

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 081**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/GB2012/051354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12727919 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2718312**

54 Título: **Tratamiento de dolencias asociadas a septicemia**

30 Prioridad:

13.06.2011 US 201161496352 P

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

30.10.2018

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 2 688 081 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 dolencias asociadas a septicemia

5 **Campo de la invención**

Las diversas realizaciones de la presente invención se refieren a productos y métodos admisibles para el tratamiento de dolencias inflamatorias, tales como septicemia y síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) (incluyendo septicemia asociada a RDS).

10

Antecedentes de la invención

La septicemia es una grave dolencia clínica en la que el cuerpo experimenta una respuesta inflamatoria sistémica a una infección conocida o sospechosa. La septicemia produce una enfermedad grave que puede conducir a un fallo orgánico múltiple y a la muerte.

15

La septicemia se produce normalmente como resultado de la respuesta fisiológica anómala del cuerpo a una infección transmitida por la sangre. En particular, una cascada de actividad inmunológica que implica una activación rápida de neutrófilos y macrófagos, una regulación en exceso de moléculas coestimuladoras de linfocitos y una apoptosis de linfocitos rápida, contribuyen significativamente a la patogénesis de esta dolencia. La liberación sistémica de citoquinas, tales como TNF- α , produce también una desregulación del sistema de coagulación y el colapso asociado de los vasos sanguíneos. Al mismo tiempo, la activación diseminada de rutas inmunológicas, tales como la cascada del complemento, conduce a un amplio daño en tejidos y órganos. Un ejemplo específico de disfunción orgánica final es un síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS). ARDS se caracteriza por inflamación del parénquima pulmonar que conduce a una alteración en el intercambio de gases con liberación sistémica simultánea de mediadores inflamatorios que producen inflamación, hipoxemia que da con frecuencia fallo orgánico múltiple.

20

25

La incidencia de septicemia continúa aumentando a lo largo del mundo, además, la tasa de mortalidad para esta dolencia sigue siendo relativamente alta en entre 20-40 %. El conocimiento mejorado de esta dolencia compleja está facilitando el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento; sin embargo, las opciones de mejoras en el tratamiento tienen todavía una alta demanda.

30

La aféresis es un tratamiento utilizado para el agotamiento de los componentes de la sangre, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. Leucaféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para la eliminación de glóbulos blancos de la sangre, los leucocitos. El paciente se conecta a un sistema de circulación de sangre extracorpórea; la sangre se extrae de una vena de un brazo, se hace pasar a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. El documento WO2010/029317 describe columnas de aféresis útiles para tratar dolencias inflamatorias que incluyen una quimioquina inmovilizada sobre un soporte sólido.

35

40

Cummings, C, J., et al., J. Immun. Am. Assoc. Immunologists, 1999, 162(4), pp. 2341-2346, se refiere a un estudio en CXCR1 y CXCR2 y su expresión en dolencias que se refieren a septicemia, en el que se concluye que CXCR1 sigue estando regulado en exceso en pacientes con septicemia.

45

Dunican, A., et al., J. Surgic. Res., 2000, 90(1), pp. 32-38, se refiere a un estudio que concluye que IL-8 y Gro- α suprimen la apoptosis de PMN y se menciona adicionalmente que ambas quimioquinas son selectivas para, entre otros, CXCR1.

50

El documento WO 2005/113534, se refiere a derivados heterocíclicos de 5 miembros de molécula pequeña como antagonistas de CXCR1.

Sumario de la invención

Las quimioquinas son una clase de moléculas de citoquinas implicadas en el reclutamiento y activación celulares en la inflamación. Las quimioquinas producen quimiotaxis y activación de diversas subpoblaciones de células en el sistema inmunitario. La actividad de las quimioquinas está mediada principalmente a través de una estrecha unión con sus receptores sobre la superficie de los leucocitos. En determinadas realizaciones, la presente invención se basa en la realización de que la interacción entre quimioquinas y células que expresan sus receptores puede explicarse para el tratamiento de las dolencias inflamatorias específicas asociadas a la septicemia. Los inventores han determinado que el aumento del direccionamiento en el reclutamiento de células que expresan los receptores específicos de las quimioquinas presenta una nueva estrategia terapéutica para tratar dichas dolencias. Además, En dichas dolencias, la expresión del receptor de la quimioquina en cada célula puede aumentarse de nuevo proporcionando una estrategia terapéutica para tratar dichas dolencias. se muestra en el presente documento que los pacientes que padecen de síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) presentan un aumento en los neutrófilos en circulación en comparación con los controles sanos. Los neutrófilos expresan receptores de quimioquinas

60

65

característicos incluyendo CXCR1. Esto proporciona una estrategia terapéutica que permite el tratamiento de esta dolencia, mediante la eliminación de las células que expresan CXCR1 utilizando un reactivo de unión adecuado.

5 Por consiguiente, la invención se refiere a un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de la quimioquina CXCR1 para su uso en el tratamiento de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS), en el que el reactivo de unión se inmoviliza sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis, a la cual se aplica sangre periférica procedente de un paciente eliminando por tanto las células que expresan CXCR1 de la sangre periférica del paciente.

10 Además, la invención se refiere también a un método de vigilar la progresión del tratamiento de acuerdo con la invención que comprende determinar

- a) los niveles de células que expresan el receptor de la quimioquina CXCR1
- b) los niveles de expresión de CXCR1; y/o
- 15 c) los niveles de células con una elevada expresión de CXCR1 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que:

(i) niveles elevados de células que expresan CXCR1, niveles elevados de expresión de CXCR1 o niveles elevados de células con elevada expresión de CXCR1 o niveles aumentados de células que expresan CXCR1 en comparación con el control, niveles aumentados de la expresión de CXCR1 en comparación con un control o niveles aumentados de células con elevada expresión de CXCR1 en comparación con un control indican la presencia o progresión de la septicemia;

20 (i) niveles disminuidos de células que expresan CXCR1, niveles de expresión de CXCR1 y/o niveles de células con elevada expresión de CXCR1 se correlacionan con un tratamiento con resultado positivo.

25 En el presente documento, se pretende que las referencias a "CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5" abarquen la selección de uno cualquiera o más de los receptores de quimioquinas relacionados. Además, la combinación de CCR2, CXCR1 y/o CXCR2 se contempla de forma explícita como un agrupamiento separado, para incluir uno cualquiera o más de CCR2, CXCR1 y CXCR2. El agrupamiento de CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5 incluye uno cualquiera o más, hasta todos, de CCR2, CXCR1, CXCR2 y CCR5.

30 Como se muestra en el presente documento, los reactivos de unión adecuados se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido tanto directa como indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células que expresan receptores de quimioquinas relevantes. Donde se observan niveles aumentados de expresión de receptores de quimioquinas, dichas células pueden eliminarse preferentemente de la sangre periférica utilizando las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Por tanto, los métodos de las diversas realizaciones de la invención pueden dirigirse preferentemente a células CXCR1^{hi} como se define en el presente documento, para la eliminación de la sangre periférica. Se puede determinar una "alta" expresión de acuerdo con los estándares de las técnicas de citometría de flujo. El nivel se mide con respecto a los niveles de expresión de los receptores de quimioquinas en células tomadas de un sujeto sano. La figura 12 adjunta proporciona un ejemplo de estrategia de clasificación.

45 En otras realizaciones, la invención proporciona además un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de la quimioquina CXCR1 para su uso en el tratamiento de la septicemia, en el que uno o más reactivos de unión se inmovilizan, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis, a la cual se aplica sangre periférica procedente de un paciente eliminando por tanto las células que expresan CXCR1 de la sangre periférica del paciente. En determinadas realizaciones la invención proporciona también el uso de uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente al receptor de la quimioquina CXCR1 para su uso en la fabricación de una columna de aféresis para el tratamiento de la septicemia, en el que el uno o más reactivos de unión se inmovilizan sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis, a la cual se aplica sangre periférica procedente de un paciente eliminando por tanto las células que expresan CXCR1 de la sangre periférica del paciente.

55 En determinadas realizaciones, la invención proporciona además un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CXCR1 para su uso en el tratamiento del RDS, en el que el uno o más reactivos de unión se inmovilizan sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis, a la cual se aplica sangre periférica procedente de un paciente eliminando por tanto las células que expresan CXCR1 de la sangre periférica del paciente. La invención proporciona también el uso de uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con el receptor de la quimioquina CXCR1 para su uso en la fabricación de una columna de aféresis para el tratamiento del RDS, en el que el uno o más reactivos de unión se inmovilizan sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis, a la cual se aplica sangre periférica de un paciente eliminando las células que expresan CXCR1^o de la sangre periférica del paciente. El paciente es normalmente un paciente humano, pero el término paciente puede incluir sujetos humanos y sujetos animales no humanos en algunas realizaciones. En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, esto implica normalmente una reducción en las células que expresan CXCR1, tal como las células que expresan CXCR1^{hi}, en la sangre periférica del paciente. Las células que expresan CXCR1 comprenden, consisten esencialmente o consisten en monocitos, macrófagos y/o linfocitos, en particular, linfocitos T, o neutrófilos en determinadas realizaciones. Los monocitos se producen en la

médula ósea a partir de precursores de hemocitoblastos denominados monoblastos. Los monocitos pueden diferenciarse en macrófagos o células dendríticas. Los monocitos y su progenie de macrófagos y células dendríticas sirven a numerosas funciones en el sistema inmunitario incluyendo la fagocitosis, la presentación de antígenos y la producción de citoquinas. Los monocitos pueden caracterizarse con referencia a la expresión del marcador superficial celular CD14, opcionalmente junto con CD16. Los monocitos clásicos pueden caracterizarse por el alto nivel de expresión del receptor CD14 superficial celular (monocito CD14⁺⁺ CD16). Los monocitos no clásicos pueden caracterizarse por el bajo nivel de expresión de CD14 y con la coexpresión adicional del receptor CD16 (monocito CD14⁺CD16⁺⁺). Los monocitos intermedios pueden caracterizarse por el alto nivel de expresión de CD14 y el bajo nivel de expresión de CD16 (monocitos CD14⁺⁺CD16⁺). Los macrófagos se derivan de los monocitos y son responsables de proteger los tejidos de sustancias extrañas. son células que poseen un gran núcleo liso, un gran área de citoplasma y vesículas internas para procesar el material extraño. El término "macrófago" puede referirse a una célula derivada de monocito que expresa uno o más de los marcadores CD14, CD11b, Lisozima M, MAC-1/MAC-3 y CD68 superficiales celulares. El término macrófago incluye macrófagos activados y sin activar. Los macrófagos activados pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de CD69, ENG, FCER2 y IL2RA, HLA-DR, CD86. Los macrófagos sin activar no han recibido todavía señales de activación a través, por ejemplo, de los receptores TLR y, por tanto, expresan menos marcadores de activación sobre la superficie celular que se correlacionan con una menor maduración. Los macrófagos M1 pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de CD16⁺CD32⁺CD64⁺ y secretan principalmente IL-23 e IL-1, TNF, IL-6 y altos niveles de IL-12 y adicionalmente, moléculas efectoras tales como iNOS y ROI. Los macrófagos M1 tienen características citotóxicas al contrario que los macrófagos M2. Los macrófagos M2 pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de SRA/B⁺CD163⁺MR⁺CD14⁺ y expresan TGFβ, IL-10 e IL-1Ra. Los macrófagos asociados a tumor (TAM) comparten muchas características con los macrófagos M2 y se consideran como macrófagos M2 polarizados. El paradigma M1/M2 puede también encontrarse en subconjuntos de monocitos donde los monocitos CD14⁺CD16⁻CXC3R1^{low} se consideran el subconjunto "inflamatorio" y los monocitos CD14^{low}CD16⁺CXC3R1^{high} son monocitos "residentes".

Los tres tipos principales de linfocitos son los linfocitos T, linfocitos B, y linfocitos citolíticos naturales (NK). La expresión "linfocito T" incluye linfocitos T CD4⁺ T tales como linfocitos T auxiliares (linfocitos Th1 y linfocitos Th2), y linfocitos T CD8⁺ T tales como 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.

Los neutrófilos, conocidos también como granulocitos neutrófilos, pueden subdividirse en neutrófilos segmentados (o segs) y neutrófilos en bandas (o bandas). Los neutrófilos forman parte de la familia de células polimorfonucleares (PMN) junto con basófilos y eosinófilos. Los neutrófilos se tiñen de un rosa neutro en las preparaciones histológicas o citológicas con hematoxilina y eosina (HyE). Los neutrófilos contienen normalmente un núcleo dividido en 2-5 lóbulos.

Los neutrófilos son uno de los primeros respondedores de las células inflamatorias en migrar hacia el sitio de la inflamación. Los granulocitos neutrófilos tienen un diámetro promedio de 12-15 micrómetros (μm) en los frotis de sangre periférica. Cuando se analiza una suspensión de neutrófilos puros en un contador de células automatizado, los neutrófilos tienen un diámetro promedio de 8-9 μm.

Además de reclutar y activar otras células del sistema inmunitario, los neutrófilos juegan un papel clave en la defensa de primera línea frente a los patógenos invasores. Los neutrófilos tienen tres estrategias para atacar directamente los microorganismos: la fagocitosis (ingestión), la liberación de antimicrobianos solubles (incluyendo proteínas granulares) y la generación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Kinshult et al., (Clin Exp Allergy. Agosto de 2003;33(8):1141-6) investigaron la expresión de los marcadores superficiales de activación sobre neutrófilos, reflejando la activación durante su reclutamiento en la nariz, y para observar si el proceso inflamatorio durante la rinitis alérgica influencia este proceso. Se observó un aumento marcado en la expresión de CD11b, CD66b y CD63 en la superficie celular de los neutrófilos tras la migración desde el torrente sanguíneo a la superficie de la mucosa nasal. La expresión de CD11b se redujo en neutrófilos que permanecían en la circulación. Además, se redujo el nivel de L-selectina en los neutrófilos derivados de la sangre durante la inflamación alérgica.

CXCR1 expresado en estas células anteriormente mencionadas se une a las quimioquinas tal como la proteína-1 quimioattractora de monocitos (MCP-1) o CXCL8. MCP-1 es un quimioattractor principal de monocitos y linfocitos T con memoria por medio de su unión a su receptor superficial celular específico, receptor-2 de la quimioquina CC. CXCL8 se une a CXCR1. CXCR1 se une a IL-8 (CXCL8).

CXCR1 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 1 de la quimioquina (motivo C-X-C). La ID HGNC para este gen es 6026. El gen se localiza en la posición 2q35 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es CMKAR1, IL8RA, "receptor de interleucina 8, alfa". Los sinónimos para este gen incluyen CD181, CDw128a, CKR-1. La secuencia de referencia del Genbank para CXCR1 es U11870.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

El tratamiento establecido por la presente invención puede dar como resultado el alivio o la mejora de los síntomas, prevención de la progresión, regresión de la dolencia, o recuperación completa. Los parámetros medibles del

tratamiento satisfactorio incluyen uno o más, hasta todos, de la mejora en los signos vitales incluyendo pO₂, respiración, hallazgos mediante rayos X, CRP, niveles de ESR y disminución de la temperatura y la evidencia de aclaramiento de bacterias en los cultivos sanguíneos. En realizaciones específicas, un único tratamiento es suficiente para producir un agotamiento de alrededor del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o incluso hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores ente e incluyendo estas cantidades, de células que expresan CXCR1 procedentes de la sangre periférica del paciente. Por ejemplo, se consigue al menos alrededor de un 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por tanto, el tratamiento satisfactorio puede definirse con referencia al agotamiento de las células que expresan CXCR1. El tratamiento puede conducir al agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan CXCR1, tales como monocitos o neutrófilos, y más concretamente, aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 millones de células que expresan CXCR1. El tratamiento puede conducir al agotamiento de neutrófilos que expresan CXCR1.

Uniendo la columna a través de la interacción reactivo de unión-receptor de la quimioquina, se inmovilizan las células que expresan el receptor de la quimioquina. Estas células inmovilizadas expresan además receptores de la quimioquina sin ocupar, que pueden ser del mismo o diferente tipo a los utilizados para la captura. Estos receptores de quimioquina adicionales pueden permitir la circulación de las quimioquinas que contribuyen a la dolencia inflamatoria que se va a capturar a partir de la sangre periférica. Por tanto, una reducción en los niveles de quimioquinas en circulación puede producir una medida de un tratamiento satisfactorio. Por "unión específica" se entiende que el reactivo de unión presenta suficiente especificidad de unión y afinidad de unión/cinética adecuadas para permitir la eliminación de células que expresan CXCR1 de la sangre periférica. El reactivo de unión se unirá preferentemente a células que expresan CXCR1 y en particular a células que expresan niveles aumentados de CXCR1 (como se define adicionalmente en el presente documento). El reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CXCR1 puede ser tanto un agonista como un antagonista de CXCR1. Como la enfermedad depende de la regulación positiva de la expresión o de la señalización mediante CXCR1, en determinadas realizaciones, el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CXCR1 es un antagonista de CXCR1. Las quimioquinas son normalmente, aunque no necesariamente de forma exclusiva (particularmente en el caso de formas truncadas o modificadas) agonistas de su receptor análogo, y sirven para activar las células que expresan el receptor relevante, como entenderán los expertos en la técnica. Los anticuerpos contra el receptor de la quimioquina relevante se considera generalmente que son antagonistas, como entenderán los expertos en la técnica. Los ejemplos específicos de reactivos de unión incluyen proteínas o polipéptidos, tales como anticuerpos y ligandos de receptores, en particular, quimioquinas. El reactivo de unión puede ser una molécula de ácido nucleico en determinadas realizaciones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un aptámero. Los aptámeros de ácidos nucleicos so polinucleótidos de aproximadamente 15-40 nucleótidos de longitud. Los aptámeros de ácidos nucleicos pueden prepararse utilizando el proceso SELEX (evolución sistémica de ligando mediante enriquecimiento exponencial) o cualquier otro proceso conocido por los expertos en la materia.

En otras realizaciones, el reactivo de unión puede ser un péptido, y en determinados casos, un aptámero peptídico. Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento artificiales que consisten en una secuencia peptídica variable insertada en una proteína de estructura principal constante (Baines IC, Colas P. Peptide aptamers as guides for small molecule drug discovery. *Drug Discov Today*. 2006; 11:334-341). Numerosas metodologías, tales como la expresión en fagos, la expresión en ribosomas y los sistemas de cribado de doble híbrido en levaduras están disponibles para cribar una biblioteca de agentes de unión potenciales basados en péptidos. De forma similar, las estructuras principales basadas en dominios tales como fibronectinas, repeticiones de anquirina, proteína A, dominios SH3, lipocalinas y ubiquitina se pueden usar como el agente de unión. De nuevo, numerosas tecnologías tales como la expresión en fagos y la expresión en ribosomas están disponibles para el cribado de una biblioteca de agentes de unión basados en proteínas. De manera similar, las bibliotecas de compuestos químicos candidatos se pueden cribar para la unión específica al receptor de la quimioquina relevante utilizando técnicas de cribado adecuadas conocidas en la materia, que pueden ser cribados de alto rendimiento en determinadas realizaciones. El agente de unión candidato puede inmovilizarse sobre un soporte sólido y determinarse la capacidad del agente de retener específicamente las células que expresan el receptor de la quimioquina de interés o los receptores de la quimioquina marcados. Puede aplicarse una gama de tipo de células a los soportes sólidos para confirmar la especificidad de la unión, o alternativamente, puede aplicarse una muestra mezclada (tal como sangre periférica) al soporte sólido. La retención del tipo de célula de interés (que expresa el receptor de la quimioquina adecuado) puede confirmarse para identificar los agentes de unión adecuados.

En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, el término "quimioquina" comprende también quimioquinas biotiniladas o quimioquinas marcadas de otra forma. El término "quimioquina" comprende también versiones modificadas y truncadas de la quimioquina y los fragmentos de quimioquina con la condición de que la forma modificada o truncada retenga su capacidad de unirse a su receptor análogo (y por tanto, siga siendo funcional en el contexto de las diversas realizaciones de la invención). La quimioquina no necesita necesariamente retener la actividad biológica como es la afinidad de unión específica que se requiere para CXCR1. En determinadas realizaciones, la quimioquina carece de actividad biológica, por ejemplo, en términos de activación del receptor CXCR1. Pueden hacerse modificaciones para mejorar la síntesis de proteínas, por ejemplo, la uniformidad del producto y el rendimiento. como conocen los expertos en la materia, las modificaciones ilustrativas pueden comprender adiciones, sustituciones, deleciones u otras modificaciones de aminoácidos en uno o más aminoácidos en la quimioquina. Las modificaciones pueden comprender la sustitución del aminoácido natural con aminoácidos no

naturales tales como norleucina (NLeu) y aminoácidos derivatizados tales como ácido piroglutámico (pyroGlu). Dichas modificaciones pueden realizarse para minimizar la formación de productos secundarios durante el almacenamiento y el uso de las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Las modificaciones pueden realizarse para mejorar el marcado, por ejemplo, la inclusión de un separador de polietilenglicol (PEG) para facilitar la biotilación. La biotilación y/o la conjugación con fluorocromos u otros grupos marcados de la quimioquina se lleva a cabo de una manera que no afecta sustancialmente la capacidad de unión del receptor. La biotilación específica de sitio u otro marcado se prefiere como marcado no selectivo de las quimioquinas que puede comprometer la actividad de unión al receptor. se prefiere la biotilación u otro marcado en o hacia el extremo C de la proteína ya que los inventores han encontrado que las modificaciones en este área son generalmente bien toleradas (en términos de un efecto mínimo sobre la capacidad de unión del receptor). La biotilación puede llevarse a cabo específicamente en el sitio en cualquier aminoácido adecuado. Los ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen lisina, ácido diaminopropiónico y ornitina. En general, se pueden hacer referencias 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 delección tanto de los aminoácidos en el extremo N o C según sea adecuado, o ambos. Típicamente, la versión truncada retendrá los restos requeridos para que la quimioquina se pliegue correctamente, Por ejemplo, para retener una estructura plegada de la quimioquina, consistente con el requerimiento de que una versión truncada debe retener la capacidad de unirse al receptor relevante (expresado por (sobre la superficie de) un leucocito). Las moléculas de quimioquina incluyen normalmente enlaces disulfuro entre el 1º y 3º y 2º y 4º restos de cisteína, como entendería un experto en la materia. Cuando se presentan secuencias en el presente documento, se supone que estos enlaces disulfuro se formarán en la proteína plegada (salvo que se indique otra cosa).

Las versiones truncadas pueden comprender en cualquier sitio entre 1 y menos de 100 aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5 etc. aminoácidos, que la secuencia de aminoácidos natural en determinadas realizaciones. Por supuesto, las versiones truncadas pueden comprender una modificación adicional como se detalla en el presente documento. La versión modificada o truncada puede tener 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más identidad de secuencia de aminoácidos global con la quimioquina natural de longitud completa (cuando se cuenta una delección como una diferencia en la secuencia de aminoácidos) en determinadas realizaciones. Sobre la secuencia común entre las moléculas (es decir, los aminoácidos que no se han eliminado), puede haber un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos en determinadas realizaciones. Puede determinarse la identidad de la secuencia utilizando algoritmos conocidos, tales como el análisis BLAST o GAP (Programa GCG) (que aplica los escenarios por defecto), que están disponibles gratuitamente. Las quimioquinas pueden carecer de péptido señal en el extremo N que se elimina mediante escisión durante la síntesis *in vivo*.

Las quimioquinas específicas útiles en la presente invención para la unión a CXCR1 incluye CXCL8. CXCL8 es capaz de unirse a receptores de la quimioquina implicados en la septicemia y el RDS. Más específicamente, CXCL8 es útil para eliminar las células que expresan CXCR1 de la sangre de un paciente. Las quimioquinas descritas con mayor detalle en el presente documento (con referencia a las figuras y a las secuencias de aminoácidos relevantes, como se muestra en las SEQ ID NOS) pueden cada uno aplicarse de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención.

Las quimioquinas modificadas y truncadas descritas con mayor detalle en el presente documento (con referencia a las secuencias de aminoácidos relevantes, como se muestra en las SEQ ID NOS y en los ejemplos experimentales acompañantes) pueden cada uno aplicarse a la presente invención. dichas formas modificadas pueden instruir a la persona experta con respecto a las formas modificadas adicionales de las mismas y otras quimioquinas que pueden ser adecuadas para su uso en la invención. Las quimioquinas muestran una homología de secuencia variable que varía desde menos de l 20 % a alrededor del 90 %, pero todas comparten estructuras terciarias muy similares que consisten en un extremo N desordenado, seguido por un bucle largo (el bucle N) que termina en una hélice 3₁₀, una lámina β tricatenaria y una hélice en el extremo C. La topología en general se estabiliza mediante enlaces disulfuro. Esta estructura terciaria común es una característica de la familia de proteínas de las quimioquinas. (Fernandez EJ and Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 202, 42, 469-99; Allen SJ et al, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820).

Los truncamientos en esta región en el extremo N pueden mantener la unión al receptor, pero pueden conducir a un cambio o pérdida de función (por ejemplo Zhang YJ et al, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 15918, ; Gong J-H y Clark-Lewis I., *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 631-640; Fernandez EJ y Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 202, 42, 469-99; Allen SJ et al, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820,). Pueden realizarse también truncamientos en el extremo C de la quimioquina y mantener la actividad de unión del receptor (Treating Inflammatory Disorders, Ola Winqvist y Graham Cotton, documento WO2010/029317).

En otras realizaciones, se usan fragmentos y variantes de las quimioquinas en los dispositivos y métodos como se divulga en el presente documento. Más particularmente, dichos fragmentos y variantes retienen la capacidad de unirse específicamente a su receptor de la quimioquina análogo. Los expertos en la materia saben que las

quimioquinas comparten dominios de unión al receptor específicos, incluyendo un pliegue monomérico similar, caracterizado, por ejemplo, por un dominio en el extremo amino desordenado, seguido por una región nuclear conservada, que consiste en el denominado "bucle N", tres hebras β antiparalelas, y una hélice α en el extremo carboxilo. Sin desear quedar ligado por teoría alguna, se cree que la interacción del receptor quimioquina-quimioquina es una etapa en dos mecanismos, en la que el núcleo de la quimioquina interactúa en primer lugar con un sitio de unión formado por los dominios extracelulares del receptor, aunque se forma otra interacción entre el extremo N de la quimioquina y un segundo sitio de unión en el receptor a fin de estimular la activación del receptor. Por tanto, un "fragmento", tal como un fragmento funcional de una quimioquina, se pretende que signifique una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que retiene la unión para su receptor análogo. El fragmento puede incluir, por ejemplo, la región de pliegue monomérico, o partes de la misma tales como el dominio en el extremo amino, la región del núcleo conservada y/o el "bucle N", las hebras β antiparalelas, y/o la hélice α del extremo carboxilo o las combinaciones y partes de los mismos.

Además, se reconoce que un polinucleótido puede estar considerablemente mutado sin alterar materialmente una o más de las funciones del polipéptido, por ejemplo, sin alterar la unión específica y/o el pliegue de la proteína. Es bien sabido que el código genético degenera, y por tanto, diferentes codones codifican los mismos aminoácidos. Incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácidos, la mutación puede ser conservativa y no tiene impacto material sobre las funciones esenciales de una proteína (véase, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* 4^a Ed., W. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1995). Esto incluye, por ejemplo, la capacidad de la proteína de unirse e interactuar con otras proteínas, tal como la unión de la quimioquina truncada en su receptor análogo.

En algunos ejemplos, parte de una cadena polipeptídica puede eliminarse sin alterar o eliminar todas sus funciones. Por ejemplo, la delección de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo C y/o N, dichas 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 dar como resultado una quimioquina que retiene la función, tal como la unión específica de su receptor análogo. Dichos truncamientos pueden retener la función completa de una proteína completa, y/o pueden permitir retener funciones tales como las interacciones proteína-proteína como en el caso de las interacciones ligando-receptor. Las quimioquinas que tienen delecciones de un número pequeño de aminoácidos, por ejemplo, menos de aproximadamente el 20 %, /tal como menos de aproximadamente el 18 %, menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 8 %, menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 2 %, o menos de aproximadamente un 1 %) del número total de aminoácidos en la quimioquina natural pueden utilizarse en los métodos y dispositivos divulgados en el presente documento. Además, pueden realizarse, por ejemplo, inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, añadiendo etiquetas de epítopos, sin alterar o eliminar sus funciones (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc, y Wiley-Interscience, 1998). Otras modificaciones que se pueden realizar sin alterar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas y 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 más o 200 o más restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de la quimioquina.

En algunos ejemplos, la quimioquina o un fragmento funcional de la misma tiene un aminoácido que tiene al menos aproximadamente un 60 % o un 65 % de identidad de la secuencia, aproximadamente un 70 % o 75 % de identidad de la secuencia, aproximadamente un 80 % o 85 % de identidad de la secuencia, aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la secuencia sobre su longitud completa en comparación con una secuencia de referencia, tal como la detallada en el presente documento, utilizando por ejemplo el BLAST con huecos NCBI Blast 2.0 configurado con los parámetros por defecto. El alineamiento puede llevarse a cabo también manualmente mediante inspección. Se pueden realizar también una o más modificaciones de aminoácidos conservativos en la secuencia de aminoácidos de la quimioquina, ya sea una adición, delección o modificación, que no altera sustancialmente la estructura tridimensional del polipéptido o su capacidad de unirse al receptor análogo. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservativa no afecta la capacidad de la quimioquina de unirse específicamente a su receptor análogo. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Cada uno de los seis grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Los péptidos, tales como quimioquinas, y fragmentos de las mismas, pueden modificarse mediante varias técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad o función--, tal como la unión a un receptor análogo--como los péptidos sin modificar y que tienen, opcionalmente otras propiedades deseables. Por ejemplo, grupos de ácidos carboxílicos de la proteína, ya sea el extremo carboxilo o la cadena secundaria, pueden proporcionarse en la forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificarse para formar un éster C1-C16, o convertirse en una amida de fórmula NR1R2 en la que R1 y R2 son cada uno, de manera independiente, alquilo C1-c16 o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea el extremo amino o la cadena secundaria, pueden estar en la forma de una sal de adición

de ácido farmacéuticamente aceptable, tal como HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o puede modificarse en alquilo C1-C16 o dialquil amino o convertirse adicionalmente en una amida.

5 Los grupos hidroxilo de las cadenas secundarias peptídicas pueden convertirse en un alcoxi C1-C16 o en un éster C1-C16 utilizando técnicas bien reconocidas. Los anillos fenilo y fenólicos de las cadenas secundarias peptídicas pueden sustituirse con uno o más átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, o con alquilo C1-C16, alcoxi C1-C16, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. los grupos metileno de las cadenas secundarias peptídicas pueden extenderse a alquilenos C2-C4 homólogos. Los tioles pueden protegerse
10 con uno cualquiera de numerosos grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida. Los expertos en la materia reconocerán también los métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de esta divulgación para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que dan como resultado una estabilidad potenciada. Por ejemplo, se puede añadir una cisteína en el extremo C o N al péptido, de tal manera que cuando se oxida, el péptido contendrá un enlace disulfuro, generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclar
15 péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres en el extremo carboxilo y amino.

Las realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas están también comprendidas en el alcance de la presente divulgación, por lo cual, la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos peptidomiméticos y organomiméticos imita la disposición tridimensional de la estructura principal del péptido y el componente de las cadenas secundarias de aminoácidos, dando como resultado dichos peptidomiméticos y organomiméticos de las proteínas de esta divulgación. Para aplicaciones de modelización informática, un farmacóforo es una definición tridimensional idealizada de los requerimiento estructurales para la actividad biológica. Se pueden diseñar peptidomiméticos y organomiméticos para ajustar cada farmacóforo con el software de modelización informática actual (usando el diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman & Groves, eds., 1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, págs. 165 174 y Principles of Pharmacology Munson (ed.) 1995, Ch. 102, para las descripciones de las técnicas utilizadas en CADD. Se incluyen también en el alcance de la divulgación los miméticos preparados utilizando dichas técnicas.

30 Los aminoácidos en un péptido, polipéptido, o proteína se unen generalmente químicamente junto con enlaces amida (CONH). Adicionalmente, los aminoácidos se pueden encontrar junto otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂ -, -CH=CH-- (cis y trans), -COCH₂ --, -CH(OH)CH₂-, y -CHH₂SO- (Estos y otros se pueden encontrar en Spatola, en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (Marzo de 1983), Vol. 1, Fascículo 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci págs. 463-468, 1980; Hudson, et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185, 1979; Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249, 1986; Harm J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314, 1982; Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980; Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533, 1982; Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404, 1983; y Hruby Life Sci 31:189-199, 1982. Los fragmentos y variantes utilizados en los dispositivos divulgados y un método como se divulga en el presente documento son fragmentos y variantes que retienen la capacidad de unirse a su receptor de quimioquina. Las quimioquinas comparten un pliegue monomérico similar, caracterizado por un dominio en el extremo amino desordenado, seguido por una región nuclear conservada, que consiste en el denominado "bucle N", tres hebras β antiparalelas, y una hélice α en el extremo carboxilo. Sin desear quedar ligado por teoría alguna, Se cree que la interacción del receptor quimioquina-quimioquina es una etapa en dos mecanismos, en la que el núcleo de la quimioquina interactúa en primer lugar con un sitio de unión formado por los dominios extracelulares del receptor, aunque se forma otra interacción entre el extremo N de la quimioquina y un segundo sitio de unión en el receptor a fin de estimular la activación del receptor. Por tanto, un "fragmento", tal como un fragmento funcional de una quimioquina, se pretende que signifique una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que retiene la unión para su receptor análogo. El fragmento puede incluir, por ejemplo, la región de pliegue monomérico, o partes de la misma tales como el dominio en el extremo amino, la región del núcleo conservada y/o el "bucle N", las hebras β antiparalelas, y/o la hélice α del extremo carboxilo o las combinaciones de los mismos. Además, se reconoce que un polinucleótidos puede estar considerablemente mutado sin alterar materialmente una o más de las funciones del polipéptido, por ejemplo, sin alterar la unión específica y/o el pliegue de la proteína. Es bien sabido que el código genético degenera, y por tanto, diferentes codones codifican los mismos aminoácidos. Incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácidos, la mutación puede ser conservativa y no tiene impacto material sobre las funciones esenciales de una proteína (véase, por ejemplo, Stryer, Biochemistry 4^a Ed., W. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1995).

En algunos ejemplos, parte de una cadena polipeptídica puede eliminarse sin alterar o eliminar todas sus funciones, por ejemplo, la delección de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo C y/o N, dichas 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 dar como resultado una quimioquina que retiene la función, tal como la unión específica de su receptor análogo. Dichos truncamientos pueden retener la función total de una proteína completa. Las quimioquinas que tienen delecciones de un número pequeño de aminoácidos, por ejemplo, menos de aproximadamente el 20 %, /tal como menos de aproximadamente el 18 %, menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 8 %, menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 2 %, o menos de aproximadamente un 1 %) del número total de aminoácidos en la

- quimioquina natural pueden utilizarse en los métodos y dispositivos divulgados en el presente documento. Además, pueden realizarse, por ejemplo, inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, añadiendo etiquetas de epítomos, sin alterar o eliminar sus funciones (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc, y Wiley-Intersciences, 1998). Otras modificaciones que se pueden realizar sin alterar materialmente una o más
- 5 funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas in vivo o in vitro o la incorporación de aminoácidos inusuales. En algunos ejemplos, un fragmento funcional de una quimioquina puede consistir en 10 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, o 200 o más restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de la quimioquina.
- 10 En algunos ejemplos, la quimioquina o un fragmento funcional de la misma tiene un aminoácido que tiene al menos aproximadamente un 60 % o un 65 % de identidad de la secuencia, aproximadamente un 70 % o 75 % de identidad de la secuencia, aproximadamente un 80 % o 85 % de identidad de la secuencia, aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la secuencia sobre su longitud completa en comparación con una secuencia de referencia, tal como la detallada en el presente documento, utilizando por
- 15 ejemplo el BLAST con huecos NCBI Blast 2.0 configurado con los parámetros por defecto. El alineamiento puede llevarse a cabo también manualmente mediante inspección. Se pueden realizar también una o más modificaciones de aminoácidos conservativos en la secuencia de aminoácidos de la quimioquina, ya sea una adición, deleción o modificación, que no altera sustancialmente la estructura tridimensional del polipéptido. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservativa no afecta la capacidad de la quimioquina de unirse específicamente a su receptor
- 20 análogo. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Cada uno de los seis grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).
- 25 Los péptidos, tales como las quimioquinas, pueden modificarse mediante varias técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad como los péptidos sin modificar y que tienen, opcionalmente otras propiedades deseables. Por ejemplo, grupos de ácidos carboxílicos de la proteína, ya sea el extremo carboxilo o la cadena secundaria, pueden proporcionarse en la forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o
- 30 esterificarse para formar un éster C1-C16, o convertirse en una amida de fórmula NR₁R₂ en la que R₁ y R₂ son cada uno, de manera independiente, alquilo C1-c16 o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea el extremo amino o la cadena secundaria, pueden estar en la forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, tal como HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o puede modificarse en alquilo C1-C16 o dialquil amino o
- 35 convertirse adicionalmente en una amida.
- Los grupos hidroxilo de las cadenas secundarias peptídicas pueden convertirse en un alcoxi C1-C16 o en un éster C1-C16 utilizando técnicas bien reconocidas. Los anillos fenilo y fenólicos de las cadenas secundarias peptídicas pueden sustituirse con uno o más átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, o con alquilo C1-C16, alcoxi C1-C16, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas secundarias peptídicas pueden extenderse a alquilenos C2-C4 homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de numerosos grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida. Los expertos en la materia reconocerán también los métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de esta divulgación para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que dan como resultado
- 45 una estabilidad potenciada. Por ejemplo, se puede añadir una cisteína en el extremo C o N al péptido, de tal manera que cuando se oxida, el péptido contendrá un enlace disulfuro, generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclar péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres en el extremo carboxilo y amino. Las realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas están también comprendidas en el alcance de la presente divulgación, por lo cual, la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos peptidomiméticos y organomiméticos imita la disposición tridimensional de la estructura principal del péptido y el componente de las cadenas secundarias de aminoácidos, dando como resultado dichos peptidomiméticos y organomiméticos de las proteínas de esta divulgación. Para aplicaciones de modelización informática, un farmacóforo es una definición tridimensional idealizada de los requerimiento estructurales para la actividad biológica. Se pueden diseñar peptidomiméticos y organomiméticos para ajustar cada farmacóforo con el software de modelización informática actual (usando el
- 50 diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman & Groves, eds., 1993, *Pharmaceutical Biotechnology*, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, págs. 165 174 y Principles of Pharmacology Munson (ed.) 1995, Ch. 102, para las descripciones de las técnicas utilizadas en CADD.
- 60 Los aminoácidos en un péptido, polipéptido o proteína se unen químicamente de forma general junto con los enlaces amida (CONH). Adicionalmente, los aminoácidos se pueden encontrar junto otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂ -, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂ -, -CH(OH)CH₂-, y -CHH₂SO- (Estos y otros se pueden encontrar en Spatola, en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267
- 65 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (Marzo de 1983), Vol. 1, Fascículo 3, *Peptide Backbone Modifications* (revisión general); Morley, *Trends Pharm Sci* págs. 463-468, 1980; Hudson, et al., *Int J Pept Prot Res* 14:177-185, 1979;

Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249, 1986; Harm J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314, 1982; Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980; Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533, 1982; Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404, 1983; y Hruby Life Sci 31:189-199, 1982.

5 CCL2 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 2 de la quimioquina (motivo C-C), conocido también como MCP-1. La ID HGNC para este gen es 10618. El gen se localiza en la posición 17q11.2-q21.1. del cromosoma. El símbolo y nombre premio para el gen es SCYA2 "citoquina A2 inducible pequeña (proteína 1 quimiotáctica de monocitos homóloga a Sig-je de ratón)". Los sinónimos para este gen incluyen GDCF-2, HC11, MCP1, MGC9434, SMC-CF, "proteína-1 quimioatrayente de monocitos", "factor de activación y quimiotáctico del monocito", "proteína 1 quimiotáctica de monocitos, homóloga a Sig-je de ratón", "proteína JE secretora de monocitos", "subfamilia A de la citoquina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 2". La secuencia de referencia del Genbank para CCL2 es BC009716.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

15 CCL8 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 8 de la quimioquina (motivo C-C), conocido también como MCP-2. La ID HGNC para este gen es 10635. El gen se localiza en la posición 17q11.2 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA8, "subfamilia A de la citoquina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 8 (proteína 2 quimiotáctica de monocitos)". Otro sinónimo para este gen es HC14. La secuencia de referencia del Genbank para CCL8 es X99886.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

20 CCL7 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 7 de la quimioquina (motivo C-C), conocido también como MCP-3. La ID HGNC para este gen es 10634. El gen se localiza en la posición 17q11.2-q12. del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA6, SCYA7, "citoquina A7 inducible pequeña (proteína 3 quimiotáctica de monocitos)". Los sinónimos para este gen incluyen FIC, MARC, MCP-3, MCP3, NC28, "proteína 3 quimioatrayente de monocitos", "proteína 3 quimiotáctica de monocitos". La secuencia de referencia del Genbank para CCL7 es AF043338 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

30 CCL13 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 13 de la quimioquina (motivo C-C), conocido también como MCP-4. La ID HGNC para este gen es 10611. El gen se localiza en la posición 17q11.2 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA13, "subfamilia A de la citoquina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 13". Los sinónimos para este gen incluyen CKb10, MCP-4, MGC17134, NCC-1, SCYL1. La secuencia de referencia del Genbank para CCL13 es AJ001634 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

35 MCP-5 es una quimioquina de ratón en la familia de las quimioquinas CC. Se conoce también como ligando 12 de la quimioquina (motivo C-C) (CCL12) y, debido a su similitud con la quimioquina MCP-1 humana, algunas veces se denomina quimioquina relacionada con MCP-1. El gen para MCP-5 se encuentra se encuentra en un clúster de quimioquinas CC en el cromosoma 11 de ratón. El símbolo previo para MCP-5 es SCYA12. La secuencia de referencia NCBI para CCL12 es NC_000077.5 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

40 CXCL1 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 1 de la quimioquina (motivo C-X-C), (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa). La ID HGNC para este gen es 4602. El gen se localiza en la posición 4q13.3 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es "proteína secretora de fibroblastos", FSP, GRO1, "oncogen GRO1 (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)", MGSA. Los sinónimos para este gen incluyen GROa, MGSA-a, NAP-3, SCYB1. La secuencia de referencia del Genbank para CXCL1 es J03561.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

50 CXCL2 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 2 de la quimioquina (motivo C-X-C). La ID HGNC para este gen es 4603. El gen se localiza en la posición 4q13.3 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es GRO2, "oncogen GRO2". Los sinónimos para este gen incluyen CINC-2a, GROb, MGSA-b, MIP-2a, SCYB2. La secuencia de referencia del Genbank para CXCL2 es M36820.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

55 CXCL3 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 3 de la quimioquina (motivo C-X-C). La ID HGNC para este gen es 4604. El gen se localiza en la posición 4q21 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es GRO3, "oncogen GRO3". Los sinónimos para este gen incluyen CINC-2b, GROg, MIP-2b, SCYB3. La secuencia de referencia del Genbank para CXCL3 es M36821.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

60 CXCL5 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 5 de la quimioquina (motivo C-X-C). La ID HGNC para este gen es 10642. El gen se localiza en la posición 4q13.3 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYB5, "subfamilia B de la citoquina inducible pequeña (Cys-X-Cys), miembro 5 (péptido 78 activador de neutrófilos derivado de epitelio)". Un sinónimo para este gen es ENA-78. La secuencia de referencia del Genbank para CXCL5 es X78686.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

65

CXCL6 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 6 de la quimioquina (motivo C-X-C). La ID HGNC para este gen es 10643. El gen se localiza en la posición 4q13.3 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es el ligando 6 (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos). Los sinónimos para este gen incluyen CKA-3, GCP-2. La secuencia de referencia del Genbank para CXCL6 es U83303.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

PPBP es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para la proteína básica protoplaquetaria (ligando 7 de la quimioquina (motivo C-X-C), conocido también como CXCL7. La ID HGNC para este gen es 9240. El gen se localiza en la posición 412-q13 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es THBGB1. Los sinónimos para este gen incluyen b-TG1, Beta-FGF, "beta-tromboglobulina", "péptido III activador del tejido conectivo", CTAP3, CTAPIII, CXCL7, LA-PF4, LDGF, MDGF, NAP-2, NAP-2-L1, "péptido-2 activador de neutrófilos", PBP, "proteína básica plaquetaria", SCYB7, TGB, TGB1. La secuencia de referencia del Genbank para PPBP es M54995.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

IL8 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para la interleuquina 8, conocido también como CXCL8. La ID HGNC para este gen es 6025. El gen se localiza en la posición 4q13-q21. del cromosoma. Los sinónimos para este gen incluyen 3-10C, AMCF-I, b-ENAP, "ligando 8 de quimioquina (motivo C-X-C)", CXCL8, GCP-1, IL-8, K60, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAF, NAP-1, SCYB8, TSG-1. La secuencia de referencia del Genbank para CXCL8 es Y00787.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

CCL5 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 5 de la quimioquina (motivo C-C), también conocido como RANTES. La ID HGNC para este gen es 10632. El gen se localiza en la posición 17q11.2-q12. del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es D17S136E, SCYA5, "citoquina A5 inducible pequeña (RANTES)". Los sinónimos para este gen incluyen "beta-quimioquina RANTES", MGC17164, RANTES, "regulada tras activación, normalmente T expresada, y presumiblemente secretada", "SIS-delta", SISd, "subfamilia A de la citoquina inducible pequeña (Cys-Cys), miembro 5", "proteína p288 específica de linfocitos T", "proteína RANTES específica de linfocitos T", TCP228. La secuencia de referencia del Genbank para CCL5 es AF043341.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

CCL3 es el símbolo del gen homologado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 3 de la quimioquina (motivo C-C), también conocido como MIP-1a. La ID HGNC para este gen es 10627. El gen se localiza en la posición 17q12 del cromosoma. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA3, "citoquina A3 inducible pequeña (homóloga a Mip-1a de ratón)". Los sinónimos para este gen incluyen G0S19-1, LD78ALPHA, MIP-1-alfa. La secuencia de referencia del Genbank para CCL3 es M23178.1 que está disponible desde el 13 de junio de 2011.

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

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la invención se refiere a una quimioquina MCP-1 modificada que comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en la que se han realizado una o más de las siguientes modificaciones:

- a) el resto 1 de glutamina de la SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con piroglutamina
- b) el extremo C se produce como un derivado de amida (esto puede conseguirse mediante síntesis en un enlazador de amida)
- c) el resto (región terminal C) en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1, o la posición 75 de la SEQ ID NO:2 o la posición 67 de la SEQ ID NO: 3, que puede ser un resto de lisina u ornitina u otra alternativa adecuada (tal como el ácido diaminopropanoico), está biotilado, opcionalmente, mediante un grupo separador, a fin de permitir la inmovilización de la quimioquina sobre un soporte sólido; y/o
- d) el resto de metionina en la posición 87 de la SEQ ID NO: 1 o la posición 64 de la SEQ ID NO: 2 o la posición 56 de la SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con norleucina.

El aminoácido (región del extremo C), que puede ser un resto de lisina o un equivalente funcional, en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1, o la posición 75 de la SEQ ID NO:2 o la posición 67 de la SEQ ID NO: 3 puede estar biotilada mediante un grupo separador adecuado, tal como un grupo separador de polietilenglicol (PEG), a fin de permitir la

inmovilización de la quimioquina sobre un soporte sólido. En realizaciones específicas, el separador PEG es ácido 3,6-dioxo amino-octanoico. En las figuras 7 a 9 respectivamente se muestran la secuencia y la biotilación de las quimioquinas MCP-1 modificadas de la invención. Las quimioquinas MCP-1 modificadas pueden ser agonistas o antagonistas de la actividad de CCR2. Pueden ensayarse para la actividad en un ensayo adecuado, tal como ensayos basados en células. En particular, se pueden determinar las propiedades agonistas y antagonistas en un ensayo funcional basado en células en un receptor CCR2 humano.

Un ejemplo adicional de una quimioquina de las diversas realizaciones de la invención que contiene modificaciones y se adapta específicamente para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo 8 a continuación). El CCL2 modificado (MCP-1) corresponde a los restos 1 a 76 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal en el extremo N de 23 aminoácidos, que se elimina mediante escisión) y retiene por tanto el pliegue de la quimioquina. El Gln en el extremo N de la proteína (Gln1) está sustituido con piroglutamina para evitar las especies mixtas del Gln del extremo N y pyroGlu que se están generando (SEQ ID NO: 8). Esto mejora el rendimiento de la síntesis y garantiza una preparación de quimioquina homogénea durante la fabricación en columna y el uso. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 75 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 9). Un separador adecuado, tal como un separador PEG, puede incorporarse entre la funcionalidad ϵ -amino y la biotina. Por tanto, la invención se refiere a una quimioquina modificada, incluyendo una versión biotilada, que comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10:

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-NH₂

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

X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal como lisina, ornitina o

ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina).

MCP-5 se une solo a CCR2 y debe ser selectivo en su eliminación de las células que expresan CCR2. La secuencia de aminoácidos de longitud completa, incluido el péptido señal, se define en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos del extremo N que procesa la quimioquina MCP-5 tiene 82 aminoácidos de longitud y se define en la SEQ ID NO: 5. Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos sugiere que MCP-5 tiene una extensión en el extremo C cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de MCP-1. Los resultados de este alineamiento se muestran en la figura 10. Se pueden sintetizar por tanto las versiones truncadas en el extremo C de MCP-5. Esta versión truncada comprenderá, consistirá esencialmente o consistirá en los restos 1-76 de MCP-5, definida en la SEQ ID NO: 6.

Por consiguiente, una quimioquina MCP-5 modificada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 en la que el resto de isoleucina en la posición 97 de la SEQ ID NO: 4 o en la posición 75 de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con lisina (o un equivalente funcional como se define en el presente documento). En determinadas realizaciones, la quimioquina MCP-5 modificada comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. La quimioquina MCP-5 modificada puede estar biotilada en el resto de lisina (o un equivalente funcional) en la posición 97 de la SEQ ID NO: 4 o en la posición 75 de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. La biotilación puede ser mediante un grupo separador adecuado. Los ejemplos específicos del grupo separador incluyen un separador PEG, opcionalmente ácido 3,6-dioxo amino-octanoico. En algunas realizaciones, el extremo C se produce como un derivado de amida. esto puede conseguirse mediante síntesis en un enlazador de amida. En determinadas realizaciones, la quimioquina MCP-5 modificada comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia y la biotilación se muestra en la figura 11. La quimioquina MCP-5 modificada puede ser un agonista o un antagonista de la actividad de CCR2. Pueden ensayarse para la actividad en un ensayo adecuado, tal como ensayos basados en células. En particular, se pueden determinar las propiedades agonistas y antagonistas en un ensayo funcional basado en células en un receptor CCR2 humano.

Un ejemplo adicional de una quimioquina que contiene modificaciones se describe en detalle en el presente documento (véase el ejemplo 3 a continuación). El CCL8 modificado (MCP-2) corresponde a los restos 1 a 76 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal en el extremo N de 23 aminoácidos, que se elimina mediante escisión) y retiene por tanto el pliegue de la quimioquina. La Gln del extremo N de la proteína se somete a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Por tanto, el Gln1 de la secuencia está sustituido con piroglutamina para evitar las especies mixtas del Gln del extremo N y pyroGlu que se están generando (SEQ ID NO: 11). Esto mejora el rendimiento de la síntesis y garantiza una preparación de quimioquina homogénea durante la fabricación en columna y el uso. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 75 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 12). La lisina que se produce naturalmente en la posición 75 está modificada mediante biotilación. Un separador adecuado, tal como un separador PEG, puede incorporarse entre la funcionalidad ϵ -amino y la biotina (SEQ ID NO: 13): Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención se refiere a una quimioquina modificada que comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 13:

XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVVRDSMKHLDQIFQNLXP

- 5 X1 = pyroGlu (pero puede permanecer como Gln en algunas realizaciones)
X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina).
- 10 Un ejemplo adicional de una quimioquina que contiene modificaciones se describe en detalle en el presente documento (véase el ejemplo 4 a continuación). El CCL5 modificado (RANTES) corresponde a los restos 1 a 68 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal en el extremo N de 23 aminoácidos, que se elimina mediante escisión) y retiene por tanto el pliegue de la quimioquina. La metionina individual (Met67) en la secuencia se muta a lisina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena (SEQ ID NO:
- 15 14). Esta sustitución de Met a Lys proporciona una lisina en la posición 67 que se puede modificar mediante biotinilación. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 67 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 15). La versión biotinilada comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
- 20 Por tanto, una quimioquina modificada que comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16:

SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEXS

- 25 X es un resto de aminoácido que se puede biotinar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG (por ejemplo, K(Biotina))
- 30 Un ejemplo adicional de una quimioquina de las diversas realizaciones de la invención que contiene modificaciones y se adapta específicamente para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo 3 a continuación). El CXCL8 modificado (IL-8) corresponde a los restos 1 a 77 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal en el extremo N de 22 aminoácidos, que se elimina mediante escisión) y retiene por tanto el pliegue de la quimioquina. Un resto de aminoácido capaz de biotinilación, tal como lisina u ornitina, se añade como resto 78 (SEQ ID NO: 17). FmocLys(ivDde)-OH puede incorporarse como resto 78 para
- 35 facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 18). El aminoácido adicional, en particular lisina u ornitina, en la posición 78 se modifica mediante biotinilación. Un separador adecuado, tal como un separador PEG, puede incorporarse entre la funcionalidad ϵ -amino y la biotina (SEQ ID NO: 19).
- 40 Por tanto, en otras realizaciones, la invención se refiere también a una quimioquina modificada que comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o 19: SEQ ID NO: 17

AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKL
SDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX

- 45 X es un resto de aminoácido que se puede biotinar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG
SEQ ID NO: 19

AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKL
SDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSK(PEG-Biotin)

- 50 Un ejemplo adicional de una quimioquina de las diversas realizaciones de la invención que contiene truncamientos y modificaciones y se adapta específicamente para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo 3 a continuación). La CXCL8 (IL-8) modificada corresponde a los restos 6 a 77 de la proteína madura de longitud completa, con los 5 primeros aminoácidos en el extremo N eliminados, (y carece del péptido señal en el extremo N de 22 aminoácidos, que se elimina mediante escisión) y retiene por tanto el pliegue de la quimioquina. Un resto de aminoácido capaz de biotinilación, tal como lisina u ornitina, se añade como resto 78
- 55 (SEQ ID NO: 20). FmocLys(ivDde)-OH puede incorporarse como resto 78 para facilitar el marcado específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 21). El aminoácido adicional, en particular lisina u ornitina, en la

posición 78 se modifica mediante biotilación. Un separador adecuado, tal como un separador PEG, puede incorporarse entre la funcionalidad ϵ -amino y la biotina (SEQ ID NO: 22).

5 Por tanto, en otras realizaciones, la invención se refiere también a una quimioquina modificada que comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 22:

SEQ ID NO: 20

SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGREL
CLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX

10 X es un resto de aminoácido que se puede biotilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG

SEQ ID NO: 22

15 SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGREL
CLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX

X es K(PEG-Biotina)

20 Las quimioquinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden sintetizarse mediante cualquier medio adecuado conocido en la materia. Preferentemente, las quimioquinas se sintetizan químicamente ya que esto facilita la modificación y el marcado, etc. Sin embargo, se pueden emplear también estrategias basadas en ADN recombinante en combinación con un marcado y tecnologías de modificación adecuadas según se requiera.

25 Las quimioquinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden biotinilarse mediante métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en el documento WO 00/50088 A2. Tal como se ha indicado anteriormente, es preferible un marcado específico de sitio de las quimioquinas de las diversas realizaciones de la invención, aunque se puede emplear cualquier técnica de marcado que no afecte significativamente la capacidad de unión del receptor de la quimioquina. Están disponibles comercialmente diversas quimioquinas biotiniladas
30 específicas de sitio y quimioquinas nativas, por ejemplo, de Almac, Craigavon, Reino Unido. En realizaciones específicas, la una o más quimioquinas se biotinilan mediante un grupo separador. El separador se puede emplear para evitar que el grupo biotina altere la afinidad de unión de la quimioquina, en particular, la unión de la quimioquina a su receptor análogo. Puede emplearse cualquier separador adecuado que facilite la retención de las propiedades de unión del receptor de la quimioquina en las diversas realizaciones de la invención. Por tanto, en las realizaciones
35 específicas descritas anteriormente, pueden emplearse separadores diferentes que los separadores PEG según sea adecuado. En realizaciones específicas, el separador es un separador de polietilenglicol (PEG). PEG ha mostrado ser un separador eficaz que permite la unión de la biotina a la quimioquina (que se puede inmovilizar a continuación sobre el soporte sólido mediante la interacción con estreptavidina) sin comprometer la capacidad de unión del receptor.

40 En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, el término "anticuerpo" incluye todas las inmunoglobulinas o moléculas análogas a inmunoglobulina con afinidad de unión específica por el receptor de la quimioquina relevante (incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cuyas combinaciones, y las moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por
45 ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones). Las inmunoglobulinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la invención incluyen isotipos de IgG. Los anticuerpos útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden ser monoclonales o policlonales en origen, pero son normalmente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos, o versiones humanizadas de anticuerpos no humanos, o anticuerpos quiméricos. Están bien establecidas diversas técnicas para
50 la humanización de anticuerpos y se puede emplear cualquier técnica adecuada. El término "anticuerpo" se refiere también a un ligando polipeptídico que comprende al menos una cadena ligera o una cadena pesada de la región variable de la inmunoglobulina que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno, y se extiende a todos los derivados y fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al receptor de la quimioquina relevante. Estos derivados y fragmentos pueden incluir fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂,
55 fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fc, etc. El término anticuerpo abarca los anticuerpos comprendidos por las cadenas pesada y ligera, pero también anticuerpos de cadena pesada (solo). En realizaciones específicas, Los anticuerpos pueden diseñarse mediante ingeniería genética con el fin de ser específicos para más de un receptor de la quimioquina, por ejemplo, biespecíficos para permitir la unión de dos diferentes receptores de quimioquina. Se describen anticuerpos contra CCR2, por ejemplo, en el documento WO
60 2010/021697. Ejemplos adicionales de anticuerpos potencialmente útiles incluyen MLN-1202, un anticuerpo monoclonal dirigido contra CCR2 experimenta actualmente ensayos clínicos (Millennium Pharmaceuticals). Los anticuerpos comercialmente disponibles adecuados que se unen a los receptores de la quimioquina de interés se

relacionan en la tabla 1 siguiente. Pueden estar o pueden no estar marcados. Se puede hacer una referencia general a "Antibodies a laboratory manual: Por E Harlow y D Lane, pág. 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.

Tabla 1. Anticuerpos marcados con fluoróforos comercialmente disponibles contra receptores específicos de quimioquinas

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR5	PE	Biolegend
CXCR1	APC	Biolegend
CXCR2	PE	BD Biosciences
CCR2	PerCP Cy5.5	BD Biosciences

Las células que expresan el receptor de la quimioquina pueden por tanto dirigirse utilizando agentes de unión alternativos, tales como anticuerpos u otros compuestos químicos, como se definen en el presente documento, más bien que el ligando de la quimioquina natural. Esta estrategia es una nueva estrategia para el tratamiento de las dolencias inflamatorias.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la invención proporciona también una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de la quimioquina inmovilizado directa o indirectamente sobre el soporte para permitir la eliminación de una célula que expresa el receptor de la quimioquina procedente de la sangre periférica de un paciente, en el que el reactivo de unión no es una quimioquina. El reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de la quimioquina puede ser tanto un agonista como un antagonista del receptor de la quimioquina. En realizaciones específicas, el reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de la quimioquina se selecciona entre un anticuerpo y un compuesto químico.

De manera similar, En otras realizaciones, la invención proporciona un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de la quimioquina para su uso en el tratamiento de una dolencia inflamatoria, en el que el reactivo de unión se inmoviliza sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de la quimioquina inmovilizado directa o indirectamente sobre el soporte para permitir la eliminación de una célula que expresa el receptor de la quimioquina procedente de la sangre periférica de un paciente/sujeto, en el que el reactivo de unión no es una quimioquina), a la cual se aplica sangre periférica procedente de un paciente, eliminando por tanto las células que expresan el receptor de la quimioquina de la sangre periférica del paciente.

Se conocen en la técnica materiales de soporte sólido para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención. "Soporte sólido" se refiere a, por ejemplo, materiales que tienen una superficie o superficies rígida o semirígida, y pueden tomar la forma de perlas, resinas, geles, microesferas, u otras configuraciones geométricas. Un material de soporte útil es uno que no activa las células de la sangre para hacerlas coagular o adherir al soporte como sangre periférica completa que se aplica al dispositivo. En determinadas realizaciones, se emplea un soporte tratado con un agente para proporcionar a este propiedades anticoagulación, en particular se emplea un soporte heparinizado. Como alternativa, la sangre del paciente puede tratarse con un anticoagulante tal como heparina antes de la aplicación al soporte. Los materiales de soporte útiles comprenden hidratos de carbono de alto peso molecular, en hidratos de carbono concretos que tienen un peso molecular de 100 kDa o más, tales como agarosa, En forma particulada, opcionalmente reticulada, y celulosa. Otros materiales de soporte preferidos son los polímeros, tales como poliestireno carboxilado, y vidrio. El soporte de las diversas realizaciones de la invención puede proporcionarse en la forma de partículas o fibras. Las partículas de soporte pueden tener una forma regular, tales como esferas o perlas, o una forma irregular. Pueden ser porosas o no porosas. Un tamaño de partícula promedio preferido del soporte es de 50 μm a 2 mm. En determinadas realizaciones se usa Sepharose™, una agarosa reticulada en forma de perlas, como matriz de la columna. Se seleccionan por su capacidad de distribución óptima, y puede proporcionar un área disponible grande para la unión por afinidad. pueden proporcionarse soportes sólidos en la forma de perlas magnéticas, con el reactivo de unión específico inmovilizado sobre las perlas magnéticas. Tras la captura del receptor de la quimioquina CXCR1 que expresa células procedentes de la sangre, las perlas pueden retirarse de la sangre con la ayuda de un separador magnético adecuado.

Se conocen en la técnica los métodos para inmovilizar reactivos de unión sobre un soporte sólido. Un reactivo de unión, tal como una quimioquina, anticuerpo, péptido, ácido nucleico o compuesto químico, puede inmovilizarse sobre el soporte de una manera directa o indirecta. La inmovilización puede ser por medio de un enlazador adecuado en algunas realizaciones. Un método preferido de inmovilización indirecta de un reactivo de unión, tal como una quimioquina, depende de la interacción entre las moléculas de biotina y avidina. "Avidina" o "molécula de avidina" se refiere a cualquier tipo de proteína que se une específicamente a la biotina para la exclusión sustancial de otras moléculas (pequeñas) que pueden estar presentes en una muestra biológica. Los ejemplos de avidina incluyen avidinas que están presentes naturalmente en clara de huevo, proteínas de semillas oleaginosas (por ejemplo, grano molido de soja), y grano (por ejemplo, maíz), y estreptavidina, que es una proteína de origen

bacteriano. Por tanto, la biotinylación de un reactivo de unión y el uso de una molécula de avidina tal como estreptavidina inmovilizada sobre el soporte sólido permite una unión fiable del reactivo de unión al soporte sólido de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Específicamente, dicho método puede comprender proporcionar el reactivo de unión en forma biotinylada, proporcionar un soporte sólido que tiene estreptavidina inmovilizada sobre su superficie, poner en contacto el soporte con una solución acuosa del reactivo de unión biotinylado, y enjuagar el soporte con un disolvente acuoso. Además, las interacciones de ligandos, tales como interacciones anticuerpo - antígeno, pueden también utilizarse para la inmovilización indirecta del reactivo de unión sobre un soporte. En dichas realizaciones, el soporte puede derivatizarse con un miembro de un ligando, tal como un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, como se definen en el presente documento, que tiene una afinidad conocida por una secuencia peptídica concreta o un hapteno de molécula pequeña. Incorporando el otro miembro del ligando, tal como un antígeno, la secuencia peptídica o el hapteno sobre o en el reactivo de unión facilita la inmovilización sobre un soporte sólido revestido con el anticuerpo o fragmento correspondiente o derivado del mismo. Por tanto, el reactivo de unión puede modificarse para incluir la secuencia peptídica o hapteno en la molécula lineal o puede añadirse como una cadena secundaria o marca. Se puede emplear cualquier pareja de anticuerpo-antígeno adecuada. El fragmento o derivado de anticuerpo puede ser cualquier fragmento o derivado que retiene la afinidad de unión específica por el antígeno adecuado. Los ejemplos incluyen Fab, fragmentos F(ab')₂, scFV, los dominios VH, los anticuerpos de dominio único (tales como nanocuerpos), anticuerpos de cadena pesada y la versión humanizada de anticuerpos no humanos, etc. Se pueden utilizar otras interacciones de alta afinidad para la inmovilización de reactivos de unión, siempre que el reactivo de unión pueda sintetizarse o derivatizarse con una de las moléculas asociadas interactuantes y el soporte sólido sintetizado o derivatizado con la otra molécula asociada interactuante sin pérdida de la actividad de unión (es decir, la unión del reactivo de unión al receptor de la quimioquina adecuado). La inmovilización puede producirse mediante esencialmente la misma interacción a la inversa en algunas realizaciones. Por tanto, el reactivo de unión que puede ser, por ejemplo, una quimioquina, puede unirse a un anticuerpo, como se define en el presente documento, y el soporte sólido derivatizarse con el antígeno. La quimioquina puede producirse como una proteína de fusión con el anticuerpo.

Alternativamente, los reactivos de unión, tales como quimioquinas y anticuerpos, se puede inmovilizar directamente sobre un soporte sólido utilizando las técnicas de bioconjugación establecidas en el campo. Por ejemplo, la inmovilización directa de proteínas sobre bromuro de cianógeno activó soportes sólidos mediante funcionalidades amino en la secuencia primaria de la proteína. Como alternativa, se pueden usar las funcionalidades sulfhidrilo en proteína para inmovilizar directamente la proteína a los soportes derivatizados con haluro de alquilo o soportes que contienen funcionalidades tiol libres. En otras realizaciones, las proteínas que contienen funcionalidades α -tioéster pueden inmovilizarse directamente sobre soportes que contienen restos 1,2 amino tiol (por ejemplo, cisteína en el extremo N) utilizando la reacción de ligadura química nativa. Alternativamente, las proteínas modificadas con cetonas y aldehídos pueden inmovilizarse sobre soportes sólidos derivatizados con funcionalidades hidrazinilo, hidrazida y aminoxi utilizando hidrazona / oxima unidas formando reacciones de ligadura (y viceversa). Alternativamente, la química de 'Click' se puede usar para inmovilizar proteínas sobre soportes sólidos, por lo cual la proteína y el soporte se derivatizan con las funcionalidades químicas mutuamente reactivas adecuadas (azidas y alquinos). En otras realizaciones, se puede usar la química de ligadura de Staudinger para inmovilizar proteínas derivatizadas adecuadamente sobre soportes sólidos derivatizados adecuadamente.

El soporte sólido está contenido o transportado por la columna de aféresis. Por tanto, Se entiende por "cargado" que la columna transporta o contiene el soporte sólido de una manera tal que la sangre (periférica) puede fluir a través de la columna en contacto con el soporte sólido. Por tanto, el soporte sólido proporciona una matriz en la columna a través de la cual fluye la sangre, de una manera continua en determinadas realizaciones. Esto permite que las células expresen el receptor de la quimioquina específico que se va a eliminar de la sangre pasando a través de la columna, de tal manera que la sangre que sale de la columna tiene agotadas las células que expresan el receptor de la quimioquina específico. En realizaciones específicas, la columna de aféresis se carga con un soporte que comprende estreptavidina inmovilizada sobre el soporte y uno o más reactivos de unión biotinylados, tales como las quimioquinas, unidas a la estreptavidina sobre el soporte. El soporte sólido puede estar comprendido de un hidrato de carbono de alto peso molecular, opcionalmente reticulado, tal como agarosa.

Tal como se ha analizado 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 será inmediato, minimizando el riesgo de desacoplamiento del reactivo de unión 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. Como alternativa, o adicionalmente, tras la inmovilización del reactivo de unión sobre el soporte sólido, el soporte sólido puede lavarse para eliminar cualquier reactivo de unión no unido.

La columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como un tratamiento de leucaféresis para las dolencias asociadas a septicemia y/o para el tratamiento del RDS (incluyendo el RDS asociado a septicemia). La columna actúa para eliminar específicamente los monocitos, neutrófilos o leucocitos que expresan CXCR1, explicando la interacción entre CXCR1 expresada sobre la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado sobre un soporte sólido contenido en o transportado por la columna. La columna total comprende normalmente, consiste, o consiste esencialmente de tres componentes combinados; 1) un alojamiento que contiene o transporta 2) el soporte sólido y 3) uno o más reactivos de unión (inmovilizado en el anterior) que se

5
10
15
20

une específicamente a uno o más receptores de la quimioquina. El alojamiento puede fabricarse a partir de cualquier material adecuado para el uso clínico. En determinadas realizaciones, el alojamiento está compuesto de un material plástico. El alojamiento incluye un sitio de entrada de flujo para la entrada de la sangre y un sitio de salida de flujo para la sangre (agotada de células diana) para la salida de la columna. El alojamiento puede diseñarse para mantener un flujo continuo de sangre a través de la matriz de soporte sólido. El alojamiento (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 3) puede incluir una parte superior que comprende una placa de distribución (2) en el sitio de entrada del flujo (1) para diseminar la sangre uniformemente sobre el área total de la matriz. La placa de distribución puede actuar como una primera barrera de seguridad evitando que las partículas más grandes fluyan a través de la columna en el paciente. Sin embargo, la placa de distribución no es esencial y puede retirarse en algunas realizaciones para disminuir la resistencia total en el sistema. La columna puede contener una o más unidades de filtros de seguridad (3 y 4) colocados en la entrada de flujo (1) y/o sitios de salida de flujo (5) del alojamiento de plástico. Dichas unidades de filtro pueden actuar para evitar que partículas más grandes que las células de la sangre pasen dentro y fuera de la columna. Las unidades de filtros de seguridad pueden contener una pluralidad de filtros, tales como dos, tres o cuatro filtros diseñados para ser una sólida barrea y detener todas las partículas más grandes que las células de la sangre que pasan a través de la columna. La inclusión de filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos de la columna minimizará el riesgo de fugas de partículas en el paciente, incluido el caso en el que el dispositivo se conecte incorrectamente dando como resultado un flujo de sangre en la dirección opuesta a la prevista. Los filtros de seguridad pueden comprender cualquier tamaño de poro adecuado para evitar que partículas más grandes que las células de la sangre pasen a través de la columna, como entendería fácilmente un experto en la materia. Están disponibles en el mercado los filtros adecuados. En realizaciones específicas, el tamaño del poro del(de los) filtro(s) está entre aproximadamente 60 µm y 100 µm, más específicamente, aproximadamente 80 µm. El soporte sólido y los componentes del reactivo de unión se describen con detalle adicional en el presente documento.

25
30
35

se puede variar el volumen del alojamiento dependiendo de los volúmenes de sangre que está previsto que pasen a través de la columna. Típicamente, el volumen del alojamiento está entre aproximadamente 40 ml y 200 ml, más específicamente 50 ml a 150 ml o 60 ml a 120 ml. La columna se aplica generalmente en la forma de un circuito de aféresis. En este contexto, el sistema total incluye la columna de aféresis, la conducción y una bomba adecuada para bombear la sangre alrededor del circuito. El sistema se ilustra en la figura 4. El paciente (1) se conecta al circuito extracorpóreo mediante agujas estériles por las venas de los brazos derecho e izquierdo. Una bolsa (3) de suero salino también se conecta, y la solución salina se bombea con una bomba adecuada (2). La sangre se extrae por un brazo del paciente a través del sistema de conducciones estériles mediante la bomba de sangre (4) y se hace pasar a través de la columna (6) y se devuelve al paciente. El sistema de conducción puede conectarse a la columna mediante cualquier acoplamiento adecuado, tal como acoplamientos de tipo luer de diálisis normalizados. Los acoplamientos de la columna tienen un código de colores para su correcto montaje. Por ejemplo, conducciones de color rojo para el flujo de entrada a la parte superior de la columna de color rojo y conducciones azules para el flujo devuelto al paciente. Puede estar presente en el circuito un detector (8) de aire. Se utilizan sensores de presión de entrada (5) y / Pven (7) para supervisar la presión en el circuito.

40
45

Una bomba de aféresis, tal como la bomba 4008 ADS fabricada por Fresenius Medical Care o la bomba Adamonitor, puede controlar la entrada y salida de flujo del paciente. La bomba puede también controlar la presión en la circulación extracorpórea. La bomba puede ser capaz de discriminar el aire con una trampa de burbujas y un detector de aire. Un filtro de captura de coágulos puede colocarse dentro de la trampa de burbujas. La bomba puede también incorporar un detector óptico para distinguir entre luz, por ejemplo, la solución salina o aire presente en el sistema de conducciones; y oscuridad, por ejemplo, la sangre presente en el sistema de conducciones.

50

Un diagrama esquemático de la bomba adecuada, que muestra el detector de aire y el filtro óptico se muestra en la figura 5. Si el sistema de la bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas, o si los valores de la presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba puede detenerse inmediatamente. Alternativa, o adicionalmente, puede emitirse una alarma visual/ audible.

55

Los métodos de tratamiento pueden depender de un circuito extracorpóreo. Los métodos pueden considerarse como métodos *ex vivo* o *in vitro* y definirse únicamente con referencia a las etapas llevadas a cabo externamente al paciente. En algunas realizaciones, sin embargo, el método también comprende, antes de la aplicación de la sangre a la columna, al recoger la sangre periférica del paciente.

Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención proporciona también un método de controlar la progresión del tratamiento de septicemia (incluyendo el RDS asociado a septicemia) que comprende determinar:

- 60
65
- a) los niveles de células que expresan CXCR1
 - b) los niveles de expresión de CXCR1; y/o
 - c) los niveles de células con una elevada expresión de CXCR1 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que células que expresan altos niveles de CXCR1, altos niveles de expresión de CXCR1 o altos niveles de células con una alta expresión de CXCR1 o células que expresan niveles aumentados de CXCR1 en comparación con el control, niveles aumentados de expresión de CXCR1 en comparación con el control o niveles aumentados de células con una alta expresión de CXCR1 en comparación con el control indican la presencia o la progresión de septicemia. Los niveles de expresión del receptor de la quimioquina, al contrario que las cantidades de células,

pueden también investigarse como niveles aumentados de expresión del receptor de la quimioquina por célula y pueden ser también diagnósticamente relevantes.

5 Se define "diagnosticar" en el presente documento para incluir el cribado de una enfermedad/dolencia o la preindicación de una enfermedad/dolencia, identificar una enfermedad/dolencia o la preindicación de una enfermedad/dolencia y la comprobación de la reincidencia de una enfermedad/dolencia tras el tratamiento. Los métodos de las diversas realizaciones de la invención pueden tener también un valor pronóstico, y este se incluye en la definición del término "diagnóstico". El valor pronóstico de los métodos de las diversas realizaciones de la invención puede utilizarse como un marcador de susceptibilidad potencial para la septicemia y/o el RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa el RDS asociado a septicemia) identificando los niveles de expresión de uno o más de CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5 vinculados a dolencias asociadas a este síndrome. Por tanto, los pacientes en riesgo que pueden identificarse antes de la enfermedad tienen una posibilidad de manifestarse en términos de síntomas identificables en el paciente. En determinadas realizaciones, puede realizarse un diagnóstico junto con otros indicadores objetivos de septicemia y/o RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa, RDS asociada a septicemia). Por tanto, en realizaciones específicas, el diagnóstico se realiza junto con uno o más de los siguientes indicadores:

10 definidos como temperatura corporal $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($97\text{ }^{\circ}\text{F}$) o $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($100\text{ }^{\circ}\text{F}$) (hipotermia o fiebre). Frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto.

15 Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto, o, en el gas de la sangre, una PaCO_2 menor de 32 mm Hg ($4,3\text{ kPa}$) (taquipnea o hipocapnia debida a hiperventilación).

20 Recuento de glóbulos blancos de la sangre $< 4.000\text{ células/mm}^3$ o $> 12.000\text{ células/mm}^3$ ($< 4 \times 10^9$ o $> 12 \times 10^9$ células/l).

25 Los indicadores clínicos, tal como lo entiende un experto en la materia, incluyen signos vitales tales como pO_2 , respiración, hallazgos mediante rayos X, CRP, Los niveles de ESR y la temperatura del paciente y la evidencia/cuantificación de bacterias en los cultivos sanguíneos

30 "El control de la progresión incluye llevar a cabo los métodos para controlar la etapa y/o el estado y la progresión de la dolencia asociada a septicemia y/o RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa RDS asociado a septicemia). El control de la progresión puede implicar llevar a cabo los métodos diagnósticos múltiples veces en el mismo paciente para determinar si los niveles de células que expresan CXCR1 están aumentando, disminuyendo o permaneciendo estables durante un determinado periodo de tiempo.

35 "Controlar el éxito de un tratamiento concreto" se define para incluir la determinación de los niveles de células que expresan CXCR1 antes y después de un tratamiento. El tratamiento es generalmente uno destinado a tratar la septicemia y/o el RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa el RDS asociado a septicemia) y puede ser un tratamiento de acuerdo con uno de los métodos de las diversas realizaciones de la invención, como se define en el presente documento. Puede determinarse el tratamiento satisfactorio con referencia a una disminución en las células que expresan CXCR1 como resultado de, o tras, el tratamiento. Por tanto, en dichos métodos, se determina un nivel de células que expresan CXCR1 antes del tratamiento. Se registró este nivel y se realizó una evaluación adicional a un tiempo predeterminado tras el tratamiento. La comparación de los niveles de células que expresan CXCR1 permite el éxito del tratamiento que se va a controlar. un único tratamiento es suficiente para producir un agotamiento de alrededor del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o mayor, hasta el 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores ente e incluyendo estas cantidades, de células que expresan CXCR1 procedentes de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos alrededor de un 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por tanto, el tratamiento satisfactorio puede definirse con referencia al agotamiento de las células que expresan CXCR1. El tratamiento puede conducir al agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de CXCR1, tales como monocitos o neutrófilos. Se pueden incluir factores adicionales para determinar el éxito de un tratamiento. Por ejemplo, una ausencia de aumento en células que expresan CXCR1 tras el tratamiento puede indicar un tratamiento satisfactorio en términos de evitar la progresión adicional de la dolencia, combinado opcionalmente con una mejora en otros marcadores o estadificación de la dolencia asociada a la septicemia y/o RDS (incluyendo RDS asociado a septicemia). Uniendo la columna a través de la interacción reactivo de unión-receptor de la quimioquina, se inmovilizan las células que expresan el receptor de la quimioquina. Estas células inmovilizadas expresan además receptores de la quimioquina sin ocupar, que pueden ser del mismo o diferente tipo a los utilizados para la captura. Estos receptores de quimioquina adicionales pueden permitir la circulación de las quimioquinas que contribuyen a la dolencia inflamatoria que se va a capturar a partir de la sangre periférica. Por tanto, una reducción en los niveles de quimioquinas en circulación puede producir una medida de un tratamiento satisfactorio.

60 La muestra en la que los niveles de células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con una alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) que se determinaron pueden comprender cualquier muestra de tejido o muestra de fluido corporal adecuada. En general, se obtiene la muestra de ensayo de un sujeto humano. Típicamente, la muestra es una muestra de sangre, en particular, una muestra de sangre periférica. La muestra puede comprender fluido de lavado broncoalveolar en determinadas realizaciones (BALF). Los métodos pueden implicar determinar los niveles de neutrófilos que expresan CXCR1 en sangre o en BALF en determinadas realizaciones. Los métodos pueden implicar determinar los niveles de monocitos, macrófagos o

linfocitos que expresan CXCR1 en determinadas realizaciones.

Los niveles de células que expresan CXCR1, pueden determinarse los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) de acuerdo con cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede emplearse la citometría de flujo a fin de determinar el número de células que expresan CXCR1 en la muestra, para determinar los niveles de expresión de CXCR1 y/o para identificar los niveles de células CXCR1^{hi}. Se describen en el presente documento técnicas citométricas de flujo y ejemplos de anticuerpos comercialmente disponibles marcados adecuadamente, por ejemplo, para su uso en la citometría de flujo y se muestran en la Tabla 1. Como alternativa, los métodos pueden implicar etapas de recoger y fijar las células en la muestra, seguido por incubación con un reactivo de unión adecuado que se une específicamente a las células que expresan el receptor de la quimioquina CXCR1 en la muestra. Puede emplearse cualquier reactivo de unión adecuado, como se define en el presente documento. Por ejemplo, puede emplearse un anticuerpo específico de CXCR1. Puede adoptarse una etapa de lavado tras un periodo de incubación para eliminar cualquier reactivo sin unir. Las etapas de lavado y las condiciones de incubación adecuadas serían bien conocidas por un experto en la materia. El reactivo de unión puede marcarse directamente a fin de permitir determinar directamente la unión del anticuerpo. Alternativamente, puede emplearse un reactivo de unión secundario, tal como un anticuerpo, que se une al primer reactivo de unión y transporta una marca. De nuevo, Las condiciones de incubación y las etapas de lavado adecuadas serán evidentes para un experto en la materia. Los reactivos de unión primario y secundario pueden formar dos mitades de un ligando. La interacción de unión no debe evitar la unión del reactivo de unión primario a las células que expresan el receptor de CXCR1, salvo que se emplee un ensayo de competición. En determinadas realizaciones las dos mitades de un ligando pueden comprender una pareja antígeno-anticuerpo, anticuerpo-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-estreptavidina, etc. Otras técnicas usadas para cuantificar los niveles de células que expresan el receptor de la quimioquina (CXCR1), para cuantificar los niveles de expresión de CXCR1 y/o para identificar los niveles de células CCR2^{hi}, CXCR1^{hi}, incluyen técnicas basadas en la PCR tales como QT-PCR y métodos basados en proteínas tales como la transferencia western. La cuantificación puede conseguirse con referencia a las líneas de células fijas que transportan cantidades conocidas de diversas células que expresan el receptor y/o niveles conocidos de expresión del receptor por célula. Dichas líneas de células fijas están comercialmente disponibles (por ejemplo, líneas de células ChemiScreen™ de Millipore). Pueden emplearse también métodos análogos a los métodos de tratamiento de las diversas realizaciones de la invención, determinándose la unión de células que expresan CCR al soporte sólido tras pasar la sangre periférica a través de la columna.

Pueden determinarse los niveles de células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) con respecto a cualquier control adecuado. Cuando se diagnostica una dolencia asociada a una septicemia y/o RDS (incluyendo RDS asociado a septicemia), puede configurarse un nivel umbral de células, un nivel de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) en o sobre el cual se realiza un diagnóstico positivo. Se puede determinar este umbral basándose en los niveles de medición de las células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles con una alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) en muestras obtenidas de pacientes enfermos y comparando estos niveles con niveles de células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con una alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) en muestras obtenidas de sujetos sanos.

En determinadas realizaciones, la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se diagnostica sobre la base de niveles de células que expresan CXCR1. Se puede realizar un diagnóstico positivo en sujetos basándose en la presencia de más de aproximadamente el 10 %, más de aproximadamente el 20 %, más de aproximadamente el 30 %, más de aproximadamente el 40 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 55 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 65 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 75 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 85 %, más de aproximadamente el 90 %, más de aproximadamente el 95 %, o más células que expresan el receptor de la quimioquina en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra. En otras realizaciones, la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se diagnostica sobre la base de la presencia de un aumento de 1,2 veces o más, tal como aproximadamente un aumento de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en las células que expresan CXCR1, con respecto a los controles sanos.

En realizaciones específicas, RDS se diagnostica sobre la base de niveles de células que expresan CXCR1, en neutrófilos concretos. Se puede realizar un diagnóstico positivo en sujetos basándose en la presencia de más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 %, más de aproximadamente el 4 %, más de aproximadamente el 5 %, más de aproximadamente el 10 %, más de aproximadamente el 15 %, o más de aproximadamente el 20 % de células que expresan CCR5, en neutrófilos concretos en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra. Se puede realizar un diagnóstico positivo en sujetos basándose en la presencia de más de aproximadamente el 40 %, más de aproximadamente el 45 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 55 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 65 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 75 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 85 %, o más de células que expresan CXCR1, en neutrófilos concretos en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra. Se puede realizar un diagnóstico positivo en sujetos basándose en la

presencia de un aumento de aproximadamente 1,2 veces o más, tal como aproximadamente un aumento de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en las células que expresan el receptor específico de la quimioquina, con respecto a los controles sanos.

5 En determinadas realizaciones, la progresión de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS), que puede estar en el contexto de un régimen de tratamiento, se controla sobre la base de los niveles de células que expresan quimioquinas, tales como células que expresan CXCR1 en diferentes puntos temporales. La progresión de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) puede indicarse en sujeto basándose en un aumento de más de aproximadamente el 1 %, más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 %, 10 más de aproximadamente el 4 %, más de aproximadamente el 5 %, más de aproximadamente el 10 %, tal como un aumento de más de aproximadamente el 15 %, más de aproximadamente el 20 %, más de aproximadamente el 25 %, más de aproximadamente el 30 %, más de aproximadamente el 35 %, más de aproximadamente el 40 %, más de aproximadamente el 45 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 55 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 65 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 75 % o más células que expresan el receptor de la quimioquina en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la progresión de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se confirma sobre la base de la presencia de un aumento de aproximadamente 1,2 veces o más, tal como aproximadamente un aumento de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en las células que expresan el receptor quimioquina, con respecto a una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

En realizaciones específicas, la septicemia y/o el RDS se controlan sobre la base de los niveles de CXCR1, , en neutrófilos concretos. La progresión de la enfermedad, que puede estar en el contexto de un régimen de tratamiento, 25 puede indicarse en sujetos basándose en la presencia de un aumento de más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 %, más de aproximadamente el 4 %, más de aproximadamente el 5 %, más de aproximadamente el 10 %, más de aproximadamente el 15 %, o más de aproximadamente el 20 % de células que expresan CCR5, en neutrófilos concretos en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la progresión de la enfermedad, que puede estar en el contexto de un régimen de tratamiento, puede indicarse en sujetos basándose en la presencia de un aumento de más de aproximadamente el 40 %, más de aproximadamente el 45 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 55 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 65 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 75 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 85 %, o más de células que expresan CXCR1, en neutrófilos 35 concretos en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

En otras realizaciones, la progresión de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se confirma sobre la base de la presencia de un aumento de aproximadamente 1,2 veces o más, tal como aproximadamente un aumento de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en las células que expresan CXCR1, en particular neutrófilos, con respecto a una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

La regresión o tratamiento satisfactorio puede controlarse basándose en disminuciones similares en varios puntos temporales. Por ejemplo, la regresión o tratamiento satisfactorio puede indicarse en sujetos basándose en una 45 disminución de más de aproximadamente el 1 %, más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 %, más de aproximadamente el 4 %, más de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, tal como una disminución de aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, 50 aproximadamente el 75 % o más células que expresan CXCR1 en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la regresión de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se confirma sobre la base de la presencia de una disminución de 1,2 veces o más, tal como aproximadamente una disminución de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en las células que expresan el receptor de la quimioquina, con respecto a una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se controla sobre la base de niveles de células que expresan CXCR1, en neutrófilos concretos. La regresión o el tratamiento satisfactorio de la enfermedad puede realizarse en sujetos basándose en una disminución de más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 %, más de aproximadamente el 4 %, más de aproximadamente el 5 %, más de aproximadamente el 10 %, más de aproximadamente el 15 %, o más de aproximadamente el 20 % de células que expresan CCR5, en neutrófilos concretos en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra o mediante una disminución de aproximadamente más de aproximadamente el 2 %, más de aproximadamente el 3 %, más de aproximadamente el 4 %, más de aproximadamente el 5 %, más de aproximadamente el 10 %, más de aproximadamente el 15 %, o más de aproximadamente el 20 % de células que expresan CCR5, en neutrófilos concretos en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto 65

temporal anterior.

- La regresión o el tratamiento satisfactorio de la enfermedad puede realizarse en sujetos basándose en una disminución de más de aproximadamente el 40 %, más de aproximadamente el 45 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 55 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 65 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 75 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 85 %, o más de células que expresan CXCR1, en neutrófilos concretos en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra o mediante una disminución de más de aproximadamente el 40 %, más de aproximadamente el 45 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 55 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 65 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 75 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 85 %, o más de células que expresan CXCR1, en neutrófilos concretos en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.
- 15 En otras realizaciones adicionales, la regresión de la septicemia y/o el síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se confirma sobre la base de la presencia de una disminución de 1,2 veces o más, tal como aproximadamente una disminución de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en las células que expresan CXCR1, en particular neutrófilos, con respecto a una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.
- 20 El software adecuado está disponible gratuitamente (tal como el proyecto R para el cálculo estadístico) para llevar a cabo el análisis estadístico necesario de los datos obtenidos para calcular un umbral útil. El umbral puede configurarse para maximizar la sensibilidad y/o la especificidad del ensayo. Puede medirse el rendimiento del ensayo en estos aspectos representando gráficamente la curva de las características de funcionamiento de un receptor (ROC) (sensibilidad frente a especificidad). El área bajo la curva proporciona una indicación del rendimiento total del ensayo. Por tanto, una vez que los umbrales se han configurado para diagnosticar la dolencia, un experimento de control separado no tiene porqué ejecutarse cada vez que se ensaya una muestra. En su lugar, puede hacerse simplemente una referencia a los umbrales preexistentes para determinar el diagnóstico. Sin embargo, en determinadas realizaciones, la muestra se ensaya junto con una muestra del control tomada de un sujeto sano para proporcionar un comparador basándose en condiciones experimentales esencialmente idénticas. La muestra de prueba se ensaya generalmente en paralelo con la muestra del control. Pueden a continuación compararse los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con una alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) con los de la muestra del control para realizar el diagnóstico. En determinadas realizaciones puede también ensayarse una muestra del control de un paciente enfermo. La referencia a los controles permite niveles relativos ("alto", "bajo", etc.) de células que expresan CXCR1 en una muestra de ensayo para identificarse fácilmente e interpretarse su significancia. La referencia a los controles permite también niveles relativos de expresión de CXCR1 ("alto", "bajo" etc.) en la población de células que se va a determinar e interpretarse su significancia. Dicha determinación puede, por ejemplo, indicar los niveles promedio de expresión de CXCR1 por célula en la muestra de ensayo.
- 40 Por tanto, en realizaciones específicas, los niveles altos o superiores de células que expresan CXCR1 o los niveles altos o superiores de expresión de CXCR1, por ejemplo, la expresión de CXCR1 promedio por célula, o los niveles altos o superiores de células CXCR1^{hi} se correlacionan con la enfermedad activa o la mayoría de enfermedades activas asociadas a septicemia y/o RDS. De manera similar, los niveles inferiores o bajos de células que expresan CXCR1, o los niveles bajos o inferiores de expresión de CXCR1, por ejemplo, la expresión promedio de CXCR1 por célula, o los niveles bajos o inferiores de células CXCR1^{hi} pueden correlacionarse con una ausencia de inflamación o enfermedad activa asociada a septicemia y/o RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa, RDS asociado a septicemia). Esto puede definirse como "enfermedad menos activa". Puede conseguirse fácilmente que las muestras del control puedan evaluarse y determinarse los niveles de células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con una alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) a través del intervalo de gravedades de dolencias asociadas a la septicemia y/o RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa RDS asociada a septicemia). Esto puede ayudar en la correlación de los niveles de células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) en la muestra de ensayo con respecto a la gravedad relativa de la dolencia.
- 55 Cuando se controla el progreso, o se controla el tratamiento de una septicemia y/o RDS (incluyendo RDS asociado a septicemia), pueden tomarse muestras del control procedentes del sujeto en un punto temporal anterior. Pueden estar, sin embargo, basadas en valores de referencia conocidos como se ha descrito anteriormente. Por tanto, los niveles relativos de células que expresan CXCR1, los niveles relativos de expresión de CXCR1 incluyendo los niveles relativos de expresión de CXCR1 promedio por célula o los niveles relativos de células CXCR1^{hi} pueden ser con referencia a las muestras tomadas procedentes del mismo sujeto en un punto temporal diferente. En determinadas realizaciones, los niveles disminuidos de una o más de las células que expresan CXCR1, los niveles relativos disminuidos de una o más de la expresión de CXCR1 incluyendo los niveles relativos disminuidos de expresión de CXCR1 promedio por célula, o los niveles relativos disminuidos de células CXCR1^{hi} se correlacionan con un tratamiento satisfactorio.
- 65 Cuando el control de la progresión de la septicemia y/o RDS (incluyendo, aunque no de forma limitativa RDS

asociado a septicemia), los niveles aumentados de células que expresan CXCR1 aumentaron los niveles relativos de expresión de CXCR1 incluyendo los niveles relativos aumentados de expresión de CXCR1 promedio por célula o los niveles relativos aumentados de células CXCR1^{hi} pueden indicar la progresión de la dolencia o enfermedad. Por tanto, si los niveles de células que expresan CXCR1, los niveles de expresión de CXCR1 y/o los niveles de células con alta expresión de CXCR1 (definida como CXCR1^{hi}) están aumentados en una muestra tomada más tarde que una muestra del mismo paciente, esto puede indicar la progresión de la dolencia.

Específicamente, Puede indicarse la septicemia junto con uno o más de los siguientes indicadores:

- 10 definidos como temperatura corporal $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($97\text{ }^{\circ}\text{F}$) o $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($100\text{ }^{\circ}\text{F}$) (hipotermia o fiebre). Frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto.
Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto, o, en el gas de la sangre, una PaCO₂ menor de 32 mm Hg (4,3 kPa) (taquipnea o hipocapnia debida a hiperventilación).
15 Recuento de glóbulos blancos de la sangre < 4.000 células/mm³ o > 12.000 células/mm³ ($< 4 \times 10^9$ o $> 12 \times 10^9$ células/l).

Los indicadores clínicos, tal como lo entiende un experto en la materia, incluyen signos vitales tales como pO₂, respiración, hallazgos mediante rayos X, CRP, Los niveles de ESR y la temperatura del paciente y la evidencia/cuantificación de bacterias en los cultivos sanguíneos

- 20 En realizaciones específicas, la muestra es una muestra de sangre periférica o puede ser un BALF.

Las diversas realizaciones de la invención se describirán ahora con más detalle por referencia a las siguientes realizaciones y ejemplos:

25 Descripción de las figuras

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

- 30 FIG. 1d, 1e y 1f - la unión de IL-8 por linfocitos T CD4+, CD8+ y neutrófilos CD16+ respectivamente, obtenidos de la sangre periférica de un donante sano.

FIG. 2a - unión de MCP-1 a monocitos (línea discontinua) en sangre periférica obtenida de pacientes de IBD. El gráfico representa un resumen de cuatro ensayos.

- 35 FIG. 2b - unión del anticuerpo contra CCR2 a monocitos (línea) en sangre periférica obtenida de pacientes de IBD. El gráfico representa un resumen de cuatro ensayos.

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

- 40 FIG. 4 - El sistema de leucaféresis completo.

FIG. 5 - La bomba con detector de aire y detector óptico (4).

- 45 FIG. 6 - Resultados de los ensayos de agotamiento in vitro realizados en la matriz acoplada a bMCP-1 que muestra la capacidad para eliminar las células que expresan CCR2 de la sangre de tres donantes sanos.

FIG. 7 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo separador, del derivado de la proteína madura MCP-1 que contiene la modificación de Gln a pyroGlu

- 50 FIG. 8 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo separador, del derivado de la proteína madura MCP-1 que contiene la modificación de Gln a pyroGlu y la sustitución de Met a Norleu

FIG. 9 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo separador, del derivado de MCP-1 truncado que contiene la sustitución de Met a Norleu

- 55 FIG. 10 - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de MCP-1 y MCP-5

FIG. 11 - Secuencia y biotinilación, mediante un grupo separador, del derivado de MCP-5 truncado (extremo C) que contiene la modificación de Ile a Lys

- 60 FIG. 12 - ejemplo de criterios de clasificación para monocitos que expresan CCR2

FIG. 13 - Frecuencia de los neutrófilos en la sangre periférica de pacientes de RDS y en controles sanos (HC). Las barras representan el promedio y la SEM de granulocitos positivos para CD16 en la sangre de 8 pacientes

- 65

de RDS y 20 HC. La sangre se analizó para determinar la expresión de marcadores específicos de células mediante citometría de flujo.

5 FIG. 14 - Expresión de CXCR1 y CXCR2 en neutrófilos procedentes de pacientes con RDS. La sangre se analizó para determinar la expresión de receptores de quimioquina mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio y la SEM de neutrófilos positivos para CXCR1 y positivos para CXCR2 en 6 pacientes de RDS. La sangre se analizó para determinar la expresión de marcadores específicos de células mediante citometría de flujo y los neutrófilos se caracterizaron como granulocitos que expresan CD16.

10 FIG. 15 - Unión de IL-8 biotinilada (bIL-8) a neutrófilos de un control sano. Las barras representan el porcentaje de neutrófilos que se unen a la IL-8 biotinilada, analizado mediante citometría de flujo.

15 FIG. 16 - Agotamiento de neutrófilos con un anticuerpo dirigido contra CXCR1 y MACS. Las barras representan el porcentaje de neutrófilos positivos para CXCR1 antes y después de la MACS. La sangre periférica de un paciente de RDS se usó para el experimento.

20 FIG. 17a - Frecuencia de neutrófilos que expresan CCR5 en pacientes con RDS (n=6) y controles sanos (n=20). Las barras representan el promedio y la SEM de neutrófilos que expresan CCR5, analizado mediante citometría de flujo.

FIG. 17b - Frecuencia de células que expresan CCR5 en la sangre de controles sanos y pacientes de RDS y en BALF de un paciente de RDS. Las barras representan el promedio y la SEM de neutrófilos que expresan CCR5, analizado mediante citometría de flujo.

25 FIG. 18 - Unión de RANTES y CCR5 (linfocitos T y neutrófilos) o RANTES y CCR1 (monocitos). Las barras representan el porcentaje de células positivas en la sangre del control sano.

FIG. 19 - Agotamiento de neutrófilos que expresan CCR5 con un anticuerpo dirigido contra CCR5 y MACS.

30 FIG. 20 - Secuencia y biotinilación de un derivado de RANTES

35 FIG. 21 - Resultados de los ensayos de agotamiento in vitro realizados sobre la matriz acoplada a RANTES biotinilado que muestra capacidad para eliminar las células que expresan el receptor de quimioquinas procedentes de sangre periférica extraída de un donante sano.

Descripción de las realizaciones preferidas

40 La septicemia se define como un síndrome de inflamación sistémica (SIRS) en respuesta a una infección. Si no se trata correctamente, puede conducir a un síndrome de disfunción orgánica múltiple potencialmente mortal. Por tanto, la invención puede estar destinada a tratar el SIRS y/o el síndrome de disfunción orgánica múltiple. En pocas palabras, el aumento de la permeabilidad vascular debido a las citoquinas inflamatorias liberadas conlleva a una disminución de la presión sanguínea. Como consecuencia, la circulación es insuficiente en órganos importantes, tales como los riñones y pulmones, lo que puede conducir a la disfunción orgánica.

45 El mecanismo celular exacto del progreso del SIRS sigue siendo desconocido, pero se ha demostrado que los neutrófilos muestran una alteración en la capacidad de migración hacia el tejido infectado en pacientes que padecen septicemia. Los neutrófilos actúan como la primera línea de defensa frente a los patógenos invasores. Si los neutrófilos no pueden migrar eficazmente al tejido infectado, la infección persistirá, lo que contribuye a una respuesta inflamatoria sistémica.

50 Además, en un estado final del SIRS, los neutrófilos activados migran al tejido sano de órganos remotos (no afectados por la infección), causando la destrucción del tejido.

La combinación de disfunción orgánica y destrucción tisular puede ser fatal para el paciente. Factores que producen un aumento en la permeabilidad vascular:

55 Moléculas proinflamatorias tales como la interleuquina 1-beta, interleuquina 6 y factor de necrosis tumoral-alfa, liberados por los macrófagos en el hígado y en el bazo y los gránulos liberados por los mastocitos.

Ejemplos

60 En los ejemplos dados siguientes, debe señalarse que los ejemplos que no comprenden el receptor de CXCR1 y los agentes capaces de unirse al mismo son meramente una referencia o comparación con la invención reivindicada.

Materiales y procedimientos

65 *Aislamiento de leucocitos de sangre periférica.* Sangre periférica heparinizada procedente de donantes de sangre sanos o pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) se fijó con 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 sanguíneos.

Quimioquinas. Los leucocitos se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 4 °C con MCP-1 o IL-8 biotinilados o marcados con Alexa647 Fluor® (en concentraciones de 10 ng/μl y 50 ng/μl). A continuación, las células se lavaron con tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo. Todas las quimioquinas utilizadas en los Ejemplos fueron proporcionadas por Almac Sciences Scotland Ltd, Edimburgo, Escocia.

Ensayo de citometría de flujo. El ensayo de citometría de flujo se realizó en dos citómetros láser FACS Calibur (BD Immunocytometry systems, San José, CA, Estados Unidos). Diez mil células se contaron y se analizaron en cada muestra. Para el análisis de datos, se usó el programa informático Cell Quest Pro de Becton Dickinson.

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

Ejemplo 2 - Afinidad de las células sanguíneas por la IL-8 biotinilada. En la Fig. 1 se muestra la unión a IL-8 biotinilada (CXCL8) de linfocitos CD4+ (Fig. 1d), de los linfocitos CD8+ (Fig. 1e) y de los neutrófilos CD16+ (Fig. 1f) obtenidos de donantes sanos. Después de 30 min de incubación, todos los neutrófilos CD16+ se unieron a la IL-8. Por el contrario, no se observó unión de linfocitos T CD4+ y de linfocitos T CD8+.

Ejemplo 3 - Se investigaron monocitos para determinar su expresión de CCR2 (Fig. 2b) y su capacidad para unirse a MCP-1 (Fig. 2a). Se observó la expresión de CCR2 en todos los monocitos, donde la mayoría de estos expresaron altos niveles, mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra CCR2 (FIG. 2b). La unión de MCP-1 a los monocitos que se muestra en la Fig. 2a corresponde a la población que expresa CCR2^{hi}, que se muestra en la Fig. 2b. Por tanto, MCP-1 se une favorablemente a las células que expresan CCR2^{hi}.

Ejemplo 4 - Leucaféresis personalizada

DISEÑO Y PROPIEDADES DE LA COLUMNA

Introducción

Aféresis es un tratamiento establecido que se utiliza para agotar los componentes de la sangre, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. Leucaféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para la eliminación de glóbulos blancos de la sangre, los leucocitos. El paciente se conecta a un sistema de circulación de sangre extracorpórea; la sangre se extrae de una vena de un brazo, se hace pasar a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. Los efectos secundarios de la leucaféresis son variables, desde eventos leves como cefalea, mareos, hipotensión, palpitaciones y enrojecimiento observado en de 0,1 al 5 % de los pacientes tratados.

La columna

Se pretende utilizar la columna como un tratamiento de leucaféresis para la septicemia. Eliminará específicamente los leucocitos que expresan CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5, en particular los monocitos, mediante el uso de un reactivo de unión, más específicamente una resina que contiene MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y/o CXCL8 o una resina que contiene CCL5, CCL3 o CCL8, que aprovecha la interacción entre la quimioquina y CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5. La columna consiste en tres componentes combinados, la carcasa de plástico, la matriz de estreptavidina (SA) Sepharose™ BigBeads y uno o más MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, CXCL8, CCL5, CCL3 o CCL8 biotinilados unidos a la matriz. El tratamiento se lleva a cabo usando las mismas técnicas que un procedimiento de aféresis convencional.

La carcasa de plástico (Fig. 3)

La carcasa de plástico, diseñada para mantener un flujo de sangre continuo a través de la matriz, consiste en un cuerpo transparente y una parte superior de color rojo. La parte superior tiene una placa de distribución (2) en el sitio de entrada de flujo (1) para distribuir la sangre uniformemente sobre todo el área de la matriz. La placa es la primera barrera de seguridad para evitar que las partículas más grandes fluyan a través de la columna y hacia la sangre del paciente. Las unidades de filtro (3 y 4) de seguridad se sitúan en los sitios de entrada (1) y salida (5) de flujo de la carcasa de plástico. La unidad de filtro de seguridad contiene tres filtros diseñados para ser una barrera sólida y detener todas las partículas más grandes que las células sanguíneas que atraviesan la columna. El diseño de la carcasa de plástico se muestra en la Figura 3. El diseño con filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos del dispositivo de columna minimizará el riesgo de fugas de partículas hacia el paciente, incluido el caso en el que el dispositivo se coloque del revés con el flujo de sangre en dirección opuesta a la prevista.

Estreptavidina Sepharose™ BigBeads

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

Reactivo de unión

El tercer componente del dispositivo se encuentra acoplado a la matriz, uno o más reactivos de unión que se unen específicamente a CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5. Se pueden emplear una o más quimioquinas seleccionadas del grupo que consiste en MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y CXCL8 y/o CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8 o CCL5, CCL3 o CCL8 (se une a CCR5). Estos péptidos pueden ser sintéticos, versiones genomanipuladas de la quimioquina humana, que están truncadas y biotiniladas, pero retienen la actividad de unión al receptor de CCR2, CXCR1, CXCR2 y/o CCR5. Al biotinilar la quimioquina genomanipulada, es capaz de unirse a las moléculas de estreptavidina de la matriz de Sepharose™. Se sabe que la unión biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas más fuertes, con un valor de la Kd de aproximadamente 4×10^{-14} M. La relación calculada de los sitios de unión estreptavidina:biotina en la columna es de 10:1. Por lo tanto, el acoplamiento entre la matriz y la quimioquina será inmediato, minimiza el riesgo de que la quimioquina se desacople de la matriz.

El sistema de aféresis

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

El circuito

El sistema se ilustra en la Figura 4. El paciente (1) se conecta al circuito extracorpóreo mediante agujas estériles Venflon por las venas de los brazos derecho e izquierdo. Una bolsa (3) de suero salino también se conecta, y la solución salina se bombea con una bomba ACD (2). La sangre se extrae por un brazo del paciente a través del sistema de conducciones estériles mediante la bomba de sangre (4) y se hace pasar a través de la columna (6) y se devuelve al paciente. El sistema de conducciones está conectado a la columna mediante acoplamientos de tipo luer-lock convencionales para diálisis. Los acoplamientos de la columna tienen un código de colores para su correcto montaje; conducciones de color rojo para el flujo de entrada a la parte superior de la columna de color rojo y conducciones azules para el flujo devuelto al paciente. Está presente un detector de aire (8). Se utilizan sensores de presión de entrada (5) y Pven (7) para supervisar la presión en el circuito.

La bomba 4008 ADS

Una bomba de aféresis, de Fresenius Medical Care, controla la entrada y salida de flujo del paciente, la presión de la circulación extracorpórea y puede discriminar el aire con una trampa de burbujas y un detector de aire. Un filtro de captura de coágulos se coloca dentro de la trampa de burbujas. La bomba también tiene un detector óptico para distinguir entre luz, por ejemplo, la solución salina o aire presente en el sistema de conducciones; y oscuridad, por ejemplo, la sangre presente en el sistema de conducciones.

Un diagrama esquemático de la bomba, que muestra el detector de aire y el filtro óptico se muestra en la Figura 5. Si el sistema de la bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas, o si los valores de la presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba se detiene inmediatamente y se emite una alarma visual y sonora.

Leyenda de la Fig. 5:

1. Monitor
2. Soporte de la bolsa de residuos
3. Módulos (izquierda a derecha - Bomba de sangre, bomba ACD, detector de aire)
4. Lugares reservados para futuros módulos
5. Soporte del absorbancia
6. Detector de gotas
7. Mástil IV

Preparación del paciente

El paciente recibirá anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Se usará una solución salina estéril con heparina 5000 IE para cebar el sistema extracorpóreo, después, se añadirá una inyección de bolo con heparina 4000 IE al circuito al principio de cada sesión de tratamiento.

Tiempo y caudal de leucaféresis

El sistema de aféresis deberá hacerse funcionar a un caudal de 30-60 ml/min. El tratamiento finaliza cuando se han hecho circular 1800 ml de sangre.

5

Condiciones de almacenamiento

Los dispositivos de columna deberán almacenarse entre 1 y 25 °C, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Los datos de estabilidad > 3 meses no indican diferencias en la funcionalidad con el tiempo o la temperatura (temperatura ambiente y refrigerados). Las columnas se mantendrán en condiciones de refrigeración hasta su uso. Debe evitarse el daño mecánico, como el que resulta de vibraciones bruscas y golpes. No se deberán utilizar columnas almacenadas en condiciones distintas a las recomendadas.

10

Condiciones de transporte

15

Los dispositivos de columna se transportarán en condiciones refrigeradas, evitando la congelación y las temperaturas más elevadas. Debe evitarse el daño mecánico tal como el que resulta de vibraciones bruscas y golpes.

20

Agotamiento in vitro de las poblaciones de células diana

Para investigar la capacidad de eliminar las células que expresan CCR2, se han realizado ensayos in vitro sobre la matriz acoplada a bMCP-1. Se recogió sangre de donantes de sangre y se hizo pasar a través del dispositivo de columna que contenía la matriz acoplada a bMCP-1. Se tomaron muestras de sangre antes y después del paso por la columna, y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) para determinar el agotamiento de las células que expresan CCR2.

25

Los resultados demuestran un agotamiento significativo de la población diana de los monocitos que expresan CCR2 después de la perfusión de la matriz. Los ensayos de agotamiento se realizaron sobre sangre procedente de tres donantes sanos. En la Figura 6 se muestran los resultados.

30

Los resultados in vitro demuestran una reducción específica de hasta el 80 % de la CCR2. De forma destacable, los individuos con menos células que expresan CCR2 inicialmente consiguieron un agotamiento menor. Los niveles restantes de monocitos estuvieron aproximadamente en 20-30 % en cada caso, independientemente del punto de partida. Las células que no expresan CCR2 quedaron sin alterar (no se muestran los datos).

35

Ejemplo 5 - Derivados de MCP1

MCP-1 se produjo con el resto 75 como el sitio de biotinylación de la quimioquina (numeración basada en la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2). La biotinylación permite la inmovilización de MCP-1 sobre un soporte sólido (a través de una interacción biotina-avidina). La secuencia de aminoácidos básica de MCP-1, que incluye una secuencia líder de 23 aminoácidos, se define en la SEQ ID NO: 1,

40

MKVSALLCL LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP
KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KVVQDSMDHL DKQTQTPKT

45

La secuencia de aminoácidos de la proteína madura se define en la SEQ ID NO: 2,

QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ
KVVQDSXDHL DKQTQTPKT

50

X = Met o Nleu

Los inventores han determinado que las quimioquinas pueden presentar propiedades de unión mejoradas cuando la quimioquina se biotinyla mediante un grupo separador. El separador puede evitar que el grupo biotina altere la afinidad de unión de la quimioquina.

55

Por tanto, Se sintetizará MCP-1 derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral del ε-amino de la Lys75 con PEG-Biotina (sal de TFA). El separador de PEG será el ácido 3,6-dioxoaminooctanoico. La Gln del extremo N de la proteína se somete a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Así, la primera glutamina (Gln1) de la secuencia se sustituirá con piroglutamina. La molécula se sintetizará como una amida en el extremo C (mediante la síntesis de un enlazador de amida). La molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

60

También se sintetizará un análogo de biotinMCP-1 Met a Nleu. La única metionina dentro de la secuencia se alterará a Norleucina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena y mejorar la estabilidad del

producto final. Esta molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 2.

Una vez sintetizado, se determinará la actividad de los diferentes derivados de biotinMCP-1 mediante ensayos celulares. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas se determinarán en un ensayo celular funcional de aqueorina del receptor CCR2 humano.

Ejemplo 6 - SÍNTESIS DE UN ANTAGONISTA DE CCR2 BIOTINMCP-1 QUE SE UNE AL RECEPTOR SIN ACTIVACIÓN

10 La actividad antagonista (J-H Gong y I. Clark-Lewis, J. Exp. Med., 1995, 181, 63) se ha demostrado para un derivado de MCP-1 truncado en el extremo N. En particular, la delección de los restos 1-8, da como resultado la unión a CCR2 con una Kd de 8,3 nM. Esta proteína fue incapaz de producir quimiotaxis de células CCR2 positivas, (inhibición de la quimiotaxis (CI50 20 nM)

15 La secuencia de aminoácidos de la versión truncada se define en la SED ID NO:3:

VTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ K WVQDSMDHL
DKQTQTPKT

20 Un derivado de esta versión truncada se sintetizará comprendiendo los restos 9 a 76 de la proteína madura (MCP-1 9-76) con sustitución Met64 a Nleu y se derivatizará en la funcionalidad de la cadena lateral del aminoácido ε de Lys75 con PEG-Biotina (sal de TFA). Esta molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 9. El separador de PEG será el ácido 3,6-dioxoaminooctanoico.

25 Una vez sintetizado, se determinará la actividad de los diferentes derivados de biotinMCP-1 mediante ensayos celulares. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas se determinarán en un ensayo celular funcional de aqueorina del receptor CCR2 humano.

Ejemplo 7 - DEMONSTRAR LA ELIMINACIÓN DE CÉLULAS QUE EXPRESAN CCR2 USANDO UN LIGANDO DE QUIMIOQUINA ALTERNATIVO A MCP-1

30 CCR2 también se une a las quimioquinas MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MCP-5 además de MCP-1. MCP-5 se une solo a CCR2 y debe ser selectivo en su eliminación de las células que expresan CCR2. MCP5 es una quimioquina de ratón de la que se ha demostrado que es quimiotáctica para las células CCR2 con CE50 < 3 nM.

35 La secuencia de aminoácidos de longitud completa, incluido el péptido señal, se define en la SEQ ID NO: 4

MKISTLLCLL LIATTISPQV LAGPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY R RITSSQCPR
EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFIL EP SCLG

40 La secuencia de aminoácidos del extremo N que procesa la quimioquina MCP-5 tiene 82 aminoácidos de longitud y se define en la SEQ ID NO: 5

GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY R RITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK
WVKNSINHLD KTSQTFIL EP SCLG

45 Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos sugiere que MCP-5 tiene una extensión en el extremo C 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 de MCP-5 truncada en el extremo C. Esta versión truncada comprenderá los restos 1-76 de MCP-5, definida en la SEQ ID NO: 6:

GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY R RITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK
WVKNSINHLD KTSQTFIL

50 En la versión truncada, Ile75 a sustituir con Lys, definida en la SEQ ID NO: 7:

GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY R RITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK
WVKNSINHLD KTSQTFXL

55 X es un resto de aminoácido que se puede biotinar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotina, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-

Biotina)

Después de la sustitución, la versión sustituida se biotinará en la posición 75, una lisina u otro resto adecuado tal como ornitina o ácido diaminopropanoico mediante un separador PEG (ácido 3,6- dioxoaminoctanoico). La proteína se sintetizará sobre un enlazador de amida para dar un derivado de amida en el extremo C. Esta molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 11.

Una vez sintetizado, se determinará la actividad de los diferentes derivados de biotinMCP-5 mediante ensayos celulares. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas se determinarán en un ensayo celular funcional de aqueurina del receptor CCR2 humano.

EJEMPLOS DE QUIMIOQUINAS ADICIONALES

Protocolos generales

Ensamblaje:

La síntesis química de las quimioquinas se llevó a cabo usando síntesis de péptidos en fase convencional Fmoc (SPPS) en un sintetizador de péptidos ABI 433. DIC (0,5 M en DMF) y OxymaPure (0,5 M en DMF) se usaron para la activación, anhídrido acético (0,5 M en DMF) para protección, y piperidina al 20 % en DMF para desprotección de Fmoc. Se utilizó una resina Rink Amida para la generación de quimioquinas con una amida en el extremo C y una resina Wang para las quimioquinas con ácido en el extremo C. Después del ensamblaje, la resina se lavó con DMF y DCM y después se secó *in vacuo*.

Eliminación de la protección Dde:

El grupo protector Dde se eliminó por tratamiento de la resina con una solución de hidrazina al 2,5 % en DMF (200 ml) durante un periodo de 2 horas. A continuación, se lavó con DMF.

Etapas de marcado:

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

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

2. Protección

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

3. Desprotección de Fmoc

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

4. Pareja Biotina-OSu

Una solución de Biotina-OSu (341 mg, 1 mmol) y DIPEA (348 µl) en DMF (10 ml) se añadió a la resina, y la mezcla se sonicó durante 3 horas. La resina se lavó abundantemente con DMF y DCM después se secó *in vacuo*.

Escisión:

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

Protocolo de purificación:

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

Protocolo de plegado:

El péptido puro (10 mg) se disolvió en GnHCl 6 M (16 ml) y después se diluyó rápidamente hasta una concentración de GnHCl 2 M por adición de TRIS 50 mM pH 8,5 (84 ml) que contenía GSSG 0,3mM y GSH 3 mM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y después se analizó mediante RP-HPLC (columna Jupiter C18, 250 x 4,6 mm, 10-60 % de B durante 30 minutos. La purificación mediante RP-HPLC usando un gradiente optimizado dio como resultado el producto deseado.

Ejemplo 8 - biotinMCP-1 (CCL2)

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

Modificaciones: MCP-1 humano correspondiente a los restos 1-76, se expresó inicialmente como los 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimioquina, y un péptidos señal de 23 aminoácidos que se escindió. La Gln del extremo N de la proteína se somete a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Así, la Gln1 de la secuencia se sustituyó por piroglutamina para evitar la generación de especies mixtas con Gln y pyroGlu en el extremo N. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y garantiza una preparación de quimioquina homogénea durante la fabricación en columna y el uso. La lisina natural en la posición 75 se modificó por biotilación sobre la resina. Se incorporó un separador PEG entre la funcionalidad del aminoácido ϵ y la biotina.

La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 8) se muestra, antes de su unión a las moléculas del separador PEG y la biotina en el aminoácido 75 (K):

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT-NH₂

X = pyroGlu o Gln

La secuencia de MCP-1 genomanipulada se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida tal como se describe en la sección de protocolos generales:

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-RESIN

X1 = pyroGlu o Gln
X75 = K(ivDde)

FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como el resto 75 para facilitar el marcado específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 9). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido por el acoplamiento del separador PEG y la biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegado se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimioquina activa (SEQ ID NO: 10):

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-NH₂

X1 = pyroGlu o Gln

X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina).

Datos de ionización por electropulverización espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinMCP-1 purificado plegado: obtenido = 9032,8 Da; esperado 9034,4 Da.

Datos de ensayos funcionales:

biotinMCP-1 se sometió a ensayo para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequorina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se notificó un valor de la CE50 de 9,6 nM, c.f. CE50 del MCP-1 recombinante natural es 3,1 nM.

Ejemplo 9 - biotinMCP-2 (CCL8)

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

Modificaciones: MCP-2 humano correspondiente a los restos 1-76, se expresó inicialmente como los 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimioquina, y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escindió. La Gln del extremo N de la proteína se somete a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Así, la Gln1 de la secuencia se sustituyó por piroglutamina para evitar la generación de especies mixtas con Gln y pyroGlu en el extremo N. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y garantiza una preparación de quimioquina homogénea durante la fabricación en columna y el uso. La lisina natural en la posición 75 se modificó por biotilación sobre la resina. Se incorporó un separador PEG entre la funcionalidad del aminoácido ϵ y la biotina.

5

10

La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 11) se muestra, antes de su unión a las moléculas del separador PEG y la biotina en el aminoácido 75 (K):

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVRDSMKHLDQIFQNLKP-NH₂

X = pyroGlu o Gln

15

La secuencia de MCP-2 genomanipulada se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida tal como se describe en la sección de protocolos generales:

20

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH₂

X1 = pyroGlu o Gln
X75 = K(ivDde)

25

FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como el resto 75 para facilitar el marcado específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 12). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido por el acoplamiento del separador PEG y la biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegado se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimioquina activa (SEQ ID NO: 13):

30

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE
RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH₂

X1 = pyroGlu o gln
X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina).

35

Datos de ionización por electropulverización espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinMCP-2 purificado plegado: obtenido = 9263,6 Da; esperado 9263,8 Da.

40

Datos de ensayos funcionales:

biotinMCP-2 se sometió a ensayo para determinar la actividad en un ensayo de Aequorina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se mostró que era un agonista parcial con un valor de la CE50 de 50,9 nM. c.f. CE50 del MCP-2 recombinante natural es 23,5 nM.

45

Ejemplo 10 - biotinRANTES (CCL5)

Molécula diana: RANTES derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral del ϵ -amino de la Lys(67) con Biotina (sal de TFA)

50

Modificaciones: RANTES humano correspondiente a los restos 1-68, se expresó inicialmente como los 91 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimioquina, y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escindió. La única metionina (Met67) de la secuencia se mutó a lisina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena, que se observó durante la síntesis del derivado de la secuencia natural. Esta sustitución de Met a Lys proporcionó una lisina en la posición 67, que se modificó mediante biotilación en la resina.

55

La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 14) se muestra, antes de su unión a la molécula de biotina en el aminoácido 67 (K):

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEKS-OH

La secuencia de RANTES genomanipulada se ensambló sobre un soporte sólido (resina Wang), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida tal como se describe en la sección de protocolos generales:

5

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEXS-RESIN

X es K(ivDde)

10 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como el resto 67 para facilitar el marcado específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 15). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido por acoplamiento de la biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegado se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimioquina activa (SEQ ID NO: 16).

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC
ANPEKKWVREYINSLEXS-OH

15

X es un resto de aminoácido que se puede biotilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG (por ejemplo, K(Biotina))

20

Datos de ionización por electropulverización espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinRANTES purificado plegado: obtenido = 8068,9 Da; esperado 8070,2 Da.

Datos de ensayos funcionales:

25

biotinRANTES se sometió a ensayo para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequorina contra hCCR5, (Euroscreen) y se notificó un valor de la CE50 de 0,5 nM.

Ejemplo 11 - biotinIL-8 (CXCL8)

30

Molécula diana: IL-8 derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral del ε-amino de la Lys(78) con PEG-Biotina (sal de TFA)

35 Modificaciones: IL-8 humano correspondiente a los restos 1-77, se expresó inicialmente como los 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimioquina, y un péptidos señal de 22 aminoácidos que se escindió. Se insertó una lisina adicional en el extremo C en la posición 78, y se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un separador PEG entre la funcionalidad del aminoácido ε y la biotina.

40 La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 17) se muestra, antes de su unión a las moléculas del separador PEG y la biotina:

H-AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKL
SDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX-NH₂

45 X es un resto de aminoácido que se puede biotilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.

La secuencia de IL-8 genomanipulada se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida tal como se describe en la sección de protocolos generales:

H-AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKL
SDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX-RESIN

50

X es K(ivDde)

55 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como el resto 78 para facilitar el marcado específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 18). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido por el acoplamiento del separador

PEG y la biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegado se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimioquina activa (SEQ ID NO: 19):

H-AVLPRSAKELRCQCICKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKL
SDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSK(PEG-Biotin)-NH₂

5

Datos de ionización por electropulverización espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinIL-8 purificado plegado: obtenido = 9416,9 Da; esperado 9417,0 Da.

10 Datos de ensayos funcionales:

biotinIL-8 se sometió a ensayo para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerina contra hCXCR1, (Euroscreen) y se notificó un valor de la CE50 de 18,9 nM, c.f. CE50 del IL-8 recombinante natural es 4,2 nM.

15 **Ejemplo 12 - biotinIL-8 (6-78)**

Molécula diana: IL-8 (6-78) derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral del ε-amino de la Lys(78) con PEG-Biotina (sal de TFA)

20 Modificaciones: Forma truncada de IL-8 correspondiente a los restos 6-77, los primeros cinco restos del extremo N se retiraron, y se insertó una lisina adicional en el extremo C en la posición 78, y se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un separador PEG entre la funcionalidad del aminoácido ε y la biotina.

25 La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 20) se muestra, antes de su unión a las moléculas del separador PEG y la biotina:

H-SAKELRCQCICKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGREL
CLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX-NH₂

30 X es un resto de aminoácido que se puede biotilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.

La secuencia de IL-8 genomanipulada se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida tal como se describe en la sección de protocolos generales:

H-SAKELRCQCICKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGREL
CLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX-RESIN

35

X es K(ivDde)

40 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como el resto 78 para facilitar el marcado específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 21). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido por el acoplamiento del separador PEG y la biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegado se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimioquina activa (SEQ ID NO: 22):

H-SAKELRCQCICKTYSKPFHFKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGREL
CLDPKENWVQRVVEKFLKRAENSX-NH₂

45

X es K(PEG-Biotina)

50 Datos de ionización por electropulverización espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinIL-8 (6-78) purificado plegado: obtenido = 8880,50 Da; esperado 8880,4 Da.

Datos de ensayos funcionales:

55 BiotinIL-8 (6-78) se sometió a ensayo para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerina contra hCXCR1, (Euroscreen) y se notificó un valor de la CE50 de 6,1 nM, c.f. CE50 del IL-8 recombinante natural es 4,2 nM.

Ejemplo 13 - Diagnóstico y tratamiento de RDS

Materiales y procedimientos

1. Análisis por citometría de flujo de sangre periférica

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

Tabla 2. Lista de anticuerpo para el análisis por citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD14	FITC	Beckman Coulter
CCR5	PE	Biolegend
CXCR2	PE	Biolegend
Estreptavidina	PE, APC	Biolegend
CD16	PE Cy7	BD Biosciences
CXCR1	APC	Biolegend
CD3	V450	BD Biosciences
CD14	V500	BD Biosciences

2. Ensayo de unión a quimioquina

15 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón Fix (solución salina tamponada con fosfato (PBS) citrato con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37°C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH₄Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37°C. Las células se lavaron en PBS con suero de crecimiento bovino al 2 %, se incubó con suero humano al 10 % durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y se tiñó con anticuerpos específicos de la célula junto con la quimioquina biotinilada (1 µM) o el correspondiente anticuerpo contra el receptor de quimioquina a 4°C durante 30 min (Tabla 2). La quimioquina biotinilada se detectó mediante la interacción entre la biotina y una estreptavidina conjugada con un fluoróforo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citometría de flujo FACS con el programa informático FACSDiva (BD Biosciences).

3. Agotamiento de células con anticuerpo y clasificación celular activada de forma magnética (MACS)

25 Se prepararon células a partir de sangre periférica (sección 1) y se mantuvieron en tampón MACS (PBS pH 7,2 suplementado con EDTA 2 mM y albúmina de suero bobino al 0,5 % (BSA)). Las células se incubaron con un anticuerpo dirigido contra CXCR1-APC durante 30 min a 4°C. A continuación, las células se incubaron con microperlas anti-APC durante 15 min, 4°C (Miltenyi Biotec). Las células se hicieron pasar por columnas MACS® (Miltenyi Biotec) para permitir la unión de las células CXCR1 positivas. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

Resultados y Discusión

1. Análisis por citometría de flujo de sangre periférica

40 Los glóbulos blancos de pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS) se analizaron para determinar marcadores mediante citometría de flujo. Los pacientes mostraron una frecuencia creciente de neutrófilos en circulación, 73 % comparado con el 45 % en controles sanos (Fig 13).

2. Ensayo de unión a quimioquina

45 Los neutrófilos expresaron los receptores de quimioquina CXCR1 y CXCR2 según los datos de citometría de flujo mediante los anticuerpos dirigidos contra CXCR1 y CXCR2 (Fig 14). Ambos de estos receptores se unen a la IL-8, una quimioquina inflamatoria muy importante que media en la migración de los neutrófilos hacia el sitio de la infección.

50 La IL-8 biotiniladas (bIL-8) se pudo unir a los neutrófilos en la misma medida que el anticuerpo específico del receptor, el anticuerpo dirigido contra CXCR1 (Fig 15).

3. Agotamiento de células con anticuerpo y clasificación celular activada de forma magnética (MACS).

Además, los neutrófilos se pudieron agotar eficazmente con un anticuerpo dirigido contra CXCR1 y clasificación celular activada de forma magnética (MACS) (Fig 16).

5 Los inventores concluyen que la frecuencia de neutrófilos es mayor en los pacientes con septicemia. Los neutrófilos expresan los receptores de IL-8 CXCR1 y CXCR2 y se pueden unir al ligando IL-8. Además, los neutrófilos se pueden agotar con un anticuerpo dirigido contra CXCR1 y MACS.

Ejemplo 14 - Agotamiento in vitro de las poblaciones de células diana (CCR5)

10 Para investigar la capacidad de eliminar las células que expresan CCR5, se han realizado ensayos in vitro sobre la matriz acoplada a RANTES biotinilada. Se recogió sangre de donantes de sangre y se hizo pasar a través del dispositivo de columna que contenía la matriz acoplada a RANTES biotinilada. Se tomaron muestras de sangre antes y después del paso por la columna, y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) para determinar el agotamiento de las células que expresan CCR5.

15 La molécula RANTES se sintetizó por Almac. La secuencia de aminoácidos de la molécula RANTES, antes de la biotinilación, se define en la SEQ ID NO: 14:

H2N-
 SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYI
 NSLEKS
 -CO2H

20 Esta molécula tiene la metionina natural de la posición 67 sustituida por lisina para facilitar la biotinilación en la posición 67. La versión biotinilada se muestra como la SEQ ID NO: 16.

25 La cadena lateral de la Lys 67 se biotiniló directamente para proporcionar la estructura primaria de la proteína mostrada en la figura 20. La proteína se plegó, y los puentes disulfuro formados entre la primera y la tercer cisteína de la secuencia, y entre las cisteínas segunda y cuarta.

30 Los resultados demuestran un agotamiento significativo de la población diana de las células que expresan el receptor de quimioquinas después de la perfusión de la matriz. Los ensayos de agotamiento se realizaron sobre sangre de un donante sano. En la Figura 21 se muestran los resultados.

Los resultados in vitro demuestran una reducción específica de aproximadamente el 20 % de las células que expresan la quimioquina mediante la columna. Las células que no expresan CCR5 quedaron sin alterar (no se muestran los datos).

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ITH Immune Therapy Holdings AB

40 <120> TRATAMIENTO DE DOLENCIAS ASOCIADAS A LA SEPTICEMIA

<130> P117817WO00

45 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

50 <211> 99

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido sintético

<400> 1

ES 2 688 081 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Thr

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

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> X
 <222> (64)..(64)
 <223> X = metionina o norleucina

<400> 2

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

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

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

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser 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> Péptido sintético

5

<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

10

<210> 4

<211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Glu Pro Ser Cys Leu Gly
100

20

ES 2 688 081 T3

<210> 5
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 5
 10
 Gly Pro Asp Ala Val Ser Thr Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Val Val
 1 5 10 15
 Lys Gln Lys Ile His Val Arg Lys Leu Lys Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
 20 25 30
 Ser Ser Gln Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Arg Thr Ile Leu Asp
 35 40 45
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys Trp Val Lys Asn Ser Ile
 50 55 60
 Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe Ile Leu Glu Pro Ser Cys
 65 70 75 80
 Leu Gly
 <210> 6
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 6
 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 Ile Leu
 65 70 75
 25
 <210> 7
 <211> 76

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> X
 <222> (75)..(75)
 10 <223> X es un resto de aminoácido que se puede biotinilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina)

<400> 7
 15

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	Xaa	Leu		
		65					70					75			

20 <210> 8
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

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

<400> 8

ES 2 688 081 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 Lys Thr
65 70 75

5 <210> 9
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

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

20 <220>
<221> X
<222> (75)..(75)
<223> X es K(ivDde)

<400> 9

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

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

30 <210> 10
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 688 081 T3

- <220>
<223> Péptido sintético
- 5 <220>
<221> X
<222> (1)..(1)
<223> X es pyroGlu o Gln
- 10 <220>
<221> X
<222> (75)..(75)
<223> X es un resto de aminoácido que se puede biotinilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.
- 15 <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 | | | | | |
- 20 <210> 11
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Péptido sintético
- 30 <220>
<221> X
<222> (1)..(1)
<223> X es pyroGlu o Gln
- <400> 11

ES 2 688 081 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 Lys Pro
65 70 75

5 <210> 12
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

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

20 <220>
<221> X
<222> (75)..(75)
<223> X es FmocLys(ivDde)

<400> 12

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

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

30 <210> 13
<211> 76
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 688 081 T3

<223> Péptido sintético

<220>

<221> X

5 <222> (1)..(1)

<223> X es pyroGlu o Gln

<220>

<221> X

10 <222> (75)..(75)

<223> X es un resto de aminoácido que se puede biotinilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.

<400> 13

15

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> 68

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25

<400> 14

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

ES 2 688 081 T3

<210> 15
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10
 <220>
 <221> X
 <222> (67)..(67)
 <223> X es K(ivDde)
 15
 <400> 15
 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
 <210> 16
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25
 <220>
 <221> X
 <222> (67)..(67)
 <223> X es un resto de aminoácido que se puede biotinilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y
 30 opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.
 <400> 16

ES 2 688 081 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 Xaa Ser
65

<210> 17

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (78)..(78)

<223> X es un resto de aminoácido que se puede biotinilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.

<400> 17

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (78)..(78)

ES 2 688 081 T3

<223> X es K(ivDde)

<400> 18

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 78

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <220>

<221> X

<222> (78)..(78)

<223> X es K(PEG-Biotina)

20 <400> 19

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 73

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

ES 2 688 081 T3

<220>

<221> X

<222> (73)..(73)

5 <223> X es un resto de aminoácido que se puede biotinilar, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula separadora tal como PEG.

<400> 20

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

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

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

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

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
65 70

10

<210> 21

<211> 73

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

20

<220>

<221> X

<222> (73)..(73)

<223> X es K(ivDde)

25

<400> 21

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

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

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

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

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
65 70

30

<210> 22

<211> 73

<212> PRT

ES 2 688 081 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> X

<222> (73)..(73)

<223> X es K(PEG-Biotina)

10

<400> 22

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

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

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

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

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser Xaa
 65 70

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimioquina CXCR1 para su uso en el tratamiento de la septicemia o del síndrome de insuficiencia respiratoria (RDS), en donde el reactivo de unión está inmovilizado sobre un soporte sólido contenido en una columna de aféresis, a la cual se aplica sangre periférica procedente de un paciente eliminando por tanto las células que expresan CXCR1 de la sangre periférica del paciente.
2. El reactivo de unión para el uso de la reivindicación 1 en donde:
- (i) la septicemia es un síndrome de inflamación sistémico o el tratamiento está destinado a tratar o prevenir el síndrome de disfunción orgánica múltiple o en donde el RDS es RDS agudo o RDS asociado a septicemia; y/o
 - (ii) el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CXCR1 es un agonista o un antagonista de CXCR1; y/o
 - (iii) el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CXCR1 se selecciona de un anticuerpo y una quimioquina; y/o
 - (iv) las células que expresan CXCR1 son monocitos, macrófagos o neutrófilos; y/o
 - (v) el paciente ha sido seleccionado para el tratamiento sobre la base de detectar un aumento en el nivel de células que expresan CXCR1, niveles de expresión de CXCR1 y/o niveles de células con una elevada expresión de CXCR1 en una muestra obtenida del paciente; y/o
 - (vi) el 20-50 % de la sangre del paciente se aplica a la columna en un único tratamiento.
3. Un método para vigilar el progreso del tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende determinar
- a) los niveles de células que expresan el receptor de la quimioquina CXCR1
 - b) los niveles de expresión de CXCR1; y/o
 - c) los niveles de células con una elevada expresión de CXCR1 en una muestra obtenida de un sujeto,
- en el que:
- (i) niveles elevados de células que expresan CXCR1, niveles elevados de expresión de CXCR1 o niveles elevados de células con elevada expresión de CXCR1 o niveles aumentados de células que expresan CXCR1 en comparación con el control, niveles aumentados de la expresión de CXCR1 en comparación con un control o niveles aumentados de células con elevada expresión de CXCR1 en comparación con un control indican la presencia o la progresión de la septicemia;
 - (ii) niveles disminuidos de células que expresan CXCR1, niveles de expresión de CXCR1 y/o niveles de células con elevada expresión de CXCR1 se correlacionan con un tratamiento con resultado positivo.
4. El método de reivindicación 3 en el que:
- (i) la septicemia es un síndrome de inflamación sistémico o el tratamiento previene el síndrome de disfunción orgánica múltiple o en el que el RDS es RDS agudo o RDS asociado a septicemia; y/o
 - (ii) la muestra es una muestra de sangre periférica, opcionalmente en donde las células que expresan CXCR1 son neutrófilos; y/o
 - (iii) niveles más altos de células que expresan CXCR1, niveles de expresión de CXCR1 y/o niveles de células con elevada expresión de CXCR1 se correlacionan con una enfermedad más activa; y/o
 - (iv) niveles bajos de células que expresan CXCR1, niveles de expresión de CXCR1 y/o niveles de células con elevada expresión de CXCR1 se correlacionan con una falta de enfermedad activa o una enfermedad menos activa; y/o
 - (v) niveles aumentados de células que expresan CXCR1, niveles de expresión de CXCR1 y/o niveles de células con elevada expresión de CXCR1 indican la progresión de la enfermedad.

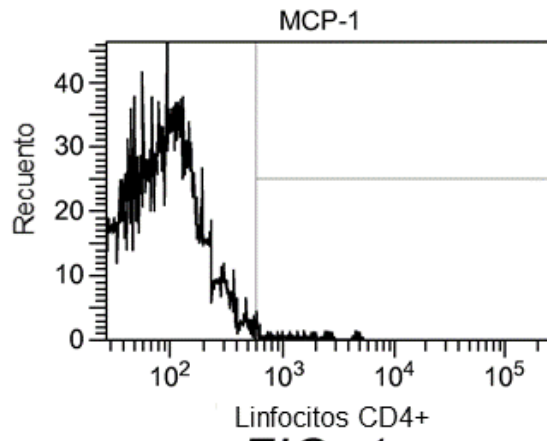


FIG. 1a

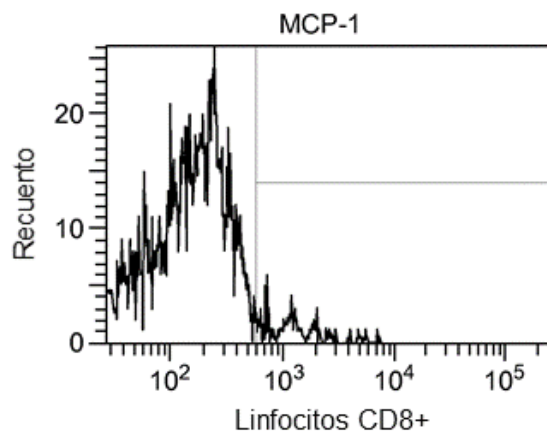


FIG. 1b

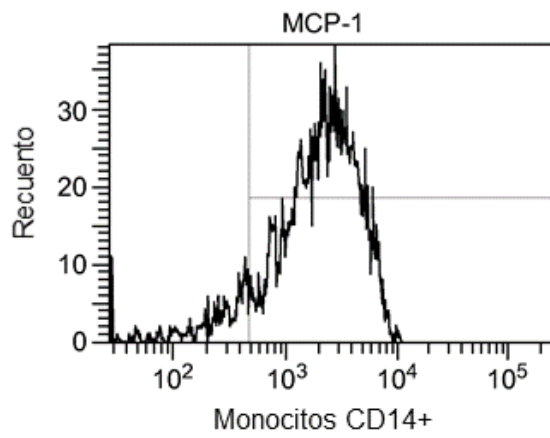


FIG. 1c

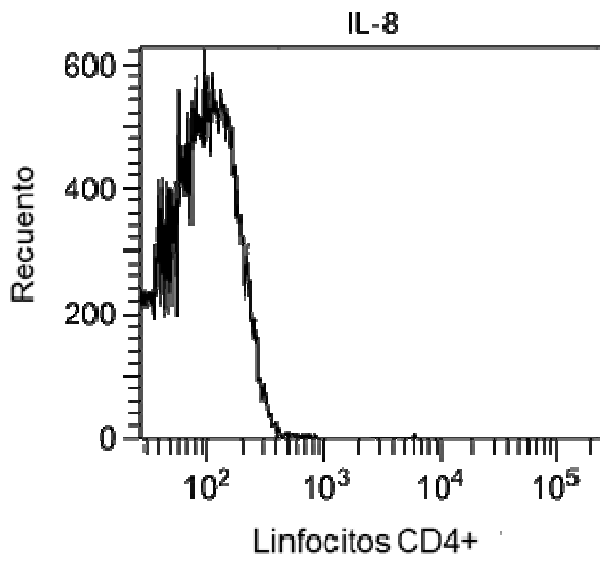


FIG. 1d

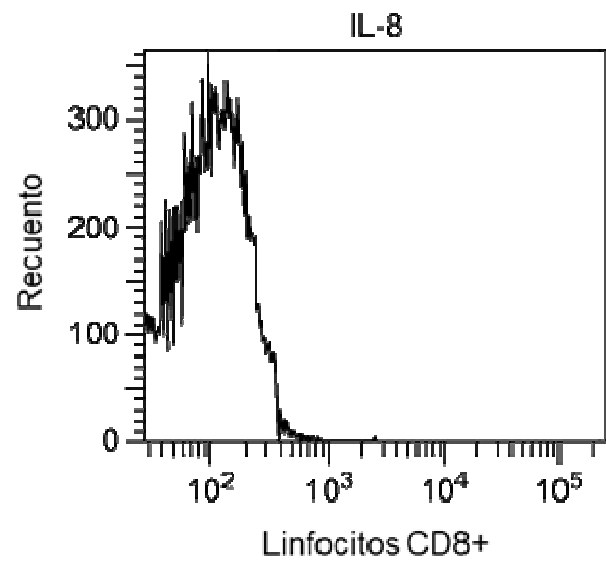


FIG. 1e

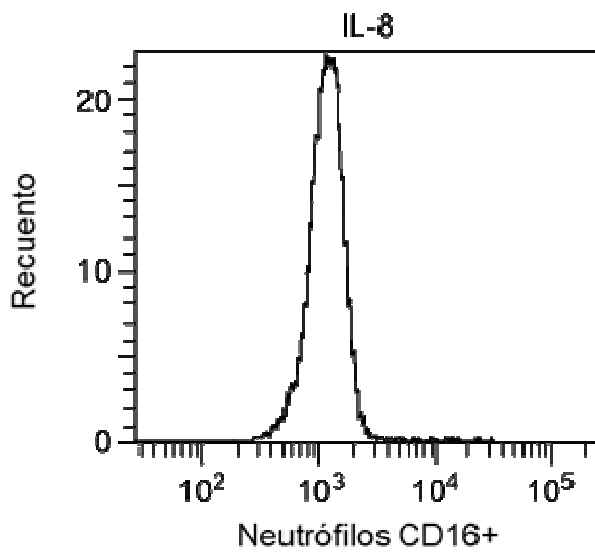


FIG. 1f

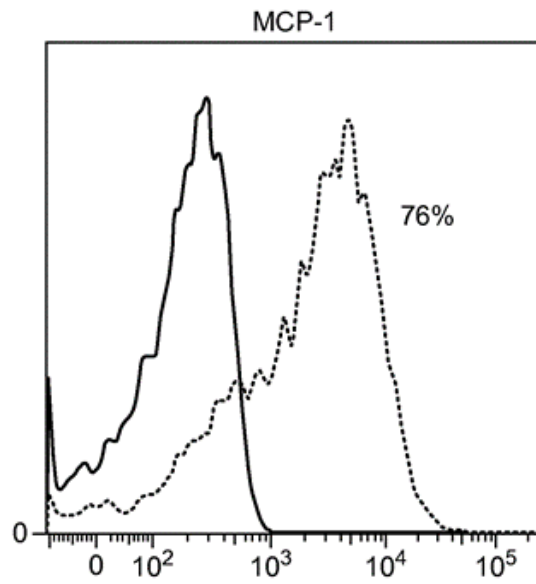


FIG. 2a

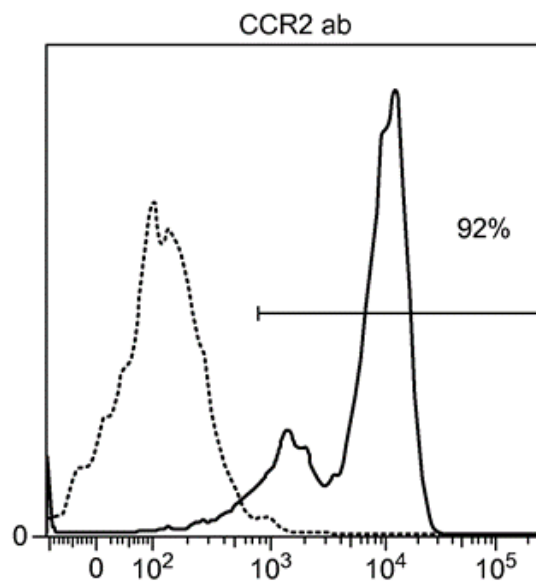


FIG. 2b

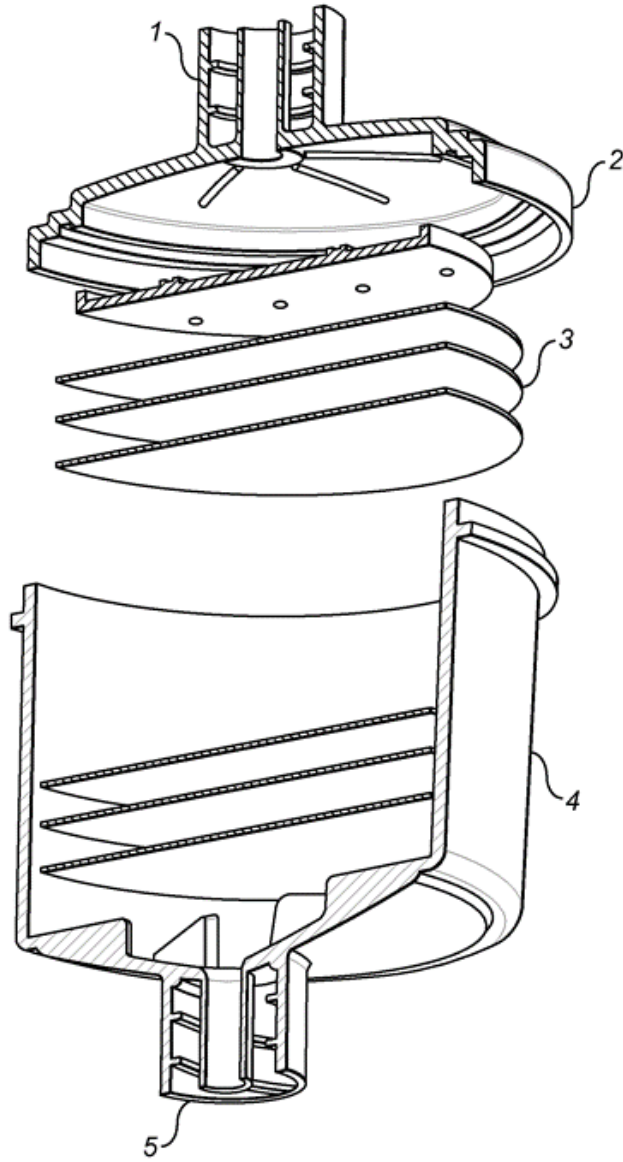


FIG. 3

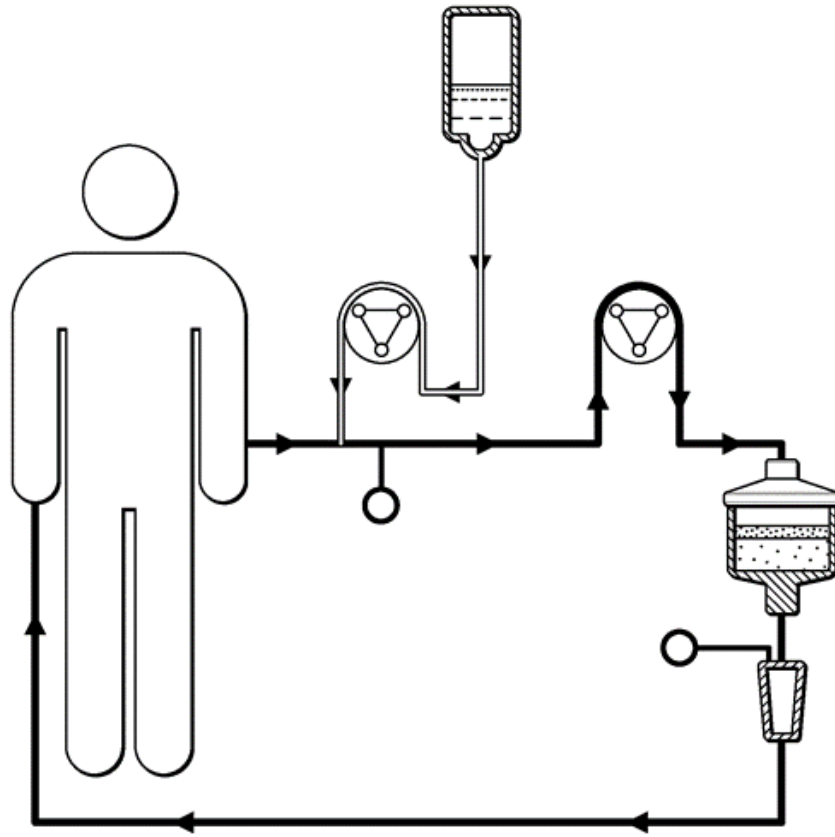


FIG. 4

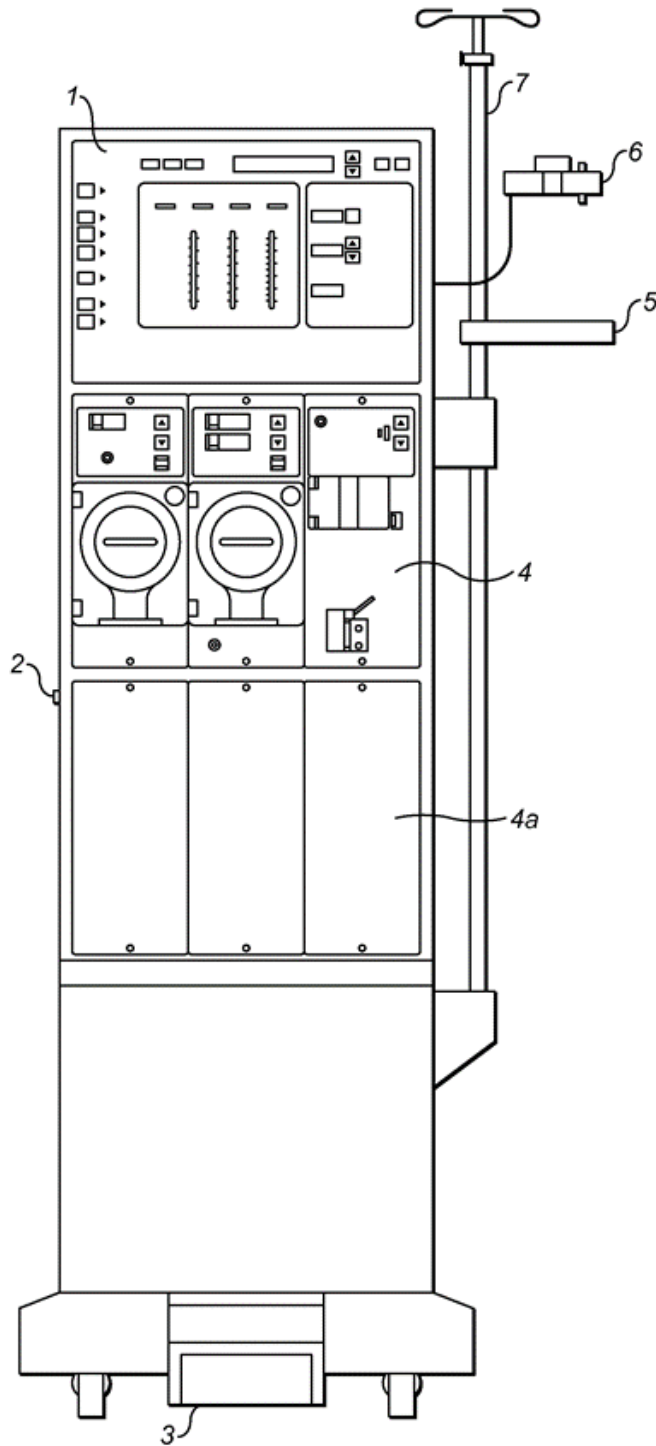


FIG. 5

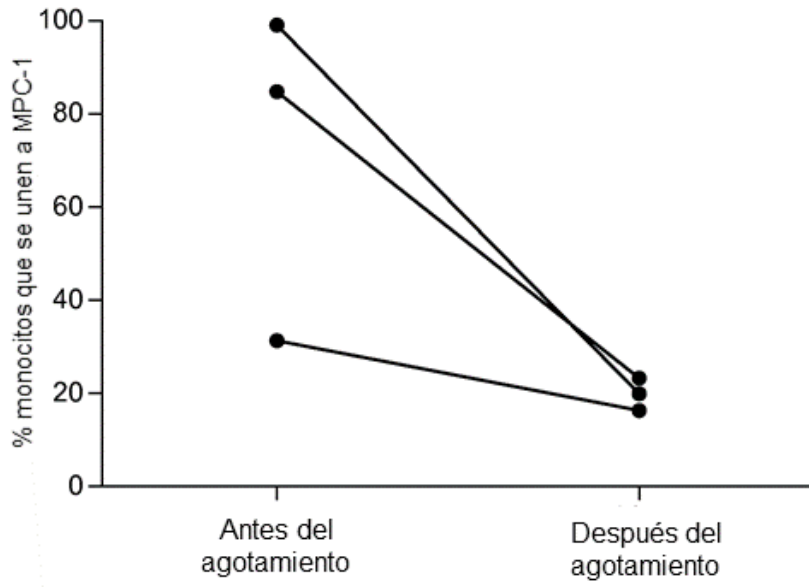


FIG. 6

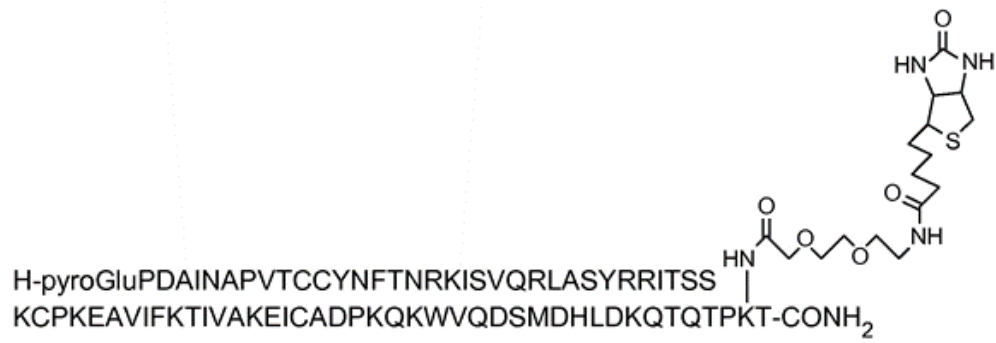


FIG. 7

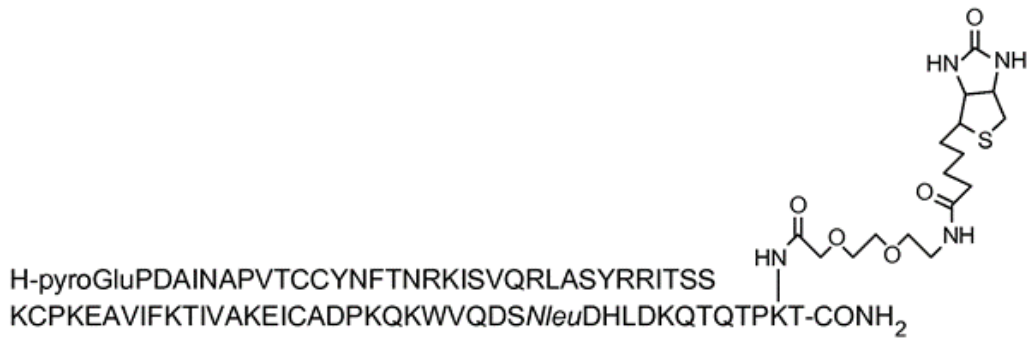


FIG. 8

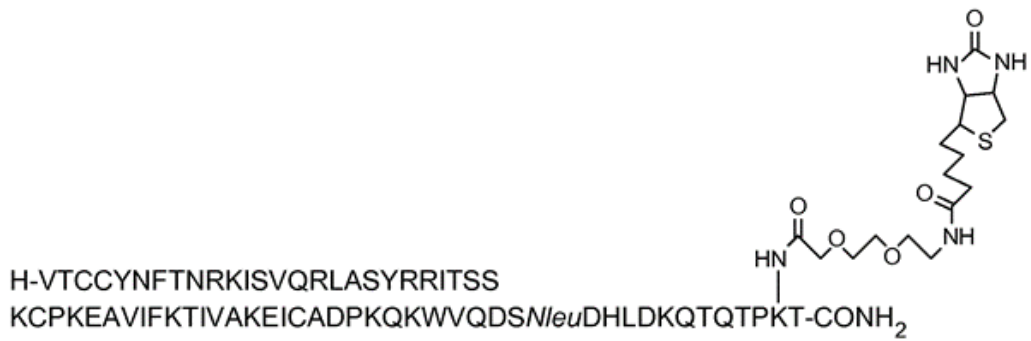


FIG. 9

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 encuentra los mejores
alineamientos locales entre dos secuencias versión 2.1u09 Diciembre 2006 Debe citarse: X.
Huang y W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 alignments < E(
0.05):score: 38 (3 max)

Comparison of:
(A) ./wwtmp/.11134.1.seq MCP1 (human) 76 bp
- 76 aa
(B) ./wwtmp/.11134.2.seq MCP-5 (mouse) 82 bp
- 82 aa
using matrix file: BL50 (15/-5), gap-open/ext: -14/-4 E(limit)
0.05
68.1% identity in 72 aa overlap (2-73:2-73); score: 370 E(10000):
1.6e-31

	10	20	30	40	50	60
MCP1	PDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQ					

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

FIG. 10



FIG. 11

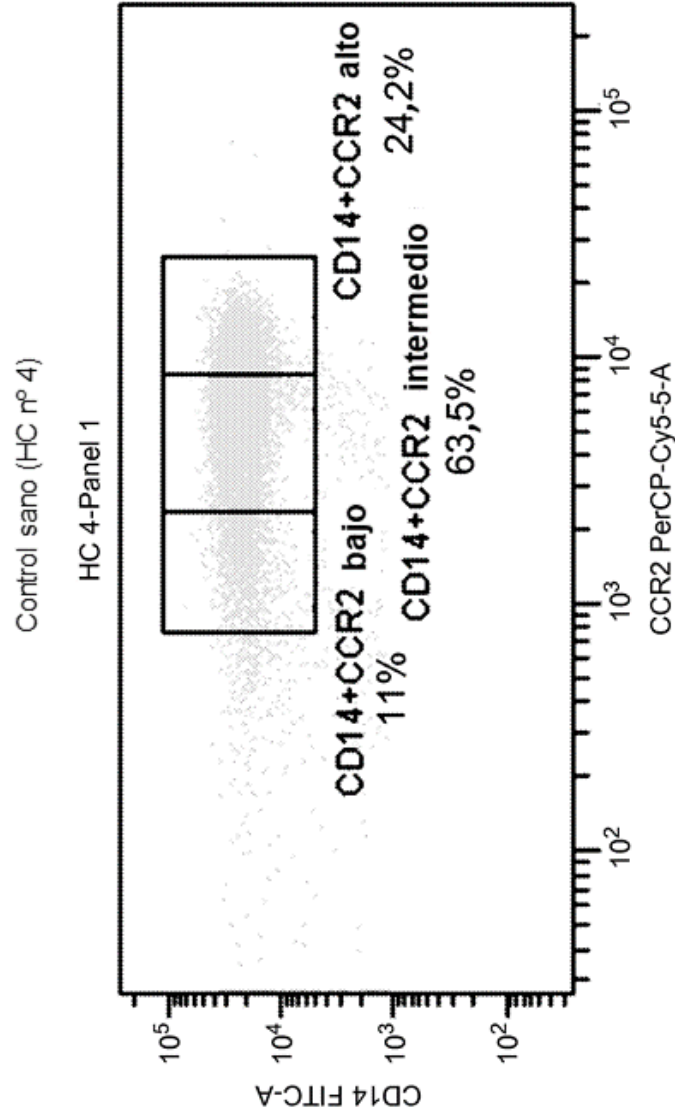


FIG. 12

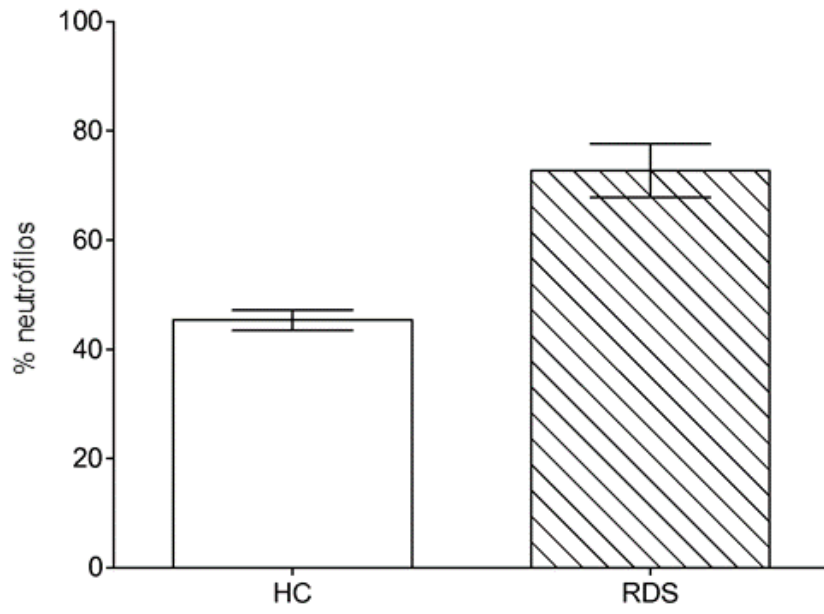


FIG. 13

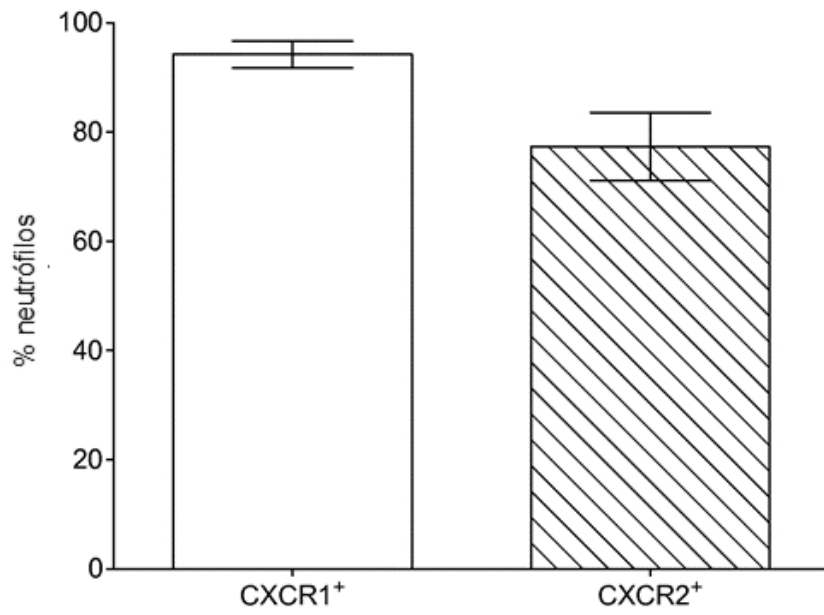


FIG. 14

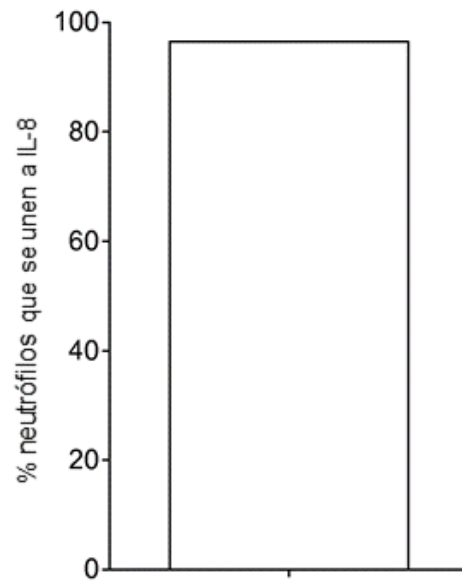


FIG. 15

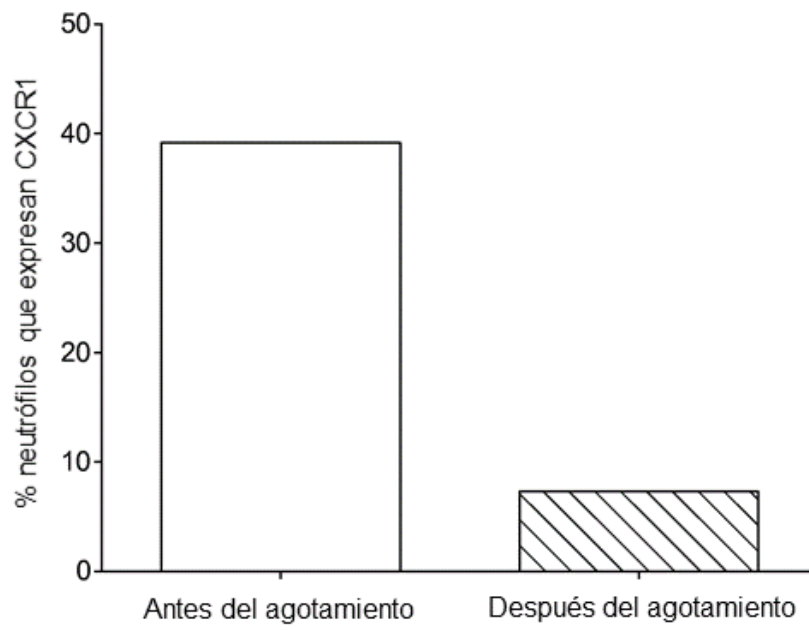


FIG. 16

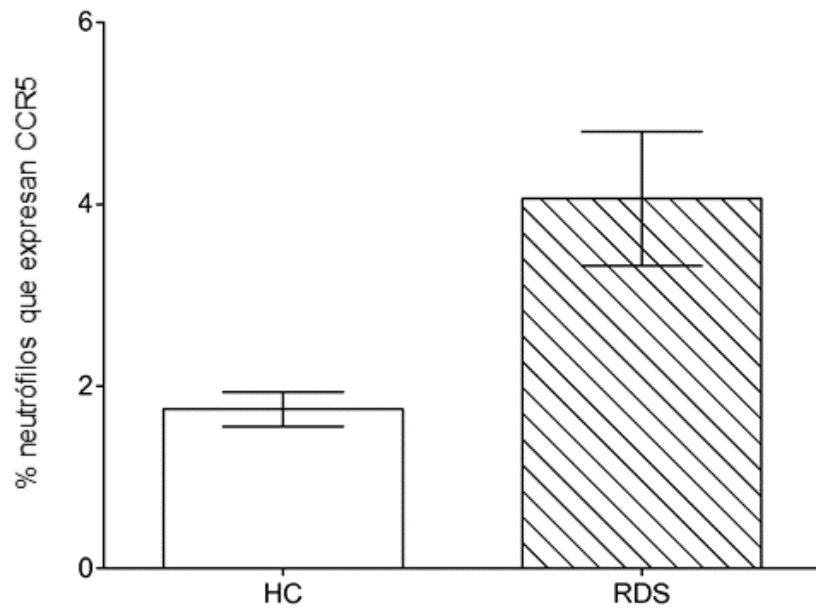


FIG. 17a

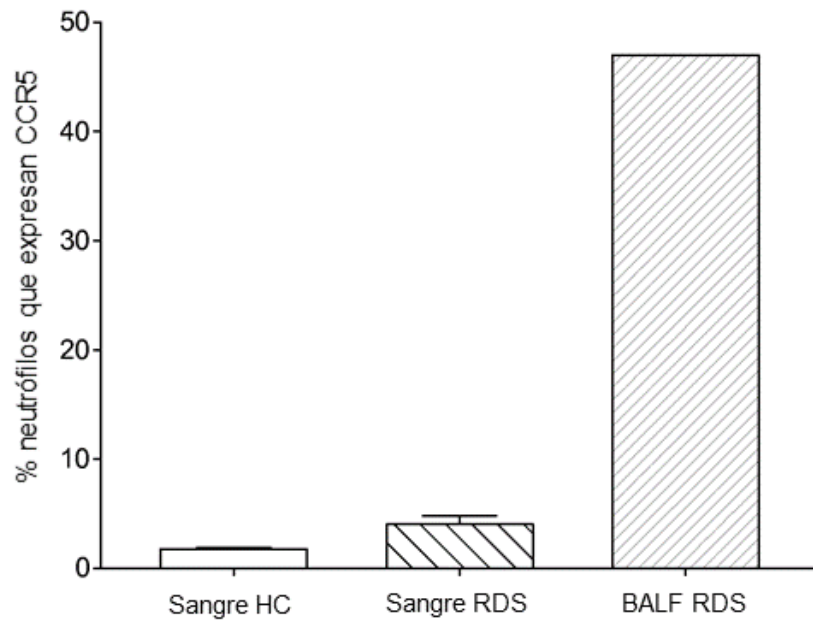


FIG. 17b

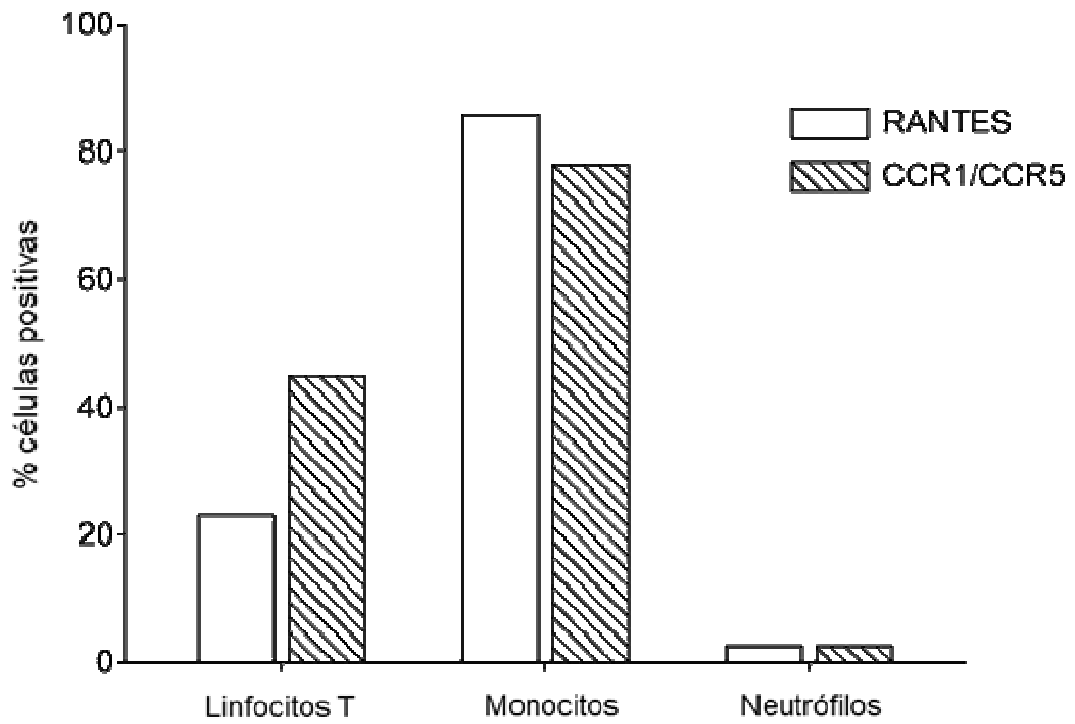


FIG. 18

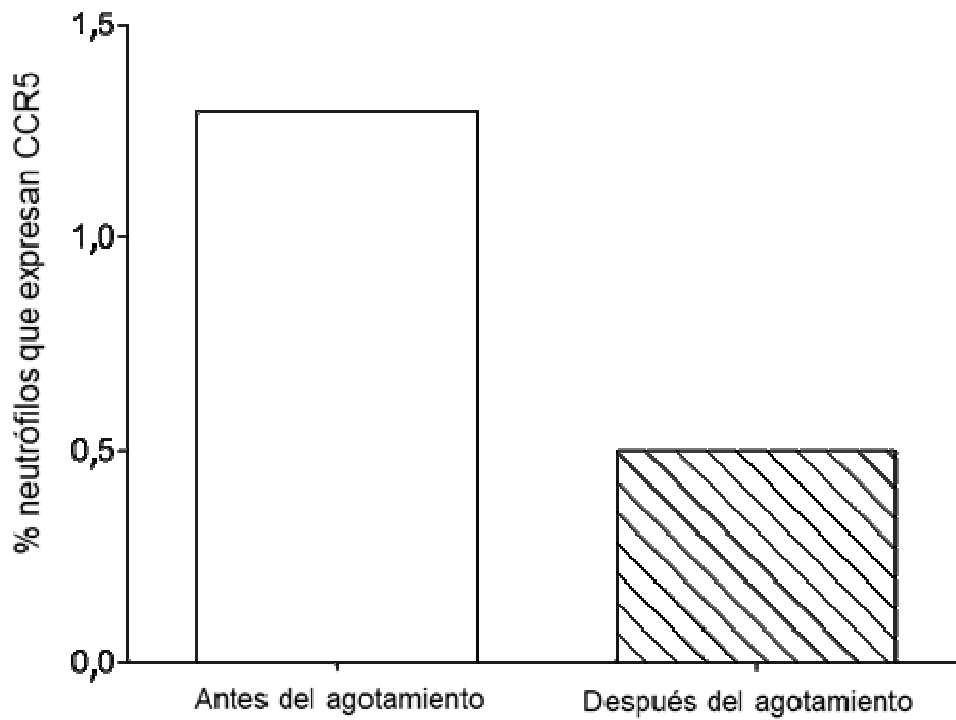


FIG. 19

H₂N-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNP
 AVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEKS-CO₂H

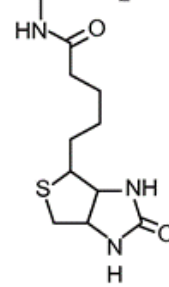


FIG. 20

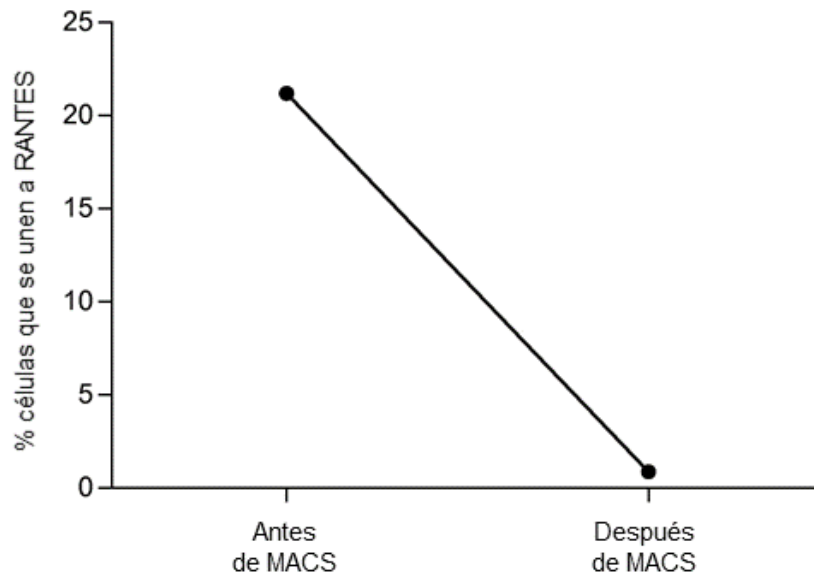


FIG. 21