

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 836**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

A61M 1/36 (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/GB2012/051352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12727917 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2718311**

54 Título: **Tratamiento de esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

13.06.2011 US 201161496264 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2018

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 2 664 836 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 esclerosis múltiple

Campo de la invención

5 Las diversas realizaciones de la presente invención se refieren a productos y métodos para el tratamiento de esclerosis múltiple, en particular, esclerosis múltiple remitente-recidivante estable y activa, esclerosis múltiple progresiva primaria, progresiva secundaria y recidivante progresiva. Se describen asimismo pruebas diagnósticas.

10 Antecedentes de la invención

Esclerosis múltiple es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC). El inicio de la enfermedad suele producirse en adultos jóvenes, con edades comprendidas entre 20 y 40 años, sin embargo, la causa subyacente precisa de la EM es desconocida. Actualmente, no existe ninguna cura para esta enfermedad
15 incapacitante y el tratamiento se centra principalmente en el tratamiento de los síntomas. Independientemente de la etiología de la enfermedad, se ha descubierto que el sistema inmune desempeña un papel central en la patogénesis de EM. En particular, las lesiones que se forman en el cerebro y/o la médula espinal durante el progreso de la enfermedad se caracterizan frecuentemente por una infiltración inflamatoria excesiva y la presencia de linfocitos T CD4⁺/ CD8⁺ autorreactivos y linfocitos B autorreactivos. Por otra parte, el ataque en curso del SNC mediado por
20 diversos tipos de células inflamatorias y/o inmunes parece ser la causa principal del daño nervioso y, en particular, la desmielinización de axones, asociada a esta enfermedad. La aféresis es un tratamiento utilizado para empobrecer componentes de la sangre, como por ejemplo anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y glóbulos. La leucaféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para separar glóbulos blancos, leucocitos. Se conecta al paciente con un sistema de circulación de la sangre extracorpóreo; se extrae la sangre de una vena de un brazo, se pasa a
25 través de un dispositivo de columna y se retorna al otro brazo del paciente. La patente internacional WO2010/029317 describe columnas de aféresis útiles para el tratamiento de afecciones inflamatorias incluyendo una quimioquina inmovilizada sobre un soporte sólido.

Como técnica relacionada se puede mencionar Nakane Shunya et al., Multiple Sclerosis Journal, 2003, 9(6), pp. 579-584, que se refiere a citaféresis con un filtro para la separación selectiva de linfocitos T CD4⁺ en un modelo
30 animal experimental de esclerosis múltiple humana. Asimismo, Mahad Don, et al., Seminars in Immunology, 2003, 15(1), pp. 23-32, se refiere al papel de MCP-1(CCL2) y CCR2 en esclerosis múltiple y el modelo experimental EAE.

Sumario de la invención

35 Las quimioquinas constituyen una clase de moléculas de citoquinas relacionadas con el reclutamiento y activación de células en inflamación. Las quimioquinas causan quimiotaxis y activación de diversas subpoblaciones de las células en el sistema inmune. La actividad de las quimioquinas está mediada principalmente por la firme unión a sus receptores en la superficie de los leucocitos. En ciertas realizaciones, la presente invención se basa en el hecho de
40 haber comprendido que la interacción entre las quimioquinas y las células que expresan sus receptores puede ser explotada para el tratamiento de esclerosis múltiple. En particular, varios tipos de esclerosis múltiple, como esclerosis múltiple remitente-recidivante estable y activa, incluyen un componente inflamatorio. Los autores de la invención han determinado que dirigirse al mayor reclutamiento de células que expresan receptor de quimioquina específico en el sitio de la inflamación presenta un nuevo enfoque terapéutico para tratar dichas afecciones.
45 Además, en dichas afecciones, es posible que aumente la expresión del receptor de quimioquina en cada célula los que proporciona también en este caso un enfoque terapéutico para tratar dichas afecciones. En el presente documento se demuestra que las personas que padecen EM presentan una mayor frecuencia de células que expresan receptor de quimioquina en la sangre periférica, en particular, linfocitos T que expresan CCR2 y CCR6, en comparación con los controles sanos. Asimismo, en el presente documento, se demuestra que es posible separar
50 las células CDCR2 utilizando un reactivo de unión adecuado, en particular, MCP-1 (en forma biotinilada), inmovilizada en una matriz adecuada. De manera similar, en el presente documento se demuestra que es posible empobrecer las células que expresan CCR6 (adicionales) utilizando un reactivo de unión adecuado, en particular, CCL20 (MIP-31), en la forma biotinilada, inmovilizado sobre una matriz adecuada. En consecuencia, la presente invención se refiere a un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimioquina CCR2, para
55 su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, en el que el reactivo de unión se inmoviliza sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis a la que se aplica sangre periférica del paciente separando así las células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente, en el que el reactivo de unión es quimioquina MCP-1/ CCL2. Por otra parte, la invención se refiere también a un método de selección de un tratamiento adecuado para esclerosis múltiple que comprende determinar:

60 a) los niveles de una o más de las células que expresan receptor de quimioquina CCR2.
b) niveles de expresión de CCR2; y/o
c) niveles de células con una alta expresión de CCR2
65 en una muestra obtenida de una persona, en el que niveles altos de células que expresan CCR2, niveles altos de expresión de CCR2 o niveles altos de células con una alta expresión de CCR2 o mayores niveles de células que

expresan CCR2 en comparación con el control, mayores niveles de expresión de CCR2 en comparación con el control o mayores niveles de células con una alta expresión de CCR2 en comparación con el control tienen como resultado la selección de un tratamiento, tal como se ha definido, para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple. Por tanto, en ciertas realizaciones, la invención sirve para reducir el reclutamiento de leucocitos inflamatorios, que expresan receptores de quimioquina característicos y, posiblemente, expresan receptores de quimioquina característicos a mayores niveles, para sitios de inflamación relacionados con la esclerosis múltiple, como por ejemplo esclerosis múltiple remitente-recidivante estable y activa, esclerosis múltiple progresiva primaria, progresiva secundaria y recidivante progresiva. Esto se consigue utilizando reactivos de unión específica para capturar leucocitos inflamatorios que expresan receptor de quimioquina específicos del paciente. Por consiguiente, la invención permite un método de tratamiento de esclerosis múltiple que comprende la aplicación de 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 a receptores de quimioquina CCR2, inmovilizados directa o indirectamente en el soporte separando así las células que expresan receptores de quimioquina CCR2, de la sangre periférica del paciente. La sangre periférica de la que se han separado las células que expresan el receptor de quimioquina puede retornarse al paciente para completar el tratamiento. Tal como se muestra en el presente documento, se pueden inmovilizar en un soporte sólido reactivos de unión adecuados, ya sea directa o indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células que expresan receptor de quimioquina pertinentes. Cuando se observan mayores niveles de expresión de receptor de quimioquina, es posible que sea preferente separar dichas células de la sangre periférica utilizando las columnas para su uso en la invención. Por tanto, las diversas realizaciones de la invención se dirigen preferentemente a células CCR2^{hi}, tal como se definen en el presente documento para su separación de la sangre periférica. La expresión "alta" puede determinarse de acuerdo con técnicas de citometría de flujo convencionales. Se mide el nivel en relación con los niveles e expresión del receptor de quimioquina en las células tomadas de una persona sana. La Figura 13 adjuntas proporciona un ejemplo de una estrategia de selección de poblaciones (gating). La presente invención proporciona un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimioquina CCR2 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, en el que se inmoviliza el reactivo de unión sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente separando así células que expresan receptor de quimioquina CCR2 de la sangre periférica del paciente, en el que el reactivo de unión es la quimioquina MCP-1/CCL2. Los monocitos son producidos por la médula ósea desde precursores de células madre hematopoyéticas denominadas monoblastos. Los monocitos pueden diferenciarse en macrófagos o células dendríticas. Los monocitos y su progenie de macrófagos y células dendríticas cumplen una serie de funciones en el sistema inmune, entre las que se incluyen fagocitosis, presentación de antígeno y producción de citoquina. Los monocitos se pueden caracterizar con referencia a la expresión del marcador de la superficie celular CD14, opcionalmente junto con CD16. Los monocitos clásicos se pueden caracterizar por un alto nivel de expresión del receptor de superficie celular CD14 (monocito CD14⁺⁺ CD16⁻). Los monocitos no clásicos se pueden caracterizar por un bajo nivel de expresión de CD14 y con una co-expresión adicional del receptor CD16 (monocito CD14⁺ CD16⁺⁺). Los monocitos intermedios se pueden caracterizar por un alto nivel de expresión de CD14 y un bajo nivel de expresión de CD16 (monocitos CD14⁺⁺ CD16⁺). Los macrófagos se derivan de monocitos y son los responsables de proteger los tejidos de sustancias extrañas. Son células que poseen un gran núcleo liso, una gran área de vesículas citoplásmicas e internas para procesar material extraño. El término "macrófago" puede referirse a una célula derivada de monocito que expresa uno o más de los siguientes marcadores de la superficie de la célula, CD14, CD11b, lisozima M, MAC-1/MAC-3 y CD68. El término macrófago incluye tanto macrófagos activados como inactivados. Los macrófagos activados pueden caracterizarse por la expresión de uno o más entre CD69, ENG, FCER2 e IL2RA, HLA-DR, CD86. Los macrófagos inactivados no han recibido aún señales de activación, por ejemplo, a través de receptores TLR, y por tanto expresan menos marcadores de activación en la superficie de la célula, lo que se correlaciona con una menor maduración. Los macrófagos M1 pueden caracterizarse por la expresión de uno o más CD16⁺CD32⁺CD64⁺ y secretar principalmente IL-23 e IL-1, TNF, IL-6 y altos niveles de IL-12 y, además, moléculas efectoras como iNOS y ROI. Los macrófagos M1 tienen características citotóxicas, a diferencia de los macrófagos M2. Los macrófagos M2 se pueden caracterizar por la expresión de uno o más SRA/B+CD163⁺MR⁺CD14⁺ y expresar TGFβ, IL-10 y IL-1Ra. Los macrófagos asociados a tumor (MAT) comparten muchas características con los macrófagos M2 y se consideran como macrófagos polarizados M2. El paradigma M1/M2 puede encontrarse también en subconjuntos de monocitos en los que los monocitos bajos CD14⁺ CD16⁻ CXC3R1 se consideran el subconjunto "inflamatorio" y los CD14^{bajo} CD16⁺CXC3R1^{altos} son monocitos "residentes".

Los tres tipos principales de linfocitos son linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citotóxicos naturales (NK). El término "linfocito T" incluye linfocitos T CD4⁺, como por ejemplo linfocitos T colaboradores (linfocitos Th1 y linfocitos Th2) y linfocitos T CD8⁺, como por ejemplo linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos Th1 pueden caracterizarse por la expresión de CCR5 y/o por la producción de IFN-γ. Los linfocitos Th2 pueden caracterizarse por la expresión de CCR3 y/o por la producción de IL-4.

La invención reivindicada puede dirigirse a eosinófilos. El nombre "eosinófilo" deriva de las propiedades de afinidad a ácido" eosinófilo de la célula. Normalmente transparente, es esta afinidad la que hace que tengan un tono rojo ladrillo después de la tinción con eosina, un colorante rojo, aplicando el método de Romanowsky. La tinción se concentra en gránulos pequeños dentro del citoplasma celular, que contiene muchos mediadores químicos, tales como histaminas y proteínas, como por ejemplo eosinófilo peroxidasa, ribonucleasa (RNAsa), desoxiribonucleasas, lipasa, plasminógeno y proteína básica mayor. Estos mediadores se liberan a través de un proceso denominado

desgranulación tras la activación del eosinófilo y son tóxicos para tejidos tanto parásitos como hospedadores.

5 Los eosinófilos se desarrollan y maduran en la médula ósea. Se diferencian de las células precursoras mieloides como respuesta a las citoquinas interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 5 (IL-5) y factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Los eosinófilos producen y almacenan muchas proteínas de gránulo secundarias antes de salir de la médula ósea. Después la maduración, los eosinófilos circulan en la sangre y se desplazan a sitios inflamatorios en los tejidos como respuesta a quimioquinas como CCL11 (eotaxina-1), CCL24 (eotaxina-2), CCL5 (RANTES) y MCP1/4. Los eosinófilos pueden activarse mediante citoquinas de tipo 2 liberadas desde un subconjunto específico de linfocitos T colaboradores (Th2)); IL-5, GM-CSF e IL-3 son importantes para la activación de eosinófilos, así como para la maduración. Se ha demostrado que CD44 y C69 representan diferentes tipos de marcadores de activación de la superficie celular para eosinófilos humanos. CD69 está ausente de eosinófilos "nuevos" pero se expresa tras su activación (utilizando citoquinas). CD44, por otra parte, se expresa constitutivamente, pero la expresión se regula a la alza significativamente como respuesta a la activación (Matsumoto et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., volumen 18, Número 6, junio, 1998 860-866). Los marcadores específicos de célula para eosinófilos incluyen CD9 y CDw125.

20 Los basófilos se conocen también como granulocitos basófilos. A diferencia de los eosinófilos, estos leucocitos son basófilos, es decir, son susceptibles de tinción mediante colorantes básicos. Los basófilos contienen grandes gránulos citoplásmicos que oscurecen el núcleo celular bajo el microscopio. Sin embargo, cuando están sin teñir, el núcleo es visible y normalmente tiene 2 lóbulos. Los basófilos almacenan histamina, que es secretada por las células tras estimulación.

25 Los basófilos tienen receptores de proteína sobre su superficie celular que se une a IgE, una inmunoglobulina relacionada con la defensa contra macroparásitos y la alergia. Se une al anticuerpo IgE que confiere una respuesta selectiva de estas células a sustancias del entorno, como por ejemplo, proteínas de polen o antígenos helmintos. Estudios recientes en ratones indican que los basófilos pueden regular también el comportamiento de linfocitos T y mediar la magnitud de la respuesta inmune secundaria. Los basófilos pueden presentar un inmunofenotipo basado en la expresión (o falta de ella, indicada como "+" o "-", respectivamente de uno o más de los siguientes marcadores : FcεRI+, CD123, CD49b(DX-5)+, CD69+, Thy-1.2+, 2B4+, CD11 bdull, CD117(c-kit), CD24-, CD19-, CD80-, CD14-, CD23-, Ly49c-, CD122-, CD11c-, Gr-1-, NK1.1-, B220-, CD3-, γδTCR-, αβTCR-, α4 y β4-integrina negativa.

35 Cuando están activados, los basófilos se desgranulan para liberar histamina, proteoglicanos (p.ej., heparina y condroitina) y enzimas proteolíticas (p.ej., elastasa y lisofosfolipasa). También segregan mediadores de lípidos como leucotrienos y diversas citoquinas. La histamina y los proteoglicanos se pre-almacenan en los gránulos de la célula, mientras que las demás sustancias secretadas se generan nuevamente. Cada una de estas sustancias contribuye a la inflamación. Datos recientes indican que los basófilos son una importante fuente de la citoquina, interleuquina-4, quizá más importante que los linfocitos T. La interleuquina 4 se considera como una de las citoquinas críticas en el desarrollo de alergias y la producción de anticuerpo IgE para el sistema inmune. Existen otras sustancias que pueden activar los basófilos para que secreten lo que indica que estas células tienen otras rutas de inflamación.

40 Las distintas realizaciones de la invención reivindicada pueden implicar interacciones de unión específicas con marcadores de la superficie de la célula (y específicos de la célula) además de la separación basada en la unión a CCR2.

45 CCR2 expresado en las células mencionadas se une mediante quimioquinas como proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).

50 MCP-1 (CCL2) es un importante quimioatrayente para monocitos y los linfocitos T de memoria por medio de su unión a su receptor de superficie celular específico, receptor 2 de quimioquina-CC (CCR2). CCR2 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de Nomenclatura de Genes HUGO para receptor 2 de quimioquina (motivo C-C). La identificación HGNC para este gen es 1603. El gen está localizado en la posición de cromosoma 3p21. El símbolo anterior y el nombre para el gen es CMKBR2. Entre los sinónimos para este gen se incluyen CC-CKR-2, CD192, CKR2, FLJ78302 y MCP-1-R. La secuencia de referencia NCBI es NM_001123041.2 disponible el 13 de junio.

55 El tratamiento que permite la invención puede tener como resultado el alivio o mejora de los síntomas, prevención de la progresión, regresión de la afección o completa recuperación. Los parámetros cuantificables del tratamiento con éxito incluyen uno o más, hasta todos, de la Puntuación de Gravedad de Esclerosis múltiple o MRI. En las realizaciones específicas, un solo tratamiento es suficiente para causar un empobrecimiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % o más hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores comprendido o que incluya estas cantidades de células que expresan receptor de quimioquina CCR2 desde la sangre periférica del paciente. En las realizaciones específicas, se consigue al menos un empobrecimiento en torno a un 50 % en un solo tratamiento. Por lo tanto, se puede definir el éxito de un tratamiento en lo que se refiere al empobrecimiento de células que expresan CCR2. El tratamiento puede conducir al empobrecimiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan CCR2, como por ejemplo monocitos, en ciertas realizaciones y, más en particular, aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 millón de células que expresan CCR2. Al unirse a la columna a través de la interacción del reactivo de unión –receptor de

quimioquina, se inmovilizan las células que expresan receptor de quimioquina. Estas células inmovilizadas expresan otros receptores de quimioquina no ocupados que pueden ser de un tipo igual o diferente al utilizado para la captura. Dichos receptores de quimioquina adicionales pueden permitir la circulación de quimioquinas que contribuyen al estado inflamatorio que se va a capturar desde la sangre periférica. Por lo tanto, una reducción en los niveles de quimioquina en circulación (específicos) puede proporcionar una medición del éxito del tratamiento. La invención se basa en un reactivo de unión que es capaz de unirse específicamente al receptor de quimioquina CCR2 y que es quimioquina MCP-1/ CCL2. Esta reacción de unión específica permite que las células expresen el receptor de quimioquina que se va a separar de la sangre periférica del paciente cuando se pasa la sangre sobre el soporte sólido sobre el que o en el que se inmoviliza el reactivo de unión. Se entiende por "unión específica" que el reactivo de unión despliega una especificidad de unión suficiente y afinidad/cinética de unión apropiada como para permitir la separación de células que expresan CCR2 desde la sangre periférica. Si bien no se excluye que el reactivo de unión sea capaz de unirse a otras moléculas, como por ejemplo otros receptores de quimioquina, el reactivo de unión se unirá preferentemente a células que expresan CCR2 y, en particular, a células que expresan mayores niveles de CCR2 (tal como se define mejor en el presente documento). Las quimioquinas son normalmente, aunque no necesariamente de forma exclusiva (particularmente en el caso de formas truncadas o modificadas) agonistas de su receptor afín y sirven para activar las células que expresan el receptor pertinente, tal como podrán apreciar las personas especializadas en la técnica. En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, el término "quimioquina" comprende también quimioquinas biotiniladas o marcadas de otra forma. El término "quimioquina" comprende también versiones modificadas o truncadas de la quimioquina y fragmentos de quimioquina siempre y cuando la forma modificada o truncada retenga su capacidad para unirse a su receptor afín (y, por tanto, siga siendo funcional en el contexto de las diversas realizaciones de la invención). La quimioquina no tiene por qué retener necesariamente su actividad biológica ya que es su afinidad de unión específica para CCR2 lo que se requiere. En ciertas realizaciones, la quimioquina carece de actividad biológica, como por ejemplo, por lo que respecta a la activación del receptor CCR2. Se pueden introducir modificaciones para mejorar la síntesis de proteínas, por ejemplo, uniformidad del producto y rendimiento. Tal como saben las personas especializadas en la técnica, entre los ejemplos de modificaciones se incluyen adiciones, sustituciones, deleciones de aminoácidos u otras modificaciones de uno o más aminoácidos en la quimioquina. Las modificaciones pueden comprender sustitución del aminoácido de tipo silvestre por aminoácidos no naturales, como norleucina (NLeu) y aminoácidos derivados como ácido piroglutámico (pyroGlu). Dichas modificaciones se pueden realizar para reducir al mínimo la formación de productos secundarios durante el almacenamiento y el uso de columnas de las diversas realizaciones de la invención. Las modificaciones se pueden realizar para mejorar el marcado, por ejemplo, inclusión de un espaciador de polietileno glicol (PEG) para facilitar la biotinilación. La biotinilación y/o conjugación con fluorocromos u otros grupos marcadores de la quimioquina se realiza de tal manera que no afecte sustancialmente a la capacidad de unión del receptor. Es preferente la biotinilación específica de sitio u otro marcado ya que el marcado no selectivo de quimioquinas puede comprometer la actividad de unión a receptor. La biotinilación u otro marcado es preferente generalmente en el extremo C o hacia el extremo N de la proteína, ya que los autores de la invención han observado que las modificaciones en este área se toleran bien por lo general (por lo que respecta al mínimo efecto sobre la capacidad de unión del receptor). La biotinilación se puede llevar a cabo de forma específica de sitio en cualquier aminoácido adecuado. Entre los ejemplos de aminoácidos adecuados se incluyen lisina, ácido diaminopropiónico y ornitina. Generalmente, se puede hacer 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 deleción de aminoácidos N o C terminales, según sea apropiado, o ambos. Normalmente, la versión truncada retendrá los restos requeridos para que la quimioquina se pliegue correctamente, por ejemplo, para retener una estructura plegada de quimioquina, en correspondencia con el requisito de que una versión truncada debe retener la capacidad para unirse al receptor pertinente (expresado por un leucocito o en su superficie). Las moléculas de quimioquina incluyen normalmente enlaces disulfuro entre los restos de cisteína 1^o y 3^o y 2^o y 4^o, respectivamente, tal como entenderán las personas especializadas en la técnica. Cuando se presentan las secuencias en el presente documento, debe asumirse que se formarán estos enlaces disulfuro en la proteína plegada (a no ser que se afirme de otro modo). Las versiones truncadas pueden comprender cualquier intervalo entre 1 y 100 aminoácidos menos, como 1, 2, 3, 4, 5, etc. aminoácidos menos que la secuencia de aminoácido de tipo silvestre en ciertas realizaciones. Naturalmente, las versiones truncadas pueden comprender otra modificación, tal como se detalla en el presente documento. La versión modificada o truncada puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos total en un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más con respecto a la longitud completa de la quimioquina de tipo silvestre (en la que una deleción se cuenta como una diferencia de la secuencia de aminoácido) en ciertas realizaciones. En la secuencia común entre las moléculas (es decir, los aminoácidos que no se han suprimido), puede haber una identidad de secuencia de un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la secuencia de aminoácidos en ciertas realizaciones. La identidad de secuencia se puede determinar aplicando algoritmos conocidos tales como análisis BLAST o GAP (Programa GCG) (aplicando ajustes por defecto) que son del dominio público. Las quimioquinas pueden carecer del péptido de señal N-terminal que se escinde durante la síntesis *in vivo*.

Las quimioquinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la presente invención son MCP-1. Ambas MCP-1 se unen solamente al receptor de quimioquina CCR2 y por tanto es preferente esta quimioquina.

Puede aplicarse cada una de las quimioquinas MCP-1/CCL2 modificadas y truncadas, descritas con mayor detalle en el presente documento (haciendo referencia a las secuencias de aminoácido pertinentes, tal como se exponen en las SEQ ID NO y que acompañan a los ejemplos experimentales), de acuerdo con la presente invención. Dichas formas modificadas pueden instruir a las personas especializadas en lo que se refiere a formas modificadas adicionales de las mismas quimioquinas u otras quimioquinas que pueden ser adecuadas para su uso en la invención. Las quimioquinas presentan homología de secuencia variable, con una variación de menos de 20 % a por encima de 90 %, pero comparten todas ellas estructuras terciarias similares que consisten en un extremo N-desordenado, seguido de un bucle largo (el bucle N-) que termina en una hélice 3_{10} , una lámina β de tres hebras y una hélice C-terminal. La topología global se establece mediante enlaces disulfuro. La estructura terciaria común es una característica común de la familia de las proteínas citoquinas (Fernández EJ and Lolis E., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2002, 42, 469-99; Allen SJ et al, Annu. Rev. Immunol., 2007, 25, 787-820.). Los truncamientos dentro de esta región N-terminal pueden mantener la unión al receptor, pero pueden conducir a un cambio o pérdida de la función (para los ejemplos, Zhang YJ et al, J. Biol. Chem., 1994, 269, 15918; Gong J-H and Clark-Lewis I., J. Exp. Med., 1995, 181, 631-640; Fernández EJ and Lolis E., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2002, 42, 469-99; Allen SJ et al, Annu. Rev. Immunol., 2007, 25, 787-820). Pueden prepararse también truncamientos en el extremo C de la citoquina y mantener la actividad de unión a receptor (Treating Inflammatory Disorders, Ola Winqvist and Graham Cotton, patente internacional WO2010/029317). Tal como saben las personas especializadas en la técnica, las quimioquinas 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 del núcleo conservada que consiste en el llamado "bucle N", tres hebras β anti-paralelas y una hélice α carboxilo terminal. Si bien no se pretende vincularse a teoría alguna, se cree que la interacción entre quimioquina y receptor de quimioquina es un mecanismo en dos etapas en el que el núcleo de la quimioquina interactúa primero con el sitio de unión formado por los dominios extracelulares del receptor, mientras que se forma otra interacción entre el extremo N de la quimioquina y un segundo sitio de unión en el receptor para desencadenar la activación de receptor. Por lo tanto, se pretende que un "fragmento" como por ejemplo un fragmento funcional de una quimioquina, signifique una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína que retiene la unión para su receptor afín. El fragmento puede incluir por ejemplo la región de pliegue monomérico o porciones de las mismas, como por ejemplo el dominio amino terminal, la región del núcleo conservada y/o el "bucle N", las hebras β anti-paralelas y/o la hélice α carboxilo terminal o combinaciones y porciones de los mismos. Asimismo, se reconoce que puede mutarse considerablemente un polipéptido sin alterar materialmente una o más de las funciones del polipéptido, como por ejemplo, sin alterar la unión específica y/o el plegamiento de la proteína. Se sabe que se degenera el código genético y por tanto diferentes codones codifican los mismos aminoácidos. Incluso cuando se introduce la sustitución de aminoácido, la mutación puede ser conservadora y no tener impacto material sobre las funciones esenciales de la 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 de unirse e interactuar con otras proteínas, como por ejemplo una quimioquina truncada que se une a un receptor afín.

En algunos ejemplos, se puede suprimir parte de una cadena de polipéptidos sin deteriorar o eliminar todas sus funciones. Por ejemplo, la delección de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo C- y/o N- como por ejemplo delecciones 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- pueden tener como resultado una quimioquina que retenga la función, como por ejemplo, la unión específica de su receptor afín. Dichos truncamientos pueden retener la función completa de una proteína completa y/o puede permitir que se retengan las funciones de dichas interacciones proteína-proteína, como en el caso de interacciones ligando-receptor. Se pueden utilizar en los métodos y dispositivos descritos en el presente documento quimioquinas que tienen delecciones de un pequeño número de aminoácidos, por ejemplo, menos de aproximadamente un 20 % (como por ejemplo, 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 quimioquina de tipo silvestre. Por otra parte, se pueden realizar inserciones o adiciones en la cadena de polipéptidos, por ejemplo, adición de etiquetas de epítipo, sin perjudicar o eliminar sus funciones (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1998). Otras modificaciones que se pueden introducir sin perjudicar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas o bioquímicas *in vivo* o *in vitro* o la incorporación de aminoácidos inusuales. En algunos ejemplos, un fragmento funcional de una quimioquina 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 more o 200 o más restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de quimioquina.

En algunos ejemplos, la quimioquina 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 % o 85 % de identidad de secuencia, aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia en todas su longitud en comparación con la secuencia de referencia, como por ejemplo las que se detallan en el presente documento, como por ejemplo utilizando el NCBI Blast 2.0 con espacios BLAST ajustado para parámetros por defecto. El alineamiento se puede llevar a cabo también de forma manual para inspección. Se puede introducir una o más modificaciones de aminoácido conservadoras en la secuencia de aminoácidos de quimioquina, ya sea adición, delección, modificación, que no altere sustancialmente la estructura

tridimensional del polipéptido o su capacidad para unirse al receptor afín. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido conservadora no afecta a la capacidad de la quimioquina de unirse específicamente a su receptor afín. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar son muy conocidas en la especialidad. Los seis grupos que se indican a continuación contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras unos de otros: 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).

Las quimioquinas se pueden modificar a través de diversas técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad o función, como la unión a un receptor afín que los péptidos sin modificar, y que tienen opcionalmente otras propiedades deseables. Por ejemplo, se pueden proporcionar grupos de ácido carboxílico de la proteína, ya sean del terminal carboxilo o de la cadena lateral, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificada para formar un éster de C1-C16, o convertirse a una amida de fórmula NR1R2 en la que R1 y R2 son cada uno de ellos independientemente H o alquilo de C1-C16 o combinarse para formar un anillo heterocíclico, como por ejemplo un anillo de 5- o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea del terminal amino o de la cadena lateral pueden presentarse en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, como HCl, HBr, ácidos acético, benzoico, toluen sulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o pueden modificarse en alquilo de C1-C16 o dialquil amino o convertirse además en una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales del péptido pueden convertirse en alcoxi de C1-C16 o en un éster de C1-C-16 utilizando técnicas muy conocidas. Se puede sustituir el fenilo y los anillos fenólicos de las cadenas laterales del péptido con uno o más átomos de halógeno como F, Cl, Br o I, o con alquilo de C1-C16, alcoxi de C1-C16, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales del péptido pueden extenderse en alquilenos de C2-C4 homólogos. Se pueden proteger los tioles con uno cualquiera de una serie de grupos protectores perfectamente conocidos, como grupos acetamida. Las personas especializadas en la técnica reconocerán los métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de la presente divulgación para seleccionar y proporcionar limitaciones conformacionales a la estructura que resulten en una mayor estabilidad. Por ejemplo, se puede añadir una cisteína C- o N-terminal en el péptido, de manera que cuando se oxide el péptido, contenga un enlace disulfuro generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación del péptido incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres carboxilo- y amino-terminales.

Los aminoácidos en un péptido, polipéptido o proteína están unidos químicamente por lo general a través de uniones amida (CONH). Por otra parte, los aminoácidos pueden estar unidos a través de otros enlaces químicos. Por ejemplo, las uniones para los aminoácidos o análogos de aminoácido pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-- (cis y trans), -COCH₂--, -CH(OH)CH₂- y -CHH₂SO- (Tanto éstos como otros se pueden encontrar en Spatola, in Chemistry and Biochemistry of Aminoácidos, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo 1983), Vol. 1, Publicación 3, Peptide Backbone Modificaciones (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; and Hruby Life Sci 31:189-199, 1982.

Más específicamente, MCP-1 es útil para eliminar las células que expresan CCR2 de la sangre de un paciente. CCL2 es el símbolo de gen aprobado por Comité de Nomenclatura de Genes HUGO para el ligando 2 de quimioquina (motivo C-C), también conocido como MCP-1. La ID HGNC para este gen es 10618. El gen está localizado en la posición de cromosoma 17q11.2- q21.1. El símbolo previo y el nombre del gen es SCYA2 "citoquina A2 inducible pequeña (proteína quimiotáctica 1 de monocito, homóloga de Sig-je de ratón)". Entre los sinónimos de este gen se incluyen GDCF-2, HC11, MCP1, MGC9434, SMC-CF, "proteína quimioatrayente de monocito 1", "factor activador y quimiotáctico de monocitos", "proteína quimiotáctica 1 de monocitos, homóloga de Sig-je de ratón", "proteína JE secretora de monocito", "subfamilia A (Cys-Cys) de citoquinas inducibles pequeñas, miembro 2". La secuencia de referencia del Genbank para CCL2 es BC009716.1 disponible desde el 13 de junio de 2011. En el presente documento, se describen con detalle ejemplos de quimioquinas modificadas de las diversas realizaciones de la invención que contienen modificaciones y/o truncamientos y específicamente adaptadas para su uso en la invención. Se ha producido MCP-1 con el resto 75, que puede ser una lisina (o cualquier otro aminoácido como ornitina y ácido diaminopropiónico, que pueda estar biotinilado), como sitio de biotinilación de la quimioquina (la numeración se basa en la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2). La biotinilación permite la inmobilización de MCP-1 sobre un soporte sólido (a través de la interacción biotina-avidina). La secuencia de aminoácidos básica de MCP-1, incluyendo una secuencia líder de 23 aminoácidos se expone en como SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de la proteína madura se expone como SEQ ID NO: 2. Los autores de la invención han determinado que las quimioquinas pueden desplegar propiedades de unión mejoradas cuando se biotinila la quimioquina a través de un grupo espaciador. El espaciador puede impedir que el grupo biotina afecte a la afinidad de unión de la quimioquina. Se puede emplear cualquier grupo espaciador adecuado. Otras modificaciones pueden proporcionar a la molécula propiedades ventajosas. La invención se refiere también a derivados de quimioquinas MCP-1 truncadas. La secuencia de aminoácidos de la versión truncada se expone como SED ID NO: 3.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la invención utiliza una quimioquina MCP-1 modificada que comprende, consiste esencialmente o 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 han introducido una o más de las siguientes modificaciones:

- 5 a) el resto glutamina 1 de SEQ ID NO: 2 ha sido reemplazado por piroglutamina
- b) el extremo C se produce como derivado de amina (esto se puede conseguir por síntesis en un engarce amida)
- c) el resto (región terminal C) 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 lisina u ornitina, está biotinilado, opcionalmente a través de un grupo espaciador, para permitir la inmovilización de la quimioquina sobre un soporte sólido, y/o
- 10 d) el resto 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 ha sido reemplazada por norleucina.

El aminoácido (región C-terminal) que puede ser un resto lisina o un equivalente funcional, en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1 o la posición 75 de SEQ ID NO: 2 o la posición 67 de SEQ ID NO: 3 puede estar biotinilado a través de un grupo espaciador adecuado, como un grupo espaciador de polietileno glicol (PEG) para permitir la inmovilización de la quimioquina sobre un soporte sólido. En las realizaciones específicas, el espaciador PEG es un ácido 3,6-dioxo aminooctanoico. En las Figuras 7 a 9, respectivamente, se muestra la secuencia y la biotinilación de las quimioquinas MCP-1 modificadas de la invención. Las quimioquinas MCP-1 modificadas pueden ser agonistas o antagonistas de la actividad CCR2. Se pueden analizar para determinar su actividad en un ensayo adecuado, como por ejemplo ensayos celulares. En particular, es posible determinar las propiedades agonistas y antagonistas en un ensayo celular funcional sobre el receptor CCR2 humano. CCL2 (MCP-1) modificado corresponde a los restos 1 a 76 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido de señal N-terminal de 23 aminoácidos que se escinde) y retiene por tanto el pliegue de quimioquina. Gln en el extremo N de la proteína (Gln 1) está sustituido con una piroglutamina para impedir la generación de especies mixtas de Gln N-terminal y pyroGlu (SEQ ID NO: 8). Esto mejora el rendimiento de síntesis y asegura una preparación de quimioquina homogénea a lo largo de la fabricación y uso de la columna. Se incorpora FmocLys(ivDde)-OH como resto 75 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 9). Se puede incorporar un espaciador adecuado, como por ejemplo un espaciador de PEG, entre la funcionalidad ε-amino y la biotina. Por tanto, la invención puede utilizar una quimioquina modificada, incluyendo una versión biotinilada, que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10:

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-NH₂

X1 = pyroGlu (pero puede permanecer como Gln en algunas realizaciones)

35 X75 = un resto de aminoácido que se puede biotinar como por ejemplo lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej., K(PEG-Biotina).

Las quimioquinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden sintetizarse a través de cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, las quimioquinas se sintetizan químicamente ya que ello facilita la modificación y el marcado, etc. Sin embargo, también es posible emplear enfoques basados en ADN recombinante en combinación con las tecnologías de marcado y modificación apropiadas, según se requiera. Las quimioquinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden biotinilarse a través de métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en la patente internacional WO 00/50088 A2. Tal como se ha indicado anteriormente, es preferente el marcado específico de sitio de las quimioquinas en diversas realizaciones de la invención, si bien puede emplearse cualquier técnica de marcado que no afecte significativamente la capacidad de unión a receptor de la quimioquina. En el mercado están disponibles varias quimioquinas biotiniladas con especificidad de sitio, así como quimioquinas nativas, por ejemplo las distribuidas por Almac, Craigavon, RU. En realizaciones específicas la una o más quimioquinas está biotinilada a través de un grupo espaciador. El espaciador puede emplearse para evitar que el grupo biotina afecte a la actividad de la quimioquina, en particular, la unión de la quimioquina a su receptor afín. Puede emplearse cualquier espaciador adecuado que facilite la retención de las propiedades de unión a receptor de la quimioquina en diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, en las realizaciones concretas que se han descrito, es posible emplear otros espaciadores distintos a espaciadores PEG, según sea apropiado. En realizaciones concretas, el espaciador es un espaciador de polietileno glicol (PEG). Se ha demostrado que PEG es un espaciador eficaz que permite la fijación de la biotina en la quimioquina (que puede inmovilizarse entonces sobre un soporte sólido a través de la interacción con estreptavidina) sin comprometer la capacidad de unión a receptor.

En el contexto de la presente divulgación, el término "anticuerpo" incluye todas las inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina con afinidad de unión específica para el receptor de quimioquina pertinente (incluyendo, por ejemplo, y sin limitación IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmune en un vertebrado, como por ejemplo, en mamíferos como seres humanos, cabras, conejos y ratones). Las inmunoglobulinas concretas descritas en el presente documento incluyen isotipos de IgG. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden ser de origen monoclonal o policlonal, si bien

normalmente son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos o versiones humanizadas de anticuerpos no humanos o anticuerpos quiméricos. Las diversas técnicas para la humanización de anticuerpos están perfectamente establecidas pudiéndose utilizar cualquier técnica adecuada. El término "anticuerpo" se refiere asimismo a un ligando de polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une al epítipo de un antígeno y se extiende a todos los derivados de anticuerpo y fragmentos que retienen la capacidad de unirse específicamente al receptor de quimioquina pertinente. 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 que constan de cadenas tanto pesadas como ligeras, aunque también anticuerpos (solamente) de cadena pesada. Los anticuerpos pueden obtenerse por ingeniería genética de manera que sean específicos para más de un receptor de quimioquina, por ejemplo, bi-específicos para permitir la unión a dos receptores de quimioquina diferentes. En la Tabla 1, a continuación, se enumeran anticuerpos disponibles en el mercado adecuados que se pueden unir a los receptores de quimioquina de interés. Pueden estar marcados o no. Se remite de manera general a "Antibodies a laboratory manual: By E Harlow and D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988".

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR5	PE	Biolegend
CCR2	PerCP Cy5.5	Biolegend
CCR6	PerCP Cy5.5	BD Biosciences
CCR3	PE	Biolegend
CCR1	Alexa Fluor 647	Biolegend
CCR9	APC	R&D Systems

Los anticuerpos anti-CCR2 se describen por ejemplo en la patente internacional WO 2010/021697. Otros ejemplos de anticuerpos potencialmente útiles incluyen MLN-1202, un anticuerpo monoclonal anti-CCR2 actualmente en ensayos clínicos en curso (Millennium Pharmaceuticals). Por tanto es posible dirigirse a células que expresan receptores de quimioquina utilizando agentes de unión alternativos, como por ejemplo anticuerpos u otros compuestos químicos, tal como se define en el presente documento, en lugar de un socio de unión de quimioquina natural. No obstante, esto no forma parte de la invención. Este enfoque es un nuevo enfoque para tratar afecciones inflamatorias y en particular esclerosis múltiple.

Por lo tanto, en el presente documento se divulga una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de quimioquina inmovilizado directa o indirectamente en un soporte para permitir la separación de una célula que expresa el receptor de quimioquina desde la sangre periférica del paciente, en la que el reactivo de unión es una quimioquina. El reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimioquina puede ser un agonista o un antagonista del receptor de quimioquina.

De manera similar, en otros aspectos, en el presente documento se divulga un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de quimioquina para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, en el que el reactivo de unión se inmoviliza sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, tal como se ha definido (una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de quimioquina inmovilizado directa o indirectamente sobre el soporte para permitir la separación de una célula que expresa el receptor de quimioquina desde la sangre periférica de un paciente/sujeto, en el que el reactivo de unión es una quimioquina), al que se aplica sangre periférica del paciente separando así las células que expresan receptor de quimioquina de la sangre periférica del paciente. Los materiales del soporte sólido para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención son conocidos dentro de la técnica. "Soporte sólido" se refiere por ejemplo a materiales que tienen superficie o superficies rígidas o semi-rígidas y que pueden adoptar la forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. Un material de soporte útil es aquel que no activa los glóbulos de la sangre como para provocar que se coagulen o se adhieran al soporte a medida que se aplica la sangre entera periférica al dispositivo. En ciertas realizaciones, se emplea un soporte tratado con un agente para proporcionar propiedades anti-coagulación, en particular, un soporte heparinizado. Alternativamente, se puede tratar la sangre del paciente con un anti-coagulante como por ejemplo heparina, antes de la aplicación al soporte. Los materiales de soporte útiles comprenden hidratos de carbono de alto peso molecular, en particular, hidratos de carbono que tienen un peso molecular de 100 kDa o más, como agarosa, en forma de partículas, opcionalmente reticulada, y celulosa. Otros materiales de soporte preferentes son polímeros como poliestireno carboxilado y vidrio. El soporte de las diversas realizaciones de la invención puede proporcionarse en forma de partículas o fibras. Las partículas del soporte pueden tener una forma regular, como por ejemplo esferas o perlas, o una forma irregular. Pueden ser porosas o no porosas. Un tamaño de partícula promedio preferente del soporte es de 50 µm a 2 mm. En ciertas realizaciones se utiliza Sepharose™, una forma de agarosa, en forma de perlas, reticulada, como matriz de columna. Se opta por ella por su óptima capacidad de distribución y porque puede proporcionar un gran área disponible para la unión por afinidad. Los soportes sólidos

pueden proporcionarse en forma de perlas magnéticas, con el reactivo de unión específico inmovilizado sobre las perlas magnéticas. Tras la captura de las células que expresan receptor de quimioquina CCR2 desde la sangre, se pueden separar las perlas de la sangre con la ayuda de un separador magnético apropiado.

5 Los métodos para inmovilizar los reactivos de unión en un soporte sólido son conocidos dentro de la técnica. Se puede inmovilizar un reactivo de unión, como pueda ser una quimioquina, un anticuerpo, un péptido, un ácido nucleico o un compuesto químico, sobre el soporte directa o indirectamente. La inmovilización puede llevarse a cabo por medio de un engarce adecuado en algunas realizaciones. Un método preferente de inmovilización indirecta de un reactivo de unión, como por ejemplo una quimioquina, se basa en la interacción entre biotina y las moléculas de
 10 avidina. "Avidina" o "moléculas de avidina" se refiere a cualquier tipo de proteína que se une específicamente con biotina con una sustancial exclusión de otras moléculas (pequeñas) que pudieran estar presentes en una muestra biológica. Entre los ejemplos de avidina se incluyen avidinas que están presentes de forma natural en la clara de huevo, proteína de semillas oleaginosas (p.ej., harina de soja), y grano (p.ej., maíz) y estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano. Por lo tanto, la biotinilación del reactivo de unión y el uso de una molécula de avidina como por ejemplo estreptavidina inmovilizada en un soporte sólido permite que se fije de forma fiable el reactivo de unión sobre el soporte sólido de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Concretamente, dicho método puede comprender proporcionar el reactivo de unión en forma biotinilada, proporcionar un soporte sólido que tiene estreptavidina inmovilizada en la superficie, contacto de la superficie con una solución acuosa del reactivo de unión biotinilado y aclarado del soporte con un disolvente acuoso. Por otra parte, pueden utilizarse interacciones de pares
 20 de unión, como por ejemplo interacciones anticuerpo-antígeno, para la inmovilización indirecta del reactivo de unión sobre un soporte. En dichas realizaciones, el soporte puede derivatizarse con uno o más miembros del par de unión, como por ejemplo un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, tal como se define en el presente documento, que tiene una afinidad conocida para una secuencia de péptidos en particular o un hapteno de molécula pequeño. La incorporación de otro miembro del par de unión, como pueda ser un antígeno, secuencia de péptidos o hapteno, sobre o en el reactivo de unión facilita la inmovilización en un soporte sólido revestido con el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo. Por lo tanto, el reactivo de unión puede modificarse para incluir la secuencia de péptidos o hapteno en la molécula lineal o puede añadirse como cadena lateral o marcador. Puede emplearse cualquier par de anticuerpo-antígeno adecuado. El fragmento o derivado de anticuerpo puede ser un fragmento o derivado que retenga la afinidad de unión específica para el antígeno apropiado. Entre los ejemplos se incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, scFV, dominios VH, anticuerpos de dominio simple (como nanocuerpos), anticuerpos de cadena pesada y la versión humanizada de anticuerpos no humanos, etc. Pueden utilizarse otras interacciones de alta afinidad para inmovilizar reactivos de unión, siempre y cuando el reactivo de unión se pueda sintetizar o derivatizar con uno de los socios de interacción y sintetizarse o derivatizarse su soporte sólido con el otro socio de interacción sin pérdida de afinidad de unión (es decir, la unión del reactivo de unión con el receptor de quimioquina apropiado). La inmovilización puede tener lugar esencialmente a través de la misma interacción a la inversa en algunas realizaciones. Por lo tanto, el reactivo de unión que puede ser una quimioquina, por ejemplo, puede fijarse a un anticuerpo, tal como se define en el presente documento, y el soporte sólido derivatizarse con el antígeno. Se puede producir la quimioquina como una proteína de fusión con el anticuerpo.

40 Alternativamente, es posible inmovilizar las quimioquinas directamente sobre un soporte sólido utilizando técnicas de bioconjugación establecidas en el campo. Por ejemplo, la inmovilización directa de proteínas en soportes sólidos activados con bromuro de cianógeno a través de funcionalidades amino dentro de la secuencia primaria de la proteína. Alternativamente, se pueden utilizar funcionalidades de sulfhidrilo dentro de las proteínas para inmovilizar directamente la proteína a soportes derivatizados de haluro de alquilo o soportes que contienen funcionalidades tiol
 45 libres. En otras realizaciones más, se pueden inmovilizar directamente proteínas que contienen funcionalidades α-tioéster sobre soportes que contienen fracciones 1,2-amino tiol (p.ej., cisteína N-terminal) utilizando la reacción de ligación química nativa. Alternativamente, pueden inmovilizarse proteínas modificadas con cetonas y aldehídos sobre soportes sólidos derivatizados de funcionalidades hidracinilo, hidracida y aminoxi utilizando reacciones de ligación que forman enlaces hidrazona/oxima (y viceversa). Alternativamente, se puede utilizar química "click" para inmovilizar proteínas sobre soportes sólidos, en virtud de lo cual se derivatizan la proteína y el soporte con las funcionalidades químicas mutuamente reactivas apropiadas (azidas y alquinos). En otras realizaciones, puede usarse química de ligación de Staudinger para inmovilizar proteínas apropiadamente derivatizadas en soportes sólidos apropiadamente derivatizados.

55 El soporte sólido está contenido dentro de la columna de aféresis o transportado por ella. Por lo tanto, "cargado" significa que la columna lleva o contiene el soporte sólido de manera que la sangre (periférica) puede fluir por la columna en contacto con el soporte sólido. Por tanto, el soporte sólido proporciona una matriz dentro de la columna a través de la cual fluye la sangre de manera continua, en ciertas realizaciones. Esto permite que las células que expresan el receptor de quimioquina específico se separen de la sangre pasando a través de la columna, de manera
 60 que la sangre que sale de la columna está empobrecida de las células que expresan el receptor de quimioquina específico. En realizaciones concretas, la columna de aféresis está cargada con un soporte que comprende estreptavidina inmovilizada sobre el soporte y uno o más reactivos de unión biotinilados, como por ejemplo quimioquinas unidas a la estreptavidina en el soporte. El soporte sólido puede comprender un hidrato de carbono de alto peso molecular, opcionalmente, reticulado, como por ejemplo agarosa.

65 Tal como se ha explicado anteriormente, el reactivo de unión se acopla al soporte sólido. Las cantidades relativas

del reactivo de unión pueden controlarse para asegurar que el acoplamiento entre el soporte sólido y el reactivo de unión sean inmediatos, reduciendo al mínimo el riesgo de que el reactivo de unión se desacople del soporte sólido. Por tanto, puede asegurarse que existe un exceso relativo de sitios de inmovilización para el reactivo de unión sobre el soporte sólido. Alternativamente, o adicionalmente, tras la inmovilización del reactivo de unión sobre el soporte sólido, se puede lavar el soporte sólido para separar cualquier reactivo de unión sin unir.

La columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como tratamiento de leucaféresis para afecciones asociadas a la esclerosis múltiple. La columna actúa para separar específicamente los monocitos que expresan CCR2 explotando la interacción entre CCR2 expresado en la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado en un soporte sólido contenido dentro de la columna o transportado por ella. La columna en global normalmente comprende, consiste en o consiste esencialmente en tres componentes combinados: 1) un alojamiento que contiene o que transporta; 2) un soporte sólido y 3) uno o más reactivos de unión (inmovilizados en ellas), que se unen específicamente a uno o más de los receptores de quimioquina. El alojamiento puede estar fabricado de cualquier material adecuado para uso clínico. En ciertas realizaciones, el alojamiento está compuesto de un material plástico. El alojamiento incluye un emplazamiento de flujo de entrada para la entrada de la sangre y un emplazamiento de flujo de salida para la salida de la sangre (con empobrecimiento de células diana). El alojamiento puede estar diseñado para mantener un flujo de sangre continuo en toda la matriz del soporte sólido. El alojamiento (tal como se muestra por ejemplo en la Figura 3) puede incluir una porción superior que comprende una placa de distribución (2) en el emplazamiento de entrada de flujo (1) para extender la sangre uniformemente en toda el área de la matriz. La placa de distribución puede actuar como una primera barrera de seguridad impidiendo que fluyan las partículas más grandes por la columna y hacia el paciente. Sin embargo, la placa de distribución no es esencial y puede eliminarse en algunas realizaciones para disminuir la resistencia global en el sistema. La columna puede contener una o más unidades de filtro de seguridad (3 y 4) situadas en el emplazamiento de flujo de entrada (1) y/o el flujo de salida (5) del alojamiento de plástico. Dichas unidades de filtro pueden actuar para impedir que las partículas más grandes que los glóbulos de la sangre entren y/o salgan de la columna. Las unidades de filtro de seguridad contienen una pluralidad de filtros, como por ejemplo dos, tres o cuatro filtros diseñados para constituir una barrera firme y detener el traspaso de la columna de todas las partículas más grandes que los glóbulos de la sangre. La inclusión de filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos de la columna sirve para reducir al mínimo el riesgo de filtración de las partículas en el paciente, incluyendo en el caso de que el dispositivo esté conectado incorrectamente y como consecuencia fluya la sangre en la dirección contraria a la pretendida. Los filtros de seguridad pueden comprender cualquier tamaño de poro adecuado para impedir que las partículas más grandes que los glóbulos de la sangre atraviesen la columna, tal como entenderán perfectamente las personas especializadas en la técnica. Entre los filtros adecuados se incluyen los disponibles en el mercado. En realizaciones concretas, el tamaño de poro del (los) filtro(s) está comprendido entre aproximadamente 60 μm y 100 μm , más concretamente aproximadamente 80 μm . El soporte sólido y los componentes del reactivo de unión se describen con mayor detalle en el presente documento.

El volumen del alojamiento puede variar dependiendo de los volúmenes de sangre que se pretende pasar a través de la columna. Normalmente, el volumen del alojamiento está comprendido entre aproximadamente 40 ml y 200 ml, más específicamente entre 50 ml y 150 ml o entre 60 ml y 120 ml.

La columna se aplica generalmente en forma de circuito de aféresis. En este contexto, el sistema global incluye la columna de aféresis, tubos y una bomba apropiada para bombear la sangre en el circuito. El sistema se ilustra en la Figura 4. Se conecta al paciente (1) con el circuito extracorpóreo, a través de agujas estériles en las venas en los brazos derecho e izquierdo. Se conecta también una bolsa de solución salina (3) y se bombea dicha solución salina con una bomba adecuada (2). Se extrae la sangre del brazo del paciente a través del sistema de tubos estéril por bombeo de la sangre (4) y se pasa a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos puede estar conectado a la columna a través de cualquier acoplamiento adecuado, como pueda ser acoplamientos de cierre Luer para diálisis normal. Los acoplamientos en la columna pueden llevar códigos de colores para el correcto montaje. Por ejemplo, un tubo rojo para el flujo de entrada con la parte superior de la columna roja y un tubo azul para el flujo de salida de vuelta al paciente. Puede estar presente un detector de aire (8) en el circuito. Pueden emplearse sensores de la presión de entrada (5) y/o Pven (7) adicionalmente para controlar la presión en el circuito.

La bomba de aféresis, como por ejemplo la bomba 4008 ADS fabricada por Fresenius Medical Care o la bomba Adamonitor pueden controlar el flujo de entrada y de salida del paciente. La bomba puede controlar asimismo la presión en la circulación extracorpórea. La bomba puede tener la capacidad para discriminar el aire con un dispositivo para atrapar burbujas y un detector de aire. Puede colocarse dentro del dispositivo para atrapar burbujas un filtro para atrapar coágulos. La bomba puede llevar incorporado un detector óptico para distinguir entre luz, por ejemplo solución salina o aire presente en el sistema de tubos, y oscuridad, p.ej., sangre presente en el sistema de tubos. En la Figura 5 se muestra un diagrama esquemático de una bomba adecuada, en el que se muestra un detector de aire y un filtro óptico. Si el sistema de bombeo detecta burbujas de aire y fluctuaciones de aire o, si los valores de presión extracorpórea se encuentran fuera del intervalo ajustado, la bomba puede detenerse inmediatamente. Alternativamente o adicionalmente, puede dispararse una alarma visual o audible. "Diagnosticar" se define en el presente documento para incluir el reconocimiento de una enfermedad/afección o pre-indicación de una enfermedad/afección, identificando una enfermedad/afección o pre-indicación de una enfermedad/afección y haciendo un examen en cuanto a la recurrencia de la enfermedad/afección tras el tratamiento. Los métodos

divulgados en el presente documento también pueden tener un valor de pronóstico y esto se incluye dentro de la definición del término “diagnóstico”. El valor del pronóstico de los métodos divulgados en el presente documento puede utilizarse como marcador de la posible susceptibilidad a esclerosis múltiple identificando los niveles de expresión de CCR2 ligados a condiciones asociadas a una esclerosis múltiple. Por tanto, es posible identificar los pacientes en riesgo antes de que la enfermedad tenga la oportunidad de manifestarse por lo que respecta a los síntomas identificables en el paciente. Dado que los niveles de células que expresan CCR2, los niveles de expresión de CCR2 o los niveles de una o más células CCR2^{hi} son relevantes para el diagnóstico, determinar dichos niveles en una muestra obtenida de un sujeto puede influir en la selección del tratamiento para dicho paciente. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la invención proporciona un método de selección de un tratamiento adecuado para esclerosis múltiple que comprende determinar:

- a) los niveles de una o más células que expresan el receptor de quimioquina CCR2;
- b) los niveles de expresión de CCR2; y/o
- c) los niveles de células con una alta expresión de CCR2

en una muestra obtenida de un paciente, en el que niveles altos de células que expresan CCR2, niveles altos de expresión de CCR2 o niveles altos de células con una alta expresión de CCR2 o mayores niveles de células que expresan CCR2 en comparación con el control, mayores niveles de expresión de CCR2 en comparación con el control o mayores niveles de células con alta expresión de CCR2 en comparación con el control, tienen como resultado la selección de un tratamiento de esclerosis múltiple de acuerdo con la invención. Las células pueden ser linfocitos, en particular, linfocitos T. Las células son células que expresan CCR2, como por ejemplo linfocitos T, en realizaciones concretas.

A continuación, se describirán diversas realizaciones de la invención con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Descripción de las figuras

FIG. 1a, 1b y 1c – la unión de MCP-1 biotinilado con linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y monocitos CD14⁺, respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un donante sano.

FIG. 2a – Unión de MCP-1 a monocitos (línea discontinua) en sangre periférica tomada de pacientes EII. El gráfico representa un compendio de cuatro ensayos.

FIG. 2b – Unión de anticuerpo-CCR2 a monocitos (línea) en sangre periférica tomada de pacientes EII. El gráfico representa el compendio de cuatro ensayos.

FIG. 3 – El alojamiento de plástico y la parte superior en la que se muestra la placa de distribución (2) y unidades de filtro de seguridad (3 y 4).

FIG. 4 – Sistema de leucaféresis global.

FIG. 5 – Bomba con detector de aire y detector óptico (4).

FIG. 6a - Resultados del análisis del empobrecimiento *in vitro* realizado en la matriz acoplada a bMCP-1 que presenta capacidad para eliminar células que expresan CCR2 de la sangre de tres donantes sanos.

FIG. 6b – Resultados del análisis del empobrecimiento *in vitro* en matriz acoplada a RANTES que presenta capacidad de eliminar células que expresan receptor de quimioquina de sangre periférica de un donante sano.

FIG. 6c - Resultados del análisis del empobrecimiento *in vitro* en matriz acoplada a MIP-3a biotinilada que presenta la capacidad de eliminar linfocitos que expresan CCR6 de la sangre de tres donantes sanos.

FIG. 7 – Secuencia y biotinilación a través de un grupo espaciador, derivado MCP-1 de proteína madura que contiene Gln para modificación pyroGlu.

FIG. 8 - Secuencia y biotinilación a través de un grupo espaciador, derivado MCP-1 de proteína madura, que contiene Gln para modificación pyroGlu y Met para sustitución Norleu

FIG. 9 - Secuencia y biotinilación a través de un grupo espaciador de derivado MCP-1 truncada que contiene Met para sustitución Norleu

FIG. 10 – Alineamiento de secuencias de aminoácido de MCP-1 y MCP-5.

FIG. 11 - Secuencia y biotinilación a través de un grupo espaciador de derivado MCP-5 truncada (C-terminal) que contiene Ile para modificación Lys.

FIG. 12 - Secuencia y biotilación de derivado RANTES.

FIG. 13 – Ejemplo de criterio de selección de poblaciones (gating) para monocitos que expresan CCR2.

5 FIG. 14a – Frecuencia de linfocitos T CCR2 positivos. Las barras presentan la media y SEM de linfocitos T que expresan CCR2 en 2 pacientes y 20 controles sanos.

10 FIG. 14b – Frecuencia de linfocitos T CCR6 positivos. Las barras representan la media y SEM de linfocitos T que expresan CCR6 en 5 pacientes y 20 controles sanos. Se analizaron la expresión de receptores de quimioquina y marcadores celulares específicos por citometría de flujo. Se caracterizaron los linfocitos T como CD3 positivos.

FIG. 15a – Unión de la quimioquina bMCP-1 a linfocitos T. La barra representa la media y SEM de linfocitos T que se unen a MCP-1 en 5 pacientes con EM.

15 FIG. 15b - Unión de la quimioquina bMIP3a a linfocitos T. La barra representa la frecuencia de unión de linfocitos T a MIP3a en un paciente con EM. Se incubó la sangre con quimioquina biotilada y se analizó por citometría de flujo. Se caracterizaron los linfocitos T como CD3 positivos.

20 FIG. 16a – Empobrecimiento de linfocitos T que expresan CCR2 en matriz de Sepharose estreptavidina conjugada con bMCP-1.

25 FIG. 16b – Empobrecimiento de linfocitos que expresan CCR6 con matriz de Sepharose estreptavidina conjugada con bMIP3a. Se incubaron los glóbulos de la sangre del paciente con EM con matriz de quimioquina biotilada -Sepharose estreptavidina. Se retiraron las células sin unir por lavado de la matriz. A continuación, se analizaron las células (tras el empobrecimiento) por citometría de flujo y se compararon con células que no habían sido incubadas con matriz de quimioquina (antes del empobrecimiento).

Descripción de las realizaciones preferentes

30 En EM progresiva secundaria las microglías / MØ presentes en el borde de las placas producen quimioquinas MCP-1 y CXCL10 responsables de atraer células que expresan CCR2 y CXCR3 incluyendo macrófagos y astrocitos.

35 En el presente documento se demuestra que las personas que padecen de EM presentan una mayor frecuencia de células que expresan receptor de quimioquina en la sangre periférica, en particular, linfocitos T que expresan CCR2 y CCR6, en comparación con los controles sanos. Se demuestra asimismo en el presente documento que es posible separar las células CCR2 utilizando un reactivo de unión adecuado, en particular MCP-1 (en forma biotilada) inmovilizado en una matriz adecuada. De manera similar, se demuestra en el presente documento que es posible empobrecer las células que expresan CCR6 (adicionales) utilizando un reactivo adecuado, en particular CCL20 (MIP-31) en forma biotilada, inmovilizado en una matriz adecuada.

40 Los niveles de CCL5 son significativamente elevados en el líquido cefalorraquídeo de pacientes EM con enfermedad recidivante, lo que demuestra que CCL5 en circulación está relacionado con el reclutamiento de células de unión CCL5 al cerebro. Estas conclusiones se corroboran por el enriquecimiento de linfocitos T en el líquido cefalorraquídeo que expresan CCR5 y CCR6 lo que indica una activa acumulación como consecuencia de un gradiente de CCL5 de quimioquina. Por lo tanto, la eliminación de células atraídas normalmente al cerebro proporcionando una fuente extracorpórea de CCL5 fijada a una columna será útil para el tratamiento de EM.

EJEMPLOS 1 y 2

50 Materiales y métodos

Aislamiento de leucocitos de sangre periférica. Se fijó sangre periférica heparinizada de donantes de sangre sanos o de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (EII) en paraformaldehído al 4 % durante 4 minutos, se hemolizó durante 15 minutos con una solución de cloruro de amonio al 0,83 % y se lavó dos veces en tampón FACS para obtener una suspensión de leucocitos de la sangre.

60 *Quimioquinas.* Se incubaron leucocitos durante 30 minutos en la oscuridad a 4 °C con MCP-1 biotilado y marcado con Alexa647 Fluor® (en concentraciones de 10 ng/μl y 50 ng/μl). Se lavaron las células con tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo. Todas las quimioquinas utilizadas en los ejemplos fueron facilitadas por Almac Sciences Scotland Ltd., Edimburgo, Escocia.

65 *Ensayo de citometría de flujo.* Se llevó a cabo el ensayo de citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur de dos láseres (BD Immunocytometry Systems, San José, Ca, Estados Unidos). Se hizo el recuento de diez mil células y se analizaron en cada ejemplo. Para el análisis de los datos, se utilizó el software Cell Quest Pro de Becton Dickinson.

EJEMPLO 1- *Unión de monocitos a MCP-1.* En este experimento con MCP-1 biotilado, se observó que

aproximadamente un 90 % de los monocitos obtenidos de la sangre periférica de donantes sanos se había unido a citoquina al cabo de 30 minutos de incubación (Fig. 1 a), mientras que los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ no (Fig. 1b y 1c).

EJEMPLO 2 – Se investigaron los monocitos en cuanto a su expresión de CCR3 (Fig. 2b) y su capacidad para unirse a MCP-1 (Fig. 2 a). Se advirtió la expresión de CCR2 en todos los monocitos, expresando la mayoría de los monocitos altos niveles, mediante el uso de anticuerpo anti-CRR2 (Fig. 2b). La unión de MCP-1 a monocitos que se presenta en la Fig. 2a corresponde a la población que expresa CCR2^{hi} en la Fig. 2b. Por tanto, MCP-1 se une favorablemente a la población que expresa CCR2^{hi} presentada en la Fig. 2b. Por tanto, MCP-1 se une favorablemente a células que expresan CCR2^{hi}.

EJEMPLO 3 – Leucaféresis adaptada

PROPIEDADES Y DISEÑO DE COLUMNA

Introducción

Aféresis es un tratamiento establecido que se utiliza para el empobrecimiento de componentes de la sangre, como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y glóbulos de la sangre. La leucaféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para separar glóbulos blancos de la sangre, leucocitos. Se conecta al paciente con un sistema de circulación de la sangre extracorpóreo; se extrae la sangre de una vena de uno de los brazos, se pasa a través de un dispositivo de columna y se retorna al otro brazo del paciente. Los efectos secundarios de los tratamientos de leucaféresis son diversos desde episodios moderados, como cefalea, mareo, hipertensión, palpitaciones y vista borrosa en 0,1 a 5 % de los pacientes tratados.

Columna

La columna tiene como fin su uso como tratamiento de leucaféresis para esclerosis múltiple. Separará de forma específica leucocitos que expresan CCR2, CCR6, CCR3, CCR5, CCR1, CXCR3 y/o CCR9, en particular, monocitos, a través del uso de un reactivo de unión, más específicamente una resina que contiene MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-3alfa, MIG (CXCL9), IP10 (CXCL10), CXCL11 (I-TAC), CCL25 y RANTES explotando la interacción de CCR2, CCR6, CCR3, CCR5, CCR1, CXCR3 y/o CCR9 -quimioquina. La columna consiste en tres componentes combinados, el alojamiento de plástico, la matriz de estreptavidina (SA) Sepharose™ BigBeads y uno o más MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-3alfa, MIG (CXCL9), IP10 (CXCL10), CXCL11 (I-TAC), CCL25 y RANTES biotinilados unidos a la matriz. El tratamiento se lleva a cabo utilizando la misma técnica que la del procedimiento de aféresis normal.

Alojamiento de plástico (Fig. 3)

El alojamiento de plástico, diseñado 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 un emplazamiento de flujo de entrada (1) para extender la sangre uniformemente en todo el área de la matriz. La placa constituye una primera barrera de seguridad que impide que las partículas más grandes fluyan a través de la columna y hasta el paciente. Las unidades de filtro de seguridad (3 y 4) están situadas en los sitios del flujo de entrada (1) y el flujo de salida (5) del alojamiento de plástico. La unidad de filtro de seguridad contiene tres filtros diseñados para funcionar como una sólida barrera y detener todas las partículas más grandes que los glóbulos de la sangre y evitar que atraviesen la columna. En la Figura 3 se muestra el diseño del alojamiento de plástico. El diseño con los filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos del dispositivo de columna reducirá al mínimo el riesgo de filtración de las partículas hacia el paciente, incluyendo el caso en el que el dispositivo esté colocado al revés de manera que la sangre fluya en dirección opuesta a la anticipada.

Perlas de estreptavidina Sepharose™ BigBeads

El segundo componente del dispositivo es la matriz de afinidad denominada estreptavidina Sepharose™ BigBeads (Sepharose™ GE Healthcare, Suecia). Sepharose™ es una forma en perlas de agarosa reticulada que es un polisacárido extraído de algas. El uso de Sepharose™ y agarosa para matrices de columna está muy extendido en las técnicas de afinidad biomédica. Se opta por él por su óptima capacidad de distribución y puede proporcionar un área disponible grande para la unión por afinidad.

Reactivo de unión

El tercer componente está acoplado a la matriz del dispositivo, el uno o más de los reactivos que se unen específicamente a CCR2, CCR6, CCR3, CCR5, CCR1, CXCR3 y/o CCR9. Se pueden emplear una o más quimioquinas como, por ejemplo, las seleccionadas del grupo que consiste en MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-3alfa, MIG (CXCL9), IP10 (CXCL10), CXCL11 (I-TAC), CCL25 y RANTES. Estos péptidos pueden ser sintéticos, versiones obtenidas por ingeniería genética de quimioquina humana, que están truncados o biotinilados para retener la actividad de unión al receptor CCR2, CCR6, CCR3, CCR5, CCR1, CXCR3 y/o CCR9. Al biotinilar la

quimioquina obtenida por ingeniería, ésta es capaz de unirse a moléculas de estreptavidina en la matriz de Sepharose™. Se sabe que la biotina-estreptavidina constituye una de las interacciones biológicas más fuertes con un Kd del orden de 4×10^{-14} M. La relación calculada de sitios de unión estreptavidina: biotina en la columna es 10:1. Por lo tanto, el acoplamiento entre la matriz y la quimioquina será intermedio, reduciendo así al mínimo el riesgo de

5

Sistema de aféresis

Para llevar a cabo la leucaféresis, se necesitan los siguientes componentes: la columna, el sistema de tubos y una bomba 4008 ADS (Fresenius Medical Care).

10

Circuito

En la Figura 4 se ilustra el sistema de circuito. Se conecta al paciente con el circuito extracorpóreo a través de agujas estériles Venflon en las venas de los brazos derecho e izquierdo. Se conecta asimismo una bolsa de solución salina (3) y se bombea la solución salina con una bomba ACD (2). Se extrae la sangre de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estéril por bombeo de la sangre (4) y se pasa a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. Se conecta el sistema de tubos con la columna a través de acoplamientos de cierre Luer para diálisis normales. Los acoplamientos en la columna llevan un código de color para su correcto montaje; el tubo rojo para el flujo de entrada con la parte superior de la columna y el tubo azul para el flujo de salida de nuevo al paciente. Está presente un detector de aire (8). Se emplean sensores de la presión de entrada (5) y PVen para controlar la presión del circuito.

15

20

Bomba 4008 ADS

25

Una bomba de aféresis de Fresenius Medical Care controla el flujo de entrada y el flujo de salida del paciente, la presión en la circulación extracorpórea y puede discriminar aire mediante un detector de aire y un dispositivo que atrapa las burbujas. Dentro del dispositivo que atrapa las burbujas hay colocado un filtro que atrapa coágulos. La bomba tiene también un detector óptico para distinguir entre la luz, p.ej., solución salina o aire presente en el sistema de tubos, y oscuro, por ejemplo la sangre presente en el sistema de tubos.

30

En la Figura 5 se muestra un diagrama esquemático de la bomba, en la que se presenta un detector de aire y un filtro óptico. Si el sistema de la bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de la presión extracorpórea se salen del intervalo ajustado, la bomba se detiene inmediatamente y se emite una alarma visible/audible.

35

Leyendas para la Fig. 5:

1. Monitor

40

2. Soporte para bolsa de residuos

3. Módulos (de izquierda a derecha – Bomba de sangre, bomba ACD, detector de aire)

4. Sitio de reserva para otros módulos

5. Soporte de amortiguador

6. Detector de goteo

45

7. Mástil IV

Preparación del paciente

Se administrará al paciente anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Se utilizará una solución salina estéril con heparina 5000 IE para preparar el sistema extracorpóreo, a continuación, se añadirá una inyección de bolo con heparina 4000 IE al circuito al comienzo de cada sesión.

50

Tiempo y caudal de leucaféresis.

55

El sistema de aféresis deberá funcionar a un caudal de 30-60 ml/min. Se finaliza un tratamiento después de que hayan circulado 1800 ml de sangre.

Condiciones de almacenamiento

60

Los dispositivos de columna deberán almacenarse a entre 1 y 25 °C evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Datos de estabilidad > 3 meses no indican ninguna diferencia en la funcionalidad a lo largo del tiempo o por la temperatura (temperatura ambiente y refrigerada). Las columnas se mantendrán en condiciones refrigeradas hasta su uso. Deberá evitarse cualquier daño mecánico, como puedan ser los que se deriven de vibraciones violentas y golpes. Una columna almacenada sin cumplir estas recomendaciones no deberá ser utilizada.

65

Condiciones de transporte

El dispositivo de columna se deberá transportar en condiciones refrigeradas, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Deberá evitarse cualquier daño mecánico, como pueda ser el derivado de vibraciones violentas y golpes.

Empobrecimiento *in vitro* de las poblaciones de células diana – MCP-1

Para investigar la capacidad para eliminar Células que expresan CCR2, se llevaron a cabo análisis *in vitro* sobre la matriz acoplada a bMCP-1. Se recogió sangre de donantes de sangre y se pasó a través del dispositivo de columna que contenía matriz acoplada a bMCP-1. Se tomaron muestras de sangre antes y después del paso por la columna y se analizaron por citometría de flujo (FACS) en cuanto al empobrecimiento de células que expresan CCR2. Los resultados demuestran un significativo empobrecimiento de la población diana, monocitos que expresan CCR2, después de la perfusión de la matriz. Se realizaron análisis de empobrecimiento en la sangre de tres donantes sanos. En la Figura 6a se muestran los resultados.

En conclusión, los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de hasta un 80 % de las células que expresan CCR2 a través de la columna. Cabe destacar que los individuos con menos células que expresan CCR2 consiguieron inicialmente un empobrecimiento inferior. Los niveles de monocitos restantes fueron en torno a 20-30 % en cada caso, independientemente del punto de partida. Quedaron sin afectar las células que no expresan CCR2 (no se muestran los datos).

Empobrecimiento *in vitro* de poblaciones de células diana – RANTES

Para investigar la capacidad para eliminar CCR1, células que expresan 3 y 5-, se llevaron a cabo análisis *in vitro* sobre matriz acoplada a RANTES biotinilado. Se recogió sangre de donantes de sangre 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 paso por la columna y se analizaron por citometría de flujo (FACS) en cuanto al empobrecimiento de CCR1, células que expresan 3 y 5-. Los resultados demuestran un significativo empobrecimiento de la población diana, células que expresan receptor de quimioquina después de la perfusión de la matriz. Se realizaron análisis de empobrecimiento en la sangre de un donante sano. Los resultados se muestran en la Figura 6b.

Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica en torno a 20 % de las células que expresan receptor de quimioquina con la columna. Las células que expresan 3 o 5, no CCR1, quedaron sin afectar (no se muestran los datos).

Empobrecimiento *in vitro* de poblaciones de células diana - MIP-3alfa

Para investigar la capacidad para eliminar células que expresan CCR6, se llevaron a cabo análisis *in vitro* en matriz acoplada a MIP-3a biotinilado. Se recogió sangre de donantes de sangre y se pasó a través del dispositivo de columna que contenía matriz acoplada a MIP-3a biotinilado. Se tomaron muestras de sangre antes y después del paso por la columna y se analizaron por citometría de flujo (FACS) en cuanto al empobrecimiento de células que expresan CCR6. Los resultados demuestran un significativo empobrecimiento de la población diana linfocitos que expresan CCR6- después de la perfusión de la matriz. Se realizaron análisis de empobrecimiento en la sangre de tres donantes sanos. Los resultados se muestran en Figure 6c. Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de hasta en torno a un 15 % de las células que expresan CCR6 a través de la columna. Las células que no expresan CCR6 quedaron sin afectar (no se muestran los datos).

Se sintetizó la molécula RANTES por Almac. La secuencia de aminoácidos de la molécula RANTES biotinilada se expone como SEQ ID NO: 17:

```
H2N-
SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYI
NSLEKS
-CO2H
```

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

Se biotiniló directamente cadena lateral de Lys 67 para dar la estructura primaria de proteína que se presenta en la Figura 12. Se plegó la proteína y se formaron enlaces disulfuro entre la primera y la tercera cisteína de la secuencia y entre las cisteínas 2ª y 4ª.

EJEMPLO 4 – DERIVADOS DE MCP1

Se produjo MCP-1 con el resto 75 como sitio de biotinilación en la quimioquina (la numeración se basa en la proteína

madura que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2). La biotilación permite la inmovilización de MCP-1 sobre un soporte sólido (a través de la interacción biotina-avidina). La secuencia de aminoácidos básicas de MPC-1, incluyendo la secuencia líder de 23 aminoácidos se expone como SEQ ID NO:

MKVSAALLCL LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP
5 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
10 KVVQDSXDHL DKQTQTPKT

X = Met o Nleu

Los autores de la invención determinaron que las quimioquinas pueden desplegar mejores propiedades de unión cuando la quimioquina está biotilada a través de un grupo espaciador. El espaciador puede evitar que el grupo biotina afecte a la afinidad de unión de la biotina.

15 Por lo tanto, se sintetizará MCP-1 derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral ϵ -amino de Lys 75 con PEG-Biotina (sal TFA). El espaciador PEG será ácido 3,6-dioxoaminooctanoico. Se somete Gln en el extremo N de las proteínas a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. De esta forma la primera glutamina (Gln1) de la secuencia se sustituirá por piroglutamina. La molécula se sintetizará como una amina C-terminal (a través de la síntesis en un garce amida). La molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

20 Se sintetizará asimismo biotina MCP-1 Met en su análogo Nleu. La única metionina dentro de la secuencia se alterará en Norleucina para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de cadena y mejorar la estabilidad del producto final. Esta molécula se presenta esquemáticamente en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 2.

25 Una vez sintetizada, se determinará la actividad de los diversos derivados biotinaMCP-1 en ensayos celulares. En particular, se determinarán las propiedades agonistas y antagonistas en ensayo celular funcional de aequorina sobre receptor CCR2 humano.

30 **EJEMPLO 5 – SINTESIS DE BIOTINAMCP-1 ANTAGONISTA DE CCR2 QUE SE UNE AL RECEPTOR SIN ACTIVACIÓN**

35 Se ha demostrado la actividad antagonista (J-H Gong and I. Clark-Lewis, J. Exp. Med., 1995, 181, 63) para un derivado de MCP-2 truncado en el extremo N. En particular, la delección de los restos 1-8 tiene como resultado la unión a CCR2 con Kd 8,3 nM. Esta proteína fue incapaz de causar quimiotaxis de células CCR2 positivas (la inhibición de quimiotaxis IC50 20 nM).

La secuencia de aminoácidos de la versión truncada se expone como SEQ ID NO: 3:

VTCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KVVQDSMDHL
40 DKQTQTPKT

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

50 Una vez sintetizado, se determinará la actividad de los diversos derivados biotinaMCP-1 en ensayos celulares. En particular, se determinarán las propiedades agonistas y antagonistas en un ensayo celular funcional con aequorina sobre receptor CCR2 humano.

55 **EJEMPLO 6 – DEMOSTRACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE CÉLULAS QUE EXPRESAN CCR2 UTILIZANDO UN LIGANDO DE QUIMIOQUINA PARA MCP-1 ALTERNATIVO. Ejemplo de referencia**

60 CCR2 se une también a quimioquinas MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y HCC-4 además de a MCP-1. MCP-5 solamente se une a CCR2 y no deberá ser selectivo en su eliminación de células que expresan CCR2. MCP5 es una quimioquina de ratón que tiene acción quimiotáctica, según se ha demostrado, para células CCR2 humanas con EC50 < 3 nM.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa que incluye el péptido de señal se expone como SEQ ID NO: 4

MKISTLLCLL LIATTISPQV LAGPDAVSTP VTCCYNNVKQ KIHVRKLSY RRITSSQCPR
EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFILP SCLG

La secuencia de aminoácidos de quimioquina MCP-5 procesada N-terminal es de 82 aminoácidos de longitud y se expone como SEQ ID NO: 5

5

GPDAVSTP VTCCYNNVKQ KIHVRKLSY RRITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK
WVKNSINHLD KTSQTFILP SCLG

Un alineamiento de secuencia de aminoácidos indica que MCP-5 tiene una extensión C-terminal cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de MCP-1. Los resultados de este alineamiento se muestran en la Figura 10. Sobre esta base, se sintetizará una versión truncada C-terminal de MCP-5. Dicha versión truncada comprenderá los restos 1-76 de MCP-5, expuestos como SEQ ID NO: 6:

10

GPDAVSTP VTCCYNNVKQ KIHVRKLSY RRITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK
WVKNSINHLD KTSQTFIL

15 En la versión truncada, lle75 para su sustitución por Lys, expuesta como SEQ ID NO: 7:

GPDAVSTP VTCCYNNVKQ KIHVRKLSY RRITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK
WVKNSINHLD KTSQTFKL

20

Tras la sustitución, la versión sustituida se biotinilará en la posición 75, una lisina u otro resto adecuado como ornitina o ácido diaminopropanoico a través de un espaciador PEG (ácido 3,6, - dioxoaminooctanoico). Se sintetizará la proteína sobre un engarce amida para producir un derivado amida C-terminal. Esta molécula se muestra de manera esquemática en la Figura 11.

25

Una vez sintetizada, se determinará la actividad de los diversos derivados de biotinaMCP-5 en ensayos celulares. En particular, se determinarán las propiedades agonistas y antagonistas en un ensayo celular funcional con sobre receptor CCR2 humano.

EJEMPLOS 7 a 14

30

Protocolos generales para síntesis de quimioquina

Ensamblaje:

35

Se llevó a cabo la síntesis química de quimioquinas utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) Fmoc normales sobre un sintetizador de péptidos ABI 433. Se utilizaron DIC (0,5 M en DMF) y OxymaPure (0,5 M en DMF) para la activación, anhídrido acético (0,5 M en DMF) para la protección con caperuza y 20 % piperidina en DMF para la Desprotección Fmoc. Se utilizó resina de amida de Rink para generar quimioquinas de amida C-terminal y resina Wang para quimioquinas de ácido C-terminal. Tras el ensamblaje, se lavó la resina con DMF y DCM y después se secaron al vacío.

40

Separación de protección Dde:

Se separó el grupo protector Dde por tratamiento de la resina con una solución de 2,5 % de hidracina en DMF (200 ml) a lo largo de un período de 2 horas. A continuación, se lavó la resina con DMF.

45

Etapas de marcado:

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

50

Se hinchó la resina en DMF y a continuación, se añadió una solución de Fmoc-8-amino-ácido 3,6-dioctanoico (0.38g, 1 mmol), solución DIC (2 ml, 0,5 M en DMF) y solución de OxymaPure (2 ml, 0,5 M en DMF). Se sometió a sonicación la mezcla durante 3 horas y después se lavó con DMF.

55

2. Protección con caperuza

Se protegió con caperuza la resina con solución de anhídrido acético (0,5 M en DMF, 10 ml) durante 5 minutos y después se lavó con DMF.

3. Desprotección Fmoc

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

5

4. Par Biotina-OSu

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

10

Escisión:

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

15

Protocolo de purificación:

20

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

Protocolo de plegado:

25

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

30

Purificación por RP-HPLC utilizando un gradiente optimizado para dar el producto deseado.

EJEMPLO 7 - biotinaMCP-1 (CCL2)

35

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

Modificaciones: MCP-1 humana que corresponde a los restos 1-76, se expresa inicialmente como 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y un péptido de señal de 23 aminoácidos que se escinde. Se somete Gln en el extremo N de la proteína a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Así, se substituyó Gln1 de la secuencia con piroglutamina para evitar especies mixtas del N-terminal Gln y generándose pyroGlu. Esto mejora el rendimiento de síntesis y asegura una preparación de quimioquina homogénea en toda la fabricación y uso de la columna. Se modificó la lisina de origen natural en la posición 75 por biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador PEG entre la funcionalidad ε- amino y la biotina.

40

45

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 8), antes de la fijación del espaciador PEG y biotina moléculas en el aminoácido 75 (K):

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT-NH₂

50

X = pyroGlu

Se ensambló la secuencia de MCP-1 obtenida por ingeniería genética en soporte sólido (Resina de amida de Rink), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

55

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-RESIN

60

X1 = pyroGlu
X75 = K(ivDde)

Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como el resto 75 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la

proteína (SEQ ID NO: 9). Tras la separación del grupo protector ivDde, se llevó a cabo el acoplamiento del espaciador PEG y biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito, para abastecer la quimioquina activa deseada (SEQ ID NO: 10):

5

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-NH₂

X1 = pyroGlu

10 X75 = resto aminoácido que puede ser biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente, está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K (PEG-Biotina).

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

15 Datos de ensayo funcional:

Se analizó biotinaMCP-1 en cuanto a la actividad agonista en un ensayo con aequarina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se registró un valor EC50 de 9,6 nM. En comparación con EC50 para MCP-1 nativo recombinante de 3,1 nM.

20

Ejemplo 8 - biotinaMCP-2 (CCL8) - Ejemplo de Referencia

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

25

Modificaciones: MCP-2 humana que corresponde a los restos 1-76, se expresa inicialmente como 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y un péptido de señal de 23 aminoácidos que se escinde. Se sometió a formación pyroGlu Gln en el extremo N de la proteína en condiciones fisiológicas. Así se sustituyó Gln1 de la secuencia con piroglutamina para evitar que se generaran especies mixtas de Gln N-terminal y pyroGlu. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimioquina homogénea en toda la fabricación y uso de la columna. Se modificó la lisina de origen natural en la posición 75 por biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador PEG entre la funcionalidad ε- amino y la biotina.

30

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 11), antes de la fijación del espaciador PEG y biotina moléculas en el aminoácido 75 (K):

35

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVRDSMKHLDQIFQNLKP-NH₂

X = pyroGlu

40

Se ensambló la secuencia de MCP-2 obtenida por ingeniería genética sobre soporte sólido (resina de amida de Rink), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH₂

45

X1 = pyroGlu

X75 = K(ivDde)

50 Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como el resto 75 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 12). Tras la separación de the ivDde grupo protector, se llevó a cabo el acoplamiento del espaciador PEG y biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, la purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada (SEQ ID NO: 13):

55

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH₂

X1 = pyroGlu

X75 = resto aminoácido que puede ser biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente,

está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K (PEG-Biotina).

Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaMCP-2: plegada purificada obtenido = 9263,6 Da; esperado 9263,8 Da.

5

Datos de ensayo funcional:

Se analizó biotinaMCP-2 en cuanto a su actividad en un ensayo con aequarina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se demostró que era un agonista parcial con un valor EC50 de 50,9 nM en comparación con EC50 para MCP-2 nativo recombinante de 23,5 nM (agonista parcial).

10

EJEMPLO 9 - biotinaEotaxina (CCL11) - Ejemplo de Referencia

Molécula diana: Eotaxina derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino Lys(73) con PEG-Biotina (Sal TFA)

15

Modificaciones: eotaxina humana que corresponde a los restos 1-74, se expresa inicialmente como 97 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y un péptido de señal de 23 aminoácidos que se escinde. Se modificó la lisina de origen natural en la posición 73 por biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador PEG entre la funcionalidad ϵ -amino y la biotina.

20

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 14) antes de la fijación del espaciador PEG y biotina moléculas en el aminoácido 73 (K):

H-GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKK
WVQDSMKYLDQKSPTXP-NH₂

25

X es un resto de aminoácido que puede ser biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente, está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K (PEG-Biotina).

30

Se ensambló la eotaxina obtenida por ingeniería genética sobre soporte sólido (resina de amida de Rink), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKK
WVQDSMKYLDQKSPTXP-NH₂

35

X es K(ivDde)

Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como el resto 73 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 15). Tras la separación del grupo protector ivDde, se llevó a cabo el acoplamiento del espaciador PEG y biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, la purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada (SEQ ID NO: 16):

40

H-GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKK
WVQDSMKYLDQKSPTXP-NH₂

45

X es K(PEG-Biotina)

Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaEotaxina plegada purificada: obtenido = 8731,3 Da; esperado 8731,3 Da.

50

Datos de ensayo funcional:

Se analizó biotinaEotaxina en cuanto a su actividad en un ensayo con aequarina contra hCCR3, (Euroscreen) y se demostró que era antagonista con un valor EC50 de 211,8 nM en comparación con EC50 para eotaxina nativa recombinante de 10,7 nM (agonista).

55

Ejemplo 10 - biotinaRANTES (CCL5) - Ejemplo de Referencia

Molécula diana: RANTES derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino Lys(67) con biotina (Sal TFA)

60

Modificaciones: RANTES humana que corresponde a los restos 1-68, se expresa inicialmente como 91 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y un péptido de señal de 23 aminoácidos que se escinde. Se mutó la única metionina (Met67) dentro de la secuencia a lisina para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de cadena, observada durante la síntesis del derivado de la secuencia natural. Esta sustitución de Met por Lys proporcionó una lisina en la posición 67 que fue modificada por biotinilación sobre la resina.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 17) antes de la fijación de la molécula de biotina en el aminoácido 67 (K):

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEKS-OH

Se ensambló la secuencia de RANTES obtenida por ingeniería genética sobre un soporte sólido (resina Wang), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEXS-RESIN

X es K(ivDde)

Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como el resto 67 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 18). Tras la separación del grupo protector ivDde, se llevó a cabo el acoplamiento de la biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, la purificación y los protocolos de plegado tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada (SEQ ID NO: 19).

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEXS-OH

X es un resto de aminoácido que puede ser biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG (p.ej. K(Biotina))

Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaRANTES purificada plegada: obtenido = 8068,9 Da; esperado 8070,2 Da.

Datos de ensayo funcional:

Se analizó BiotinRANTES en cuanto a la actividad agonista en un ensayo con aequarina contra hCCR5, (Euroscreen) y se registró un valor EC50 de 0,5 nM.

Ejemplo 11 - biotinaMIP-3 α (CCL20) - Ejemplo de Referencia

Molécula diana: MIP-3 α derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino Lys(68) con PEG-Biotina (Sal TFA)

Modificaciones: MIP-3 α humana que corresponde a los restos 1-70, se expresa inicialmente como 96 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y un péptido de señal de 26 aminoácidos que se escinde. Se modificó la lisina de origen natural en la posición 68 por biotinilación sobre la resina. Se incorporó un espaciador PEG entre la funcionalidad ϵ -amino y la biotina.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 20) antes de la fijación del espaciador PEG y biotina moléculas en el aminoácido 68 (K):

H-ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPK
QTVVKYIVRLLSKKVKNM-OH

Se ensambló la secuencia de MIP-3 α obtenida por ingeniería genética en un soporte sólido (resina Wang), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPK
QTVVKYIVRLLSKKVXNM-RESIN

X= K(ivDde)

Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como el resto 68 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 21). Tras la separación del grupo protector ivDde se llevó a cabo el acoplamiento del espaciador PEG y biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada (SEQ ID NO: 22).

H-ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKTKKLSVCANPK
QWVVKYIVRLLSKKXNM-OH

X es un resto de aminoácido que puede ser biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente, está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, en particular K(PEG-Biotina)

Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) biotinaMip-3α purificada plegada: obtenido = 8396,4 Da; esperado 8397,0 Da.

Datos de ensayo funcional:

Se analizó BiotinMIP-3α en cuanto a la actividad agonista en un ensayo con aequarina contra hCCR6, (Euroscreen) y se registró un valor EC50 de 1,6 nM en comparación con EC50 para MIP-3α nativa recombinante de 1,0 nM.

Ejemplo 12 - biotinaTECK (CCL25) - Ejemplo de Referencia

Molécula diana: TECK (Met para sustitución Nleu) derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ε-amino Lys72 con PEG-Biotina (Sal TFA)

Modificaciones: Forma truncada de TECK humana que corresponde a los restos 1-74 de la proteína madura, que abarca la secuencia que corresponde al pliegue de quimioquina. La longitud completa de la proteína es de 127 aminoácidos (el péptido de señal es de 23 aminoácidos en una proteína inmadura de 150 aminoácidos). Se alteró la única metionina dentro de la secuencia en Norleucina para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de cadena, observada durante la síntesis del derivado de la secuencia natural. Se sometió Gln en el extremo N de la proteína a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Así, se sustituyó Gln1 de la secuencia por piroglutamina para evitar especies mixtas de Gln N-terminal y generándose pyroGlu. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimioquina homogénea a lo largo de la fabricación y el uso de la columna. Se modificó la lisina de origen natural en la posición 72 por biotinilación sobre la resina. Se incorporó un espaciador PEG entre la funcionalidad ε-amino y la biotina.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 23) antes de la fijación del espaciador PEG y biotina moléculas en el aminoácido 72 (K):

H-
XGVFEDCCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGNPKSREVQ
RAXKLLDARNKVF-OH

X1 = pyroGlu o Gln
X64 = Norleucina

Se ensambló la secuencia TECK obtenida por ingeniería genética sobre un soporte sólido (Resina Wang), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-
XGVFEDCCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGNPKSREVQ
RAXKLLDARNXVF-RESIN

X1 = pyroGlu o Gln
X64 = Norleucina
X72 = K(Dde)
NPKSREVQRANleKLLDARNK(ivDde)VF-RESIN

Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como el resto 72 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 24). Tras la separación de the ivDde grupo protector, se llevó a cabo el acoplamiento del espaciador PEG y biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, la

purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada.

Por tanto, la quimioquina activa final tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 25):

H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG
5 NPKSREVQRAXKLLDARNXVF-OH

X1 = pyroGlu o Gln

X64 = Norleucina

10 X72 = un resto aminoácido que puede ser biotilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente es biotilada, opcionalmente a través de una molécula espaciadora como PEG, como K(PEG-Biotina)

15 Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaTECK purificada plegada (Met para sustitución Nleu): obtenido = 8958,5 Da; esperado 8959,6 Da.

Datos de ensayo funcional:

20 Se analizó biotinaTECK (Met para sustitución Nleu) en cuanto a la actividad agonista en un ensayo con aequarina contra hCCR9, (Euroscreen) y se registró un valor EC50 de 63,6nM en comparación con EC50 por TECK nativo recombinante 67,9 nM.

Ejemplo 13 - biotinaITAC (CXCL11) - Ejemplo de Referencia

25 Molécula diana: ITAC derivatizada con biotina en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino con una lisina adicional insertada en el extremo C tras un espaciador PEG (Sal TFA)

30 Modificaciones: ITAC humana que corresponde a los restos 1-73, se expresa inicialmente como 94 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y una señal de péptido de 21 aminoácidos que se escinde. Se insertaron un espaciador PEG y una lisina adicional en el extremo C, y se modificaron por biotilación sobre la resina. Se incorporó el espaciador PEG en el extremo C entre la proteína y la lisina adicional.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 26) antes de la fijación del espaciador PEG, la lisina adicional y las moléculas de biotina:

H-FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVDIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG
35 QRCLNPKSKQARLIKKVERKNF-OH

40 Se ensambló la secuencia de ITAC obtenida por ingeniería genética sobre un soporte sólido (resina Wang), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVDIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNFX-RESIN

X es PEG-K(ivDde)

45 Se incorporaron Fmoc- ácido 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico seguido de FmocLys(ivDde)-OH en el extremo C para facilitar el marcado específico de sitio con biotina en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino de la lisina adicional Lys (SEQ ID NO: 27). Tras la separación del grupo protector ivDde, se llevó a cabo el acoplamiento de la biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, la purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada (SEQ ID NO: 28).

50 H-FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVDIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNFX-OH

55 X es un resto de aminoácido que puede ser biotilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina) y puede estar fijado a través de una molécula espaciadora, p.ej., PEG-K(Biotina)

Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaITAC purificada plegada: obtenido = 8866,5 Da; esperado 8860,6 Da.

Datos de ensayo funcional:

Se analizó biotinalTAC en cuanto a la actividad agonista en un ensayo con aequarina contra hCXCR3, (Euroscreen) y se registró un valor EC50 de 15,7 nM en comparación con EC50 para ITAC nativa recombinante de 0,7 nM.

5

EJEMPLO 14 - biotinalP-10 (CXCL10) - Ejemplo de Referencia

Molécula diana: IP-10 derivatizada con biotina en la funcionalidad de cadena lateral de la lisina adicional insertada en el extremo C tras un espaciador PEG (Sal TFA)

10

Modificaciones: IP-10 humana que corresponde a los restos 1-77, se expresa inicialmente como 98 aminoácidos que comprenden el pliegue de quimioquina y el péptido de señal de 21 aminoácidos que se escinde. Se insertaron un espaciador PEG y una lisina adicional en el extremo C y se modificó por biotinilación sobre la resina. Se incorporó el espaciador PEG en el extremo C entre la proteína y la lisina adicional.

15

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 29) antes de la fijación del espaciador PEG, la lisina adicional y las moléculas de biotina:

H-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP-OH

20

Se ensambló la secuencia de IP-10 obtenida por ingeniería genética sobre un soporte sólido (resina Wang), aplicando protocolos Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se ha descrito en la sección de protocolos general:

H-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSPX-RESIN

25

X es K(ivDde), opcionalmente, fijado a través de un espaciador como PEG, p.ej. -PEG-K(ivDde)

Se incorporaron Fmoc-8-amino-ácido 3,6-dioctanoico seguido de FmocLys(ivDde)-OH en el extremo C para facilitar el marcado específico de sitio con biotina en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino de Lys adicional (SEQ ID NO: 30). Tras la separación del grupo protector ivDde, se llevó a cabo el acoplamiento de la biotina, tal como se describe en la sección del protocolo general. Se llevaron a cabo la escisión, la purificación y los protocolos de plegado, tal como se ha descrito para abastecer la quimioquina activa deseada. La quimioquina activa final tiene por tanto la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 31):

35

H-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSPX-OH

X es un resto de aminoácido que puede ser biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente, está biotinilado, opcionalmente, a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina) y puede estar fijado a través de una molécula espaciadora, p.ej. PEG-K(Biotina)

40

Datos de Ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinalP-10 plegada purificada: obtenido = 9141,0 Da; esperado 9141,9 Da.

Datos de ensayo funcional:

45

Se analizó BiotinalP-10 en cuanto a la actividad agonista en un ensayo con aequarina contra hCXCR3, (Euroscreen) y se registró un valor EC50 de 8,7 nM en comparación con EC50 para IP-10 nativo recombinante de 4,4 nM.

EJEMPLO 15 – Diagnóstico y tratamiento de EM basado en linfocitos T que expresan CCR2 y CCR6

50

Materiales y métodos

1. Análisis de citometría de flujo de sangre periférica

55

Se recogió sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos en tubos de heparina. Se lisaron los glóbulos rojos de la sangre utilizando tampón Fix (Solución salina de tampón fosfato (PBS) citrato con 4 % de paraformaldehído) durante 4 minutos a 37° C y tampón de lisado (PBS con 10 mM Tris y 160 mM NH₄Cl, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Se lavaron células en PBS con 2 % de suero de crecimiento bovino, incubado con 10 % de suero humano durante 15 m minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñó con anticuerpos (Tabla 2) a 4 °C durante 30 minutos. Se analizaron las células por citometría de flujo sobre un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

60

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD3	V450	BD Biosciences
CCR6	PE	BD Biosciences
Estreptavidina	PE, APC	Biolegend
CCR2	PerCP Cy5.5	Biolegend

2. Prueba de unión a quimioquina

5 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Se lisaron glóbulos rojos de la sangre utilizando tampón fix (Solución salina con tampón fosfato (PBS) citrato con 4 % de paraformaldehído) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con 10 mM Tris y 160 mM NH₄Cl, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Se lavaron las células en PBS con 2 % de suero de crecimiento bovino, incubado con 10 % de suero humano 15 minutos a temperatura ambiente (RA) y se tiñeron con anticuerpos específicos de célula junto con quimioquina biotinilada (1 µM) o el anticuerpo de receptor de quimioquina correspondiente a 4 °C durante 30 min (Tabla 2). Se detectó la quimioquina biotinilada a través de la interacción entre biotina y estreptavidina conjugada con fluoróforo. Se analizaron las muestras por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con un software FACSDiva (BD Biosciences).

15 3. Empobrecimiento de células con matriz conjugada con quimioquina biotinilada

Se prepararon células de sangre periférica (sección 1). Se lavó la matriz de Sepharose BigBeads conjugada con 0,4 mg/ml de estreptavidina (GE Healthcare) en 50 ml de PBS y se añadieron a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió quimioquina biotinilada (1 µM) al tubo y se incubó durante 20 minutos a TA para dar cabida a la inmovilización de la quimioquina en la matriz a través de la interacción de biotina-estreptavidina. A continuación, se añadieron las células a la matriz de quimioquina y se incubó durante 20 min a TA. Se separaron las células que no se unieron a la matriz por lavado de la matriz con PBS en un filtro de nilón de 40 µm estéril (BD Falcon™ Cell Strainer). Se tiñeron las células en flujo con anticuerpos (Tabla 2), se analizaron por citometría de flujo y se compararon con las células de sangre periférica que no habían sido incubadas con la matriz de quimioquina.

25

Resultados y explicación

1. Análisis de citometría de flujo de sangre periférica

30 Se analizaron los glóbulos blancos de la sangre de pacientes con esclerosis múltiple (EM) en cuanto a la expresión de receptores de quimioquina por citometría de flujo. Los pacientes con EM presentaron una mayor frecuencia de linfocitos T que expresan receptor de quimioquina CCR2 en la circulación, 15 % en comparación con aproximadamente 5 % en la sangre sana (Fig. 14a), sobre la base de los datos de citometría de flujo y la unión con anticuerpo anti-CCR2. Asimismo, los pacientes presentaron una mayor frecuencia de linfocitos T que expresan CCR6 b (Fig. 14b).

35

2. Prueba de unión a quimioquina

40 CCR2 se une a la quimioquina MCP-1 que interviene en el desplazamiento y la infiltración de células inflamatorias en varios tejidos. El ligando para CCR6 es MIP3a (CCL20) que puede intervenir en el desplazamiento de linfocitos T en el SNC. Ambos receptores son importantes en el proceso inflamatorio. De acuerdo con la expresión de CCR2 y CCR6, los linfocitos T unidos a MCP-1 biotinilada (bMCP-1) (Fig. 15a) y bMIP3a (Fig. 15b).

40

3. Empobrecimiento de células con matriz conjugada con quimioquina biotinilada

45

Se pudieron empobrecer eficientemente los linfocitos T que expresan CCR2 con matriz de Sepharose estreptavidina conjugada con bMCP-1 (Fig. 16a) y se pudieron empobrecer los linfocitos T que expresan CCR6 con matriz de Sepharose estreptavidina conjugada con bMIP3a (Fig. 16b).

50 Los autores de la invención concluyen que en EM se potencia la frecuencia de linfocitos T que expresan CCR2 y CCR6. Estos linfocitos T pueden unirse a los ligandos MCP-1 y MIP3a. Asimismo, es posible separar la mayor parte de los linfocitos T que expresan CCR2 y CCR6 con matriz de Sepharose estreptavidina conjugada con la quimioquina biotinilada correspondiente.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ITH Immune Therapy Holdings AB

<120> TRATAR ESCLEROSIS MÚLTIPLE

60

<130> P117759WO00

<160> 31

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Síntesis de péptido

15 <400> 1

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

20 <210> 2

<211> 76

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Síntesis de péptido

<220>

<221> X

<222> (64)..(64)

30 <223> X = Met o Nleu

<400> 2

ES 2 664 836 T3

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 Xaa
 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> Síntesis de péptido

<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

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

<220>
 <223> Síntesis de péptido

<400> 4

ES 2 664 836 T3

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

5 <210> 5
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Síntesis de péptido
 <400> 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

15 <210> 6
 <211> 76

ES 2 664 836 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Síntesis de péptido

<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

10 <210> 7
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Síntesis de péptido

<400> 7

20 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

25 <210> 8
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 664 836 T3

<223> Síntesis de péptido
 <220>
 <221> X
 5 <222> (1)..(1)
 <223> X = pyroGlu
 <400> 8

 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
 10

 <210> 9
 <211> 76
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Síntesis de péptido
 20 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = pyroGlu
 25 <220>
 <221> X
 <222> (75)..(75)
 <223> X es K(ivDde)
 30 <400> 9

ES 2 664 836 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> 10
- <211> 76
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Síntesis de péptido
- 15 <220>
- <221> X
- <222> (1)..(1)
- <223> X = pyroGlu
- 20 <220>
- <221> X
- <222> (75)..(75)
- <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina)
- <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 Xaa Thr
 65 70 75

- 25 <210> 11
- <211> 76

ES 2 664 836 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

<210> 13
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Síntesis de péptido

<220>
<221> X
<222> (1)..(1)
<223> X = pyroGlu

<220>
<221> X
<222> (75)..(75)

<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotinilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina)

<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 Xaa Pro
65 70 75

<210> 14
<211> 74

ES 2 664 836 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Síntesis de péptido

10 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotinilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina)

15 <400> 14

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

20 <210> 15
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Síntesis de péptido

30 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es K(ivDde)

<400> 15

ES 2 664 836 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 16
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Síntesis de péptido

15 <220>
 <221> X
 <222> (73)..(73)
 <223> X es K(PEG-Biotina)

<400> 16

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

20 <210> 17
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Síntesis de péptido

<400> 17

ES 2 664 836 T3

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

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

10 <220>
<223> Síntesis de péptido

15 <220>
<221> X
<222> (67)..(67)
<223> X es K(ivDde)

<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

20 <210> 19
<211> 68
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Síntesis de péptido

<220>

ES 2 664 836 T3

<221> X

<222> (67)..(67)

<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotinilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina)

5

<400> 19

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

10

<210> 20

<211> 70

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Síntesis de péptido

<400> 20

20

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys
35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
50 55 60

Lys Lys Val Lys Asn Met
65 70

25

<210> 21

<211> 70

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Síntesis de péptido

<220>

<221> X

5

<222> (68)..(68)

<223> X es K(ivDde)

<400> 21

10

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys
35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
50 55 60

Lys Lys Val Xaa Asn Met
65 70

<210> 22

<211> 70

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Síntesis de péptido

20

<220>

<221> X

<222> (68)..(68)

25

<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotinilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina)

<400> 22

ES 2 664 836 T3

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys
35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
50 55 60

Lys Lys Val Xaa Asn Met
65 70

5 <210> 23
<211> 74
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Síntesis de péptido

15 <220>
<221> X
<222> (1)..(1)
<223> X = pyroGlu o Gln

20 <220>
<221> X
<222> (64)..(64)
<223> X = Norleucina

<400> 23

Xaa Gly Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Ala Tyr His Tyr Pro Ile Gly
1 5 10 15

Trp Ala Val Leu Arg Arg Ala Trp Thr Tyr Arg Ile Gln Glu Val Ser
20 25 30

Gly Ser Cys Asn Leu Pro Ala Ala Ile Phe Tyr Leu Pro Lys Arg His
35 40 45

Arg Lys Val Cys Gly Asn Pro Lys Ser Arg Glu Val Gln Arg Ala Xaa
50 55 60

Lys Leu Leu Asp Ala Arg Asn Lys Val Phe
65 70

25 <210> 24
<211> 74
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 25

Xaa Gly Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Ala Tyr His Tyr Pro Ile Gly
1 5 10 15

Trp Ala Val Leu Arg Arg Ala Trp Thr Tyr Arg Ile Gln Glu Val Ser
20 25 30

Gly Ser Cys Asn Leu Pro Ala Ala Ile Phe Tyr Leu Pro Lys Arg His
35 40 45

Arg Lys Val Cys Gly Asn Pro Lys Ser Arg Glu Val Gln Arg Ala Xaa
50 55 60

Lys Leu Leu Asp Ala Arg Asn Xaa Val Phe
65 70

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

10 <220>
<223> Síntesis de péptido

<400> 26

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

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

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

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

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe
65 70

15 <210> 27
<211> 74
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Síntesis de péptido

25 <220>
<221> X
<222> (74)..(74)
<223> X es PEG-K(ivDde)

<400> 27

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

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

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

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

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe Xaa
 65 70

- 5 <210> 28
- <211> 74
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Síntesis de péptido
- 15 <220>
- <221> X
- <222> (74)..(74)
- <223> X = X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. K(PEG-Biotina) y puede estar fijada a través de una molécula espaciadora, p.ej., PEG-K(Biotina).

20 <400> 28

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

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

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

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

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe Xaa
 65 70

- 25 <210> 29
- <211> 77
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 664 836 T3

<220>
 <223> Síntesis de péptido

5 <400> 29

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

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

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

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

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

10 <210> 30
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Síntesis de péptido

<220>
 <221> X

20 <222> (77)..(77)
 <223> X es K(ivDde) opcionalmente fijado a través de un espaciador como PEG, p.ej., -PEG-K(ivDde)

25 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 30

ES 2 664 836 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 31
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Síntesis de péptido

15 <220>
 <221> X
 <222> (77)..(77)
 <223> X es un resto que puede estar biotinilado, como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y, opcionalmente, está biotinilado a través de una molécula espaciadora como PEG, p.ej. k(PEG-Biotina) y que puede estar fijado a través de una molécula espaciadora, p.ej., PEG-K(Biotina).

20 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <400> 31

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimioquina CCR2 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, 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 separando así las células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente, en donde el reactivo de unión es la quimioquina MCP-1/CCL2.
2. El reactivo de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
- (i) la esclerosis múltiple se selecciona entre esclerosis múltiple remitente-recidivante estable y activa, esclerosis múltiple progresiva primaria, progresiva secundaria y recidivante progresiva;
y/o
- (ii) las células que expresan CCR2 se seleccionan entre monocitos, linfocitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y basófilos, opcionalmente en donde:
- las células que expresan CCR2 son mocitos y linfocitos, opcionalmente linfocitos T;
y/o
- (iii) se selecciona el paciente para su tratamiento sobre la base de la detección de un aumento del nivel de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con una alta expresión de CCR2 en una muestra obtenida del paciente
y/o
- (iv) se aplica a la columna el 20-50 % de la sangre del paciente en un solo tratamiento.
3. Un método de selección de un tratamiento adecuado para esclerosis múltiple que comprende determinar:
- a) los niveles de una o más de las células que expresan receptor de quimioquina CCR2
b) niveles de expresión de CCR2; y/o
c) niveles de células con alta expresión de CCR2
- en una muestra obtenida de una persona, 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 mayores niveles de células que expresan CCR2 en comparación con el control, mayores niveles de expresión de CCR2 en comparación con el control o mayores niveles de células con alta expresión de CCR2 en comparación con un control tienen como resultado la selección de un tratamiento tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
4. El método de la reivindicación 3 en el que:
- (i) la esclerosis múltiple se selecciona entre esclerosis múltiple remitente-recidivante estable y activa; y/o
(ii) la muestra es una muestra de sangre periférica o una muestra de licor en las que las células comprenden linfocitos T que expresan CCR2.
5. El reactivo de unión para su uso de la reivindicación 1, en el que el reactivo de unión es una quimioquina MCP-1 modificada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en las que se han realizado una o más de las siguientes modificaciones:
- a) un resto glutamina en la posición 1 de SEQ ID NO: 2 ha sido reemplazado por piroglutamina
b) se produce el extremo C como un derivado amida
c) el resto lisina 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 estar reemplazado por un aminoácido alternativo adecuado, tal como ácido diaminopropiónico u ornitina, está biotinilado, opcionalmente a través de un grupo espaciador, para permitir la inmovilización de la quimioquina en un soporte sólido
d) el resto 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 ha sido reemplazado por norleucina; opcionalmente en donde:
- (i) el resto lisina 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 está biotinilado a través de un grupo espaciador de polietilén glicol (PEG), para permitir la inmovilización de la quimioquina en un soporte sólido, opcionalmente, en donde el espaciador PEG es ácido 3,6-dioxo amino-octanoico;
y/o
- (ii) la quimioquina MCP-1 modificada tiene la estructura que se muestra en una cualquiera de las Figuras 7 a 9;
y/o
- (iii) la quimioquina MCP-1 modificada es un agonista o un antagonista de la actividad de CCR2.

ES 2 664 836 T3

6. El reactivo de unión para su uso de la reivindicación 1, en donde el reactivo de unión es una quimioquina CCL2 modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 8, opcionalmente en donde:

- 5 (i) el resto en la posición 75 está biotinilado, opcionalmente a través de un grupo espaciador, para permitir la inmovilización de la quimioquina en un soporte sólido, opcionalmente, en donde el grupo espaciador es un grupo espaciador de polietilen glicol (PEG) y, opcionalmente, en donde el espaciador PEG es ácido 3,6-dioxo aminooctanoico;
- y/o
- 10 (ii) la quimioquina CCL2 modificada es un agonista o un antagonista de la actividad de CCR2.

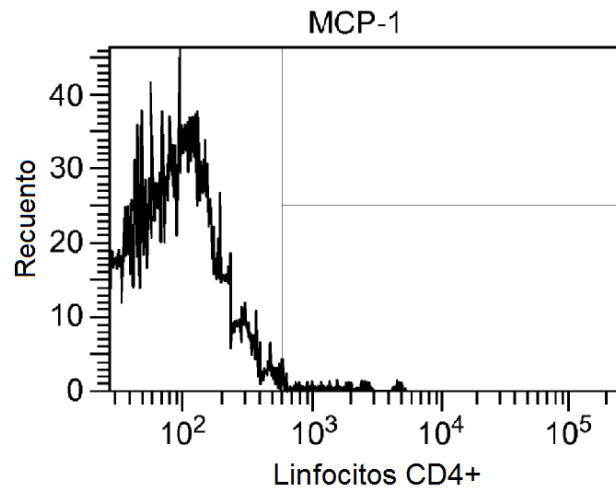


FIG. 1a

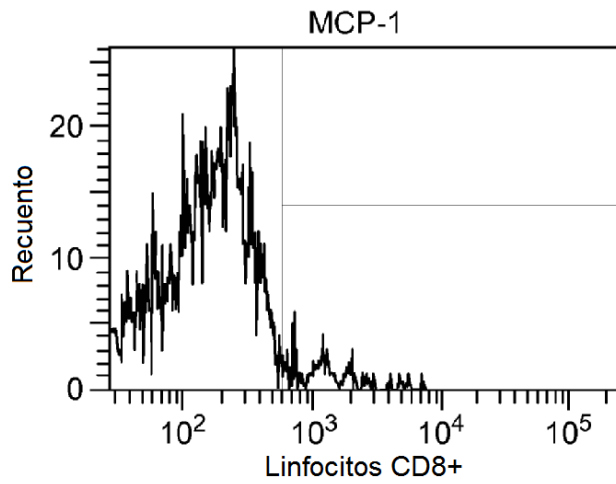


FIG. 1b

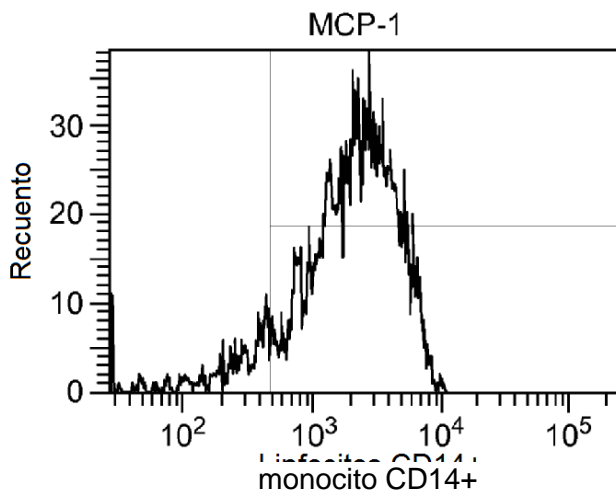


FIG. 1c

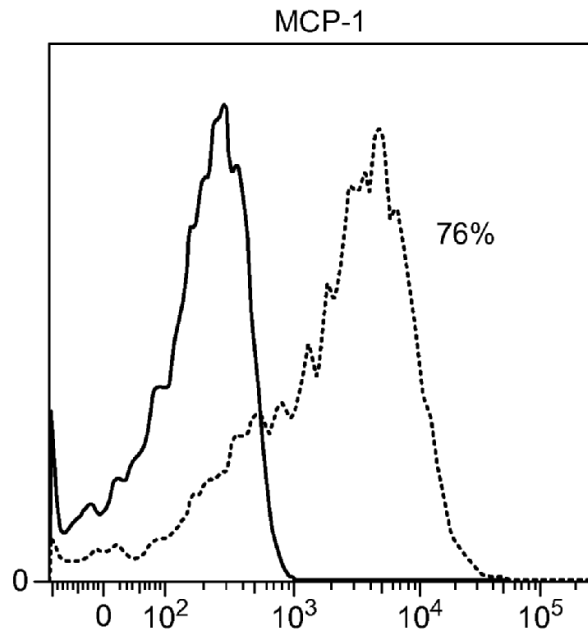


FIG. 2a

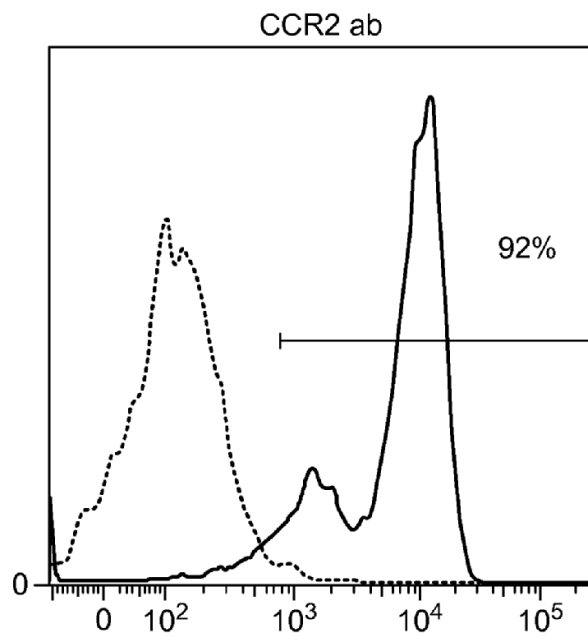


FIG. 2b

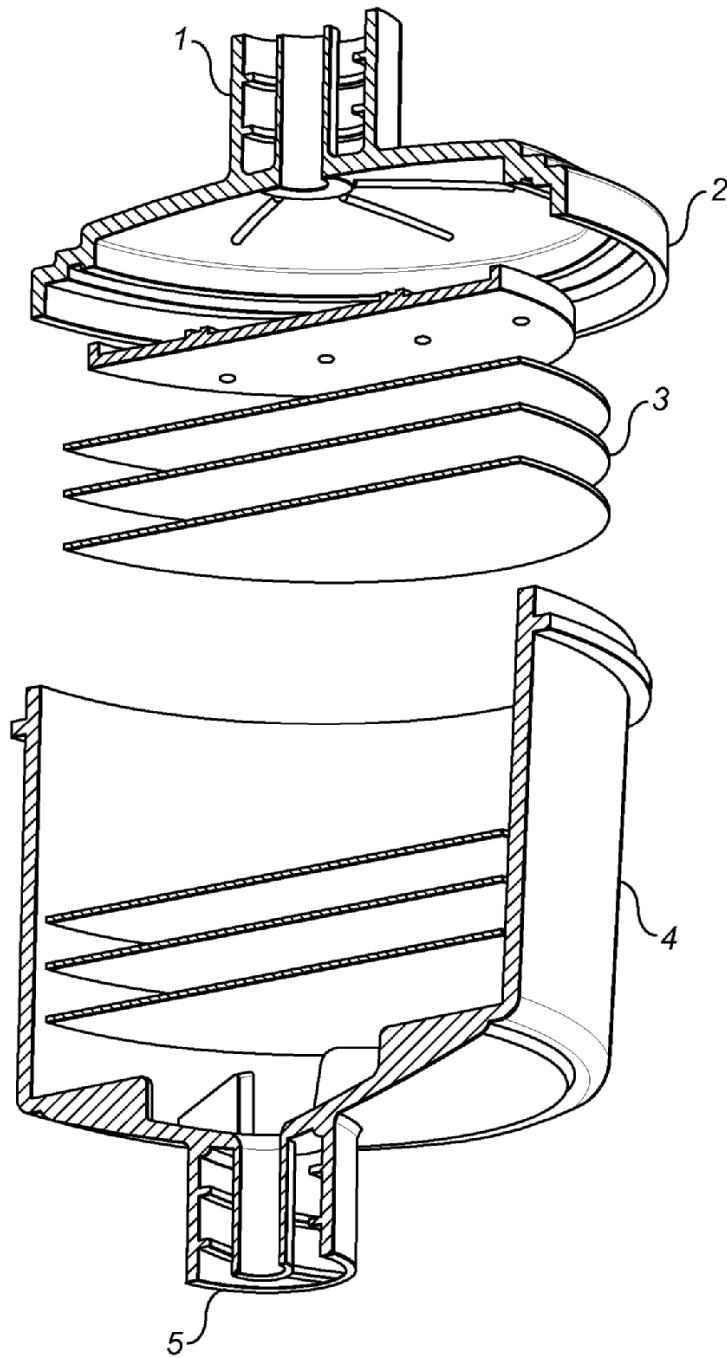


FIG. 3

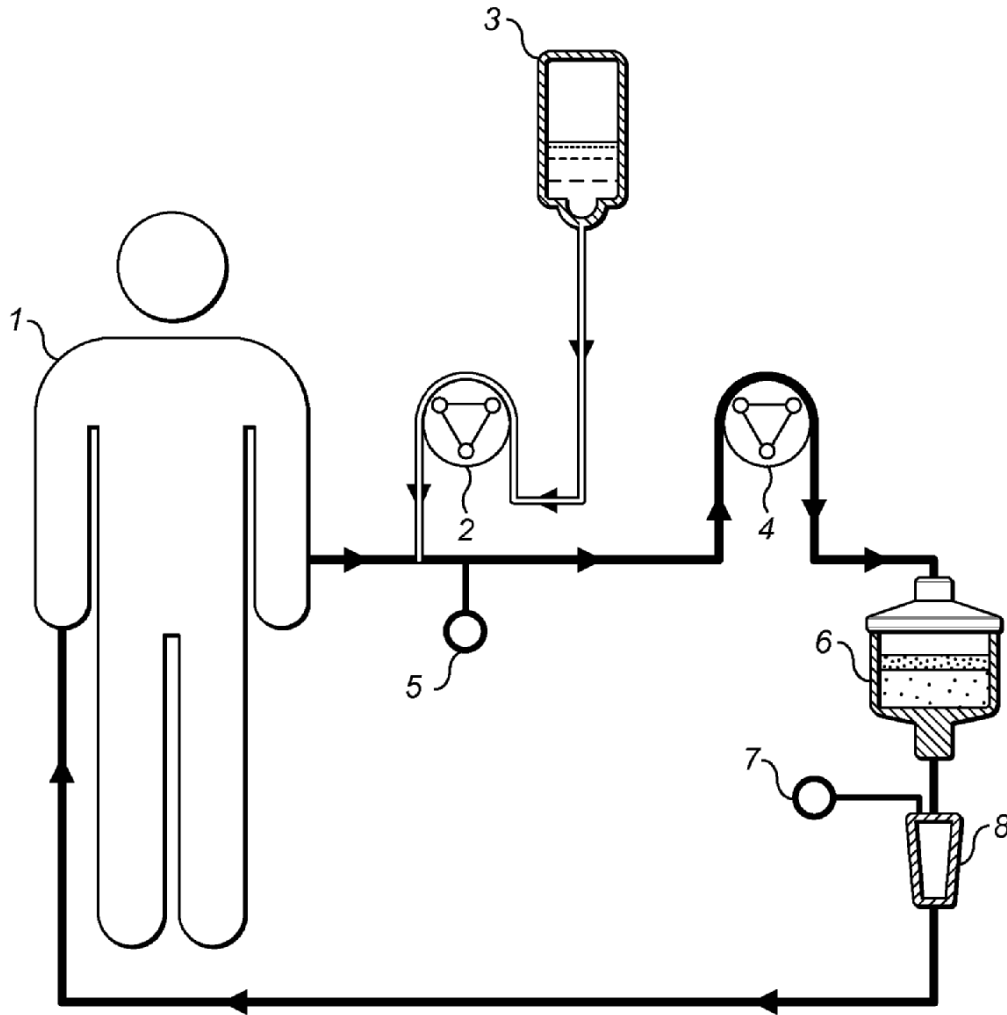


FIG. 4

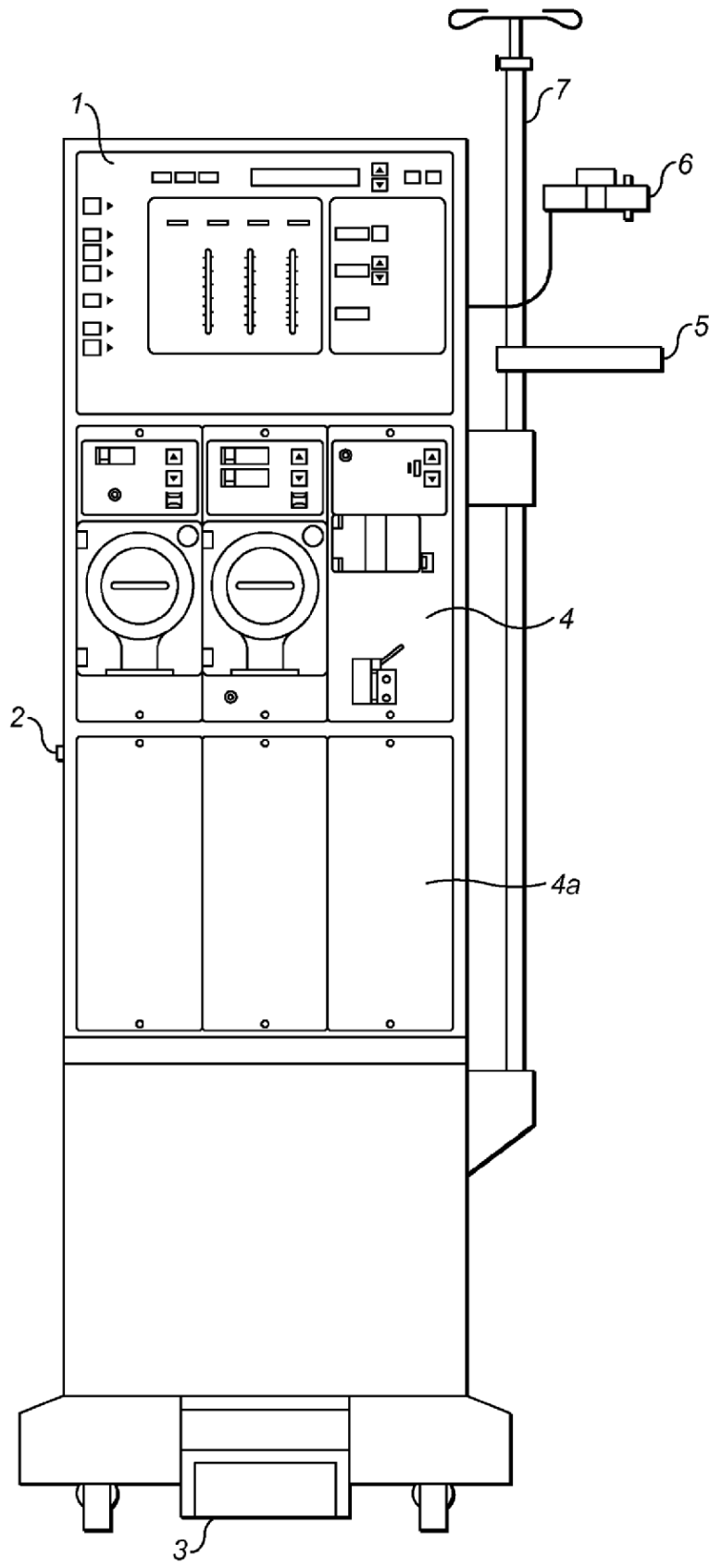


FIG. 5

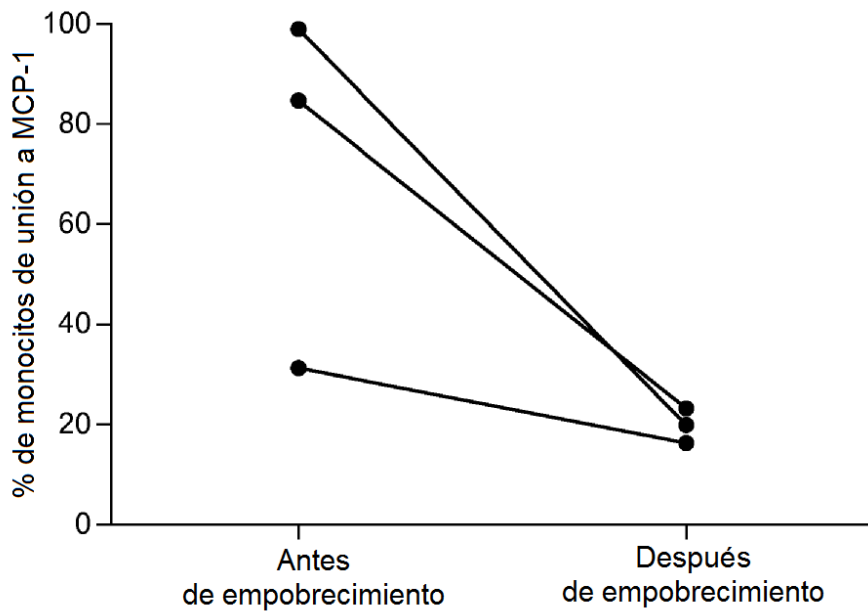


FIG. 6a

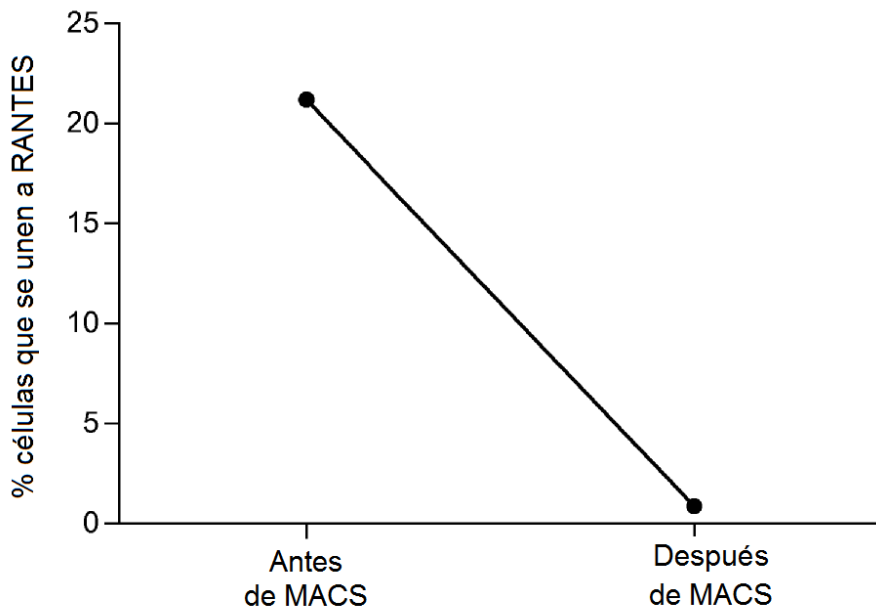


FIG. 6b

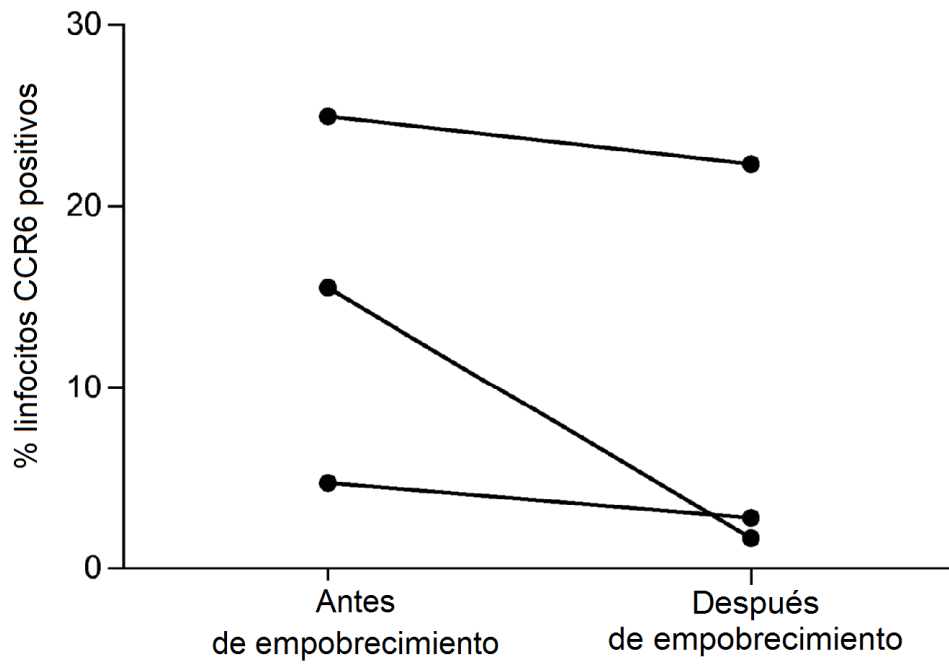


FIG. 6c

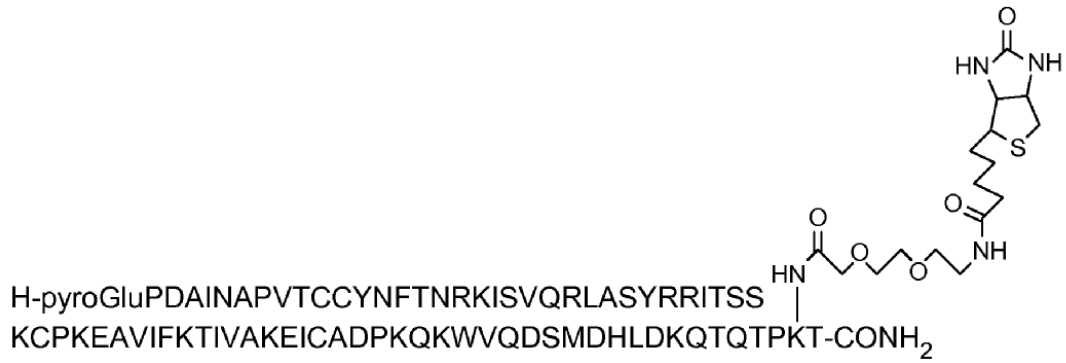


FIG. 7

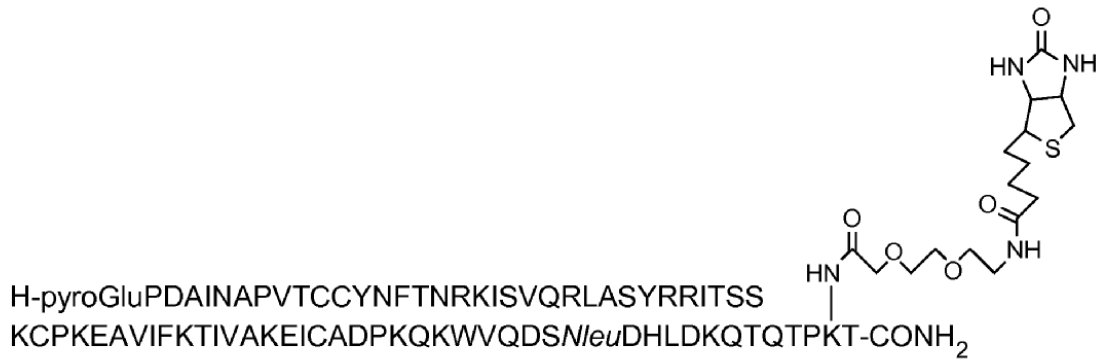


FIG. 8

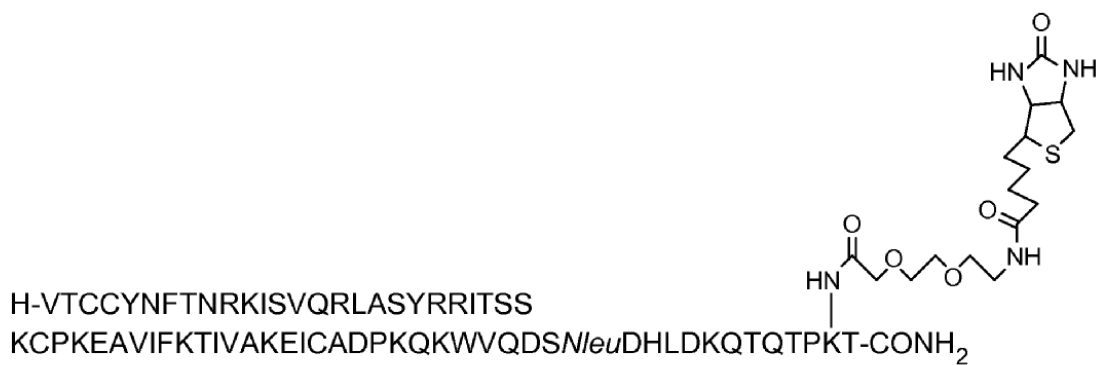


FIG. 9

```

ulimit -t 30; /usr/molbio/bin/lalign -f -14 -g -4 -K 3 ./wwtmp/.11134.1.seq
./wwtmp/.11134.2.seq > ./wwtmp/.11134.out LALIGN finds the best local
alignments between two sequences version 2.1u09 December 2006 Please cite: X.
Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 alignments < E(
0.05):score: 38 (3 max)
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
uso de archivo de matriz: BL50 (15/-5),hueco-abierto/ext:-14/-4 E(límite)
0,05

68,1% identidad en superposición 72 aa (2-73:2-73);Puntuación:370 E(10000):
1.6e-31

      10      20      30      40      50      60
MCP1  PDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQ
      .....: .....: ...: .....: .....: .....: .....: .....:
MCP-5  PDAVSTPVTCCYNVVKQKIHVRKLSYRRITSSQCPREAVIFRTILDKEICADPKEKWVK
      10      20      30      40      50      60

      70
MCP1  DSMDHLDKQTQTPKT
      .....: ...:
MCP-5  NSINHLDKTSQTFILEPSCLG
      70

```

FIG. 10

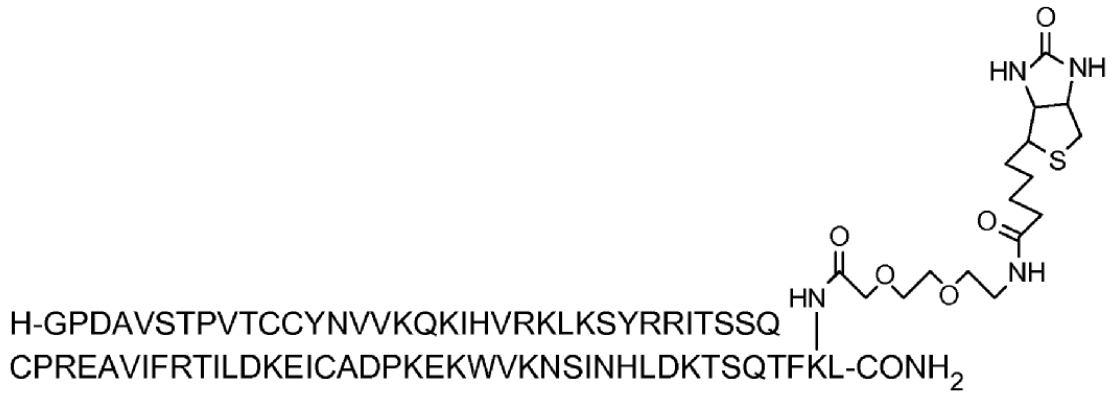


FIG. 11

H₂N-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNP
AVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEKS-CO₂H

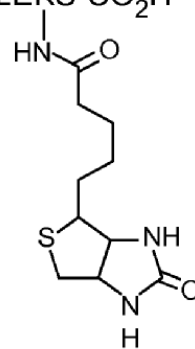


FIG. 12

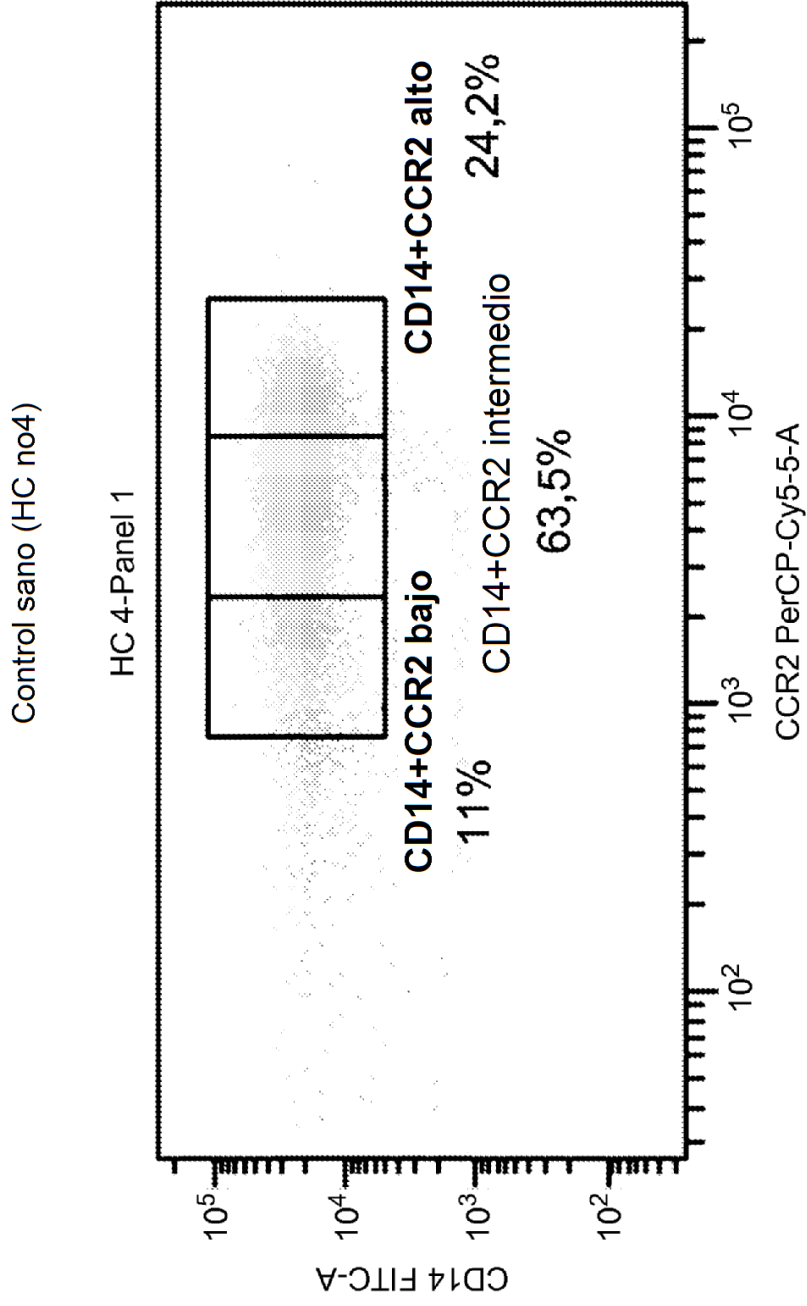


FIG. 13

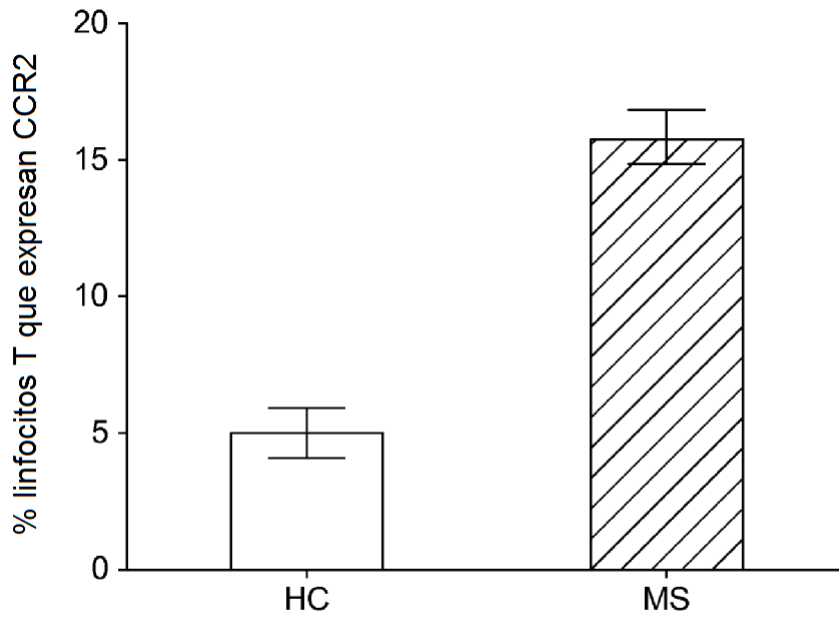


FIG. 14a

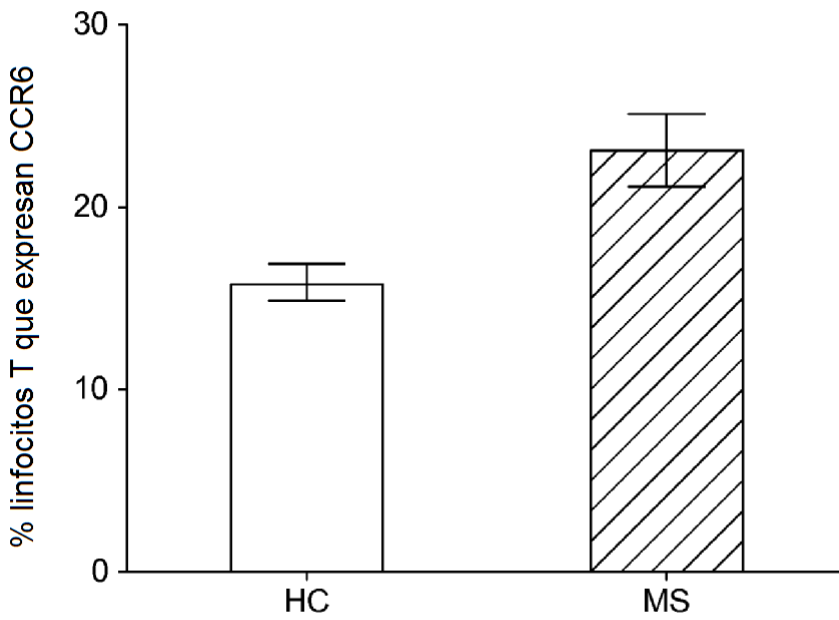


FIG. 14b

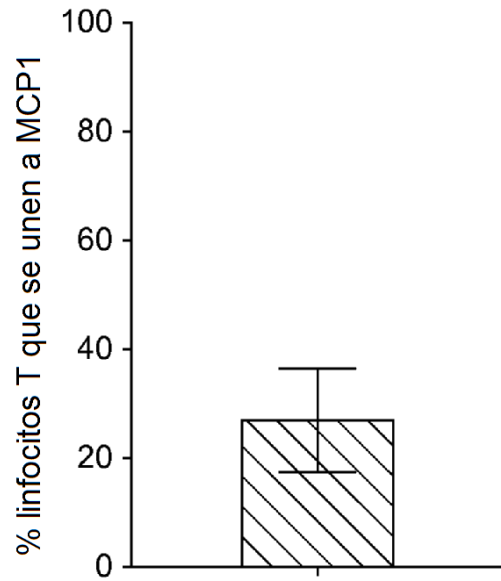


FIG. 15a

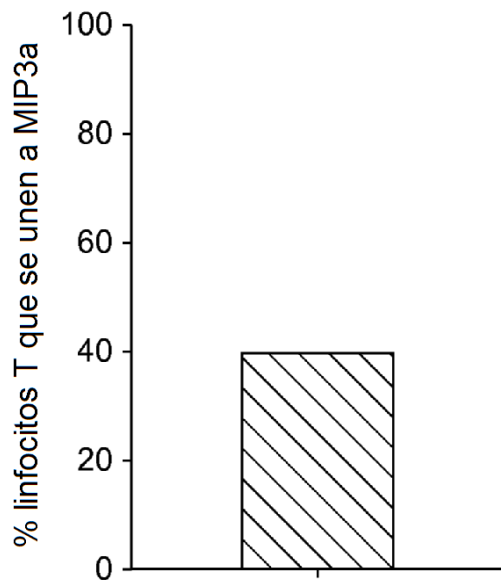


FIG. 15b

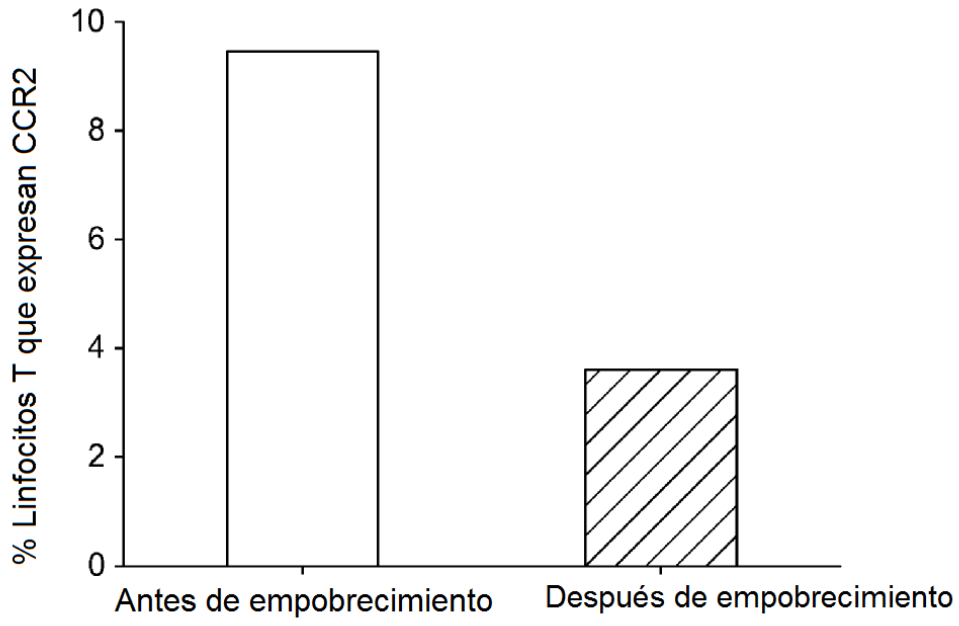


FIG. 16a

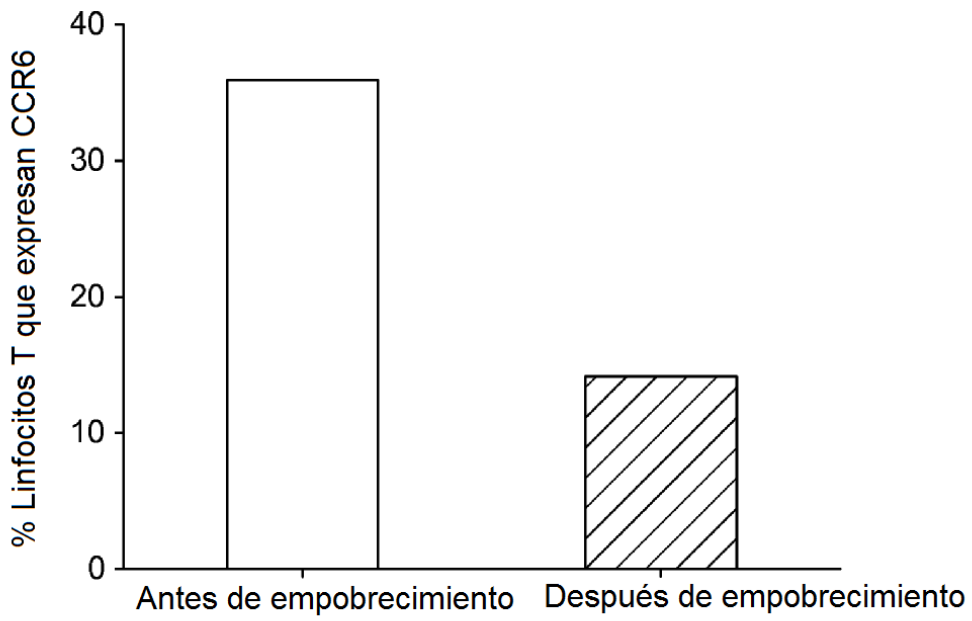


FIG. 16b