura 6: muestra un alineamiento de secuencias de ligandos de ARN relacionados unidos a MCP-1 humana que indica el motivo de secuencia ("Tipo 4") que es en una realización preferida en su totalidad esencial para la unión a la MCP-1 humana (otras secuencias);
- 20 Figura 7: muestra una tabla de secuencias de varios ligandos diferentes de ARN que se unen a la MCP-1 humana que no puede ser relacionada con los motivos de secuencia de unión a MCP-1 "Tipo 1A", "Tipo 1B", "Tipo 2", "Tipo 3" o "Tipo 4";
- Figura 8: muestra alineamientos de derivados de ligandos de ARN 188-A3-001 y de 189-G7-001 que se unen a la MCP-1 murina;
- 25 Figura 9: muestra el resultado de los análisis de unión del aptámero D-NOX-E36 a D-MCP-1 biotinilada humana a temperatura ambiente y 37°C, representado como la unión del aptámero sobre la concentración de la D-MCP-1 biotinilada humana;
- Figura 10: muestra el resultado de los análisis de unión del aptámero D-mNOX-E36 a la D-MCP-1 biotinilada murina a 37°C, representado como la unión del aptámero sobre la concentración de la D-MCP-1 biotinilada murina;
- 30 Figura 11: muestra la liberación de Ca⁺⁺ inducida por MCP-1 en células THP-1, mientras que se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1 humana, lo que indica una concentración efectiva media (EC₅₀) de aproximadamente 3 nM, representada como la diferencia en fluorescencia con el blanco sobre la concentración de MCP-1 humana;
- Figura 12: muestra la eficacia del Spiegelmero NOX-E36 en un ensayo de liberación de calcio; las células se estimularon con 3 nM de MCP-1 humana preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero NOX-E36, representado como porcentaje de control sobre la concentración de NOX-E36;
- 35 Figura 13: muestra la eficacia del Spiegelmero mNOX-E36 en un ensayo de liberación de calcio; las células se estimularon con 5 nM de MCP-1 murina preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero mNOX-E36, representado como porcentaje de control sobre la concentración de mNOX-E36;
- 40 Figura 14: muestra la quimiotaxis inducida por la MCP-1 humana de las células THP-1 mientras que después de 3 horas de migración de las células THP-1 hacia diversas concentraciones de MCP-1 se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1, representada como factor X de aumento en comparación con el control sobre la concentración de la MCP-1 humana;
- Figura 15: muestra la eficacia del Spiegelmero NOX-E36 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia 0,5 nM de MCP-1 humana preincubada a 37°C con diversas proporciones de Spiegelmero NOX-E36, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero NOX-E36;
- 45 Figura 16: muestra la eficacia del Spiegelmero mNOX-E36 en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia 0.5 nM MCP-1 murina preincubada a 37°C con diversas proporciones de Spiegelmero NOX-E36, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero mNOX-E36;
- 50 Figura 17: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica el valor de K_D del Spiegelmero NOX-E-36 que se une a la MCP-1 humana que estaba inmovilizada en un chip sensor PioneerF1 por el procedimiento de acoplamiento de amina, representado como respuesta (UR) con el tiempo;

Figura 18: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica el valor de K_D del Spiegelmero NOX-E-36 a las proteínas de la familia MCP humana (huMCP-1, huMCP-2, huMCP-3) y eotaxina humana, que estaban inmovilizadas por el procedimiento de acoplamiento de amina en un PioneerF1 y un chip sensor CM4, respectivamente, representado como respuesta (UR) con el tiempo;

5 Figura 19: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica la unión de del Spiegelmero NOX-E36 a la MCP-1 de especies diferentes (MCP-1 canina, MCP-1 de mono, MCP-1 humana, MCP-1 porcina, MCP-1 de conejo, MCP-1 de ratón, MCP-1 de rata) mientras que diferentes formas de MCP-1 se inmovilizaron por el procedimiento de acoplamiento de aminas PioneerF1 y chips sensores CM4, respectivamente, representado como respuesta (UR) con el tiempo;

10 Figura 20: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica el valor de K_D del Spiegelmero 181-A2-018 que se une a la MCP-1 humana que estaba inmovilizada en un chip sensor CM4 por el procedimiento de acoplamiento de aminas, representado como respuesta (UR) con el tiempo;

Figura 21: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica la unión del Spiegelmero 181-A2-018 a las proteínas de la familia de MCP (huMCP-1, huMCP-2, huMCP-3) y eotaxina humana que estaban inmovilizadas por el procedimiento de acoplamiento de aminas a PioneerF1 y un chip sensor CM4, respectivamente, representado como respuesta (UR) con el tiempo;

15

Figura 22: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica la unión del Spiegelmero 181-A2-018 a la MCP-1 de especies diferentes (MCP-1 canina, MCP-1 de mono, MCP-1 humana, MCP-1 porcina, MCP-1 de conejo, MCP-1 de ratón, MCP-1 de rata) mientras que diferentes formas de MCP-1 se inmovilizaron por el procedimiento de acoplamiento de aminas PioneerF1 y chips sensores CM4, respectivamente, representado como respuesta (UR) con el tiempo;

20

Figura 23: muestra un alineamiento Clustal W de la MCP-1 de diferentes especies de mamíferos además de la MCP-2, MCP-3, y eotaxina humana (solo posiciones 1-76);

Figura 24A: muestra una tabla que sintetiza la especificidad de unión de NOX-E36 y 181-A2-018 con respecto a la MCP-1 de diferentes especies de mamíferos además de la MCP-2, MCP-3, y eotaxina humana;

25

Figura 24B: muestra una tabla que sintetiza la selectividad de NOX-E36 determinada por análisis Biacore donde NOX-E36 biotinilado estaba inmovilizado en la superficie del chip sensor y se analizó la unión de un panel de diversas quimiocinas CC y CXC a la NOX-E36;

Figura 24C: muestra el análisis de cinética de NOX-E36 que interactúa con las quimiocinas determinadas por el análisis Biacore donde las quimiocinas estaban inmovilizadas de forma covalente sobre la superficie de un chip sensor CM5 y se inyectaron diversas concentraciones de NOX-E36 y se analizó el comportamiento de unión NOX-E36s mediante el programa de computación BiaEvaluation;

30

Figura 24D: muestra la curva dosis respuesta de la quimiotaxis de la estimulación de las células THP-1 con MIP-1 α con una concentración efectiva media de aproximadamente 0,2 nM;

Figura 24E: muestra la inhibición de la quimiotaxis inducida de MIP-1 α por NOX-E36. NOX-E36 no tuvo influencia sobre la quimiotaxis inducida por MIP1 α de las células THP-1;

35

Figura 25: muestra la eficacia del Spiegelmero NOX-E36-3'-PEG en un ensayo de liberación de calcio; las células se estimularon con 3 nM de MCP-1 humana preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero NOX-E36-3'-PEG, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero NOX-E36-3'-PEG;

Figura 26: muestra la eficacia del Spiegelmero NOX-E36-3'-PEG en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia 0,5 nM de MCP-1 humana preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero NOX-E36-3'-PEG, representado como porcentaje de control sobre la concentración de NOX-E36-3'-PEG;

40

Figura 27A: muestra la eficacia del Spiegelmero NOX-E36-5'-PEG en un ensayo de liberación de calcio; las células se estimularon con 3 nM de MCP-1 humana preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero NOX-E36-5'-PEG, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero NOX-E36-5'-PEG;

45

Figura 27B: muestra la eficacia del Spiegelmero NOX-E36-5'-PEG en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia 0,5 nM de MCP-1 humana preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero NOX-E36-5'-PEG, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero NOX-E36-5'-PEG;

Figura 28: muestra la liberación de Ca⁺⁺ inducida por la MCP-1 murina en células THP-1, mientras que se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1 murina, que indica una concentración efectiva media (EC_{50}) de aproximadamente 5 nM, representado como diferencia de fluorescencia del blanco sobre la concentración de MCP-1 murina;

50

- Figura 29: muestra la eficacia de la anti-MCP-1 murina para el Spiegelmero mNOX-E36-3'-PEG en un ensayo de liberación de calcio; las células se estimularon con 3 nM de MCP-1 murina preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero mNOX-E36-3'-PEG, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero mNOX-E36-3'-PEG;
- 5 Figura 30: muestra la quimiotaxis inducida por la MCP-1 murina de las células THP-1 mientras que después de 3 horas de la migración de las células THP-1 hacia diversas concentraciones de mMCP-1 se obtuvo una curva de dosis respuesta para mMCP-1, representado como X veces de aumento en comparación con el control sobre la concentración de MCP-1 murina;
- Figura 31: muestra la eficacia de la anti-MCP-1 murina del Spiegelmero mNOX-E36-3'-PEG en un ensayo de quimiotaxis; las células se dejaron migrar hacia 0,5 nM de MCP-1 murina preincubada a 37°C con diversas cantidades de Spiegelmero mNOX-E36-3'-PEG, representado como porcentaje de control sobre la concentración de Spiegelmero mNOX-E36-3'-PEG anti-murina;
- 10 Figura 32: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica el valor de K_D del aptámero D-mNOX-E36 de unión a la D-MCP-1 murina que estaba inmovilizada sobre el chip sensor PioneerF1 por el procedimiento de acoplamiento de aminas, representado como respuesta (UR) con el tiempo;
- 15 Figura 33: muestra el sensograma de Biacore 2000 que indica la unión del aptámero D-mNOX-E36 a la D-MCP-1 humana y D-MCP-1 murina mientras que las dos formas diferentes de la D-MCP-1 estaban inmovilizadas por el procedimiento de acoplamiento de aminas PioneerF1 y chips sensores CM4, respectivamente, representado como respuesta (UR) con el tiempo;
- Figura 34: muestra las secciones renales de ratones de 24 semanas MRL^{lpr/lpr}, teñidos con ácido peryódico de Schiff (PAS), anticuerpos para Mac-2 (macrófagos) y CD3 (células T) como se indica; las imágenes son representativas para 7-12 ratones en cada grupo (aumento original PAS: x 100, insertos PAS: x 400, Mac2: x 400, CD3: x 100);
- 20 Figura 35: muestra una tabla que ilustra los parámetros de función renal y los hallazgos clínicos de los diferentes grupos de ratones MRL^{lpr/lpr} de 24 semanas;
- Figura 36: muestra la cuantificación de cambios histológicos por morfometría realizada en secciones teñidas con plata de ratones de todos los grupos; A, índice de volumen intersticial; B, índice de dilatación tubular, y C, índice de daño celular tubular, se calcularon como porcentaje de campo eléctrico de alto voltaje y se expresan como media \pm SEM;
- 25 Figura 37: muestra la supervivencia de los ratones MRL^{lpr/lpr} de los diversos grupos de tratamiento calculada mediante análisis de Kaplan-Meier;
- Figura 38: muestra la expresión de ARNm renal para las quimiocinas CC CCL2 y CCL5 determinada mediante RT-PCR de tiempo real con ARN renal total combinado de 5 ratones de cada grupo, donde los niveles de ARN son expresados por la respectiva expresión de ARNr 18S;
- Figura 39: muestra la reducción de patología pulmonar por el tratamiento con mNOX-E36-3'PEG; el tejido de pulmón se preparó a partir de todos los grupos de 24 semanas y se clasificó de forma semicuantitativa; el tratamiento con mNOX-E36 y mNOX-E36-3'PEG redujo la inflamación peribronquiolar en ratones MRL^{lpr/lpr}; las imágenes son representativas de 7-11 ratones de cada grupo; aumento original x 100;
- 35 Figura 40: muestra las manifestaciones de lupus cutáneo de ratones MRL^{lpr/lpr} de 24 semanas que aparecen generalmente en el área facial o del cuello (ratón izquierdo) que fueron menos comunes en ratones tratados con Spiegelmero anti-mCCL2 (ratón derecho);
- 40 Figura 41: muestra los hallazgos séricos e histológicos de los ratones MRL^{lpr/lpr} de 24 semanas;
- Figura 42: muestra la farmacocinética de los Spiegelmeros anti-mCCL2 pegilados y no pegilados en plasma durante el estudio, indicado como concentración plasmática del Spiegelmero mNOX-E36 en función del tiempo;
- Figura 43: muestra la citometría de flujo para CCR2 en médula ósea y sangre periférica de ratones MRL^{lpr/lpr} de 24 semanas tratados con vehículo o con mNOX-E36-3'PEG; los datos se muestran como la media del porcentaje de las células CCR2 positivas \pm SEM, tanto en médula ósea como en sangre periférica en 5 ratones de cada grupo;
- 45 Figura 44: muestra los niveles de CCL2 sérico en PoC-PEG- (barras blancas) y ratones 1K db/db tratados con mNOX-E36-3'PEG (mNOX-E36-P) (barras negras) determinados por ELISA a diferentes tiempos, como se indica; los datos son medias \pm SEM; *, p < 0,05 mNOX-E36-3'PEG (mNOX-E36-P) frente a PoC-PEG;
- Figura 45: muestra el número de células Mac-2 y Ki-67 positivas infiltradas en los glomérulos y el intersticio de los ratones db/db no tratados o tratados con POC-PEG o más que mNOX-E36-3'PEG;
- 50 Figura 46: muestra la glomerulosclerosis diabética en ratones db/db de 6 meses; las secciones renales de los

5 ratones de los diferentes grupos se tiñeron con ácido peryódico de Schiff y se clasificaron 15 glomérulos de cada sección renal por el grado de glomeruloesclerosis; las imágenes muestran glomérulos representativos clasificados con los puntajes respectivos indicados, aumento original 400 x; el gráfico ilustra el porcentaje medio de cada puntaje \pm SEM de todos los ratones de cada grupo (n = 7 - 10); *, p < 0,05 para ratones 1K db/db tratados con mNOX-E36-3'PEG (mNOX-E36-P) frente a PoC-PEG (PoC-P);

Figura 47: muestra la velocidad de filtración glomerular (GFR) de ratones 1K db/db de 6 meses tratados con mNOX-E36-3'PEG (mNOX-E36-P) y PoC-PEG(PoC-P); la GFR se determinó por la cinética de depuración de FITC-inulina de los grupos de ratones 1K db/db tratados con PoC-PEG y mNOX-E36-3'PEG al final del estudio;

10 Figura 48: muestra la atrofia tubular y el volumen intersticial de ratones db/db de 6 meses; las imágenes de secciones renales teñidas con plata ilustran los riñones representativos de los grupos respectivos (aumento original 100x); los valores representan las medias \pm SEM del índice del análisis morfométrico de 7 - 10 ratones de cada grupo; *, p < 0,05 ratones 2K db/db frente a BKS natural; #, p < 0,05 ratones db/db 1K frente a 2K; †, p < 0,05 ratones 1K db/db tratados con mNOX-E36-3'PEG (mNOX-E36-PEG) frente a PoC-PEG;

15 Figura 49: muestra la expresión de ARNm renal de CCL2 de los ratones db/db determinada por RT-PCR en tiempo real usando el ARN renal total combinado de 6 - 10 ratones de cada grupo; los niveles de ARNm para cada grupo de ratones son expresados por la respectiva expresión de ARNr 18 S; y

Figura 50: muestra la expresión de CCL2 espacial en riñones de ratones db/db determinados por inmunotinción; las imágenes ilustran secciones representativas de riñones de ratones de 6 meses de los grupos respectivos indicados (aumento original, 200 x).

20 **Ejemplo 1: Ácidos nucleicos que se unen a MCP-1 humana**

Usando D-MCP-1 biotinilada humana como diana, se podrían generar varios ácidos nucleicos que se unen a la MCP-1, cuyas secuencias de nucleótidos se representan en las Figuras 1 a 7. Los ácidos nucleicos se caracterizaron en el aptámero, es decir, el nivel de ácido nucleico D mediante ensayos competitivos o de unión directa a D-MCP-1 biotinilada humana (Ejemplo 4) o a nivel del Spiegelmero, es decir, el ácido nucleico L con la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) a través de una medida de resonancia de plasmón superficial mediante un instrumento Biacore 2000 (Ejemplo 7), un ensayo *in vitro* de liberación de Ca⁺⁺ del cultivo celular (Ejemplo 5) o un ensayo de quimiotaxis *in vitro* (Ejemplo 6).

30 Las moléculas de ácido nucleico generadas de este modo exhiben diferentes motivos de secuencias, los cuatro tipos principales se definen en las Figuras 1 y 2 (Tipo 1A / 1B), la Figura 3 (Tipo 2), las Figuras 4 y 5 (Tipo 3) y la Figura 6 (Tipo 4). Los ácidos nucleicos adicionales de unión a MCP-1 que no se pueden relacionar entre sí ni con los motivos de secuencias diferentes descritos en la presente memoria, se enumeran en la Figura 7. Para la definición de los motivos de secuencia de nucleótidos, se usan las abreviaturas IUPAC para los nucleótidos ambiguos:

35	S	fuerte	G o C;
	W	débil	A o U;
	R	purina	G o A;
	Y	pirimidina	C o U;
	K	ceto	G o U;
	M	imino	A o C;
40	B	no A	C o U o G;
	D	no C	A o G o U;
	H	no G	A o C o U;
	V	no U	A o C o G;
	N	total	A o G o C o U

45 Si no se indica lo contrario, cualquier secuencia de ácido nucleico o secuencia de extensiones y cajas, respectivamente, se indica en la dirección 5' → 3'.

Ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de Tipo 1A (Figura 1)

50 Como se ilustra en la Figura 1, todas las secuencias de ácidos nucleicos de Tipo 1A que se unen a MCP-1 comprenden varias extensiones o cajas de secuencia donde las cajas B1A y B1B son las extensiones terminales 5'-y 3' que se pueden hibridar entre sí. Sin embargo, dicha hibridación no se da necesariamente en la molécula como se presenta realmente en condiciones fisiológicas. Las cajas B2, B3, B4, B5 y la caja B6 están flanqueadas por la caja B1A y la caja B1B.

55 Los ácidos nucleicos se caracterizaron a nivel aptámero, es decir, a nivel de ácido nucleico D mediante ensayos de unión directos y competitivos con D-MCP-1 biotinilada humana, para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como Spiegelmero (Ejemplo 3) y se ensayaron usando la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) en un ensayo de liberación de Ca⁺⁺ *in vitro* del cultivo celular (Ejemplo 5).

Las secuencias de las cajas definidas pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de Tipo 1A que se unen a MCP-1 lo que influye en la afinidad de unión a MCP-1. En base al análisis de la unión de los diferentes ácidos nucleicos que se unen a MCP-1 denominados **ácidos nucleicos de Tipo 1A de unión a MCP-1**, las cajas **B1A**, B2, B3, B4, **B5**, **B6** y **B1B**, y sus secuencias de nucleótidos tal como se describen a continuación, son individualmente y, más preferiblemente, en su totalidad esenciales para la unión a la MCP-1:

- las cajas **B1A** y **B1B** son las extensiones de los extremos terminales 5' y 3' que se pueden hibridar entre sí; en donde **B1A** es **AGCRUG**, preferiblemente **AGCGUG**; y donde **B1B** es **CRYGCU**, preferiblemente **CACGCU**;
- la caja **B2**, que es **CCCGGW**, preferiblemente **CCCGGU**;
- la caja **B3**, que es **GUR**, preferiblemente **GUG**;
- la caja **B4**, que es **RYA**, preferiblemente **GUA**;
- la caja **B5**, que es **GGGGGRCGCGAYC**, preferiblemente **GGGGGGCGCGACC**;
- la caja **B6**, que es **UGCAAUAAUG** o **URYAWUUG**, preferiblemente **UACAUUUG**.

Como se ilustra en la Figura 1, la molécula de ácido nucleico designada como 176-E10trc tiene la mejor afinidad con la MCP-1 (como aptámero en el ensayo de unión con una K_D de 5 nM, además de como Spiegelmero con una IC_{50} de 4 - 5 nM en el ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* del cultivo celular), y en consecuencia puede constituir la secuencia óptima y la combinación óptima de los elementos de secuencia **B1A**, **B2**, **B3**, **B4**, **B5**, **B6** y **B1B**.

Ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de Tipo 1B (Figura 2)

Como se ilustra en la Figura 2, todas las secuencias de ácidos nucleicos de Tipo 1B que se unen a MCP-1 comprenden varias extensiones o cajas de secuencias donde las cajas **B1A** y **B1B** son las extensiones terminales 5' y 3' que se pueden hibridar entre sí, y las cajas **B2**, **B3**, **B4**, **B5** y la caja **B6** están flanqueadas por la caja **B1A** y la caja **B1B**. Sin embargo, dicha hibridación no se da necesariamente en la molécula como se presenta realmente en condiciones fisiológicas.

Los ácidos nucleicos se caracterizaron a nivel aptámero, usando ensayos de unión directos y competitivos con D-MCP-1 biotinilada humana, para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como el Spiegelmero (Ejemplo 3) y se evaluaron usando la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) en un ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* del cultivo celular (Ejemplo 5).

Las secuencias de las cajas definidas pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de Tipo 1B que se unen a MCP-1, lo que influye en la afinidad de unión a la MCP-1. En base a los análisis de unión de los diferentes ácidos nucleicos que se unen a MCP-1 designados como **ácidos nucleicos de Tipo 1B que se unen a MCP-1**, las cajas **B1A**, **B2**, **B3**, **B4**, **B5**, **B6** y **B1B**, y sus secuencias de nucleótidos descritas a continuación, son individualmente y, más preferiblemente, en su totalidad esenciales para la unión a la MCP-1:

- las cajas **B1A** y **B1B** que se pueden hibridar entre sí; donde **B1A** es **AGYRUG**, preferiblemente **AGCGUG**; y donde **B1B** es **CAYRCU**, preferiblemente **CACGCU**;
- la caja **B2**, que es **CCAGCU** o **CCAGY**, preferiblemente **CCAGU**;
- la caja **B3**, que es **GUG**;
- la caja **B4**, que es **AUG**;
- la caja **B5**, que es **GGGGGGCGCGACC**;
- la caja **B6**, que es **CAUUUUA** o **CAUUUA**, con preferencia **CAUUUUA**;

Como se ilustra en la Figura 2, el ácido nucleico designado como 176-C9trc tiene la mejor afinidad con la MCP-1 (como aptámero en el ensayo de unión con una K_D de 5 nM, además de como Spiegelmero con una IC_{50} de 4 - 5 nM en el ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* del cultivo celular) y en consecuencia puede constituir la secuencia óptima y la combinación óptima de los elementos de secuencia **B1A**, **B2**, **B3**, **B4**, **B5**, **B6** y **B1B**.

Ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de Tipo 2 (Figura 3)

Como se ilustra en la Figura 3, todas las secuencias de Tipo 2 comprenden varias extensiones o cajas de secuencias donde las cajas **B1A** y **B1B** son las extensiones terminales 5'- y 3' que se pueden hibridar entre sí y la caja **B2** es el elemento de secuencia central. Sin embargo, dicha hibridación no se da necesariamente en la molécula como se presenta realmente en condiciones fisiológicas.

Los ácidos nucleicos se caracterizaron a nivel aptámero, usando ensayos de unión directos y competitivos con D-MCP-1 biotinilada humana, para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como el Spiegelmero (Ejemplo 3) y se ensayaron usando la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) en un ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* del cultivo celular (Ejemplo 5) en ensayos de quimiotaxis *in vitro* (Ejemplo 6).

Las secuencias de las cajas definidas pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de Tipo 2 que se unen a MCP-1, lo que influye en la afinidad de unión a la MCP-1. En base al análisis de la unión de diferentes ácidos

nucleicos que se unen a MCP-1 designados como **ácidos nucleicos de Tipo 2 que se unen a MCP-1**, las cajas **B1A**, **B2**, y **B1B**, y sus secuencias de nucleótidos descritas a continuación, son individualmente y, más preferiblemente, en su totalidad esenciales para la unión a la MCP-1:

- 5 • las cajas **B1A** y **B1B**, extensiones terminales 5' y 3' que se pueden hibridar entre sí; donde **B1A** es **ACGCA** y **B1B** es **UGCGU**, o **B1A** es **CGCA** y **B1B** es **UGCG**, o **B1A** es **GCA** y **B1B** es **UGCG** o **UGC**; preferiblemente **B1A** es **GCA** y **B1B** es **UGCG**;
- la caja **B2**, **CSUCCUCACCGUGCAAGUGAAGCCGYGGCUC**, preferiblemente **CGUCCUCACC-GGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUC**

10 Como se ilustra en la Figura 3, el ácido nucleico designado como 180-D1-002 además de los derivados de tipo 180-D1-002 tales como 180-D1-011, 180-D1-012, 180-D1-035, y 180-D1-036 (= NOX-E36) tienen la mejor afinidad de unión con la MCP-1 como aptámero en el ensayo de unión con una $K_D < 1$ nM y, en consecuencia, pueden constituir la secuencia óptima y la combinación óptima de elementos de secuencia **B1A**, **B2**, y **B1B**.

15 Para las moléculas de ácido nucleico D-NOX-E36 (D-180-D1-036; SEC ID N°: 159), se determinó una constante de disociación (K_D) de 890 ± 65 pM a temperatura ambiente (TA) y de 146 ± 13 pM a 37°C (Ejemplo 4; Figura 9). El Spiegelmero NOX-E36 respectivo (180-D1-036; SEC ID N°: 37) exhibió una concentración inhibitoria (IC_{50}) de 3 - 4 nM en un ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* (Ejemplo 5; Figura 12) y de aproximadamente 0,5 nM en un ensayo de quimiotaxis *in vitro* (Ejemplo 6; Figura 15). Para los derivados PEGilados de NOX-E36, NOX-E36-3'PEG y NOX-E36-5'PEG, se determinaron las IC_{50} de aproximadamente 3 nM en el ensayo de liberación de Ca^{++} (Ejemplo 5, Figura 25 y Figura 27A) y < 1 nM en el ensayo de quimiotaxis (Ejemplo 6; Figura 26 y Figura 27B).

20 **Ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de Tipo 3 (Figuras 4+5)**

Como se ilustra en las Figuras 4 y 5, todas las secuencias de Tipo 3 comprenden varias extensiones o cajas de secuencias donde tres pares de cajas son características para los **ácidos nucleicos de Tipo 3 de unión a MCP-1**. Ambas cajas **B1A** y **B1B**, así como las cajas **B2A** y **B2B** y las cajas **B5A** y **B5B** tienen la capacidad para hibridarse entre sí. Sin embargo, dicha hibridación no se da necesariamente en la molécula como se presenta realmente en condiciones fisiológicas. Entre estos elementos de secuencia potencialmente hibridados, se localizan nucleótidos no hibridantes, definidos como caja **B3**, caja **B4** y caja **B6**.

Los ácidos nucleicos se caracterizaron a nivel de aptámero, usando ensayos de unión directa y competitiva con D-MCP-1 biotinilada humana, para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como el Spiegelmero (Ejemplo 3) y se evaluaron usando la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) en ensayos de quimiotaxis *in vitro* (Ejemplo 6) o por medio de medidas de Biacore (Ejemplo 7).

Las secuencias de las cajas definidas pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de Tipo 3 que se unen a MCP-1, lo que influye en la afinidad de unión a la MCP-1. En base al análisis de la unión de diferentes ácidos nucleicos que se unen a MCP-1 designados como **ácidos nucleicos de Tipo 3 que se unen a MCP-1**, las cajas **B1A**, **B2A**, **B3**, **B2B**, **B4**, **B5A**, **B6**, **B5B**, **B1B** y sus secuencias de nucleótidos descritas a continuación, son individualmente y, más preferiblemente, en su totalidad esenciales para la unión a la MCP-1:

- 40 • las cajas **B1A** y **B1B**, extensiones de los extremos terminales 5' y 3' que se pueden hibridar entre sí; donde **B1A** es **GURCUGC** y **B1B** es **GCAGCAC**; preferiblemente **B1A** es **GUGCUGC** y **B1B** es **GCAGCAC**; o **B1A** es **GKSYGC** y **B1B** es **GCRSMC**; preferiblemente **B1A** es **GUGC GC** y **B1B** es **GCGCAC**; o **B1A** es **KBBSC** y **B1B** es **GSVVM**; preferiblemente **B1A** es **KKSSC** y **B1B** es **GSSMM**; o **B1A** es **BNGC** y **B1B** es **GCVN**; preferiblemente **B1A** es **SNGC** y **B1B** es **GCNS**; lo más preferiblemente **B1A** es **GGGC** y **B1B** es **GCCC**;
- las cajas **B2A** y **B2B**, extensiones que se pueden hibridar entre sí, donde **B2A** es **GKMGU** y **B2B** es **ACKMC**; preferiblemente **B2A** es **GUAGU** y **B2B** es **ACUAC**;
- 45 • la caja **B3**, que es **KRRAR**, preferiblemente **UAAAA** o **GAGAA**;
- la caja **B4**, que es **CURYGA** o **CUWAUGA** o **CWRMGACW** o **UGCCAGUG**, preferiblemente **CAGCGACU** o **CAACGACU**;
- **B5A** y **B5B**, extensiones que se pueden hibridar entre sí; donde **B5A** es **GGY** y **B5B** es **GCYR** mientras que **GCY** se puede hibridar con los nucleótidos de **B5A**; o **B5A** es **CWGC** y **B5B** es **GCWG**; preferiblemente **B5A** es **GGC** y **B5B** es **GCCG**;
- 50 • la caja **B6**, que es: **YAGA**; o **CKAAU**; o **CCUUUAU**; preferiblemente **UAGA**.

55 Tal como se ilustra en las Figuras 4 y 5, el ácido nucleico designado como 178-D5 y su derivado 178-D5-030, así como 181-A2 con sus derivados 181-A2-002, 181-A2-004, 181-A2-005, 181-A2-006, 181-A2-007, 181-A2-017, 181-A2-018, 181-A2-019, 181-A2-020, 181-A2-021, y 181-A2-023 presentan la mejor afinidad con MCP-1. 178-D5 y 178-D5-030 se evaluaron como aptámeros en ensayos de unión directa o competitiva (Ejemplo 4) con una K_D de aproximadamente 500 pM. En el mismo experimento, se determinó que 181-A2 tenía una K_D de aproximadamente

100 pM. En el análisis Biacore (Ejemplo 7), se determinó que la K_D de 181-A2 y sus derivados hacia MCP-1 era de 200 - 300 pM. En los ensayos de liberación de Ca^{++} y de quimiotaxis con células cultivadas (Ejemplos 5 y 6, respectivamente), para ambos, 178-D5 y 181-A2, se midió una IC_{50} de aproximadamente 500 pM. En consecuencia, 178-D5 además 181-A2 y sus derivados pueden constituir la secuencia óptima y la combinación óptima de elementos de secuencia B1A, B2A, B3, B2B, B4, B5A, B6, B5B y B1B.

Ácidos nucleicos de unión a MCP-1 de Tipo 3 (Figura 6)

Tal como se ilustra en la Figura 6, todas las secuencias de Tipo 4 comprenden varias extensiones o cajas de secuencia, en donde las cajas B1A y B1B son las extensiones terminales 5' y 3' que se pueden hibridar entre sí y la caja B2 es el elemento de secuencia central.

Los ácidos nucleicos fueron caracterizados a nivel de aptámero usando ensayos de unión directa y competitiva con D-MCP-1 biotinilada humana, para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como el Spiegelmero (Ejemplo 3) y se evaluaron usando la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) en ensayos de liberación de Ca^{++} *in vitro* del cultivo celular (Ejemplo 5) y/o en ensayos de quimiotaxis (Ejemplo 6).

Las secuencias de las cajas definidas pueden ser diferentes entre los ácidos nucleicos de Tipo 4 que se unen a MCP-1, lo que influye en la afinidad de unión a MCP-1. En base al análisis de la unión de diferentes ácidos nucleicos que se unen a MCP-1 designados como **ácidos nucleicos de Tipo 4 que se unen a MCP-1**, las cajas B1A, B2, y B1B, y sus secuencias de nucleótidos descritas a continuación, son individualmente y, más preferiblemente, en su totalidad esenciales para la unión a la MCP-1:

- las cajas B1A y B1B, extensiones terminales 5' y 3' que se pueden hibridar entre sí; en donde B1A es AGCGUGDU y B1B es GNCASGCU; o B1A es GCGCGAG y B1B es CUCGCGUC; o B1A es CSKSUU y B1B es GRSMMSG; o B1A es GUGUU y B1B es GRCAC; o B1A es UGUU y B1B es GGCA; preferiblemente B1A es CSKSUU y B1B es GRSMMSG; lo más preferiblemente B1A es CCGCUU y B1B es GGGCGG; y

- la caja B2, que es AGNDRDGBKGGURGYARGUAAAG o AGGUGGGUGGUAGUAAGUAAAG o CAGGUGGGUGGUAGAAUGUAAAGA, preferiblemente AGGUGGGUGGUAGUAAGUAAAG

Tal como se ilustra en la Figura 6, el ácido nucleico designado como 174-D4-004 y 166-A4-002 tiene la mejor afinidad con la MCP-1 (como Spiegelmero con una IC_{50} de 2 - 5 nM en un ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro*) y puede, en consecuencia, constituir la secuencia óptima y la combinación óptima de los elementos de secuencia B1A, B2, y B1B.

Adicionalmente, se identificaron otros 29 ácidos nucleicos de unión a MCP-1 que no se pueden describir por una combinación de elementos de secuencia de nucleótidos como la demostrada para los ácidos nucleicos de Tipos 1 - 4 que se unen a MCP-1. Estas secuencias se enumeran en la Figura 7.

Se considera que cualquiera de las secuencias mostradas en las Figuras 1 a 7 son ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, que incluyen las formas truncadas de los mismos pero que también incluyen las formas extendidas de los mismos, con la condición, sin embargo, de que las moléculas de ácidos nucleicos truncadas y extendidas de este modo, respectivamente, sean todavía capaces de unirse a la diana.

Ejemplo 2: Ácidos nucleicos que se unen a MCP-1 murina

Mediante el uso de la D-MCP-1 biotinilada murina como diana, se podrían generar varias moléculas de ácido nucleico que se unen a la misma. El resultado de un análisis de secuencia de estas moléculas de ácido nucleico se puede tomar de la Figura 8.

Los ácidos nucleicos fueron caracterizados a nivel de aptámero usando ensayos de unión directa y competitiva con D-MCP-1 biotinilada murina, para clasificarlos con respecto a su comportamiento de unión (Ejemplo 4). Las secuencias seleccionadas se sintetizaron como el Spiegelmero (Ejemplo 3) y se evaluaron usando la configuración natural de la MCP-1 (L-MCP) en un ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* del cultivo celular (Ejemplo 5) y un ensayos de quimiotaxis *in vitro* (Ejemplo 6).

Tal como se ilustra en la Figura 8, D-188-A3-001 y D-189-G7-001 y sus derivados se unen a D-MCP-1 con una K_D sub-nanomolar en el ensayo de unión (Figura 8).

Para D-mNOX-E36 (= D-188-A3-007; SEC ID N°: 244), se determinó una constante de disociación (K_D) de 0,1 - 0,2 nM a 37°C (Ejemplo 4; Figura 10). El Spiegelmero mNOX-E36 (188-A3-007; SEC ID N°: 122) respectivo exhibió una concentración inhibitoria (IC_{50}) de aproximadamente 12 nM en un ensayo de liberación de Ca^{++} *in vitro* (Ejemplo 5; Figura 13) y de aproximadamente 7 nM en un ensayo de quimiotaxis *in vitro* (Ejemplo 6; Figura 16). Para el derivado PEGilado de mNOX-E36, mNOX-E36-3'PEG (SEC ID N°: 254), se determinaron las IC_{50} de aproximadamente 8 nM

en un ensayo de liberación de Ca^{++} (Ejemplo 5, Figura 29) y de aproximadamente 3 nM en el ensayo de quimiotaxis (Ejemplo 6; Figura 31).

5 Debe entenderse que cualquiera de las secuencias mostradas en las Figuras 1 a 7 son ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, que incluyen las formas truncadas de los mismos pero que también incluyen las formas extendidas de los mismos, con la condición, sin embargo, de que las moléculas de ácido nucleico truncadas y extendidas de este modo, respectivamente, sean todavía capaces de unirse a la diana.

Ejemplo 3: Síntesis y derivatización de aptámeros y Spiegelmeros

Síntesis a pequeña escala

10 Los aptámeros y los Spiegelmeros se produjeron mediante una síntesis en fase sólida con un sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) usando reacciones químicas con ARN 2'TBDMS fosforamidita (M.J. Damha, K.K. Ogilvie, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 *Protocols for oligonucleotides and analogs*, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. 1993). Las fosforamiditas rA(N-Bz)-, rC(Ac)-, rG(N-ibu)- y UR en configuración D y L se adquirieron en ChemGenes, Wilmington, MA. Los aptámeros y los Spiegelmeros se purificaron mediante electroforesis en gel.

15 Síntesis a gran escala más modificación

El Spiegelmero NOX-E36 se produjo mediante síntesis en fase sólida con un sintetizador ÄktaPilot100 (Amersham Biosciences; General Electric Healthcare, Friburgo) usando reacciones químicas con ARN 2'TBDMS fosforamidita (M.J. Damha, K.K. Ogilvie, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 *Protocols for oligonucleotides and analogs*, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. 1993). Las fosforamiditas rA(N-Bz)-, rC(Ac)-, rG(N-ibu)- y UR en configuración D y L se adquirieron en ChemGenes, Wilmington, MA. El modificador de 5'-amino se adquirió en American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, EE.UU.). La síntesis del Spiegelmero no modificado comenzó sobre CPG modificado con riboG-L de tamaño de poro de 1000 Å (Link Technology, Glasgow, R.U.); para el Spiegelmero modificado en 3'-NH₂, se usó el aminomodificador 3'-CPG, 1000 Å (ChemGenes, Wilmington, MA). Para el acoplamiento (15 minutos por ciclo), se usó benciliotetrazol 0,3 M (CMS-Chemicals, Abingdon, R.U.) en acetonitrilo y 3,5 equivalentes de la disolución de fosforamidita respectiva 0,1 M en acetonitrilo. Se usó un ciclo de oxidación-terminación de cadena. Los disolventes y reactivos estándares adicionales para la síntesis de oligonucleótidos se adquirieron en Biosolve (Valkenswaard, Holanda). El Spiegelmero se sintetizó en DMT-ON; después de desprotección, se purificó por medio de RP-HPLC preparativa (Wincott F. *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23: 2677) usando un medio Source15RPC (Amersham). El grupo 5'DMT se eliminó con ácido acético al 80% (30 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente, se agregó una disolución de NaOAc 2 M y el Spiegelmero se desalinizó por filtración con flujo tangencial mediante una membrana de celulosa regenerada 5 K (Millipore, Bedford, MA).

PEGilación de NOX-E36

35 Para prolongar el tiempo de residencia del plasma del Spiegelmero *in vivo*, el Spiegelmero NOX-E36 se acopló de forma covalente a un residuo de polietilen glicol de 40 kDa (PEG) en el extremo 3' o 5'.

PEGilación en 3' de NOX-E36

40 Para la PEGilación (para detalles técnicos del método para PEGilación ver la Solicitud de Patente Europea EP 1 306 382), se disolvió el Spiegelmero modificado en 3'-amino purificado en una mezcla de H₂O (2,5 mL), DMF (5 mL), y tampón A (5 mL; preparado mezclando ácido cítrico · H₂O [7 g], ácido bórico [3,54 g], ácido fosfórico [2,26 mL] y NaOH 1 M [343 mL] y añadiendo H₂O hasta un volumen final de 1 L; el pH = 8,4 se ajustó con HCl 1 M).

El pH de la disolución del Spiegelmero se llevó a 8,4 con NaOH 1 M. Luego, se añadió éster de PEG-NHS 40 kDa (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) a 37°C cada 30 minutos en cuatro porciones de 0,6 equivalentes hasta que alcanzó un rendimiento máximo de 75 a 85%. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 8 - 8,5 con NaOH 1 M durante la adición del éster de PEG-NHS.

45 La mezcla de reacción se combinó con 4 mL de disolución de urea (8 M), 4 mL de tampón A y 4 mL de tampón B (acetato de trietilamonio 0,1 M en H₂O) y se calentó a 95°C durante 15 minutos. El Spiegelmero PEGilado luego se purificó mediante RP-HPLC con un medio Source 15RPC (Amersham), con un gradiente de acetonitrilo (tampón B; tampón C: acetato de trietilamonio 0,1 M en acetonitrilo). El exceso de PEG eluido con un tampón C de 5%, Spiegelmero PEGilado en un tampón C de 10 - 15%. Las fracciones del producto con una pureza de >95% (medido por HPLC) se combinaron y mezclaron con 40 mL de NaOAc 3 M. El Spiegelmero PEGilado fue desalinizado por filtración con flujo tangencial (membrana de celulosa regenerada 5 K, Millipore, Bedford MA).

PEGilación en 5' de NOX-E36

Para la PEGilación (para detalles técnicos del método de PEGilación ver la Solicitud de Patente Europea EP 1 306 382), se disolvió el Spiegelmero modificado en 5'-amino purificado en una mezcla de H₂O (2,5 mL), DMF (5 mL) y

tampón A (5 mL; preparado mezclando ácido cítrico · H₂O [7 g], ácido bórico [3,54 g], ácido fosfórico [2,26 mL] y NaOH 1 M [343 mL] y añadiendo H₂O hasta un volumen final de 1 L; el pH = 8,4 se ajustó con HCl 1 M).

5 El pH de la disolución del Spiegelmero se llevó a 8,4 con NaOH 1 M. Luego, se añadió éster de PEG-NHS 40 kDa (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) a 37°C cada 30 minutos en seis porciones de 0,25 equivalentes hasta que se alcanzó un rendimiento máximo de 75 a 85%. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a 8 - 8,5 con NaOH 1 M durante la adición del éster de PEG-NHS.

10 La mezcla de reacción se combinó con 4 mL de disolución de urea (8 M), 4 mL de tampón A y 4 mL de tampón B (acetato de trietilamonio 0,1 M en H₂O) y se calentó a 95°C durante 15 minutos. El Spiegelmero PEGilado luego se purificó mediante RP-HPLC con un medio Source 15RPC (Amersham), usando un gradiente de acetonitrilo (tampón B; tampón C: acetato de trietilamonio 0,1 M en acetonitrilo). El exceso de PEG eluido con un tampón C de 5%, Spiegelmero PEGilado en un tampón C de 10 - 15%. Las fracciones del producto con una pureza de >95% (medido por HPLC) se combinaron y mezclaron con 40 mL de NaOAC 3 M. El Spiegelmero PEGilado se desalinizó por filtración con flujo tangencial (membrana de celulosa regenerada 5 K, Millipore, Bedford MA).

Ejemplo 4: Determinación de las constantes de unión (ensayo de unión)

15 Ensayo de unión directa

Se midió la afinidad de los aptámeros con el D-MCP-1 en un formato de ensayo de unión a 20 o 37°C, respectivamente. Los aptámeros fueron marcados con 5'-fosfato mediante T4 polinucleótido quinasa (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) usando ATP marcado con [γ -³²P] (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemania). La radiactividad específica de los aptámeros marcados fue de 200.000 - 800.000 cpm/pmol. Los aptámeros se incubaron después de la des- y re-naturalización hasta una concentración de 20 pM a 37°C en un tampón de selección (Tris 20 mM-HCl pH 7,4; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 1 mM; Tween-20 al 0,1% [p/vol]) junto con cantidades variadas de D-MCP-1 biotinilada durante 4 - 12 horas para alcanzar el equilibrio a concentraciones bajas. El tampón de selección se suplementó con 10 µg/mL de albúmina de suero humano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y 10 µg/mL de ARN de levaduras (Ambion, Austin, EE.UU.) para evitar la adsorción de los compañeros de unión en superficies de plástico o la matriz de inmovilización. El rango de concentración de D-MCP-1 biotinilada se ajustó entre 8 pM y 100 nM; el volumen de reacción total fue 1 mL. Los complejos de péptido y péptido-aptámero se inmovilizaron en 1,5 µL de partículas de estreptavidina Streptavidin Ultralink Plus (Pierce Biotechnology, Rockford, EE.UU.) que habían sido pre-equilibradas con tampón de selección y se re-suspendieron en un volumen total de 6 µL. Las partículas se mantuvieron en suspensión durante 30 minutos a la temperatura respectiva en un mezclador térmico. La radiactividad inmovilizada se cuantificó en un contador de centelleo después de retirar el sobrenadante y de un lavado apropiado. El porcentaje de unión se representó frente a la concentración de D-MCP-1 biotinilada y se obtuvieron las constantes mediante algoritmos de software (GRAFIT; Erithacus Software; Surrey R.U.) suponiendo una estequiometría de 1:1.

Ensayo de unión competitiva

35 Con el objetivo de comparar diferentes aptámeros de unión a D-MCP-1, se realizó un ensayo de clasificación competitiva. Para este propósito, el aptámero disponible más afín se marcó con radiactividad (ver anteriormente) y actuó como referencia. Después de la des- y la re-naturalización se incubó a 37°C con D-MCP-1 biotinilada en 1 mL de tampón de selección en condiciones que producen alrededor de 5 - 10 % de unión al péptido después de la inmovilización y lavado en agarosa NeutrAvidin o estreptavidina Ultralink Plus (ambas de Pierce) sin competición. Se añadió a reacciones de unión paralelas un exceso de aptámero de D-ARN des- y re-naturalizado no marcado a diferentes concentraciones (por ej., 2, 10, y 50 nM) con el aptámero de referencia marcado. Los aptámeros ensayados compitieron con el aptámero de referencia para unirse a la diana, disminuyendo de este modo la señal de unión dependiendo de las características de unión. El aptámero hallado como más activo en este ensayo puede servir a continuación como nueva referencia para el análisis comparativo de otras variantes de aptámero.

45 **Ejemplo 5: Determinación de la concentración inhibitoria en un ensayo de liberación de Ca⁺⁺**

Se cultivaron células THP-1 (DSMZ, Braunschweig) durante una noche con una densidad celular de 0,3 x 10⁶/mL a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 con GlutaMAX (Invitrogen) que contenía además un 10% de suero de carnero fetal, 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomycin y β-mercaptoetanol 50 µM.

50 Los Spiegelmeros se incubaron junto con MCP-1 recombinante humana (Bachem) en disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS), que contiene 1 mg/mL de albúmina de suero bovino, probenecid 5 mM y HEPES 20 mM (HBSS+) durante de 15 a 60 minutos a 37°C en una placa de 96 pocillos de perfil bajo de 0,2 mL ("disolución de estimulación").

55 Para la carga con el colorante indicador de calcio, las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min, se resuspendieron en 4 mL de disolución de colorante indicador (10 µM de fluo-4 [Molecular Probes], 0,08% de pluronic 127 [Molecular Probes] en HBSS+) y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Después de ello, se añadieron 11 mL de HBSS+ y se centrifugaron las células como antes, se lavaron una vez con 15 mL de HBSS+ y luego se

resuspendieron en HBSS+ para dar una densidad celular de $1,1 \times 10^6$ /mL. Se agregaron 90 μ L de esta suspensión de células a cada pocillo de una placa negra de 96 pocillos.

5 La medición de las señales de fluorescencia se realizó con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm en una placa lectora de detección múltiple Fluostar Optima (BMG). Para una medición paralela de varias muestras, se registraron juntos los pocillos de cada fila (perpendicular) de la placa de 96 pocillos. Se realizaron las tres primeras lecturas con un tiempo de demora de 4 segundos para la determinación de la línea de base. Luego el registro se interrumpió y la placa se retiró del instrumento. Mediante una pipeta multicanal, se agregaron 10 μ L de la disolución de estimulación a los pocillos, luego la placa se colocó otra vez en el instrumento y la medición continuó. En total, se realizaron 20 registros con intervalos de tiempo de 4 segundos.

10 Para cada pocillo se determinó la diferencia entre la fluorescencia máxima y el valor de la línea base, y se representó frente a la concentración de MCP-1 o, en los experimentos de inhibición de la liberación de calcio por Spiegelmeros, frente a la concentración de Spiegelmero.

Determinación de la concentración efectiva media máxima (EC₅₀) correspondiente a MCP-1 humana

15 Después de estimular células THP-1 con diversas concentraciones de hMCP-1 y de representar gráficamente la diferencia entre las señales máximas y basales, se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1 humana, la cual indica una concentración efectiva media (EC₅₀) de aproximadamente 2 - 4 nM (Figura 11). Esta concentración se usó para los experimentos adicionales de inhibición de la liberación de Ca⁺⁺ por los Spiegelmeros.

Determinación de la concentración efectiva media máxima (EC₅₀) correspondiente a MCP-1 murina

20 Después de estimular células THP-1 con diversas concentraciones de hMCP-1 y de representar gráficamente la diferencia entre las señales máximas y basales, se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1 murina, la cual indica una concentración efectiva media (EC₅₀) de aproximadamente 5 nM (Figura 28). Esta concentración se usó para los experimentos adicionales de inhibición de la liberación de Ca⁺⁺ por los Spiegelmeros.

Ejemplo 6: Determinación de la concentración inhibidora en un ensayo de quimiotaxis

25 Células THP-1 cultivadas como se ha descrito anteriormente fueron centrifugadas, lavadas una vez con HBH (HBSS, que contiene 1 mg/mL de albúmina de suero bobino y HEPES 20 mM) y resuspendidas a razón de 3×10^6 células/mL. Se añadieron 100 μ L de esta suspensión a insertos Transwell con poros de 5 μ m (Corning, n° 3421). En los compartimientos inferiores la MCP-1 se preincubó junto con los Spiegelmeros en diversas concentraciones en 600 μ L de HBH a 37°C durante 20 a 30 minutos antes de la adición de las células. Las células se dejaron migrar a 37°C durante 3 horas. Después se retiraron los insertos y se añadieron 60 μ L de resazurina 440 μ M (Sigma) en disolución tamponada con fosfato a los compartimientos inferiores. Después de incubar a 37°C durante 2,5 horas, se midió la fluorescencia en una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm en un lector de placa de detección múltiple Fluostar Optima (BMG).

Determinación de la concentración efectiva media máxima (EC₅₀) correspondiente a MCP-1 humana

35 Después de 3 horas de migración de las células THP-1 a diversas concentraciones de MCP-1 humana, se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1 humana, que indica una concentración efectiva máxima de aproximadamente 1 nM, y una activación reducida a concentraciones superiores (Figura 14). Para experimentos adicionales de inhibición de la quimiotaxis por los Spiegelmeros se usó una concentración de MCP-1 de 0,5 nM.

Determinación de la concentración efectiva media máxima (EC₅₀) correspondiente a la MCP-1 murina

40 Después de 3 horas de migración de las células THP-1 a diversas concentraciones de MCP-1 murina, se obtuvo una curva de dosis respuesta para la MCP-1 murina, que indica una concentración efectiva máxima de aproximadamente 1 - 3 nM y una activación reducida a concentraciones superiores (Figura 30). Para experimentos adicionales de inhibición de la quimiotaxis por los Spiegelmeros, se usó una concentración de MCP-1 murina de 0,5 nM.

Ejemplo 7: Análisis de unión por medición de la resonancia de plasmón superficial

7.1 Evaluación de especificidad de NOX-E36, 181-A2-018 y mNOX-E36

45 Se usó un instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) para analizar la unión de los ácidos nucleicos a la MCP-1 humana y proteínas relacionadas. Cuando se logró el acoplamiento por medio de los grupos amino, las proteínas se dializaron contra agua durante 1 - 2 h (ésteres de celulosa mixtos Millipore VSWP; tamaño de poro, 0,025 μ m) para eliminar las aminas interferentes. Los chips sensores PioneerF1 o CM4 (Biacore AB) se activaron antes del acoplamiento de proteínas por una inyección de 35 μ L de una dilución 1:1 de NHS 0,4 M y EDC 0,1 M con un caudal de 5 μ L/minuto. Luego se inyectó quimiocina en concentraciones de 0,1 - 1,5 μ g/mL con un caudal de 2 μ L/minuto hasta que la respuesta del instrumento estuvo en el rango de 1000 - 2000 UR (unidades relativas). Los ésteres de NHS no reaccionados se desactivaron con una inyección de 35 μ L de una disolución de clorhidrato de etanolamina (pH 8,5) con un caudal de 5 μ L/minuto. El chip sensor se activó dos veces con tampón de unión y se equilibró a razón de 10 μ L/minuto durante 1 - 2 horas hasta que el valor basal fue estable. Para todas las proteínas,

se evaluaron los parámetros cinéticos y las constantes de disociación mediante una serie de inyecciones de Spiegelmeros a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, y 0 nM en tampón de selección (Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 137 mM; KCl, 5 mM; CaCl₂, 1 mM; MgCl₂, 1 mM; Tween20, 0,1% [p/v]; pH 7,4). En todos los experimentos se realizó el análisis a 37°C mediante el comando Kinject que define un tiempo de asociación de 180 y un tiempo de disociación de 360 segundos a un caudal de 10 µL/minuto. Los análisis de datos y el cálculo de las constantes de disociación (K_D) se realizaron con el software BIAevaluation 3.0 (BIACORE AB, Uppsala, Suecia) usando el algoritmo de ajuste estequiométrico de Langmuir 1:1.

7.1.1 NOX-E36 y 181-A2-018 (ácidos nucleicos específicos para MCP-1 humana)

Solo se representan los sensogramas correspondientes a MCP-1 humana (Figuras 17 y 20, respectivamente); para las otras proteínas, solo se muestra el sensograma obtenido con 125 nM de concentración de Spiegelmero para mayor claridad (Figuras 18/19 y 21/22).

Análisis de la interacción NOX-E36-hMCP-1: se inmovilizó MCP-1 recombinante humana en un chip sensor PioneerF1 siguiendo las recomendaciones del fabricante (procedimiento de acoplamiento de aminas) hasta establecer una respuesta del instrumento de 1381 UR (unidades relativas). La constante de disociación determinada (K_D) para la unión de NOX-E36 a la MCP-1 humana fue de aproximadamente 890 pM (Figura 17).

Análisis de la interacción 181-A2-018-hMCP-1: MCP-1 recombinante humana se inmovilizó en un chip sensor CM4 siguiendo las recomendaciones del fabricante (procedimiento de acoplamiento de aminas) hasta establecer una respuesta del instrumento de 3111 UR (unidades relativas). La constante de disociación determinada (K_D) para la unión de 181-A2-018 a la MCP-1 humana fue de aproximadamente 370 pM (Figura 20).

Para determinar la especificidad de NOX-E36 y 181-A2-018, se inmovilizaron diversas proteínas de la familia de la MCP-1 humana además de la eotaxina humana en un chip sensor PioneerF1 y CM4 (hMCP-1, 1754 UR; hMCP-2, 1558 UR; hMCP-3, 1290 UR; eotaxina, 1523 UR). El análisis cinético demostró que NOX-E36 se une a eotaxina y hMCP-2 con constantes de disociación (K_D) de 5 - 10 nM; la hMCP-3 no fue reconocida (Figuras 18 y 24A). 181-A2-018, por contra, se une a eotaxina, hMCP-2 y hMCP-3, pero con una afinidad ligeramente menor (10 - 20 nM; Figuras 21 y 24A).

La reactividad cruzada interespecie de NOX-E36 y 181-A2-018 se evaluó mediante acoplamiento de amino inmovilizado en MCP-1 de ser humano (1460 UR), mono (1218 UR), cerdo (1428 UR), perro (1224 UR), conejo (1244 UR), rata (1267 UR) y ratón (1361 UR) en un chip sensor PioneerF1 y CM4. El análisis cinético demostró que NOX-E36 se une a MCP-1 humana, de mono, porcina y canina con constantes de disociación comparables (K_D) de 0,89 - 1,2 nM mientras que las MCP-1 de ratón, rata y conejo no fueron reconocidas (Figuras 19 y 24A). 181-A2-018 se une a MCP-1 humana y de mono con constantes de disociación comparables (K_D) de 0,5-0,6 nM, mientras que las MCP-1 porcina, de conejo y canina se unen con mucha menor afinidad. Las MCP-1 de rata y ratón no fueron reconocidas por NOX-A2-018 (Figuras 22 y 24A).

Las secuencias, así como el grado de homología en porcentaje de aminoácidos idénticos entre la proteína de MCP-1 de diferentes especies y proteínas humanas estrechamente relacionada se representan en la Figura 23; los valores de KD calculados para NOX-E36 y 181-A2-018 se exhiben en forma de tabla en la Figura 24A.

7.1.2 mNOX-E36 (ácido nucleico específico para MCP-1 murina)

Para analizar el comportamiento de unión de mNOX-E36, se inmovilizaron 3759 UR de D-MCP-1 biotinilada murina sintética (celda de flujo 3) y 3326 UR de D-MCP-1 biotinilada humana (celda de flujo 4) en un chip sensor conjugado de estreptavidina (Biacore AB, Friburgo, Alemania), respectivamente. Las disoluciones del aptámero mNOX-E36 (D-ARN) de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, y 0 nM se inyectaron mediante un comando Kinject definido con un tiempo de asociación de 180 segundos y un tiempo de disociación de 360 segundos. La celda de flujo 1 se usó como tampón y el control de matriz de dextrano (superficie Biacore SA-Chip) mientras que en la celda de flujo 2 se inmovilizó un péptido D específico para determinar la unión inespecífica del aptámero. La Figura 32 muestra un sensograma de la cinética de D-NOX-E36 para la unión a la D-MCP-1 murina con una constante de disociación calculada (K_D) de 200 - 300 pM. mNOX-E36 no se une a D-MCP-1 humana (Figura 33); para mayor claridad solo se muestra el sensograma obtenido con 125 nM de Spiegelmero.

7.2 Evaluación de selectividad de NOX-E36

La selectividad de NOX-E36 se evaluó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial al inmovilizar NOX-E36 5'-biotinilado en estreptavidina (SA-Chip). Se inmovilizaron 352 UR de NOX-E36 en la celda de flujo (FC) 1 y una cantidad igual de Spiegelmero control no funcional biotinilado en el extremo 5'-terminal (POC) en la FC 2 mediante la unión de estreptavidina/biotina. Se usó la FC3 como control de superficie para determinar la unión inespecífica a la superficie del sensor de dextrano-SA.

Se inyectaron 100 nM de un panel de quimiocinas humanas de los cuatro subgrupos (CC, CXC, CX₃C y XC) durante 360 s y los complejos se dejaron disociar durante 360 s con un caudal de 10 µL/minuto y 37°C. Se representaron gráficamente las unidades de respuesta después de la asociación (Respuesta 1; grado de interacción) y después de

- la disociación (Respuesta 2, afinidad de interacción). Después de cada inyección, la superficie del chip se regeneró con 240 s de cloruro de sodio 1 M, con 0,1% de Tween; los Spiegelmeros inmovilizados se dejaron posteriormente plegar durante 2 minutos en condiciones fisiológicas (tampón de corrida). La inyección de cada quimiocina se repitió 3 veces. CXCL1, CXCL2, CXCL6 y CXCL9 mostraron unión inespecífica a ácidos ribonucleicos y la superficie de dextrano del chip. La unión de alta afinidad específica a NOX-E36 inmovilizado solo pudo ser detectada para CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL11/eotaxina, CCL3/MIP1 α , y CXCL7/NAP-2 (Figura 24B). El hallazgo de que la MCP-2 y la eotaxina se unen con NOX-E36 no es sorprendente, ya que la relativamente alta homología entre estas quimiocinas y la MCP-1, de 62 y 70 %; para los positivos inesperados de CCL3/MIP-1 α y CXCL7/NAP-2 se han realizado pruebas de inhibición funcional *in vitro* o se están estableciendo actualmente, respectivamente.
- Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos de la interacción entre NOX-E36 y CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL11/eotaxina, CCL3/MIP1 α , CXCL7/NAP-2, CCL7/MCP-3 y CCL13/MCP-4 en el sistema "invertido". Aquí, se inmovilizaron las quimiocinas y se inyectó NOX-E36 (para el protocolo detallado, ver 7.1). Los datos cinéticos se resumen en la Figura 24C.

7.3 Evaluación de la funcionalidad anti-MIP-1 α *in vitro*

- Las mediciones en Biacore han mostrado reactividad cruzada de NOX-E36 con MIP-1 α . Mediante el empleo de un ensayo funcional *in vitro* basado en cultivo de célula se debería examinar si la unión simple Biacore de NOX-E36 a MIP-1 α también se traduce a funcionalidad, por ej., antagonismo.

- Para obtener esto, se realizaron experimentos de quimiotaxis con células THP-1 que se pueden estimular con MIP-1 α . Las células THP-1 cultivadas como se describió anteriormente se centrifugaron, se lavaron una vez con HBH (HBSS, (HBSS, que contiene 1 mg/mL de albúmina de suero bobino y HEPES 20 mM) y se resuspendieron a razón de 3×10^6 células/mL. Se añadieron 100 μ L de esta suspensión a insertos Transwell con poros de 5 μ m (Corning, n° 3421). En los compartimientos inferiores la MIP-1 α se preincubó junto con los Spiegelmeros a diversas concentraciones en 600 μ L de HBH a 37°C durante 20 a 30 minutos antes de la adición de las células. Las células se dejaron migrar a 37°C durante 3 horas. Después se retiraron los insertos y se agregaron 60 μ L de resazurina 440 μ M (Sigma) en solución tamponada con fosfato a los compartimientos inferiores. Después de incubar a 37°C durante 2,5 horas, se midió la fluorescencia en una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm en un lector de placa de detección múltiple Fluostar Optima (BMG).

- Después de 3 horas de migración de las células THP-1 a diversas concentraciones de MIP-1 α humana, se obtuvo una curva de dosis respuesta para MIP-1 α humana, que indica una concentración efectiva máxima media de aproximadamente 1 nM y una activación reducida a concentraciones superiores (Figura 24D). Para los experimentos adicionales de inhibición de la quimiotaxis por Spiegelmeros se usó una concentración de MIP-1 α de 0,5 nM.

- Se realizaron experimentos para la determinación de la inhibición de la quimiotaxis por NOX-E36 con un estímulo de 0,5 nM de MIP-1 α . Se pudo demostrar claramente que NOX-E36 no inhibe la quimiotaxis inducida por MIP-1 α hasta la mayor concentración ensayada de 1 μ M de MIP-1 α . Como control positivo, se realizó en paralelo el experimento respectivo con MCP-1 como estímulo (Figura 24E).

Ejemplo 8: Terapia de la enfermedad de tipo lupus en ratones MRL^{lpr/lpr} con Spiegelmero anti-mMCP-1

- El bloqueo de los mediadores proinflamatorios se ha convertido en un método exitoso para el tratamiento de la inflamación crónica (Steinman 2004). Además del TNF y las interleucinas, las quimiocinas CC son candidatos importantes para el antagonismo específico, ya que las quimiocinas CC median en el reclutamiento de leucocitos del espacio intravascular a los sitios de inflamación (Baggiolini 1998, Luster 2005). Existe una evidencia muy sólida de que la MCP-1 (= CCL2), y su respectivo receptor de quimiocina CCR2, cumple un papel crucial en la lesión del tejido autoinmune tal como las manifestaciones clínicas del lupus eritematoso sistémico (Gerard & Rollins 2001). Por ejemplo, los ratones MRL^{lpr/lpr} deficientes en el gen *Ccl2* o *Ccr2* están protegidos de la autoinmunidad semejante al lupus (Perez de Lema 2005, Tesch 1999). De este modo, el eje CCL2/CCR2 puede representar un objetivo terapéutico prometedor, por ej., para la nefritis lúpica. En efecto, la terapia génica retardada o la transferencia de células transfectadas, ambas resultantes de la producción *in situ* de una MCP-1 truncada en NH₂, redujeron considerablemente la lesión tisular autoinmune en ratones MRL^{lpr/lpr}. Sin embargo, tales métodos experimentales no se pueden usar en seres humanos debido a la producción incontrolable de antagonistas y a la formación de tumores (Hasegawa 2003, Shimizu 2004). En consecuencia, todavía es necesario desarrollar nuevos antagonistas CCL2 con perfiles farmacocinéticos favorables *in vivo*. En este ejemplo se demuestra que el bloqueo de CCL2 murino con el Spiegelmero anti-mCCL2 mNOX-E36 o mNOX-E36-3'PEG sería adecuado para el tratamiento de la nefritis lúpica y de otras manifestaciones de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico. El comienzo tardío de la terapia con Spiegelmero mCCL2 mejora efectivamente la nefritis lúpica, peribronquitis autoinmune y enfermedad cutánea semejante a lupus en ratones MRL^{lpr/lpr}, independientemente de cualquier problema previo asociado con el bloqueo de CCL2/CCR2 terapéutico.

Animales y protocolo experimental

Se obtuvieron ratones hembra MRL^{lpr/lpr} de diez semanas de edad en Harlan Winkelmann (Borchen, Alemania) y se mantuvieron en condiciones normales de alojamiento con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad. El agua y el

pienso estándar (Ssniff, Soest, Alemania) estuvieron disponibles *ad libitum*. A la edad de 14 semanas, grupos de 12 ratones recibieron inyecciones subcutáneas de Spiegelmeros en 5% de glucosa (volumen de inyección, 4 mL/kg) tres veces por semana de la siguiente manera: mNOX-E36, 1,5 $\mu\text{mol/kg}$; mNOX-E36-3'PEG, 0,9 $\mu\text{mol/kg}$; Spiegelmero de control no funcional PoC (5'-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGU AGCGCUGUGCAGAGCU-3'), 1,9 $\mu\text{mol/kg}$; PoC-PEG, 0,9 $\mu\text{mol/kg}$; vehículo (5% de glucosa). Se determinaron los niveles plasmáticos de mNOX-E36 y mNOX-E36-3'PEG en muestras de sangre tomadas semanalmente del seno retroorbital 3 o 24 horas después de la inyección, respectivamente. Los niveles de Spiegelmero en las muestras de plasma se determinaron a través de una modificación del método de hibridación sándwich descrito en el Ejemplo 8. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical al final a las 24 semanas de edad.

10 *Evaluación del lupus sistémico*

Las lesiones cutáneas se registraron por un puntaje semicuantitativo (Schwartzing 2005). Se calculó la proporción del peso del bazo y la masa de los ganglios linfáticos del mesenterio respecto al peso corporal total como marcador del síndrome linfoproliferativo asociado con el lupus. Se recogieron muestras de sangre y orina de cada animal al final del período de estudio por sangrado del plexo venoso retro-orbital bajo anestesia general con éter inhalador. Se recogieron muestras de sangre y orina de cada animal al final del período de estudio y se determinó la relación albúmina/cretinina urinaria y los títulos séricos del isotipo IgG del autoanticuerpo ADNsD como se ha descrito previamente (Pawar 2006). Se determinó la velocidad de filtración glomerular (GFR) a las 24 semanas a través de la cinética de depuración de FITC-inulina plasmática (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) 5, 10, 15, 20, 35, 60, y 90 minutos después de una única inyección en bolo (Qi 2004). Se determinó la fluorescencia con excitación de 485 nm y se leyó a una emisión de 535 nm. La GFR se calculó sobre la base del modelo de dos compartimientos mediante un software de ordenador de ajuste de curva con regresión no lineal (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Se determinaron los niveles de citocinas en suero mediante kits comerciales de ELISA para las IL-6, IL-12p40 (OptEiA, BD Pharmingen), e IFN- α (PBL Biomedical Labs, USA). Se fijaron los riñones y pulmones de todos los ratones en 10% de formalina tamponada, se procesaron y se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de 5 μm para las tinciones con plata yácido peryódico de Schiff, siguiendo los protocolos de rutina (Anders 2002). Se clasificó la gravedad de las lesiones renales mediante los índices de actividad y cronicidad descritos para la nefritis lúpica humana (Austin 1984), y se realizó la morfometría de la lesión intersticial renal como se ha descrito previamente (Anders 2002). La gravedad de la inflamación peribronquial se clasificó de forma semicuantitativa entre 0 y 4. Para la inmunotinción, las secciones de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina se desparafinaron y se rehidrataron. Se bloqueó la peroxidasa endógena con un 3% de peróxido de hidrógeno y se realizó la recuperación del antígeno en disolución de recuperación del antígeno (Vector, Burlingame, CA) en una estufa autoclave. La biotina se bloqueó con el kit de bloqueo de avidina/biotina (Vector). Los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios durante una hora, seguido por los anticuerpos secundarios biotinilados (IgG anti-rata, Vector) y el reactivo ABC (Vector). Los portaobjetos se lavaron en disolución salina tamponada con fosfato entre los pasos de incubación. Se usó 3'3'diaminobencidina (DAB, Sigma, Taufkirchen, Alemania) con refuerzo metálico como sistema de detección, lo que originó un producto de color negro. Se usó verde de metilo como tinte de contraste, los portaobjetos se rehidrataron y montaron en Histomount (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Mac2 de rata (macrófagos, Cederlane, Ontario, Canadá, 1:50), CD3 anti-ratón (1:100, clon 500A2, BD), IgG₁ anti-ratón (1:100, M32015, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.), IgG_{2a} anti-ratón (1:100, M32215, Caltag), C3 anti-ratón (1:200, GAM/C3c/FITC, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holanda). Los controles negativos incluyeron la incubación con un anticuerpo del isotipo respectivo. Para el análisis cuantitativo, se contaron las células glomerulares de 15 glomérulos corticales por sección. Se clasificaron los depósitos de Ig y C3c glomerulares de 0-3 en 15 secciones de glomérulos corticales.

Preparación de ARN y RT-PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan)

45 El tejido renal de cada ratón se separó congelado en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C . Para cada animal se realizó la preparación del ARN renal total y la transcripción inversa tal como se ha descrito (Anders 2002). Los cebadores y las sondas fueron de PE Biosystems, Weiterstadt, Alemania. Los cebadores usados (300 nM) se emplearon para la detección de *Ccl2*, *Ccl5* y *ARNr 18S*, el reactivo del ensayo TaqMan predesarrollado provenía de PE Biosystems.

50 *Citometría de flujo*

Al final del estudio se obtuvieron muestras de sangre entera y de medula ósea de los ratones de todos los grupos. Se realizó la citometría de flujo mediante una máquina FACScalibur y el anticuerpo previamente caracterizado MC21 anti-mCCR2 (Mack 2001). Para la detección se usó un anticuerpo IgG anti-rata biotinilado (BD Biosciences). Se usó una IgG_{2b} de rata (BD Biosciences) como control de isotipo.

55 *Análisis estadístico*

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Se realizó la comparación entre los grupos mediante un ANOVA univariado. Se usó la corrección de Posthoc Bonferroni para las comparaciones múltiples. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ indica significación estadística.

Ensayo de hibridación tipo sándwich

Se cuantificó la cantidad de Spiegelmero en las muestras mediante un ensayo de hibridación tipo sándwich basado en un ensayo descrito por Drolet *et al.* 2000 (*Pharm Res* 17:1503). Las muestras de sangre se recogieron en paralelo para seguir la depuración plasmática de NOX-E36. Los tejidos seleccionados se prepararon para determinar las concentraciones de Spiegelmero.

5 Preparación de la placa de hibridación

El Spiegelmero mNOX-E36 se cuantificó por medio un ensayo de hibridación tipo sándwich no validado. Brevemente, la sonda de captura de mNOX-E36 (SEC ID N°: 281) se inmovilizó sobre placas blancas de 96 pocillos ADN-BIND (Corning Costar, Wiesbaden, Alemania) a 0,75 mM en fosfato de sodio 0,5 M, EDTA 1 mM, pH 8,5 durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron dos veces y se bloquearon con 0,5% p/v de BSA en fosfato de sodio 0,25 M, EDTA 1 mM, pH 8,5 durante 3 h a 37°C, se lavó otra vez y se conservó a 4°C hasta uso. Antes de la hibridación, los pocillos se pre-calentaron a 37°C y se lavaron dos veces con tampón de lavado pre-calentado (3×SSC, 0,5% [p/v] sarcosinato de dodecil sodio, pH 7,0; por adelantado se prepara una disolución patrón 20x [NaCl 3 M, citrato de Na₃ 0,3 M) sin lauroilsarcosina sodio y diluido de la forma correspondiente).

Preparación de muestra

15 Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Las muestras plasmáticas se descongelaron en hielo, se agitaron en vórtice y se centrifugaron brevemente en una centrífuga de mesa refrigerada. Los homogenatos de tejido se descongelaron a TA y se centrifugaron 5 minutos a velocidad máxima y temperatura ambiente. Se retiraron 5 µL de cada muestra para el ensayo y después se devolvió al refrigerador para la conservación. Las muestras se diluyeron con tampón de hibridación (sonda de detección 8 nM mNOX-E36 [SEC ID N°: 282] en tampón de lavado) a 20 temperatura ambiente según el siguiente esquema:

1:30	muestra 5 µL	+ 145 µL de tampón de hibridación
1:300	20 µL 1:30	+ 180 µL de tampón de hibridación
1:3000	20 µL 1:300	+ 180 µL de tampón de hibridación
1:30000	20 µL 1:3000	+ 180 µL de tampón de hibridación

25 Se ensayaron todas las diluciones de las muestras. El mNOX-E36 estándar se diluyó en forma seriada en una curva de calibración de 8 puntos, que abarcan el rango de 0-4 nM. Se prepararon y ensayaron las muestras no QC. El patrón de calibración fue idéntico a las muestras en estudio.

Hibridación y detección

30 Las muestras se calentaron durante 10 min a 95°C y se enfriaron hasta 37°C. Los complejos de Spiegelmero/sonda de detección se maduraron con sondas de captura inmovilizadas durante 30 minutos a 37°C. Los Spiegelmeros no unidos se retiraron por lavado dos veces con tampón de lavado y 1× TBST (Tris-Cl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5), respectivamente. Los complejos hibridados se detectaron mediante estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida a 1:5000 en TBST 1× durante 1 h a temperatura ambiente. Para eliminar el conjugado no unido, los pocillos se lavaron otra vez con TBST 1× y Tris-Cl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 9,8 (cada uno dos veces). Los pocillos se 35 llenaron finalmente con 100 mL de sustrato CSDP (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se midió la quimioluminiscencia en un lector de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

Análisis de datos

Se usaron las siguientes diluciones de muestra de ensayo para el análisis cuantitativo de datos:

40 Plasma EDTA de rata 1:2000

Los datos obtenidos del grupo de vehículo (al que no se administró Spiegelmero) se restaron como señal de ruido de fondo.

El ensayo de hibridación descrito en la presente memoria también actúa de modo similar para los Spiegelmeros NOX-36, NOX-E36-5'-PEG y NOX-E36-3'-PEG, en donde se ha usado la respectiva sonda de captura NOX-E36 (SEC ID N°: 255) y la respectiva sonda de detección NOX-E36 (SEC ID N°: 256) (datos no mostrados).

Resultados

mNOX-E36-3'PEG mejora la supervivencia y la enfermedad renal de ratones MRL^{lpr/lpr}

50 Los ratones MRL^{lpr/lpr} se desarrollan y posteriormente mueren de glomerulonefritis compleja inmune proliferativa con semejanzas llamativas con la nefritis lúpica proliferativa difusa de los seres humanos. En este diseño de estudio terapéutico, los ratones MRL^{lpr/lpr} tratados con Spiegelmero anti-mCCL2 pegilado y no pegilado, ("PoC")-Spiegelmero control regulado o no pegilado o vehículo tenían entre 14 y 24 semanas de edad. En este punto de tiempo, el vehículo, los ratones MRL^{lpr/lpr} tratados con PoC o PoC-PEG mostraron glomerulonefritis proliferativa difusa por

infiltración de macrófagos glomerular y un infiltrado de células inflamatorias mixtas periglomerulares e intersticiales que consiste en macrófagos glomerulares e intersticiales positivos a Mac2 y linfocitos intersticiales positivos a CD3 (Figuras 34 y 35). mNOX-E36-3'PEG mejoró el índice de actividad y cronicidad de la nefritis lúpica además de los marcadores de inflamación renal previamente mencionados (Figura 35). La molécula de mNOX-E36 no pegilada fue menos efectiva en el índice de cronicidad y los recuentos de macrófagos intersticiales y células T (Figura 35). La enfermedad renal crónica avanzada se ilustró adicionalmente por atrofia tubular y áreas confluyentes de fibrosis intersticiales en ratones tratados con vehículo, PoC y PoC-PEG (Figura 34). Mediante la aplicación de morfometría para cuantificar estos cambios, se halló que mNOX-E36 pegilado y no pegilado redujo el volumen intersticial, el daño celular tubular y dilatación tubular, siendo todos marcadores de la gravedad y pronóstico de la enfermedad renal crónica (Figura 36). El mNOX-E36-3'PEG mejoró en un 50% la mortalidad, pero no el mNOX-E36 no pegilado (Figura 37). De este modo, el mNOX-E36-3'PEG puede reducir el número de macrófagos renales e infiltrados de células T y mejorar la nefritis lúpica y supervivencia (renal) de los ratones MRL^{lpr/lpr}. Para estudiar si el tratamiento con mNOX-E36 y mNOX-E36-3'PEG afecta a la inflamación intrarrenal en ratones MRL^{lpr/lpr}, se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real para evaluar los niveles de expresión de las quimiocinas proinflamatorias CCL2 y CCL5, que previamente habían demostrado estar reguladas por un aumento progresivo en los riñones de ratones MRL^{lpr/lpr} durante el avance de la enfermedad renal (Perez de Lema 2001). El tratamiento con mNOX-E36 y mNOX-E36-3'PEG desde la semana 14 a 24 de edad redujo la expresión renal del ARNm de CCL2 y CCL5 en comparación con los controles tratados con vehículo (Figura 38).

Los Spiegelmeros anti-CCL2 reducen la lesión tisular extrarrenal autoinmune de los ratones MRL^{lpr/lpr}

La piel y los pulmones también se ven habitualmente afectados por lesiones tisulares autoinmunes en ratones MRL^{lpr/lpr}. La enfermedad pulmonar autoinmune en los ratones tratados con vehículo se caracterizó por infiltrados moderados de células inflamatorias peribronquiales y perivasculares, y se observaron lesiones cutáneas en el 60% de los ratones (Figura 39, 40 y 35). Tanto mNOX-E36 como mNOX-E36-3'PEG redujeron la inflamación peribronquial y la enfermedad cutánea en comparación con los ratones MRL^{lpr/lpr} tratados con vehículo, PoC, y PoC-PEG, respectivamente (Figuras 39, 40 y 35). En consecuencia, los efectos de los Spiegelmeros específicos de CCL2 no están limitados a nefritis lúpica sino que se extienden a otras manifestaciones de lesión tisular autoinmune de los ratones MRL^{lpr/lpr}.

mNOX-E36 y síndrome linfoproliferativo, autoanticuerpos ADNds y niveles en suero de citocinas de ratones MRL^{lpr/lpr}

Los ratones MRL^{lpr/lpr} hembra desarrollan un síndrome linfoproliferativo caracterizado por esplenomegalia masiva y masas de ganglios linfáticos cervicales, axilares, inguinales y mesentéricos. Tanto mNOX-E36 como mNOX-E36-3'PEG no presentaron efecto sobre el peso de los bazo y ganglios linfáticos de los ratones MRL^{lpr/lpr} (Figura 41). La autoinmunidad en los ratones MRL^{lpr/lpr} se caracteriza por la producción de autoanticuerpos contra múltiples antígenos nucleares que incluyen ADNds. Los autoanticuerpos IgG, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} de ADNds se presentaron en altos niveles en suero de ratones MRL^{lpr/lpr} de 24 semanas de edad. Tanto mNOX-E36 como mNOX-E36-3'PEG no presentaron efecto sobre ninguno de estos autoanticuerpos de ADN (Figura 41). La enfermedad semejante a lupus en ratones MRL^{lpr/lpr} tratados con vehículo se caracterizó por elevados niveles en suero de IFN- α , IL-12p40, y IL-6. Tanto mNOX-E36 como mNOX-E36-3'PEG no presentaron efecto sobre estos mediadores inflamatorios (Figura 41). De este modo, ambas variantes de mNOX-E36 no afectan a la linfoproliferación, la producción de IgG anti-ADNds y los niveles en suero de citocinas en ratones MRL^{lpr/lpr}.

Niveles plasmáticos de mNOX-E36 y mNOX-E36-3'PEG de los ratones MRL^{lpr/lpr}

Los niveles plasmáticos de mNOX-E36 y mNOX-E36-3'PEG se determinaron en intervalos semanales para controlar la exposición al fármaco durante la enfermedad renal progresiva en ratones MRL^{lpr/lpr}. Los niveles plasmáticos medios de mNOX-E36 3 h después de la inyección y de mNOX-E36-3'PEG 24 h después de la inyección fueron de aproximadamente 300 nM y 1 μ M a lo largo del estudio, respectivamente (Figura 42). De este modo, la pegilación aumentó los niveles plasmáticos de mNOX-E36 y la enfermedad renal progresiva de los ratones MRL^{lpr/lpr} no modularon la farmacocinética de ambos Spiegelmeros.

mNOX-E36-3'PEG bloquea la emigración de monocitos de la médula ósea

Se demostró que la emigración de monocitos de la médula ósea durante la infección bacteriana involucra al receptor de quimiocina CCR2 (Serbina 2006), pero el papel de CCL2 en el contexto de la autoinmunidad todavía es hipotético. En consecuencia, se examinó la población de monocitos positivos a CCR2 en sangre periférica y médulas óseas de ratones de grupos de ratones MRL^{lpr/lpr} de 24 semanas de edad tratados con mNOX-E36-3'PEG- y vehículo. El tratamiento con mNOX-E36-3'PEG aumentó el porcentaje de células positivas a CCR2 en la médula ósea de 13% a 26%, mientras que redujo esta población en la sangre periférica de 26% a 11% (Figura 43). Estos datos avalan un papel de CCL2 en la evasión de las células CCR2 positivas de la médula ósea durante la enfermedades autoinmunes en ratones MRL^{lpr/lpr}.

Resumen

Aplicando la tecnología del Spiegelmero, se creó un nuevo antagonista específico de mCCL2 que potencialmente bloquea mCCL2 *in vitro* e *in vivo*. De hecho, el comienzo tardío del tratamiento con el Spiegelmero CCL2 aumentó

considerablemente la lesión tisular semejante a lupus avanzada en los ratones MRL^{lpr/lpr}. Estos datos avalan un papel central del CCL2 en el daño tisular inflamatorio crónico e identifican a los Spiegelmeros CCL2 como una nueva terapia para la lesión tisular autoinmune.

Ejemplo 9: Terapia de la nefropatía diabética en ratones nefrectomizados unilateralmente con Spiegelmero anti-mMCP-1

La nefropatía diabética aún es la causa principal de la enfermedad renal en estadio final debido a que dirigir el tratamiento a los mecanismos patológicos dependientes de angiotensina no siempre impide el avance de la enfermedad (Zimmet 2001; Ritz 1999; United States Renal Data System 2004; Svensson 2003). En consecuencia, se requieren otras estrategias de tratamiento para agregar al armamento terapéutico para la nefropatía diabética. Los datos de estudios experimentales recientes relacionan el avance de la nefropatía diabética a la inflamación intrarrenal (Galkina 2006; Mora 2005; Meyer 2003; Tuttle 2005). Por ejemplo, el micofenolato de mofetilo, el metotrexato o la irradiación reducen la excreción de albúmina urinaria y la glomeruloesclerosis en ratas con nefropatía diabética inducida por estreptozotocina (Yozai 2005; Utimura 2003). Todavía hoy los mecanismos moleculares y celulares de la inflamación intrarrenal en la nefropatía diabética continúan estando mal caracterizados. Los pacientes con nefropatía diabética han aumentado los niveles séricos de marcadores de fase aguda de la inflamación pero esto no representa la inflamación intrarrenal (Dalla Vestra 2005; Navarro 2003). Los pacientes con nefropatía diabética excretan altos niveles de proteína 1 quimiotáctica de monocitos-quimiocina CC (MCP-1/CCL2) en la orina que puede ser más específica para la inflamación intrarrenal (Morii 2003; Tashiro 2002; Takebayashi 2006). De hecho, la MCP-1/CCL2 se expresa en las células mesangiales humanas expuestas a altas concentraciones de glucosa o productos finales de la glicación avanzada (Ihm 1998; Yamagishi 2002). La CCL2 participa en el proceso complejo de múltiples pasos del reclutamiento de leucocitos de los compartimentos intravascular a extravascular, es decir, glomérulos e intersticio renal (Baggiolini 1998). De hecho, los infiltrados de macrófagos son un hallazgo común en la glomeruloesclerosis diabética y la lesión tubulointerstitial humana y experimental (Bohle 1991; Furuta 1993; Chow 2007). Los ratones diabéticos deficientes en Cc/2 tipo 1 o tipo 2 tienen recuentos de macrófagos glomerulares inferiores, lo que se asocia a una menor lesión glomerular (Chow 2004; Chow 2006). En estos estudios también se ha demostrado el papel funcional del CCL2 en la patología glomerular de la nefropatía diabética de tipo 1 y tipo 2. En consecuencia, el CCL2 puede representar una diana terapéutica potencial para la nefropatía diabética, y se deben validar antagonistas de CCL2 adecuados con perfiles farmacocinéticos favorables en este contexto de enfermedad. En este ejemplo nosotros informamos los efectos del Spiegelmero mNOX-E36-3'PEG anti-CCL2 PEGilado en ratones db/db diabéticos de tipo 2 con nefropatía diabética avanzada. Hemos demostrado que el Spiegelmero anti-CCL2 sería adecuado para el tratamiento de la nefropatía diabética.

Animales y protocolo experimental

Se obtuvieron ratones db/db C57BLKS de C57BLKS tipo salvaje machos de 5 semanas de edad de Taconic (Ry, Dinamarca) y se alojaron en jaulas con filtro en el extremo superior con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y acceso ilimitado a comida y agua durante el estudio. Las jaulas, lechos, material de anidamiento, alimento y agua se esterilizaron con autoclave antes de usar. A la edad de 6 semanas se realizó una uninefrectomía (ratones "1K") o cirugía falsa (ratones "2K") mediante una incisión de 1 cm en el flanco como se ha descrito previamente en ratones db/db de tipo salvaje (Bower 1980). En los ratones de los grupos de la cirugía falsa el riñón se dejó *in situ*. Después de 10 semanas, a la edad de 4 meses, los ratones db/db 1K se dividieron en dos grupos que recibieron tres veces por semana inyecciones subcutáneas con mNOX-E36-3'PEG o PoC-PEG en 5% de glucosa (dosis, 0,9 µmol/kg; volumen de inyección, 1 mL/kg). El tratamiento continuó durante 8 semanas (hasta la edad de 6 meses) cuando los animales se sacrificaron y se obtuvieron los tejidos para la evaluación histopatológica. Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por las autoridades gubernamentales locales.

Evaluación de la nefropatía diabética

Todos los estudios inmunohistológicos se realizaron con las secciones incluidas en parafina descritas (Anders 2002). Se usaron los siguientes anticuerpos como anticuerpos primarios: anti-Mac2 de rata (macrófagos glomerulares, Cedarlane, Ontario, Canadá, 1:50), anti-Ki-67 (proliferación celular, Dianova, Hamburg, Alemania, 1:25). Para la evaluación histopatológica, se fijaron partes de los riñones de cada ratón en formalina al 10% en disolución salina tamponada con fosfato y se incluyeron en parafina. Se colorearon secciones de 3 µm con reactivo de ácido peryódico de Schiff o plata siguiendo las instrucciones del proveedor (Bio-Optica, Milano, Italia). Las lesiones escleróticas glomerulares se evaluaron mediante un puntaje semicuantitativo con un observador ciego de la siguiente manera: 0 = no lesión, 1 = < 25% esclerótico, 2 = 25-49% esclerótico, 3 = 50-74% esclerótico, 4 = 75-100% esclerótico, respectivamente. Se analizaron 15 glomérulos por sección. Se determinaron los índices de volumen intersticial y la dilatación tubular por superposición de una cuadrícula de 100 puntos en 10 campos corticales no superpuestos, como se ha descrito previamente (Anders 2002). Los recuentos de células intersticiales fueron realizados en 15 campos de alta potencia (hpf, 400 x) por un observador ciego. La preparación de ARN y la RT-PCR de tiempo real cuantitativa (TaqMan) se hicieron a partir de los glomérulos desparafinados. Después de la incubación en tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, SDS 2% y 20 µg/mL de proteinasa K) durante 16 h a 60°C, se realizó la extracción del ARN sobre la base de fenol-cloroformo. El ARN glomerular se disolvió en 10 µL de agua libre de ARNasa. Se realizó la transcripción inversa y la RT-PCR de tiempo real del ARN total del órgano y

glomerular descrita (Anders 2002, Cohen 2002). Los controles que consistían en ddH₂O fueron negativos para los genes diana y constitutivos. El cebador (300 nM) y las sondas de oligonucleótidos (100 nM) para mCcl2, Gapdh, y ARNr 18 S fueron reactivos de ensayo TaqMan predesarrollado de PE. Los cebadores y sondas eran de ABI Biosystems, Weiterstadt, Alemania. La velocidad de filtración glomerular (GFR) se determinó a través de la cinética de depuración de FITC-inulina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) 5, 10, 15, 20, 35, 60, y 90 minutos después de una inyección en bolo única (Qi 2004). La fluorescencia se determinó a 485 nm de excitación y se leyó a una emisión de 535 nm. La GFR se calculó en base a un modelo de dos compartimentos usando un software de ajuste de curva con regresión no lineal (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Todos los datos se presentan como media ± SEM. Se realizó la comparación de los grupos mediante ANOVA y se usó la corrección de Bonferroni post-hoc para comparaciones múltiples. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ indica significación estadística.

Resultados

mNOX-E36-3'PEG reduce los recuentos de macrófagos glomerulares y la glomeruloesclerosis global en ratones db/db nefrectomizados unilateralmente

15 Cuando la falta de CCL2 funcional se asocia al reclutamiento reducido de macrófagos glomerulares en ratones db/db (Chow 2007) y el mNOX-E36-3'PEG puede bloquear el reclutamiento de macrófagos mediado por CCL2 *in vitro* e *in vivo*, mNOX-E36-3'PEG debe alterar el reclutamiento de macrófagos renales en ratones db/db con nefropatía diabética tipo 2 avanzada. Para probar esta hipótesis, nosotros realizamos inyecciones subcutáneas con mNOX-E36-3'PEG o PoC-PEG a la edad de 4 meses en los ratones db/db ("1K") nefrectomizados unilateralmente. El
20 tratamiento continuó durante 8 semanas, cuando se recogieron tejidos para la evaluación de la nefropatía diabética. Durante este periodo, el tratamiento con mNOX-E36-3'PEG no afectó significativamente los recuentos de leucocitos o plaquetas, los niveles de glucemia o peso corporal fueron considerablemente elevados en todos los grupos de ratones db/db en comparación con los ratones BLKS no diabéticos (datos no mostrados). De modo interesante, mNOX-E36-3'PEG aumentó los niveles séricos de CCL2 en ratones db/db, lo que indica que el antagonista de CCL2
25 retiene CCL2 en la circulación (Figura 44). De acuerdo con nuestra hipótesis, el mNOX-E36-3'PEG redujo de forma significativa el número de macrófagos glomerulares en un 40% en comparación con los ratones db/db tratados con PoC-PEG o vehículo, asociado a cantidades menores de células proliferantes positivas a Ki-67 dentro del glomérulo en los ratones db/db tratados con mNOX-E36-3'PEG (Figura 45). Estos hallazgos se asociaron a un aumento significativo de la glomeruloesclerosis diabética total en ratones db/db 1K (Figura 46). De hecho, el tratamiento
30 mNOX-E36-3'PEG redujo la glomeruloesclerosis diabética en ratones db/db 1K en la medida de la glomeruloesclerosis presente en ratones db/db ("2K") no nefrectomizados emparejados por edad (Figura 46). Estos hallazgos demuestran que el bloqueo retardado del reclutamiento de macrófagos glomerulares dependiente de CCL2 con mNOX-E36-3'PEG impide la glomeruloesclerosis diabética total en ratones db/db diabéticos tipo 2.

mNOX-E36-3'PEG mejora la GFR en ratones db/db 1K

35 Los efectos beneficiosos del tratamiento con mNOX-E36-3'PEG en la glomeruloesclerosis diabética en ratones db/db 1K se deberían asociar a una mejor GFR. Nosotros analizamos la cinética de la depuración de FITC-inulina como un marcador de la GFR en ratones db/db (Qi 2004). En comparación con una GFR normal de aproximadamente 250 mL/minuto en ratones db/db (Qi 2004), nosotros hallamos una GFR reducida de 112 ± 23
40 mL/minuto en ratones db/db 1K de 6 meses inyectados con PoC-PEG (Figura 47). El tratamiento con mNOX-E36-3'PEG mejoró significativamente la GFR a 231 ± 30 mL/minuto en ratones db/db 1K ($p < 0,001$), lo que sugiere que el bloqueo del reclutamiento de macrófagos glomerulares dependiente de CCL2 también puede mejorar la función renal en ratones diabéticos tipo 2.

mNOX-E36-3'PEG reduce los recuentos de macrófagos intersticiales y la lesión tubulointersticial en ratones db/db 1K

45 La nefropatía diabética avanzada en los seres humanos se asocia a cantidades significativas de macrófagos intersticiales y a lesión tubulointersticial (Bohle 1991). En los ratones db/db 2K, los infiltrados de macrófagos intersticiales y la lesión tubulointersticial significativa no aparece antes de los 8 meses (Chow 2007). La uninefrectomía temprana acelera el desarrollo de la patología tubulointersticial en ratones db/db (Ninichuk 2005), de este modo nosotros cuantificamos los macrófagos intersticiales, la dilatación tubular y el volumen intersticial como
50 marcadores del daño tubulointersticial en ratones de todos los grupos de 6 meses de edad. En este punto de tiempo los ratones db/db 1K demostraron cantidades aumentadas de macrófagos intersticiales y elevaciones significativas de la dilatación tubular y del volumen intersticial en comparación con ratones db/db 2K (Figura 45, Figura 48). El tratamiento con mNOX-E36-3'PEG redujo las cantidades de macrófagos intersticiales en un 53%, además de la dilatación tubular y del volumen intersticial en ratones db/db 1K (Figura 45, Figura 48). De este modo, el bloqueo del
55 reclutamiento de macrófagos renales dependiente de CCL2 también impide la lesión tubulointersticial en ratones db/db diabéticas tipo 2.

mNOX-E36-3'PEG reduce la expresión renal de Ccl2 in ratones db/db 1K

Los infiltrados de macrófagos amplifican las respuestas inflamatorias de la lesión tisular, por ej., la expresión local de CCL2. Nosotros, en consecuencia, propusimos la hipótesis de que la disminución de los macrófagos renales relacionada con mNOX-E36-3'PEG se debe asociar a una menor expresión de CCL2 renal. Usamos RT-PCR de tiempo real para cuantificar la expresión de ARNm de CCL2 en ratones db/db. mNOX-E36-3'PEG redujo los niveles de ARNm de CCL2 en riñones de ratones db/db 1K de 6 meses en comparación con ratones tratados con PoC-PEG apareados por edad (Figura 49). Para evaluar adicionalmente la expresión espacial de CCL2 realizamos la inmunotinción para la proteína de CCL2 en secciones renales. En ratones db/db 1K la expresión de CCL2 aumentó considerablemente en los glomérulos, túbulos y células intersticiales en comparación con los ratones db/db 2K o tipo salvaje 2K (Figura 50). mNOX-E36-3'PEG redujo considerablemente la tinción de CCL2 en todos los compartimentos en comparación con los ratones db/db 1K tratados con vehículo o PoC-PEG. Estos datos indican que el bloqueo del reclutamiento de macrófagos renales dependiente de CCL2 con mNOX-E36-3'PEG reduce la expresión local de CCL2 en ratones db/db 1K.

Resumen

El concepto de que la inflamación contribuye al avance de la nefropatía diabética ha sido aceptado de forma creciente (Tuttle 2005), y lleva a considerar a la MCP-1/CCL2 como una diana potencial para tratar esta enfermedad. En este ejemplo, hemos demostrado que el tratamiento de ratones diabéticos nefrectomizados unilateralmente con mNOX-E36-3'PEG redujo las cantidades de macrófagos glomerulares (e intersticiales) de 6 meses, asociados a menos células glomerulares proliferantes. Además, la expresión renal/glomerular del ARNm de CCL2 se redujo considerablemente con el tratamiento con mNOX-E36-3'PEG. Además, las cantidades inferiores de macrófagos glomerulares y células glomerulares proliferativas del grupo de terapia estuvieron asociados a la protección de la glomerulosclerosis total y con un aumento significativo de la velocidad de filtración glomerular. Los efectos beneficiosos de mNOX-E36-3'PEG sobre la patología glomerular y la función renal en ratones diabéticos son compatibles con los estudios que han usado otros antagonistas de CCL2 en otros modelos de lesión glomerular (Lloyd 1997, Hasegawa 2003, Tang 1996, Wenzel 1997, Fujinaka 1997, Schneider 1999). El comienzo tardío del bloqueo de CCL2 también redujo de forma considerable las cantidades de macrófagos intersticiales que están asociados a menos patología tubulointerstitial en ratones db/db 1K.

En conjunto, estos datos validan al CCL2 como una diana terapéutica prometedora para la nefropatía diabética y sugieren que el comienzo del bloqueo de CCL2 con un Spiegelmero – aún en un estado avanzado de la enfermedad – todavía puede ser protector.

30

Referencias

Los datos bibliográficos completos de los documentos mencionados en la presente memoria son los siguientes.

- 5 Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S, Matsushima K (1993). Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* 36: 762.
- Alam R, York J, Moyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N (1996). Increased MCP-1, RANTES, y MIP-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 1398.
- 10 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (3): 403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Acids nucleics Res.* Sep 1; 25 (17): 3389-402.
- Amann B, Tinzmann R, Angelkort B (2003). ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care* 26: 2421.
- 15 Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Grone HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D (2002). A chemokines receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J. Clin. Invest.* 109: 251.
- Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D (2003). Chemokines and chemokine. quimiocina receptors are involved in the resolution o progression of renal disease. *Kidney Int.* 63: 401.
- 20 Aurup H et al. (1994). *Acid nucleics Res* 22: 20.
- Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE (1984). Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.* 25: 689.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994). Interleukin-8 y related chemotactic cytokines – CXC y CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55: 97
- 25 Baggiolini M (1998). Chemokines y leukocyte traffic. *Nature* 392: 565.
- Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K (2000). Possible relationship of monocyte chemoattractant proteina-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 58: 684.
- Banisor I, Leist TP, Kalman B (2005). Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J. Neuroinflammation* 2: 7.
- 30 Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640.
- Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Muller CA, Muller GA (1991). The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis. *Pathol. Res. Pract.* 187: 251.
- 35 Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charo IF (1997). Impaired monocyte migration y reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100: 2552.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokine in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394: 894.
- 40 Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lulis AJ, Tsou CL, Charo IF (1996). Molecular cloning y functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant proteina 1) y murine macrophage inflammatory protein 1 α receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. *J. Biol. Chem.* 271: 7551.
- Bossink AW, Paemen L, Jansen PM, Hack CE, Thijs LG, Van Damme J (1995). Plasma levels of the chemokine monocyte chemotactic proteins-1 y -2 are elevated in human sepsis. *Blood* 86: 3841.
- 45 Bower G, Brown DM, Steffes MW, Vernier RL, Mauer SM (1980). Studies of the glomerular mesangium y the juxtaglomerular apparatus in the genetically diabetic mouse. *Lab. Invest.* 43: 333.

- Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR (1994). Molecular cloning y functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxil-terminal tails. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 2752.
- 5 Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH (2007). Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologica* 50: 471.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH (2006). Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* 69: 73.
- 10 Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH (2004). Macrophages in mouse type 2diabetic nephropathy: Correlation with diabetic state y progressive renal injury. *Kidney Int.* 65: 116.
- Cockwell P, Howie AJ, Adu D, Savage CO (1998). *In situ* analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 54: 827.
- Cohen CD, Gröne HJ, Gröne EF, Nelson PJ, Schlöndorff D, Kretzler M (2002). Laser microdissection and gene expression analysis on formaldehyde-fixed archival tissue. *Kidney Int.* 61: 125.
- 15 Cummins LL et al. (1995). *Acids nucleics Res* 23: 2019.
- Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, Bruseghin M, Cernigoi AM, Saller A, Plebani M, Fioretto P (2005). Acute-phase markers of inflammation y glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 Suppl 1: S78.
- 20 Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 7: 35.
- De Bleecker JL, De Paepe B, Vanwalleghem IE, Schroder JM (2002). Differential expression of chemokines in inflammatory myopathies. *Neurology* 58: 1779.
- Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, Zack PM, Nixon K, Bolin R, Judkins MB, Farmer JA, Wolf JL, Gill SC, Bendele RA (2000). Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. *Pharm. Res.* 17: 1503.
- 25 Eaton BE et al. (1995). *Chem Biol* 2: 633.
- Eaton BE, Gold L, Hicke BJ, Janjic N, Jucker FM, Sebosta DP, Tarasow TM, Willis MC, Zichi DA (1997). *Bioorg Med Chem* 5: 1087.
- 30 Economou E, Tousoulis D, Katinioti A, Stefanadis C, Trikas A, Pitsavos C, Tentolouris C, Toutouza MG, Toutouzas P (2001). Chemokines in patients with ischaemic heart disease and the effect of coronary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* 80: 55.
- Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A (2002). Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice y monkeys. *Circ. Res.* 90: 1167.
- 35 Fujinaka H, Yamamoto T, Takeya M, Feng L, Kawasaki K, Yaoita E, Kondo D, Wilson CB, Uchiyama M, Kihara I (1997). Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 1174.
- Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K-I, Hashimoto H, Ishiwata Y, Tomosugi N, Mukaida N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H (2003). Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 1066.
- 40 Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshinaga K (1993). The role of macrophages in diabetic glomeruloesclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* 21: 480.
- Galasso JM, Liu Y, Szaflarski J, Warren JS, Silverstein FS (2000). Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of acute excitotoxic injury in neonatal rat brain. *Neuroscience* 101: 737.
- 45 Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM (1993). Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J. Exp. Med.* 177: 1421.
- Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD (1996). Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic y nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 y -3. *J. Immunol.* 157: 5613.
- 50

- Gerard C, Rollins, BJ. Chemokine and disease. *Nat. Immunol.* 6: 1182.
- Gong X, Gong W, Kuhns DB, Ben-Baruch A, Howard OM, Wang JM (1997). Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 y CCR2B as its functional receptors. *J. Biol. Chem.* 272: 11682.
- 5 Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coile AJ, Gutierrez-Ramos JC (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation y airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188: 157.
- Gordillo GM, Onat D, Stockinger M, Roy S, Atalay M, Beck FM, Sen CK (2004). A key angiogenic role of monocyte chemoattractant protein-1 in hemangioendothelioma proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: C866.
- Green LS et al. (1995). *Chem Biol* 2: 683.
- 10 Handel TM, Domaille PJ (1996). Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* 35: 6569.
- Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S (1993). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 69: 83.
- 15 Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S (2003). Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation y progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 48: 2555.
- Heath H, Qin S et al. (1997). Quimiocina receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 99: 178.
- 20 Holdsworth SR, Kitching AR, Tipping PG (2000). Chemokines as therapeutic targets in renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 9: 505.
- Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM (1997). Release of RANTES, MIP-1 α , y MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 1377.
- Hosaka S et al. (1994). *Clin Exp Immunol* 97: 451.
- 25 Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM (2001). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 193: 713.
- Hulkower K, Brosnan CF, Aquino DA, Cammer W, Kulshrestha S, Guida MP, Rapoport DA, Berman JW (1993). Expression of CSF-1, c-fms, y MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 150: 2525.
- 30 Humbert M, Ying S, Corrigan C, Menz G, Barkans J, Pfister R, Meng Q, Van Damme J, Opendakker G, Durham SR, Kay AB (1997). Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES y MCP-3 in symptomatic atopic y nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, y IL-3. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 1.
- 35 Ihm CG, Park JK, Hong SP, Lee TW, Cho BS, Kim MJ, Cha DR, Ha H (1998). A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemotactic peptide 1 in human mesangial cells. *Nephron* 79: 33.
- Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Sakamoto O, Yoshimura T, Ando M, Takahashi K (1994). Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum. Pathol.* 25: 455.
- 40 Johrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, Gander H, Holtl L, Bartsch G, Greil R, Thurnher M (2005). Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 2459.
- Jolicoeur C, Lemay A, Akoum A (2001). Comparative effect of danazol and a GnRH agonist on monocyte chemotactic protein-1 expression by endometriotic cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45: 86.
- 45 Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxina: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.* 179: 881.
- Kaburagi Y, Shimada Y, Nagaoka T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2001). Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , y eotaxina) in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 293: 350.

- Kawasaki AM et al. (1993). *J Med Chem* 36: 831.
- Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ (1998). Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 α y monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.* 91: 98.
- 5 Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA, Welch KM (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neuroimmunol.* 56: 127.
- Kitamoto S, Egashira K (2003). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy for cardiovascular diseases. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 1: 393.
- 10 Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, Kadin ME, Dummer R, Burg G, y Nestle FO (2003). Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 101: 1487.
- Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM (1992). Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 90: 772.
- 15 Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, y Emi M (2004). Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol* 70: 301.
- Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* 186: 1757.
- Kusser W (2000). *J Biotechnol* 74: 27-38.
- 20 Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N (1997). Severe reduction in leukocyte adhesion y monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 94: 12053.
- Lesnik EA et al. (1993). *Biochemistry* 32: 7832.
- Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TNC, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC (1997). RANTES y monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1371.
- Lu BB, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *J. Exp. Med.* 187: 601.
- 30 Lubkowski J, Bujacz G, Boque L, Domaille PJ, Handel TM, Wlodawer A (1997). The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat Struct Biol* 4: 64.
- Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Bruhl H, Frink M, Anders HJ, Vielhauer V, Pfisteringer J, Stangassinger M, Schlöndorff D (2001). Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 y CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166: 4697.
- 35 Martinelli R, Sabroe I, LaRosa G, Williams TJ, Pease JE. The CC chemokine eotaxin (CCL11) is a partial agonist of CC chemokine receptor 2b. *J Biol Chem* 276: 42957.
- Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ (1989). Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 167: 1883.
- 40 McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Ácidos nucleicos Res.* 32(Web Server issue): W20-5.
- Meyer TW (2003). Immunosuppression for diabetic glomerular disease? *Kidney Int.* 63: 377.
- Miller MD, Krangel MS (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 12: 17.
- 45 Miller LE et al. (1993). *J Physiol* 469: 213.
- Mora C, Navarro JF (2005). The role of inflammation as a pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 5: 399.

- Morii T, Fujita H, Narita T, Shimotomai T, Fujishima H, Yoshioka N, Imai H, Kakei M, Ito S (2003). Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complications* 17:1.
- 5 Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 145.
- Nakamura H, Weiss ST, Israel E, Luster AD, Drazen JM, Lilly CM (1999). Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1952.
- 10 Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, Noda K, Maruyama K, She H, Matsubara A, Miyahara S, Nakao S, Yin Y, Benowitz L, Hafezi-Moghadam A, Miller JW (2007). Monocyte chemoattractant protein 1 mediated retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2425.
- Navarro JF, Mora C, Maca M, Garca J (2003). Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Kidney Dis.* 42: 53.
- Myers SJ, Wong LM, Charo IF (1995). Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270: 5786.
- 15 Needleman & Wunsch (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48 (3): 443-53.
- Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN (1991). Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* 88: 1121.
- 20 Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ (1993). Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 72: 415.
- Ninichuk V, Gross O, Reichel C, Khandoga A, Pawar RD, Ciubar R, Segerer S, Belemezova E, Radomska E, Luckow B, de Lema GP, Murphy PM, Gao JL, Henger A, Kretzler M, Horuk R, Weber M, Krombach F, Schlöndorff D, Anders HJ (2005). Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 977.
- 25 Ogata H, Takeya M, Yoshimura T, Takagi K, Takahashi K (1997). The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J. Pathol.* 182: 106.
- Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, Bamba T (2002). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand. J. Gastroenterol.* 37: 317.
- 30 Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 617.
- Pawar RD, Patole PS, Zecher D, Segerer S, Kretzler M, Schlöndorff D, Anders HJ (2006). Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 141.
- Pearson & Lipman (1988), Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444.
- 35 Perez de Lema G, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla mS, Segerer S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, Busch DH, Pfeffer K, Mampaso F, Schlöndorff D, Luckow B (2005). Chemokine receptor CCR2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3592.
- Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1369.
- 40 Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR (1996a). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* 97: 604.
- 45 Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP, Newman W, Gerard C, Mackay CR (1996b). Molecular cloning and characterization of a eotaxin human receptor expressed selectively on eosinophils. *J. Exp. Med.* 183: 2437.
- Power CA, Meyer A, Nemeth K, Bacon KB, Hoogewerf AJ, Proudfoot AE, Wells TN (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J. Biol. Chem.* 270: 19495.
- 50

- Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC, Fogo AB, Breyer MD (2004). Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286: F590.
- 5 Qin S, LaRosa G, Campbell JJ, Smith-Heath H, Kassam N, Shi X, Zeng L, Butcher EC, Mackay CR (1996). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur. J. Immunol.* 26: 640.
- Ransohoff RM et al. (1993). *FASEB J* 7: 592.
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF (1996). Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α . *J. Biol. Chem.* 271: 17161.
- 10 Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S (1999). End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am. J. Kidney Dis.* 34: 795-808.
- Rollins BJ, Stier P, Ernst T, Wong GG (1989). The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell Biol.* 9: 4687.
- Rollins BJ (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 2: 198.
- 15 Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J (1994). Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 71: 536.
- Ruffing N, Sullivan N, et al. (1998). CCR5 has an expanded ligand-binding repertoire and is the primary receptor used by MCP-2 on activated T cells. *Cell Immunol* 189: 160.
- 20 Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Keinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96: 34.
- Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35: 3362.
- 25 Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int.* 56: 135.
- Schwartz A, Paul K, Tschirner S, Menke J, Hansen T, Brenner W, Kelly VR, Relle M, Galle PR (2005). Interferon-beta: a therapeutic for autoimmune lupus in MRL-Faspr mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3264.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA (1993). A modern view of atherogenesis. *Am. J. Cardiol.* 71: 9B.
- 30 Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D (2000). Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 152.
- Shimizu S, Nakashima H, Masutani K, Inoue Y, Miyake K, Akahoshi M, Tanaka Y, Egashira K, Hirakata H, Otsuka T, Harada M (2004). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephritis in MRL/lpr mice. *Rheumatology (Oxford)* 43: 1121.
- 35 Smith & Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482.
- Springer TA (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 827.
- Steinman L (2004). Immune therapy for autoimmune diseases. *Science* 305: 212.
- 40 Svensson M, Sundkvist G, Arnqvist HJ, Björk E, Blohme G, Bolinder J, Henricsson M, Nystrom L, Torffvit O, Waernbaum I, Ostman J, Eriksson JW (2003). Signs of nephropathy may occur early in young adults with diabetes despite modern diabetes management: Results from the nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetes Care* 26: 2903.
- Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y, Inukai T (2006). Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* 20: 98.
- 45 Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K (1993). Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum. Pathol.* 24: 534.
- Tang WW, Qi M, Warren JS (1996). Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration

- in anti-GBM Ab GN. *Kidney Int.* 50: 665.
- Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A, Shimizu A, Shike T, Ishiguro C, Koizumi M, Funabiki K, Horikoshi S, Shirato I, Tomino Y (2002). Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), y renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* 16: 1.
- 5 Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR (1999). Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J. Exp. Med.* 190: 1813.
- Tuaille N, Shen de F, Berger RB, Lu B, Rollins BJ, Chan CC (2002). MCP-1 expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 1493.
- 10 Tuttle KR (2005). Linking metabolism y immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 1537.
- Uguccioni M, Mackay CR et al. (1997). High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, y other chemokines. *J Clin Invest* 100: 1137.
- United States Renal Data System (2004). Annual data report: Incidence and prevalence 2004. *Am. J. Kidney Dis.* 45: S77.
- 15 Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R (2003). Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 63: 209.
- Van Riper G, Siciliano S, Fischer PA, Meurer R, Springer MS, Rosen H (1993). Characterization and species distribution of high affinity GTP-coupled receptors for human rantes y monocyte chemoattractant protein 1. *J. Exp. Med.* 177: 851.
- 20 Venkatesan N et al. (2003). *Curr Med Chem* 10: 1973.
- Vestergaard C, Just H, Baumgartner Nielsen J, Thestrup-Pedersen K, Deleuran M (2004). Expression of CCR2 on monocytes y macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm. Venereol.* 84: 353.
- 25 Viedt C, Orth SR (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrol. Dial. Transplant.* 17: 2043.
- Wada T, Furuichi K, Segada-Takaeda C, Ahimizu M, Sakai N, Takeda SI, Takasawa K, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H (1999). MIP-1 α y MCP-1 contribute to crescents y interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56: 995.
- 30 Wada T, Yokoyama H, Matsushima K, Kobayashi KI (2001). Chemokines in renal diseases. *Int. Immunopharmacol.* 1: 637.
- Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K (1996). Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J.* 10: 1418.
- 35 Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ (1995). Monocyte chemoattractant protein-1 messenger ARN expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 26: 661.
- Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RA (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 51: 770.
- 40 Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, Makita Z (2002). Advanced glycation end product-induced apoptosis y overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 277: 20309.
- Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, Mackay CR, Daugherty BL, Springer MS, Durham SR, Williams TJ, Kay AB (1997). Enhanced expression of eotaxin y CCR3 mRNA y proteina in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness y predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol* 27: 3507.
- 45 Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB (1999). Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), y MCP-4), y C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 163: 6321.

- Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D (1991). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 88: 5252.
- 5 Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ (1989). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunol.* 142: 1956.
- Yozai K, Shikata K, Sasaki M, Tone A, Ohga S, Usui H, Okada S, Wada J, Nagase R, Ogawa D, Shikata Y, Makino H (2005). Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3326.
- 10 Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOXXON Pharma AG

<120> Acidos nucleicos de unión a MCP-1

<130> N 10056 PCT-EP/A

5 <150> EP 06 002 935.2
<151> 14-02-2006

<150> EP 06 024 202.1
<151> 22-11-2006

<160> 285

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met

50

55

60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65 70 75

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 397 803 T3

Gln Pro Asp Ala Val Asn Ala Pro Leu Thr Cys Cys Tyr Ser Phe Thr
1 5 10 15

Ser Lys Met Ile Pro Met Ser Arg Leu Glu Ser Tyr Lys Arg Ile Thr
20 25 30

Ser Ser Arg Cys Pro Lys Glu Ala Val Val Phe Val Thr Lys Leu Lys
35 40 45

Arg Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Lys Glu Trp Val Gln Thr Tyr Ile
50 55 60

Lys Asn Leu Asp Arg Asn Gln Met Arg Ser Glu Pro Thr Thr Leu Phe
65 70 75 80

Lys Thr Ala Ser Ala Leu Arg Ser Ser Ala Pro Leu Asn Val Lys Leu
85 90 95

Thr Arg Lys Ser Glu Ala Asn Ala Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Thr
100 105 110

Ser Ser Thr Ser Val Gly Val Thr Ser Val Thr Val Asn
115 120 125

<210> 3
<211> 76
<212> PRT
5 <213> Maca mulatta

<400> 3

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Ile Gln Thr Pro Lys Pro
65 70 75

10 <210> 4
<211> 76
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 4

ES 2 397 803 T3

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ser Pro Val Thr Cys Cys Tyr Thr Leu Thr
1 5 10 15

Ser Lys Lys Ile Ser Met Gln Arg Leu Met Ser Tyr Arg Arg Val Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Ala Gly
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Glu Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Ile
50 55 60

Ser His Leu Asp Lys Lys Asn Gln Thr Pro Lys Pro
65 70 75

<210> 5

<211> 76

<212> PRT

5 <213> Canis familiaris

<400> 5

Gln Pro Asp Ala Ile Ile Ser Pro Val Thr Cys Cys Tyr Thr Leu Thr
1 5 10 15

Asn Lys Lys Ile Ser Ile Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Lys Arg Val Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Val Leu Asn
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60

Ala His Leu Asp Lys Lys Ser Gln Thr Gln Thr Ala
65 70 75

<210> 6

<211> 102

<212> PRT

10 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 6

ES 2 397 803 T3

Gln Pro Asp Ala Val Asn Ser Pro Val Thr Cys Cys Tyr Thr Phe Thr
 1 5 10 15

Asn Lys Thr Ile Ser Val Lys Arg Leu Met Ser Tyr Arg Arg Ile Asn
 20 25 30

Ser Thr Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Met Thr Lys Leu Ala
 35 40 45
 Lys Gly Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ala Ile
 50 55 60

Ala Asn Leu Asp Lys Lys Met Gln Thr Pro Lys Thr Leu Thr Ser Tyr
 65 70 75 80

Ser Thr Thr Gln Glu His Thr Thr Asn Leu Ser Ser Thr Arg Thr Pro
 85 90 95

Ser Thr Thr Thr Ser Leu
 100

<210> 7
 <211> 76
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr
 20 25 30

Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met
 50 55 60

Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu
 65 70 75

10 <210> 8
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 397 803 T3

Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
1 5 10 15

Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp
35 40 45

Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr
50 55 60

Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
65 70

<210> 9

<211> 76

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr
20 25 30

Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly
35 40 45

Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met
50 55 60

Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro
65 70 75

<210> 10

<211> 47

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de unión a MCP-1

<220>

15 <221> L-ARN

<222> (1)..(47)

<223> sintético

<400> 10

agcgugcccg gaguggcagg gggacgcgac cugcaauaau gcacgcu

47

20 <210> 11

<211> 45

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(45)
 5 <223> sintético
 <400> 11
 agcgugcccg gaguggcagg gggacgcgac cugcaauugc acgcu 45
 <210> 12
 <211> 47
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 15 <221> L-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético
 <400> 12
 agcgugcccg gaguggcagg gggacgcgac cuguauuuu gcacgcu 47
 20 <210> 13
 <211> 47
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético
 30 <400> 13
 agcgugcccg guguggcagg gggacgcgac cugcauuuuu gcgcgcu 47
 <210> 14
 <211> 47
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 40 <222> (1)..(47)
 <223> sintético
 <400> 14
 agcgugcccg gaguagcagg ggggacgcgac cugcauuuuu gcacgcu 47
 <210> 15
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(45) <223> sintético	
5	<400> 15 agcgugcccg gugugguagg ggggcgcgau cuacaauugc acgcu	45
	<210> 16 <211> 45 <212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(45) <223> sintético	
15	<400> 16 agcgugcccg gugugacagg ggggcgcgac cugcauuugc acgcu	45
	<210> 17 <211> 45 <212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(45) <223> sintético	
25	<400> 17 agcgugcccg guguggcagg ggggcgcgac cuguauuugc acgcu	45
	<210> 18 <211> 47 <212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(47) <223> sintético	
35	<400> 18 agcgugcccg gaguggcagg ggggcgcgac cugcauaauu gcacgcu	47
	<210> 19 <211> 45 <212> ARN	
40	<213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
45		

<221> L-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético
 <400> 19

5 agcgugcccg guguggcagg ggggcgcgac cugcaauugc acgcu 45

<210> 20
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético

15 <400> 20

agcaugcccg guguggcagg ggggcgcgac cugcauuugc augcu 45

<210> 21
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético

25 <400> 21

agcgugcccg gugugguagg ggggcgcgac cuacauuugc acgcu 45

30 <210> 22
 <211> 44
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(44)
 <223> sintético

40 <400> 22

agugugccag cugugauggg ggggcgcgac ccauuuuaca cacu 44

<210> 23
 <211> 43
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(43)

50

	<223> sintético	
	<400> 23	
	agugugccag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuuacac acu	43
5	<210> 24 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
10	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(43) <223> sintético	
	<400> 24	
15	agugugcgag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuuacau acu	43
	<210> 25 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(43)	
25	<223> sintético	
	<400> 25	
	agugugccag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuuacau acu	43
30	<210> 26 <211> 42 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
35	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(42) <223> sintético	
	<400> 26	
	aguaugccag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuacaua cu	42
40	<210> 27 <211> 43 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(43) <223> sintético	

	<400> 27	
	agugugccag ugugaugggg gggcgcgacc cauuuuacac acu	43
	<210> 28	
	<211> 43	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 28	
	agcgugccag ugugaugggg gggcgcgacc cauuuuacac gcu	43
15	<210> 29	
	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
25	<400> 29	
	acgcacgucc cucaccggug caagugaagc cgcggcucug cgu	43
	<210> 30	
	<211> 43	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
35	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 30	
	acgcaccucc cucaccggug caagugaagc cguggcucug cgc	43
	<210> 31	
40	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 31	

	acgcacgucc cucaccggug caagugaagc cguggcucug cgu	43
	<210> 32	
	<211> 41	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
10	<222> (1)..(41)	
	<223> sintético	
	<400> 32	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugc u	41
	<210> 33	
15	<211> 41	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
20	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(41)	
	<223> sintético	
	<400> 33	
25	acgcacgucc cucaccggug caagugaagc cguggcucug c	41
	<210> 34	
	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
35	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 34	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugc	39
	<210> 35	
	<211> 42	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
45	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 35	
	cgacguccc ucaccggugc aagugaagcc guggcucugc gu	42

	<210> 36	
	<211> 41	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(41)	
10	<223> sintético	
	<400> 36	
	cgcacguccc ucaccggugc aagugaagcc guggcucugc g	41
	<210> 37	
	<211> 40	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
20	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
	<400> 37	
	gcacgucccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg	40
25	<210> 38	
	<211> 49	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(49)	
	<223> sintético	
35	<400> 38	
	gucgucggu guggaagacu accuaaugac agccgaaugc uggcagcac	49
	<210> 39	
	<211> 49	
	<212> ARN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
45	<222> (1)..(49)	
	<223> sintético	
	<400> 39	
	gucgucggu guggaagacu accuaaugac agccuaaugc uggcagcac	49
	<210> 40	
50	<211> 49	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(49)	
	<223> sintético	
	<400> 40	
10	gugcugcgua guggaagacu accuuaugac agccgaaugc uggcagcac	49
	<210> 41	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
20	<223> sintético	
	<400> 41	
	gugcugcgua gugaaaaacu acugccagug ggucagagcu agcagcac	48
	<210> 42	
	<211> 48	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 42	
	gugcugcgga guaaaaacu ccuaagaca ggccagagcc ggcagcac	48
35	<210> 43	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
45	<400> 43	
	gugcugcgga guugaaaacu ccuaagaca ggccagagcc ggcagcac	48
	<210> 44	
	<211> 48	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 44 gugcugcgua guggaagacu accuaugaca gccuaaugcu ggcagcac	48
10	<210> 45 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
15	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 45	
20	gugcugcgga guaaaaacu ccuaagaca ggcuagagcc ggcagcac	48
	<210> 46 <211> 50 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Producto de unión a MCP-1 <220> <221> L-ARN <222> (1)..(50) <223> sintético	
30	<400> 46 gugcugcggc gugaaaaacg ccucugcacu gccuuuug caggcagcac	50
35	<210> 47 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
40	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 47 gugcugcgua gugaaaaacu accaacgacu ggcuagagcc ggcagcac	48
45	<210> 48 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
50	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	

	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
5	<400> 48	
	gugcugcgua gugaaagacu accugugaca gccgaaugcu ggcagcac	48
	<210> 49	
	<211> 48	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
15	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 49	
	guacugcgua guaaaaacu accaacgacu ggcuagagcc ggcagcac	48
	<210> 50	
20	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
25	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 50	
30	gugcugcgua guaaaaacu accaacgacu ggcuagagcc ggcagcac	48
	<210> 51	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
40	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 51	
	gugcugcgua guaaaaacu accagcgaca ggcuagagcc ggcagcac	48
	<210> 52	
	<211> 48	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
50	<221> L-ARN	

	<222> (1)..(48) <223> sintético	
	<400> 52	
	gugcugcgua guaaaaaacu accagcgacu ggcuagagcc ggcagcac	48
5	<210> 53 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético	
15	<400> 53	
	gugcugcgua gugagaaacu accaacgacu ggcuagagcc ggcagcac	48
	<210> 54 <211> 46 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(46) <223> sintético	
25	<400> 54	
	ggcugcguag uaaaaaacua ccagcgacug gcuagagccg gcagcc	46
	<210> 55 <211> 44 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
35	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(44) <223> sintético	
	<400> 55	
40	ggcgcguagu uaaaaacuac cagcgacugg cuagagccgg cgcc	44
	<210> 56 <211> 46 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(46) <223> sintético	
50		

ES 2 397 803 T3

	<400> 56	
	gugcgcgugag uaaaaaacua ccagcgacug gcuagagccg gcgcac	46
	<210> 57	
	<211> 46	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(46)	
	<223> sintético	
	<400> 57	
	gugcgcgugag ugagaaacua ccaacgacug gcuagagccg gcgcac	46
15	<210> 58	
	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
25	<400> 58	
	gugccguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg gcac	44
	<210> 59	
	<211> 44	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
35	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 59	
	guggcguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg ccac	44
	<210> 60	
40	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 60	
50	gucgcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cgac	44

ES 2 397 803 T3

<210> 61
 <211> 44
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(44)
 10 <223> sintético
 <400> 61
 ugcgcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cgca 44
 <210> 62
 <211> 44
 15 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(44)
 <223> sintético
 20 <400> 62
 gcugcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cagc 44
 25 <210> 63
 <211> 44
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(44)
 <223> sintético
 35 <400> 63
 gcugcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cagc 44
 <210> 64
 <211> 44
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(44)
 <223> sintético
 45 <400> 64
 ggugcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cacc 44
 <210> 65
 50 <211> 42

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 65	
10	uggcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ca	42
	<210> 66	
	<211> 42	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(42)	
20	<223> sintético	
	<400> 66	
	gcgcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc gc	42
	<210> 67	
	<211> 42	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
30	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 67	
	gugcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ac	42
35	<210> 68	
	<211> 42	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
45	<400> 68	
	gggcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc cc	42
	<210> 69	
	<211> 42	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 5 <222> (1)..(42)
 <223> sintético

<400> 69
 gagcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc uc 42

<210> 70
 10 <211> 42
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

15 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(42)
 <223> sintético

<400> 70

20 cggcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc cg 42

<210> 71
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(42)
 30 <223> sintético

<400> 71
 ccgcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc gg 42

<210> 72
 <211> 42
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 40 <221> L-ARN
 <222> (1)..(42)
 <223> sintético1

<400> 72
 cagcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ug 42

45 <210> 73
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Producto de unión a MCP-1

	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
5	<400> 73	
	cugcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ag	42
	<210> 74	
	<211> 39	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
15	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 74	
	agcguguuag ugaagugggu ggcagguaaa ggacacgcu	39
	<210> 75	
20	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
25	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 75	
30	agcgugguag cggugugggu gguagguaaa ggccacgcu	39
	<210> 76	
	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
40	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 76	
	agcgugauag aagagcgggu gguagguaaa ggucagcgu	39
	<210> 77	
	<211> 39	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
50	<221> L-ARN	

	<222> (1)..(39) <223> sintético	
	<400> 77	
	agcguguuag guaggguggu aguaaguaaa ggacacgcu	39
5	<210> 78 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(38) <223> sintético	
15	<400> 78	
	agcguguuag guggguggua guaaguaaag gacacgcu	38
	<210> 79 <211> 38 <212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(38) <223> sintético	
25	<400> 79	
	agcguguuag guggguggua guaaguaaag ggcacgcu	38
	<210> 80 <211> 34 <212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
35	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(34) <223> sintético	
	<400> 80	
40	ccgcuuaggu gggugguagu aaguaaaggg gcgg	34
	<210> 81 <211> 39 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(39)	
50	<223> sintético	

	<400> 81	
	gcgcgagcag guggguggua gaauguaaag acucgcguc	39
	<210> 82	
	<211> 34	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(34)	
	<223> sintético	
	<400> 82	
	cguguuaggu gggugguagu aaguaaagga cacg	34
15	<210> 83	
	<211> 32	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(32)	
	<223> sintético	
25	<400> 83	
	guguuaggug ggugguagua aaguaaggac ac	32
	<210> 84	
	<211> 34	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
35	<222> (1)..(34)	
	<223> sintético	
	<400> 84	
	cguguuaggu gggugguagu aaguaaaggg cacg	34
	<210> 85	
40	<211> 32	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(32)	
	<223> sintético	
	<400> 85	

	guguuaggug ggugguagua aguaaagggc ac	32
	<210> 86	
	<211> 30	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
10	<222> (1)..(30)	
	<223> sintético	
	<400> 86	
	uguuaggugg gugguaguaa guaaagggca	30
	<210> 87	
15	<211> 52	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
20	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
	<400> 87	
25	ggacgagagu gacaaaugau auaaccuccu gacuaacgcu gcgggcgaca gg	52
	<210> 88	
	<211> 52	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
35	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
	<400> 88	
	ggaccuaucg cuaagacaac gcgagucua cgggacauuc uccgaggaca gg	52
	<210> 89	
	<211> 52	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
45	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
	<400> 89	
	ggacaauugu uacccccgag agagacaaau gagacaaccu ccugaagaca gg	52

	<210> 90	
	<211> 51	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(51)	
10	<223> sintético	
	<400> 90	
	ggacgaaagu gagaaaugau acaaccuccu guugcugcga auccggacag g	51
	<210> 91	
	<211> 50	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
20	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 91	
	ggacguaaaa gacgcuaccc gaaagaugu caggagggua gaccgacagg	50
25	<210> 92	
	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
35	<400> 92	
	ggacuagaaa cuacaauagc ggccaguugc accgcguuau caacgacagg	50
	<210> 93	
	<211> 50	
	<212> ARN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
45	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 93	
	ggacuaguca gccagugugu auaucggacg cggguuuuuu uacugacagg	50
	<210> 94	
50	<211> 50	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 94	
10	ggacugucg gaguguaaa cucccgaga cgccagaag cggggacagg	50
	<210> 95	
	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(50)	
20	<223> sintético	
	<400> 95	
	ggacuucua ccagguggu gguaguaugu aaagagauag aagugacagg	50
	<210> 96	
	<211> 50	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
30	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 96	
	ggacgagagc gaacaugau auaaccuccu gacggaaaga gaucgacagg	50
35	<210> 97	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
45	<400> 97	
	ccugugcuac acgcaguaag aagugaacgu ucaguaugug ugcacagg	48
	<210> 98	
	<211> 48	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 98 cgugagccag gcaccgaggg cguuaacugg cugauuggac acgacacg	48
10	<210> 99 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
15	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 99	
20	cgugaacaug caagcuaagc ggggcuguug guugcuuggc cgcaccag	48
	<210> 100 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Producto de unión a MCP-1 <220> <221> -ARN <222> (1)..(48) <223> sintético	
30	<400> 100 cgugcagaga gagaccaacc acguaaaauc aaccuaaugg gccgcacg	48
35	<210> 101 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
40	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 101 cgugcagaga gagaccaacc acguaaaauc aaccuaaugg gccgcacg	48
45	<210> 102 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
50	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético

5 <400> 102

cgugaacauu caagcuaagc ggggcuguug guugcuuggc cgcaccg 48

<210> 103
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético

15 <400> 103

cgugccgagg cggcgaccag cguuacuuag agaggcuuug gcaccag 48

<210> 104
 <211> 47
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

25 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético

<400> 104

30 cgugauaaca gccgucgguc aagaaaaca aguucgggag ggcgacg 47

<210> 105
 <211> 47
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético

40 <400> 105

cguggguggc gcaccgaggg cgaaaagcca ccaguaaaga uagaccg 47

<210> 106
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN

50

ES 2 397 803 T3

	<222> (1)..(45) <223> sintético	
	<400> 106	
	cgugugaucu ccuuuggggu gauuagcuua gagacuuccc acacg	45
5	<210> 107 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(45) <223> sintético	
15	<400> 107	
	gcaccuucgc cuaauacacg ugccggcuag cuaauacucg uccgc	45
	<210> 108 <211> 45 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(45) <223> sintético	
25	<400> 108	
	gcacgacuug ggcgaccagu gauacuuaga gagcaagucg ucggc	45
	<210> 109 <211> 44 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(44) <223> sintético	
35	<400> 109	
	gcgcgcguc aguaagaaau ugaaaguuca gaaugucguc gcgc	44
40	<210> 110 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético	
45	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> L-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético	
50	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	

	<400> 110	
	aguguguggc aggcuaagga gauauuccga gaccacgcu	39
	<210> 111	
	<211> 39	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 111	
	aguguguggc agacuaugga uagacuccga gaccacgcu	39
15	<210> 112	
	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
25	<400> 112	
	agcgugaggc gaccagcgga uuacuuagag agucacgcu	39
	<210> 113	
	<211> 39	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
35	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 113	
	agcgugaagg ggaccagcgu uacuuacaga guucacgcu	39
	<210> 114	
40	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 114	

	agcggugau guauguagca ccguaucaga ggacacgcu	39
	<210> 115	
	<211> 37	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
10	<222> (1)..(37)	
	<223> sintético	
	<400> 115	
	agcggagggc gacccguguu ucguagagag ucacgcu	37
	<210> 116	
15	<211> 40	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> NOX-E36-5'PEG	
20	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
	<220>	
25	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(1)	
	<223> PEGilación en 5'	
	<400> 116	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg	40
30	<210> 117	
	<211> 40	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> NOX-E36-3'PEG	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
40	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> PEGilación en 3'	
	<400> 117	
45	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg	40
	<210> 118	
	<211> 58	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(58)	
5	<223> sintético	
	<400> 118	
	gagauggcga cauugguugg gcaugaggcg aggccuuug augaauccgc ggccauuc	58
	<210> 119	
	<211> 56	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
15	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(56)	
	<223> sintético	
	<400> 119	
	gauggcgaca uugguugggc augaggcgag gccuuugau gaauccgagg ccauuc	56
20	<210> 120	
	<211> 53	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(53)	
	<223> sintético	
30	<400> 120	
	ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgaggcca uuc	53
	<210> 121	
	<211> 52	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
40	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
	<400> 121	
	ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgaggcca uu	52
	<210> 122	
45	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	

	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
5	<400> 122	
	ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgcgcca	50
	<210> 123	
	<211> 48	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
15	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 123	
	gcugguuacc gaggggcgcu cguuggaguu uggugguug ucaccagc	48
	<210> 124	
20	<211> 46	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
25	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(46)	
	<223> sintético	
	<400> 124	
30	cugguuaccg aggggcguc guuggaguuu gguugguugu caccag	46
	<210> 125	
	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
40	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 125	
	ugguuaccga ggggcgucg uggaguuug guugguug acca	44
	<210> 126	
	<211> 48	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
50	<221> L-ARN	

	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 126	
	gccgguuacc gagggggcgu cguuggaguu uggugguug ucaccggc	48
5	<210> 127	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
15	<400> 127	
	gccggcuacc gagggggcgu cguuggaguu uggugguug ucgccggc	48
	<210> 128	
	<211> 46	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> L-ARN	
25	<222> (1)..(46)	
	<223> sintético	
	<400> 128	
	gcgcuaccg agggggcguc guuggaguuu gguugguugu cgcgcg	46
	<210> 129	
30	<211> 46	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
35	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(46)	
	<223> sintético	
	<400> 129	
40	gggccuaccg agggggcguc guuggaguuu gguugguugu cggccc	46
	<210> 130	
	<211> 76	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> D MCP-1 biotinilada humana	
	<220>	
	<221> D-Proteína	
	<222> (1)..(76)	
50	<223> sintético	

<220>
 <221> Biotinilación
 <222> (1)..(1)
 <223> sintético

5 <400> 130

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
 20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
 65 70 75

<210> 131
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> D MCP-1 de ratón biotinilada

<220>
 <221> D-Proteína
 <222> (1)..(76)
 <223> sintético

15

<220>
 <221> Biotinilación
 <222> (1)..(1)
 <223> sintético

20

<220>
 <221> Biotinilación
 <222> (76)..(76)
 <223> sintético

25 <400> 131

ES 2 397 803 T3

Gln Pro Asp Ala Val Asn Ala Pro Leu Thr Cys Cys Tyr Ser Phe Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Met Ile Pro Met Ser Arg Leu Glu Ser Tyr Lys Arg Ile Thr
 20 25 30

Ser Ser Arg Cys Pro Lys Glu Ala Val Val Phe Val Thr Lys Leu Lys
 35 40 45

Arg Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Lys Glu Trp Val Gln Thr Tyr Ile
 50 55 60

Lys Asn Leu Asp Arg Asn Gln Met Arg Ser Glu Pro
 65 70 75

<210> 132
 <211> 47
 <212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético

10

<400> 132

agcgugcccg gaguggcagg gggacgcgac cugcaauauu gcacgcu

47

<210> 133
 <211> 45
 <212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético

20

<400> 133

agcgugcccg gaguggcagg gggacgcgac cugcaauugc acgcu

45

<210> 134
 <211> 47
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<400> 134

agcgugcccg gaguggcagg gggacgcgac cuguauuuuu gcacgcu

47

<210> 135
 <211> 47
 <212> ARN

35

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
5	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(47)	
	<223> sintético	
	<400> 135	
	agcgugcccg guguggcagg gggacgcgac cugcauaau gcgcgcu	47
10	<210> 136	
	<211> 47	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(47)	
	<223> sintético	
20	<400> 136	
	agcgugcccg gaguagcagg ggggacgac cugcauaau gcacgcu	47
	<210> 137	
	<211> 45	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
30	<222> (1)..(45)	
	<223> sintético	
	<400> 137	
	agcgugcccg gugugguagg ggggacgac cuacaauugc acgcu	45
	<210> 138	
35	<211> 45	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
40	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(45)	
	<223> sintético	
	<400> 138	
45	agcgugcccg gugugacagg ggggacgac cugcauuugc acgcu	45
	<210> 139	
	<211> 45	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 5 <222> (1)..(45)
 <223> sintético

<400> 139

agcgugcccg guguggcagg ggggcgcgac cuguauuugc acgcu 45

<210> 140
 10 <211> 47
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

15 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético

<400> 140

20 agcgugcccg gaguggcagg ggggcgcgac cugcaauauu gcacgcu 47

<210> 141
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(45)
 30 <223> sintético

<400> 141

agcgugcccg guguggcagg ggggcgcgac cugcaauugc acgcu 45

<210> 142
 <211> 45
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético

40 <400> 142

agcaugcccg guguggcagg ggggcgcgac cugcauuugc augcu 45

<210> 143
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Producto de unión a MCP-1

	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(45)	
	<223> sintético	
5	<400> 143	
	agcgugcccg gugugguagg ggggcgcgac cuacauuugc acgcu	45
	<210> 144	
	<211> 44	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
15	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 144	
	agugugccag cugugauggg ggggcgcgac ccauuuuaca cacu	44
	<210> 145	
20	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
25	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 145	
30	agugugccag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuuacac acu	43
	<210> 146	
	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
40	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 146	
	agugugcgag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuuacau acu	43
	<210> 147	
	<211> 43	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
50	<221> D-ARN	

	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 147	
	agugugccag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuuacau acu	43
5	<210> 148	
	<211> 42	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
15	<400> 148	
	aguaugccag cgugaugggg gggcgcgacc cauuuacaua cu	42
	<210> 149	
	<211> 43	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
25	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 149	
	agugugccag ugugaugggg gggcgcgacc cauuuuacac acu	43
	<210> 150	
30	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
35	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 150	
40	agcgugccag ugugaugggg gggcgcgacc cauuuuacac gcu	43
	<210> 151	
	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(43)	
50	<223> sintético	

	<400> 151	
	acgcacgucc cucaccggug caagugaagc cgcggcucug cgu	43
	<210> 152	
	<211> 43	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
	<400> 152	
	acgcaccucc cucaccggug caagugaagc cguggcucug cgc	43
15	<210> 153	
	<211> 43	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(43)	
	<223> sintético	
25	<400> 153	
	acgcacgucc cucaccggug caagugaagc cguggcucug cgu	43
	<210> 154	
	<211> 41	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(41)	
	<223> sintético	
	<400> 154	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg u	41
	<210> 155	
40	<211> 41	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(41)	
	<223> sintético	
	<400> 155	

	acgcacgucc cucaccggug caagugaagc cguggcucug c	41
	<210> 156	
	<211> 39	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
10	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 156	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugc	39
	<210> 157	
15	<211> 42	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
20	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 157	
25	cgcacgucc ucaccggugc aagugaagcc guggcucugc gu	42
	<210> 158	
	<211> 41	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(41)	
	<223> sintético	
	<400> 158	
	cgcacgucc ucaccggugc aagugaagcc guggcucugc g	41
	<210> 159	
	<211> 40	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
45	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
	<400> 159	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugc	40

	<210> 160	
	<211> 49	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(49)	
10	<223> sintético	
	<400> 160	
	gugcugcgua guggaagacu accuaaugac agccgaaugc uggcagcac	49
	<210> 161	
	<211> 49	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
20	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(49)	
	<223> sintético	
	<400> 161	
	gugcugcgua guggaagacu accuaaugac agccuaaugc uggcagcac	49
25	<210> 162	
	<211> 49	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(49)	
	<223> sintético	
35	<400> 162	
	gugcugcgua guggaagacu accuaaugac agccgaaugc uggcagcac	49
	<210> 163	
	<211> 48	
	<212> ARN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
45	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 163	
	gugcugcgua gugaaaaacu acugccagug ggucagagcu agcagcac	48
	<210> 164	
50	<211> 48	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 164	
10	gugcugcgga guaaaaacu ccuaagaca ggccagagcc ggcagcac	48
	<210> 165	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
20	<223> sintético	
	<400> 165	
	gugcugcgga guugaaaacu ccuaagaca ggccagagcc ggcagcac	48
	<210> 166	
	<211> 48	
25	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
30	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 166	
	gugcugcgua guggaagacu accuaugaca gccuaugcu ggcagcac	48
35	<210> 167	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
45	<400> 167	
	gugcugcgga guaaaaacu ccuaagaca ggcuagagcc ggcagcac	48
	<210> 168	
	<211> 50	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(50) <223> sintético <400> 168 gugcugcggc gugaaaaacg ccucgacgac gccuuuug caggcagcac	50
10	<210> 169 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
15	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 169	
20	gugcugcgua gugaaaaacu accaacgacu gccuagagcc ggcagcac	48
	<210> 170 <211> 48 <212> ARN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> Producto de unión a MCP-1 <220> <221> D-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético	
30	<400> 170 gugcugcgua gugaaagacu accugugaca gccgaaugcu ggcagcac	48
35	<210> 171 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
40	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(48) <223> sintético <400> 171 guacugcgua guaaaaacu accaacgacu gccuagagcc ggcagcac	48
45	<210> 172 <211> 48 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
50	<223> Producto de unión a MCP-1	

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético

5 <400> 172

gugcugcgua guaaaaaacu accaacgacu ggcuagagcc ggcagcac 48

<210> 173
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético

15 <400> 173

gugcugcgua guaaaaaacu accagcgaca ggcuagagcc ggcagcac 48

<210> 174
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético

25 <400> 174

30 gugcugcgua guaaaaaacu accagcgacu ggcuagagcc ggcagcac 48

<210> 175
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético

40 <400> 175

gugcugcgua gugagaaacu accaacgacu ggcuagagcc ggcagcac 48

<210> 176
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN

50

	<222> (1)..(46) <223> sintético	
	<400> 176	
	ggcugcguag uaaaaaacua ccagcgacug gcuagagccg gcagcc	46
5	<210> 177 <211> 44 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(44) <223> sintético	
15	<400> 177	
	ggcgcguagu uaaaaacuac cagcgacugg cuagagccgg cgcc	44
	<210> 178 <211> 46 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(46) <223> sintético	
25	<400> 178	
	gugcgcguag uaaaaaacua ccagcgacug gcuagagccg gcgcac	46
	<210> 179 <211> 46 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(46) <223> sintético	
35	<400> 179	
	gugcgcguag ugagaaacua ccaacgacug gcuagagccg gcgcac	46
40	<210> 180 <211> 44 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(44) <223> sintético	
45	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(44) <223> sintético	
50	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	

	<400> 180	
	gugccguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg gcac	44
	<210> 181	
	<211> 44	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 181	
	guggcguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg ccac	44
15	<210> 182	
	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
25	<400> 182	
	gucgcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cgac	44
	<210> 183	
	<211> 44	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 183	
	ugcgcuagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cgca	44
	<210> 184	
40	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 184	

	gcugcguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cagc	44
	<210> 185	
	<211> 44	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
10	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 185	
	gcugcguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cagc	44
	<210> 186	
15	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
20	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 186	
25	ggugcguagu gagaaacuac caacgacugg cuagagccgg cacc	44
	<210> 187	
	<211> 40	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
	<400> 187	
	uggcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc	40
	<210> 188	
	<211> 42	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
45	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 188	
	gcgcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc gc	42

<210> 189
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(42)
 10 <223> sintético
 <400> 189
 gugcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ac 42
 <210> 190
 <211> 42
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(42)
 <223> sintético
 20 <400> 190
 gggcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc cc 42
 25 <210> 191
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(42)
 <223> sintético
 35 <400> 191
 gagcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc uc 42
 <210> 192
 <211> 42
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(42)
 <223> sintético
 45 <400> 192
 cggcguagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc cg 42
 <210> 193
 50 <211> 42

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 193	
10	ccgcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc gg	42
	<210> 194	
	<211> 42	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(42)	
20	<223> sintético	
	<400> 194	
	cagcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ug	42
	<210> 195	
	<211> 42	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
30	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(42)	
	<223> sintético	
	<400> 195	
	cugcuagug agaaacuacc aacgacuggc uagagccggc ag	42
35	<210> 196	
	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
45	<400> 196	
	agcguguuag ugaagugggu ggcagguaaa ggacacgcu	39
	<210> 197	
	<211> 39	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético <400> 197 agcgugguag cggugugggu gguagguaaa ggccacgcu	39
10	<210> 198 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
15	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético <400> 198	
20	agcgugauag aagagcgggu gguagguaaa ggucaggcu	39
	<210> 199 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
30	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético <400> 199 agcguguuag guaggguggu aguaaguuuu ggacacgcu	39
35	<210> 200 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
40	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(38) <223> sintético <400> 200 agcguguuag guggguggua guaaguuuu gagacgcu	38
45	<210> 201 <211> 38 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
50	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	

	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(38) <223> sintético	
5	<400> 201 agcguguuag guggguggua guaagaaaag ggcacgcu	38
	<210> 202 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(34) <223> sintético	
15	<400> 202 ccgcuuaggu gggugguagu aaguaaaggg gcgg	34
	<210> 203 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético	
25	<400> 203 gcgcgagcag guggguggua gaaugaaaag acucgcguc	39
	<210> 204 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(34) <223> sintético	
35	<400> 204 cguguuaggu gggugguagu aaguaaagga cacg	34
	<210> 205 <211> 32 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN	
45		
50		

	<222> (1)..(32) <223> sintético	
	<400> 205	
	guguuaggug ggugguagua aguaaaggac ac	32
5	<210> 206 <211> 34 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(34) <223> sintético	
15	<400> 206	
	cguguuaggu gggugguagu aaguaaaggg cacg	34
	<210> 207 <211> 32 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(32) <223> sintético	
25	<400> 207	
	guguuaggug ggugguagua aguaaagggc ac	32
30	<210> 208 <211> 30 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
35	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(30) <223> sintético	
	<400> 208	
40	uguuaggugg gugguaguaa guaaagggca	30
	<210> 209 <211> 52 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(52) <223> sintético	
50		

	<400> 209	
	ggacgagagu gacaaaugau auaaccuccu gacuaacgcu gcgggcgaca gg	52
	<210> 210	
	<211> 52	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
10	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
	<400> 210	
	ggaccuaucg cuaagacaac gcgcagucua cgggacauuc uccgcgga gg	52
15	<210> 211	
	<211> 52	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
25	<400> 211	
	ggacaauugu uacccccgag agagacaaau gagacaaccu ccugaagaca gg	52
	<210> 212	
	<211> 51	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(51)	
	<223> sintético	
	<400> 212	
	ggacgaaagu gagaaaugau acaaccuccu guugcugcga auccggacag g	51
	<210> 213	
40	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 213	

	ggacguaaaa gacgcuaccc gaaagaauugu caggagggua gaccgacagg	50
	<210> 214	
	<211> 50	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
10	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 214	
	ggacuagaaa cuacaauagc ggccaguugc accgcguuau caacgacagg	50
	<210> 215	
15	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
20	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 215	
25	ggacuaguca gccagugugu auaucggacg cggguuuuuu uacugacagg	50
	<210> 216	
	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 216	
	ggacuguccg gagugugaaa cucccccgaga ccgccagaag cggggacagg	50
	<210> 217	
	<211> 50	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
45	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
	<400> 217	
	ggacuucuai ccaggugggu gguaguaugu aaagagauag aagugacagg	50

	<210> 218	
	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(50)	
10	<223> sintético	
	<400> 218	
	ggacgagagc gaacaugau auaaccuccu gacggaaaga gaucgacagg	50
	<210> 219	
	<211> 48	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
20	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 219	
	ccugugcuac acgcaguaag aagugaacgu ucaguaugug ugcacagg	48
25	<210> 220	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
35	<400> 220	
	cgugagccag gcaccgaggg cguaaacugg cugauuggac acgacagc	48
	<210> 221	
	<211> 48	
	<212> ARN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
45	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 221	
	cgugaacaug caagcuaagc ggggcuguug guugcuuggc ccgccagc	48
	<210> 222	
50	<211> 48	

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 5 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético
 <400> 222
 10 cgugcagaga gagaccaacc acguaaaauc aaccuaaugg gccgcacg 48
 <210> 223
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 20 <223> sintético
 <400> 223
 cgugcagaga gagaccaacc acguaaaauc aaccuaaugg gccgcacg 48
 <210> 224
 <211> 48
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético
 <400> 224
 30 cgugaacauu caagcuaagc ggggcuguug guugcuuggc ccgccacg 48
 <210> 225
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(48)
 <223> sintético
 45 <400> 225
 cgugccgagg cggcgaccag cguuacuuag agaggcuuug gcaccacg 48

<210> 226
 <211> 47
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(47)
 10 <223> sintético

 <400> 226

 cgugauaaca gccgucgguc aagaaaaca aguucggcg gcgcacg 47

 <210> 227
 <211> 47
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(47)
 <223> sintético
 20 <400> 227

 cguggguggc gcaccgaggg cgaaaagcca ccaguaaaga uagaccg 47

 25 <210> 228
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Producto de unión a MCP-1

 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético
 35 <400> 228

 cgugugaucu ccuuugggu gauuagcuua gagacuucc acacg 45

 <210> 229
 <211> 45
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(45)
 <223> sintético
 45 <400> 229

 gcaccuucgc cuaauacacg ugccggcuag cuaauacucg uccgc 45

 <210> 230
 50 <211> 45

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(45)	
	<223> sintético	
	<400> 230	
10	gcacgacuug ggcgaccagu gauacuuaga gagcaagucg ucggc	45
	<210> 231	
	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(44)	
20	<223> sintético	
	<400> 231	
	gcgcgcguc aguaagaaau ugaaaguuca gaaugucguc ggcg	44
	<210> 232	
	<211> 39	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
	<400> 232	
	aguguguggc aggcuaagga gauauuccga gaccacgcu	39
35	<210> 233	
	<211> 39	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(39)	
	<223> sintético	
45	<400> 233	
	aguguguggc agacuaugga uagacuccga gaccacgcu	39
	<210> 234	
	<211> 39	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético <400> 234 agcgugaggc gaccagcgga uuacuuagag agucacgcu	39
10	<210> 235 <211> 39 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
15	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético <400> 235	
20	agcgugaagg ggaccagcgu uacuuacaga guucacgcu	39
	<210> 236 <211> 39 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Producto de unión a MCP-1 <220> <221> D-ARN <222> (1)..(39) <223> sintético	
30	<400> 236 agcgugugau guauguagca ccguaucaga ggacacgcu	39
35	<210> 237 <211> 37 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
40	<220> <221> D-ARN <222> (1)..(37) <223> sintético <400> 237 agcgugaggc gacccguguu ucguagagag ucacgcu	37
45	<210> 238 <211> 40 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <223> Producto de unión a MCP-1	
50		

ES 2 397 803 T3

	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
5	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> PEGilación en 5'	
	<400> 238	
10	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg	40
	<210> 239	
	<211> 40	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(40)	
20	<223> sintético	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> PEGilación en 3'	
25	<400> 239	
	gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg	40
	<210> 240	
	<211> 58	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
35	<222> (1)..(58)	
	<223> sintético	
	<400> 240	
	gagauggcga cauugguugg gcaugaggcg aggccuuug augaauccgc ggccaauc	58
	<210> 241	
40	<211> 56	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
45	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(56)	
	<223> sintético	
	<400> 241	
50	gauggcgaca uugguugggc augaggcgag gccuuugau gaauccgagg ccauuc	56

	<210> 242	
	<211> 53	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(53)	
10	<223> sintético	
	<400> 242	
	ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgcggcca uuc	53
	<210> 243	
	<211> 52	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
20	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(52)	
	<223> sintético	
	<400> 243	
	ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgcggcca uu	52
25	<210> 244	
	<211> 50	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(50)	
	<223> sintético	
35	<400> 244	
	ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgcggcca	50
	<210> 245	
	<211> 48	
	<212> ARN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
45	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 245	
	gcugguuacc gagggggcgu cguuggaguu ugguuuguug ucaccagc	48
	<210> 246	
50	<211> 46	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
5	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(46)	
	<223> sintético	
	<400> 246	
10	cugguuaccg agggggcguc guuggaguuu gguugguugu caccag	46
	<210> 247	
	<211> 44	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
20	<222> (1)..(44)	
	<223> sintético	
	<400> 247	
	ugguuaccga gggggcgucg uuggaguuug guugguugac acca	44
	<210> 248	
	<211> 48	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
30	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
	<400> 248	
	gccgguuacc gagggggcgu cguuggaguu ugguugguug ucaccggc	48
35	<210> 249	
	<211> 48	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Producto de unión a MCP-1	
	<220>	
	<221> D-ARN	
	<222> (1)..(48)	
	<223> sintético	
45	<400> 249	
	gccggcuacc gagggggcgu cguuggaguu ugguugguug ucgccggc	48
	<210> 250	
	<211> 46	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> D-ARN
 5 <222> (1)..(46)
 <223> sintético

<400> 250
 gcgcguaccg agggggcguc guuggaguuu gguugguugu cgcgc 46

<210> 251
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

15 <220>
 <221> D-ARN
 <222> (1)..(46)
 <223> sintético

<400> 251

20 gggccuaccg agggggcguc guuggaguuu gguugguugu cggccc 46

<210> 252
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

25 <400> 252

Gln Pro Asp Ala Val Asn Ala Pro Leu Thr Cys Cys Tyr Ser Phe Thr
 1 5 10 15

Gly Lys Met Ile Pro Met Ser Arg Leu Glu Asn Tyr Lys Arg Ile Thr
 20 25 30

Ser Ser Arg Cys Pro Lys Glu Ala Val Val Phe Val Thr Lys Leu Lys
 35 40 45

Arg Glu Ile Cys Ala Asp Pro Asn Lys Glu Trp Val Gln Lys Tyr Ile
 50 55 60

Arg Lys Leu Asp Gln Asn Gln Val Arg Ser Glu Thr
 65 70 75

<210> 253
 <211> 50
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de unión a MCP-1

<220>
 <221> L-ARN
 35 <222> (1)..(50)
 <223> sintético

<220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(50)
 <223> PEGilación en 5'
 5 <400> 253
 ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgcgcca 50
 <210> 254
 <211> 50
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de unión a MCP-1
 <220>
 <221> L-ARN
 15 <222> (1)..(50)
 <223> sintético
 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(50)
 20 <223> PEGilación en 3'
 <400> 254
 ggcgacauug guugggcaug aggcgaggcc cuuugaugaa uccgcgcca 50
 <210> 255
 <211> 11
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de captura de NOX-E36
 <220>
 30 <221> L-ADN
 <222> (1)..(11)
 <223> sintético
 <220>
 <221> L-ADN
 35 <222> (1)..(11)
 <223> -(espaciador 18)2-nh4+ aen el extremo 3'
 <400> 255
 gagggacgtg c 11
 <210> 256
 40 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección de NOX-E36
 45 <220>
 <221> L-ADN
 <222> (1)..(9)
 <223> sintético
 <220>
 50 <221> L-ADN
 <222> (1)..(9)

<223> 5'- Biotina-(espaciador 18)

<400> 256

cgcagagcc

9

5 <210> 257
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CCL1/I-309

10 <220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(73)
 <223> sintético

<400> 257

Lys Ser Met Gln Val Pro Phe Ser Arg Cys Cys Phe Ser Phe Ala Glu
 1 5 10 15

Gln Glu Ile Pro Leu Arg Ala Ile Leu Cys Tyr Arg Asn Thr Ser Ser
 20 25 30

Ile Cys Ser Asn Glu Gly Leu Ile Phe Lys Leu Lys Arg Gly Lys Glu
 35 40 45

Ala Cys Ala Leu Asp Thr Val Gly Trp Val Gln Arg His Arg Lys Met
 50 55 60

15 Leu Arg His Cys Pro Ser Lys Arg Lys
 65 70

<210> 258
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CCL3/MIP-1?

<220>
 <221> L-Proteína

25 <222> (1)..(69)
 <223> sintético

<400> 258

ES 2 397 803 T3

Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser
20 25 30

Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp
50 55 60

Leu Glu Leu Ser Ala
65

<210> 259

<211> 69

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CCL4/MIP-1beta

<220>

<221> L-Proteína

10 <222> (1)..(69)

<223> sintético

<400> 259

Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
1 5 10 15

Ala Arg Lys Leu Pro Arg Asn Phe Val Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser
20 25 30

Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys
35 40 45

Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Asn
65

<210> 260

15 <211> 68

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CCL5/RANTES

20 <220>

<221> L-Proteína

<222> (1)..(68)

<223> sintético

ES 2 397 803 T3

<400> 260

Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly
20 25 30

Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser
50 55 60

Leu Glu Met Ser
65

<210> 261

<211> 82

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CCL13/MCP-4

<220>

10 <221> L-Proteína

<222> (1)..(82)

<223> sintético

<400> 261

Phe Asn Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Leu Asn Val Pro Ser
1 5 10 15

Thr Cys Cys Phe Thr Phe Ser Ser Lys Lys Ile Ser Leu Gln Arg Leu
20 25 30

Lys Ser Tyr Val Ile Thr Thr Ser Arg Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile
35 40 45

Phe Arg Thr Lys Leu Gly Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys
50 55 60

Trp Val Gln Asn Tyr Met Lys His Leu Gly Arg Lys Ala His Thr Leu
65 70 75 80

Lys Thr

15 <210> 262

<211> 74

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CCL14/HCC-1

<220>

ES 2 397 803 T3

<221> L-Proteína
 <222> (1)..(74)
 <223> sintético

<400> 262

Thr Lys Thr Glu Ser Ser Ser Arg Gly Pro Tyr His Pro Ser Glu Cys
 1 5 10 15

Cys Phe Thr Tyr Thr Thr Tyr Lys Ile Pro Arg Gln Arg Ile Met Asp
 20 25 30

Tyr Tyr Glu Thr Asn Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Ile Val Phe Ile
 35 40 45

Thr Lys Arg Gly His Ser Val Cys Thr Asn Pro Ser Asp Lys Trp Val
 50 55 60

Gln Asp Tyr Ile Lys Asp Met Lys Glu Asn
 65 70

5

<210> 263
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> CXCL1/GROalfa

<220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(73)
 <223> sintético

15

<400> 263

Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
 65 70

20

<210> 264
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CXCL2/GRObeta

<220>

<221> L-Proteína
 <222> (1)..(73)
 <223> sintético

<400> 264

Ala Pro Leu Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Gln
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Lys Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Met Leu Lys Asn Gly Lys Ser Asn
 65 70

5

<210> 265
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> CXCL3/GROgamma

<220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(73)

15

<223> sintético
 <400> 265

Ala Ser Val Val Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Arg Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Lys
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Gln Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Ile Leu Asn Lys Gly Ser Thr Asn
 65 70

20

<210> 266
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CXCL4/PF4

<220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(70)
 <223> sintético

5 <400> 266

Glu Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala
 20 25 30
 Gly Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
 35 40 45
 Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile
 50 55 60
 Lys Lys Leu Leu Glu Ser
 65 70

<210> 267
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10

<220>
 <223> CXCL5/ENA-78

<220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(77)
 <223> sintético

15

<400> 267

Gly Pro Ala Ala Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg Cys Val Cys Leu Gln
 1 5 10 15
 Thr Thr Gln Gly Val His Pro Lys Met Ile Ser Asn Leu Gln Val Phe
 20 25 30
 Ala Ile Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys
 35 40 45
 Asn Gly Lys Glu Ile Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys
 50 55 60
 Val Ile Gln Lys Ile Leu Asp Gly Gly Asn Lys Glu Asn
 65 70 75

<210> 268
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> CXCL6/GCP-2

<220>

<221> L-Proteína

<222> (1)..(77)

5 <223> sintético

<400> 268

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

Val Thr Leu Arg Val Asn Pro Lys Thr Ile Gly Lys Leu Gln Val Phe
20 25 30

Pro Ala Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys
35 40 45

Asn Gly Lys Gln Val Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys
50 55 60

Val Ile Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly Asn Lys Lys Asn
65 70 75

<210> 269

<211> 94

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CXCL7/NAP-2

<220>

15 <221> L-Proteína

<222> (1)..(94)

<223> sintético

<400> 269

Ser Ser Thr Lys Gly Gln Thr Lys Arg Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu
1 5 10 15

Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile
20 25 30

Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val
35 40 45

Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu
50 55 60

Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys
65 70 75 80

Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
85 90

20 <210> 270

<211> 79

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> CXCL8/IL-8

5 <220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(79)
 <223> sintético
 <400> 270

Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Ser	Ala	Lys	Glu	Leu	Arg	Cys	Gln	Cys
1				5					10					15	
Ile	Lys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Phe	His	Pro	Lys	Phe	Ile	Lys	Glu	Leu
			20					25					30		
Arg	Val	Ile	Glu	Ser	Gly	Pro	His	Cys	Ala	Asn	Thr	Glu	Ile	Ile	Val
			35				40					45			
Lys	Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Leu	Cys	Leu	Asp	Pro	Lys	Glu	Asn	Trp
	50					55					60				
Val	Gln	Arg	Val	Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Lys	Arg	Ala	Glu	Asn	Ser	
65					70					75					

10 <210> 271
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> CXCL9/MIG

<220>
 <221> L-Proteína
 <222> (1)..(103)
 20 <223> sintético
 <400> 271

ES 2 397 803 T3

Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser Cys Ile Ser Thr Asn Gln
1 5 10 15

Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp Leu Lys Gln Phe Ala Pro
20 25 30

Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
35 40 45

Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala Asp Val Lys Glu Leu Ile
50 55 60

Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys Lys Lys Gln Lys Asn Gly
65 70 75 80

Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys Val Arg Lys Ser Gln Arg
85 90 95

Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
100

<210> 272

<211> 77

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CXCL10/IP-10

<220>

<221> L-Proteína

10 <222> (1)..(77)

<223> sintético

<400> 272

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30

Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
35 40 45

Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
50 55 60

Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro
65 70 75

<210> 273

<211> 73

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CXCL11/I-TAC

<220>

<221> L-Proteína

<222> (1)..(73)

5 <223> sintético

<400> 273

Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys Ile Gly Pro Gly Val
1 5 10 15

Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala Ser Ile Met Tyr Pro
20 25 30

Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile Thr Leu Lys Glu Asn
35 40 45

Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile
50 55 60

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe
65 70

<210> 274

<211> 72

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CXCL12alfa/SDF-1alfa

<220>

15 <221> L-Proteína

<222> (1)..(72)

<223> sintético

<400> 274

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
65 70

20 <210> 275

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CXCL12beta/SDF-1beta

<220>

5 <221> L-Proteína

<222> (1)..(72)

<223> sintético

<400> 275

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
65 70

10 <210> 276

<211> 76

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CX3CL1/Fractalquina

<220>

<221> L-Proteína

<222> (1)..(76)

<223> sintético

20 <400> 276

Gln His His Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr
1 5 10 15

Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala
20 25 30

Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu
35 40 45

Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His
50 55 60

Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn Gly
65 70 75

ES 2 397 803 T3

<210> 277
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> XCL1/Linfotactina
 <220>
 <221> L-Proteina
 <222> (1)..(93)
 10 <223> artificial
 <400> 277

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

 Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Ile Lys Thr Tyr Thr Ile Thr Glu Gly
 20 25 30

 Ser Leu Arg Ala Val Ile Phe Ile Thr Lys Arg Gly Leu Lys Val Cys
 35 40 45

 Ala Asp Pro Gln Ala Thr Trp Val Arg Asp Val Val Arg Ser Met Asp
 50 55 60

 Arg Lys Ser Asn Thr Arg Asn Asn Met Ile Gln Thr Lys Pro Thr Gly
 65 70 75 80

 Thr Gln Gln Ser Thr Asn Thr Ala Val Thr Leu Thr Gly
 85 90

 <210> 278
 15 <211> 40
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> NOX-E36 biotinilada
 20 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(40)
 <223> sintético
 25 <220>
 <221> L-ARN
 <222> (1)..(40)
 <223> 5' Blotina
 <400> 278

 gcacguccu caccggugca agugaagccg uggcucugcg 40
 30 <210> 279
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> POC

	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
5	<400> 279	
	uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcgcu gugcagagcu	40
	<210> 280	
	<211> 40	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> POC-PEG	
	<220>	
	<221> L-ARN	
15	<222> (1)..(40)	
	<223> sintético	
	<220>	
	<221> L-ARN	
	<222> (1)..(40)	
20	<223> PEGilación en 5'	
	<400> 280	
	uaaggaaacu cggucugaug cgguagcgcgcu gugcagagcu	40
	<210> 281	
	<211> 11	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de captura de mNOX-E36	
	<220>	
30	<221> L-ADN	
	<222> (1)..(11)	
	<223> sintético	
	<220>	
	<221> L-ADN	
35	<222> (1)..(11)	
	<223> 3'-(espaciador 18)2-NH4+	
	<400> 281	
	ccaatgtcgc c	11
	<210> 282	
40	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de detección mNOX-E36	
45	<220>	
	<221> L-ADN	
	<222> (1)..(9)	
	<223> sintético	
	<220>	
50	<221> L-ADN	
	<222> (1)..(9)	

ES 2 397 803 T3

<223> 5'- biotina-(espacidor 18)2-

<400> 282

cgcagagcc

9

5

<210> 283

<211> 76

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 283

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ser Pro Val Thr Cys Cys Tyr Thr Phe Thr
1 5 10 15

Gly Lys Lys Ile Ser Ser Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Lys Arg Val Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Leu Ala
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Glu Gln Lys Trp Val Gln Asp Ala Val
50 55 60

Lys Gln Leu Asp Lys Lys Ala Gln Thr Pro Lys Pro
65 70 75

10

<210> 284

<211> 76

<212> PRT

<213> Bos Taurus

<400> 284

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ser Gln Val Ala Cys Cys Tyr Thr Phe Asn
1 5 10 15

Ser Lys Lys Ile Ser Met Gln Arg Leu Met Asn Tyr Arg Arg Val Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Ile
50 55 60

15

Asn Tyr Leu Asn Lys Lys Asn Gln Thr Pro Lys Pro
65 70 75

<210> 285

<211> 125

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

20

<400> 285

ES 2 397 803 T3

Gln Pro Asp Ala Val Asn Ala Pro Leu Thr Cys Cys Tyr Ser Phe Thr
 1 5 10 15

Gly Lys Met Ile Pro Met Ser Arg Leu Glu Asn Tyr Lys Arg Ile Thr
 20 25 30

Ser Ser Arg Cys Pro Lys Glu Ala Val Val Phe Val Thr Lys Leu Lys
 35 40 45

Arg Glu Ile Cys Ala Asp Pro Asn Lys Glu Trp Val Gln Lys Tyr Ile
 50 55 60

Arg Lys Leu Asp Gln Asn Gln Val Arg Ser Glu Thr Thr Val Phe Tyr
 65 70 75 80

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

Thr His Lys Ser Glu Ala Asn Ala Ser Thr Leu Phe Ser Thr Thr Thr
 100 105 110

Ser Ser Thr Ser Val Glu Val Thr Ser Met Thr Glu Asn
 115 120 125

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico L capaz de unirse a MCP-1, en donde el ácido nucleico comprende en la dirección 5'→3' una primera extensión Caja B1A, una segunda extensión Caja B2 y una tercera extensión Caja B1B, en donde
- 5 la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en ACGCA, CGCA y GCA,
- la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de nucleótidos de CSUCCCUCACCGGUGC-AAGUGAAGCCGYGGCUC, y
- la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende UGCGU, UGCG y UGC.
- 10 2. El ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde
- la segunda extensión Caja B2 comprende una secuencia de CGUCCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCC-GUGGCUC.
3. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde
- a) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de ACGCA,
- 15 y
- la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGCGU; o
- b) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de CGCA,
- y
- la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGCG; o
- 20 c) la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GCA,
- y
- la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGC o UGCG.
4. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde
- la primera extensión Caja B1A comprende una secuencia de nucleótidos de GCA.
- 25 5. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y preferiblemente según la reivindicación 4, en donde
- la tercera extensión Caja B1B comprende una secuencia de nucleótidos de UGCG.
6. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico según las SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 116, SEC ID N°: 117 y SEC ID N°: 278, o un ácido nucleico homólogo a los mismos, en donde la homología es de al menos un 85%.
- 30 7. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el ácido nucleico es capaz de unirse a una quimiocina, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.
8. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el ácido nucleico es capaz de unirse a MCP-1 humana.
- 35 9. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ácido nucleico comprende una modificación, en donde la modificación preferiblemente es un resto de elevado peso molecular y/o en donde la modificación preferiblemente permite modificar las características del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en términos de tiempo de residencia en el organismo animal o humano, preferiblemente organismo humano.
- 40 10. El ácido nucleico según la reivindicación 9, en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste en un resto de HES y un resto de PEG.
11. El ácido nucleico según la reivindicación 10, en donde la modificación es un resto de PEG que consiste en un PEG lineal o ramificado, en donde el peso molecular del resto de PEG preferiblemente está entre aproximadamente 20 y 120 kD, más preferiblemente entre aproximadamente 30 y 80 kD y lo más preferiblemente de aproximadamente 40 kD.
- 45

12. El ácido nucleico según la reivindicación 10, en donde la modificación es un resto de HES, en donde preferiblemente el peso molecular del resto de HES está entre aproximadamente 10 y 130 kD, más preferiblemente entre aproximadamente 30 y 130 kD y lo más preferiblemente de aproximadamente 100 kD.
- 5 13. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la primera extensión Caja B1A y la tercera extensión Caja B1B se hibridan opcionalmente entre sí, en donde con la hibridación se forma una estructura de cadena doble.
14. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad.
- 10 15. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en un método de diagnóstico.
16. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y opcionalmente un constituyente adicional, en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que consiste en excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos farmacéuticamente aceptables y agentes farmacéuticamente activos.
- 15 17. El uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento.
18. El uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medio de diagnóstico.
- 20 19. El uso según la reivindicación 17, en donde el medicamento es para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, encefalomiелitis autoinmune, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple aguda y crónica, inflamación crónica, artritis reumatoide, enfermedades renales, restenosis, restenosis después de angioplastia, reacciones alérgicas agudas y crónicas, reacciones inmunológicas y alérgicas primarias y secundarias, asma, conjuntivitis, bronquitis, cáncer, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca cardiovascular arteriosclerótica o accidente cerebrovascular, psoriasis, artritis psoriática, inflamación del sistema nervioso, dermatitis atópica, colitis, endometriosis, uveítis, trastornos retinianos que incluyen degeneración macular, desprendimiento de retina, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, retinitis pigmentaria, vitreorretinopatía proliferativa y coriorretinopatía serosa central; fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, polimiositis, dermatomiositis, anulación de la inmunosupresión, reducción del riesgo de infección, sepsis, inflamación renal, glomerulonefritis, glomerulonefritis progresiva rápida, glomerulonefritis proliferativa, nefropatía diabética, nefropatía obstructiva, necrosis tubular aguda y glomeruloesclerosis difusa, lupus eritematoso sistémico, bronquitis crónica, enfermedad de Behget, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aterosclerosis prematura después de la enfermedad de Kawasaki, infarto de miocardio, obesidad, enfermedad hepática crónica, enfermedad de Peyronie, lesión de médula espinal aguda, trasplante de pulmón o riñón, miocarditis, enfermedad de Alzheimer y neuropatía, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, hamartoma, carcinoma colorrectal, adenoma colónico, pancreatitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades intestinales inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa.
- 35 20. Un complejo que comprende una quimiocina y un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3, en donde preferiblemente el complejo es un complejo cristalino.
- 40 21. El uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la detección *in vitro* de una quimiocina, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que consiste en eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.
22. Un método para el escrutinio de un antagonista de quimiocina o de un agonista de quimiocina que comprende los pasos siguientes:
- 45 - proporcionar un antagonista de quimiocina candidato y/o un agonista de quimiocina candidato,
- proporcionar un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,
- proporcionar un sistema de ensayo que provea una señal en presencia de un antagonista de quimiocina y/o de un agonista de quimiocina, y
- 50 - determinar si el antagonista de quimiocina candidato es un antagonista de quimiocina y/o si el agonista de quimiocina candidato es un agonista de quimiocina,
- en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.
23. Un método para el escrutinio de un agonista de quimiocina y/o de un antagonista de quimiocina que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una quimiocina inmovilizada a una fase, preferiblemente una fase sólida,
 - proporcionar un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, preferiblemente un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que está marcado,
 - añadir un agonista de quimiocina candidato y/o un antagonista de quimiocina candidato, y
- 5 - determinar si el agonista de quimiocina candidato es agonista de quimiocina y/o si el antagonista de quimiocina candidato es antagonista de quimiocina,

en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

24. Un kit para la detección de una quimiocina que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la quimiocina se selecciona del grupo que comprende eotaxina, MCP-1, MCP-2 y MCP-3.

25. Un método para la detección del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en una muestra, en donde el método comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;
- b) proporcionar una sonda de captura, donde la sonda de captura es al menos parcialmente complementaria a una primera parte del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y una sonda de detección, donde la sonda de detección es al menos parcialmente complementaria a una segunda parte del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o, alternativamente, la sonda de captura es al menos parcialmente complementaria a una segunda parte del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y la sonda de detección es al menos parcialmente complementaria a la primera parte del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;
- c) dejar que la sonda de captura y la sonda de detección reaccionen bien simultáneamente o bien secuencialmente en cualquier orden con el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o con una parte del mismo;
- d) opcionalmente detectar si la sonda de captura se hibrida o no con el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 proporcionado en la etapa a); y
- e) detectar el complejo formado en la etapa c) que consiste en el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y la sonda de captura y la sonda de detección.

26. El método según la reivindicación 25, en donde la sonda de detección comprende un medio de detección, y/o en donde la sonda de captura puede inmovilizarse sobre un soporte, preferiblemente sobre un soporte sólido.

27. El método según la reivindicación 25 ó 26, en donde cualquier sonda de detección que no forme parte del complejo es eliminada de la reacción de tal modo que en la etapa e) solo se detecte una sonda de detección que forme parte del complejo.

28. El método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en donde la etapa e) comprende la etapa de comparar la señal generada por el medio de detección cuando se hibridan la sonda de captura y la sonda de detección en presencia del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o de una parte del mismo, y en ausencia de dicho ácido nucleico o parte del mismo.

29. El método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en el que el ácido nucleico que va a ser detectado es el ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico según las SEC ID N°: 37, 116, 117 ó 278, y la sonda de captura o la sonda de detección comprenden una secuencia de ácido nucleico según la SEC ID N°: 255 ó la SEC ID N°: 256.

Tipo 1A

	AGCGUG	CCCCGA	GUG	GCA	GGGGACGGGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	Longitud (nt)	Bajar	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀ [nM]
169-B1trc	AGCGUG	CCCCGA	GUG	GCA	GGGGACGGGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	47	>> E10trc	8
169-F3trc	AGCGUG	CCCCGA	GUG	GCA	GGGGACGGGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	45	>> E10trc	10
169-C1trc	AGCGUG	CCCCGA	GUG	GCA	GGGGACGGGACC	UGUAUUAUG	CACGCU	47	>> E10trc	
169-A3trc	AGCGUG	CCCCGU	GUG	GCA	GGGGACGGGACC	UGCAUUAUG	CGCGCU	47	>> E10trc	
169-B2trc	AGCGUG	CCCCGA	GUA	GCA	GGGGGGCCGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	47	>> E10trc	
176-B12trc	AGCGUG	CCCCGU	GUG	GUA	GGGGGGCCGGAUC	UACAAUUG	CACGCU	45	>> E10trc	
176-D9trc	AGCGUG	CCCCGU	GUG	ACA	GGGGGGCCGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	45	>> E10trc	
176-B10trc	AGCGUG	CCCCGU	GUG	GCA	GGGGGGCCGACC	UGUAUUAUG	CACGCU	45	>> E10trc	
169-F2trc	AGCGUG	CCCCGA	GUG	GCA	GGGGGGCCGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	47	> E10trc	14
176-B9trc	AGCGUG	CCCCGU	GUG	GCA	GGGGGGCCGACC	UGCAUUAUG	CACGCU	45	> E10trc	
176-H9trc	AGCAUG	CCCCGU	GUG	GCA	GGGGGGCCGACC	UGCAUUAUG	CAUGCU	45	> E10trc	
176-E10trc	AGCGUG	CCCCGU	GUG	GUA	GGGGGGCCGACC	UACAAUUAUG	CACGCU	45	> 5 nM	4-5

Cuadros B1A B2 B3 B4 B5 B6 B1B

> E10trc, enlace más débil que 176-E10trc como se determina en el ensayo de competencia
 >> E10trc, enlace mucho más débil que 176-E10trc como se determina en el ensayo de competencia

FIG. 1

Tipo 1B

	AGUGUG	CCAGCU	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CACACU	Longitud (nt)	Bejar	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀ [nM]
176-G9trc	AGUGUG	CCAGC	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CACACU	44	> C9trc	
176-F9trc	AGUGUG	CCAGC	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CACACU	43	> C9trc	6
176-C11trc	AGUGUG	CGAGC	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CAUACU	43	> C9trc	
176-E11trc	AGUGUG	CCAGC	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CAUACU	43	> C9trc	
176-D10trc	AGUAUC	CCAGC	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUA	CAUACU	42	> C9trc	30
176-H10trc	AGUGUG	CCAG U	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CACACU	43	= C9trc	6
176-C9trc	AGCGUG	CCAG U	GUG AUG	GGGGGGCGGACC	CAUUUUA	CACGCU	43	= C9trc 5 nM	4-5
Cuadros	B1A	B2	B3 B4	B5	B6	B1B			

= C9trc, enlace similar a 176-C9trc como se determina en el ensayo de competencia
 > C9trc, enlace más débil que 176-C9trc como se determina en el ensayo de competencia

FIG. 2

Tipo 2

	Longitud (nt)	Bajar	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀	Quimiotaxis en IC ₅₀
180-B1-001	43	> D1-002		
180-A4-002	43	> D1-002		
180-D1-002	43	0.7 nM	5 nM	< 1 nM

CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCGU
CCUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCGC
CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCGU
B1A	B1B
B2	

Derivados de 180-D1-002

	Longitud (nt)	Bajar	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀	Quimiotaxis en IC ₅₀
180-D1-011	41	= D1-002	5 nM	1.2 nM
180-D1-012	41	= D1-002	6 nM	2.6 nM
180-D1-018	39	> D1-002	<10 nM	2 nM
180-D1-034	42	> D1-002		
180-D1-035	41	= D1-002		
180-D1-036	40	= D1-002	3-4 nM	0.5 nM

CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCGU
CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGC
CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGC
CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCGU
CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCG
CGUCCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCCGGGCUC	UGCG
B1A	B1B
B2	

= D1-002, enlace similar a 180-D1-002 como se determina en el ensayo de competencia
 > D1-002, enlace más débil que 180-D1-002 como se determina en el ensayo de competencia

FIG. 3

Tipo 3

	B2A	B3	B2B	B4	B5A	B6	B5B	B1B	Longitud (nt)	Bajar	Quimiotaxis en IC ₅₀ [nM]
178-A8	GUAAG	GGAAG	ACUAC	CUAAUGA	CAGC	GAAAU	GCUG	GCAGCAC	49	> 178-D5	
178-F7	GUAGU	GGAAG	ACUAC	CUAAUGA	CAGC	CUAAU	GCUG	GCAGCAC	49	> 178-D5	
178-G7	GUAGU	GGAAG	ACUAC	CUAAUGA	CAGC	CGAAU	GCUG	GCAGCAC	49	> 178-D5	
178-C6	GUAGU	GAAA	ACUAC	UGCCAGUG	GGU	CAGA	GCUA	GCAGCAC	48	> 178-D5	
178-E7	GUAGU	UAAAA	ACUCC	CUAAGACA	GGC	CAGA	GCCG	GCAGCAC	48	> 178-D5	
178-G6	GGAGU	UGAAA	ACUAC	CUAAGACA	GGC	CAGA	GCCG	GCAGCAC	48	> 178-D5	
178-A7	GUAGU	GGAAG	ACUAC	CUAUGA	CAGC	CUAAU	GCUG	GCAGCAC	48	> 178-D5	
178-C7	GGAGU	UAAAA	ACUCC	CUAAGACA	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	> 178-D5	
178-E5	GGCGU	GAAA	ACGCC	CUGCGA	CUGC	CCUUUAU	GCCG	GCAGCAC	48	= 178-D5	
181-F1	GUAGU	GAAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	= 178-D5	
181-B2	CUAGU	GAAAG	ACUAC	CUGUGA	CAGC	CGAAU	GCUG	GCAGCAC	48	= 178-D5	
181-C2	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	= 178-D5	
178-A6	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	= 178-D5	0.5
178-D6	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	0.5 nM	
178-D5	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	0.5 nM	0.5
181-A2	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48	0.1 nM	0.5

= 178-D5, enlace similar a 178-D5 como se determina en el ensayo de competencia
 > 178-D5, enlace más débil que 178-D5 como se determina en el ensayo de competencia

FIG. 4

Derivados de 178-D5 y 181-A2

	GGCUGC	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAGCGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGGC	Longitud (nt)	Bajar	Biacore
178-D5-020	GGCUGC	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAGCGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGGC	46	1.5 nM	
178-D5-027	GGCGG	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAGCGACU	GGC	UAGA	GCCG	GGCGG	44	27 nM	
178-D5-030	GUGGG	GUAGU	UAAAA	ACUAC	CAGCGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGCAC	46	= 178-D5	
181-A2	GUGCUGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGCAC	48		0.37 nM
181-A2-002	GUGGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGCAC	46		= 181-A2
181-A2-004	GUGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GGCAC	44		= 181-A2
181-A2-005	GUGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCCAC	44		= 181-A2
181-A2-006	GUGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGAC	44		= 181-A2
181-A2-007	UGCGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGCA	44		= 181-A2
181-A2-008	UGCGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGC	44		> 181-A2
181-A2-011	GCUGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGC	44		> 181-A2
181-A2-012	GGUGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAGC	44		> 181-A2
181-A2-015	UGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCCCA	42		> 181-A2
181-A2-016	GCGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGC	42		> 181-A2
181-A2-017	GUGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAC	42		= 181-A2
181-A2-018	GGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCCC	42		= 181-A2
181-A2-019	GAGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCUC	42		= 181-A2
181-A2-020	CGGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCCG	42		= 181-A2
181-A2-021	CCGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGG	42		= 181-A2
181-A2-022	CAGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCGG	42		> 181-A2
181-A2-023	CUGC	GUAGU	GAGAA	ACUAC	CAACGACU	GGC	UAGA	GCCG	GCAG	42		= 181-A2
Cuadros	B1A	B2A	B3	B2B	B4	B5A	B6	B5B	B1B			

= 178-D5, enlace similar a 178-D5 como se determina en el ensayo de competencia
 = 181-A2, enlace similar a 181-A2 en la medición Biacore
 > 181-A2, enlace más débil que 181-A2 en la medición Biacore

FIG. 5

Tipo 4

184-B8trc
 184-C6trc
 184-H5trc
 184-A7trc
 174-D4-004
 166-A4-002
 187-A5trc
 187-A5-001
 187-A5-002
 187-H5trc
 187-H5-002
 187-H5-003
 187-H5-004

AGCGUGUU
 AGCGUGUU
 AGCGUGAU
 AGCGUGUU
 CCGCUU
 GCGCGAG
 AGCGUGUU
 CGUGUU
 GUGUU
 AGCGUGUU
 CGUGUU
 GUGUU
 UGUU
 B1A

AGUGAAGUGGGUGGCAGGUAAAG
 AGCGUGUGGGUGGUAGGUAAAG
 AGAAGACGGGUGGUAGGUAAAG
 AGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 CAGGU-GGGUGGUAGAAUGUAAAGA
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 AGGU-GGGUGGUAGUAAAGUAAAG
 B2

GACACGCU
 GCCACGCU
 GUCAGGCU
 GACACGCU
 GGGCGG
 CUCGGGUC
 GACACGCU
 GACACG
 GACAC
 GGCACGCU
 GGCACG
 GGCAC
 GGCA
 B1B

Longitud (nt)	Bajar [nM]	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀ [nM]	Quimiotaxis en IC ₅₀ [nM]
39	48		
39	56		
39	69		
39	29		
34	2-4	2-5	2
39		3-5	
38	20		
34	23		
32	26		
38	16		
34	15		
32	17		
30	40		

Cuadros

FIG. 6

Otras secuencias

	Longitud (nt)	Bajar	Biacore	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀	Quimiotaxis en IC ₅₀
177-B3	52	12 nM	> 178-D5		
177-C1	52	> 178-D5			
177-C2	52	9	> 178-D5		
177-E3	51	> 178-D5			
177-D1	50	> 178-D5			
177-E1	50	> 178-D5			
177-A1	50	> 178-D5			
177-G3	50	5 nM	> 178-D5		
177-C3	50	5 nM	> 178-D5		
177-A2	50	13 nM	> 178-D5		
170-E4trc	48			20 nM	
166-D2trc	48			+	
174-A2trc	48			+	
174-E2trc	48			+	
183-G3trc	48	2-5 nM		2-3 nM	+
183-B2trc	48	5-10 nM		2-6 nM	+
166-B2trc	48	25 nM		2-15 nM	
166-G3trc	47			+	
166-D1trc	47			+	
183-H2trc	45	2-5 nM		10 nM	
167-A7trc	45		180 nM	150 nM	
167-C7trc	45		5 nM	+	
167-B5trc	44			+	
184-D7trc	39	800 nM			
184-D6trc	39	650 nM			
184-E5trc	39	100 nM			
184-G6trc	39	160 nM			
184-B7trc	39	27 nM			
184-B6trc	37	60 nM			

+, sustancia activa en ensayo; no se determinó la IC₅₀

> 178-D5, enlace más débil que 178-D5 como se determina en el ensayo de competencia

FIG. 7

Spiegelmers Específicos de Murino

188-A3-001 y Derivados

188-A3-001	GAGAUAGGGACAAUUGGUUGGCAUUGAGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAAUUCGCGGGCAUUC				
188-A3-004	GAUGGGACAAUUGGUUGGCAUUGAGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAAUUCGCGGGCAUUC				
188-A3-005	GGCGACAUUGGUUGGCAUUGAGGCGAGGCCUUUGAAUUCGCGGGCAUUC				
188-A3-006	GGCGACAUUGGUUGGCAUUGAGGCGAGGCCUUUGAAUUCGCGGGCAUUC				
188-A3-007	GGCGACAUUGGUUGGCAUUGAGGCGAGGCCUUUGAAUUCGCGGGCAUUC				
= mNOX-E36					
		Longitud (nt)	Bajar	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀ [nM]	Quimiotoxicidad en IC ₅₀ [nM]
		58	< 1 nM		
		56	< 1 nM		
		53	< 1 nM		
		52	< 1 nM	12	4
		50	~0.2 nM	12	7

189-G7-001 y Derivados

189-G7-001	GCUGGUUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAGC				
189-G7-002	CUGGUUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAG				
189-G7-003	UGGUUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAG				
189-G7-007	GCCGGUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAG				
189-G7-008	GCCGGUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAG				
189-G7-010	GCGGUUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAG				
189-G7-012	GGGCUUACCGAGGGGGCGUCGUGGAGUUUGGUUGGUUUGUACCCAG				
		Longitud (nt)	Bajar	Ensayo de Ca ⁺⁺ en IC ₅₀ [nM]	Quimiotoxicidad en IC ₅₀ [nM]
		48	< 1 nM	20-30	
		46	< 1 nM	40-50	6.5
		44	< 1 nM		
		48		20	
		48	~ 1 nM	12	5
		46		40	
		46		> 50	

FIG. 8

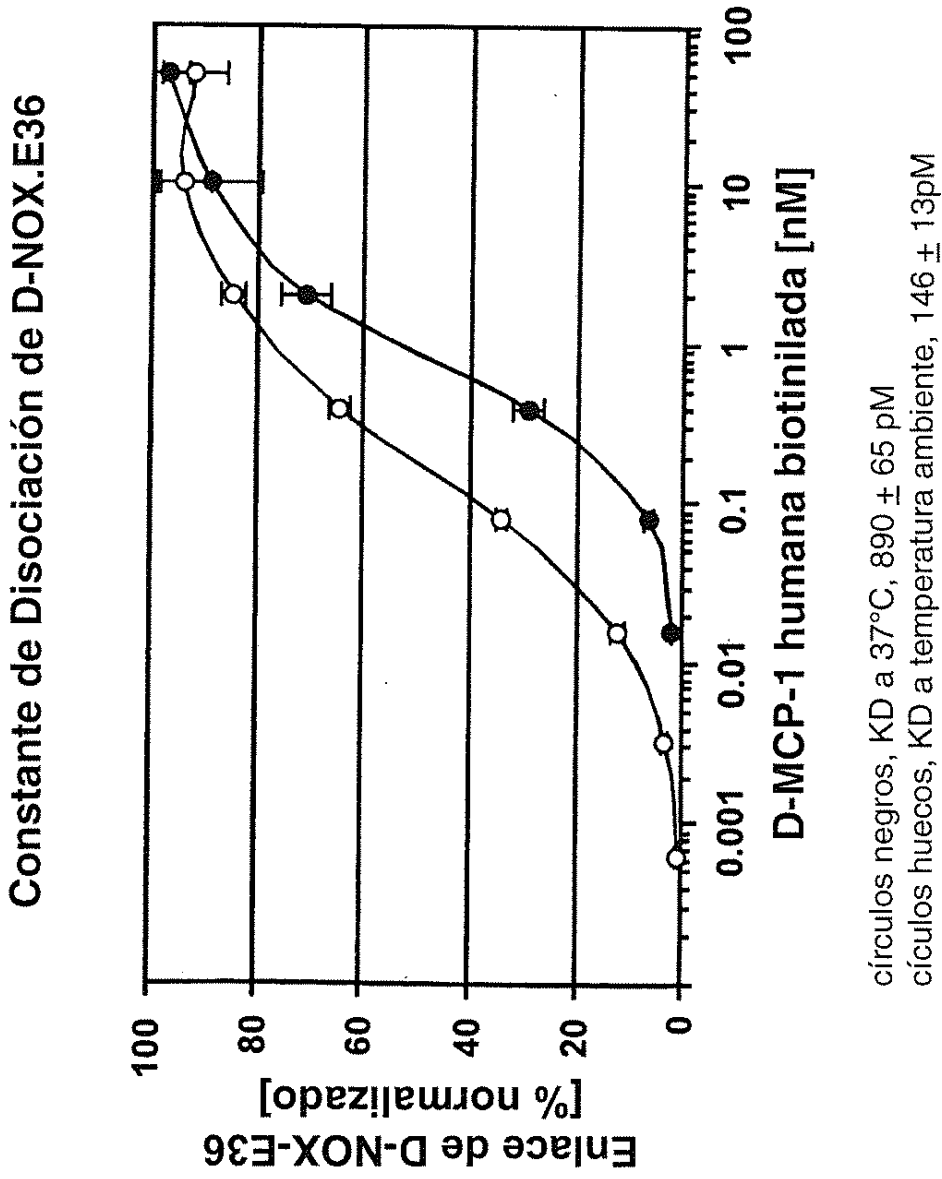


FIG. 9

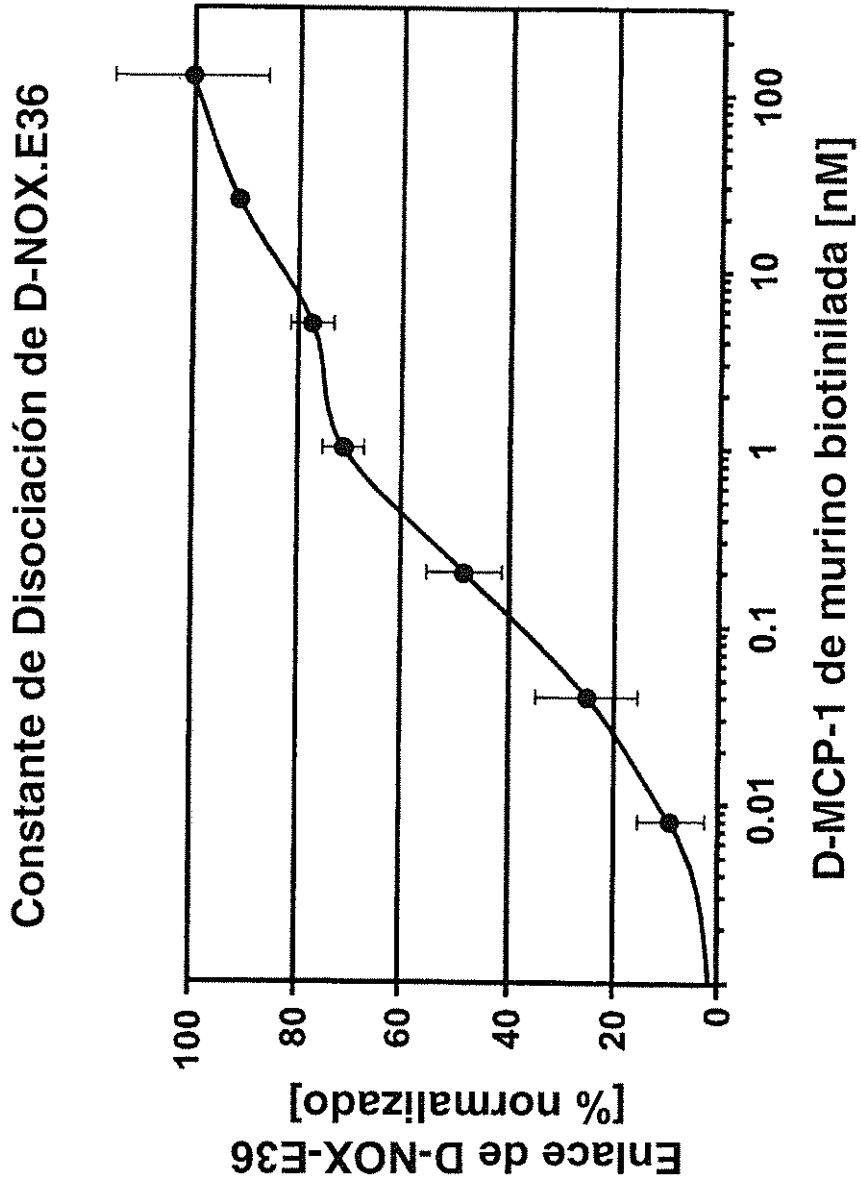


FIG. 10

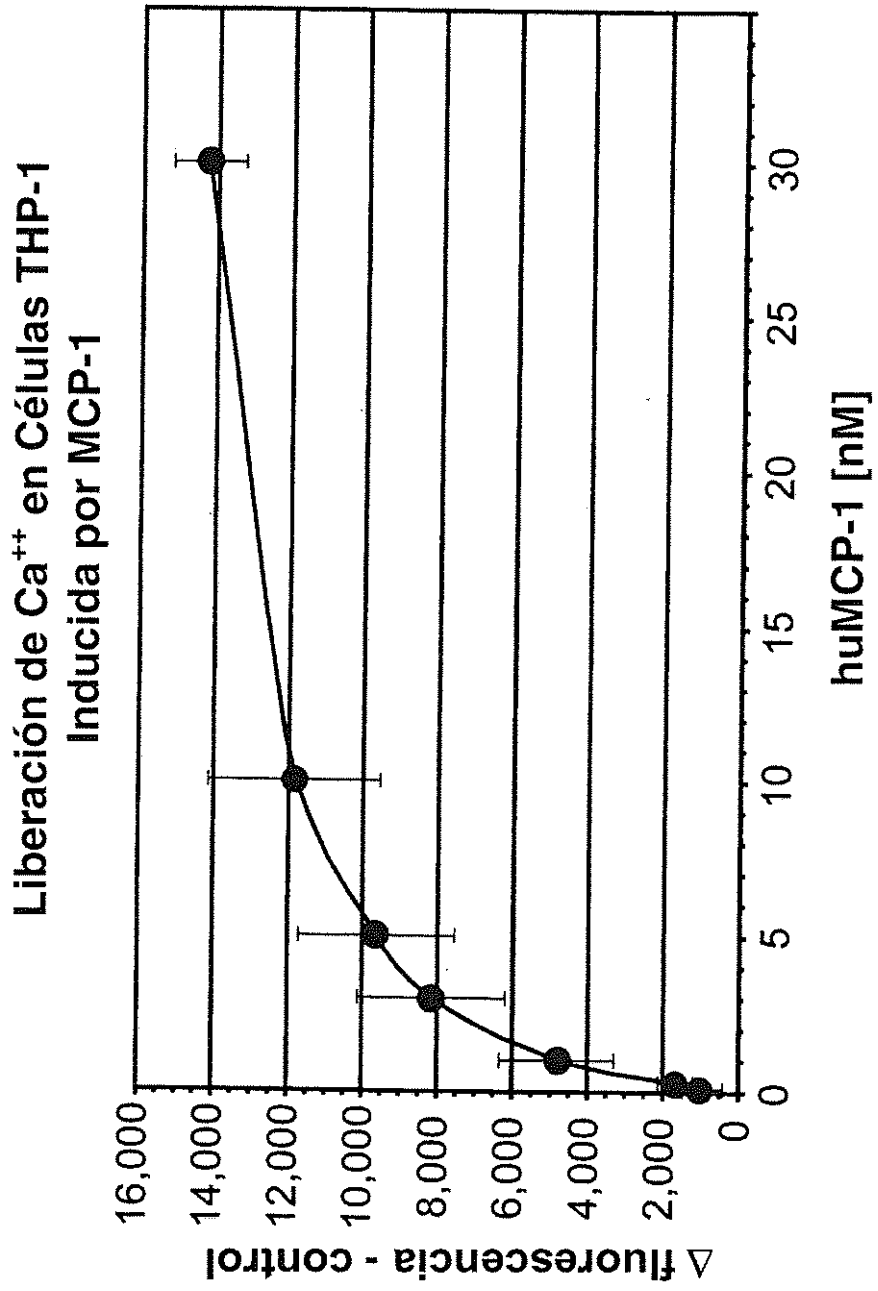


FIG. 11

NOX-E36: Ensayo de Liberación de Ca^{++} con Células THP-1

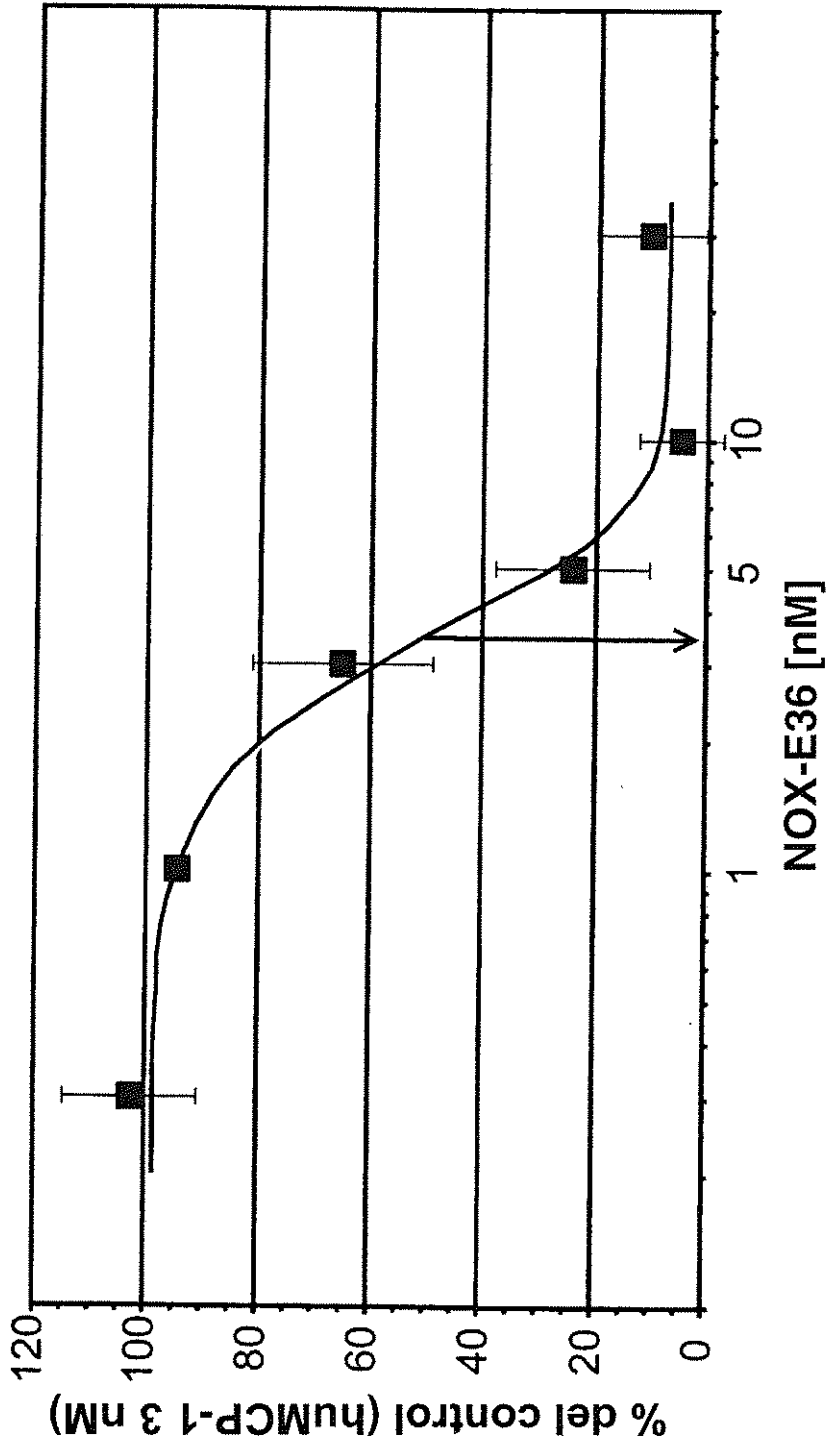


FIG. 12

mNOX-E36: Ensayo de Liberación de Ca^{++}
con Células THP-1

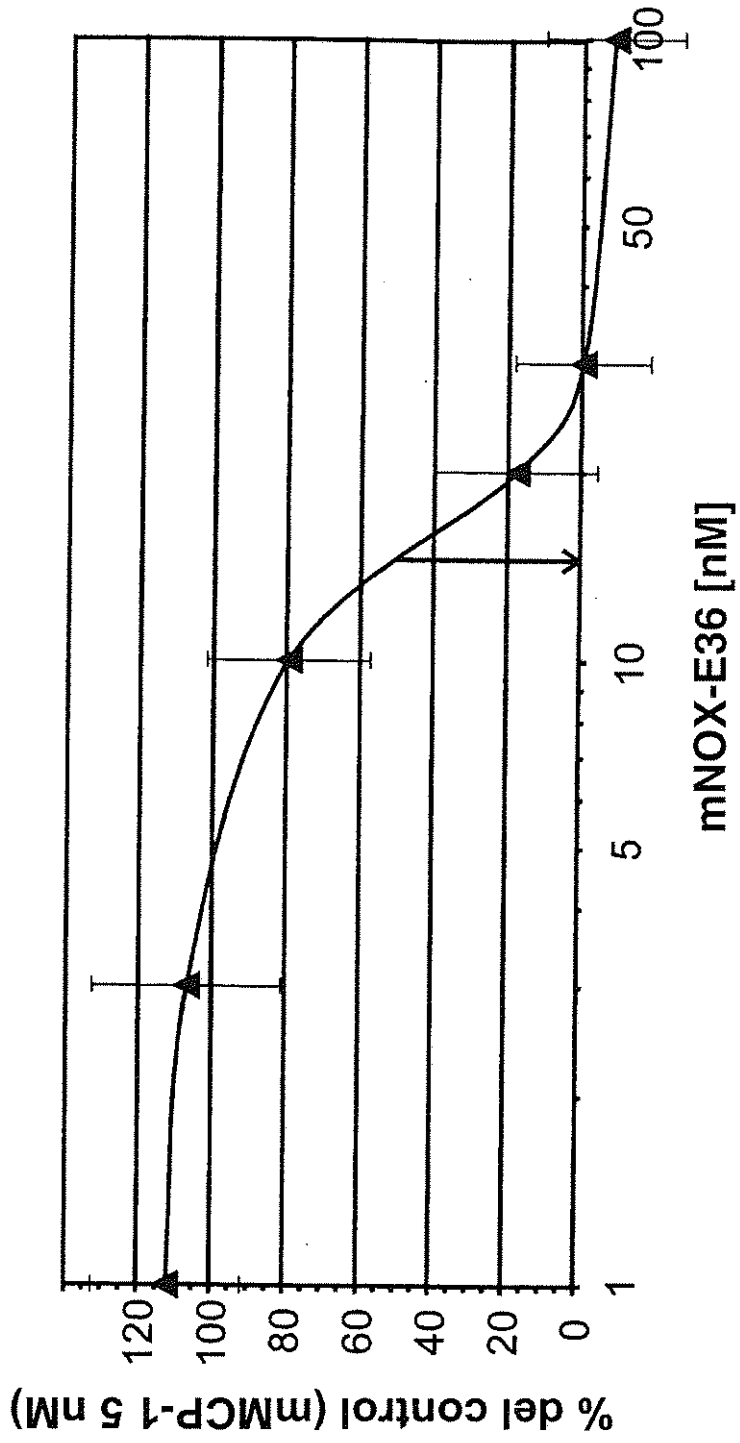


FIG. 13

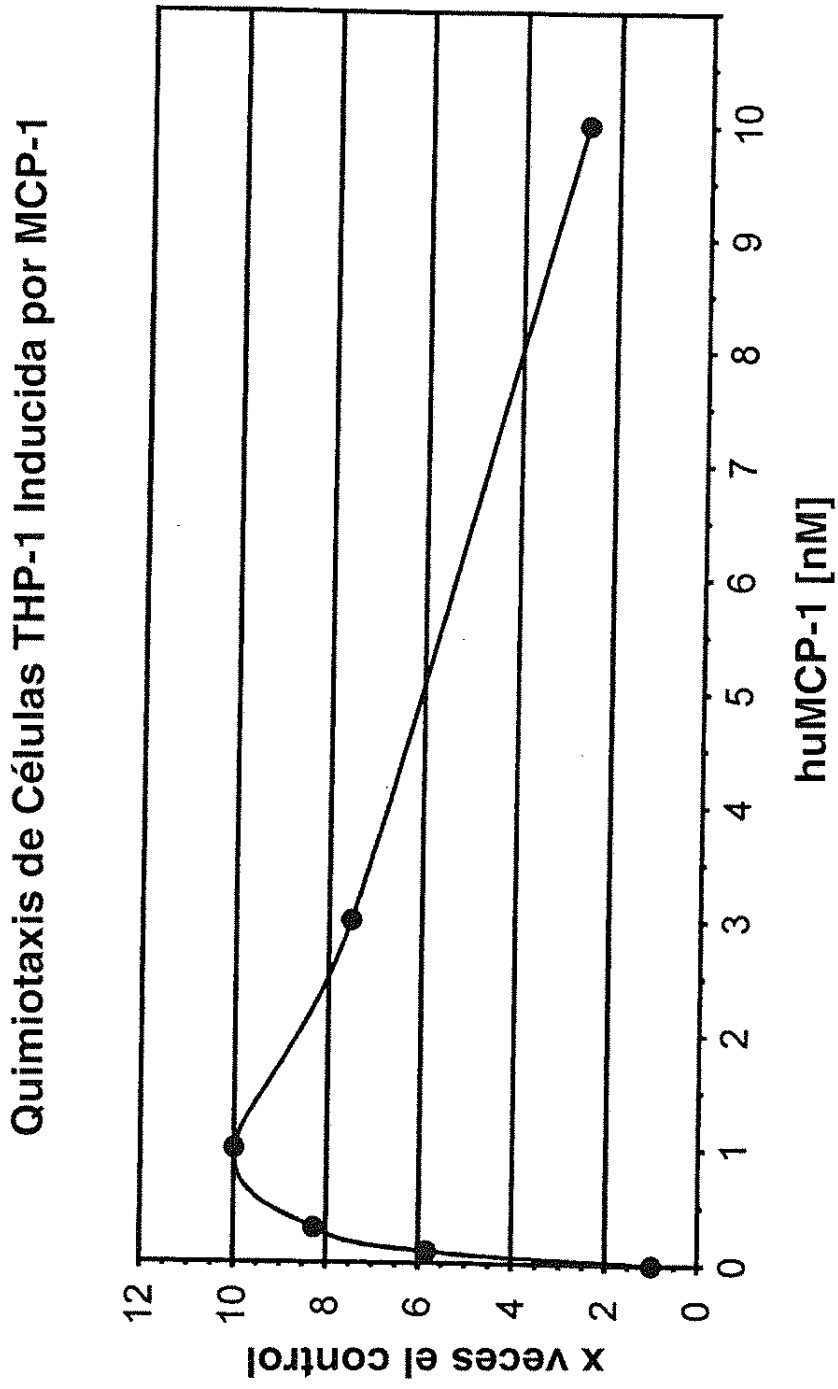


FIG. 14

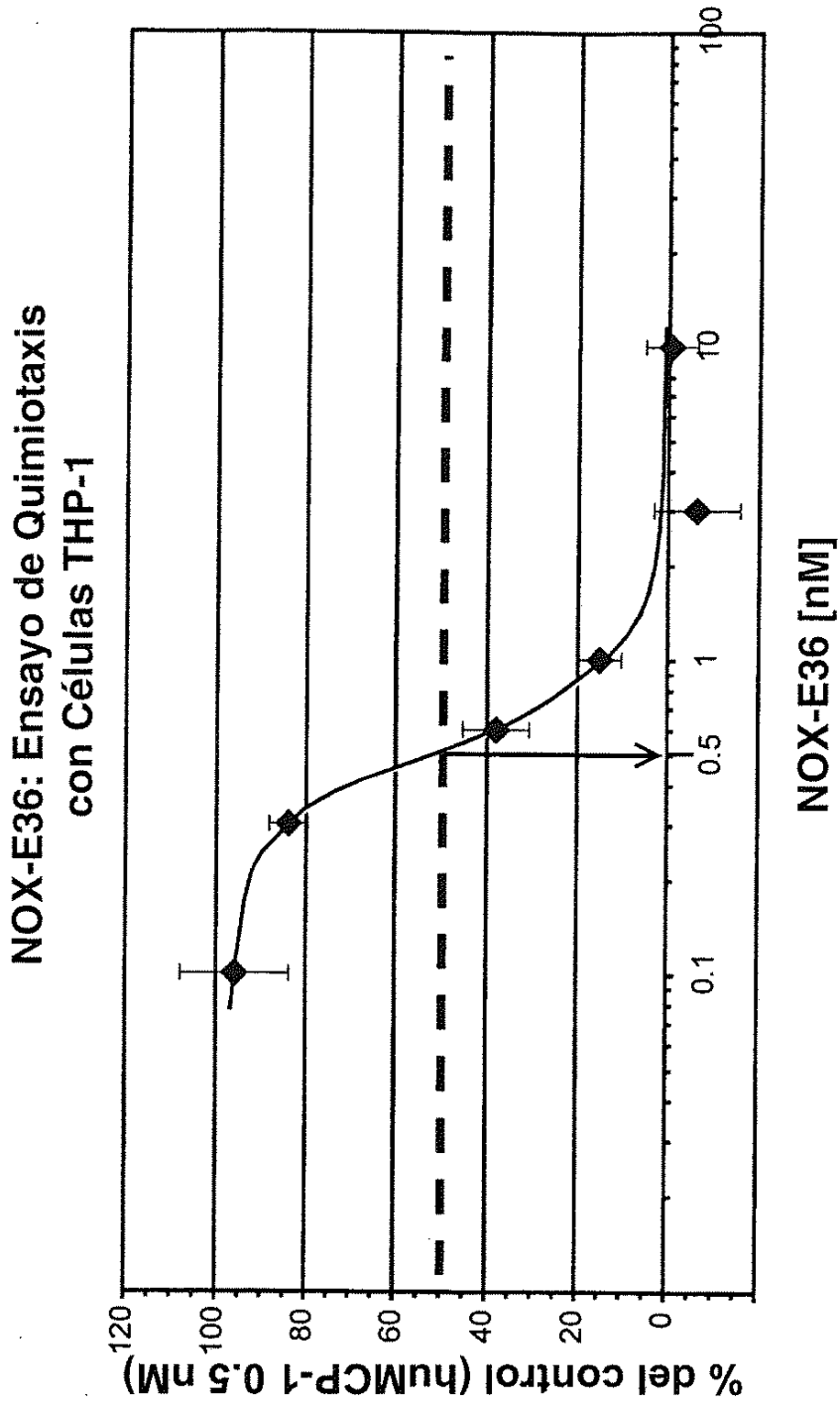


FIG. 15

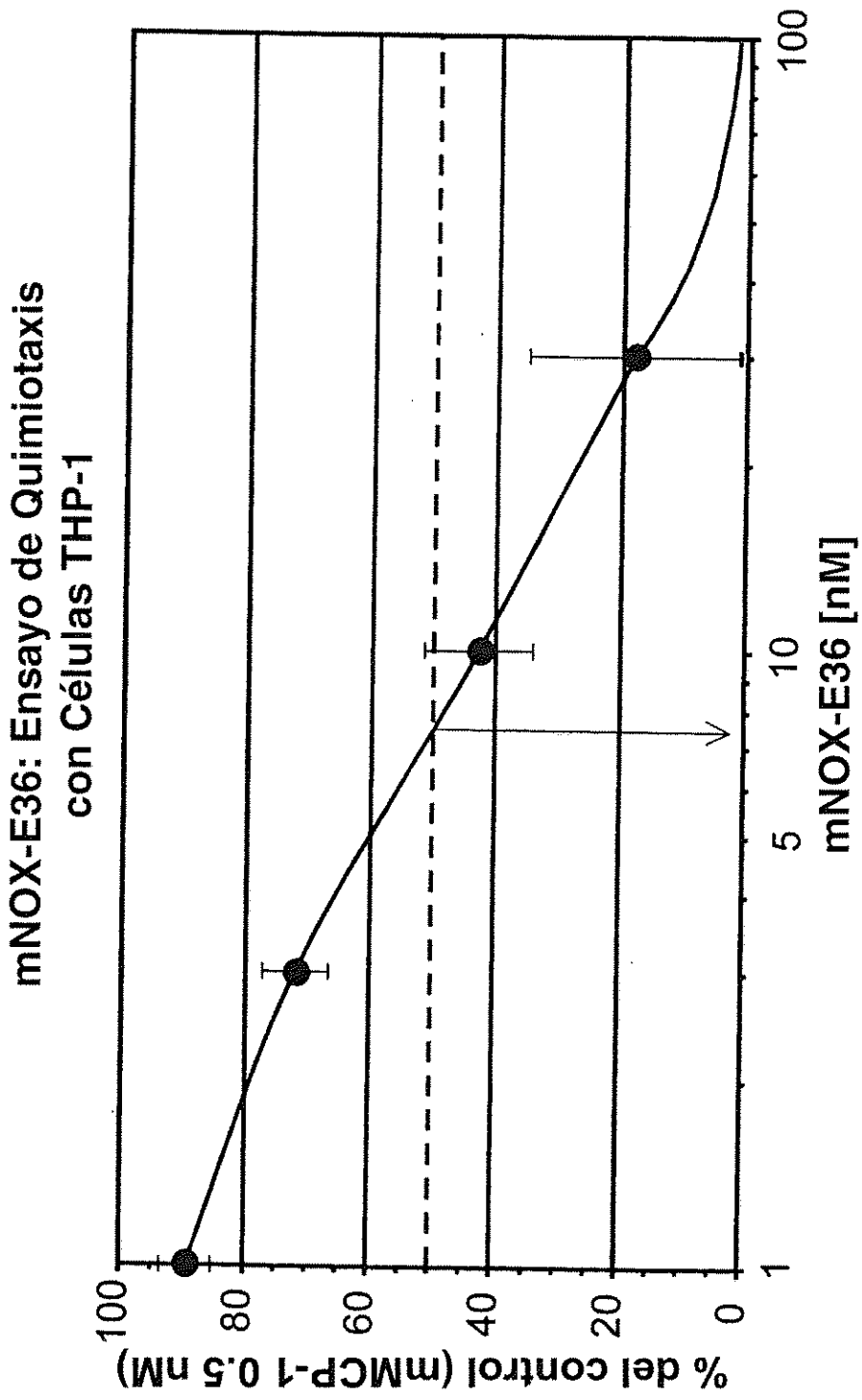
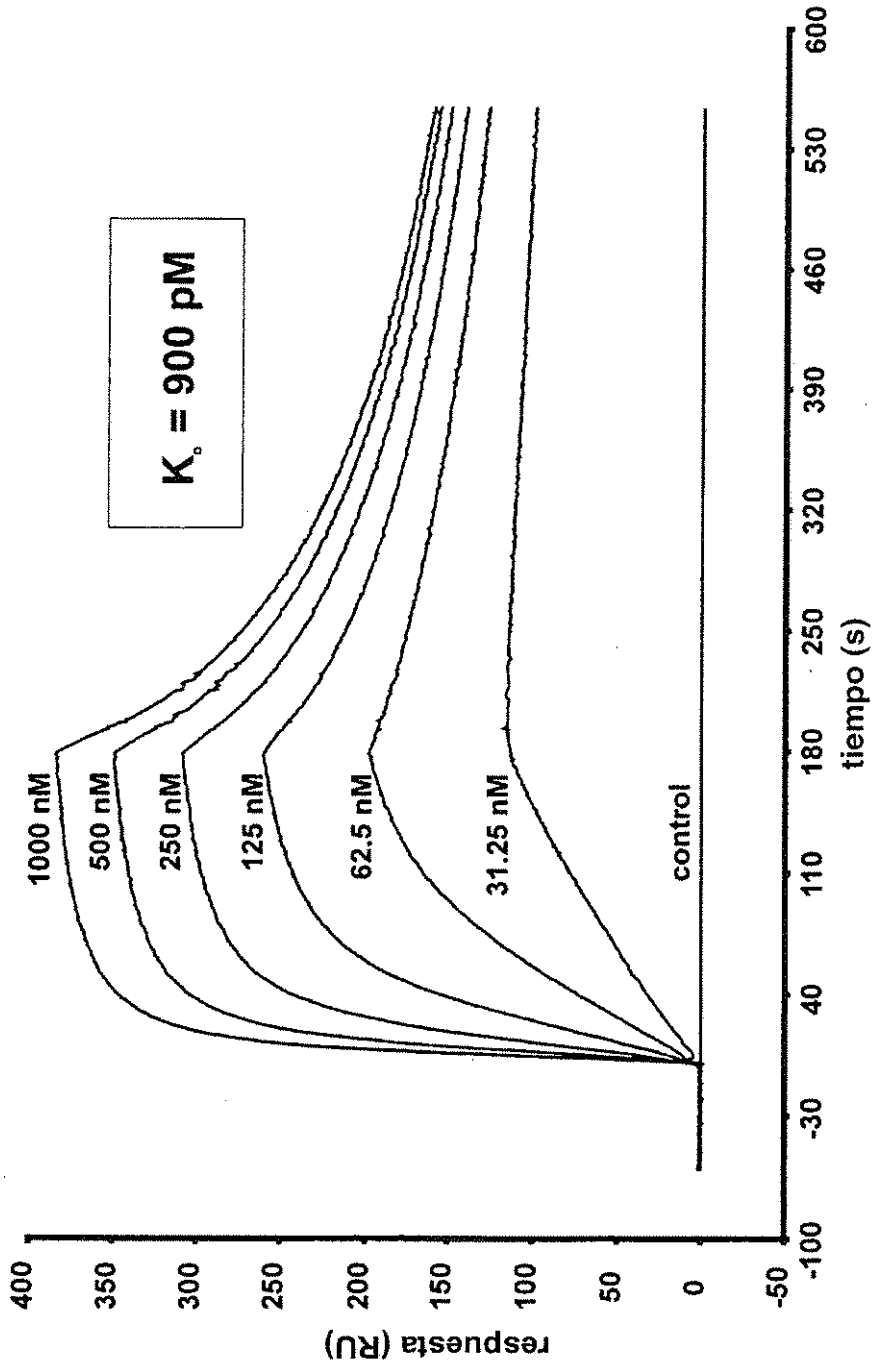
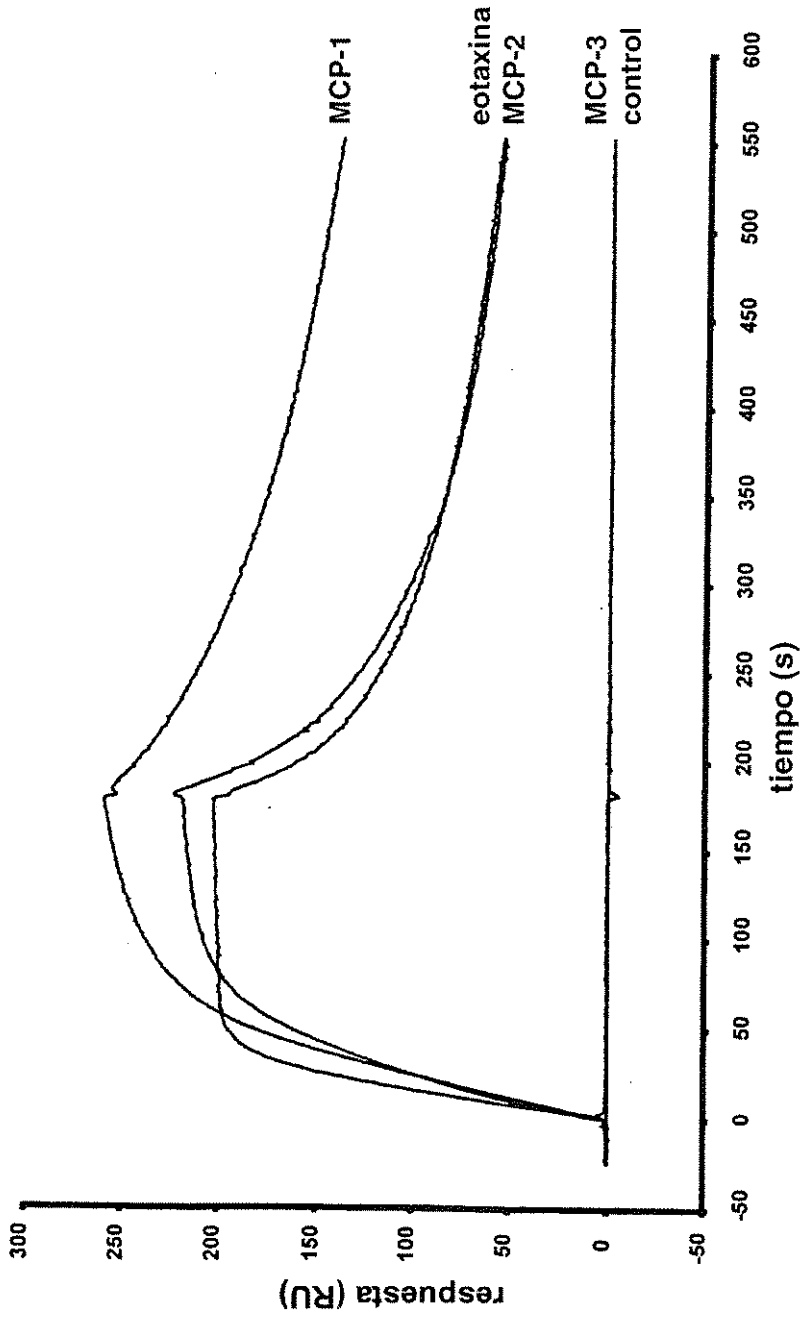


FIG. 16



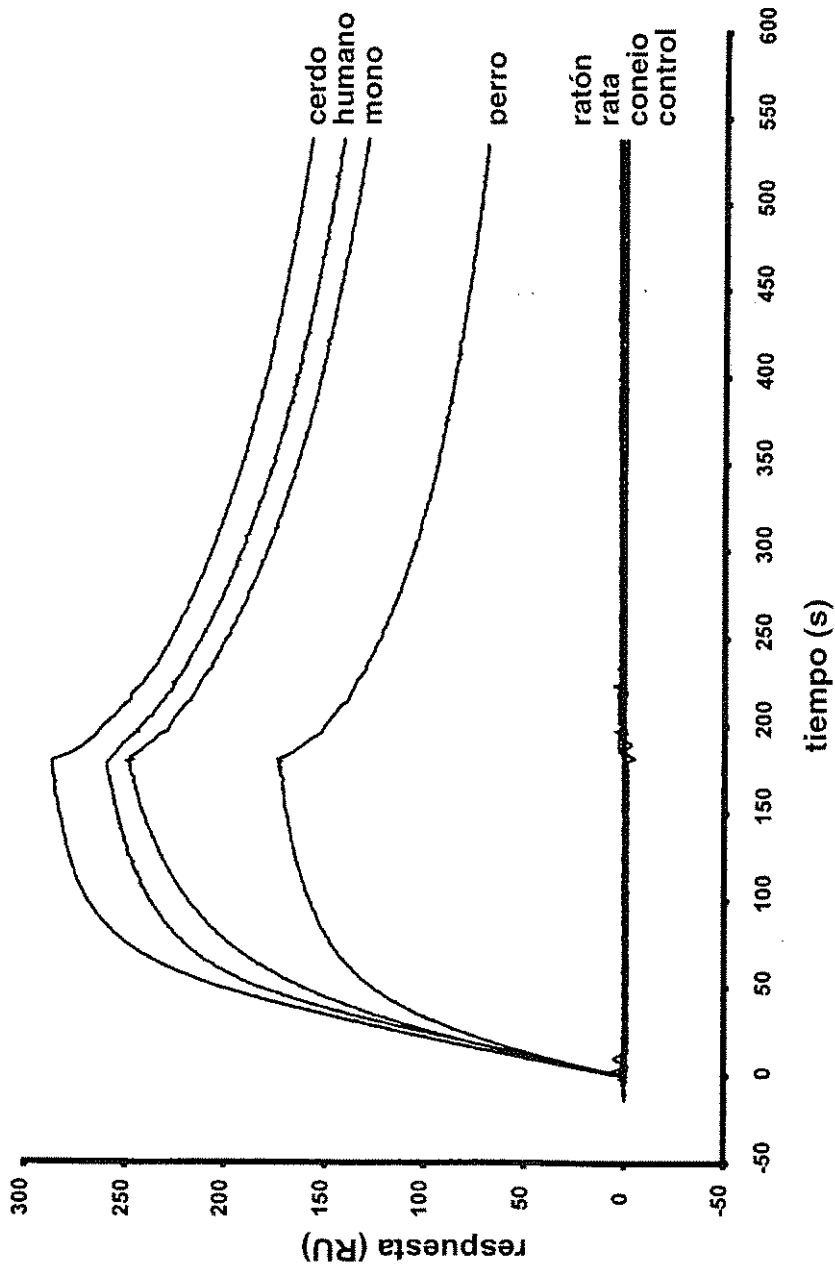
Cinética del Enlace Spiegelmer NOX-E36 con MCP-1 Humana

FIG. 17



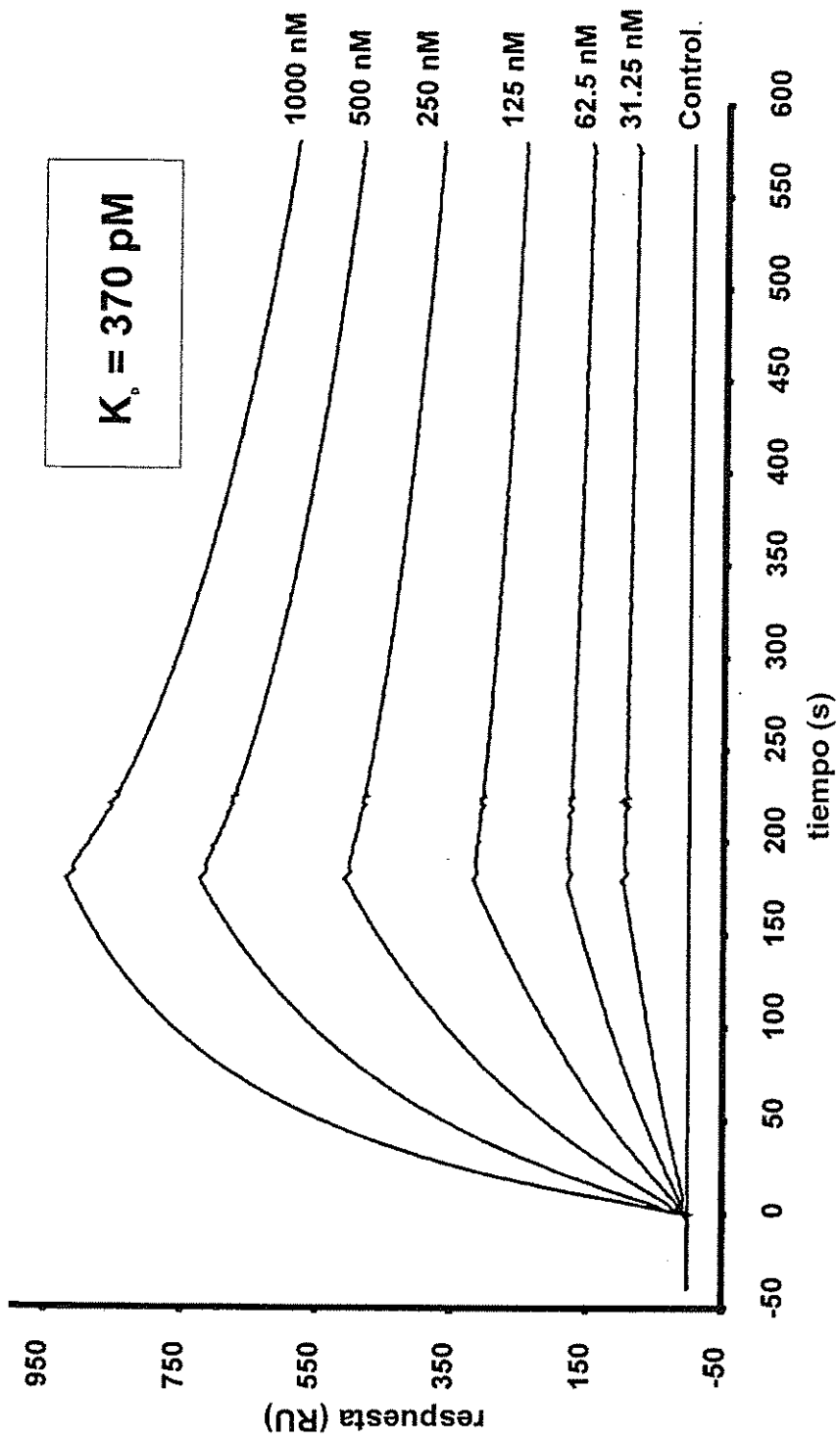
Enlace Spiegelmer NOX-E36 con las Proteínas de la Familia MCP Humana y Eotaxina

FIG. 18



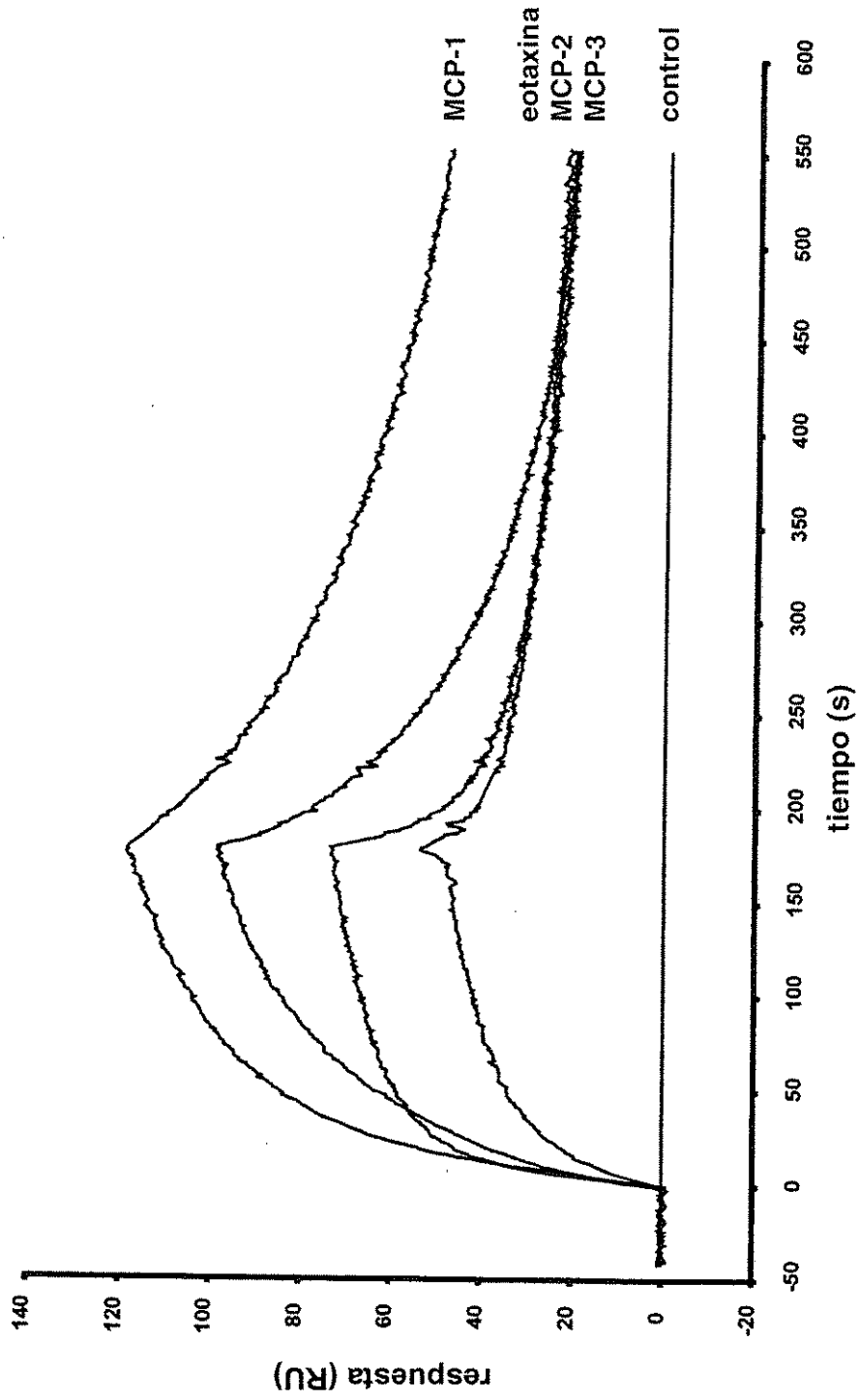
Enlace Spiegelmer NOX-E36 con MCP-1 de Diferentes Especies

FIG. 19



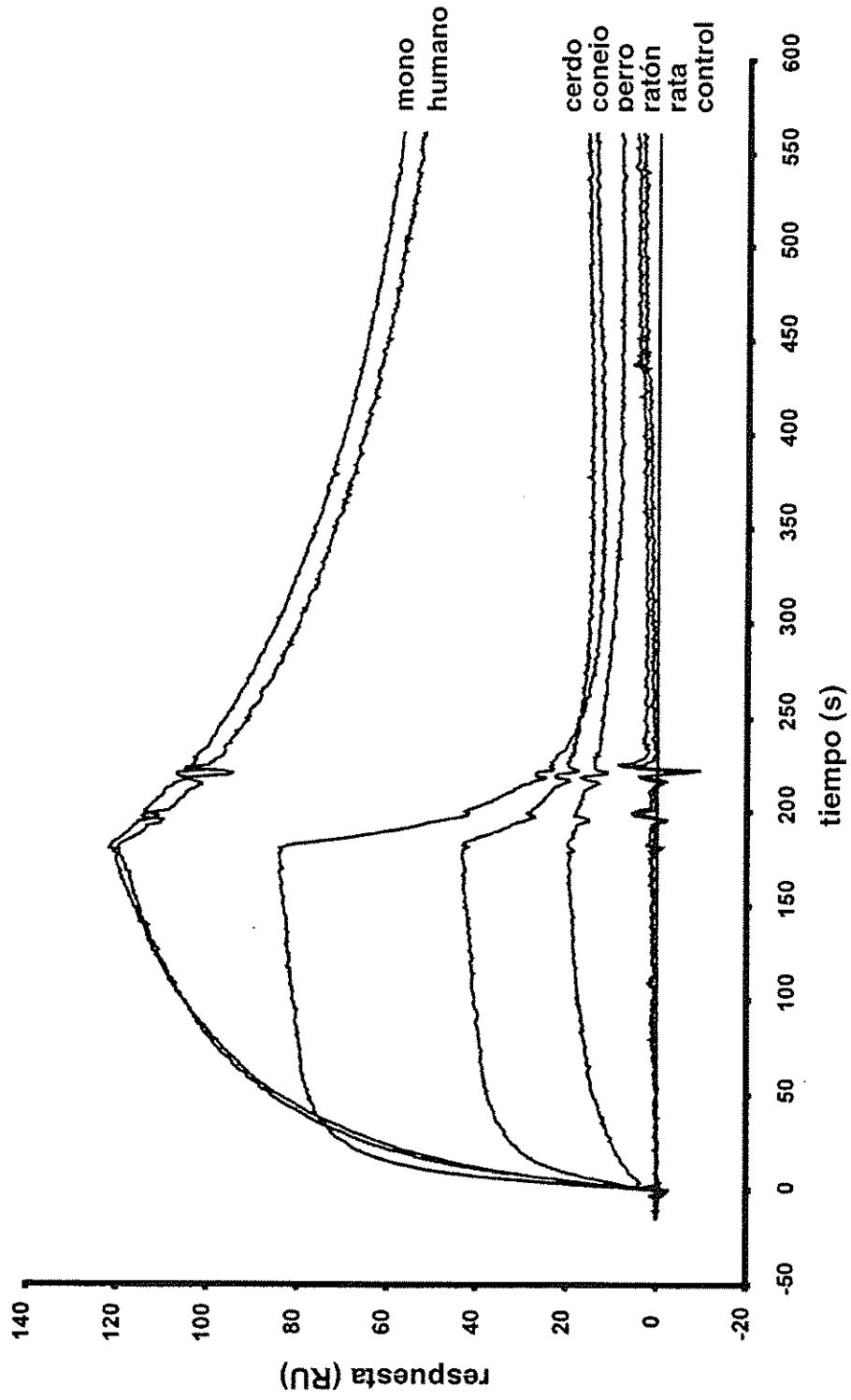
Cinética del Enlace Spiegelmer 181-A2-018 con MCP-1 Humana

FIG. 20



Enlace Spiegelmer 181-A2-018 con Proteínas de la Familia MCP-1 Humana y Eotaxina

FIG. 21



Enlace Spiegelmer 181-A2-018 con MCP-1 de Diferentes especies

FIG. 22

1 QPDAINAPVTCYNTNRKISVQRLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKTI
2 QPDAINAPVTCYNTNRKISVQRLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQIQTPKP
3 QPDAINSPVTCCTYLTSSKISMQRLMSVRRVTSKCPKEAVIFKTIAGKEICAEPKQKWVQDSISHLDDKKNQTPKP
4 QPDAINSPVTCCTYFTGKKISSQRLGSKRVTSKCPKEAVIFKTIILAKEICADPEQKWVQDAVKQLDKKAQTPKP
5 QPDAIISPVTCCYTLTNKKISIQRLASVRRITSSKCPKEAVIFKTVLNKEICADPKQKWVQDSMAHLDDKKSQTQTA
6 QPDAVNSPVTCCYFTTNKTIISVKRLMSVRRINSTKCPKEAVIFMTKLAKGICADPKQKWVQDAIANLDDKMQTPKT
7 QPDAINSQVACCYTFNSKKISMQRLMNRRVTSKCPKEAVIFKTIILGKELCADPKQKWVQDSINYLNKKNQTPKP
8 QPVGINSTTCCYRFINKKIPKQRLSYRRITSSHCPRVAVIFKTKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDDKKTQTPKL
9 GP--ASVPTTCCFNLANRKIPLQRLSYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICALPKKQKWVQDSMKYLDQKSPTPKP
10 QPDSVSIPIITCCFNVINRKIPIQRLSYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGEVCADPKERWVRDSMKHLDDQIFQNLKP
11 QPDAVNAPLTCYFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVFVTKLKREVCADPKKEWVQTYIKNLDRNQMRSEP
12 QPDAVNAPLTCYFTGKMI PMSRLENYKRITSSRCPKEAVFVTKLKREICADPNKEWVQYIRKLDQNQVRSET

Proteína	% de identidad con MCP-1 humano
MCP-1 de <i>Homo Sapiens</i>	100%
MCP-1 de <i>Macaca mulatta</i> (Mono Rhesus)	97%
MCP-1 de <i>Sus scrofa</i> (Cerdo)	79%
<i>Equus caballus</i> (Caballo)	78%
MCP-1 de <i>Canis familiaris</i> (Perro)	76%
MCP-1 de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	75%
<i>Bos Taurus</i> (Bovino)	72%
MCP-3 de <i>Homo Sapiens</i>	71%
Eotaxina de <i>Homo Sapiens</i>	64%
MCP-2 de <i>Homo Sapiens</i>	62%
MCP-1 de <i>Mus musculus</i> (Ratón)	55%
MCP-1 de <i>Rattus norvegicus</i> (Rata)	55%

FIG. 23

Especificidad de NOX-E36 y 181-A2-018

	NOX-E-06 K _D [nM]	181-A2-018 K _D [nM]
hMCP-1	0.89	0.37 – 0.6
hMCP-2	5 - 10	10
hMCP-3	-	10
eotaxina	5 - 10	10 – 20
MCP-1 mono	0.90	0.6
MCP-1 porcino	0.82	>1000
MCP-1 canino	1.2	>1000
MCP-1 conejo	-	>1000
MCP-1 rata	-	-
MCP-1 ratón	-	-

-, sin enlace

FIG. 24A

Quimiocina/sinónima enlace

CCL1/I-309	-
CCL2/MCP-1	+
CCL3/MIP-1 α	+
CCL4/MIP-1 β	-
CCL5/RANTES	.*
CCL7/MCP-3	-
CCL8/MCP-2	+
CCL11/eotaxina	+
CCL13/MCP-4	(+)
CCL14/HCC-1	-
CXCL1/GRO α	-
CXCL2/GRO β	-
CXCL3/GRO γ	-
CXCL4/PF4	..**
CXCL5/ENA-78	-
CXCL6/GCP-2	..**
CXCL7/NAP-2	+
CXCL8/IL-8	-
CXCL9/MIG	.*
CXCL10/IP-10	-
CXCL11/I-TAC	..**
CXCL12 α /SDF-1 α	-
CXCL12 β /SDF-1 β	-
CX ₃ CL1/Fractaquina	-
XCL1/Linfotactina	-

El enlace se clasificó como sigue:

+, enlace específico < 10nM;

(+), NOX-E36 enlace específico > 1 μ M;

-, sin interacción mensurable;

.*, enlace de polianión no específico (PoC o matriz de dextrano) > 250 nM;

..**, enlace de polianión no específico (PoC o matriz de dextrano) > 100 μ M.

FIG. 24B

	Constante de Índice de Asociación K_a [$M^{-1} s^{-1}$]	Constante de Índice de Disociación K_d [s^{-1}]	Constante de Disociación K_D [nM]
CCL2/MCP-1	$1.8 \pm 0.4 \times 10^5$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	1.1 ± 0.2
CCL3/MCP-1 α	$1.6 \pm 0.3 \times 10^5$	$6.4 \pm 1.1 \times 10^{-4}$	4.1 ± 1.3
CCL7/MCP-3	-	-	-
CCL8/MCP-2	$2.0 \pm 0.7 \times 10^5$	$6.7 \pm 2.0 \times 10^{-4}$	4.2 ± 2.5
CC1/Eotaxina	$1.6 \pm 0.4 \times 10^5$	$1.1 \pm 0.6 \times 10^{-3}$	7.7 ± 5.2
CCL13/MCP-4	-	-	>1,000
CXCL7/NAP-2	$1.8 \pm 0.5 \times 10^5$	$4.1 \pm 0.4 \times 10^{-4}$	2.5 ± 0.9

FIG. 24C

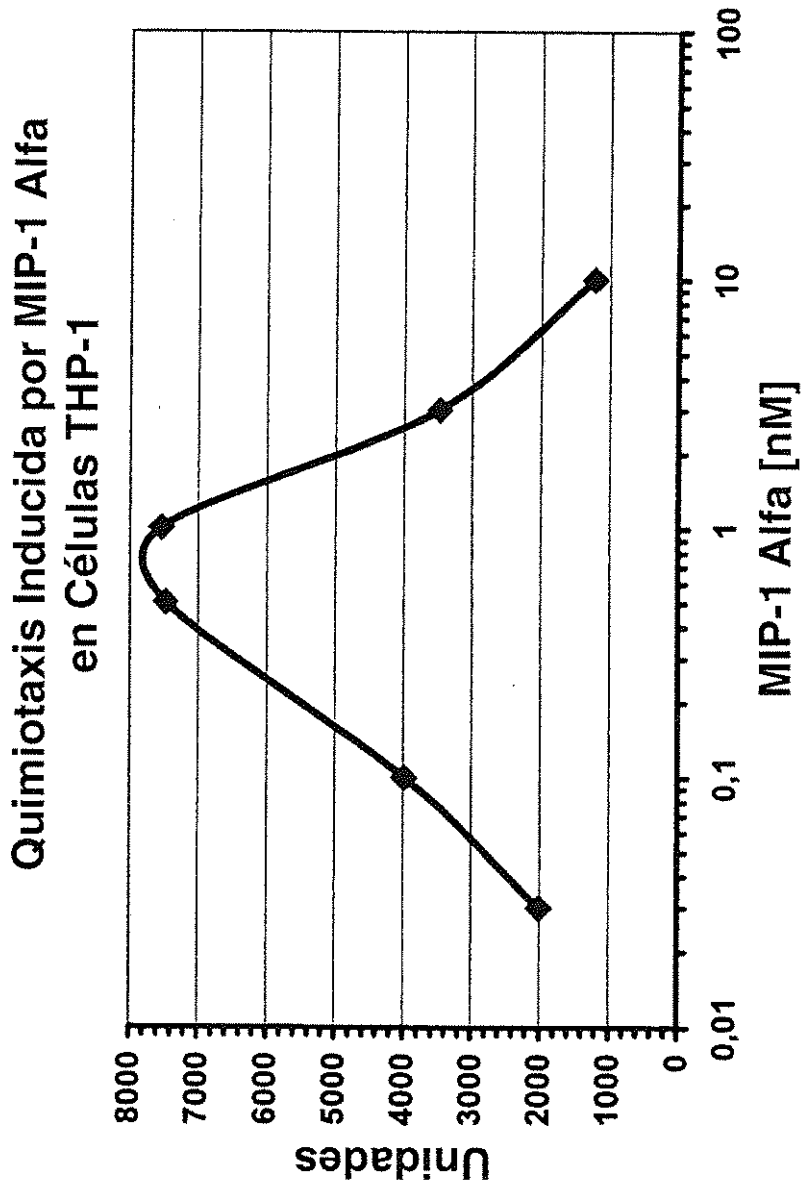


FIG. 24D

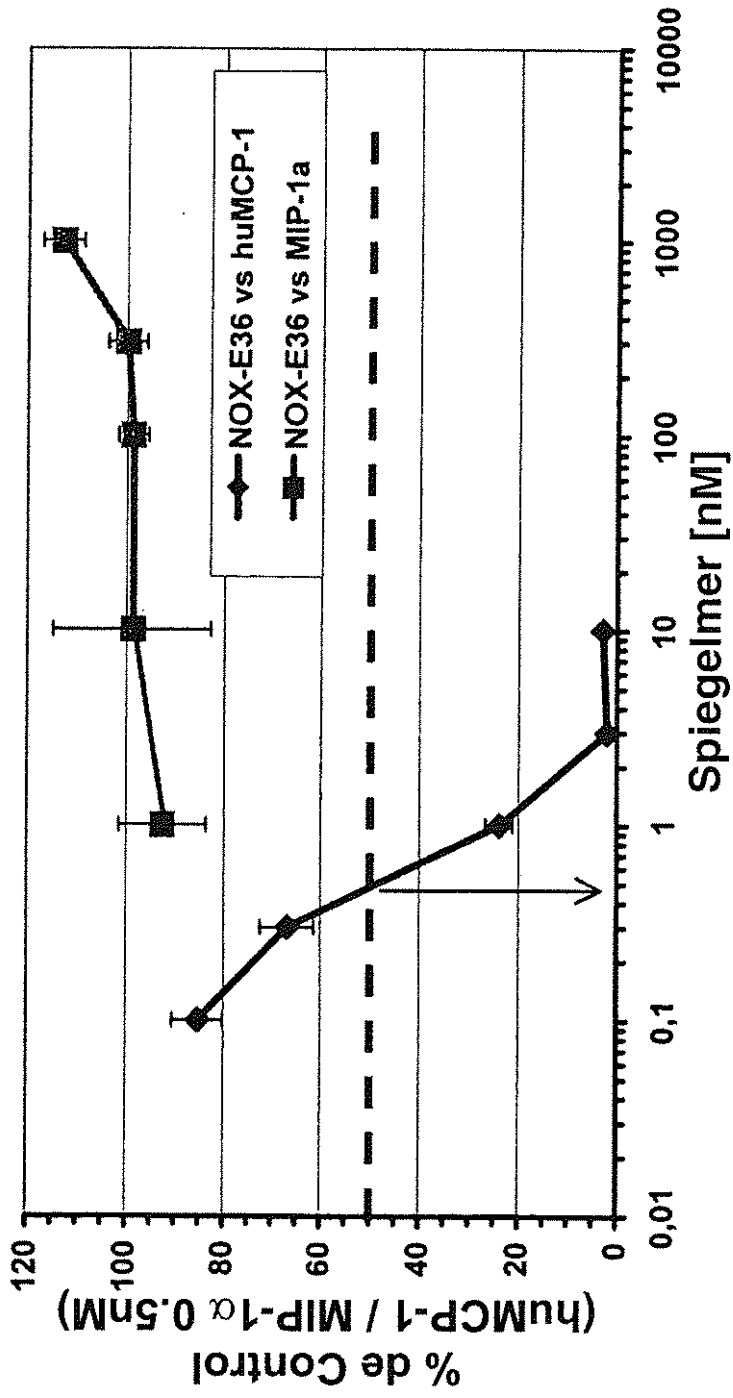


FIG. 24E

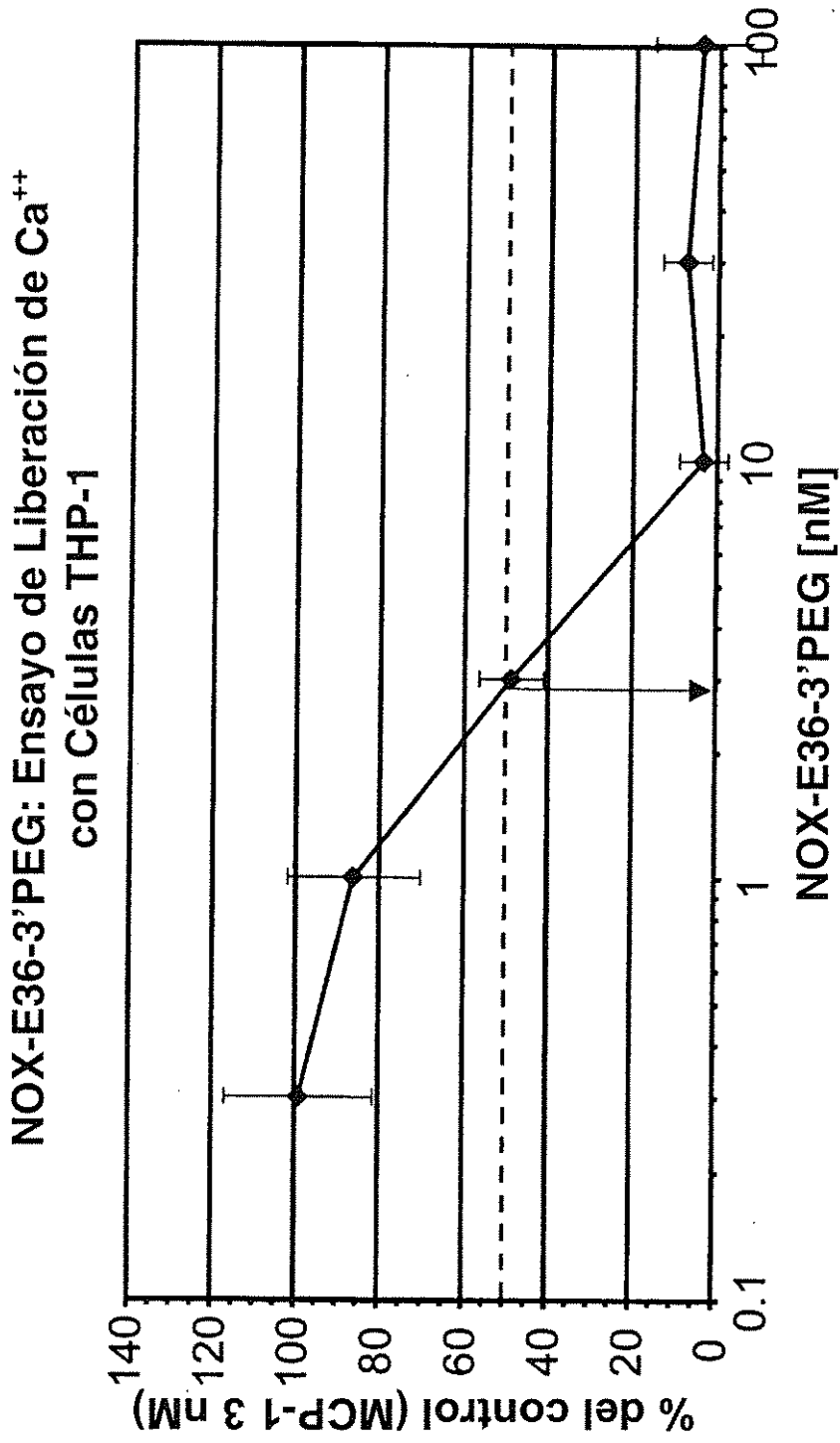


FIG. 25

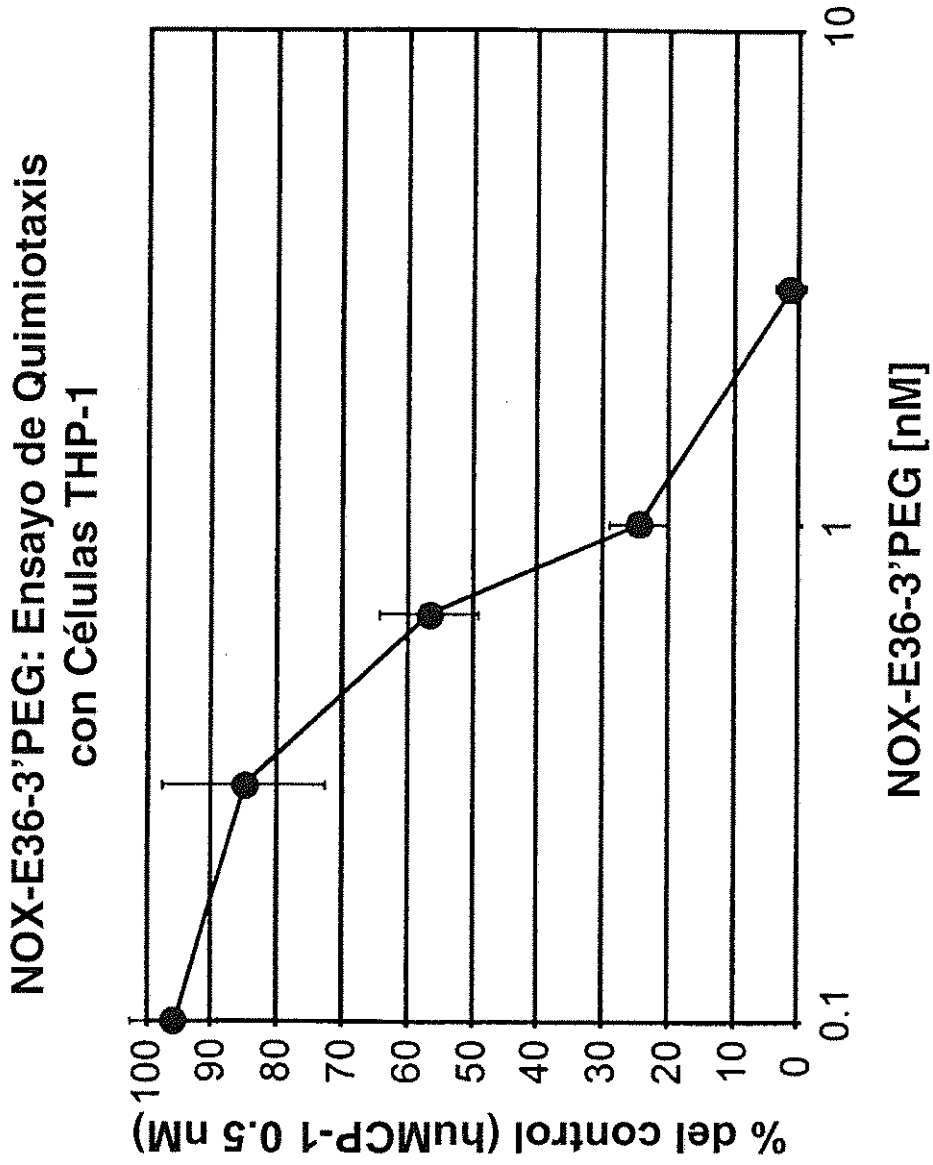


FIG. 26

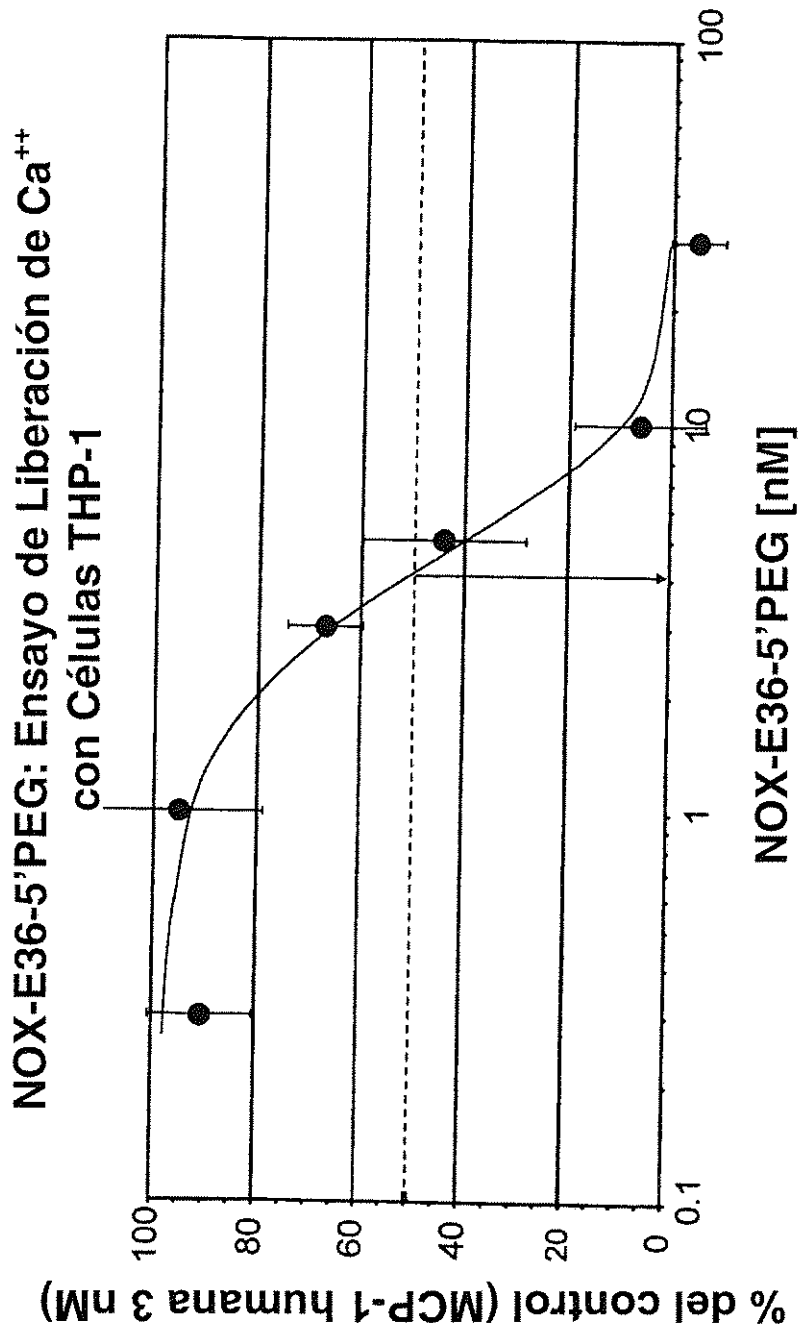


FIG. 27A

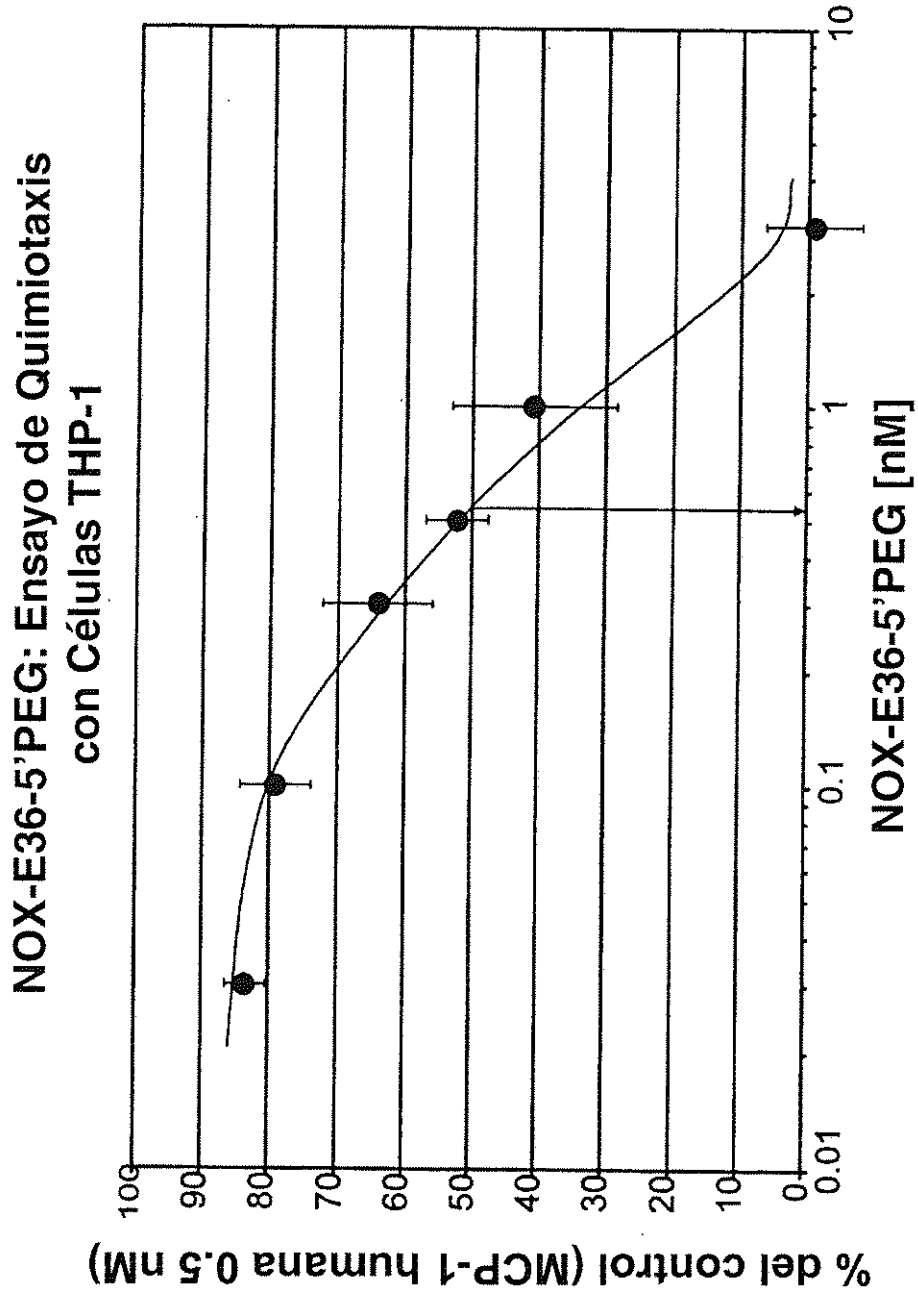


FIG. 27B

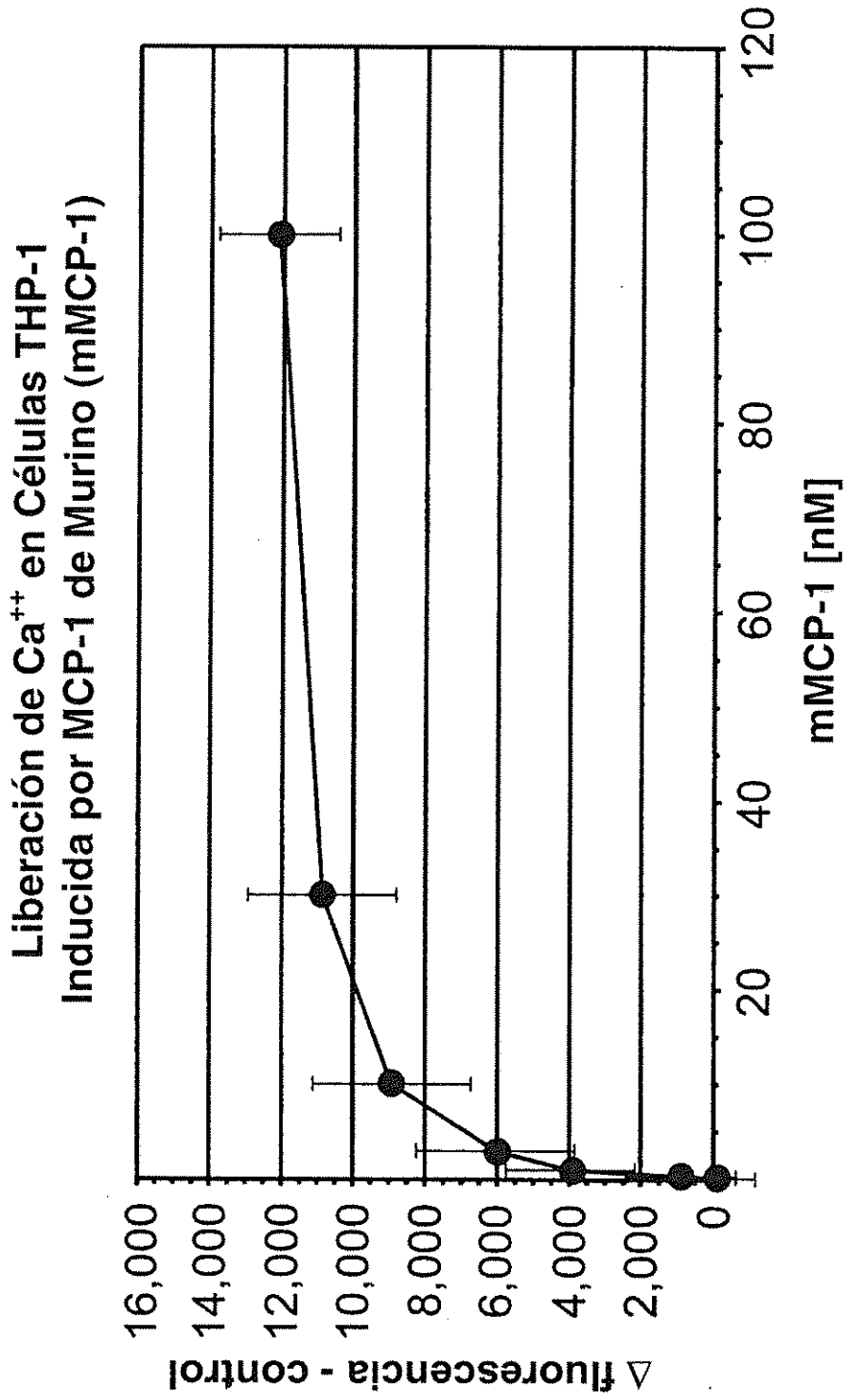


FIG. 28

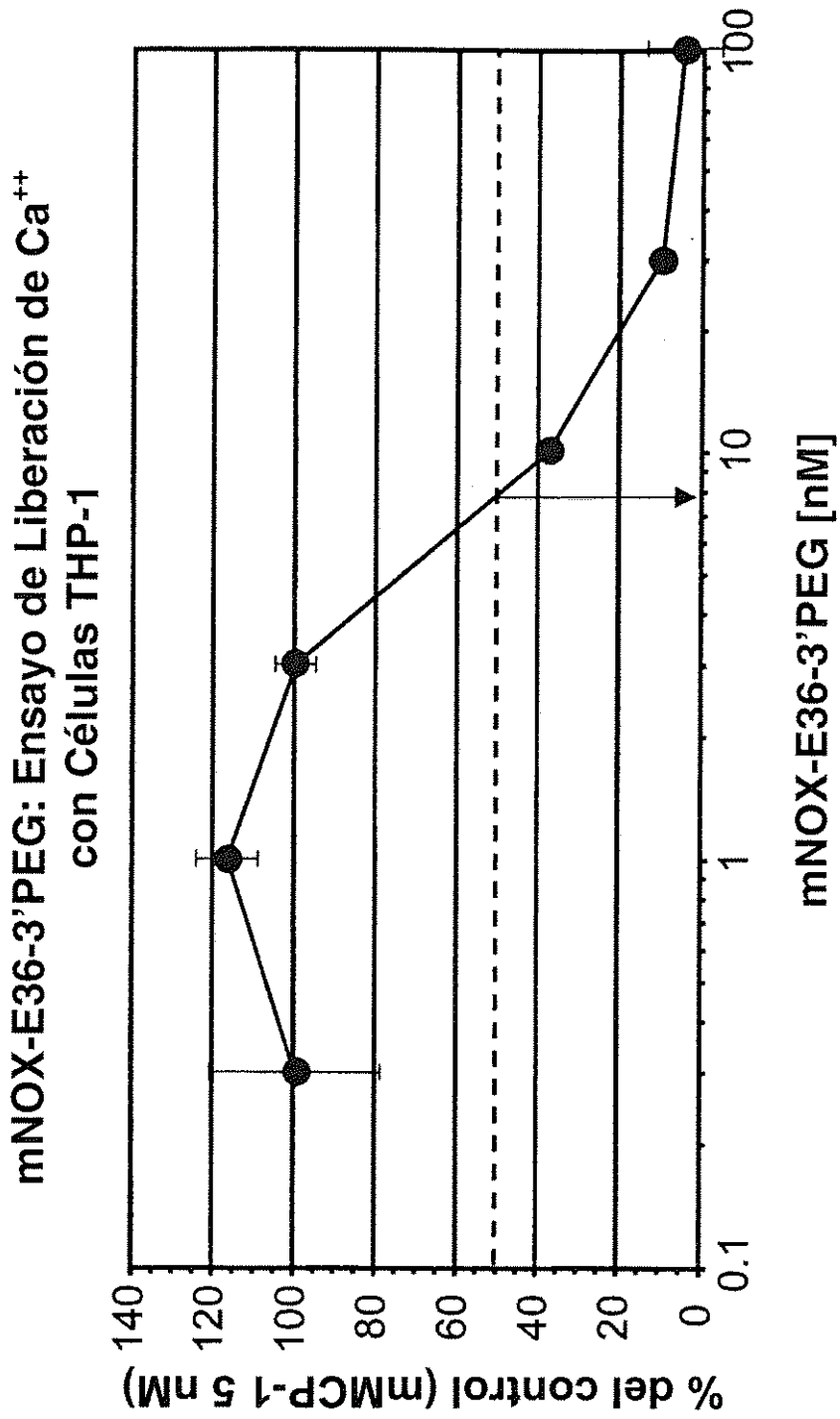


FIG. 29

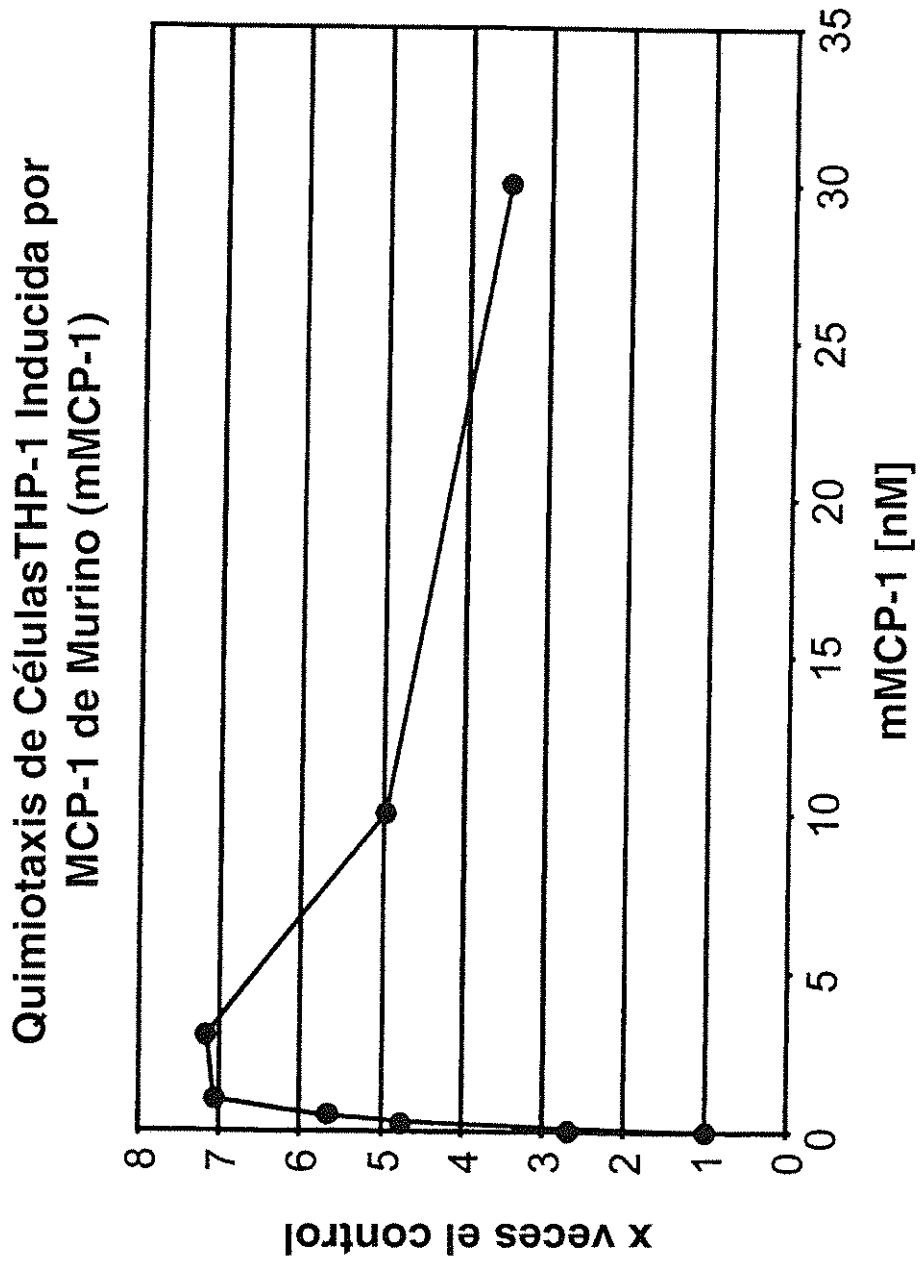


FIG. 30

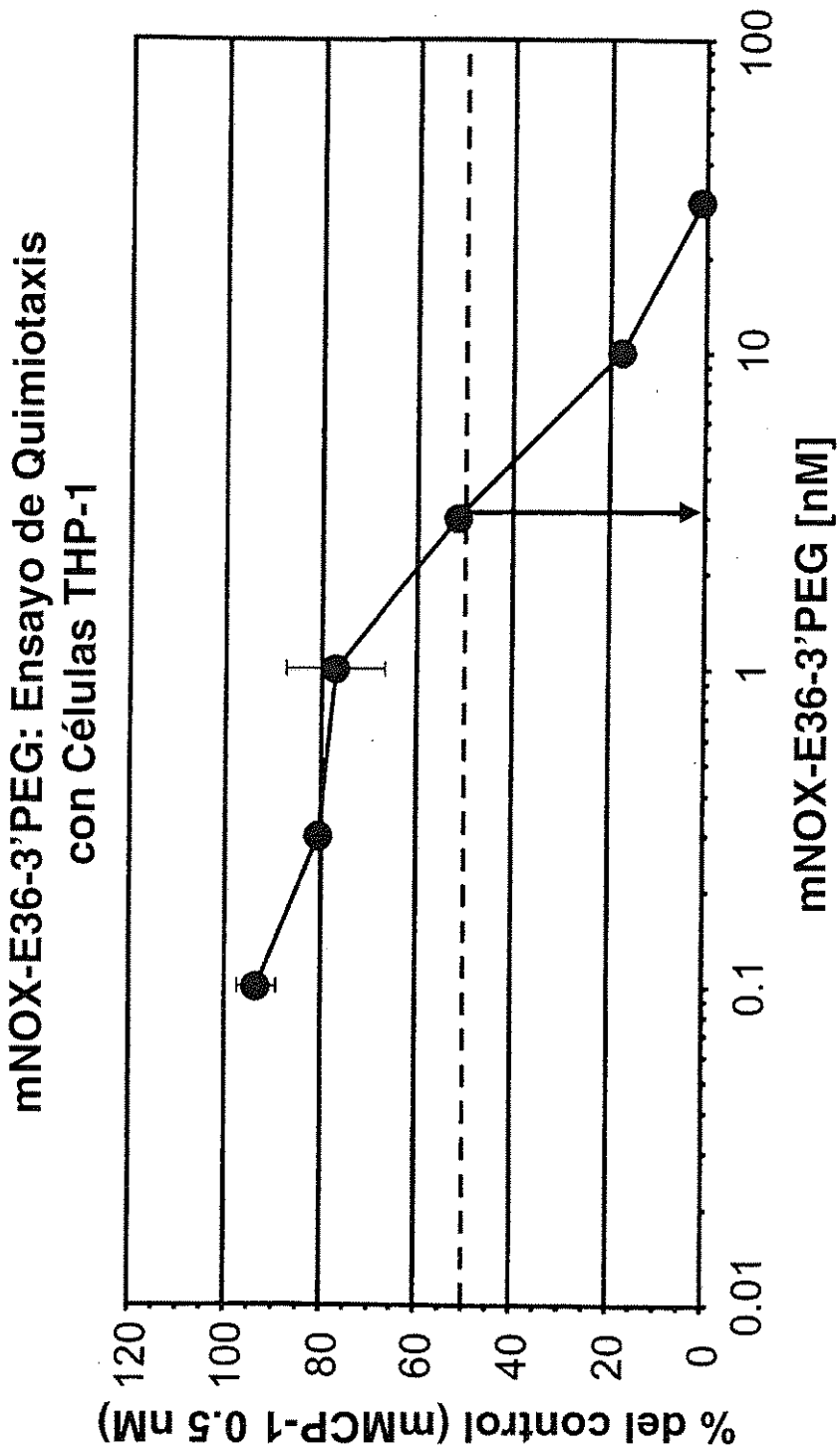
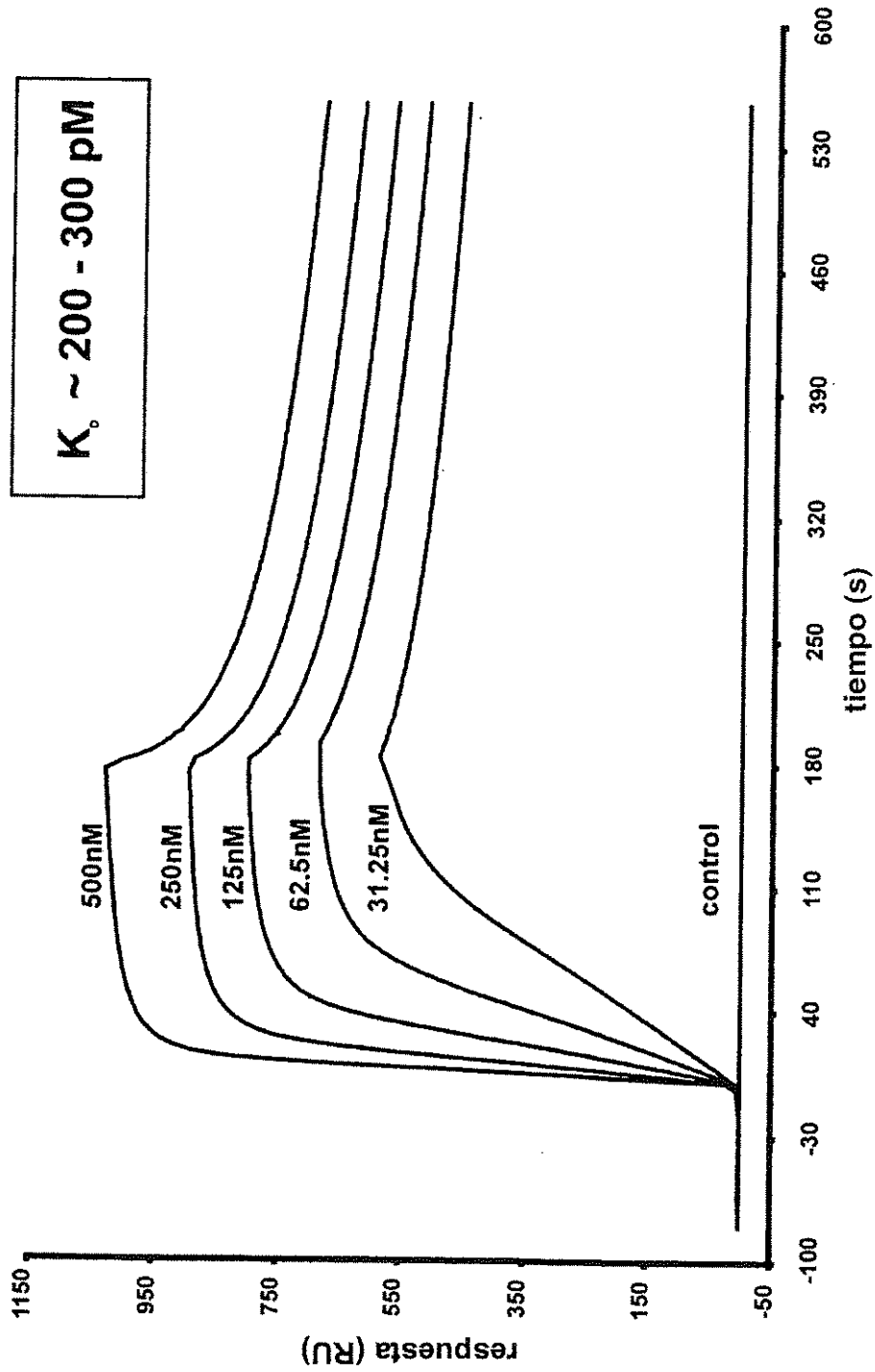
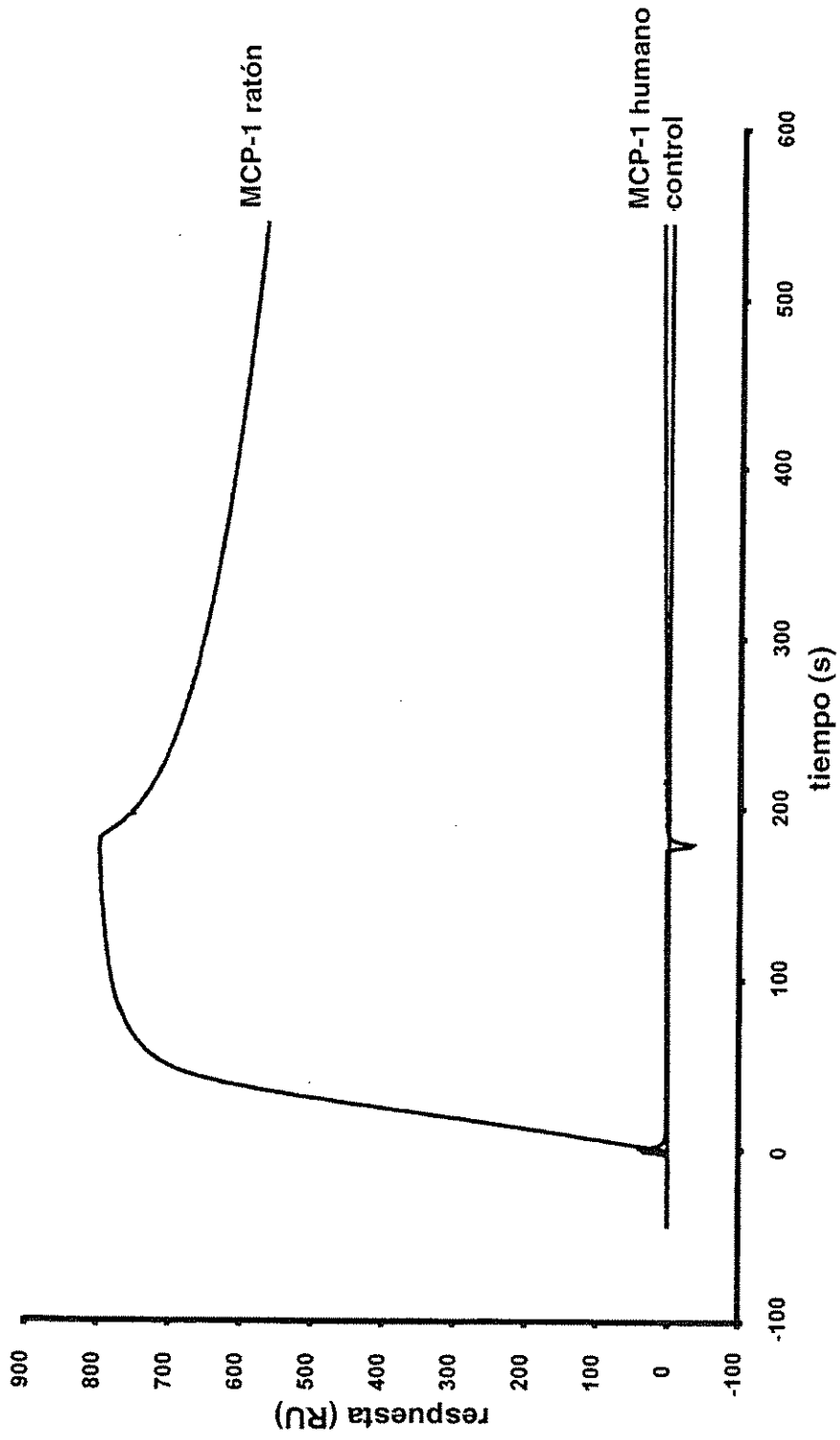


FIG. 31



Cinética del Enlace D-mNOX-E36 con D-MCP-1 de Murino

FIG. 32



Enlace D-mNOX-E36 con D-MCP-1 Humana y de Murino

FIG. 33

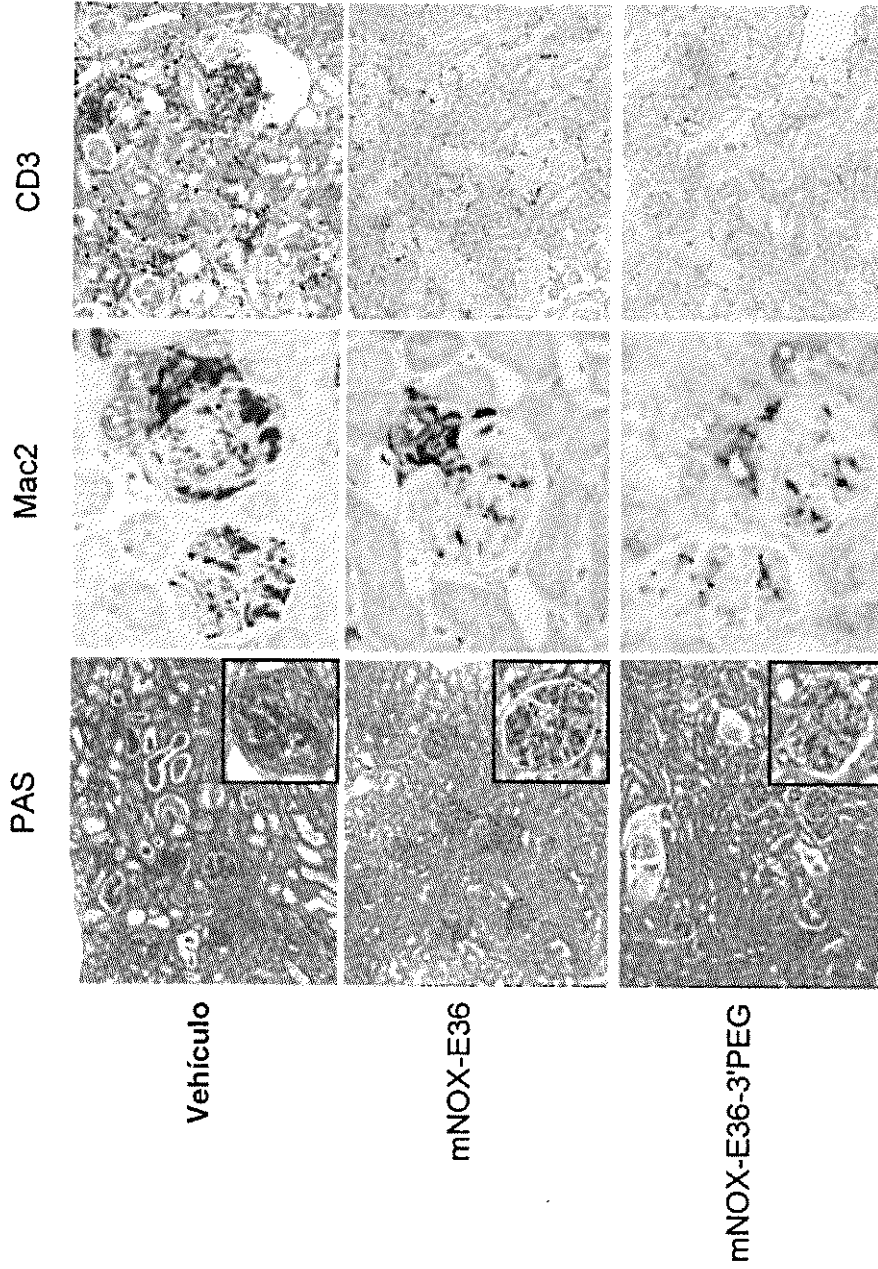


FIG. 34

	Vehículo	PoC	mNOX-36	PoC-PEG	mNOX-36'PEG
Enfermedad Renal					
GFR [μ /min]	179 \pm 41	200 \pm 49	245 \pm 69	157 \pm 74	293 \pm 72
Proporción albúmina/creatinina U	15.6 \pm 10.1	4.3 \pm 1.4	6.8 \pm 1.8	3.8 \pm 0.5	2.4 \pm 0.7
IgG₁ [puntaje de glom.]	1.5 \pm 0.4	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.5
IgG_{2a} [puntaje de glom.]	0.9 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3
Índice de Actividad [puntaje]	17.4 \pm 4.9	17.8 \pm 4.2	10.3 \pm 5.0*	17.4 \pm 2.7	9.4 \pm 4.2*
Índice de Cronicidad [puntaje]	6.0 \pm 2.0	7.2 \pm 2.6	2.6 \pm 2.5	5.4 \pm 1.0	1.6 \pm 1.8*
Mac-2+ [células/glom]	13.4 \pm 2.0	12.6 \pm 0.9	8.5 \pm 2.3*	13.6 \pm 2.3	8.2 \pm 3.5*
Mac-2+ [células/hpf]	20.3 \pm 8.1	20.6 \pm 6.7	10.8 \pm 5.1	19.3 \pm 3.7	7.7 \pm 4.0*
CD3+ [células/hpf]	44.6 \pm 14.7	39.4 \pm 7.5	23.8 \pm 10.2	36.2 \pm 3.1	19.0 \pm 8.0*
Lesión Pulmonar [puntaje]	1.6 \pm 0.8	1.6 \pm 0.8	0.6 \pm 0.5*	1.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.5*
Lesiones de la Piel [% de ratón]	60	60	28	80	28

Proporción de albúmina/creatinina, U = proporción de albúmina/creatinina en μ g/mg, los valores son promedio \pm SEM; * p < 0.05 Spiegelmer contra el control PoC respectivo

FIG. 35

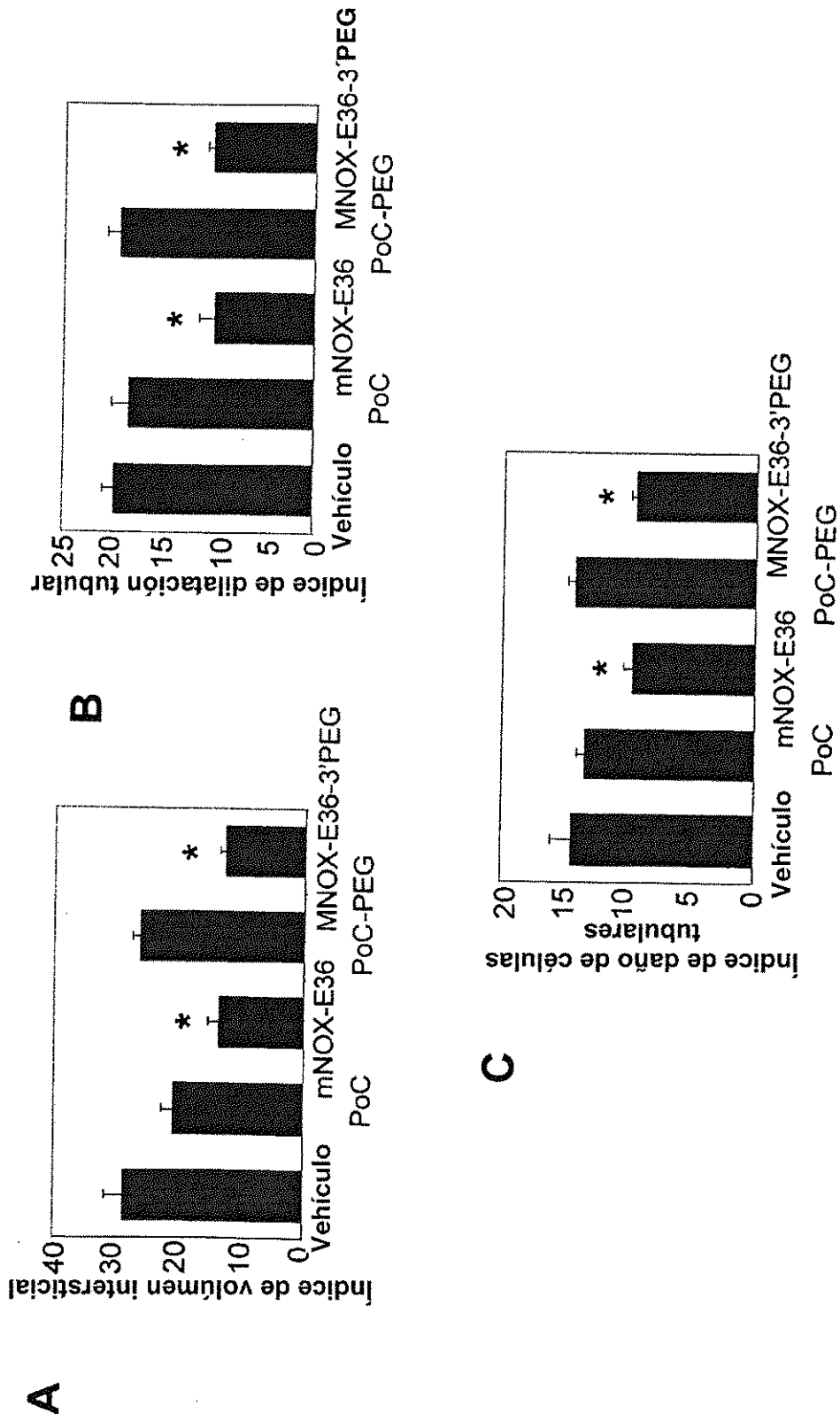


FIG. 36

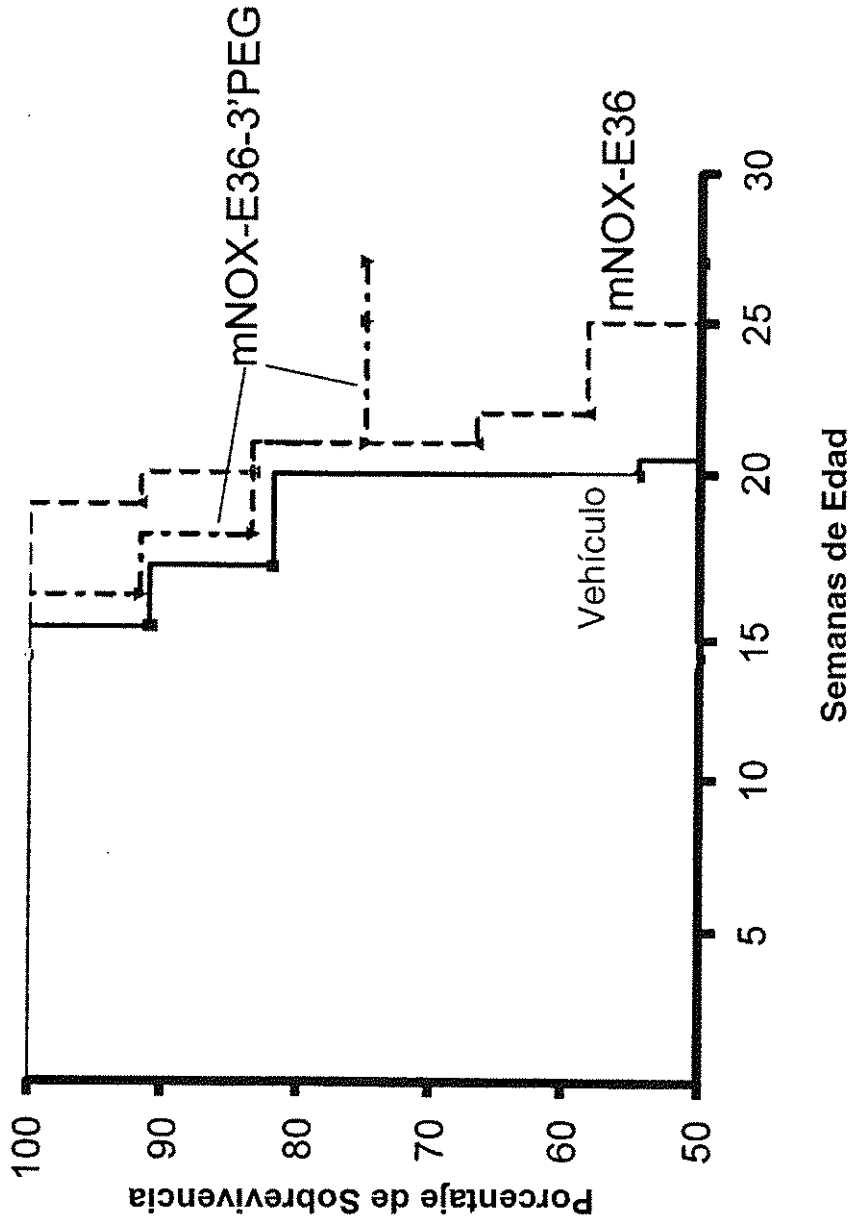


FIG. 37

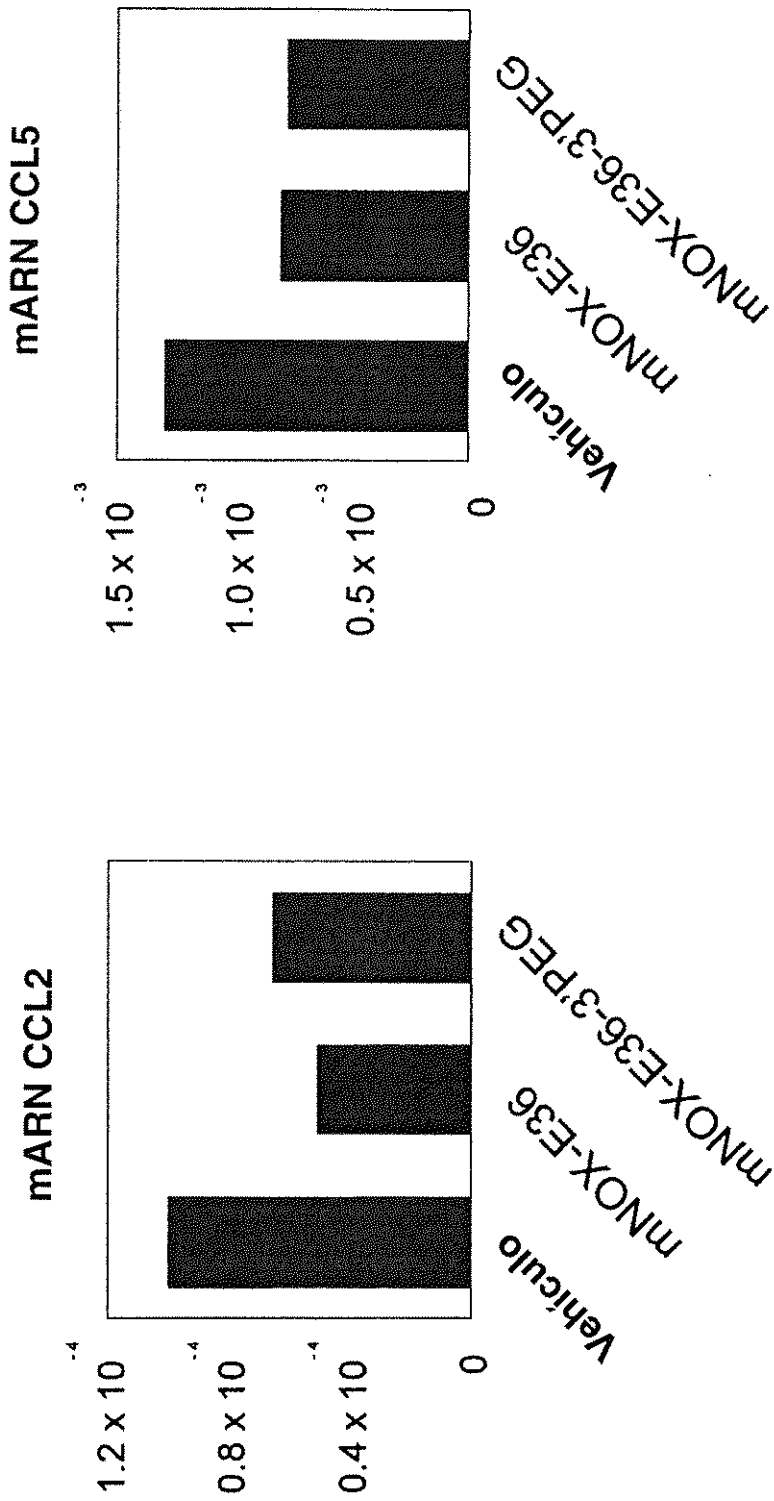


FIG. 38

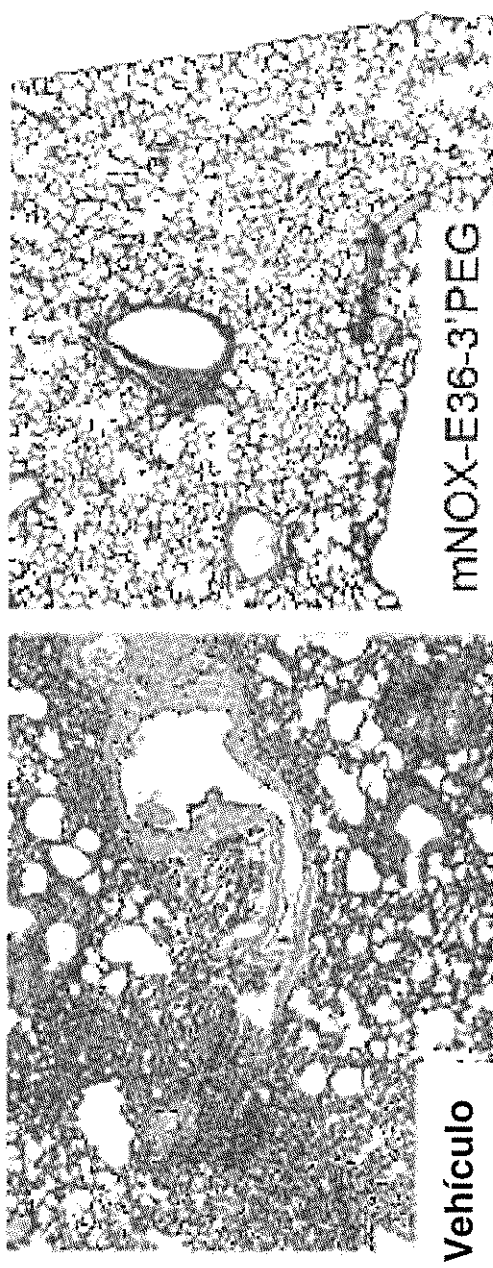


FIG. 39

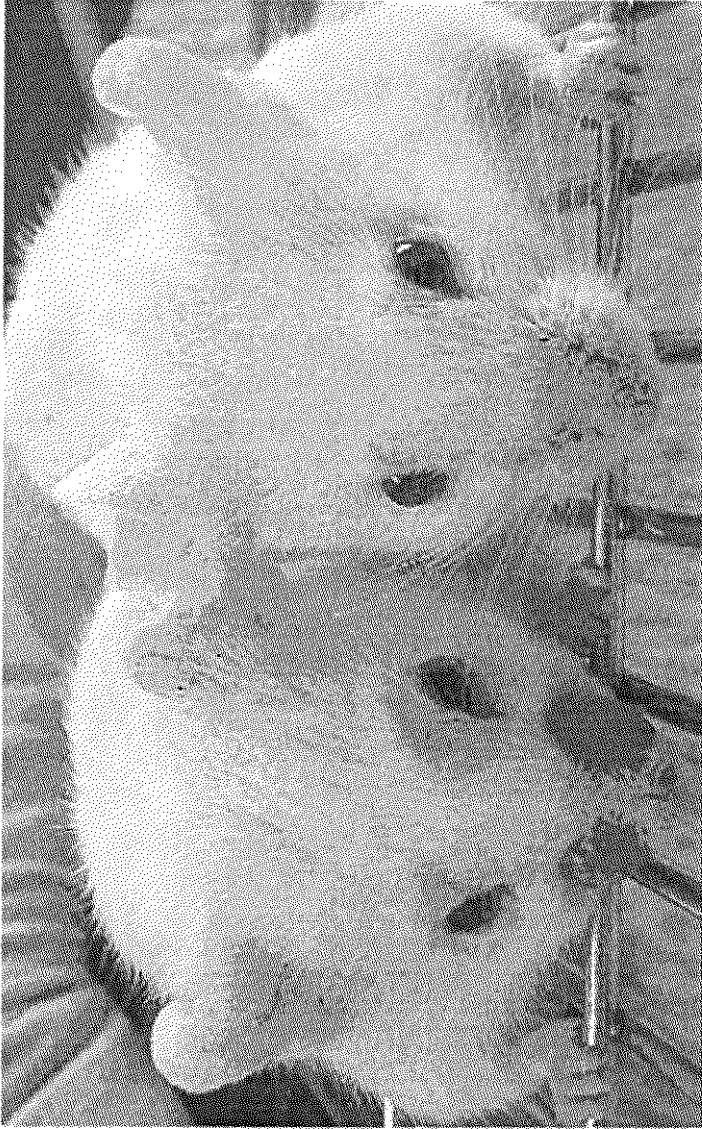


FIG. 40

	Vehículo	PoC	mNOX-36	PoC-PEG	mNOX-36'PEG
Linfoproliferación					
Peso del Bazo [% BW]	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3
Peso de LN [% BW]	2.3 ± 0.7	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.7
Anti-ADNds en Suero					
IgG₁ [µg/ml]	11.7 ± 3.6	7.5 ± 2.8	11.7 ± 3.4	8.2 ± 1.2	6.6 ± 1.2
IgG_{2a} [µg/ml]	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.2
IgG_{2b} [µg/ml]	17.6 ± 5.6	18.9 ± 5.2	22.6 ± 3.3	28.3 ± 2.5	20.6 ± 3.8

LN = Volumen de nodos linfáticos mesentéricos, los valores son promedio ± SEM

FIG. 41

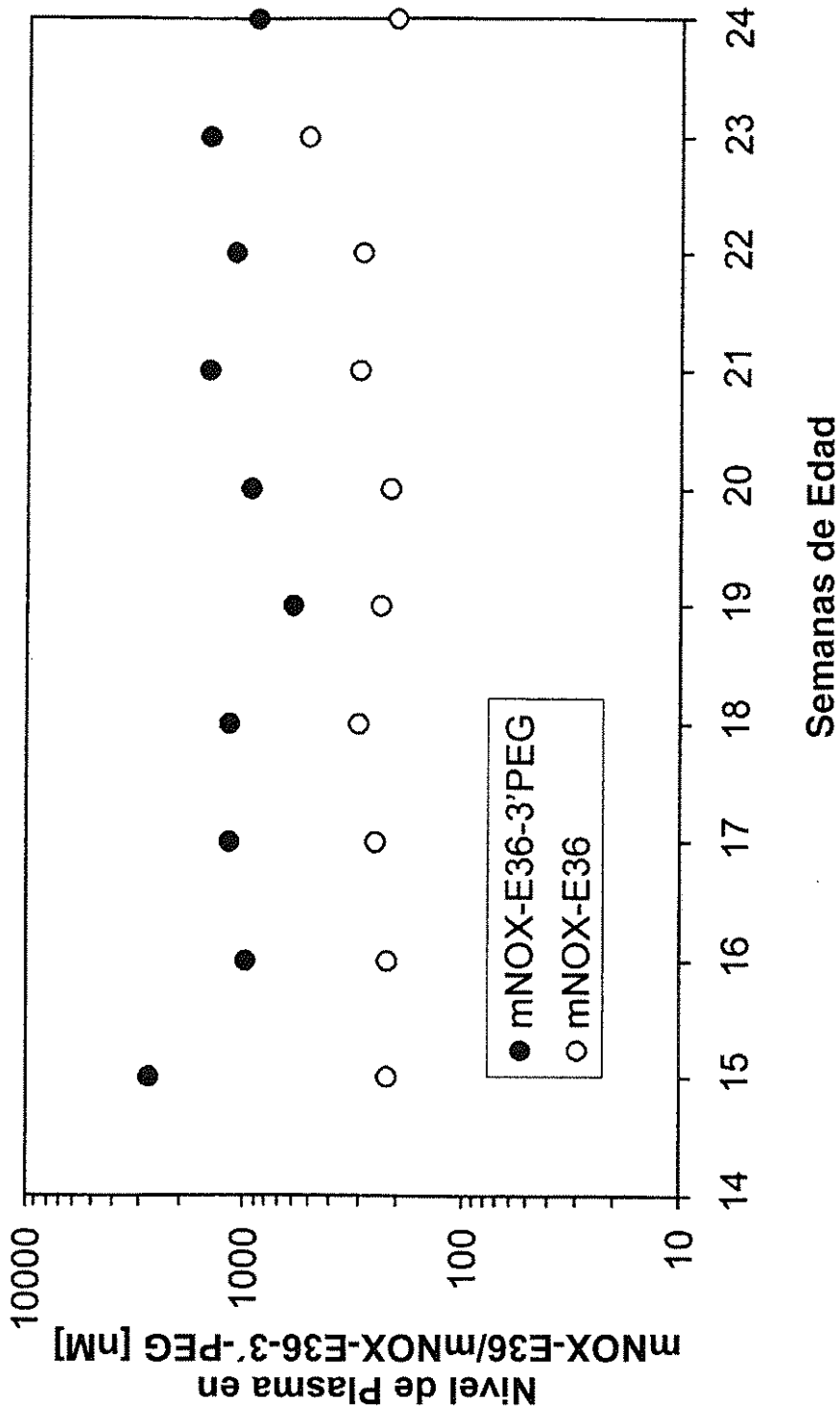


FIG. 42

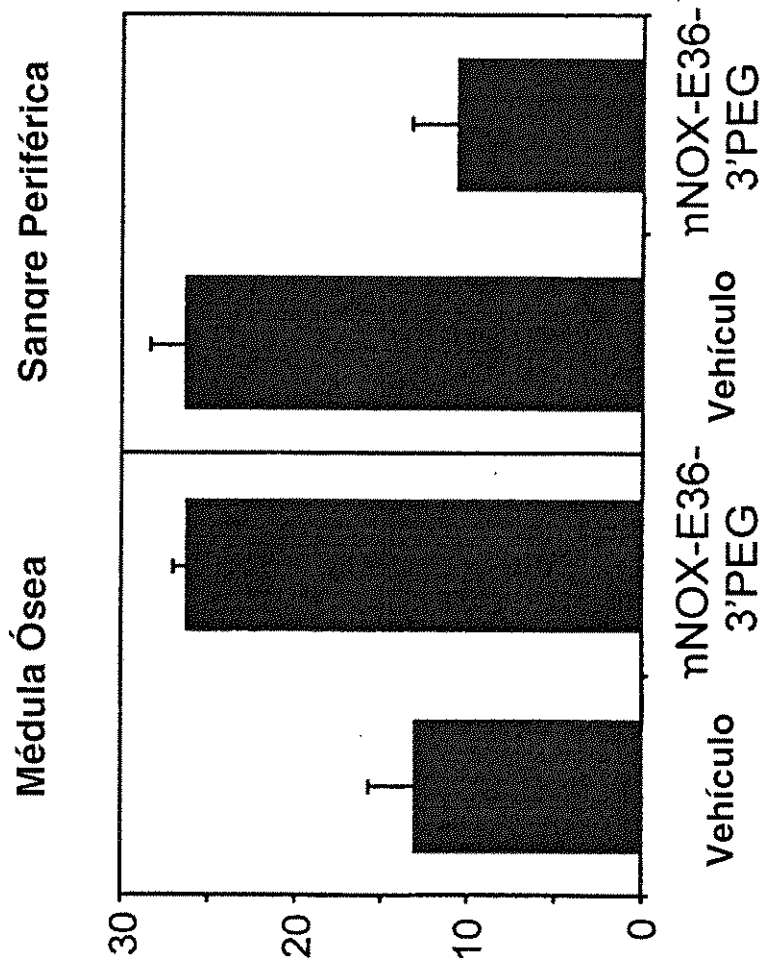


FIG. 43

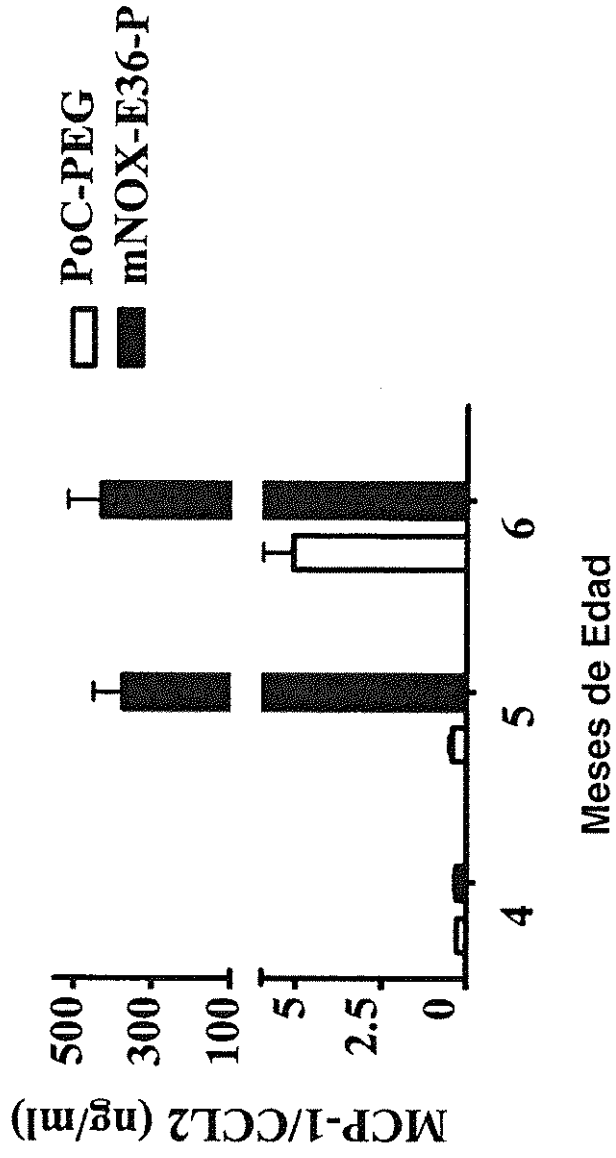


FIG. 44

	2K		1K		
	Tipo silvestre nada	db/db nada	db/db nada	db/db PoC-PEG	db/db mNOX-E36-3'PEG
Respuesta Celular [células/glomérulos o hpf]					
Glomerular	Células Mac-2+ 0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	5.0 ± 0.7*	5.9 ± 0.4	3.5 ± 0.3 [#]
	Células Ki-67+ 0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2.4 ± 0.2*	3.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2 [#]
Interticial	Células Mac-2+ 3.2 ± 0.3	8.6 ± 1.0	19.2 ± 2.8*	23.8 ± 3.3	12.3 ± 1.2 [#]

Los valores son promedio ± SEM; *, p<0.05 1K db/db contra 2K db/db; #, p<0.05 mNOX-E36-3'PEG contra PoC-PEG

FIG. 45

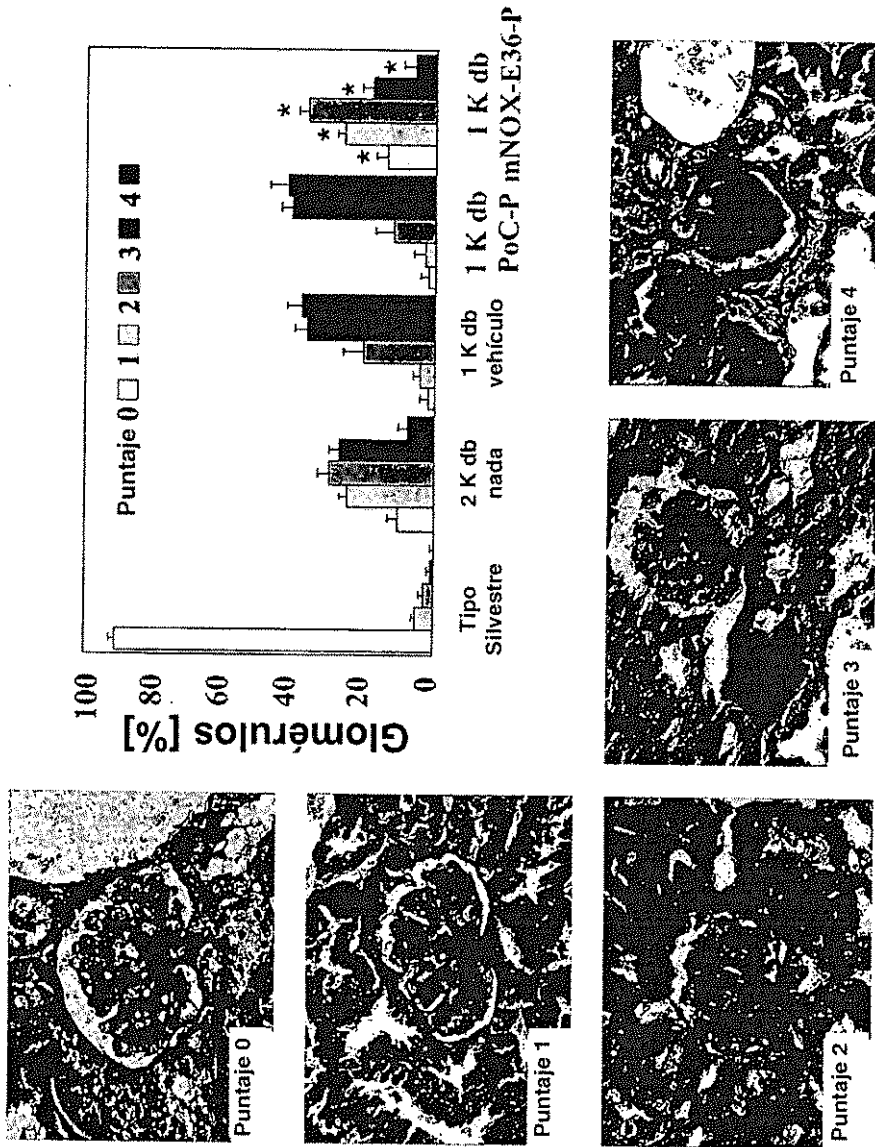


FIG. 46

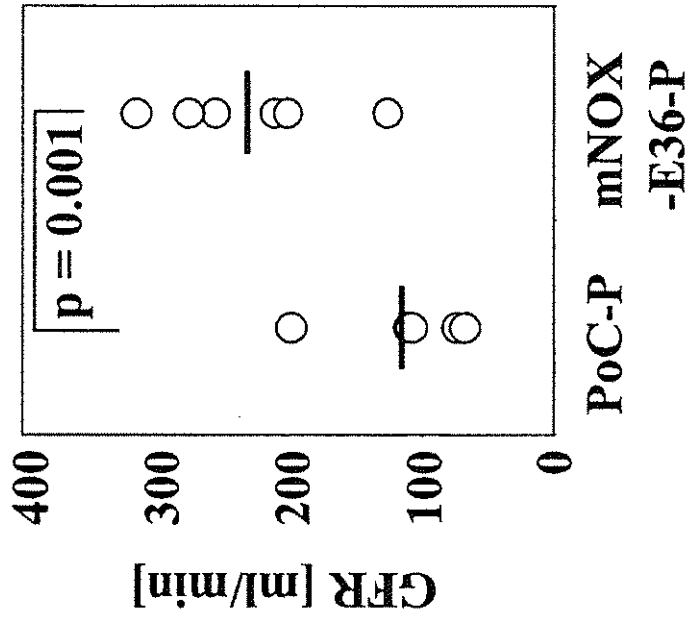


FIG. 47

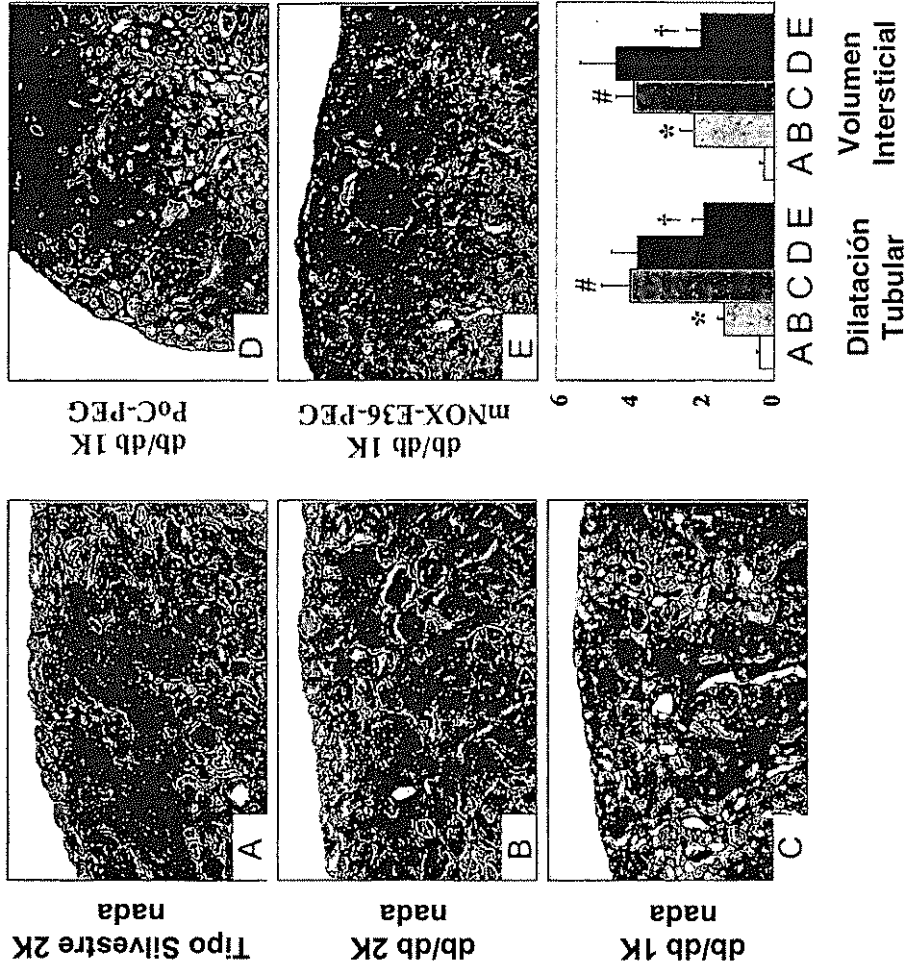


FIG. 48

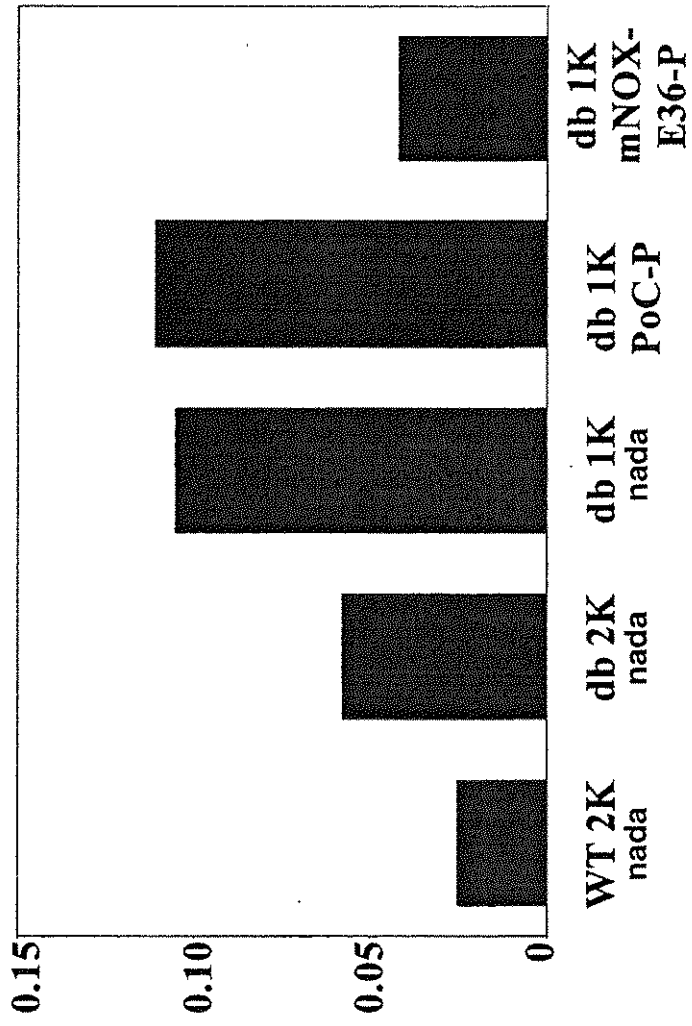


FIG. 49

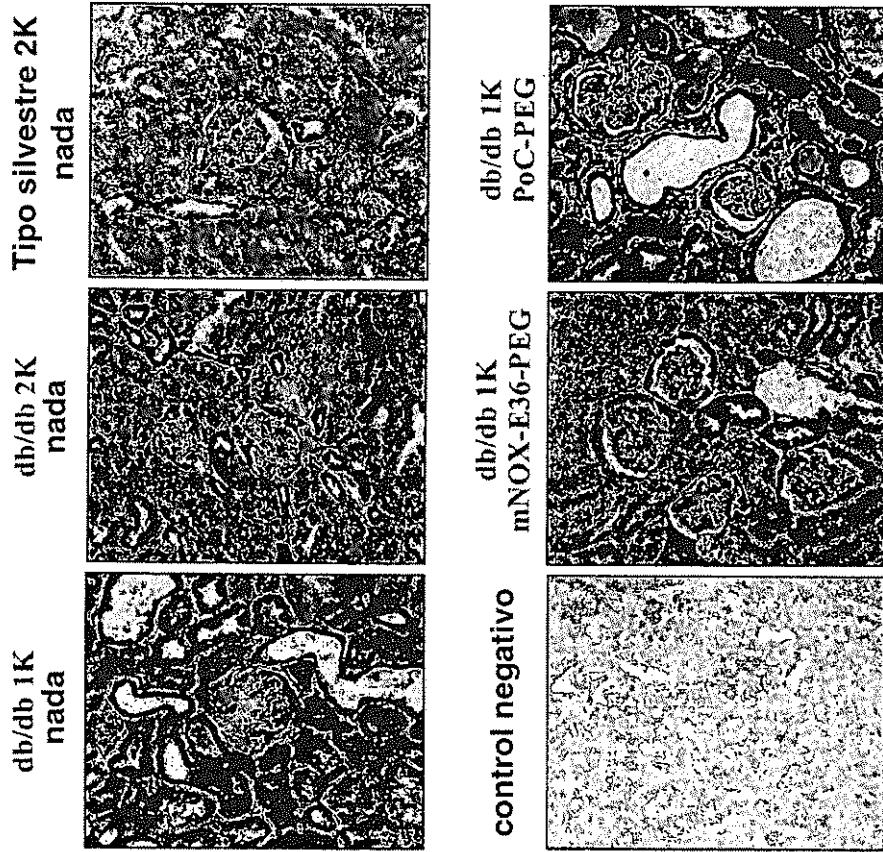


FIG. 50