

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 390**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/GB2012/051356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12727921 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2718313**

54 Título: **Tratamiento de afecciones respiratorias**

30 Prioridad:

13.06.2011 US 201161496377 P

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

13.10.2017

73 Titular/es:

**TLA TARGETED IMMUNOTHERAPIES AB
(100.0%)**

**Avd L2:04, Karolinska Universitetssjukhuset,
Solna
171 76 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**COTTON, GRAHAM y
WINQVIST, OLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 637 390 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

Tratamiento de afecciones respiratorias

5 Campo de la invención

Las diversas realizaciones de la presente invención se refieren a productos y métodos para tratar afecciones inflamatorias, tales como afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). También se describen diagnósticos adjuntos.

10

Antecedentes de la invención

Los trastornos del tracto respiratorio, tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se caracterizan normalmente por dificultades respiratorias como resultado de la reducción del flujo aéreo a los pulmones. Estos síntomas están provocados con frecuencia por la inflamación de las vías respiratorias; por ejemplo, la bronquitis crónica es una forma de EPOC asociada con inflamación excesiva de los bronquios.

15

Además de dificultades respiratorias, la obstrucción de las vías respiratorias y la inflamación asociada, pueden provocar daño pulmonar progresivo. En el caso de pacientes con EPOC, el estrechamiento permanente de las vías respiratorias puede conducir a complicaciones tales como infecciones torácicas, insuficiencia cardíaca y, en última instancia, insuficiencia pulmonar.

20

La EPOC es una enfermedad respiratoria muy común y en la mayoría de los casos la causa es el tabaquismo.

25

Normalmente, los pacientes se tratan usando inhaladores que contienen fármacos "broncodilatadores". Sin embargo, estos tienen un uso limitado para pacientes con las vías respiratorias permanentemente constreñidas y/o enfermedad de estadio final caracterizada por daño extensivo a los pulmones.

30

La aféresis es un tratamiento usado para agotamiento de los componentes sanguíneos, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. La leucaféresis es el tratamiento por aféresis usado para retirar glóbulos blancos, leucocitos. El paciente se conecta a un sistema circulatorio de sangre extracorpórea; la sangre se extrae de una vena en un brazo, se pasa a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. El documento WO2010/029317 describe columnas de aféresis útiles para tratar afecciones inflamatorias incluyendo una quimiocina inmovilizada en un soporte sólido

35

Sumario de la invención

Las quimiocinas son una clase de moléculas citocinas implicadas en el reclutamiento celular y la activación en inflamación. Las quimiocinas provocan quimiotaxis y la activación de diversas subpoblaciones de células en el sistema inmunitario. La actividad de quimiocinas está mediada principalmente mediante unión estrecha con sus receptores en la superficie de leucocitos. En ciertas realizaciones la presente invención se basa en el entendimiento de que la interacción entre quimiocinas y células que expresan sus receptores puede aprovecharse para el tratamiento de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En particular, diversas afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) incluyen un componente inflamatorio. Aunque la sarcoidosis se considera predominantemente una afección respiratoria, el tratamiento general de la sarcoidosis que afecta a cualquier órgano del cuerpo puede ser posible dentro del alcance de las diversas realizaciones de la presente invención. Los inventores han determinado que la dirección de reclutamiento aumentado de células que expresan receptores de quimiocinas específicos al sitio de inflamación presenta un nuevo enfoque terapéutico para tratar dichas afecciones. Además, en dichas afecciones, la expresión de receptores de quimiocinas en cada célula puede aumentarse de nuevo proporcionando un enfoque terapéutico para tratar dichas afecciones. Se muestra en el presente documento que sujetos que padecen afecciones respiratorias tales como sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan receptores de quimiocinas en la sangre periférica. Los sujetos con sarcoidosis muestran frecuencia aumentada de células que expresan CCR1 tales como monocitos que expresan CCR1, en comparación con controles sanos. También se ha mostrado en el presente documento que las células que expresan CCR1 pueden retirarse usando un reactivo de unión adecuado, en particular RANTES (en forma biotinilada) inmovilizado en una matriz adecuada. De forma similar, se muestra en el presente documento que los monocitos también expresan CCR2. Los monocitos que expresan CCR2 pueden agotarse en pacientes con sarcoidosis usando un reactivo de unión adecuado, en particular MCP-1, en forma biotinilada, inmovilizado en una matriz adecuada. También se muestra en el presente documento que sujetos que padecen afecciones respiratorias tales como sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan CCR7 tales como linfocitos que expresan CCR7, y también células T de memorias centrales, en comparación con controles sanos. También se muestra en el presente documento que las células que expresan CCR7 pueden retirarse usando un reactivo de unión adecuado, en particular MIP3b (en forma biotinilada) inmovilizado en una matriz adecuada.

40

45

50

55

60

65

Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención sirve para reducir el reclutamiento de leucocitos inflamatorios, que

expresan receptores de quimiocinas característicos y posiblemente expresan receptores de quimiocinas característicos a mayores niveles, a sitios de inflamación ligados a afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Esto se consigue usando reactivos de unión específicos para capturar leucocitos inflamatorios que expresan receptores de quimiocinas específicos del paciente. En consecuencia, en ciertas realizaciones la invención proporciona en un primer aspecto un método para tratar afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) que comprende aplicar sangre periférica de un paciente a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con el receptor de quimiocinas CCR2, inmovilizado directa o indirectamente en el soporte retirando de este modo células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente. La sangre periférica de la que se han retirado células que expresan receptores de quimiocinas puede después devolverse al paciente para completar el tratamiento. La invención puede basarse por lo tanto en un circuito extracorpóreo continuo en algunas realizaciones. Como alternativa, en ciertas realizaciones la invención puede comprender etapas de obtención de sangre periférica del paciente, aplicación de la sangre periférica a la columna y posteriormente devolución de la sangre periférica de la que se han retirado las células que expresan receptores de quimiocinas al paciente.

Como se muestra en el presente documento, pueden inmovilizarse reactivos de unión adecuados en un soporte sólido, bien directa o bien indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células que expresan receptores de quimiocinas relevantes. Cuando se observan niveles mayores de expresión de receptores de quimiocinas, dichas células pueden retirarse preferentemente de la sangre periférica usando las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, los métodos de las diversas realizaciones de la invención pueden dirigirse preferentemente a células CCR2^{hi} como se define en el presente documento para retirada de la sangre periférica. La “alta” expresión puede determinarse de acuerdo con técnicas de citometría de flujo convencionales. El nivel se mide en relación con niveles de expresión del receptor de quimiocinas en células tomadas de un sujeto sano. La Figura 17 adjunta proporciona un ejemplo de una estrategia de selección.

En el presente documento, se pretende que la referencia a CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CCR7 abarque selección de uno cualquiera o más, hasta todos, de los receptores de quimiocinas enumerados. Además, la combinación de CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1 y/o CXCR2 se contempla de forma explícita como un agrupamiento separado, para incluir uno cualquiera o más de CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1 y CXCR2.

En otras realizaciones la invención proporciona además un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor de quimiocinas CCR2, para uso en el tratamiento de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), en la que el o los reactivos de unión se inmovilizan, directa o indirectamente, en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2 de la sangre periférica del paciente. En ciertas realizaciones la invención también proporciona el uso de uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas/el receptor de quimiocinas CCR2, para su uso en la fabricación de una columna de aféresis para el tratamiento de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), en el que el o los reactivos de unión se inmovilizan en un soporte sólido contenido dentro de la columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo una o más células que expresan receptor de quimiocinas/CCR2 de la sangre periférica del paciente.

Todas las realizaciones descritas con respecto a los métodos de tratamiento de las diversas realizaciones de la invención se aplican a estos aspectos cambiando lo que deba cambiarse y no se repiten por razones de concisión. Por lo tanto, el siguiente análisis realizado con referencia a las diversas realizaciones de los métodos de tratamiento también es aplicable a los aspectos de uso médico de la invención.

En ciertas realizaciones la invención se dirige a tratar una serie de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Por tratamiento se entiende una reducción de las células que expresan receptores de quimiocinas específicos en la sangre periférica del paciente. La reducción puede comprender una reducción de células que expresan receptores de quimiocinas, en particular uno o más de CCR2, a mayores niveles en pacientes con enfermedad. El paciente es normalmente un paciente humano pero el término paciente puede incluir sujetos tanto humanos como animales no humanos en algunas realizaciones. En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, esto implica normalmente una reducción en una o más de células que expresan CCR2, tales como una o más células que expresan CCR2^{hi}, en la sangre periférica del paciente. Las células que expresan CCR2 comprenden, consisten esencialmente en o consisten en monocitos, macrófagos, linfocitos, en particular linfocitos T y/o eosinófilos en ciertas realizaciones. En realizaciones específicas, las células retiradas para tratar afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden monocitos, en particular monocitos que expresan CCR2.

La médula ósea produce monocitos a partir de precursores de células madre hematopoyéticas denominados monoblastos. Los monocitos se pueden diferenciar en macrófagos o células dendríticas. Los monocitos y su descendencia de macrófagos y células dendríticas cumplen una serie de funciones en el sistema inmunitario incluyendo fagocitosis, presentación de antígenos y producción de citocinas. Los monocitos pueden caracterizarse

con referencia a la expresión del marcador de superficie celular CD14, opcionalmente junto con CD16. Los monocitos clásicos pueden caracterizarse por alto nivel de expresión del receptor de superficie celular CD14 (monocito CD14++ CD16-). Los monocitos no clásicos pueden caracterizarse por bajo nivel de expresión de CD14 y con coexpresión adicional del receptor de CD16 (monocito CD14+ CD16++). Los monocitos intermedios pueden caracterizarse por alto nivel de expresión de CD14 y bajo nivel de expresión de CD16 (monocitos CD14++ CD16+).

5 Los macrófagos derivan de monocitos y son responsables de la protección de los tejidos de sustancias ajenas. Son células que poseen un núcleo grande y liso, una gran área de citoplasma y vesículas internas para procesar material ajeno. El término "macrófago" puede referirse a una célula derivada de monocitos que expresa uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular CD14, CD11b, Lisozima M, MAC-1/MAC-3 y CD68. El término

10 macrófago incluye macrófagos tanto activados como inactivados. Los macrófagos activados pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de CD69, ENG, FCER2 e IL2RA, HLA-DR, CD86. Los macrófagos inactivados aún no han recibido señales de activación mediante por ejemplo receptores TLR y por lo tanto expresan menos marcadores de activación en la superficie celular lo que se correlaciona con menor maduración. Los macrófagos M1 pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de CD16⁺CD32⁺CD64⁺ y secretan principalmente IL-23 e IL-1, TNF, IL-6 y altos niveles de IL-12 y además moléculas efectoras tales como iNOS y ROI. Los macrófagos M1 tienen elementos citotóxicos a diferencia de macrófagos M2. Los macrófagos M2 pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de SRA/B+CD163⁺MR⁺CD14⁺ y expresan TGFp, IL-10 e IL-1Ra. Los macrófagos asociados a tumores (MAT) comparten muchas características con los macrófagos M2 y se consideran macrófagos M2 polarizados. El paradigma M1/M2 también puede encontrarse en subconjuntos de monocitos en los que se considera que monocitos

15 CD14⁺CD16-CXC3R1^{bajo} están en el subconjunto "inflamatorio" y los CD14^{bajo}CD16⁺CXC3R1^{alto} son monocitos "residentes".

Los tres tipos principales de linfocitos son células T, células B y células citolíticas naturales (NK). La expresión "linfocito T" incluye células T CD4⁺ tales como células T auxiliares (células Th1 y células Th2) y células T CD8⁺ tales como células T citotóxicas. Las células Th1 pueden caracterizarse por la expresión de CCR5 y/o por la producción de IFN-γ. Las células Th2 pueden caracterizarse por la expresión de CCR3 y/o por la producción de IL-4.

25

Los métodos reivindicados pueden, en particular, dirigirse a eosinófilos. La eosinofilia es un componente importante de ciertas afecciones respiratorias y puede definirse como la presencia de más de 500 eosinófilos/microlitro de sangre. Por lo tanto, la reducción del número de eosinófilos en circulación representa un enfoque terapéutico importante. Los eosinófilos, o granulocitos eosinofílicos son glóbulos blancos y representan un componente importante del sistema inmunitario. Junto con los mastocitos, también controlan mecanismos asociados con la alergia y el asma. Son granulocitos que se desarrollan durante la hematopoyesis en la médula ósea antes de migrar a la sangre.

30

El nombre "eosinófilo" deriva de las propiedades "afines al ácido" eosinofílicas de la célula. Son normalmente transparentes, pero esta afinidad provoca que tengan un aspecto color rojo teja después de la tinción con eosina, un colorante rojo, usando el método de Romanowsky. La tinción se concentra en gránulos pequeños dentro del citoplasma celular, que contienen muchos mediadores químicos, tales como histaminas y proteínas tales como peroxidasa de eosinófilos, ribonucleasa (RNasa), desoxirribonucleasas, lipasa, plasminógeno y proteína básica mayor. Estos mediadores se liberan por un proceso denominado desgranulación después de la activación del eosinófilo, y son tóxicos para tejidos tanto parasitarios como hospedadores.

35

Los eosinófilos se desarrollan y maduran en la médula ósea. Se diferencian de células precursoras mieloides en respuesta a las citocinas interleucina 3 (IL-3), interleucina 5 (IL-5) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Los eosinófilos producen y almacenan muchas proteínas granulares secundarias antes de su salida de la médula ósea. Después de la maduración, los eosinófilos circulan en sangre y migran a sitios inflamatorios en tejidos en respuesta a quimiocinas tales como CCL11 (eotaxina-1), CCL24 (eotaxina-2), CCL5 (RANTES) y MCP1/4. Los eosinófilos pueden activarse por citocinas de Tipo 2 liberadas de un subconjunto específico de células T auxiliares (Th2); IL-5, GM-CSF e IL-3 son importantes para la activación de eosinófilos así como su maduración. Se ha mostrado que CD44 y CD69 representan diferentes tipos de marcadores de activación en superficie celular para eosinófilos humanos. CD69 está ausente de eosinófilos "nuevos" pero se expresa después de la activación (usando citocinas). CD44 por otro lado se expresa de forma constitutiva pero la expresión está regulada positivamente de forma significativa en respuesta a activación (Matsumoto *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., Volumen 18, Número 6, junio 1998 860-866). Los marcadores específicos de células para eosinófilos incluyen CD9 y CDw125. CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CCR7 expresados en estas células anteriormente mencionadas se unen con quimiocinas tales como CCL2 (se une con CCR2), CCL3, CCL5, CCL9 (se une con CCR1), CCL11 (se une con CCR3), CCL12 (se une con CCR2), CCL-14 (se une con CCR1), CCL16 (se une con CCR1), CCL28 (se une con CCR3), CCL24 (se une con CCR3), CCL26 (se une con CCR3) y/o CXCL8 (se une con CXCR1 y CXCR2). Las quimiocinas MIP-1γ (CCL9), MRP-2 (CCL10), Mip-1δ (CCL15) y CCL23 parecen unirse solamente con CCR1. Las quimiocinas Eotaxina (CCL11) y CCL24 (Eotaxina 2) solamente se unen con CCR3. La quimiocina MIP1β (CCL4) solamente se une con CCR5. CXCR1 se une con CXCL6, CXCL7, CXCL8. CXCR2 se une con CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8.

40

45

50

55

60

CCR1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-C) 1. El ID del HGNC para este gen es 1602. El gen se localiza en la posición cromosómica

65

3p21. El símbolo previo y el nombre es CMKBR1, SCYAR1. Los sinónimos para este gen incluyen CD191, CKR-1, MIP1 • R. La secuencia de referencia de Entrez Gene para CCR1 es 1230 disponible el 13 de junio de 2011.

5 CCR2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-C) 2. El ID del HGNC para este gen es 1603. El gen está localizado en la posición cromosómica 3p21. El símbolo previo y el nombre para el gen es CMKBR2. Los sinónimos para este gen incluyen CC-CKR-2, CD192, CKR2, FLJ78302, MCP-1-R. La Secuencia de Referencia del NCBI es NM_001123041.2 disponible el 13 de junio de 2011.

10 CCR3 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-C) 3. El ID del HGNC para este gen es 1604. El gen está localizado en la posición cromosómica 3p21.3. El símbolo previo y el nombre para el gen es CMKBR3. Los sinónimos para este gen incluyen CC-CKR-3, CD193 y CKR3. La Secuencia de Referencia Genbank del CCR2 es AF247361.1 disponible el 13 de junio de 2011.

15 CCR5 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-C) 5. El ID del HGNC para este gen es 1605. El gen está localizado en la posición cromosómica 3p21. El símbolo previo y el nombre para el gen es CMKBR5. Los sinónimos para este gen incluyen CC-CKR-5, CD195 CKR-5, IDDM22 y CKR5. La secuencia de referencia de Entrez Gene para CCR5 es 1234 disponible el 13 de junio de 2011.

25 CXCR1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-X-C) 1. El ID del HGNC para este gen es 6026. El gen está localizado en la posición cromosómica 2q35. El símbolo previo y el nombre para el gen es CMKAR1, IL8RA, "receptor de interleucina 8, alfa". Los sinónimos para este gen incluyen CD181, CDw128a, CKR-1. La secuencia de referencia de CXCR1 es U11870.1 disponible el 13 de junio de 2011.

30 CXCR2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-X-C) 2. El ID del HGNC para este gen es 6027. El gen está localizado en la posición cromosómica 2q35. El símbolo previo y el nombre para el gen es IL8RB, "receptor de interleucina 8, beta". Los sinónimos para este gen incluyen CD182, CMKAR2. La secuencia de referencia de Genbank para CXCR2 es U11869.1 disponible el 13 de junio de 2011.

35 CCR7 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el receptor de quimiocinas (motivo C-C) 7. El ID del HGNC para este gen es 1608. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q12-q21.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es CMKBR7, EB11. Los sinónimos para este gen incluyen BLR2, CD197 y CDw197. La Secuencia de referencia de RefSeq para CCR7 es NM_001838.3 disponible el 13 de junio de 2011.

40 Las diversas realizaciones de los métodos de la invención pueden implicar interacciones de unión específicas con uno cualquiera o más de estos marcadores de superficie celular adicionales además de la retirada basada en la unión con CCR2. Pueden prepararse reactivos de unión adecuados para unirse específicamente con estos marcadores de superficie celular. El análisis de reactivos de unión específicos de CCR2 se aplica por lo tanto cambiando lo que deba cambiarse.

45 El tratamiento de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención puede dar como resultado el alivio o la mejora de los síntomas, la prevención de la progresión, la regresión de la afección o la recuperación completa. Los parámetros medibles de tratamiento exitoso incluyen uno o más, hasta todos, de función pulmonar con espirometría, PEF, biopsia pulmonar, Pulsoxímetro, PaO₂, paCO₂. En realizaciones específicas, un único tratamiento es suficiente para provocar un agotamiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o mayor hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de una o más de las células que expresan un receptor de quimiocinas específico, en particular uno o más de CCR2, de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse con referencia al agotamiento de una o más células que expresan CCR2. El tratamiento puede conducir a agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan CCR2, tales como monocitos, en ciertas realizaciones y más particularmente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 millones de células que expresan CCR2.

60 Uniéndose a la columna mediante la interacción de receptor de quimiocinas-reactivo de unión, se inmovilizan las células que expresan receptores de quimiocinas. Estas células inmovilizadas expresan receptores de quimiocinas desocupados adicionales, que pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes a los usados para captura. Estos receptores de quimiocinas adicionales pueden permitir quimiocinas en circulación que contribuyen a que se capture la afección inflamatoria de la sangre periférica. Por lo tanto, una reducción de los niveles de quimiocinas en circulación (específicos) puede proporcionar una medida de tratamiento exitoso.

65 La duración del tratamiento puede determinarse fácilmente por un experto en la materia y dependerá de factores

tales como el caudal de la sangre periférica. La duración del tratamiento puede estar ligada a la supervisión del tratamiento en sí mismo, considerándose el tratamiento completo una vez que un parámetro medible de tratamiento ha alcanzado un umbral definido. Puede emplearse cualquier parámetro adecuado como se analiza en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, el tratamiento puede considerarse completo cuando se ha alcanzado una

5 reducción de células que expresan CCR2, tal como una reducción del 50 % de una o más células que expresan CCR2. El sistema de aféresis puede manejarse a un caudal de aproximadamente 10-80 ml/min, o más específicamente entre aproximadamente 20 y 70 ml/min, o entre aproximadamente 30 y 60 ml/min. En realizaciones específicas, el tratamiento se realiza durante un periodo de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, etc., o cualquier intervalo de valores entremedias e incluyendo esas cantidades, minutos. El tratamiento

10 normalmente no está dirigido a retirar todas las células que expresan el receptor de quimiocinas en la sangre periférica, ya que se requiere un nivel basal de esas células en sujetos sanos. Sin embargo, se ha descubierto que solamente es necesario aplicar volúmenes de sangre bajos a las columnas de las diversas realizaciones de la invención para conseguir niveles eficaces de agotamiento de las células que expresan receptores de quimiocinas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, aproximadamente 10-80 % o más específicamente aproximadamente 20, 30, 40 o 50 %, o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de la sangre del paciente se aplica a la columna en un único tratamiento. El volumen de sangre que circula a través de la columna de aféresis o el sistema puede estar en el intervalo de aproximadamente 1000-3000 ml, tal como aproximadamente 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 o 2000 ml o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades. El tratamiento puede considerarse completo una vez que este volumen de sangre ha circulado. Pueden administrarse

20 anticoagulantes al paciente antes de cada sesión de tratamiento. Puede usarse una solución adecuada, tal como una solución salina estéril, que incluya opcionalmente un anticoagulante tal como heparina, para sensibilizar el sistema de aféresis (extracorpóreo). Puede añadirse un volumen adicional de anticoagulante al circuito al inicio de cada sesión de tratamiento, por ejemplo como una inyección de embolada.

25 En ciertas realizaciones, la invención se basa en un reactivo de unión que es capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas. Esta reacción de unión específica permite retirar células que expresen el receptor de quimiocinas de la sangre periférica del paciente cuando la sangre se pasa sobre el soporte sólido en el que o dentro del que se inmoviliza el reactivo de unión. Un receptor de quimiocinas específico de interés es CCR2. El reactivo de unión puede ser cualquier reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor en cuestión. Por "unión específica" se entiende que el reactivo de unión presenta suficiente especificidad de unión y afinidad/cinética de unión apropiadas para permitir la retirada de células que expresan CCR2 de la sangre periférica. Aunque no se descarta que el reactivo de unión sea capaz de unirse con otras moléculas, tales como otros receptores de quimiocinas, el reactivo de unión se unirá preferentemente con células que expresen uno o más de CCR2 y en particular con células que expresen mayores niveles de uno o más de CCR2 (como se define adicionalmente en el

30 presente documento). El reactivo de unión capaz de unirse específicamente con CCR2 puede ser un agonista o un antagonista de CCR2, respectivamente. Ya que la condición de enfermedad se basa en la regulación positiva de la expresión de o señalización mediante CCR2, en ciertas realizaciones el reactivo de unión capaz de unirse específicamente con CCR2 es un antagonista de CCR2, respectivamente. Las quimiocinas son normalmente, aunque no necesariamente, de forma exclusiva (particularmente en el caso de formas truncadas o modificadas)

40 agonistas de su receptor afín y actúan para activar las células que expresan el receptor relevante, como apreciaría un experto en la materia. Se considera en general que los anticuerpos contra el receptor de quimiocinas relevantes son antagonistas, como apreciará un experto en la materia. Los ejemplos específicos de reactivos de unión incluyen proteínas o polipéptidos, tales como anticuerpos y ligandos de receptores, en particular quimiocinas. El reactivo de unión puede ser una molécula de ácido nucleico en ciertas realizaciones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un aptámero. Los aptámeros de ácidos nucleicos son polinucleótidos de aproximadamente 15-40 nucleótidos de longitud. Pueden prepararse aptámeros de ácido nucleico usando el proceso SELEX (evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial) o cualquier otro proceso conocido por los expertos en la materia.

45 En otras realizaciones, el reactivo de unión puede ser un péptido y, en ciertos casos, un aptámero peptídico. Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento artificiales que consisten en una secuencia peptídica variable insertada en una proteína de armazón constante (Baines IC, Colas P. Peptide aptamers as guides for small molecule drug discovery. *Drug Discov Today*. 2006; 11: 334-341). Están disponibles varias metodologías, tales como presentación en fagos, presentación en ribosomas y sistemas de exploración de dos híbridos de levadura para exploración de una biblioteca de reactivos de unión basados en péptidos potenciales. De forma similar pueden usarse armazones proteicos basándose en dominios tales como fibronectinas, repeticiones de anquirina, proteína A, dominios SH3, lipocalinas y ubiquitina como el agente de unión. De nuevo varias tecnologías tales como presentación en fagos y presentación en ribosomas están disponibles para exploración de una biblioteca de agentes de unión basados en proteínas. De forma similar, pueden explorarse bibliotecas de compuestos químicos candidatos para unión específica con el receptor de quimiocinas relevante usando técnicas de exploración adecuadas

60 conocidas en este campo, que pueden ser exploraciones de alto rendimiento en ciertas realizaciones. El agente de unión candidato puede inmovilizarse en un soporte sólido y determinarse la capacidad del agente para conservar específicamente células que expresan el receptor de quimiocinas de interés o receptores de quimiocinas marcadas. Puede aplicarse una serie de tipos celulares a los soportes sólidos para confirmar la especificidad de unión, o como alternativa puede aplicarse una muestra mixta (tal como sangre periférica) al soporte sólido. La conservación del tipo celular de interés (que expresa el receptor de quimiocinas apropiado) puede confirmarse para identificar agentes de unión adecuados. Se analiza una serie de moléculas pequeñas antagonistas de CCR2 es analizan en Xia M y Sui Z

65

in Expert Opin Ther Pat. mar 2009; 19(3): 295-303 - Recent developments in CCR2 antagonists.

En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, el término “quimiocina” también comprende quimiocinas biotiniladas o marcadas de otro modo. El término “quimiocina” también comprende versiones modificadas y truncadas de la quimiocina y fragmentos de quimiocina a condición de que la forma modificada o truncada conserve su capacidad para unirse con su receptor afín (y por lo tanto permanezca funcional en el contexto de las diversas realizaciones de la invención). La quimiocina no requiere necesariamente conservar actividad biológica ya que lo que se requiere es afinidad de unión específica para CCR2. En ciertas realizaciones, la quimiocina carece de actividad biológica, por ejemplo con respecto a activación del receptor (CCR2). Pueden realizarse modificaciones para mejorar la síntesis de proteínas, por ejemplo uniformidad del producto y rendimiento. Como conocen los expertos en la materia, las modificaciones a modo de ejemplo pueden comprender adiciones, sustituciones, supresiones de aminoácidos u otras modificaciones de uno o más aminoácidos en la quimiocina. Las modificaciones pueden comprender sustitución del aminoácido de tipo silvestre con aminoácidos no naturales tales como norleucina (NLeu) y aminoácidos derivatizados tales como ácido piroglutámico (piroGlu). Dichas modificaciones pueden realizarse para minimizar la formación de productos secundarios durante el almacenamiento y uso de las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Pueden realizarse modificaciones para mejorar el marcaje, por ejemplo inclusión de un espaciador de polietilenglicol (PEG) para facilitar la biotinilación. La biotinilación y/o conjugación con fluorocromos u otros grupos de marcaje de la quimiocina se realiza de una manera que no afecta sustancialmente a la capacidad de unión del receptor. Se prefiere biotinilación específica de sitio u otro marcaje ya que el marcaje no selectivo de quimiocinas puede comprometer la actividad de unión al receptor. Se prefiere en general biotinilación u otro marcaje en o hacia el extremo C terminal de la proteína ya que los inventores han descubierto que las modificaciones en esta área están en general bien toleradas (con respecto a un efecto mínimo en la capacidad de unión al receptor). La biotinilación puede llevarse a cabo de forma específica de sitio en cualquier aminoácido adecuado. Los ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen lisina, ácido diaminopropiónico y ornitina. En general, puede hacerse referencia a Natarajan S *et al*, Int. J. Pept. Protein Res., 1992, 40, 567-74; Baumeister B, Int. J. Peptide Res. And Therapeutics, 2005, 11, 139-141; Bioconjugate techniques 2ª edición, Greg T. Hermanson.

Los truncamientos pueden implicar la supresión de aminoácidos N o C terminales según sea apropiado, o ambos. Normalmente, la versión truncada conservará los restos requeridos para que la quimiocina se pliegue correctamente, por ejemplo para conservar una estructura de plegamiento de quimiocinas, coherente con el requisito de que una versión truncada deba conservar la capacidad de unirse con el receptor relevante (expresado por (en la superficie de) un leucocito). Las moléculas de quimiocinas normalmente incluyen enlaces disulfuro entre los 1º y 3º y 2º y 4º restos de cisteína respectivamente, como entenderá un experto en la materia. Cuando se presentan secuencias en el presente documento, se supone que estos enlaces disulfuro se formarán en la proteína plegada (a no ser que se indique de otro modo). Las versiones truncadas pueden comprender cualquiera de entre 1 y 100 menos aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 4, 5, etc. aminoácidos, que la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre en ciertas realizaciones. Por supuesto, las versiones truncadas pueden comprender modificación adicional como se detalla en el presente documento. La versión modificada o truncada puede tener 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más identidad de secuencia de aminoácidos general con la quimiocina de tipo silvestre de longitud completa (cuando se cuenta una supresión como una diferencia en la secuencia de aminoácidos) en ciertas realizaciones. Sobre la secuencia común entre las moléculas (es decir los aminoácidos que no se han suprimido), puede haber 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos en ciertas realizaciones. La identidad de secuencia puede determinarse usando algoritmos conocidos, tales como análisis de BLAST o GAP (Programa GCG) (aplicando parámetros por defecto), que están libremente disponibles. Las quimiocinas pueden carecer del péptido señal N terminal que se escinde durante la síntesis *in vivo*.

Las quimiocinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la presente invención para unirse con CCR2 incluyen CCL2 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4 (CCL12) y MCP-5. Tanto MCP-1 como MCP-5 se unen solamente con el receptor de quimiocinas CCR2 y por lo tanto estas quimiocinas pueden preferirse en algunas realizaciones. Cada quimiocina es capaz de unirse con un receptor de quimiocina implicado en afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Más específicamente, cada uno de MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MCP-5 son útiles para retirar células que expresan CCR2 de la sangre de un paciente. Las quimiocinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la presente invención para unión con CCR1, CCR3 y/o CCR5 incluyen CCL5 (RANTES). RANTES es capaz de unirse con receptores de quimiocinas implicados en afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Más específicamente, RANTES es útil para retirar células que expresan CCR1, CCR3 y/o CCR5 de la sangre de un paciente.

Las quimiocinas descritas en mayor detalle en el presente documento (en referencia a las figuras relevantes y las secuencias de aminoácidos, como se expone en las SEQ ID NO) pueden aplicarse cada una de acuerdo con la presente invención.

Las quimiocinas modificadas y truncadas descritas en mayor detalle en el presente documento (en referencia a las secuencias de aminoácidos relevantes, como se expone en las SEQ ID NO y ejemplos experimentales adjuntos)

pueden aplicarse cada una según la presente invención. Dichas formas modificadas pueden instruir al experto en la materia con respecto a formas modificadas adicionales de las mismas quimiocinas y otras quimiocinas que pueden ser adecuadas para su uso en la invención. Las quimiocinas muestran homología de secuencia variable que varía de menos del 20 % a más del 90 % pero comparten todas estructuras terciarias muy similares que consisten en un extremo N terminal desordenado, seguido de un bucle largo (el bucle N) que termina en una hélice 3_{10} , una lámina β de 3 cadenas y una hélice C terminal. La topología general se estabiliza por enlaces disulfuro. Esta estructura terciaria común es un elemento común de la familia de proteínas quimiocinas (Fernandez EJ y Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 202, 42, 469-99; Allen SJ *et al*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820).

- 5
10
15
- Los truncamientos dentro de esta región N terminal pueden mantener la unión con el receptor pero pueden conducir a un cambio o una pérdida de función (por ejemplo, Zhang YJ *et al*, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 15918; Gong J-H y Clark-Lewis I., *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 631-640; Fernandez EJ y Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 202, 42, 469-99; Allen SJ *et al*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820). Los truncamientos en el extremo C terminal de la quimiocina también pueden realizarse y mantener la actividad de unión al receptor (Treating Inflammatory Disorders, Ola Winqvist y Graham Cotton, documento WO2010/02931).

En otras realizaciones, se usan fragmentos y variantes de quimiocinas en los dispositivos y métodos como se desvela en el presente documento. Más particularmente, dichos fragmentos y variantes conservan la capacidad de unirse específicamente con su receptor de quimiocinas afín. Los expertos en la materia saben que las quimiocinas comparten dominios de unión a receptor específicos, incluyendo un pliegue monomérico similar, caracterizado, por ejemplo, por un dominio amino terminal desordenado, seguido de una región núcleo conservada, que consiste en el denominado "bucle N", tres láminas β antiparalelas y una hélice α carboxilo terminal. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que la interacción de quimiocina-receptor de quimiocina es un mecanismo de dos etapas, en el que el núcleo de la quimiocina interacciona en primer lugar con un sitio de unión formado por los dominios extracelulares del receptor, mientras que se forma otra interacción entre el extremo N terminal de la quimiocina y un segundo sitio de unión en el receptor para desencadenar la activación del receptor. Por lo tanto, se pretende que un "fragmento", tal como un fragmento funcional de quimiocina signifique una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que conserva unión por su receptor afín. El fragmento puede incluir, por ejemplo, la región de plegamiento monomérico, o partes de la misma tales como el dominio amino terminal, la región de núcleo conservado y/o el "bucle N", las láminas β antiparalelas y/o la hélice α carboxilo terminal o combinaciones y porciones de las mismas.

- 20
25
30
- Además, se reconoce que un polipéptido puede mutarse considerablemente sin alterar materialmente una o más de las funciones del polipéptido, por ejemplo, sin alterar la unión específica y/o el plegamiento de la proteína. Se sabe bien que el código genético está degradado, y por lo tanto diferentes codones codifican los mismos aminoácidos. Incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácidos, la mutación puede ser conservativa y no tener ninguna influencia material en las funciones esenciales de una proteína (véase, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* 4^a Ed., W. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1995). Esto incluye, por ejemplo, la capacidad de la proteína para unirse e interactuar con otras proteínas, tales como una quimiocina truncada que se une con su receptor afín.

- 35
40
45
50
- En algunos ejemplos, parte de una cadena polipeptídica puede suprimirse sin alterar o eliminar todas sus funciones. Por ejemplo, la supresión de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo C y/o N terminal, tales como supresiones de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos en el extremo C y/o N terminal, puede dar como resultado una quimiocina que conserva la función, tal como unión específica de su receptor afín. Dichos truncamientos pueden conservar la función completa de una proteína completa y/o pueden permitir funciones conservadas tales como interacciones proteína-proteína como en el caso de interacciones ligando-receptor. Las quimiocinas que tienen supresiones de un número pequeño de aminoácidos, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 % (tal como menos de aproximadamente 18 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 2 % o menos de aproximadamente 1 %) del número total de aminoácidos en la quimiocina de tipo silvestre también pueden usarse en los métodos y dispositivos desvelados en el presente documento. Además, pueden realizarse inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, por ejemplo, añadiendo marcadores epitópicos, sin alterar o eliminar sus funciones (Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1998). Otras modificaciones que pueden realizarse sin alterar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones bioquímicas y químicas *in vivo* o *in vitro* o la incorporación de aminoácidos poco habituales. En algunos ejemplos, un fragmento funcional de una quimiocina puede consistir en aproximadamente 10 o más, aproximadamente 25 o más, aproximadamente 50 o más, aproximadamente 75 o más, aproximadamente 100 o más, aproximadamente 125 o más, aproximadamente 150, aproximadamente 175 o más o aproximadamente más o 200 o más restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de quimiocina.

- 55
60
65
- En algunos ejemplos, la quimiocina o un fragmento funcional de la misma tiene un aminoácido que tiene al menos aproximadamente 60 % o 65 % de identidad de secuencia, aproximadamente 70 % o 75 % de identidad de secuencia, aproximadamente 80 % u 85 % de identidad de secuencia, aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia sobre su longitud completa en comparación con una secuencia de referencia, tal como las detalladas en el presente documento, por ejemplo usando el BLAST con huecos NCBI Blast 2.0 ajustado a parámetros por defecto. También puede realizarse alineamiento manualmente por

inspección. También pueden realizarse una o más modificaciones de aminoácidos conservativas en la secuencia de aminoácidos de quimiocinas, bien sea una adición, una supresión o una modificación, que no altere sustancialmente la estructura tridimensional del polipéptido o su capacidad para unirse con el receptor afín. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservativa no afecta a la capacidad de la quimiocina para unirse específicamente con su receptor afín. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Los péptidos, tales como quimiocinas y fragmentos de las mismas, pueden modificarse por diversas técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad o función, tal como unión con un receptor afín, que los péptidos no modificados, y opcionalmente que tienen otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse grupos de ácido carboxílico de la proteína, bien carboxilo terminales o de cadena lateral, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificados para formar un éster C1-C16, o convertirse en una amida de fórmula NR₁R₂ en la que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo C1-C16, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, bien amino terminales o bien de cadena lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, tal como las sales de HCl, HBr, acética, benzoica, toluenosulfónica, maleica, tartárica y otras orgánicas, o puede modificarse a alquilo C1-C16 o dialquilamino o convertirse adicionalmente en una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales peptídicas pueden convertirse en alcoxi C1-C16 o en un éster C1-C16 usando técnicas bien reconocidas. El fenilo y los anillos fenólicos de las cadenas laterales peptídicas pueden sustituirse con uno o más átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, o con alquilo C1-C16, alcoxi C1-C16, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos de metileno de las cadenas laterales peptídicas pueden extenderse a alquilenos C2-C4 homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida. Los expertos en la materia también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de la presente divulgación para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que da como resultado estabilidad potenciada. Por ejemplo, puede añadirse una cisteína C o N terminal al péptido, de modo que cuando se oxide el péptido contendrá un enlace disulfuro, generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación de péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres carboxilo y amino terminales.

Las realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas también están dentro del alcance de la presente divulgación, por lo que la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos peptidomiméticos y organomiméticos imitan la disposición tridimensional de la cadena principal peptídica y cadenas laterales de aminoácidos componentes, dando como resultado dichos peptidomiméticos y organomiméticos de las proteínas de la presente divulgación. Para aplicaciones de modelización por ordenador, un farmacóforo es una definición tridimensional, idealizada, de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Pueden diseñarse peptidomiméticos y organomiméticos para ajustarse a cada farmacóforo con software de modelización por ordenador actual (usando diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman y Groves, eds., 1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165 174 y Principles of Pharmacology Munson (ed.) 1995, C. 102, para descripciones de técnicas usadas en CADD. También se incluyen, dentro del alcance de la divulgación, miméticos preparados usando dichas técnicas.

Los aminoácidos en un péptido, un polipéptido o una proteína en general están unidos químicamente entre sí mediante enlaces amida (CONH). Adicionalmente, los aminoácidos pueden estar unidos entre sí por otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CHH₂SO- (estos y otros pueden encontrarse en Spatola, en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo 1983), Vol. 1, n.º 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci pp. 463-468, 1980; Hudson, *et al.*, Int J Pept Prot Res 14: 177-185, 1979; Spatola *et al.* Life Sci 38: 1243-1249, 1986; Harm J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314, 1982; Almquist *et al.* J. Med. Chem. 23: 1392-1398, 1980; Jennings-White *et al.* Tetrahedron Lett 23: 2533, 1982; Holladay *et al.* Tetrahedron. Lett 24: 4401-4404, 1983; y Hruby Life Sci 31:189-199, 1982.

CCL2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 2, también conocido como MCP-1. El ID del HGNC para este gen es 10618. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2-q21.1. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA2 "citocina inducible pequeña A2 (proteína quimiotáctica de monocitos 1, homóloga de Sig-je de ratón)". Los sinónimos para este gen incluyen GDCF-2, HC11, MCP1, MGC9434, SMC-CF, "proteína quimioatrayente de monocitos 1", "factor activador y quimiotáctico de monocitos", "proteína quimiotáctica de monocitos 1, homólogo de Sig-je de ratón", "proteína secretora de monocitos JE", "subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 2". La secuencia de referencia de Genbank para CCL2 es BC009716.1 disponible el 13 de junio de 2011.

- 5 CCL4 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 4. El ID del HGNC para este gen es 10630. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q12-q23. El símbolo previo y el nombre para el gen es LAG1, SCYA4, "citocina inducible pequeña A4 (homóloga de Mip-1b de ratón)". Los sinónimos para este gen incluyen Act-2, AT744.1, MIP-1-beta. La secuencia de referencia de Genbank para CCL4 es M23502.1 disponible el 13 de junio de 2011.
- 10 CCL8 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 8, también conocido como MCP-2. El ID del HGNC para este gen es 10635. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA8, "subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 8 (proteína quimiotáctica de monocitos 2)". Otro sinónimo para este gen es HC14. La secuencia de referencia de Genbank para CCL8 es X99886.1 disponible el 13 de junio de 2011.
- 15 CCL7 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 7, también conocido como MCP-3. El ID del HGNC para este gen es 10634. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2-q12. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA6, SCYA7, "citocina inducible pequeña A7 (proteína quimiotáctica de monocitos 3)". Los sinónimos para este gen incluyen FIC, MARC, MCP-3, MCP3, NC28, "proteína quimioatrayente de monocitos 3", "proteína quimiotáctica de monocitos 3". La secuencia de referencia de Genbank para CCL7 es AF043338 disponible el 13 de junio de 2011.
- 20 CCL13 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 13, también conocido como MCP-4. El ID del HGNC para este gen es 10611. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA13, "subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 13". Los sinónimos para este gen incluyen CKb10, MCP-4, MGC17134, NCC-1, SCYL1. La secuencia de referencia de Genbank para CCL13 es AJ001634 disponible el 13 de junio de 2011.
- 25 MCP-5 es una quimiocina de ratón en la familia de quimiocinas CC. También se conoce como ligando de quimiocina (motivo C-C) 12 (CCL12) y, debido a su similitud con la quimiocina humana MCP-1, se denomina en ocasiones quimiocina relacionada con MCP-1. El gen para MCP-5 se encuentra en un grupo de quimiocinas CC en el cromosoma 11 de ratón. La secuencia de referencia del NCBI para CCL12 es NC_000077.5. El símbolo previo SCYA12 está disponible el 13 de junio de 2011.
- 30 CCL3 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 3, también conocido como MIP-1a. El ID del HGNC para este gen es 10627. El gen está localizado en la composición cromosómica 17q12. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA3, "citocina inducible pequeña A3 (homóloga de Mip-1a de ratón)". Los sinónimos para este gen incluyen G0S19-1, LD78ALPHA, MIP-1-alfa. La secuencia de referencia de Genbank para CCL3 es M23178.1 disponible el 13 de junio de 2011.
- 35 CCL5 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 5, también conocido como RANTES. El ID del HGNC para este gen es 10632. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2-q12. El símbolo previo y el nombre para el gen es D17S136E, SCYA5, "citocina inducible pequeña A5 (RANTES)". Los sinónimos para este gen incluyen "quimiocina beta RANTES", MGC17164, RANTES, "regulada tras activación, normalmente expresada en T y supuestamente secretada", "SIS-delta", SISd, "subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 5", "proteína específica de células T p288", "proteína RANTES específica de células T", TCP228. La secuencia de referencia de Genbank para CCL5 es AF043341.1 disponible el 13 de junio de 2011.
- 40 IL8 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para interleucina 8, también conocido como CXCL8. El ID del HGNC para este gen es 6025. El gen está localizado en la posición cromosómica 4q13-q21. Los sinónimos para este gen incluyen 3-10C, AMCF-I, b-ENAP, "ligando de quimiocina (motivo CXC) 8", CXCL8, GCP-1, IL-8, K60, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAF, NAP-1, SCYB8, TSG-1. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL8 es Y00787.1 disponible el 13 de junio de 2011.
- 45 CCL11 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 11, también conocido como eotaxina. El ID del HGNC para este gen es 10610. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q21.1-q21.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA11, "subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 11 (eotaxina)". Los sinónimos para este gen incluyen MGC22554 y "eotaxina-1". La secuencia de referencia de Genbank para CCL11 es AB063614.1 disponible el 13 de junio de 2011.
- 50 CCL15 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 15, también conocido como HCC-2 y Lkn-1. El ID del HGNC para este gen es 10613. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA15, "subunidad A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 15". Los sinónimos para este gen incluyen
- 55
- 60
- 65

“quimiocina CC 3”, “quimiocina CC-2”, HCC-2, HMRP-2B, “leucotactina 1”, Lkn-1, “proteína inflamatoria de macrófagos 5”, “MIP-1 delta”, MIP-1d, MIP-5, NCC-3, SCYL3. La secuencia de referencia de Genbank para CCL15 es AF031587.1 disponible el 13 de junio de 2011.

5 CCL14 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 14. El ID del HGNC para este gen es 10612. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA14, “subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 14”. Los sinónimos para este gen incluyen CKb1, HCC-1, HCC-3, MCIF, NCC-2, SCYL2. La secuencia de referencia de Genbank para CCL14 es Z49270.1 disponible el 13 de junio de 2011.

10 CCL16 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 16. El ID del HGNC para este gen es 10614. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA16, “subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 16”. Los sinónimos para este gen incluyen CKb12, HCC-4, LCC-1, LEC, LMC, Mtn-1, NCC-4, SCYL4. La secuencia de referencia de Genbank para CCL16 es AB007454.1 disponible el 13 de junio de 2011

20 CCL18 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 18 (pulmonar y regulado por activación). El ID del HGNC para este gen es 10616. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA18, “subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 18, pulmonar y regulado por activación”. Los sinónimos para este gen incluyen AMAC-1, CKb7, DC-CK1, DCCK1, MIP-4, PARC. La secuencia de referencia de Genbank para CCL18 es Y133710.1 disponible el 13 de junio de 2011.

25 CCL23 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 23. El ID del HGNC para este gen es 10622. El gen está localizado en la posición cromosómica 17q11.2. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA23, “subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 23”. Los sinónimos para este gen incluyen Ckb-8, CKb8, MIP-3, MPIF-1. La secuencia de referencia de Genbank para CCL23 es U58913.1 disponible el 13 de junio de 2011.

30 CCL24 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 4, también conocido como eotaxina-2 y MPIF-2. El ID del HGNC para este gen es 10623. El gen está localizado en la posición cromosómica 7q11.23. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA24, “subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 24”. Los sinónimos para este gen incluyen “CK-beta-6”, Ckb-6, MPIF-2, MPIF2, “eotaxina-2”, “factor inhibidor de progenitor mielóide 2”. La secuencia de referencia de Genbank para CCL24 es U85768.1 disponible el 13 de junio de 2011

40 CCL26 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-C) 26, también conocido como eotaxina-3. El ID del HGNC para este gen es 10625. El gen está localizado en la posición cromosómica 7q11.22. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA26, “subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 26”. Los sinónimos para este gen incluyen “quimiocina CC IMAC”, IMAC, MIP-4a, MIP-4alfa, TSC-1, “quimiocina N1”, “eotaxina-3”, “proteína inflamatoria de macrófago 4 alfa”, “citocina inducible pequeña A26”, “quimiocina del estroma tímico 1”. La secuencia de referencia de Genbank para CCL26 es AF124601.1 disponible el 13 de junio de 2011.

45 CXCL1 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 1 (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa). El ID del HGNC para este gen es 4602. El gen está localizado en la posición cromosómica 4q13.3. El símbolo previo y el nombre para el gen es “proteína secretora de fibroblastos”, FSP, GRO1, “oncogén GRO1 (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa)”, MGSA. Los sinónimos para este gen incluyen GROa, MGSA-a, NAP-3, SCYB1. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL1 es J03561.1 disponible el 13 de junio de 2011.

50 CXCL2 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 2. El ID del HGNC para este gen es 4603. El gen está localizado en la posición cromosómica 4q13.3. El símbolo previo y el nombre para el gen es GRO2, “oncogén GRO2”. Los sinónimos para este gen incluyen CINC-2a, GROb, MGSA-b, MIP-2a, SCYB2. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL2 es M36820.1 disponible el 13 de junio de 2011.

60 CXCL3 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 3. El ID del HGNC para este gen es 4604. El gen está localizado en la posición cromosómica 4q21. El símbolo previo y el nombre para el gen es GRO3, “oncogén GRO3”. Los sinónimos para este gen incluyen CINC-2b, GROg, MIP-2b, SCYB3. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL3 es M36821.1 disponible el 13 de junio de 2011.

65 CXCL5 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 5. El ID del HGNC para este gen es 10642. El gen está localizado en la posición

cromosómica 4q13.3. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYB5, "subfamilia B de citocina inducible pequeña (Cys-X-Cys), miembro 5 (péptido activador de neutrófilos derivado del epitelio 78)". Un sinónimo de este gen es ENA-78. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL5 es X78686.1 disponible el 13 de junio de 2011.

5 CXCL6 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 6. El ID del HGNC para este gen es 10643. El gen está localizado en la posición cromosómica 4q13.3. El símbolo previo y el nombre para el gen es ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2). Los sinónimos para este gen incluyen CKA-3, GCP-2. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL6 es U83303.1 disponible el 13 de junio de 2011.

10 PPBP es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para proteína básica proplaquetaria (ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 7), también conocido como CXCL7. El ID del HGNC para este gen es 9240. El gen está localizado en la posición cromosómica 412-q13. El símbolo previo y el nombre para el gen es THBGB1. Los sinónimos para este gen incluyen b-TG1, Beta-TG, "tromboglobulina beta", "péptido activador del tejido conectivo III", CTAP3, CTAPIII, CXCL7, LA-PF4, LDGF, MDGF, NAP-2, NAP-2-L1, "péptido activador de neutrófilos 2", PBP, "proteína básica de plaquetas", SCYB7, TGB, TGB1. La secuencia de referencia de Genbank para PPBP es M54995.1 disponible el 13 de junio de 2011.

20 CXCL11 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 11. El ID del HGNC para este gen es 10638. El gen está localizado en la posición cromosómica 4q21. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYB9B, SCYB11, "subfamilia B de citocina inducible pequeña (Cys-X-Cys), miembro 11".

25 Los sinónimos para este gen incluyen b-R1, H174, I-TAC, IP-9. La secuencia de referencia de Genbank para CXCL11 es U66096.1 disponible el 13 de junio de 2011.

30 CCL19 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de la HUGO para el ligando de quimiocina (motivo C-C) 19, también conocido como MIP-3b. El ID del HGNC para este gen es 10617. El gen está localizado en la posición cromosómica 9p13. El símbolo previo y el nombre para el gen es SCYA19, "subfamilia A de citocina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 19". Los sinónimos para este gen incluyen "quimiocina beta exodus 3", "ligando de quimiocina CC 19", "CK beta-11", CKb11, "quimiocina de ligando EB11", ELC, exodus-3 "proteína inflamatoria de macrófagos 3-beta", MIP-3b. La secuencia de referencia de Genbank para CCL19 es AB000887.1 disponible el 13 de junio de 2011.

35 Se describen en detalle en el presente documento ejemplos de quimiocinas modificadas adecuadas de las diversas realizaciones de la invención que contienen modificaciones y/o truncamientos y adaptadas específicamente para su uso en la invención. Se ha producido MCP-1 con el resto 75, que puede ser una lisina, como el sitio de biotinylación en la quimiocina (numeración basada en la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2). La biotinylación permite la inmovilización de MCP-1 en un soporte sólido (mediante una interacción de biotina-avidina). La secuencia de aminoácidos básica de MCP-1, que incluye una secuencia líder de 23 aminoácidos se expone como SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de la proteína madura se expone como SEQ ID NO: 2. Los inventores han determinado que las quimiocinas pueden presentar propiedades de unión mejoradas cuando la quimiocina se biotinyla mediante un grupo espaciador. El espaciador puede evitar que el grupo de biotina influya en la afinidad de unión de la quimiocina. Puede emplearse cualquier grupo espaciador adecuado. Modificaciones adicionales pueden proporcionar a la molécula propiedades ventajosas. La invención también se refiere a derivados de quimiocinas de MCP-1 truncadas. La secuencia de aminoácidos de la versión truncada se expone como SEQ ID NO: 3.

50 En consecuencia, en ciertas realizaciones la invención también proporciona una quimiocina MCP-1 modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en la que se ha realizado una o más de las siguientes modificaciones:

- a) el resto de glutamina 1 de SEQ ID NO: 2 se ha reemplazado con piroglutamina
- b) el extremo C terminal se produce como un derivado de amida (esto puede conseguirse por síntesis en un enlazador de amida)
- 55 c) el resto (de región C terminal) en la posición 98 de SEQ ID NO: 1 o la posición 75 de SEQ ID NO: 2 o la posición 67 de SEQ ID NO: 3, que puede ser un resto de lisina u ornitina u otro resto adecuado para marcaje, se biotinyla, opcionalmente mediante un grupo espaciador, para permitir la inmovilización de la quimiocina en un soporte sólido; y/o
- 60 d) el resto de metionina en la posición 87 de SEQ ID NO: 1 o la posición 64 de SEQ ID NO: 2 o la posición 56 de SEQ ID NO: 3 se ha reemplazado por norleucina.

65 El aminoácido (región C terminal), que puede ser un resto de lisina o un equivalente funcional, en la posición 98 de SEQ ID NO: 1 o en la posición 75 de SEQ ID NO: 2 o en la posición 67 de SEQ ID NO: 3 puede biotinylarse mediante un grupo espaciador adecuado, tal como un grupo espaciador de polietilenglicol (PEG), para permitir la inmovilización de la quimiocina en un soporte sólido. En realizaciones específicas, el espaciador de PEG es ácido

3,6-dioxo amino-octanoico. La secuencia y biotilación de las quimiocinas MCP-1 modificadas de la invención se muestran en las Figuras 7 a 9, respectivamente. Las quimiocinas MCP-1 modificadas pueden ser agonistas o antagonistas de la actividad de CCR2. Pueden ensayarse con respecto a actividad en un ensayo adecuado, tal como ensayos basados en células. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas pueden determinarse en un ensayo basado en células funcionales en receptor CCR2 humano.

MCP-5 solamente se une con CCR2 y debería ser selectiva en su retirada de células que expresan CCR2. La secuencia de aminoácidos de longitud completa, incluyendo el péptido señal, se expone como SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-5 procesada en el extremo N terminal es de 82 aminoácidos de longitud y se expone como SEQ ID NO: 5. Un alineamiento de secuencia de aminoácidos sugiere que MCP-5 tiene una extensión C terminal en comparación con la secuencia de aminoácidos de MCP-1. Los resultados de este alineamiento se muestran en la Figura 10. Pueden por lo tanto sintetizarse versiones truncadas en el extremo C terminal de MCP-5. Esta versión truncada comprenderá, consistirá esencialmente en o consistirá en los restos de MCP-5 1-76, expuestos como SEQ ID NO: 6.

En consecuencia, en ciertas realizaciones la invención también proporciona una quimiocina MCP-5 modificada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 en la que el resto de isoleucina en la posición 97 de SEQ ID NO: 4 o en la posición 75 de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 se ha reemplazado con lisina. En ciertas realizaciones, la quimiocina MCP-5 modificada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. La quimiocina MCP-5 modificada puede estar biotilada en el resto de lisina (o un equivalente funcional) en la posición 97 de SEQ ID NO: 4 o en la posición 75 de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. La biotilación puede ser mediante un grupo espaciador adecuado. Los ejemplos específicos del grupo espaciador incluyen un espaciador de PEG, opcionalmente ácido 3,6-dioxo amino-octanoico. En algunas realizaciones, la expresión C terminal se produce como un derivado de amida. Esto puede conseguirse por síntesis en un enlazador de amida. En ciertas realizaciones, la quimiocina MCP-5 modificada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia y biotilación mostradas en la Figura 11. La quimiocina MCP-5 modificada puede ser un agonista o un antagonista de la actividad de CCR2. Pueden ensayarse con respecto a actividad en un ensayo adecuado, tal como ensayos basados en células. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas pueden determinarse en un ensayo basado en células funcionales en el receptor CCR2 humano.

Un ejemplo adicional de una quimiocina de las diversas realizaciones de la invención que contiene modificaciones y específicamente adaptada para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase ejemplo posterior). El CCL2 modificado (MCP-1) corresponde a los restos 1 a 76 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y por lo tanto conserva el plegamiento de quimiocina (SEQ ID NO: 10). La Gln en el extremo N terminal de la proteína (Gln1) se sustituye con piroglutamina para evitar que se generen especies mixtas de Gln N terminal y piroGlu. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea mediante fabricación y uso de columna. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como el resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 11). Puede incorporarse un espaciador adecuado, tal como un espaciador de PEG, entre la funcionalidad ε amino y la biotina. La versión biotilada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Por lo tanto, en otras realizaciones, la invención también se refiere a una quimiocina modificada que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

SEQ ID NO: 10: XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC ADPKQKWVQDSM-DHLDKQTQTPKT

X = piroGlu o Gln

y/o SEQ ID NO: 12: XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC ADPKQK-WVQDSMDHLDKQTQTPXT

X1 = piroGlu o Gln

X75 es un resto de aminoácido que puede biotilarse, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, opcionalmente K (PEG-Biotina)

Pueden sintetizarse quimiocinas útiles en las diversas realizaciones de la invención mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, las quimiocinas se sintetizan químicamente ya que esto facilita la modificación y el marcaje, etc. Sin embargo, también pueden emplearse enfoques basados en ADN recombinante en combinación con tecnologías de marcaje y modificación apropiadas según se requiera. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica las quimiocinas de las diversas realizaciones de la invención. En ciertas realizaciones la invención también se refiere a un vector que contiene dicha molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que contiene el vector. El vector puede comprender adicionalmente un promotor adecuado unido operativamente con la molécula de ácido nucleico, para facilitar la transcripción de la molécula de ARNm correspondiente. La célula hospedadora puede ser capaz de expresar la proteína por transcripción y traducción de la molécula de ácido nucleico que codifica una quimiocina de

las diversas realizaciones de la invención.

Las quimiocinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden biotinilarse por métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en el documento WO 00/50088 A2. Como se ha indicado anteriormente, es preferible el marcaje específico de sitio de las quimiocinas de las diversas realizaciones de la invención, aunque puede emplearse cualquier técnica de marcaje que no afecte significativamente a la capacidad de unión a receptor de la quimiocina. Están disponibles en el mercado diversas quimiocinas biotiniladas de forma específica de sitio y nativas, por ejemplo de Almac, Craigavon, Reino Unido. En realizaciones específicas la o las quimiocinas se biotinilan mediante un grupo espaciador. El espaciador puede emplearse para evitar que el grupo de biotina influya en la actividad de la quimiocina, en particular unión de la quimiocina con su receptor afín. Puede emplearse cualquier espaciador adecuado que facilite la conservación de propiedades de unión a receptor de la quimiocina en las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, en las realizaciones específicas descritas anteriormente, pueden emplearse espaciadores distintos de espaciadores de PEG, según sea apropiado. En realizaciones específicas, el espaciador es un espaciador de polietilenglicol (PEG). Se ha mostrado que PEG es un espaciador eficaz que permite la unión de biotina con la quimiocina (que después puede inmovilizarse en el soporte sólido mediante interacción con estreptavidina) sin comprometer la capacidad de unión al receptor.

En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención el término "anticuerpo" incluye todas las inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina con afinidad de unión específica por el receptor de quimiocina relevante (incluyendo por ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de los mismos y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones). Las inmunoglobulinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la invención incluyen isotipos de IgG. Los anticuerpos útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden ser de origen monoclonal o policlonal, pero son normalmente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos o versiones humanizadas de anticuerpos no humanos, o anticuerpos quiméricos. Están bien establecidas diversas técnicas para humanización de anticuerpos y puede emplearse cualquier técnica adecuada. El término "anticuerpo" también puede referirse a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une con un epitopo de un antígeno, y se extiende a todos los derivados de anticuerpo y fragmentos que conservan la capacidad para unirse específicamente con el receptor de quimiocinas relevante. Estos derivados y fragmentos pueden incluir fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de un único dominio, fragmentos Fc, etc. El término anticuerpo abarca anticuerpos constituidos por cadenas tanto pesadas como ligeras, pero también anticuerpos de (solamente) cadena pesada. En realizaciones específicas, los anticuerpos pueden modificarse técnicamente para ser específicos para más de un receptor de quimiocinas, por ejemplo biespecíficos para permitir la unión con dos receptores de quimiocinas diferentes. Se enumeran en la tabla 1 posterior anticuerpos disponibles en el mercado adecuados que se unen con los receptores de quimiocinas de interés. Pueden estar marcados o no. Puede hacerse referencia en general a "Antibodies a laboratory manual": por E Harlow y D Lane. pág. 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.

Tabla 1. Anticuerpos marcados con fluoróforo disponibles en el mercado contra receptores de quimiocinas específicos

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR2	PerCP Cy5.5	Biolegend
CCR1	Alexa Fluor 647	Biolegend
CCR3	PE	Biolegend
CCR5	PE	Biolegend
CXCR1	APC	Biolegend
CXCR2	PE	Biolegend
CCR7	PerCP Cy5.5	Biolegend

Se describen anticuerpos anti CCR2 por ejemplo en el documento WO 2010/021697, incorporado en el presente documento por referencia. Ejemplos adicionales de anticuerpos potencialmente útiles incluyen MLN-1202, un anticuerpo monoclonal anti CCR2 que se está sometiendo actualmente a ensayos clínicos (Millennium Pharmaceuticals).

Las células que expresan receptores de quimiocinas pueden ser por lo tanto dianas usando agentes de unión alternativos, tales como anticuerpos u otros compuestos químicos, como se definen en el presente documento, en lugar del compañero de unión de quimiocinas natural. Este enfoque es un nuevo enfoque para tratar afecciones inflamatorias.

En consecuencia, en ciertas realizaciones, la invención también proporciona una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente en el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa el receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina.

5 El reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor de quimiocinas puede ser un agonista o un antagonista del receptor de quimiocinas. En realizaciones específicas, el reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor de quimiocinas se selecciona de un anticuerpo y un compuesto químico.

10 En otras realizaciones la invención proporciona también por lo tanto un método para tratar una afección inflamatoria que comprende aplicar sangre periférica de un paciente/sujeto a una columna de aféresis como se ha definido anteriormente (una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente en el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa el receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina) retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica del paciente/sujeto. El método puede comprender devolver la sangre de la que se han agotado las células que expresan receptores de quimiocinas al paciente/sujeto.

20 De forma similar, en otras realizaciones la invención proporciona un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en el que el reactivo de unión se inmoviliza en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis como se ha definido anteriormente (una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente en el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa el receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente/sujeto, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina), a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica del paciente.

30 Estos aspectos de las diversas realizaciones de la invención pueden integrarse en los aspectos terapéuticos más centrados de las diversas realizaciones de la invención (es decir, tratamiento de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis y EPOC y diversos aspectos de las mismas) y por lo tanto, el resto de la divulgación, incluyendo todas las realizaciones específicas, se aplica cambiando lo que deba cambiarse.

35 Se conocen en la técnica materiales de soporte sólidos para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención. El "soporte sólido" se refiere, por ejemplo, a materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas, y pueden tomar la forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. Un material de soporte útil es uno que no activa células sanguíneas para hacerlas coagular o adherirse con el soporte a medida que se aplica sangre completa periférica al dispositivo. En ciertas realizaciones, se emplea un soporte tratado con un agente para proporcionarle propiedades anti coagulativas, en particular un soporte heparinizado. Como alternativa, la sangre del paciente puede tratarse con un anticoagulante tal como heparina antes de su aplicación al soporte. Los materiales de soporte útiles comprenden carbohidratos de alto peso molecular, en particular carbohidratos que tienen un peso molecular de 100 kDa o más, tales como agarosa, en forma de partículas, opcionalmente reticuladas, y celulosa. Otros materiales de soporte preferidos son polímeros, tales como poliestireno carboxilado y vidrio. El soporte de las diversas realizaciones de la invención puede proporcionarse en forma de partículas o fibras. Las partículas de soporte pueden tener forma regular, tales como esferas o perlas, o forma irregular. Pueden ser porosas o no porosas. Un tamaño de partícula promedio preferido del soporte es de 50 µm a 2 mm. En ciertas realizaciones se usa Sepharose™, una forma en perlas, reticulada, de agarosa, como matriz de columna. Se elige por su capacidad de distribución óptima y puede proporcionar una gran área disponible para unión de afinidad. Pueden proporcionarse soportes sólidos en forma de perlas magnéticas, con el reactivo de unión específico inmovilizado en las perlas magnéticas. Después de la captura de las células que expresan receptores de quimiocinas (CCR2) de la sangre, las perlas pueden retirarse de la sangre con la ayuda de un separador magnético apropiado.

55 Se conocen en la técnica métodos para inmovilizar reactivos de unión en un soporte sólido. Un reactivo de unión, tal como una quimiocina, un anticuerpo, un péptido, un ácido nucleico o un compuesto químico, puede inmovilizarse en el soporte de una manera directa o indirecta. La inmovilización puede ser por medio de un enlazador adecuado en algunas realizaciones. Un método preferido de inmovilización indirecta de un reactivo de unión, tal como una quimiocina, se basa en la interacción entre moléculas de biotina y avidina. La "avidina" o "molécula de avidina" se refiere a cualquier tipo de proteína que una específicamente con biotina con la exclusión sustancial de otras moléculas (pequeñas) que podrían estar presentes en una muestra biológica. Los ejemplos de avidina incluyen avidinas que están presentes de forma natural en la clara del huevo, proteína de semilla oleaginosa (por ejemplo, harina de soja) y grano (por ejemplo, maíz/trigo) y estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano. Por lo tanto, la biotilación del reactivo de unión y uso de una molécula de avidina tal como estreptavidina inmovilizada en el soporte sólido permite la unión fiable del reactivo de unión con el soporte sólido de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Específicamente, dicho método puede comprender proporcionar el reactivo de unión de forma biotilada, proporcionar un soporte sólido que tenga estreptavidina inmovilizada en su superficie, poner en contacto el soporte con una solución acuosa del reactivo de unión biotilado, y aclarar el soporte con un disolvente

acuoso. Además, también pueden utilizarse interacciones de pares de unión, tales como interacciones de anticuerpo-antígeno, para inmovilización indirecta de reactivo de unión en un soporte. En dichas realizaciones el soporte puede derivatizarse con un miembro de un par de unión, tal como un anticuerpo o fragmento, o derivado del mismo, como se define en el presente documento, que tiene afinidad conocida por una secuencia peptídica particular o hapteno de molécula pequeña. La incorporación del otro miembro del par de unión, tal como un antígeno, secuencia peptídica o el hapteno en o sobre el reactivo de unión facilita la inmovilización en un soporte sólido recubierto con el anticuerpo correspondiente o fragmento o derivado del mismo. Por lo tanto, el reactivo de unión puede modificarse para incluir la secuencia peptídica o el hapteno en la molécula lineal o puede añadirse como una cadena lateral o un marcador. Puede emplearse cualquier par de anticuerpo-antígeno adecuado. El fragmento de anticuerpo o derivado puede ser cualquier fragmento o derivado que conserve afinidad de unión específica por el antígeno apropiado. Los ejemplos incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, scFV, dominios VH, anticuerpos de un único dominio (tales como nanocuerpos), anticuerpos de cadena pesada y versión humanizada de anticuerpos no humanos etc. Pueden utilizarse otras interacciones de alta afinidad para inmovilización de reactivos de unión, siempre que el reactivo de unión pueda sintetizarse o derivatizarse con uno de los compañeros de interacción y el soporte sólido sintetizarse o derivatizarse con el otro compañero de interacción sin pérdida de actividad de unión (es decir unión del reactivo de unión con el receptor de quimiocina apropiado). Puede producirse inmovilización mediante esencialmente la misma interacción a la inversa en algunas realizaciones. Por lo tanto, el reactivo de unión que puede ser una quimiocina, por ejemplo, puede unirse a un anticuerpo como se define en el presente documento, y el soporte sólido derivatizarse con el antígeno. La quimiocina puede producirse como una proteína de fusión con el anticuerpo.

Como alternativa pueden inmovilizarse reactivos de unión, tales como quimiocinas y anticuerpos, directamente en un soporte sólido usando técnicas de bioconjugación establecidas en el campo. Por ejemplo la inmovilización directa de proteínas en bromuro de cianógeno activó soportes sólidos mediante funcionalidades amino dentro de la secuencia primaria de la proteína. Como alternativa, pueden usarse funcionalidades de sulfhidrilo dentro de proteínas para inmovilizar directamente la proteína en soportes derivatizados con alquil haluro o soportes que contienen funcionalidades de tiol libres. En realizaciones adicionales, pueden inmovilizarse directamente proteínas que contienen funcionalidades de α-tioéster en soportes que contienen restos de 1,2 amino tiol (por ejemplo cisteína N terminal) usando la reacción de ligamiento química nativa. Como alternativa pueden inmovilizarse proteínas modificadas con cetonas y aldehídos en soportes sólidos derivatizados con funcionalidades de hidrazinilo, hidrazida y aminoxi usando enlace de hidrazona/oxima que forma reacciones de ligamiento (y viceversa). Como alternativa puede usarse química "Click" para inmovilizar proteínas en soportes sólidos, por lo que la proteína y el soporte se derivatizan con las funcionalidades químicas mutuamente reactivas apropiadas (azidas y alquinos). En otras realizaciones puede usarse química de ligamiento de Staudinger para inmovilizar proteínas derivatizadas de forma apropiada en los soportes sólidos derivatizados de forma apropiada.

El soporte sólido está contenido dentro de o portado por la columna de aféresis. Por lo tanto, por "cargado" se entiende que la columna porta o contiene el soporte sólido de tal manera que la sangre (periférica) puede fluir a través de la columna en contacto con el soporte sólido. Por lo tanto, el soporte sólido proporciona una matriz dentro de la columna a través de la que fluye la sangre, de manera continua en ciertas realizaciones. Esto permite que las células que expresan el receptor de quimiocinas específico se retire de la sangre que pasa a través de la columna, de modo que la sangre que sale de la columna tiene agotadas las células que expresan receptores de quimiocinas específicos. En realizaciones específicas, la columna de aféresis se carga con un soporte que comprende estreptavidina inmovilizada en el soporte y uno o más reactivos de unión biotinilados, tales como quimiocinas, unidos con la estreptavidina en el soporte. El soporte sólido puede estar comprendido por un carbohidrato de alto peso molecular, opcionalmente reticulado, tal como agarosa.

Como se ha analizado anteriormente, el reactivo de unión se acopla con el soporte sólido. Las cantidades relativas de reactivo de unión pueden controlarse para asegurar que el acoplamiento entre el soporte sólido y el reactivo de unión sea inmediato, minimizando el riesgo de desacoplamiento del reactivo de unión del soporte sólido. Por lo tanto, se puede asegurar que haya un exceso relativo de sitios de inmovilización para el reactivo de unión en el soporte sólido. Como alternativa, o adicionalmente, después de inmovilización del reactivo de unión en el soporte sólido, el soporte sólido puede lavarse para retirar cualquier reactivo de unión no unido.

La columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como un tratamiento de leucaféresis para afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). La columna actúa para retirar específicamente monocitos o leucocitos que expresan CCR2 aprovechando la interacción entre CCR2 expresado en la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado en un soporte sólido contenido dentro de o portado por la columna. La columna general normalmente comprende, consiste en o consiste esencialmente en tres componentes combinados; 1) una carcasa que contiene o porta 2) el soporte sólido y 3) uno o más reactivos de unión (inmovilizados en la misma) que se unen específicamente con uno o más receptores de quimiocinas. La carcasa puede fabricarse de cualquier material adecuado para su uso clínico. En ciertas realizaciones la carcasa está compuesta de un material plástico. La carcasa incluye un sitio de flujo de entrada para la entrada de sangre y un sitio de flujo de salida para que la sangre (con células diana agotadas) salga de la columna. La carcasa puede diseñarse para mantener un flujo de sangre continuo a través de la matriz de soporte sólida. La carcasa (como se muestra por ejemplo en la Figura 3) puede incluir una parte superior que

comprende una placa de distribución (2) en el sitio de flujo de entrada (1) para extender la sangre uniformemente sobre el área de matriz completa. La placa de distribución puede actuar como una primera barrera de seguridad que evita que partículas mayores fluyan a través de la columna y al paciente. Sin embargo, la placa de distribución no es esencial y puede retirarse en algunas realizaciones para reducir la resistencia general en el sistema. La columna puede contener una o más unidades de filtro de seguridad (3 y 4) colocadas en los sitios de flujo de entrada (1) y/o flujo de salida (5) de la carcasa de plástico. Dichas unidades de filtro pueden actuar para evitar que partículas mayores que las células sanguíneas entren y/o salgan de la columna. Las unidades de filtro de seguridad pueden contener una pluralidad de filtros, tales como dos, tres o cuatro filtros diseñados para ser una barrera robusta y detener el paso de todas las partículas mayores que las células sanguíneas a través de la columna. La inclusión de filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos de la columna sirve para minimizar el riesgo de filtración de partículas al paciente, incluyendo en el caso de que el dispositivo se conecte incorrectamente lo que da como resultado flujo sanguíneo en la dirección opuesta a la pretendida. Los filtros de seguridad pueden comprender cualquier tamaño de poro adecuado para evitar que partículas mayores que células sanguíneas pasen a través de la columna, como entendería fácilmente un experto habitual en la materia. Están disponibles en el mercado filtros adecuados. En realizaciones específicas, el tamaño de poro del filtro o los filtros está entre aproximadamente 60 µm y 100 µm, más específicamente aproximadamente 80 µm. Los componentes de soporte sólido y reactivo de unión se analizan en más detalle en el presente documento.

El volumen de la carcasa se puede variar dependiendo de los volúmenes sanguíneos que se pretende que pasen a través de la columna. Normalmente, el volumen de la carcasa es de entre aproximadamente 40 ml y 200 ml, más específicamente de 50 ml a 150 ml o de 60 ml a 120 ml.

La columna se aplica en general en forma de un circuito de aféresis. En este contexto, el sistema general incluye la columna de aféresis, tubos y una bomba apropiada para bombear la sangre alrededor del circuito. El sistema se ilustra en la Figura 4. El paciente (1) está conectado al circuito extracorpóreo mediante agujas estériles a venas en los brazos derecho e izquierdo. Una bomba de solución salina (3) también está conectada y la solución salina se bombea con una bomba adecuada (2). Se extrae sangre de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estériles por la bomba sanguínea (4) y se pasa a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos puede conectarse a la columna mediante cualquier acoplamiento adecuado, tal como acoplamientos luer-lock de diálisis convencional. Los acoplamientos en la columna pueden estar codificados por colores para su correcto ensamblaje. Por ejemplo, tubos rojos para flujo de entrada a la parte superior de la columna roja y tubos azules para flujo de salida de vuelta al paciente. Puede estar presente un detector de aire (8) en el circuito. Pueden emplearse adicionalmente sensores de presión de entrada (5) y/o Pven (7) para supervisar la presión en el circuito.

Una bomba de aféresis, tal como la bomba 4008 ADS fabricada por Fresenius Medical Care o la bomba Adamonitor, puede supervisar el flujo de entrada y el flujo de salida del paciente. La bomba también puede supervisar la presión en la circulación extracorpórea. La bomba puede ser capaz de diferenciar aire por un captador de burbujas y detector de aire. Puede situarse un filtro de captura de coágulos dentro del captador de burbujas. La bomba también puede incorporar un detector óptico para distinguir entre luz, por ejemplo solución salina o aire presente en el sistema de tubos y oscuridad, por ejemplo sangre presente en el sistema de tubos.

Se muestra un diagrama esquemático de una bomba adecuada, que muestra el detector de aire y el filtro óptico en la figura 8. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba debe detenerse inmediatamente. Como alternativa o adicionalmente puede emitirse una alarma visual/auditiva.

Los métodos de tratamiento de las diversas realizaciones de la invención pueden por lo tanto basarse en un circuito extracorpóreo. Los métodos pueden considerarse métodos *ex vivo* o *in vitro* y definirse solamente con referencia a etapas realizadas fuera del paciente. En algunas realizaciones, sin embargo, el método comprende además, antes de la aplicación de la sangre a la columna, recoger sangre periférica del paciente. En una realización adicional, el método comprende además, después de la aplicación de la sangre a la columna, infundir la sangre con agotamiento de células que expresan receptores de quimiocinas (CCR2) al paciente. Este es, por lo tanto, un método de tratamiento de leucaféresis completo. Por lo tanto, un método de leucaféresis, para tratar afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), comprende recoger sangre periférica del paciente; aplicar la sangre periférica a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con uno o más receptores de quimiocinas, en particular el receptor de quimiocinas CCR2, inmovilizados directa o indirectamente en el soporte eliminando de este modo una o más de las células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente; e infundir la sangre con agotamiento (de células que expresan receptores de quimiocinas) al paciente.

- La sangre periférica puede recogerse continuamente del paciente. De forma similar, la sangre con agotamiento puede infundirse de forma continua al paciente, mediante el uso de un circuito apropiado como se describe en el presente documento. Por lo tanto, el soporte puede disponerse en una columna a través de la que se hace fluir la sangre. Esto puede conseguirse usando una bomba adecuada, por ejemplo, como se describe también en el presente documento. El flujo de sangre a través de la columna permite que el reactivo o los reactivos de unión inmovilizados en el soporte sólido capturen las células que expresan el receptor de quimiocinas, agotándolas de este modo en la sangre y evitando su contribución a las afecciones respiratorias inflamatorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).
- Los métodos de las diversas realizaciones de la invención y reactivos de unión para su uso en los métodos de las diversas realizaciones de la invención pueden requerir que el paciente se haya seleccionado para tratamiento basándose en la detección de un aumento en el nivel de receptor de quimiocinas, en particular, células que expresan CCR2 en una muestra obtenida del paciente. Dichos métodos de diagnóstico adjuntos se describen en más detalle en el presente documento y se basan, por ejemplo, en la observación de que la expresión de CCR2 puede elevarse en pacientes con afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Se muestra en el presente documento que sujetos que padecen afecciones respiratorias tales como sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan receptores de quimiocinas en la sangre periférica. Los sujetos con sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan CCR1 tales como monocitos que expresan CCR1, en comparación con controles sanos. De forma similar, se muestra en el presente documento que los monocitos también expresan CCR2. También se muestra en el presente documento que los sujetos que padecen afecciones respiratorias tales como sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan CCR7 tales como linfocitos que expresan CCR7, y también células T de memoria centrales, en comparación con controles sanos.
- Por lo tanto, (en este contexto) en ciertas realizaciones la invención también proporciona un método de diagnóstico, supervisión de la progresión o supervisión del tratamiento de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) que comprende determinar:
- a) los niveles de las células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2
 - b) niveles de expresión de CCR2; y/o
 - c) niveles de células con alta expresión de CCR2 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que altos niveles de una o más células que expresan CCR2, altos niveles de expresión de CCR2 o altos niveles de células con alta expresión de uno o más de CCR2 o mayores niveles de células que expresan CCR2 en comparación con el control, mayores niveles de expresión de CCR2 en comparación con un control o mayores niveles de células con alta expresión de CCR2 en comparación con un control indican la presencia o progresión de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Los niveles de expresión de receptor de quimiocinas, a diferencia de números de células, también pueden investigarse ya que mayores niveles de expresión de receptores de quimiocinas por célula también pueden ser diagnósticamente relevantes. En realizaciones específicas, las células relevantes para diagnóstico, etc. de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden monocitos, en particular monocitos que expresan CCR2. En otras realizaciones las células relevantes para diagnóstico, etc. de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden linfocitos, específicamente linfocitos T tales como células T de memoria centrales, en particular células T que expresan CCR7.
- “Diagnóstico” se define en el presente documento para incluir exploración con respecto a una enfermedad/afección o preindicio de una enfermedad/afección, que identifica una enfermedad/afección o preindicio de una enfermedad/afección y comprobación de la reaparición de enfermedad/afección después del tratamiento. Los métodos de las diversas realizaciones de la invención también pueden tener el valor pronóstico, y este se incluye dentro de la definición del término “diagnóstico”. El valor pronóstico de los métodos de las diversas realizaciones de la invención puede usarse como un marcador de susceptibilidad potencial a afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) identificando niveles de expresión de CCR2 ligada a la afección respiratoria. Por lo tanto pueden identificarse pacientes en riesgo antes de que la enfermedad tenga la oportunidad de manifestarse con respecto a síntomas identificables en el paciente. En ciertas realizaciones, puede realizarse diagnóstico junto con otros indicadores objetivos de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC): el diagnóstico de sarcoidosis puede realizarse basándose en hallazgos clínicos; rayos X, biopsia, s-Ca, actividad ACE. El diagnóstico de EPOC también puede realizarse por hallazgos clínicos; espirometría de rayos X y análisis de gas en sangre.
- La “supervisión de la progresión de” incluye realizar los métodos para supervisar el estadio y/o el estado y la progresión de las afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). La supervisión de la progresión puede implicar realizar los métodos de diagnóstico múltiples veces en el mismo paciente para determinar si los niveles de células que expresan CCR2 están aumentando, reduciéndose o permaneciendo estables durante un cierto periodo de tiempo. Esto puede estar en el contexto de un régimen de tratamiento.

Se define que la “supervisión del éxito de un tratamiento particular” incluye determinar los niveles de células que expresan CCR2 antes y después de un tratamiento. El tratamiento es en general uno dirigido a tratar afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y puede ser un tratamiento de acuerdo con uno de los métodos de las diversas realizaciones de la invención como se define en el presente documento. El tratamiento exitoso puede determinarse en referencia a una reducción de células que expresan CCR2 como resultado de, o después de, tratamiento. Por lo tanto, en dichos métodos un nivel de células que expresan CCR2 se determina antes del tratamiento. Este nivel se registra y se realiza una evaluación adicional en un tiempo predeterminado después del tratamiento. La comparación de niveles de células que expresan CCR2 permite que se supervise el éxito del tratamiento. En realizaciones específicas, un único tratamiento es suficiente para provocar un agotamiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o más, hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de uno o más receptores de quimiocinas específicos, en particular células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse con referencia al agotamiento de células que expresan CCR2. El tratamiento puede conducir a agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan CCR2, tales como monocitos, en ciertas realizaciones. Pueden incluirse factores adicionales para determinar el tratamiento exitoso. Por ejemplo, una falta de aumento de células que expresan CCR2 después del tratamiento puede indicar tratamiento exitoso con respecto a prevención de la progresión adicional de la afección, opcionalmente en combinación con una mejora de otros marcadores o estadificación de las afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

Mediante unión a la columna a través de la interacción de reactivo de unión-receptor de quimiocinas, se inmovilizan células que expresan receptores de quimiocinas. Estas células inmovilizadas expresan receptores de quimiocinas desocupados adicionales, que pueden ser del mismo tipo o de un tipo diferente a los usados para captura. Estos receptores de quimiocinas adicionales pueden permitir quimiocinas en circulación que contribuyen a que la afección inflamatoria se capture de la sangre periférica. Por lo tanto, una reducción de los niveles de quimiocinas (específicos) en circulación puede proporcionar una medida del tratamiento exitoso. En realizaciones específicas, las células relevantes para diagnóstico, etc. de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden monocitos, en particular monocitos que expresan CCR1 y/o CCR2. En otras realizaciones las células relevantes para diagnóstico, etc. de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden linfocitos, específicamente linfocitos T tales como células T de memoria centrales en particular células T que expresan CCR7.

En realizaciones específicas, las afecciones respiratorias se seleccionan de sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

La muestra en la que se determinan los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidos como CCR2^{hi}) pueden comprender cualquier muestra tisular adecuada o muestra de fluido corporal. En general, la muestra de ensayo se obtiene de un sujeto humano. Normalmente, la muestra es una muestra sanguínea, en particular una muestra de sangre periférica. La muestra puede comprender una biopsia de tejido adiposo en ciertas realizaciones. Los métodos pueden implicar determinar niveles de monocitos que expresan CCR2, macrófagos o linfocitos en ciertas realizaciones. En realizaciones específicas, las células relevantes para el diagnóstico, etc. de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden monocitos, en particular monocitos que expresan CCR1 y/o CCR2. En otras realizaciones las células relevantes para el diagnóstico, etc. de afecciones respiratorias tales como sarcoidosis comprenden linfocitos, específicamente linfocitos T tales como células T de memoria centrales, en particular células T que expresan CCR7.

Los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) pueden determinarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede emplearse citometría de flujo para determinar el número de células que expresan CCR2 en la muestra, para determinar los niveles de expresión de CCR2 y/o para identificar los niveles de células CCR2^{hi}. Se describen en el presente documento técnicas de citometría de flujo y se exponen ejemplos de anticuerpos disponibles en el mercado marcados convenientemente para su uso en citometría de flujo en la Tabla 1, por ejemplo. Como alternativa, el método puede implicar las etapas de recoger y fijar las células en la muestra, seguido de incubación con un reactivo de unión adecuado que se une específicamente con las células que expresan receptores de quimiocina CCR2 en la muestra. Puede emplearse cualquier reactivo de unión adecuado, como se define en el presente documento. Por ejemplo, puede emplearse un anticuerpo específico de CCR2. Puede adoptarse una etapa de lavado después de un periodo de incubación para retirar cualquier reactivo no unido. Un experto en la materia conocería bien etapas de lavado y condiciones de incubación adecuadas. Como alternativa puede emplearse un reactivo de unión secundario, tal como un anticuerpo, que se une con el primer reactivo de unión y porta un marcador. De nuevo, resultarían evidentes para un experto en la materia condiciones de incubación y etapas de lavado adecuadas. Los reactivos de unión primarios y secundarios pueden formar dos mitades de un par de unión. La interacción de unión no debería evitar que el reactivo de unión primario se uniera con las células que expresan receptores CCR2, a no ser que se emplee un ensayo de competición. Las dos mitades de un par de unión pueden comprender un par de antígeno-anticuerpo, anticuerpo-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-estreptavidina, etc. en ciertas realizaciones. Otras técnicas usadas para cuantificar niveles de células que expresan receptores de quimiocinas (CCR2), para cuantificar niveles de expresión de CCR2 y/o para cuantificar niveles de células CCR2^{hi} incluyen técnicas basadas en PCR

tales como QT-PCR y métodos basados en proteínas tales como Transferencia de Western. Puede conseguirse cuantificación en referencia a líneas celulares fijadas que portan números conocidos de diversas células que expresan receptor y/o niveles conocidos de expresión de receptor por célula. Dichas líneas celulares fijadas están disponibles en el mercado (por ejemplo líneas celulares ChemiScreen™ de Millipore). También pueden emplearse métodos análogos a los métodos de tratamiento de las diversas realizaciones de la invención, determinándose la unión de células que expresan CCR2 con el soporte sólido después de pasar la sangre periférica a través de la columna.

Los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) pueden determinarse en relación con un control adecuado. Cuando se diagnostica una afección respiratoria, un nivel umbral de células, nivel de expresión de CCR2 y/o nivel de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) pueden establecerse en o sobre el que se realiza un diagnóstico positivo. Este umbral puede determinarse basándose en la medición de los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) en muestras obtenidas de pacientes enfermos y comparando estos niveles con los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) en muestras obtenidas de sujetos sanos.

En ciertas realizaciones, se diagnostica un trastorno respiratorio basándose en niveles de células que expresan receptores de quimiocinas. Puede realizarse un diagnóstico positivo en sujetos basándose en la presencia de más de aproximadamente 10 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 95 %, o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra. En otras realizaciones, un trastorno respiratorio se diagnostica basándose en la presencia de un aumento de aproximadamente 1,2 veces o mayor, tal como un aumento de aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 o más veces en células que expresan receptores de quimiocinas, en relación con controles sanos.

En ciertas realizaciones, la progresión de un trastorno respiratorio, que puede ser en el contexto de un régimen de tratamiento, se supervisa basándose en los niveles de células que expresan receptores de quimiocinas en puntos temporales diferentes. La progresión de un trastorno respiratorio puede estar indicado en sujetos basándose en un aumento de más de aproximadamente 10 %, tal como un aumento de más de aproximadamente 15 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 25 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 35 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 45 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la progresión de un trastorno respiratorio se confirma basándose en la presencia de un aumento aproximadamente 1,2 veces o mayor, tal como un aumento de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 o más veces en células que expresan receptores de quimiocinas, en relación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

La regresión o el tratamiento exitoso pueden supervisarse basándose en reducciones similares sobre diversos puntos temporales. Por ejemplo, la regresión o el tratamiento exitoso puede indicarse en sujetos basados en una reducción de aproximadamente 10 %, tal como una reducción de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la regresión de trastornos respiratorios se confirma basándose en la presencia de una reducción de aproximadamente 1,2 veces o mayor, tal como una reducción de aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 o más veces en células que expresan receptores de quimiocinas, en relación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

El software adecuado está libremente disponible (tal como el proyecto R para computación estadística) para realizar el análisis estadístico necesario de los datos obtenidos para calcular un umbral útil. El umbral puede ajustarse para maximizar la sensibilidad y/o especificidad del ensayo. El rendimiento del ensayo a este respecto puede medirse representando una curva de características operativas de receptor (ROC) (sensibilidad frente a especificidad). El área bajo la curva proporciona un indicio del rendimiento general del ensayo. Por lo tanto, una vez que se han establecido umbrales para el diagnóstico de la afección, no es necesario tener que procesar un experimento de control separado cada vez que se ensaya una muestra. En su lugar puede hacerse referencia sencillamente a los umbrales preexistentes para determinar el diagnóstico. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la muestra se ensaya

5 junto con una muestra de control tomado de un sujeto sano para proporcionar un comparador basándose en condiciones experimentales esencialmente idénticas. La muestra de ensayo se ensaya en general en paralelo con la muestra de control. El nivel de muestra de ensayo de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) pueden después compararse con el de la muestra de control para realizar el diagnóstico. También puede ensayarse una muestra de control de un paciente con enfermedad en ciertas realizaciones. La referencia a controles permite identificar fácilmente niveles relativos (“altos”, “bajos”, etc.) de células que expresan CCR2 en la muestra de ensayo e interpretar la importancia de los mismos. La referencia a controles también permite determinar niveles relativos de expresión de CCR2 (“altos”, “bajos”, etc.) dentro de la población celular e interpretar la importancia de los mismos. Dicha determinación puede 10 indicar, por ejemplo, los niveles promedios de expresión de CCR2 por célula en la muestra de ensayo.

15 Por lo tanto, en realizaciones específicas, niveles altos o mayores de células que expresan CCR2 o niveles altos o mayores de uno o más de expresión de CCR2, por ejemplo expresión de CCR2 promedio por célula, o niveles altos o mayores de células CCR2^{hi} se correlacionan con enfermedad activa o enfermedad más activa. De forma similar, niveles menores o bajos de células que expresan CCR2, o niveles bajos o menores de expresión de CCR2, por ejemplo expresión de CCR2, por ejemplo expresión de CCR2 promedio por célula, o niveles bajos o menores de células CCR2^{hi} pueden correlacionarse con una falta de inflamación activa o enfermedad. Esto puede definirse como “enfermedad menos activa”. Puede preverse fácilmente que puedan evaluarse muestras de control y niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) determinarse a través de la serie de gravedades de las afecciones respiratorias. Esto puede ayudar a correlacionar los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) en la muestra de ensayo con la gravedad relativa de la afección.

25 Cuando se supervisa la progresión o se supervisa el tratamiento de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), las muestras de control pueden tomarse del sujeto en un punto temporal anterior. Pueden basarse, sin embargo, en valores de referencia conocidos como se ha analizado anteriormente. Por lo tanto, los niveles relativos de células que expresan CCR2, niveles relativos de expresión de CCR2 incluyendo niveles relativos de expresión de CCR2 promedio por célula o niveles relativos de células CCR2^{hi} pueden ser en referencia a muestras tomadas del mismo sujeto en un punto temporal diferente. En ciertas realizaciones, los menores niveles de células que expresan CCR2, menores niveles relativos de expresión de CCR2 incluyendo menores niveles relativos de expresión de CCR2 promedio por célula o menores niveles relativos de células CCR2^{hi} se correlacionan con tratamiento exitoso. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento adecuado, pero en realizaciones específicas es un tratamiento de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención. 35

40 Cuando se supervisa la progresión de afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), los mayores niveles de células que expresan CCR2, mayores niveles relativos de expresión de CCR2 incluyendo mayores niveles relativos de expresión de CCR2 promedio por célula o mayores niveles relativos de células CCR2^{hi} pueden indicar la progresión de afección o enfermedad. Por lo tanto, si los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con alta expresión de CCR2 (definidas como CCR2^{hi}) aumentan en una muestra tomada más tarde que una muestra del mismo paciente esto puede indicar progresión de la afección.

45 Ya que los niveles de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 o niveles de células CCR2^{hi} son diagnósticamente relevantes, la determinación de dichos niveles en una muestra obtenida de un sujeto puede influir en la selección de tratamiento para ese sujeto. En consecuencia, en ciertas realizaciones la invención proporciona un método para seleccionar un tratamiento adecuado para afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) que comprende determinar: 50

- a) los niveles de las células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2
- b) niveles de expresión de CCR2; y/o
- c) niveles de células con alta expresión de CCR2 en una muestra obtenida de un sujeto, en los que altos niveles de células que expresan CCR2, altos niveles de expresión de CCR2 o altos niveles de células con alta expresión de CCR2 o aumento de los niveles de células que expresan CCR2 en comparación con el control, aumento de los niveles de expresión de CCR2 en comparación con un control o aumento de los niveles de células con alta expresión de CCR2 en comparación con un control, dan como resultado en la selección de un tratamiento como se define en el presente documento para tratamiento de las afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). En ciertas realizaciones, las células que expresan receptores de quimiocinas son células que expresan alta cantidad de receptor de quimiocinas, en particular, 60 células que expresan alta cantidad de CCR2.

65 En realizaciones específicas, un trastorno respiratorio se trata basándose en la medición de niveles de células que expresan receptores de quimiocinas. Por lo tanto, un tratamiento de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención puede aplicarse basándose en la presencia de más de aproximadamente 10 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 50 %, más de

aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 95 %, o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra. En otras realizaciones, un trastorno respiratorio se trata de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención basándose en la presencia de un aumento de aproximadamente 1,5 veces o más, tal como un aumento de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 o más veces en células que expresan receptores de quimiocinas, en relación con controles sanos.

Para evitar las dudas, todas las realizaciones descritas con respecto a los métodos de las diversas realizaciones de la invención se aplican a estos aspectos cambiando lo que deba cambiarse y no se repiten por razones de concisión. Específicamente, las condiciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) pueden indicarse junto con uno o más de los siguientes indicadores: el diagnóstico de sarcoidosis puede realizarse basándose en hallazgos clínicos; rayos X, biopsia, s-Ca, actividad ACE. El diagnóstico de EPOC también puede realizarse por hallazgos clínicos; espirometría de rayos X y análisis de gases en sangre.

En realizaciones específicas, la muestra es una muestra de sangre periférica.

Los métodos y usos médicos de las diversas realizaciones de la invención pueden por lo tanto adaptarse a las necesidades de los pacientes individuales o grupos de pacientes basándose en los diversos métodos de diagnóstico de las diversas realizaciones de la invención. Retirando de la circulación células que expresan CCR2, tales como monocitos, macrófagos y linfocitos, en particular monocitos, reguladas positivamente en diversas afecciones inflamatorias asociadas con afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), puede controlarse un factor importante en el proceso inflamatorio de dichas afecciones.

Las diversas realizaciones de la invención se describirán ahora en más detalle por referencia a las siguientes realizaciones y ejemplos no limitantes:

Descripción de las figuras

FIGURAS 1a, 1b y 1c - la unión de MIP-1 α biotinilada por células T CD4+, CD8+ y monocitos CD14+ respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un donante sano;

FIGURAS 2a, 2b y 2c - la unión de MCP-1 biotinilada por células T CD4+, CD8+ y monocitos CD14+ respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un donante sano;

FIGURAS 3a, 3b y 3c - la unión de IL-8 por células T CD4+, CD8+ y monocitos CD16+ respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un donante sano

FIGURA 4a - unión de MCP-1 con monocitos (línea discontinua) en sangre periférica tomada de pacientes con EII. La gráfica representa un sumario de cuatro ensayos.

FIGURA 4b - unión del anticuerpo de CCR2 con monocitos (línea) en sangre periférica tomada de pacientes con EII. La gráfica representa un sumario de cuatro ensayos.

FIGURA 5a - unión de eotaxina con neutrófilos/eosinófilos (línea discontinua) en sangre periférica. La gráfica representa un sumario de cuatro ensayos.

FIGURA 5b - unión de anticuerpo de CCR3 con neutrófilos/eosinófilos (línea) en sangre periférica. La gráfica representa un sumario de cuatro ensayos.

FIGURA 6 - La carcasa de plástico y parte superior que muestra la placa de distribución (2) y unidades de filtro de seguridad (3 y 4).

FIGURA 7 - El sistema de leucaféresis general.

FIGURA 8 - La bomba con detector de aire y detector óptico (4).

FIGURA 9a - Resultados de ensayos de agotamiento *in vitro* realizados en la matriz acoplada a bMCP-1 que muestran la capacidad para eliminar células que expresan CCR2 de sangre de tres donantes sanos.

FIGURA 9b - Resultados de ensayos de agotamiento *in vitro* realizados en la matriz acoplada a RANTES biotinilada que muestran la capacidad para eliminar células que expresan receptores de quimiocinas de sangre periférica tomada de un donante sano.

65

- FIGURA 9c - Resultados de ensayos de agotamiento *in vitro* realizados en la matriz acoplada a eotaxina biotinilada que muestran la capacidad de eliminar células que expresan CCR3 de sangre de un donante sano.
- 5 FIGURA 10 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo espaciador, de derivado de proteína madura MCP-1 que contiene modificación de Gln a piroGlu.
- FIGURA 11 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo espaciador, de derivado de proteína madura MCP-1 que contiene modificación de Gln a piroGlu y sustitución de Met a Norleu.
- 10 FIGURA 12 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo espaciador, de derivado de MCP-1 truncado que contiene sustitución de Met a Norleu.
- FIGURA 13 - Alineamiento de secuencias de aminoácidos de MCP-1 y MCP-5.
- 15 FIGURA 14 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo espaciador, de derivado de MCP-5 truncado (C terminal) que contiene modificación de Ile a Lys.
- FIGURA 15 - Secuencia y biotinilación de derivado de RANTES.
- 20 FIGURA 16 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo espaciador, de derivado de proteína madura eotaxina que contiene amida C terminal.
- FIGURA 17 - Ejemplo de criterios de clasificación para monocitos que expresan CCR2
- 25 FIGURA 18 - Frecuencia de monocitos que expresan CCR1 en 20 controles sanos y 2 pacientes con sarcoidosis. La expresión de receptores de quimiocinas y marcadores celulares específicos se analizaron con citometría de flujo.
- 30 FIGURA 19 - Expresión de CCR1 en comparación con unión de bRANTES con monocitos sanguíneos de un paciente con sarcoidosis. La expresión de receptores de quimiocinas, unión de quimiocina y marcadores celulares específicos se analizaron con citometría de flujo.
- 35 FIGURA 20 - Agotamiento de monocitos que expresan CCR1 con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bRANTES. Se incubaron células sanguíneas de un control sano con matriz de quimiocina biotinilada-Sepharose Estreptavidina. Se recuperaron células no unidas lavando la matriz. Las células (Después del Agotamiento) se analizaron después con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz de quimiocina biotinilada (Antes del Agotamiento).
- 40 FIGURA 21 - Expresión de CCR2 en monocitos de dos pacientes con sarcoidosis. La expresión de receptores de quimiocinas, unión de quimiocina y marcadores celulares específicos se analizaron con citometría de flujo.
- 45 FIGURA 22 - Unión de la quimiocina bMCP-1 con monocitos. Las barras representan la frecuencia de monocitos que se unen a MCP-1 y monocitos que expresan CCR2 en sangre de un paciente con sarcoidosis. La sangre se incubó con quimiocina biotinilada y se analizó con citometría de flujo.
- 50 FIGURA 23 - Agotamiento de monocitos que expresan CCR2 con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMCP-1. Se incubaron células sanguíneas de un control sano con matriz de quimiocina biotinilada-Sepharose Estreptavidina. Se recuperaron células no unidas lavando la matriz. Las células (Después del Agotamiento) se analizaron después con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz de quimiocina (Antes del Agotamiento).
- 55 FIGURA 24a - Frecuencia de células T que expresan CCR7. Las barras representan la frecuencia de células T que expresan CCR7 en 2 pacientes y 20 controles sanos. La expresión de receptores de quimiocinas y marcadores celulares específicos se analizaron con citometría de flujo. Las células T se caracterizaron como CD3 positivas.
- 60 FIGURA 24b - Frecuencia de células T de memoria centrales en un paciente con sarcoidosis. Las células T de memoria centrales se caracterizaron como células CD3 positivas, CD4 positivas, CD45RA negativas, CCR7 positivas.
- 65 FIGURA 25 - Agotamiento de células T que expresan CCR7 con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMIP3b. Se incubaron células sanguíneas de un paciente con sarcoidosis con matriz de quimiocina biotinilada-Sepharose Estreptavidina. Se recuperaron células no unidas lavando la matriz. Las células (Después del Agotamiento) se analizaron después con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz de quimiocina (Antes del Agotamiento).

Descripción de realizaciones preferidas

5 Los niveles en plasma de MCP-1 y MIP-1 α se supervisaron en 26 pacientes con sarcoidosis pulmonar activa durante un periodo de dos años. Durante este periodo, los autores muestran que los niveles de estas citocinas se relacionaron estrechamente con la evolución clínica de la enfermedad. Los autores concluyen que los niveles de MCP-1 y MIP-1 α en plasma son indicadores útiles de la gravedad clínica de la sarcoidosis, y que los niveles "pueden reflejar las pruebas subclínicas de sarcoidosis extratorácica y pueden desempeñar un papel en el inicio de la migración de monocitos al tejido". Hashimoto S *et al*, Clin Exp Immunol, 1998.

10 Se midieron los niveles de MCP-1 en suero en 47 pacientes con sarcoidosis y 10 controles sanos. Los niveles de quimiocinas eran significativamente mayores en el grupo de pacientes y, más específicamente, se correlacionaron positivamente con pacientes en estadios tempranos de la enfermedad. Además, se mostró que MCP-1 se expresaba específicamente por macrófagos asociados con ganglios linfáticos sarcoideos. Iyonaga K *et al*, Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 1998.

15 Las citocinas inflamatorias TNF-a, IL-8, MCP-1, MMP9 y GRO-a se midieron en 100 pacientes con EPOC y 50 fumadores sanos coincidentes. Estos valores se correlacionaron posteriormente con el índice de BODE de gravedad de enfermedad EPOC. La mayor diferencia en estos biomarcadores se observó en niveles en suero de MCP-1 que eran significativamente mayores en el grupo de EPOC. Los autores concluyen que los niveles de MCP-1 en suero puede ser un candidato clínico para distinguir entre fumadores sanos y pacientes con EPOC estable. Liu SF *et al*, Respirology, 2009.

20 Se midieron TNF-alfa, IL-8, MMP-9, MCP-1, TIMP-1 y TIMP-2 en 20 pacientes con EPOC, 10 fumadores asintomáticos y 10 controles sanos no fumadores. Los autores descubrieron elevaciones altamente reproducibles y estadísticamente significativas de IL-8 en plasma entre los pacientes con EPOC en comparación con los otros grupos. No se observó ninguna otra correlación. Shaker SB *et al*, Clin Respir J, 2008.

30 Se muestra en el presente documento que los sujetos que padecen afecciones respiratorias tales como sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan receptores de quimiocinas en la sangre periférica. Los sujetos con sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan CCR1 tales como monocitos que expresan CCR1, en comparación con controles sanos. También se muestra en el presente documento que las células que expresan CCR1 pueden retirarse usando un reactivo de unión adecuado, en particular RANTES (en forma biotinilada) inmovilizado en una matriz adecuada. De forma similar, se muestra en el presente documento que los monocitos también expresan CCR2. Los monocitos que expresan CCR2 pueden agotarse en pacientes con sarcoidosis usando un reactivo de unión adecuado, en particular MCP-1, en forma biotinilada, inmovilizado en una matriz adecuada. También se muestra en el presente documento que sujetos que padecen afecciones respiratorias tales como sarcoidosis muestran mayor frecuencia de células que expresan CCR7 tales como linfocitos que expresan CCR7, y también células T de memoria centrales, en comparación con controles sanos. También se muestra en el presente documento que las células que expresan CCR7 pueden retirarse usando un reactivo de unión adecuado, en particular MIP3b (en forma biotinilada) inmovilizado en una matriz adecuada.

Basándose en esto los inventores han seleccionado una serie de receptores de quimiocinas para su uso como dianas para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención.

45 **Ejemplos 1 a 9**

Materiales y métodos

50 *Aislamiento de leucocitos de sangre periférica.* Se fijó sangre periférica heparinizada de donantes de sangre sanos o pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) con paraformaldehído al 4 % durante 4 minutos, se hemolizaron durante 15 minutos con una solución de cloruro de amonio 0,83 % y se lavaron dos veces en tampón de FACS para obtener una suspensión de leucocitos sanguíneos.

55 *Quimiocinas.* Los leucocitos se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 4 °C con quimiocina biotinilada y marcada con Alexa647 Fluor® (CCL5, CCL2, CXCL8) (en concentraciones de 10 ng/ μ l y 50 ng/ μ l). Las células se lavaron después con tampón de FACS y se analizaron por citometría de flujo. Todas las quimiocinas usadas en los Ejemplos fueron proporcionadas por Almac Sciences Scotland Ltd, Edimburgo, Escocia.

60 *Ensayo de citometría de flujo.* El ensayo de citometría de flujo se realizó en un citómetro FACS Calibur de dos láseres (BD Immunocytometry systems, San José, Ca, EE.UU.). Se contaron diez mil células y se analizaron en cada muestra. Para análisis de datos, se usó software Cell Quest Pro de Becton Dickinson.

65 **EJEMPLO 1** - Unión de monocitos con MIP-1 α . En el experimento con MIP-1 α biotinilado se descubrió que aproximadamente el 90 % de los monocitos obtenidos de sangre periférica de donantes sanos se había unido a la citocina después de 30 minutos de incubación (Figura 1c), mientras que los linfocitos CD4+ y CD8+ no se habían unido (Figura 1a y 1b).

EJEMPLO 2 - Unión de monocitos con MCP-1. En el experimento con MCP-1 biotinilado se descubrió que aproximadamente el 90 % de los monocitos obtenidos de sangre periférica de donantes sanos se había unido a la citocina después de 30 minutos de incubación (Figura 2a), mientras que los linfocitos CD4+ y CD8+ no se habían unido (Figura 2b y 2c).

EJEMPLO 3 - Afinidad de células sanguíneas por IL-8 biotinilada. En la Figura 3 se muestra la unión a IL-8 biotinilada (CXCL8) de linfocitos CD4+ (Figura 3a), linfocitos CD8+ (Figura 3b) y neutrófilos CD16+ (Figura 3c) obtenidos de donantes sanos. Después de 30 minutos de incubación todos los neutrófilos CD16+ se unieron con IL-8. Por el contrario no se observó ninguna unión con linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+.

EJEMPLO 4 - Se investigaron monocitos con respecto a su expresión de CCR2 (Figura 4b) y su capacidad para unirse con MCP-1 (Figura 4a). Se observó expresión de CCR2 en todos los monocitos expresando la mayoría de los monocitos altos niveles, usando un anticuerpo anti CCR2 (Figura 4b). La unión de MCP-1 con monocitos mostrada en la FIGURA 2a corresponde a la población que expresa CCR2^{hi} mostrada en la FIGURA 4b. Por lo tanto, MCP-1 se une favorablemente con células que expresan CCR2^{hi}.

EJEMPLO 5 - Se investigaron neutrófilos/eosinófilos con respecto a su expresión de CCR3, (Figura 1b) y su capacidad para unirse con eotaxina (Figura 5a). Se observó expresión de CCR3 en todos los neutrófilos/eosinófilos expresando la mayoría de neutrófilos/eosinófilos altos niveles, usando un anticuerpo anti CCR3 (Figura 5b). La unión de eotaxina con neutrófilos/eosinófilos mostrada en la FIGURA 5a corresponde a la población que expresa CCR3^{hi} mostrada en la FIGURA 5b. Por lo tanto, la eotaxina se une favorablemente con células que expresan CCR3^{hi}.

EJEMPLO 6 - Preparación de una columna de quimiocinas para aféresis de células sanguíneas. A perlas de agarosa reticuladas con estreptavidina (ProZyme, San Leandro, CA, EE.UU.) en el intervalo de 75 µm a 300 µm suspendidas (200 ml, ~ 50 % v/v) en una solución acuosa de fosfato sódico 25 mM (pH 7,0) y NaCl 150 mM se añadió una solución de 75 µg de MIP-1α biotinilada (Almac Sciences) en el mismo tampón a 22 °C y se agitó lentamente manualmente durante 3 minutos. Después de dejar reposar durante otros 20 minutos, el soporte se filtró, se lavó tres veces con fosfato sódico acuoso neutro/cloruro sódico neutro y se cargó en una columna de vidrio (d.i. 25 mm, longitud 12 cm).

EJEMPLO 7 - Separación de monocitos de sangre periférica de un donante sano con la columna de quimiocinas del Ejemplo 5. Se analizó sangre periférica heparinizada de un donante masculino sano por citometría de flujo con respecto a linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y monocitos CD14. Se filtraron 100 ml de la sangre a través de la columna a un caudal de aproximadamente 8 ml por minuto y se lavó con tampón de FACS. La sangre filtrada se analizó con respecto a las mismas células. Se descubrió que aproximadamente el 95 % de los monocitos se habían conservado en la columna mientras que más del 90 % de cada uno de los linfocitos CD4+ y CD8+ se habían recuperado.

EJEMPLO 8 - Preparación de perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina en complejo con MIP-1α biotinilado. Se mezcló una suspensión acuosa de perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina (Ferrouluido de Estreptavidina MagCollect, 1 ml; R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) con 30 µg de MIP-1α (Almac Sciences) en 50 ml de fosfato sódico 25 mM (pH 7,0) y NaCl 150 mM y se agitó lentamente durante 1 hora. Las partículas se lavaron tres veces con partes de 20 ml del mismo disolvente y se almacenaron en suspensión a 4 °C.

EJEMPLO 9 - Separación de monocitos CD14+ de sangre periférica de un donante sano con las perlas magnéticas de estreptavidina del Ejemplo 7. Se mezclaron 100 ml de sangre heparinizada del donante sano del Ejemplo 7 con las perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina en complejo con MIP-1α biotinilado y se agitaron lentamente durante 40 minutos. Las partículas se separaron de la sangre por un separador magnético, y la sangre se analizó con respecto a monocitos CD14+ y linfocitos CD4+ y CD8+. Aunque esencialmente no pudo detectarse ningún monocito CD14+, estaban presentes linfocitos CD4+ y CD8+ en aproximadamente las cantidades originales.

EJEMPLO 10 - *Leucaféresis adaptada*

DISEÑO DE COLUMNA Y PROPIEDADES

Introducción

La aféresis es un tratamiento establecido usado para el agotamiento de componentes sanguíneos, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. La leucaféresis es el tratamiento por aféresis usado para la retirada de glóbulos blancos, leucocitos. El paciente está conectado al sistema circulatorio sanguíneo extracorpóreo; la sangre se extrae de una vena en un brazo, se pasa a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. Los efectos secundarios de los tratamientos por leucaféresis varían de acontecimientos leves como cefalea, mareos, hipotensión, palpitaciones y sofocos vistos en el 0,1 al 5 % de pacientes tratados.

La columna

Se pretende que la columna se use como un tratamiento de leucaféresis para afecciones respiratorias, en particular sarcoidosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Retirá específicamente leucocitos que expresan CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CCR7, en particular monocitos, mediante el uso de una resina que contiene reactivo de unión, aprovechando la interacción de quimiocinas -CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CCR7. La columna consiste en tres componentes combinados, la carcasa de plástico, la matriz de estreptavidina (SA) Sepharose™ BigBeads y una o más quimiocinas biotiniladas unidas a la matriz. El tratamiento se realiza usando las mismas técnicas que un procedimiento de aféresis convencional.

La carcasa de plástico (FIGURA 6)

La carcasa de plástico, diseñada para mantener un flujo de sangre continuo a través de la matriz, consiste en un cuerpo transparente y una parte superior de color rojo. La parte superior tiene una placa de distribución (2) en el sitio de flujo de entrada (1) para extender la sangre uniformemente sobre el área de matriz completa. La placa es la primera barrera de seguridad que evita que partículas mayores fluyan a través de la columna al paciente. Se colocan unidades de filtro de seguridad (3 y 4) en los sitios de flujo de entrada (1) y flujo de salida (5) de la carcasa de plástico. La unidad de filtro de seguridad contiene tres filtros diseñados para ser una barrera robusta y detener el paso de todas las partículas mayores que las células sanguíneas a través de la columna. El diseño de carcasa de plástico se muestra en la Figura 4. El diseño con filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos del dispositivo de columna minimizará el riesgo de filtración de partículas en el paciente, incluyendo en el caso de que el dispositivo se coloque boca abajo con el flujo sanguíneo en la dirección opuesta a la anticipada.

Estreptavidina Sepharose™ BigBeads

El segundo componente en el dispositivo es la matriz de afinidad denominada Estreptavidina Sepharose™ BigBeads (Sepharose™ GE Healthcare, Suecia). Sepharose™ es una forma en perlas, reticulada, de agarosa, que es un polisacárido extraído de algas. Sepharose™ y agarosa se usan habitualmente como matrices de columna en técnicas de afinidad biomédicas. Se elige por su capacidad de distribución óptima y puede proporcionar una gran área disponible para unión de afinidad.

Reactivo de unión

El tercer componente del dispositivo está acoplado a la matriz, uno o más reactivos de unión que se unen específicamente con CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CCR7. Puede emplearse una o más quimiocinas. Estos péptidos pueden ser versiones sintéticas, modificadas técnicamente de la quimiocina humana, que se truncan y biotinilan, pero conservan la actividad de unión con el receptor CCR2, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CCR7. Biotinilando la quimiocina modificada técnicamente, esta es capaz de unirse con las moléculas de estreptavidina en la matriz de Sepharose™. Se sabe que la unión de biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas más fuertes con una Kd de aproximadamente 4×10^{-14} M. La relación calculada de sitios de unión a estreptavidina:biotina en la columna es de 10:1. Por lo tanto, el acoplamiento entre la matriz y la quimiocina será inmediato, minimizando el riesgo de desacoplamiento de quimiocina de la matriz.

El sistema de aféresis

Para realizar la leucaféresis son necesarios los siguientes componentes: la columna, el sistema de tubos y una bomba 4008 ADS (Fresenius Medical Care).

El circuito

El sistema se ilustra en la Figura 7. El paciente (1) está conectado al circuito extracorpóreo mediante agujas de Venflon estériles a venas en los brazos izquierdo y derecho. Una bolsa de solución salina (3) también está conectada y la solución salina se bombea con una bomba de ACD (2). Se extrae sangre de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estéril por la bomba sanguínea (4) y se pasa a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos está conectado a la columna mediante acoplamientos luer-lock de diálisis convencional. Los acoplamientos en la columna están codificados por colores para su correcto ensamblaje; tubos rojos para flujo de entrada a la parte superior de la columna roja y tubos azules para flujo de salida de vuelta al paciente. Está presente un detector de aire (8). Se emplean la presión de entrada (5) y sensores Pven (7) para supervisar la presión en el circuito.

La bomba 4008 ADS

Una bomba de aféresis, de Fresenius Medical Care, supervisa el flujo de entrada y el flujo de salida del paciente, la presión en la circulación extracorpórea y puede diferenciar el aire por un captador de burbujas y detector de aire. Se coloca un filtro de captura de coágulos dentro del captador de burbujas. La bomba también tiene un detector óptico para distinguir entre luz, por ejemplo solución salina o aire presente en el sistema de tubos y oscuridad, por

ejemplo sangre presente en el sistema de tubos.

Se muestra un diagrama esquemático de la bomba, que muestra el detector de aire y el filtro óptico en la Figura 8. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpóreas están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba se detiene inmediatamente y se emite una alarma visual/auditiva.

Leyenda para la FIGURA 8:

1. Monitor
2. Soporte para bolsa de residuos
3. Módulos (de izquierda a derecha - bomba sanguínea, bomba ACD, detector de aire)
4. Lugares de reserva para módulos adicionales
5. Soporte de absorbente
6. Detector de goteo
7. Polo IV

Preparación del paciente

Se administrarán al paciente anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Se usará una solución salina estéril con heparina 5000 IE para sensibilización del sistema extracorpóreo, a continuación una inyección de embolada con heparina 4000 IE se añadirá al circuito al comienzo de cada sesión de tratamiento.

Tiempo y caudal de leucaféresis

Un sistema de aféresis debería actuar a un caudal de 30-60 ml/min. Un tratamiento se finaliza después de haber circulado 1800 ml de sangre.

Condiciones de almacenamiento

Los dispositivos de columna deberían almacenarse entre 1 y 25 °C evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Los datos de estabilidad > 3 meses indican que no hay diferencia en la funcionalidad a lo largo del tiempo o por temperatura (temperatura ambiente y refrigerada). Las columnas se mantendrán en condiciones refrigeradas hasta su uso. Debería evitarse el daño mecánico como el resultante de vibraciones violentas y traumatismo. No debería usarse una columna almacenada fuera de estas recomendaciones.

Condiciones de transporte

Los dispositivos de columna se transportarán en condiciones refrigeradas, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Debería evitarse el daño mecánico tal como el resultante de vibraciones violentas y traumatismo.

Agotamiento *in vitro* de poblaciones celulares diana

Para investigar la capacidad para eliminar células que expresan CCR2, se han realizado ensayos *in vitro* en la matriz acoplada a bMCP-1. Se recogió sangre de donantes de sangre y se pasó a través del dispositivo de columna que contenía una matriz acoplada a bMCP-1. Se tomaron muestras de sangre antes y después del pase de columna y se analizó por citometría de flujo (FACS) para el agotamiento de células que expresan CCR2.

Los resultados demuestran agotamiento significativo de la población diana de monocitos que expresan CCR2 después de perfusión de matriz. Se realizaron ensayos de agotamiento en sangre de tres donantes sanos. Los resultados se muestran en la Figura 9a.

Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de hasta el 80 % de las células que expresan CCR2 por la columna. Notablemente, los individuos con menos células que expresaban CCR2 consiguieron inicialmente menor agotamiento. Los niveles restantes de monocitos fueron de aproximadamente 20-30 % en cada caso, independientemente del punto de partida. Las células que no expresaban CCR2 permanecieron inalteradas (datos no mostrados).

Para investigar la capacidad para eliminar células que expresan CCR1, 3 y 5, se han realizado ensayos *in vitro* en la matriz acoplada a RANTES biotinilado. Se recogió sangre de donantes sanos y se pasó a través del dispositivo de columna que contenía matriz acoplada a RANTES biotinilado. Se tomaron muestras de sangre antes y después del pase de columna y se analizaron por citometría de flujo (FACS) con respecto al agotamiento de células que expresan CCR1, 3 o 5.

La molécula de RANTES se sintetizó por Almac. La secuencia de aminoácidos de la molécula de RANTES biotinilada se expone como SEQ ID NO: 16:

5 H2N-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVVTRKNRQVCANPEKKWVREYI NSLEKS -
CO2H

Esta molécula tiene la metionina de origen natural en la posición 67 reemplazada con lisina para facilitar la biotinilación en la posición 67.

10 La cadena lateral de Lys 67 se biotiniló directamente para proporcionar la estructura primaria proteica mostrada en la Figura 15. La proteína se plegó y se formaron enlaces disulfuro entre la primera y tercera cisteínas en la secuencia y entre la 2ª y 4ª cisteínas.

15 Los resultados demuestran agotamiento significativo de la población diana de células que expresan receptores de quimiocinas después de perfusión en la matriz. Se realizaron ensayos de agotamiento en sangre de un donante sano. Los resultados se muestran en la Figura 9b.

20 Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de aproximadamente 20 % de las células que expresan receptores de quimiocinas por la columna. Las células que no expresan CCR1, 3 y 5 permanecen inalteradas (datos no mostrados).

Agotamiento *in vitro* de poblaciones celulares diana.

25 Para investigar la capacidad de eliminar células que expresan CCR3, se han realizado ensayos *in vitro* en la matriz acoplada a eotaxina. Se recogió sangre de donantes de sangre y se pasó a través del dispositivo de columna (incluyendo un separador magnético) que contenía matriz acoplada a eotaxina (perlas MACS). Se tomaron muestras de sangre antes y después del pase de columna y se analizaron por citometría de flujo (FACS) con respecto al agotamiento de células que expresan CCR3.

30 Los resultados demuestran agotamiento significativo de la población diana de neutrófilos/eosinófilos que expresan CCR3 después de perfusión en la matriz. Se realizaron ensayos de agotamiento en sangre de un donante sano. Los resultados se muestran en la Figura 9a.

35 En conclusión, los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de aproximadamente 25 % de las células que expresan CCR3 por la columna. Las células que no expresan CCR3 permanecen inalteradas (datos no mostrados).

EJEMPLO 11 – Derivados de MCP1

40 Se ha producido MCP-1 con el resto 75 como el sitio de biotinilación en la quimiocina (numeración basada en la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2). La biotinilación permite la inmovilización de MCP-1 en un soporte sólido (mediante una interacción de biotina-avidina). La secuencia de aminoácidos básica de MCP-1, que incluye una secuencia líder de 23 aminoácidos se expone como SEQ ID NO: 1, MKVSAALLCL
45 LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ
KVVQDSMDHL DKQTQTPKT

La secuencia de aminoácidos de la proteína madura se expone como SEQ ID NO: 2, QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KVVQDSMDHL DKQTQTPKT

50 Los inventores han determinado que las quimiocinas pueden presentar propiedades de unión mejoradas cuando la quimiocina esté biotinilada mediante un grupo espaciador. El espaciador puede evitar que el grupo de biotina influya en la afinidad de unión de la quimiocina.

55 Por lo tanto, se sintetizará MCP-1 derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral de ε amino de Lys75 con PEG-Biotina (sal de TFA). El espaciador de PEG será ácido 3,6-dioxoaminooctanoico. La Gln en el extremo N terminal de las proteínas se somete a formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto la primera glutamina (Gln1) de la secuencia se sustituirá con piroglutamina. La molécula se sintetizará como una amida C terminal (mediante síntesis en un enlazador de amida). La molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 10.

60 También se sintetizará un análogo Met a Nleu de biotina MCP-1. La metionina individual dentro de la secuencia se alterará a norleucina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de cadena y mejorar la estabilidad del producto final. Esta molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 11.

65 Una vez sintetizados la actividad de los diversos derivados de biotina MCP-1 se determinará en ensayos basados en células. En particular, se determinarán propiedades agonistas y antagonistas en ensayo basado en células funcionales de aecuorina en el receptor CCR2 humano.

EJEMPLO 12 - Síntesis de un antagonista de CCR2 biotina MCP-1 que se une con el receptor sin activación

Se ha mostrado la actividad antagonista (J-H Gong e I. Clark-Lewis, J. Exp. Med., 1995,181, 63) para un derivado de MCP-1 truncado en el extremo N terminal. En particular, la supresión de los restos 1-8 da como resultado unión con CCR2 con Kd 8,3 nM. Esta proteína fue incapaz de provocar quimiotaxis de células CCR2 positivas (CI50 de inhibición de la quimiotaxis 20 nM).

La secuencia de aminoácidos de la versión truncada se expone como SEQ ID NO: 3: VTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT

Se sintetizará un derivado de esta versión truncada que comprende los restos 9 a 76 de la proteína madura (MCP-1 9-76) con sustitución de Met64 a Nleu y derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ε amino de Lys75 con PEG-biotina (sal de TFA). Esta molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 12. El espaciador de PEG será ácido 3,6-dioxoaminooctanoico.

Una vez sintetizados, la actividad de los diversos derivados de biotina MCP-1 se determinará en ensayos basados en células. En particular, se determinarán las propiedades agonistas y antagonistas en ensayo basado en células funcionales de aecurina en receptor CCR2 humano.

EJEMPLO 13 - Demostración de la retirada de células que expresan CCR2 usando un ligando de quimiocina alternativo a MCP-1

CCR2 también se une con las quimiocinas MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y HCC-4 además de MCP-1. MCP-5 solamente se une con CCR2 y debería ser selectiva en su retirada de células que expresan CCR2. MCP5 es una quimiocina de ratón que se ha mostrado que es quimiotáctica para células de CCR2 humanas con CE50 <3 nM.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa, incluyendo el péptido señal, se expone como SEQ ID NO: 4 MKISTLLCLL LIATTISPQV LAGPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRTSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFILP SCLG.

La secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-5 procesada en el extremo N terminal es de 82 aminoácidos de longitud y se expone como SEQ ID NO: 5 GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRTSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFILP SCLG.

Un alineamiento de secuencias de aminoácidos sugiere que MCP-5 tiene una extensión C terminal en comparación con la secuencia de aminoácidos de MCP-1. Los resultados de este alineamiento se muestran en la Figura 13. Basándose en esto se sintetizará una versión truncada C terminal de MCP-5. Esta versión truncada comprenderá los restos de MCP-5 1-76, expuestos como SEQ ID NO: 6: GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRTSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFIL.

En la versión truncada, Ile75 se va a sustituir con Lys, expuesta como SEQ ID NO: 7: GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRTSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFKL

Después de la sustitución, la versión sustituida se biotinará en la posición 75, una lisina u otro resto adecuado tal como ornitina o ácido diaminopropanoico mediante un espaciador de PEG (ácido 3,6-dioxoaminooctanoico). La proteína se sintetizará en un enlazador de amida para producir un derivado de amida C terminal. Esta molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 14.

EJEMPLOS 15 A 21 - Síntesis de quimiocinas - PROTOCOLOS GENERALES

Ensamblaje:

Se realizó síntesis química de quimiocinas usando técnicas de síntesis de péptidos de fase sólida Fmoc convencionales (SPPS) en un sintetizador peptídico ABI 433. Se usaron DIC (0,5 M en DMF) y OxymaPure (0,5 M en DMF) para activación, anhídrido acético (0,5 M en DMF) para recubrimiento terminal y piperidina 20 % en DMF para desprotección de Fmoc. Se utilizó resina de Amida Rink para la generación de quimiocinas de amida C terminal y resina de Wang para quimiocinas de ácido C terminal. Después del ensamblaje, la resina se lavó con DMF y DCM y después se secó al vacío.

Retirada de protección de Dde:

Se retiró el grupo de protección de Dde por tratamiento de resina con una solución de hidrazina 2,5 % en DMF (200 ml) durante un periodo de 2 horas. La resina se lavó después con DMF.

Etapas de marcaje:

1. Acoplamiento de Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioctanoico (PEG)

5 La resina se hinchó en DMF y después se añadió una solución de Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioctanoico (0,38 g, 1 mmol), solución de DIC (2 ml, 0,5 M en DMF) y solución OxymaPure (2 ml, 0,5 M en DMF). La mezcla se sometió a ultrasonido durante 3 horas y después se lavó con DMF.

2. Recubrimiento terminal

10 La resina se recubrió con solución de anhídrido acético (0,5 M en DMF, 10 ml) durante 5 minutos y después se lavó con DMF.

3. Desprotección de Fmoc

15 Se llevó a cabo desprotección de Fmoc por tratamiento con piperidina 20 % en solución de DMF (2 x 50 ml) durante 15 minutos cada uno. La resina se lavó con DMF.

4. Acoplamiento de biotina-OSu

20 Se añadió una solución de Biotina-OSu (341 mg, 1 mmol) y DIPEA (348 µl) en DMF (10 ml) a la resina y la mezcla se sometió a ultrasonido durante 3 horas. La resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM y después se secó al vacío.

25 Escisión:

30 Se trató resina seca con TFA (10 ml) que contenía un cóctel neutralizante que consistía en TIS (500 µl), tioanisol (500 µl), agua (500 µl), DMS (500 µl), EDT (250 µl), NH₄I (500 µg) y fenol (500 µg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La solución se filtró en éter frío y la resina se aclaró con TFA. El péptido precipitado se centrifugó, se lavó con éter, se centrifugó y se liofilizó.

Protocolo de purificación:

35 El péptido en bruto se purificó por HPLC en fase inversa (RP-HPLC) usando una columna Jupiter C18, de 250 x 21 mm, 9 ml/min, eluyendo con un gradiente optimizado [Tampón A: agua que contiene TFA 0,1 %, Tampón B: acetonitrilo que contiene TFA 0,1 %].

Protocolo de plegamiento:

40 Se disolvió péptido puro (10 mg) en GnHCl 6 M (16 ml) y después se diluyó rápidamente hasta una concentración de GnClCl 2 M mediante la adición de TRIS 50 mM pH 8,5 (84 ml) que contiene GSSG 0,3 mM y GSH 3 mM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y después se analizó por RP-HPLC (columna Jupiter C18, 250 x 4,6 mm, B 10-60 % durante 30 minutos).

45 La purificación mediante RP-HPLC usando un gradiente optimizado proporcionó el producto deseado.

EJEMPLO 15 - biotinaMCP-1 (CCL2)

50 Molécula diana: MCP-1 derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ε amino de Lys (75) con PEG-Biotina (sal de TFA)

55 Modificaciones: MCP-1 humana correspondiente a los restos 1-76, se expresa inicialmente como 99 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocina, y un péptido señal de 23 aminoácidos que se retira por escisión. La Gln en el extremo N terminal de la proteína se somete a formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar la generación de especies mixtas de Gln y piroGlu N terminales. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea mediante fabricación y uso de columna. La lisina de origen natural en la posición 75 se modificó mediante biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad de ε amino y la biotina.

60 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 10), antes de la unión del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 75 (K): H-XPDAINAPVTCYNFTRNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT-NH₂
X = piroGlu o Gln

65

La secuencia de MCP-1 modificada técnicamente se ensambló en un soporte sólido (resina de Amida Rink), usando protocolos de Fmoc para síntesis de péptidos de fase sólida como se describe en la sección de protocolos general:

5 SEQ ID NO: 11 H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC ADPKQKWVQDSM-DHLDKQTQTPXT-RESIN
X1 = piroGlu o Gln
X75 = K(ivDde)

10 Se incorporó FmocLys (ivDde)-OH como el resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína. Se llevó a cabo la retirada posterior del grupo protector de ivDde, seguido de acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, como se describe en la sección de protocolo general. Se llevaron a cabo protocolos de escisión, purificación y plegamiento como se describe para facilitar la quimiocina activa deseada.

15 SEQ ID NO: 12 H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC ADPKQKWVQDSM-DHLDKQTQTPXT-NH₂
X1 = piroGlu o Gln
X75 es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, opcionalmente K(PEG-Biotina).

20 Datos de ionización de electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaMCP-1 plegada purificada: obtenido = 9032,8 Da; esperado 9034,4 Da.

25 Datos de ensayos funcionales:

La biotinaMCP-1 se ensayó con respecto a actividad agonista en un ensayo de Aecurina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se indicó un valor de CE50 de 9,6 nM. Compárese con la CE50 para MCP-1 nativa recombinante que es de 3,1 nM.

30 EJEMPLO 17 - biotinaMCP-2 (CCL8)

Molécula diana: MCP-2 derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ε amino de Lys (75) con PEG-Biotina (sal de TFA)

35 Modificaciones: MCP-2 humana correspondiente a los restos 1-76 se expresó inicialmente como 99 aminoácidos que comprendían el pliegue de quimiocina y un péptido señal de 23 aminoácidos que se retiró por escisión. La Gln en el extremo N terminal de la proteína se somete a formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar la generación de especies mixtas de Gln y piroGlu N terminales. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocina homogénea mediante fabricación y uso de columna. La lisina de origen natural en la posición 75 se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad de ε amino y la biotina.

45 La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 13) se muestra, antes de la unión del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 75 (K): H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE RWVRDSMKHLDQIFQNLKP-NH₂
X = piroGlu o Gln

50 La secuencia de MCP-2 modificada técnicamente se ensambló en un soporte sólido (resina de Amida Rink), usando protocolos de Fmoc para síntesis peptídica de fase sólida como se describe en la sección de protocolos general: H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH₂

X1 = piroGlu o Gln
X75 = K(ivDde)

55 Se incorporó FmocLys (ivDde)-OH como resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 14). Se llevó a cabo retirada posterior del grupo protector ivDde, seguido de acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, como se describe en la sección de protocolo general. Se llevaron a cabo protocolos de escisión, purificación y plegamiento como se describe para facilitar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 15): H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH₂

60 X1 = piroGlu o Gln
X75 = un resto de aminoácido que puede biotinilarse, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina).

65 Datos de ionización de electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotina MCP-2 plegada purificada: obtenido = 9263,6 Da; esperado 9263,8 Da.

Datos de ensayos funcionales:

se ensayó biotinaMCP-2 con respecto a actividad en un ensayo de Aecurina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se mostró que era un agonista parcial con un valor de CE50 de 50,9 nM. Compárese con la CE50 para MCP-2 nativa recombinante que es de 23,5 nM (agonista parcial).

EJEMPLO 22 - Diagnóstico y tratamiento de sarcoidosis

Materiales y métodos

1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos con heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando tampón de fijación (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído 4 %) durante 4 minutos a 37 °C y tampón de lisado (PBS con Tris 10 mM y NH4Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 minutos a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de crecimiento bovino 2 %, se incubaron con suero humano 10 % durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos (Tabla 2) a 4 °C durante 30 minutos. Las células se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

Tabla 2. Lista de anticuerpos para análisis citométrico de flujo.

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR1	Alexa fluor 647	Biolegend
CCR2	PerCpCy5.5	Biolegend
CCR7	PerCpCy5.5	Biolegend
CD4	V500	BD
CD3	Horizon V450	BD
Estreptavidina	APC	BD
CD14	FITC	Beckman Coulter
CD45RA	PECy7	BD

2. Ensayo de unión de quimiocinas

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos con heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando tampón de fijación (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído 4 %) durante 4 minutos a 37 °C y tampón de lisado (PBS con Tris 10 mM y NH4Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 minutos a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de crecimiento bovino 2 %, se incubaron con suero humano 10 % durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos específicos de células junto con quimiocina biotilada (1 µM) o el anticuerpo de receptor de quimiocinas correspondiente a 4 °C durante 30 minutos (Tabla 1). La quimiocina biotilada se detectó mediante la interacción entre biotina y una estreptavidina conjugada con fluoróforo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

3. Agotamiento celular por matriz conjugada con quimiocina biotilada

Las células se prepararon a partir de sangre periférica (sección 1). Se lavó 1 ml de matriz de Sepharose BigBeads conjugada con estreptavidina 0,4 mg/ml (GE Healthcare) en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió quimiocina biotilada al tubo y se incubó durante 20 minutos a TA para permitir la inmovilización de la quimiocina en la matriz mediante la interacción de biotina-estreptavidina. A continuación, las células se añadieron a la matriz de quimiocina y se incubaron durante 20 minutos a TA. Las células que no se unían con la matriz se retiraron por lavado de la matriz con PBS en un filtro de nylon de 40 µm estéril (Tamiz Celular BD Falcon™). Las células del flujo continuo se tiñeron con anticuerpos (Tabla 2), se analizaron mediante citometría de flujo y se compararon con células de sangre periférica que no se habían incubado con la matriz de quimiocina.

Resultados y análisis

Se analizaron glóbulos blancos de 2 pacientes con sarcoidosis con respecto a la expresión de receptores de quimiocinas con citometría de flujo. Los pacientes mostraron mayor frecuencia de monocitos que expresaban el receptor CCR1 basándose en datos de citometría de flujo y unión de un anticuerpo anti CCR1 (Figura 18).

El ligando para CCR1 es la quimiocina RANTES que también se une con CCR5 expresado en células T. RANTES se expresa en los pulmones donde media en la migración de células inflamatorias. Los monocitos se unen con RANTES biotinilado en el mismo grado que la expresión del receptor de quimiocinas (Figura 19).

5 Los monocitos que expresaban CCR1 podrían agotarse eficazmente con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bRANTES (Figura 20).

Además de CCR1, los monocitos expresan el receptor de quimiocina CCR2 (Figura 21), basándose en datos de citometría de flujo y unión de un anticuerpo anti CCR2.

10 El ligando para CCR2 es MCP-1 que media en la migración de monocitos en inflamación. De acuerdo con la expresión de CCR2, MCP-1 biotinilado (bMCP-1) podría unirse a monocitos de sangre de un paciente con sarcoidosis (Figura 22).

15 Los monocitos que expresan CCR2 podrían agotarse con Matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMCP1 (Figura 23).

20 Los pacientes con sarcoidosis muestran una mayor frecuencia de células T en circulación que expresan el receptor de quimiocinas CCR7 (Figura 24a), basándose en los datos de citometría de flujo y unión con un anticuerpo anti CCR7. Además, la frecuencia de células T de memoria centrales, que se caracterizan como CCR7 positivas, aumenta en sarcoidosis (Figura 24b). Las células T de memoria centrales contribuyen a la inflamación montando una respuesta inmunitaria rápida y fuerte la segunda vez que se desencadena la inflamación, y pueden ser responsables de sarcoidosis recidivante.

25 El ligando para CCR7 es MIP3b. Las células T que expresan CCR7 podrían agotarse eficazmente con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMiPSb (Figura 25)

30 Se concluye que la frecuencia de monocitos que expresan CCR1 y células T que expresan CCR7 está potenciada en Sarcoidosis. El receptor CCR2 se expresa en monocitos de pacientes con sarcoidosis en el mismo grado que en controles sanos, pero las células que expresan CCR2 podrían diferir en su perfil proinflamatorio en los pacientes en comparación con controles sanos. Tanto los monocitos como las células T se unen con las quimiocinas que corresponden a la expresión del receptor de quimiocinas, y podrían agotarse eficazmente con la matriz de Sepharose Estreptavidina-quimiocina biotinilada correspondiente.

35 Las diversas realizaciones presentes de la invención no deben limitarse en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de las diversas realizaciones de la invención además de las descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Además, todas las realizaciones descritas en el presente documento se consideran ampliamente aplicables y combinables con todas y cada una de las realizaciones coherentes adicionales, según sea apropiado.

40

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> ITH Immune Therapy Holdings AB

<120> TRATAMIENTO DE AFECCIONES RESPIRATORIAS

<130> P117815WO00

50 <160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

55 <211> 99

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Péptido sintetizado

<400> 1

ES 2 637 390 T3

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

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val
 20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu
 35 40 45

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

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr
 85 90 95

Pro Lys Thr

<210> 2
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintetizado

<400> 2

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> 3
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintetizado

ES 2 637 390 T3

<400> 3

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

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

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

Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln
50 55 60

Thr Pro Lys Thr
65

5 <210> 4
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintetizado

<400> 4

Met Lys Ile Ser Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Thr Thr Ile
1 5 10 15

Ser Pro Gln Val Leu Ala Gly Pro Asp Ala Val Ser Thr Pro Val Thr
20 25 30

Cys Cys Tyr Asn Val Val Lys Gln Lys Ile His Val Arg Lys Leu Lys
35 40 45

Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Gln Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile
50 55 60

Phe Arg Thr Ile Leu Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys
65 70 75 80

Trp Val Lys Asn Ser Ile Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe
85 90 95

Ile Leu Glu Pro Ser Cys Leu Gly
100

15 <210> 5
<211> 82
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

ES 2 637 390 T3

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 5

5

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

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

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

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

Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe Ile Leu Glu Pro Ser Cys
65 70 75 80

Leu Gly

<210> 6

<211> 76

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

15

<400> 6

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

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

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

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

Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe Ile Leu
65 70 75

20

<210> 7

<211> 76

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

ES 2 637 390 T3

<220>

<223> Péptido sintetizado

<400> 7

5

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 97

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

15

<400> 8

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Trp Leu Leu Leu Ile Ala Ala Ala
1 5 10 15

Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys
20 25 30

Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser
35 40 45

Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Gly Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe
50 55 60

Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp
65 70 75 80

Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys
85 90 95

Pro

20

<210> 9

<211> 74

ES 2 637 390 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintetizado

<400> 9

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

10 <210> 10
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido sintetizado

20 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = piroGlu o Gln

25 <400> 10

Xaa 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> 11

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

5 <220>
 <223> Péptido sintetizado

10 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = piroGlu o Gln

15 <220>
 <221> X
 <222> (75)..(75)
 <223> X es K(ivDde)

<400> 11

	Xaa	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	Xaa	Thr				
20	65					70					75					

<210> 12
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintetizado

30 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = piroGlu o Gln

35 <220>
 <221> X
 <222> (75)..(75)
 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-biotina)

40 <400> 12

ES 2 637 390 T3

Xaa 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 Xaa Thr
 65 70 75

- 5 <210> 13
- <211> 76
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Péptido sintetizado
- 15 <220>
- <221> X
- <222> (1)..(1)
- <223> X = piroGlu o Gln
- <400> 13

Xaa 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

- 20 <210> 14
- <211> 76
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Péptido sintetizado
- <220>

ES 2 637 390 T3

<221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = piroGlu o Gln

5 <220>
 <221> X
 <222> (75)..(75)
 <223> X es K(ivDde)

10 <400> 14

Xaa 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 Xaa Pro
 65 70 75

15 <210> 15
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintetizado

25 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = piroGlu o Gln

30 <220>
 <221> X
 <222> (75)..(75)
 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-biotina)

35 <400> 15

ES 2 637 390 T3

Xaa 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 Xaa Pro
 65 70 75

5 <210> 16
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 <400> 16

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 Lys Ser
 65

15 <210> 17
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintetizado

25 <220>
 <221> X

<222> (67)..(67)
 <223> X es K(ivDde)

ES 2 637 390 T3

<400> 17

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 Xaa Ser
65

5 <210> 18
<211> 68
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintetizado

<220>
<221> X
15 <222> (67)..(67)

<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG (por ejemplo K(biotina))

20 <400> 18

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 Xaa Ser
65

25 <210> 19
<211> 78
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 637 390 T3

<220>
<223> Péptido sintetizado

5 <220>
<221> X
<222> (78)..(78)
<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado (por ejemplo K(biotina)), opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina)

10 <400> 19

```

Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Lys Pro
1          5          10          15

Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile Lys Asp
20          25          30

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

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

Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg Ser Ser Xaa
65          70          75
    
```

15 <210> 20
<211> 78
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintetizado

25 <220>
<221> X
<222> (78)..(78)
<223> X es K(ivDde)

<400> 20

ES 2 637 390 T3

Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Lys Pro
 1 5 10 15

Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile Lys Asp
 20 25 30

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

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

Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg Ser Ser Xaa
 65 70 75

5 <210> 21
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido sintetizado
 15 <220>
 <221> X
 <222> (78)..(78)
 <223> X es K(Biotina)
 <400> 21

Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Lys Pro
 1 5 10 15

Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile Lys Asp
 20 25 30

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

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

Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg Ser Ser Xaa
 65 70 75

20 <210> 22
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido sintetizado

ES 2 637 390 T3

<220>

<221> X

<222> (78)..(78)

5 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-biotina)

<400> 22

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys
1 5 10 15

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

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

Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln
50 55 60

Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
65 70 75

10

<210> 23

<211> 78

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

20

<220>

<221> X

<222> (78)..(78)

<223> X es K(ivDde)

25

<400> 23

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys
1 5 10 15

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

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

Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln
50 55 60

Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
65 70 75

ES 2 637 390 T3

5
 <210> 24
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintetizado

10
 <220>
 <221> X
 <222> (78)..(78)
 <223> X es K(PEG-Biotina)

15
 <400> 24

Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys
 1 5 10 15

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

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

Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln
 50 55 60

Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
 65 70 75

20
 <210> 25
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Péptido sintetizado

30
 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-biotina)

<400> 25

ES 2 637 390 T3

Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
 1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
 20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu
 35 40 45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys
 50 55 60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
 65 70

5 <210> 26
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintetizado

15 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es K(ivDde)

<400> 26

Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
 1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
 20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu
 35 40 45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys
 50 55 60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
 65 70

20 <210> 27
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintetizado

30 <220>
 <221> X

ES 2 637 390 T3

<222> (73)..(73)

<223> X es K(PEG-Biotina)

<400> 27

5

Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu
35 40 45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys
50 55 60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
65 70

<210> 28

<211> 74

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

15

<220>

<221> X

<222> (73)..(73)

20

<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-biotina)

<400> 28

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 Xaa Pro
65 70

25

<210> 29

<211> 74

ES 2 637 390 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintetizado

10 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es K(ivDde)

<400> 29

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 Xaa Pro
 65 70

15 <210> 30
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintetizado

25 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es K(PEG-Biotina)

30 <400> 30

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas CCR2 para uso en el tratamiento de una afección respiratoria, en donde el reactivo de unión está inmovilizado en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2 de la sangre periférica del paciente.
2. El reactivo de unión para uso de la reivindicación 1 en el que:
- (i) la afección respiratoria se selecciona de sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); y/o
 - (ii) el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR2 es un agonista o un antagonista de CCR2; y/o
 - (iii) el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR2 se selecciona de un anticuerpo y una quimiocina, y en donde la quimiocina es CCL2 (MCP-1)
y/o
 - (iv) las células que expresan CCR2 son monocitos o eosinófilos o linfocitos, específicamente linfocitos T tales como células T de memoria centrales;
y/o
 - (v) el paciente se ha seleccionado para tratamiento basándose en la detección de un aumento del nivel de células que expresan CCR2, de los niveles de expresión de CCR2 y/o de los niveles de células con alta expresión de CCR2 en una muestra obtenida del paciente;
y/o
 - (vi) el 20-50 % de la sangre del paciente se aplica a la columna en un único tratamiento.
3. Un método de supervisión del tratamiento de una afección respiratoria, que comprende determinar
- a) los niveles de células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2
 - b) niveles de expresión de CCR2; y/o
 - c) niveles de células con alta expresión de CCR2
- en una muestra de sangre periférica obtenida de un sujeto, en la que:
- (i) altos niveles de células que expresan CCR2, altos niveles de expresión de CCR2 o altos niveles de células con alta expresión de CCR2 o aumento de los niveles de células que expresan CCR2 en comparación con un control, aumento de los niveles de expresión de CCR2 en comparación con un control o aumento de los niveles de células con alta expresión de CCR2 en comparación con un control, indican la presencia o la progresión de la afección respiratoria;
 - (ii) reducción de los niveles de células que expresan CCR2, y/o reducción de los niveles de expresión de CCR2 y/o reducción de los niveles de células con alta expresión de CCR2 se correlacionan con tratamiento exitoso, y en donde el tratamiento es de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Un método para seleccionar un tratamiento adecuado para una afección respiratoria, que comprende determinar
- a) los niveles de células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2
 - b) niveles de expresión de CCR2; y/o
 - c) niveles de células con alta expresión de CCR2
- en una muestra obtenida de un sujeto, en la que altos niveles de células que expresan CCR2, altos niveles de expresión de CCR2 o altos niveles de células con alta expresión de CCR2 o aumento de los niveles de células que expresan CCR2 en comparación con el control, aumento de los niveles de expresión de CCR2 en comparación con un control o aumento de los niveles de células con alta expresión de CCR2 en comparación con un control, dan como resultado la selección de un tratamiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para el tratamiento de la afección respiratoria.
5. El método de la reivindicación 4 en el que:
- (i) las afecciones respiratorias se seleccionan de sarcoidosis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); y/o
 - (ii) la muestra es una muestra de sangre periférica, opcionalmente en la que las células son monocitos que expresan CCR2, o linfocitos, específicamente linfocitos T tales como células T de memoria centrales.

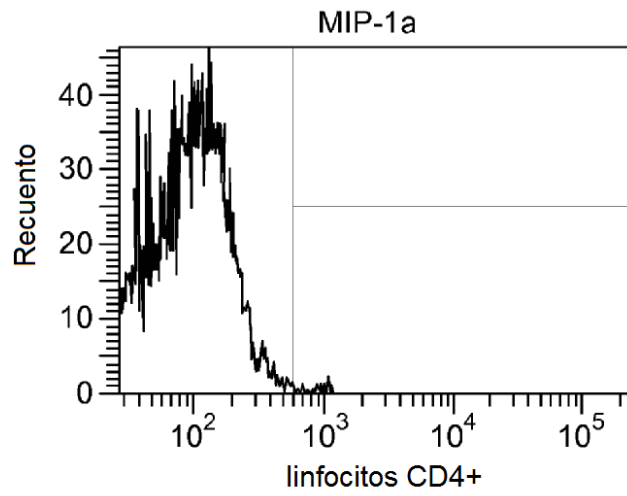


FIG. 1a

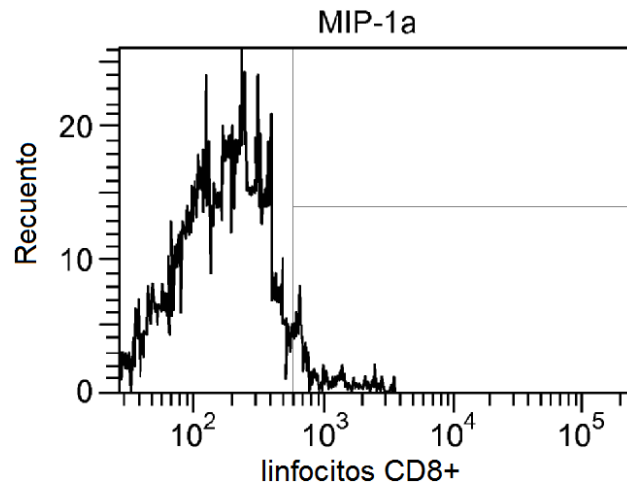


FIG. 1b

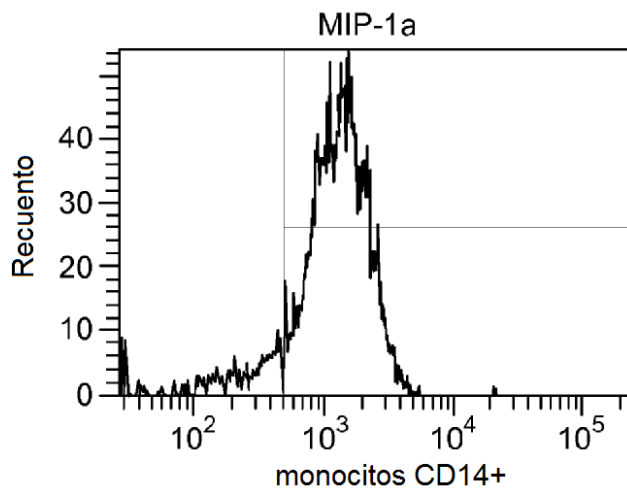


FIG. 1c

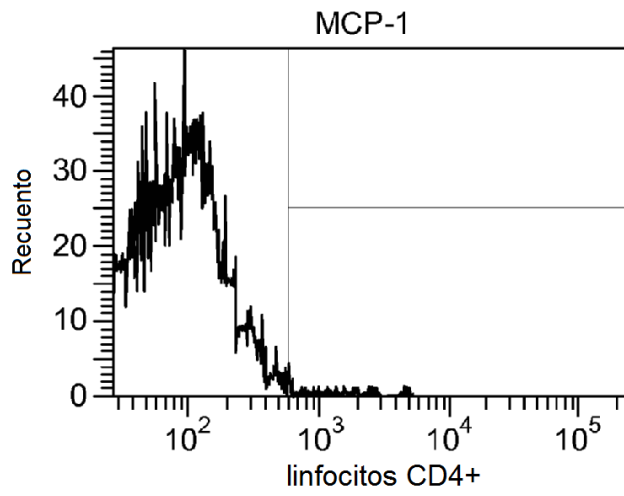


FIG. 2a

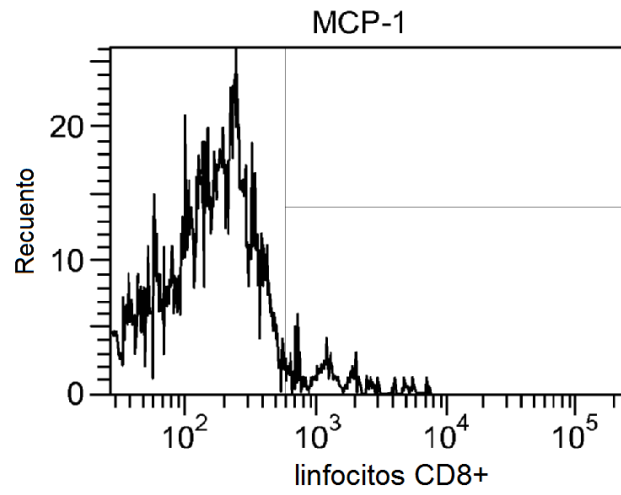


FIG. 2b

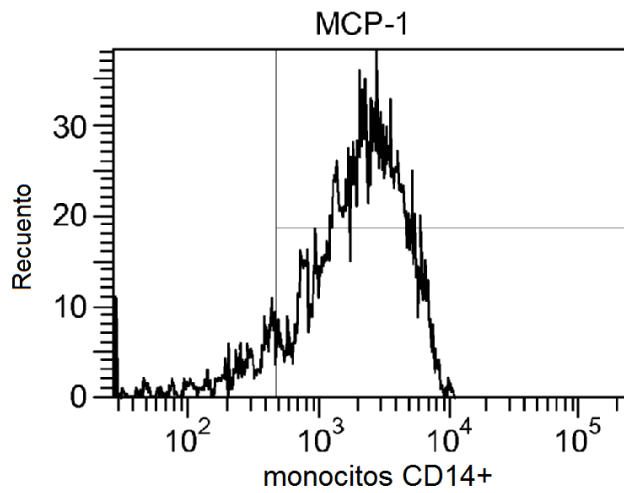


FIG. 2c

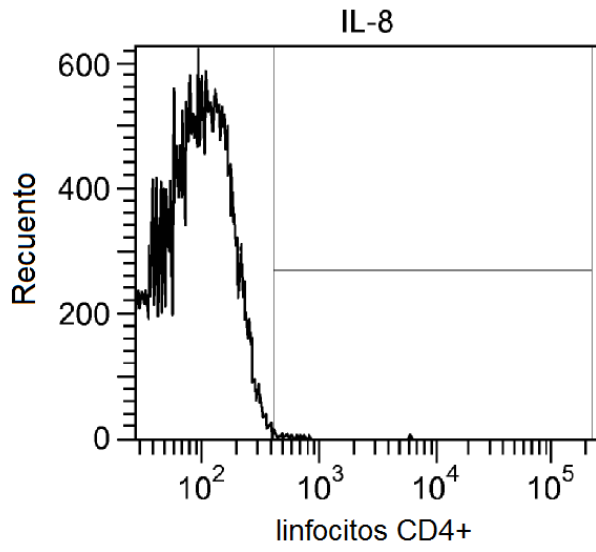


FIG. 3a

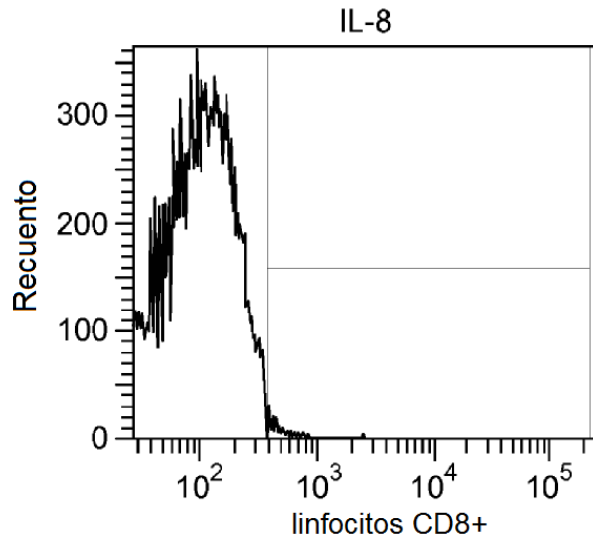


FIG. 3b

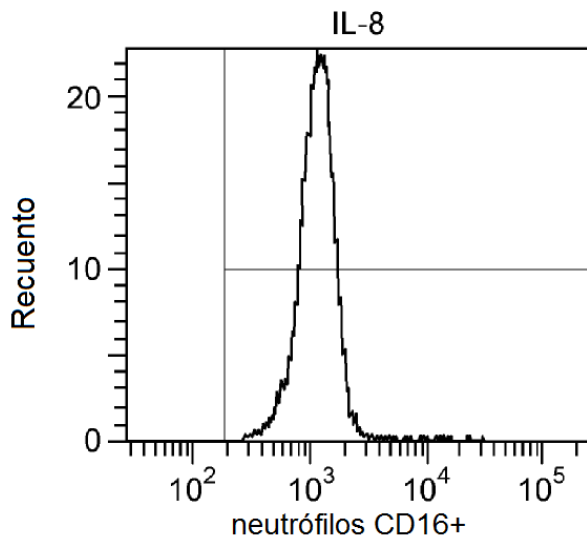


FIG. 3c

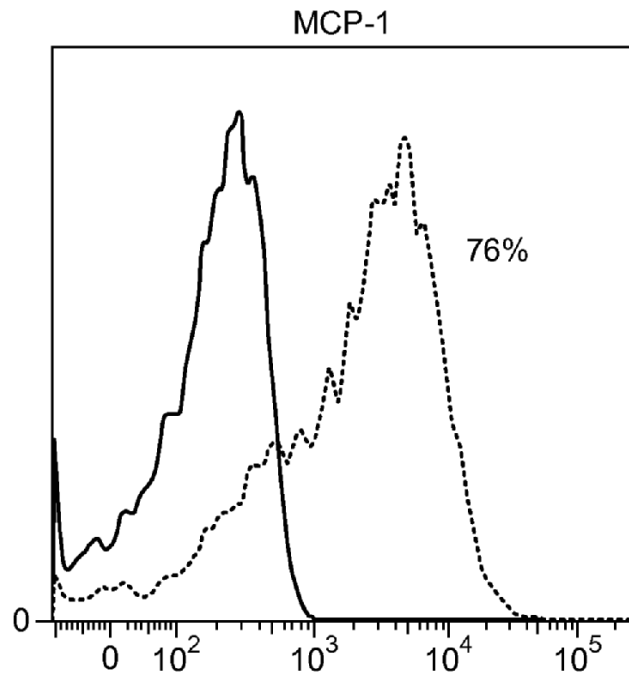


FIG. 4a

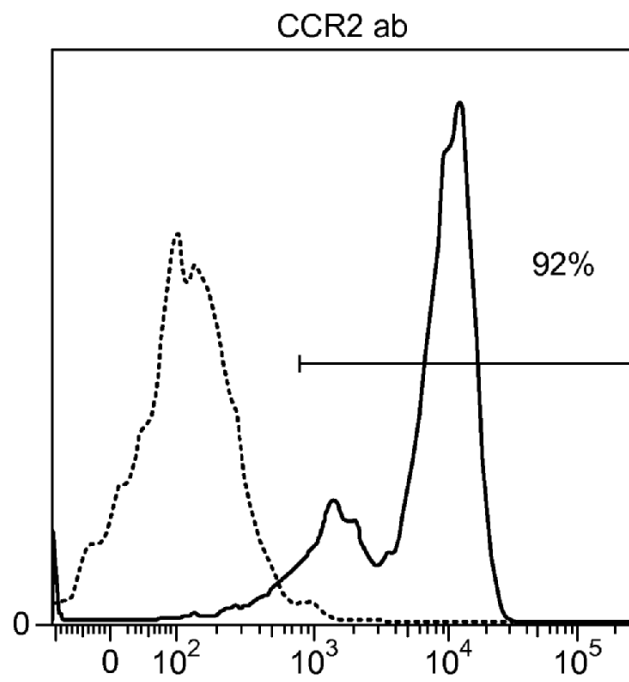


FIG. 4b

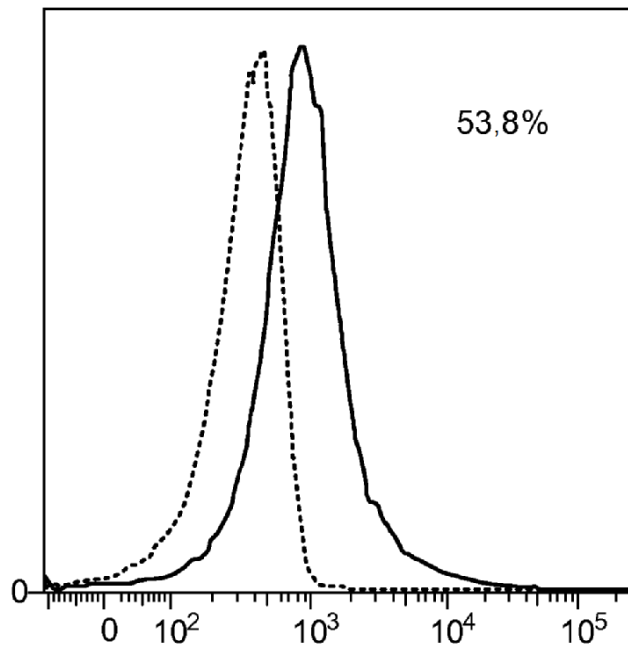


FIG. 5a

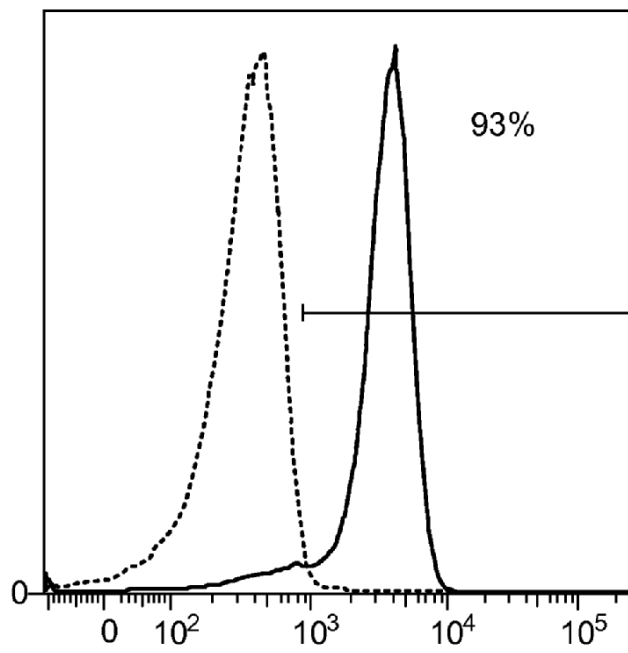


FIG. 5b

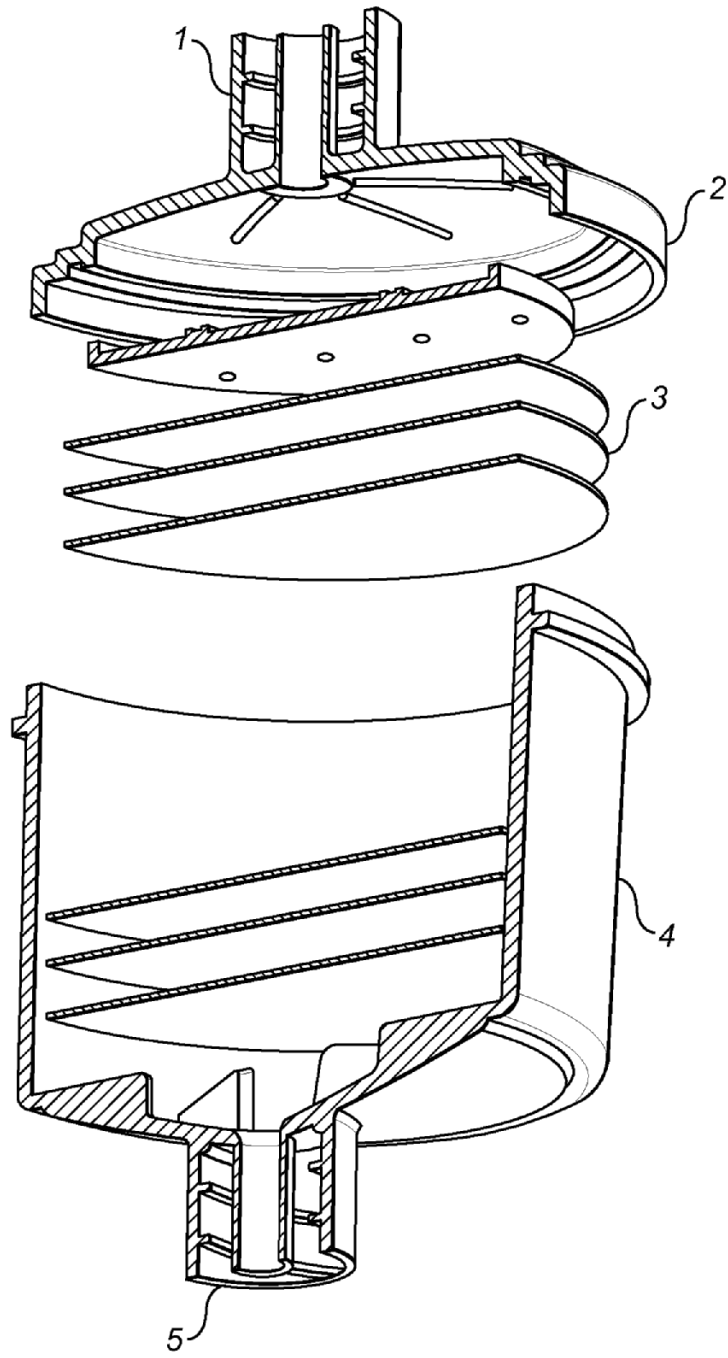


FIG. 6

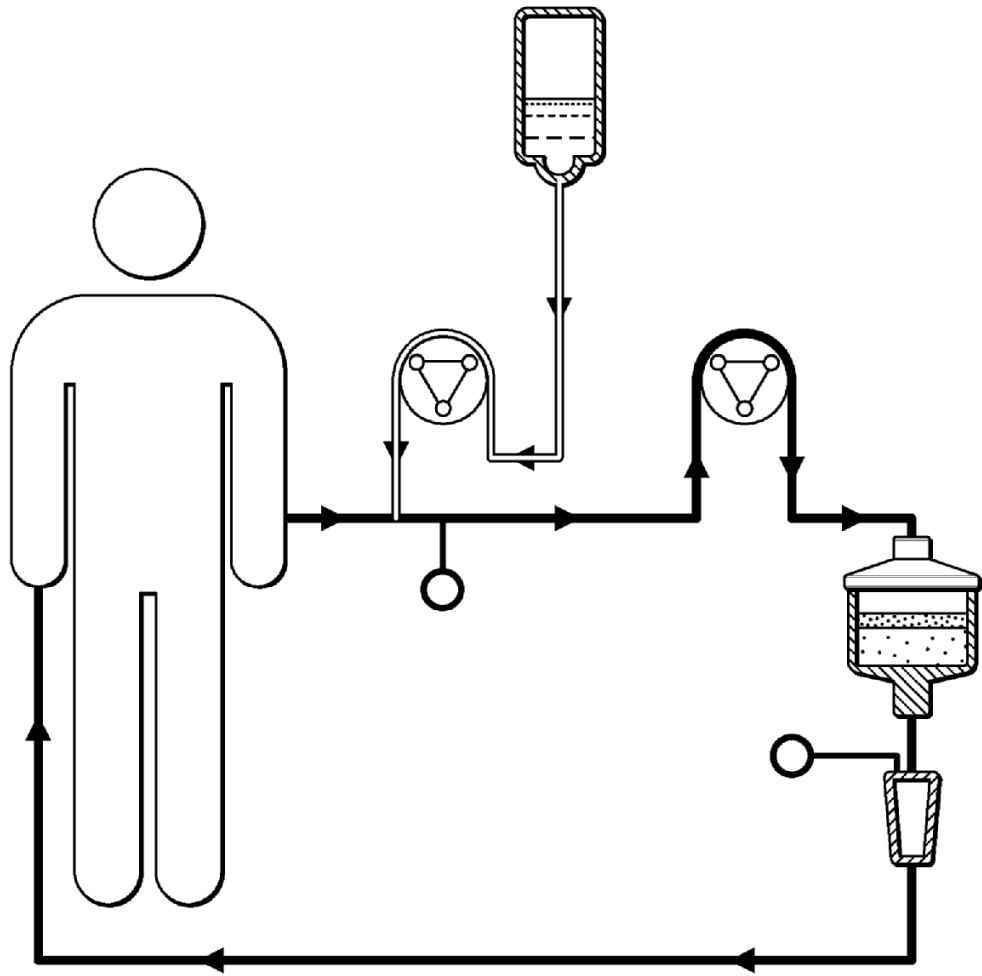


FIG. 7

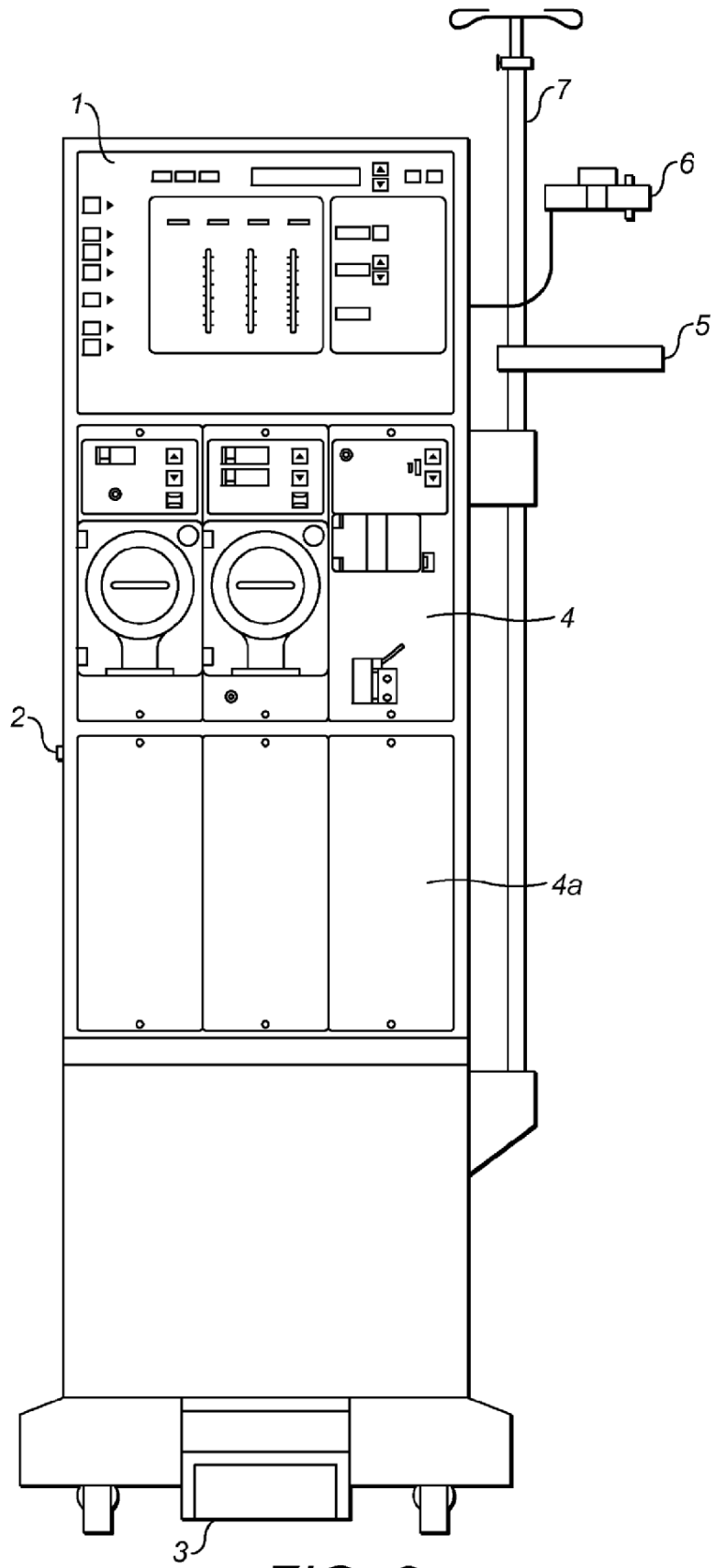


FIG. 8

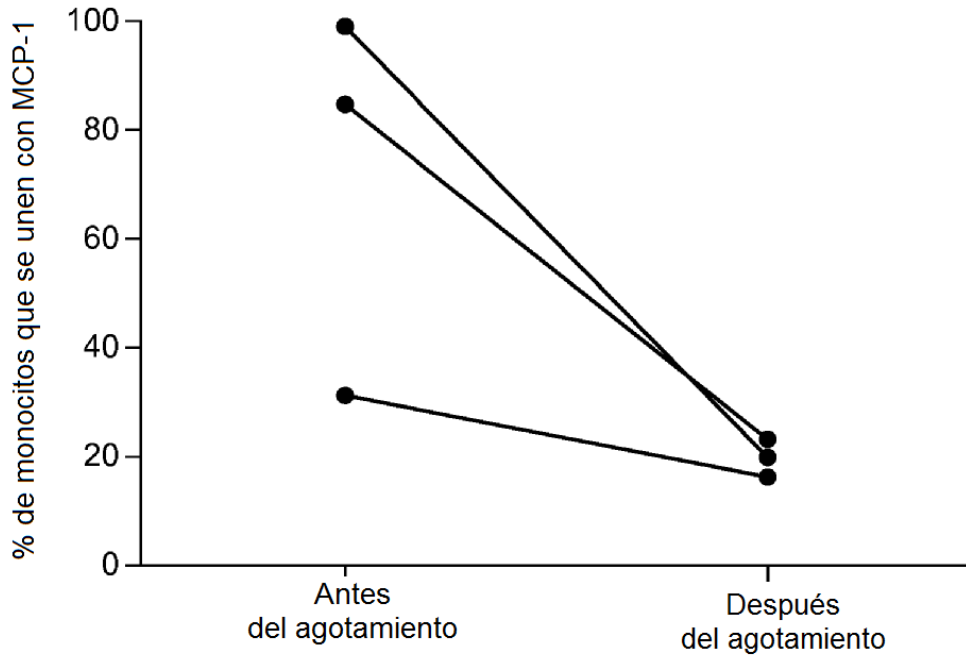


FIG. 9a

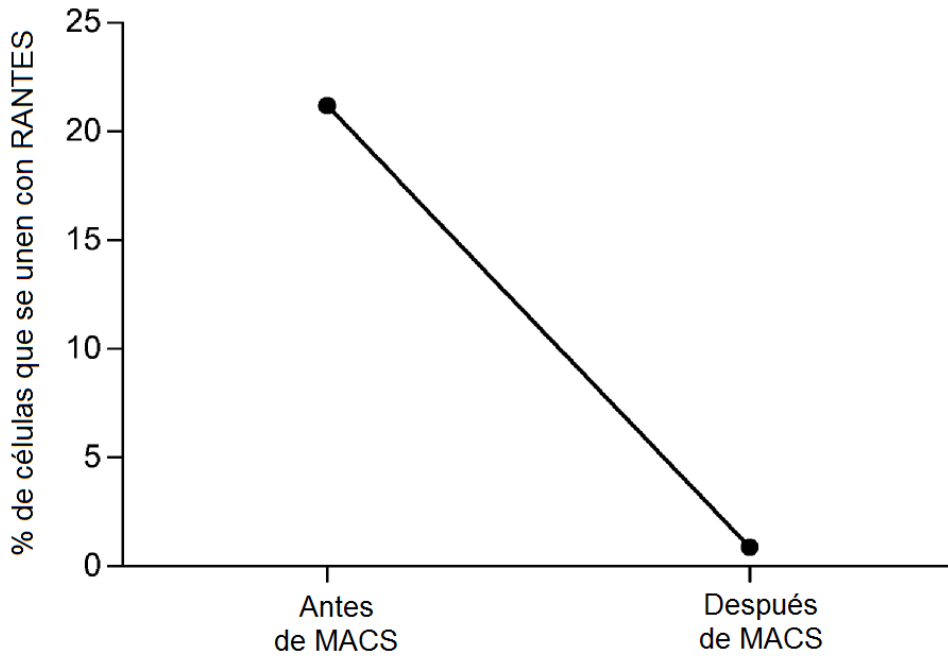


FIG. 9b

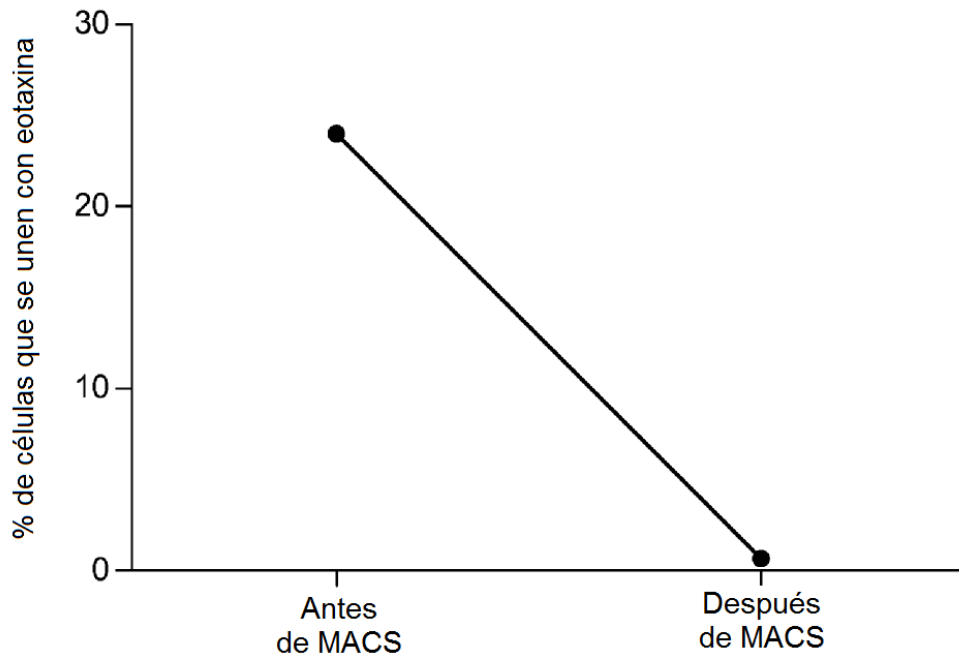


FIG. 9c

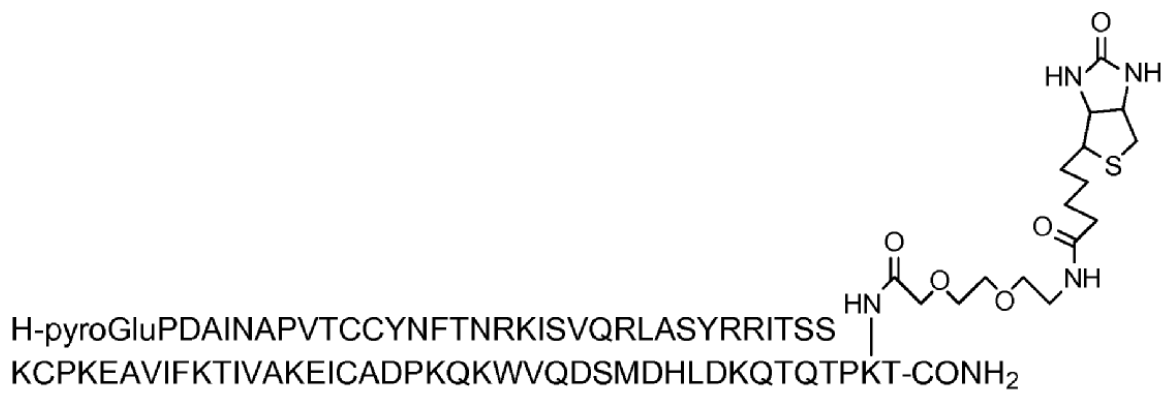


FIG. 10

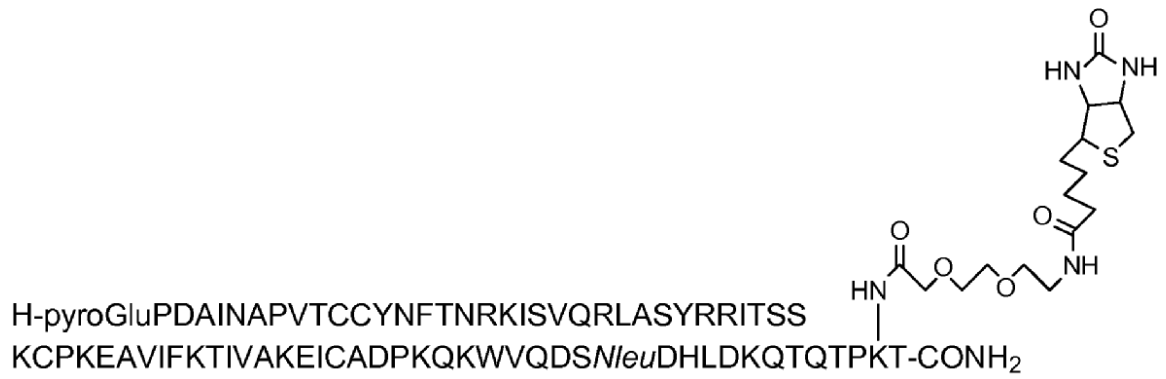


FIG. 11

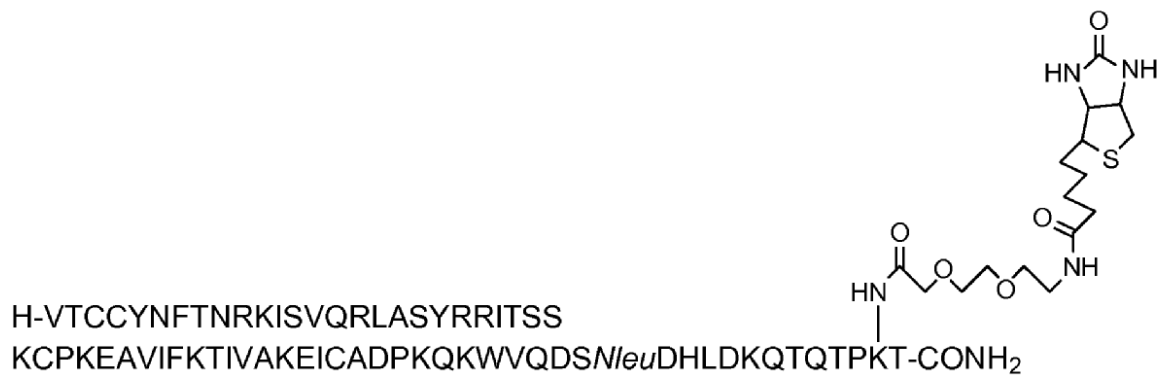


FIG. 12

ulimit -t 30; /usr/molbio/bin/lalign -f-14 -g -4 -K 3 ./wwtmp/. 11134.1.seq
 ./wwtmp/.1 1134.2.seq > ./wwtmp/. 11134.out LALIGN encuentra los mejores
 alineamientos locales entre dos secuencias versión 2.1u09 diciembre 2006 Por favor
 cítese: X. Huang y W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 alineamientos < E(
 0,05):puntuación: 38 (3 máx)

Comparación de:

(A) ./wwtmp/.11134.1.seq MCP1 (humana) 76 pb

- 76 aa

(B) ./wwtmp/.11134.2.seq MCP-5 (ratón) 82 pb

- 82 aa

usando el archivo de matriz: BL50 (15/-5), Apertura/ext de hueco: -14/-4 E(límite)
 0,05

68,1 % de identidad en solapamiento de 72 aa (2-73:2-73); puntuación: 370 E (10000):

1,6e-31

	10	20	30	40	50	60
MCP1	PDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQ					

MCP-5	PDAVSTPVTCCYNVVKQKIHVRKCLKSYRRITSSQCPREAVIFRTILDKEICADPKEKWVK					
	10	20	30	40	50	60
	70					
MCP1	DSMDHLDKQTQTPKT					
				
MCP-5	NSINHLDKTSQTFILEPSCLG					
	70					

FIG. 13

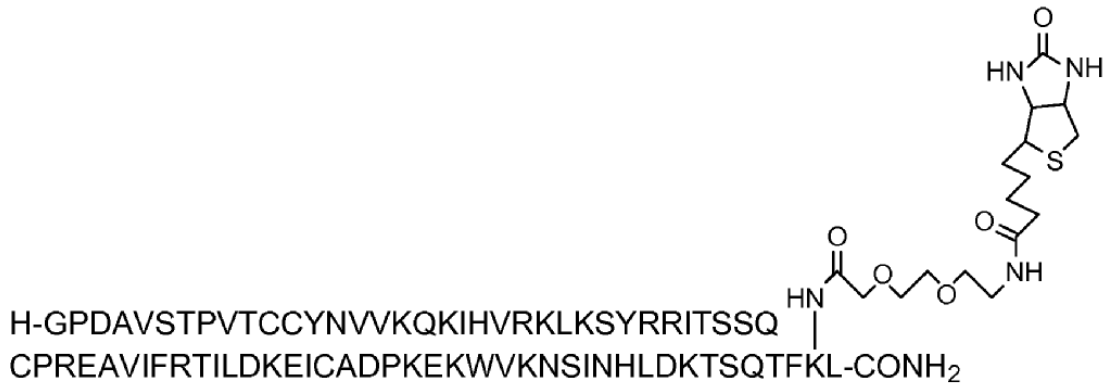


FIG. 14

H₂N-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNP
AVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEKS-CO₂H

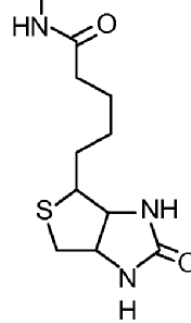


FIG. 15

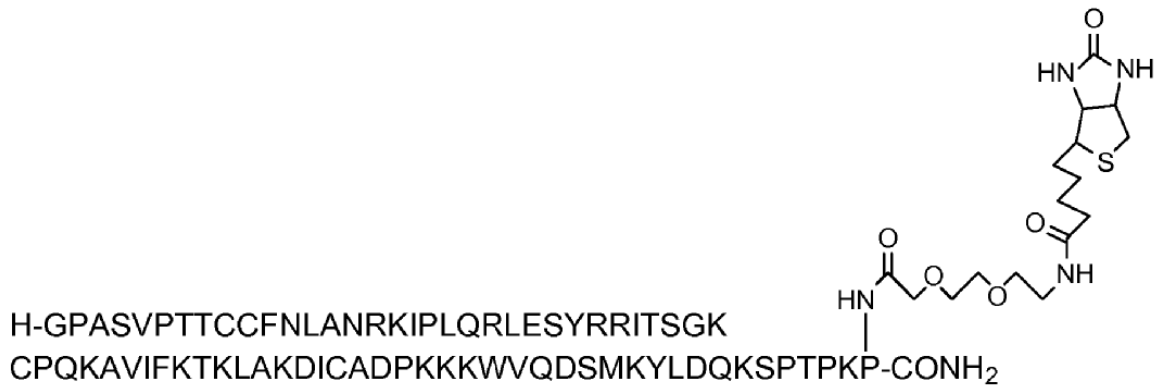


FIG. 16

Control sano (HC no4)

Panel 1 de HC 4

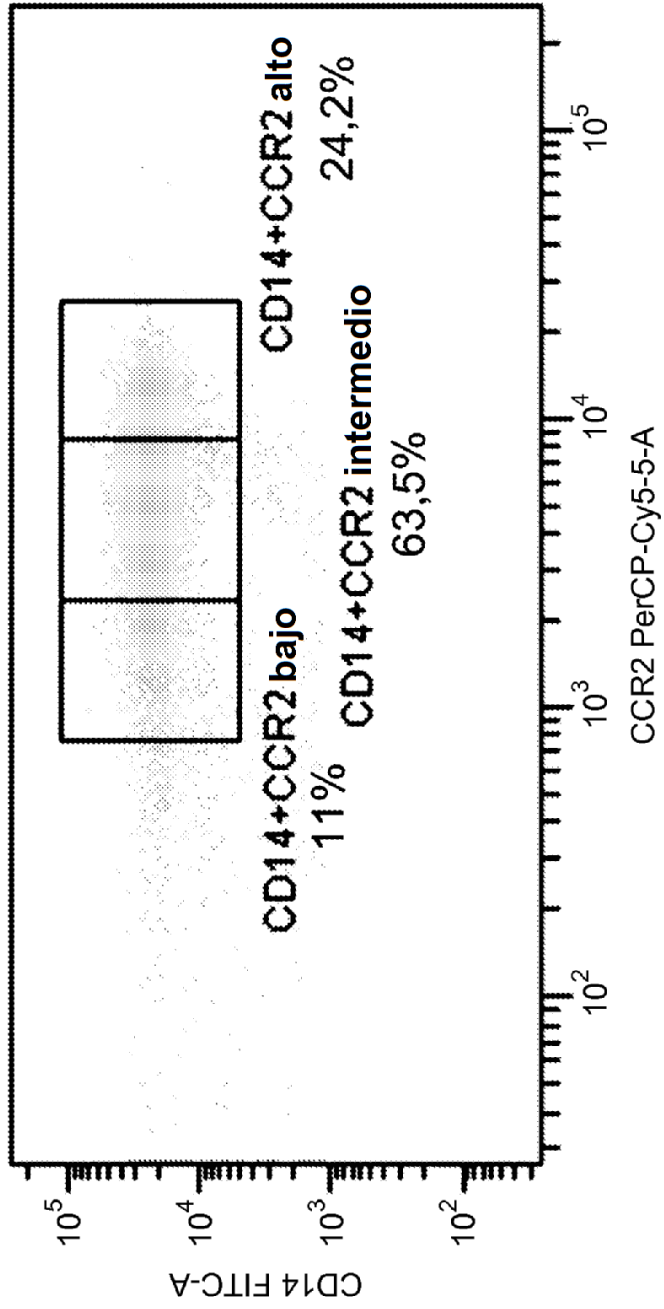


FIG. 17

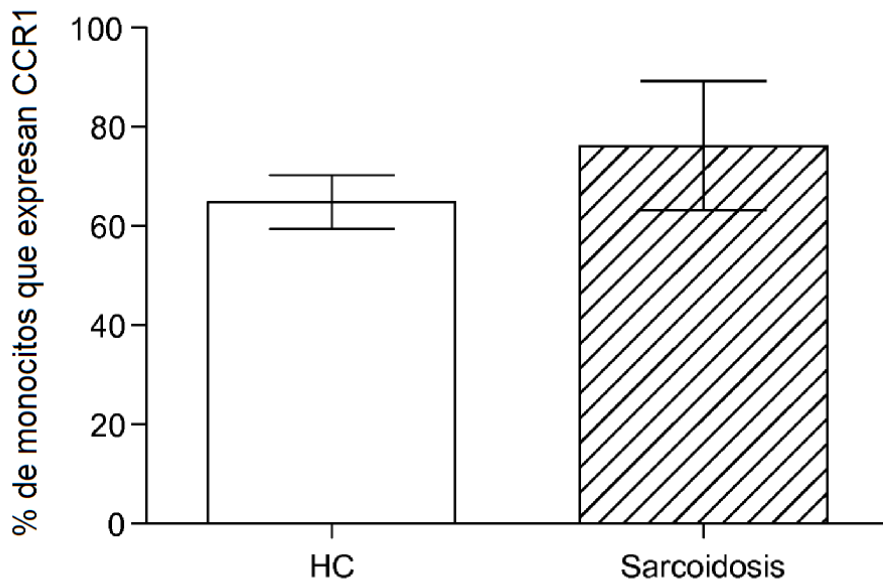


FIG. 18

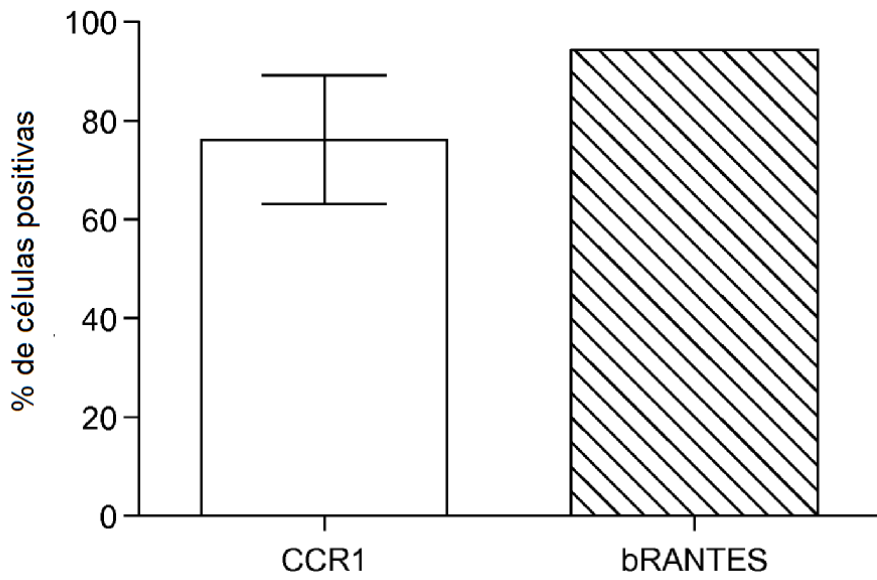


FIG. 19

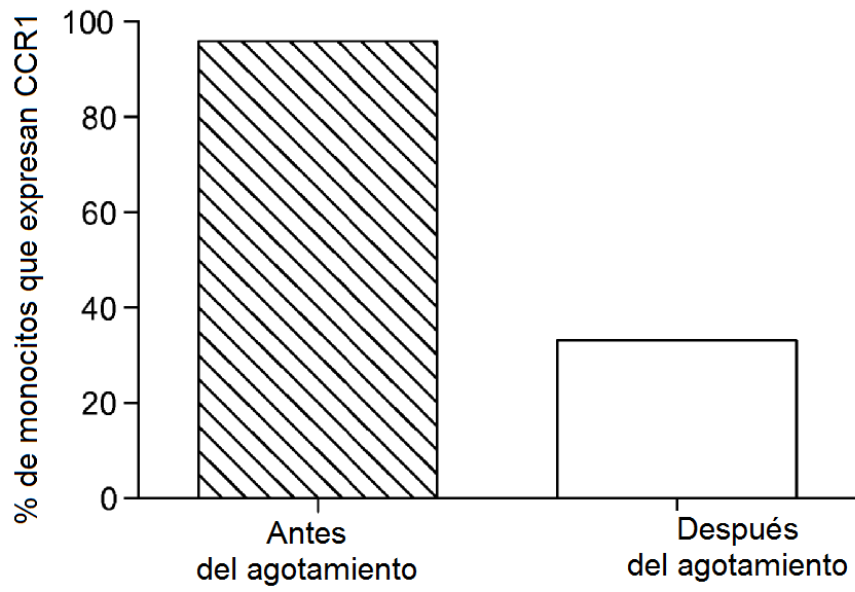


FIG. 20

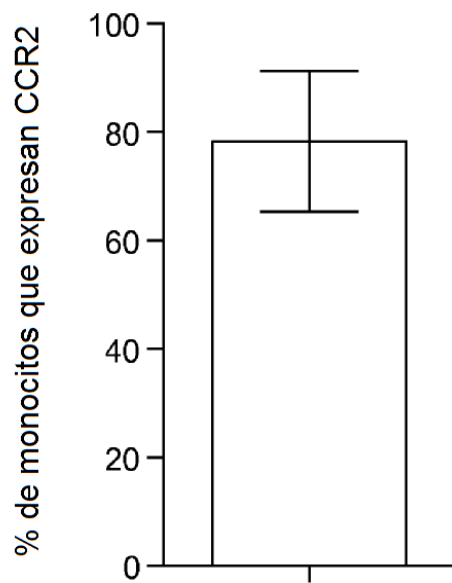


FIG. 21

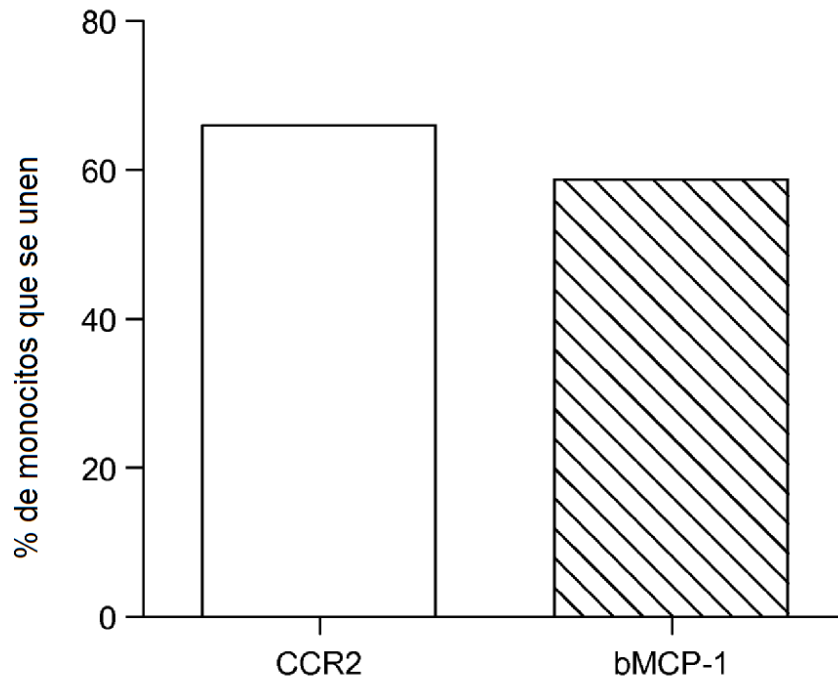


FIG. 22

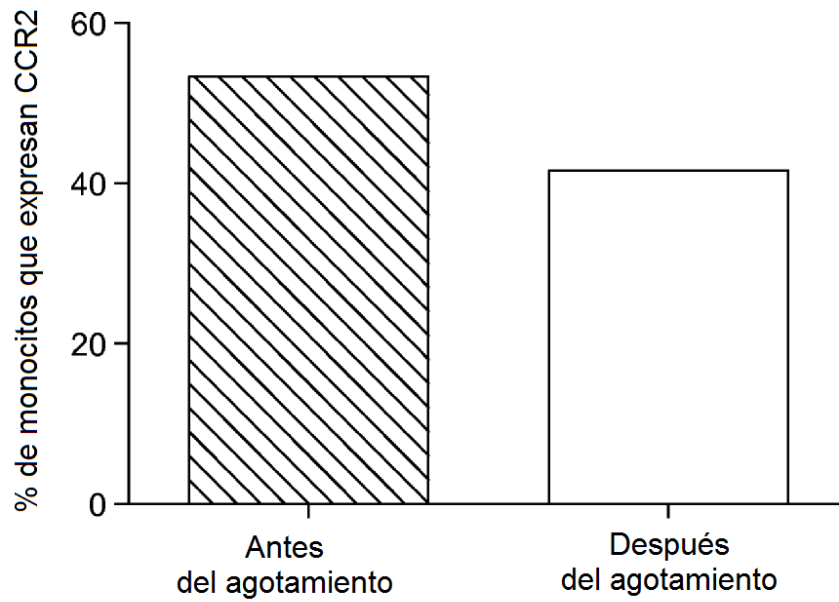


FIG. 23

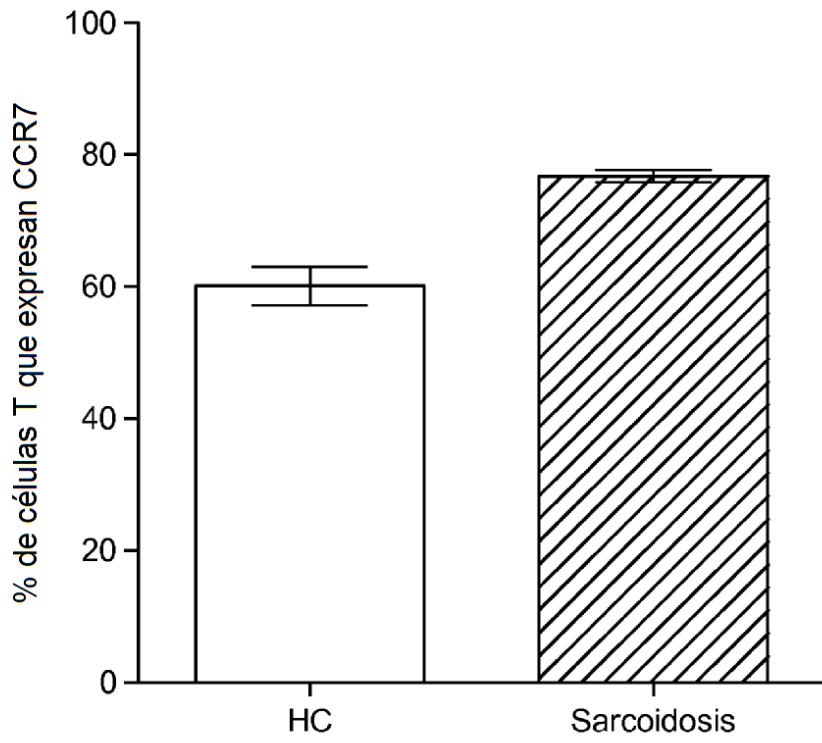


FIG. 24a

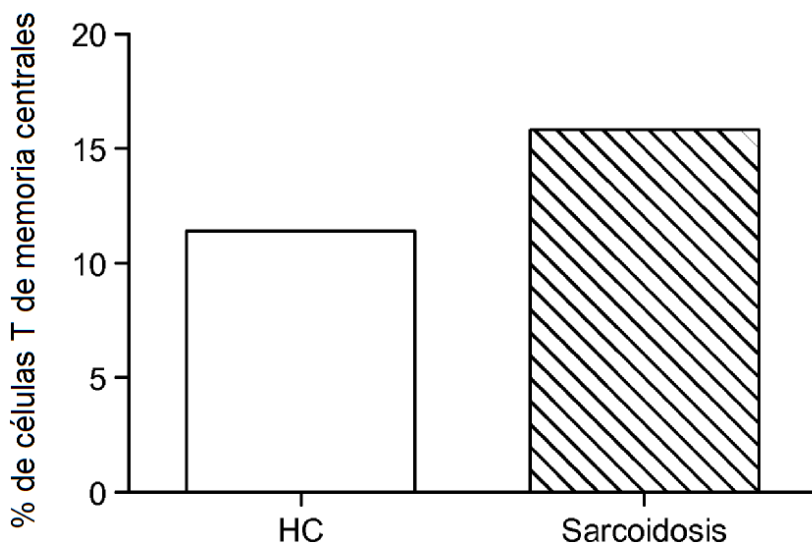


FIG. 24b

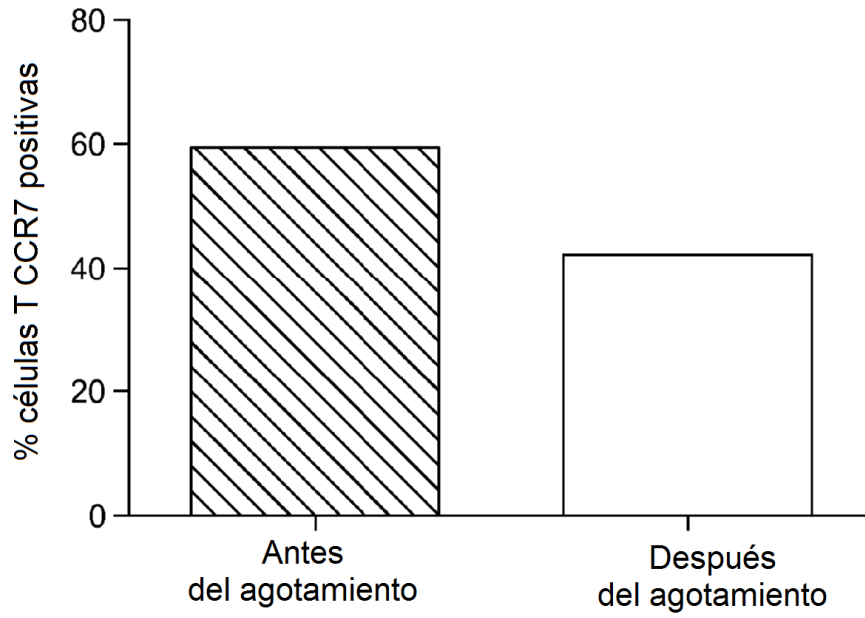


FIG. 25