

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 316**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/36** (2006.01)

**B01J 20/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/GB2012/051351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172341**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12727916 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2717941**

54 Título: **Tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:  
**13.06.2011 US 201161496242 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.12.2020**

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 2 800 316 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 del cáncer

5 **Campo de la invención**

Las diversas realizaciones de la presente invención se refieren a reactivos de unión capaces de unirse específicamente al receptor de quimiocinas, CCR7, para su uso en el tratamiento del cáncer, y reactivos de unión capaces de unirse específicamente a uno o más receptores reguladores de células T.

10

**Antecedentes de la invención**

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento celular incontrolado provocado por la acumulación de mutaciones genéticas en el ADN celular. Existen más de 200 tipos de cáncer diferentes clasificados de acuerdo con la célula de origen a partir de la cual se desarrolló por primera vez el cáncer o el tumor. Adicionalmente, los cánceres pueden clasificarse ampliamente como tumores sólidos, por ejemplo cáncer de mama, cáncer colorrectal y melanoma, o como neoplasias hematológicas tales como leucemias y linfomas.

15

Los tumores sólidos generalmente se inician y crecen como una masa anormal en un sitio local. Sin embargo, durante el transcurso de la progresión del cáncer, las células pueden adquirir la capacidad de invadir el tejido subyacente y así entrar a los sistemas circulatorio y/o linfático. Estas propiedades invasivas finalmente permiten que los tumores sólidos metastaticen a sitios distales dentro del cuerpo, y es la metástasis combinada con el crecimiento en sitios secundarios lo que explica la gran mayoría de las muertes por cáncer.

20

En contraste con los tumores sólidos, los cánceres tales como leucemias y linfomas derivan de células de origen hematológico y, por lo tanto, se manifiestan como enfermedades sistémicas. En particular, la leucemia linfocítica crónica, la forma más común de leucemia, se desarrolla a partir de linfocitos malignos que se originan en la médula ósea.

25

El cuerpo tiene muchos mecanismos intrínsecos destinados a proteger contra el desarrollo del cáncer. En este sentido, se cree que el sistema inmunitario desempeña un papel clave en la erradicación de las células que albergan mutaciones genéticas. Se sigue por lo tanto, que las células cancerosas a menudo persisten evolucionando formas para evitar el reconocimiento por parte de las células del sistema inmunitario. En particular, se ha demostrado que niveles elevados de células T reguladoras, tanto dentro de la circulación periférica como dentro del microambiente tumoral, subyacen a la supresión inmunitaria observada en pacientes con cáncer. La presencia de un mayor número de células T reguladoras también se ha identificado como una barrera para la implementación exitosa de inmunoterapias contra el cáncer.

30

35

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

40

45

El documento WO 2010/029317 se refiere a una columna cargada con una quimiocina para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad de Crohn.

El documento EP 2 067 495 se refiere a una columna de adsorción que puede usarse para agotar la sangre de un paciente en el tratamiento del cáncer.

50

**Sumario de la invención**

Las quimiocinas son una clase de moléculas de citocina implicadas en el reclutamiento celular y la activación en la inflamación. Las quimiocinas provocan quimiotaxis y activación de diversas subpoblaciones de células en el sistema inmunitario. La actividad de las quimiocinas está mediada principalmente a través de una fuerte unión a sus receptores en la superficie de los leucocitos. En ciertas realizaciones, la presente invención se basa en la comprensión de que la interacción entre las quimiocinas y las células que expresan sus receptores puede explotarse para el tratamiento de diversos cánceres y componentes de los mismos, tal como reduciendo los niveles de células tumorales circulantes, reduciendo la incidencia de metástasis tumoral, eliminando los linfocitos T reguladores (que pueden denominarse en el presente documento "Tregs") de la sangre periférica, o tratar leucemias tales como leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, su uso para reducción de volumen en AML, ALL y antes de la cosecha para el trasplante autólogo de médula ósea/células madre y para el tratamiento de la fase leucémica del linfoma. Los inventores han determinado que marcar como diana células específicas que expresan receptores de quimiocinas presenta un nuevo enfoque terapéutico para tratar tales afecciones. Por otra parte, en dichas afecciones, la expresión del receptor de quimiocinas en cada célula puede aumentarse nuevamente proporcionando un enfoque terapéutico para tratar tales

55

60

65

afecciones. Se muestra en el presente documento que los pacientes con cáncer, en particular sujetos que padecen UBC y PC, exhiben una mayor frecuencia de CCR4 que expresa Tregs circulantes y que esta respuesta es específica de Tregs (y no se aplica a otros linfocitos T). Se muestra en el presente documento que las células B que expresan CCR7 pueden agotarse eficazmente usando MIP3b como un reactivo de unión específico en un método de leucaféresis.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención sirve para reducir los niveles de células tumorales circulantes, reducir la incidencia de metástasis tumoral, retirar los linfocitos T reguladores de la sangre periférica o tratar leucemias tales como leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica. En determinadas realizaciones la invención también puede usarse para reducir el volumen en AML, ALL y antes de la cosecha para el trasplante autólogo de médula ósea/células madre y para tratar la fase leucémica del linfoma. Esto se logra usando reactivos de unión específicos para capturar receptores específicos de quimiocinas que expresan células cancerosas y linfocitos T reguladores del paciente. En consecuencia, en determinadas realizaciones la invención proporciona en un primer aspecto un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas, CCR7, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el reactivo de unión se inmoviliza sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de esta manera las células que expresan CCR7 de la sangre periférica del paciente, en donde el reactivo de unión es una quimiocina que se selecciona de CCL19 o CCL21.

En determinadas realizaciones la invención por lo tanto también proporciona un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a uno o más receptores de células T reguladoras, en particular el receptor de antígeno linfocitario cutáneo (CLA), para su uso en un método para tratar el cáncer en donde el reactivo de unión se inmoviliza directa o indirectamente sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de esta manera una o más células T reguladoras que expresan el receptor de células T (Tregs) de la sangre periférica del paciente y en donde el reactivo de unión es capaz de unirse a CCR7 en donde el reactivo de unión es una quimiocina que se selecciona de CCL19 o CCL21.

La expresión de los receptores de quimiocinas puede variar de leucemia a leucemia. Por ejemplo, la diferencia entre una leucemia con células circulantes y un linfoma con células malignas de ganglios linfáticos puede estar en la expresión de CCR7 que permite la entrada al ganglio linfático. Cuando el linfoma entra en una fase leucémica, es probable que se deba a la regulación negativa de CCR7. En consecuencia, en otras realizaciones, la invención también permite un método para tratar la leucemia que comprende aplicar sangre periférica de un paciente a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente a uno o más receptores de quimiocinas, que se han identificado estando vinculados a la leucemia, por ejemplo, regulados positivamente en leucemia, inmovilizada directa o indirectamente sobre el soporte, eliminando así una o más células que expresan el receptor de quimiocinas de la sangre periférica del paciente. Las células que expresan el receptor de quimiocina adecuado pueden identificarse aplicando los métodos descritos en el presente documento.

Como se muestra en el presente documento, pueden inmovilizarse reactivos de unión adecuados sobre un soporte sólido, tanto directa como indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células relevantes que expresan receptores de quimiocinas. Cuando se observan niveles aumentados de expresión del receptor de quimiocinas, dichas células pueden retirarse preferentemente de la sangre periférica usando las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, los métodos de diversas realizaciones de la invención pueden dirigirse como diana preferentemente a células CCR7hi como se define en el presente documento para su retirada de la sangre periférica. La expresión "alta" puede determinarse de acuerdo con técnicas de citometría de flujo convencionales. El nivel se mide con respecto a los niveles de expresión del receptor de quimiocinas en células tomadas de un sujeto sano. La Figura 5 proporciona un ejemplo de una estrategia de activación.

En determinadas realizaciones la invención proporciona además un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas CCR7 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el uno o más reactivos de unión está inmovilizado, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de esta manera una o más células que expresan CCR7 de la sangre periférica del paciente.

En determinadas realizaciones la invención tiene como objeto tratar una gama de afecciones de cáncer específico o relacionadas con el cáncer. Pueden seleccionarse afecciones específicas a partir de niveles reductores de células tumorales circulantes, reduciendo la incidencia de metástasis tumoral, retirando los linfocitos T reguladores de la sangre periférica o tratando leucemias tales como leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, su uso para reducción de volumen en AML, ALL y antes de la cosecha para el trasplante autólogo de médula ósea/células madre y tratando la fase leucémica del linfoma. La reducción de los niveles de células tumorales circulantes puede ser aplicable a una gama de cánceres. Este aspecto puede ser relevante para determinados tumores sólidos tales como cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer de pulmón. La reducción de la incidencia de metástasis tumorales puede depender de la prevención de la entrada de células metastásicas en lugares específicos, ya que esto puede dirigirse a través de interacciones quimiocina-receptor de quimiocinas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones los métodos de la invención pueden utilizarse para evitar la entrada de células metastásicas en uno o más de huesos, pulmones, ganglios linfáticos, piel e intestino delgado. En una realización, las células que expresan CCR7 están marcadas como

diana para prevenir la entrada de células metastásicas en los ganglios linfáticos.

La retirada de los linfocitos T reguladores (que pueden denominarse en el presente documento "Tregs") de la sangre periférica puede ayudar con el reconocimiento del sistema inmunitario del cáncer o tumor. Las células T reguladoras (Tregs) son una subpoblación de células T que suprimen el sistema inmunitario para mantener la homeostasis inmunitaria. En el cáncer, los Tregs pueden inhibir una respuesta inmunitaria eficaz contra el tumor y, por lo tanto, la retirada de los Tregs puede dar lugar a una activación inmunitaria mejorada contra las células cancerosas. En determinadas realizaciones este aspecto de la invención puede de esta manera ser aplicable al tratamiento de cualquier cáncer. Algunos ejemplos específicos incluyen cáncer pancreático y cáncer de vejiga, en particular cáncer de vejiga urinaria.

En determinadas realizaciones los métodos de la invención también pueden utilizarse en combinación con otras formas de terapia, tales como las quimioterapias. La reducción de volumen mediante el procedimiento de leucaféresis puede disminuir la necesidad de quimioterapia y por lo tanto disminuir los efectos secundarios.

El tratamiento de las leucemias tales como la leucemia linfocítica crónica y la leucemia mieloide crónica puede basarse en la extracción directa de células cancerosas en la sangre periférica. El uso para la reducción de volumen en AML y ALL puede depender de los efectos citorreductores marcados como diana logrados por las diversas realizaciones de la presente invención. De forma similar, la extracción de células cancerosas o células que contribuyen a la afección cancerosa (tales como Tregs) puede ser útil antes de la recolección de médula ósea o células madre de un sujeto o paciente para un trasplante autólogo de médula ósea/células madre. En determinadas realizaciones la invención también puede ser útil para tratar la fase leucémica de linfoma, cuando se encuentran exceso de linfocitos en la sangre periférica. El exceso de linfocitos, que puede incluir Tregs, puede retirarse sobre la base de las células que expresan receptores particulares, especialmente receptores de quimiocinas.

Los tres tipos principales de linfocitos son las células T, las células B y los linfocitos citolíticos naturales (NK). La frase "linfocito T" incluye células T CD4<sup>+</sup> tales como las células T auxiliares (células Th1 y células Th2) y células T CD8<sup>+</sup> tales como las células T citotóxicas. Las células Th1 pueden caracterizarse por la expresión de CCR5 y/o por la producción de IFN- $\gamma$ . Las células Th2 pueden caracterizarse por la expresión de CCR3 y/o por la producción de IL-4. Las células T reguladoras (Tregs) expresan el factor de transcripción FoxP3 y expresan altos niveles de la IL-2Ra (CD25) en la superficie celular. Además tienen niveles regulados negativamente del receptor de IL-7a CD127. Por lo tanto, las Tregs pueden definirse como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo/-</sup> y Foxp3 positivas. La función de las Tregs es regular y modular las respuestas de las células T efectoras mediante contactos directos e indirectos mediados por citocinas. Por lo tanto, los tumores inducen Tregs para evitar el reconocimiento y la eliminación por las células T efectoras como mecanismo de escape tumoral.

En determinadas realizaciones los métodos de la invención pueden implicar interacciones de unión específicas con uno o más de estos marcadores adicionales de la superficie celular (y específicos de la célula) además de la retirada basada en la unión al receptor de quimiocinas CCR7. Pueden prepararse reactivos de unión adecuados para unirse específicamente a estos marcadores de superficie celular.

CCR5 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 5 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 1605. El gen se encuentra en la posición cromosómica 3p21. El símbolo anterior y el nombre del gen es CMKBR5. Los sinónimos de este gen incluyen CC-CKR-5, CD195 CKR-5, IDDM22 y CKR5. La secuencia de referencia Entrez Gene para CCR5 es 1234, disponible el 13 de junio de 2011.

CCR6 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 6 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 1607. El gen se encuentra en la posición cromosómica 6q27. El símbolo anterior y el nombre del gen es STRL22. Los sinónimos de este gen incluyen BN-1, CD196, CKR-L3, CMKBR6, DCR2, DRY-6, GPR-CY4, GPR29. La secuencia de referencia de Genbank para CCR6 es U68030.1, disponible el 13 de junio de 2011.

CCR7 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 7 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 1608. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q12-q21.2. El símbolo anterior y el nombre del gen es CMKBR7, EBI1. Los sinónimos de este gen incluyen BLR2, CD197 y CDw197. La secuencia de referencia de RefSeq para CCR1 es NM\_001838.3, disponible el 13 de junio de 2011.

CCR8 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 8 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 1609. El gen se encuentra en la posición cromosómica 3p22. El símbolo anterior y el nombre del gen es CMKBR8, CMK. Los sinónimos de este gen incluyen CDw198, CKR-L1, CY6, GPR-CY6, TER1. La secuencia de referencia de Genbank para CCR8 es D49919.1, disponible el 13 de junio de 2011.

CXCR4 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C). La identificación de HGNC para este gen es 2561. El gen se encuentra en la posición cromosómica

2q21. El símbolo anterior y el nombre del gen es "quimiocina (motivo C-X-C), receptor 4 (fusina)". Los sinónimos de este gen incluyen CD184, D2S201E, fusina, HM89, HSY3RR, LESTR, NPY3R, NPYR, NPY3R. La secuencia de referencia de Genbank para CXCR4 es AJ132337.1, disponible el 13 de junio de 2011.

5 CXCR7 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 7 de quimiocinas (motivo C-X-C). La identificación de HGNC para este gen es 23692. El gen se encuentra en la posición cromosómica 2q37.3. El símbolo anterior y el nombre del gen es "receptor huérfano de quimiocina 1", CMKOR1. Los sinónimos de este gen incluyen GPR159 y RDC1. La secuencia de referencia de Genbank para CXCR7 es BC008459.1, disponible el 13 de junio de 2011.

10 CCR4 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 4 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 1605. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 3p24-p21.3. Los sinónimos de este gen incluyen CC-CKR-4, CD194, ChemR13, CKR4, CMKBR4, k5-5. La secuencia de referencia de Genbank para CCR4 es X85740.1, disponible el 4 de abril de 2012.

15 El antígeno linfocitario cutáneo (CLA en el presente documento) es una forma especializada de PSGL-1 expresada en las células T que se dirigen a la piel, véase Fuhlbrigge et al., Nature 389, 978-981 (30 de octubre de 1997) | doi: 10.1038/40166 (incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad). Los linfocitos T de memoria que se infiltran en la piel expresan un receptor único de referencia a la piel denominado antígeno asociado a linfocitos cutáneos (CLA), un epítipo de carbohidrato que facilita la orientación de las células T a la piel inflamada<sup>1</sup>, CLA es una modificación inducible por carbohidratos del ligando-1 de glucoproteína P-selectina (PSGL-1), una glucoproteína de superficie conocida que se expresa constitutivamente en todas las células T de sangre periférica humana.

20 CXCR3 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 3 de quimiocinas (motivo C-X-C). La identificación de HGNC para este gen es 4540. El gen se encuentra en la posición cromosómica Xq13. El símbolo anterior y el nombre del gen es "receptor 9 acoplado a proteína G", GPR9. Los sinónimos de este gen incluyen CD183, CKR-L2, CMKAR3, IP10-R y MigR. La secuencia de referencia de Genbank para CXCR3 es U32674.1, disponible el 13 de junio de 2011.

30 CXCR5 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 5 de quimiocinas (motivo C-X-C). La identificación de HGNC para este gen es 1060. El gen se encuentra en la posición cromosómica 11q23.3. El símbolo anterior y el nombre del gen es BLR1, "Receptor de linfoma de Burkitt 1, Proteína de unión a GTP (receptor 5 de quimiocina (motivo C-X-C))", "Receptor de linfoma de Burkitt 1, Proteína de unión a GTP". Los sinónimos de este gen incluyen CD185, MDR15. La secuencia de referencia de Genbank para CXCR4 es X68829.1, disponible el 29 de mayo de 2012.

35 CCR9 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 9 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 1610. El gen se encuentra en la posición cromosómica 3p22. El símbolo anterior y el nombre del gen es GPR28. Los sinónimos de este gen incluyen CDw199, GPR-9-6. La secuencia de referencia de Genbank para CCR9 es AJ132337.1, disponible el 13 de junio de 2011.

40 CCR10 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el receptor 10 de quimiocinas (motivo CC). La identificación de HGNC para este gen es 4474. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17p21.1-q21.3. El símbolo anterior y el nombre del gen es "receptor 2 acoplado a proteína G", GPR2. La secuencia de referencia de Genbank para CCR9 es AF215981.1, disponible el 29 de mayo de 2012.

50 En determinadas realizaciones la invención se basa en un reactivo de unión que es capaz de unirse específicamente a un receptor de quimiocinas, o a un receptor de células T reguladoras en algunas realizaciones. Esta reacción de unión específica permite que las células que expresan el receptor de quimiocinas o el receptor de células T reguladoras se retiren de la sangre periférica del paciente cuando la sangre se hace pasar sobre el soporte sólido sobre el cual se inmoviliza el reactivo de unión. Los receptores de quimiocinas específicos de interés incluyen CCR7 (cuando se tratan cánceres tales como las leucemias). El reactivo de unión puede ser cualquier reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor en cuestión. Por "unión específica" se entiende que el reactivo de unión muestra suficiente especificidad de unión y una afinidad/cinética de unión apropiadas para permitir la retirada de células que expresan CCR7. Si bien no se excluye que el reactivo de unión sea capaz de unirse a otras moléculas, tales como otros receptores de quimiocinas, el reactivo de unión se unirá preferentemente a las células que expresan CCR7 y, en particular, a las células que expresan niveles aumentados de CCR7. El reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR7 puede ser un agonista o un antagonista de CCR7. Ya que la condición de la enfermedad puede depender de la regulación positiva de la expresión o señalización a través de CCR7, en determinadas realizaciones el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR7 es un antagonista de CCR7. Las quimiocinas son normalmente, aunque no necesariamente de forma exclusiva (particularmente en el caso de formas truncadas o modificadas) agonistas de su receptor afín y sirven para activar las células que expresan el receptor relevante, como apreciaría un experto en la materia.

65 En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención el término "quimiocina" también comprende quimiocinas biotiniladas o marcadas de otro modo. El término "quimiocina" también comprende versiones modificadas

y truncadas de la quimiocina y fragmentos de quimiocina con la condición de que la forma modificada o truncada conserve su capacidad de unirse a su receptor afin (y por lo tanto permanece funcional en el contexto de la invención). La quimiocina no necesariamente necesita retener la actividad biológica ya que es CCR7 de afinidad de unión específica. En determinadas realizaciones, la quimiocina carece de actividad biológica, por ejemplo en términos de activación del receptor CCR7.

Las quimiocinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la presente invención para unirse a CCR7 incluyen CCL19 y CCL21.

CCL19 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 19 de quimiocinas (motivo C-C), También conocido como MIP-3b. La identificación de HGNC para este gen es 10617. El gen se encuentra en la posición cromosómica 9p13. El símbolo anterior y el nombre del gen es SCYA19, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 19". Los sinónimos de este gen incluyen "beta quimiocina exodus-3", "ligando 19 de quimiocina CC", "CK beta-11", CKb11, "ligando EB11 de quimiocina", ELC, exodus-3, "proteína 3-beta inflamatoria de macrófagos", MIP-3b. La secuencia de referencia de Genbank para CCL19 es AB000887.1, disponible el 13 de junio de 2011.

CCL21 es el símbolo génico aprobado por el HUGO Gene Nomenclature Committee para el ligando 21 de quimiocinas (motivo C-C). La identificación de HGNC para este gen es 10620. El gen se encuentra en la posición cromosómica 9p13. El símbolo anterior y el nombre del gen es SCYA21, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 21". Los sinónimos de este gen incluyen 6CKine, "beta quimiocina exodus-2", CKb9, ECL, "Quimioatrayente eficiente para linfocitos", exodus-2, "quimiocina secundaria de tejido linfoide", SLC, TCA4. La secuencia de referencia de Genbank para CCL21 es AB002409.1, disponible el 13 de junio de 2011.

Un ejemplo de una quimiocina que contiene modificaciones se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 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 N-terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas. El Gln en el extremo N de la proteína está sujeto a la formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto el Gln1 de la secuencia se sustituye con piroglutamina para evitar que se generen especies mixtas de Gln N-terminal y piroGlu (SEQ ID NO: 1). Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y uso de la columna. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 75 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 2). La lisina de origen natural en la posición 75 se modifica a través de biotilación. Puede incorporarse un espaciador de PEG entre la funcionalidad ε-amino y la biotina (SEQ ID NO: 3).

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1:

XPDSVSIPIITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE  
RWVRDSDKHLDQIFQNLXP

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

X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K(PEG-biotina).

O SEQ ID NO: 3

XPDSVSIPIITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE  
RWVRDSDKHLDQIFQNLXP

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

X75 = K(PEG-biotina).

Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 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 N-terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas. La metionina única (Met67) dentro de la secuencia está mutada a lisina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena (SEQ ID NO: 4). Esta sustitución de Met a Lys proporciona una lisina en la posición 67 que puede modificarse a través de biotilación. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 67 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 5). La versión biotilada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste

esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6:

SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEXS

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

10 Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 5 a continuación). El CCL20 modificado (MIP-3 $\alpha$ ) corresponde a los restos 1 a 70 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 26 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas (SEQ ID NO: 7). FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 68 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 8). La lisina de origen natural en la posición 68 se modifica a través de biotinilación. Puede incorporarse un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina. La proteína final puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

15 Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9:

20

ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPK  
QTWVKYIVRLLSKKVNMM

25 X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

30 Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 6 a continuación). El CXCL12 modificado (SDF-1  $\alpha$ ) corresponde a los restos 1 a 67 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 21 aminoácidos, que se escinde de una proteína inmadura de longitud total de 93 aminoácidos) y, por lo tanto, retiene el pliegue de quimiocinas (SEQ ID NO: 10). FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 64 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 11). La lisina de origen natural en la posición 64 se modifica a través de biotinilación. La proteína final puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

35

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina truncada/modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12:

KPVLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI  
DPKCLKWIQEYLEXALN

40

X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, especialmente K(Biotina)

45 O SEQ ID NO: 10:

KPVLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI  
DPKCLKWIQEYLEKALN

50 Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 7 a continuación). El CCL22 modificado (MDC) corresponde a los restos 1 a 69 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 24 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas (SEQ ID NO: 13). FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 66 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 14). La lisina de origen natural en la posición 66 se modifica a través de biotinilación. Puede incorporarse un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina. La proteína final puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

55

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15:

GPYGANMEDSVCCRDYVRYRLPLRVVVKHFWTSDSCPRPGVLLTFR  
DKEICADPRVPWVKMILNXLSQ

5

X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, especialmente K (PEG-biotina).

10

Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 8 a continuación). El CCL17 modificado (TARC) corresponde a los restos 1 a 71 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas. Puede insertarse una lisina adicional o un resto equivalente en el extremo C, en la posición 72. La quimiocina puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 72 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 17). La funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys (72) se modifica a través de biotinilación. Puede incorporarse un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina. La proteína final puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

20

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o 18:

SEQ ID NO: 16  
ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRKLKTWYQTSEDCSRDAIVFTVQGRAICS  
DPNNKRVKNAV KYLQSLERSX

25

X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado (por ejemplo, K-biotina), opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

30

SEQ ID NO: 18  
ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRKLKTWYQTSEDCSRDAIVFTVQG  
RAICSDPNNKRVKNAV KYLQSLERSK(PEG-Biotina)

35

Un ejemplo adicional de una quimiocina de las diversas realizaciones de la invención que contiene modificaciones y adaptada específicamente para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo 9 a continuación). El CCL19 modificado (MIP-3 $\beta$ ) corresponde a los restos 1 a 77 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 21 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas. Se inserta una lisina adicional en el extremo C, en la posición 78. La quimiocina puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 78 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 20). La funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys (78) se modifica a través de biotinilación. La proteína final puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

40

45

Por lo tanto, en determinadas realizaciones la invención también se refiere a una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 21:

SEQ ID NO: 19  
GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX

50

X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado (por ejemplo, K-biotina), opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

SEQ ID NO: 21

GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX

X es K(Biotina).

- 5 Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 10 a continuación). El CXCL11 modificado (ITAC) corresponde a los restos 1 a 73 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 21 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas (SEQ ID NO: 22). Se inserta una lisina adicional en el extremo C, opcionalmente a través de un espaciador de PEG, en la posición 74. La quimiocina puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

SEQ ID NO: 23:

FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG  
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNFX

- 15 X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG. El resto de aminoácido puede añadirse mediante una molécula espaciadora tal como PEG y, por lo tanto, puede ser "PEG-K".

- 20 Se incorpora FmocLys(ivDde)-OH, después del ácido Fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico, como resto 74 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 24). La funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de la Lys (74) adicional se modifica a través de biotinilación. La proteína final puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 25:

FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG  
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNFX

- 25 X es PEG-K(biotina).

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o 25.

- 30 Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 11 a continuación). La forma truncada de CCL25 humano (TECK) corresponde a los restos 1-74 de la proteína madura, que abarca la secuencia correspondiente al plegamiento de quimiocinas. La proteína madura completa es de 127 aminoácidos (el péptido señal es de 23 aminoácidos en una proteína inmadura de 150 aminoácidos). La metionina individual dentro de la secuencia se altera a Norleucina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena, que se observó durante la síntesis de la secuencia natural derivada. El Gln en el extremo N de las proteínas está sujeto a la formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto el Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar que se generen especies mixtas de Gln N-terminal y piroGlu. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y uso de la columna. La lisina de origen natural en la posición 72 se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26:

XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG  
NPKSREVQRAXKLLDARNXVF

- 45 X1 = piroGlu o Gln  
X64 = Norleucina  
50 X72 = un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo,

K(PEG-biotina).

XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG  
NPKSREVQRAXKLLDARNXVF

5 X1 = piroGlu o Gln  
X64 = Norleucina  
X72 = K(ivDde)

10 FmocLys(ivDde)-OH puede incorporarse como resto 72 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 27). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, puede llevarse a cabo como se describe en la sección de protocolo general. La quimiocina activa deseada puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28:

XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG  
NPKSREVQRAXKLLDARNXVF

15  
20 X1 = piroGlu o Gln  
X64 = Norleucina  
X72 es K(PEG-Biotina).

25 Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo de Referencia 12 a continuación). CCL27 humano (CTAC) correspondiente a los restos 1-88, inicialmente se expresa como 112 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 24 aminoácidos que se escinde. La Met (87) dentro de la secuencia se mutó a lisina para proporcionar una lisina en la posición 87 que se modificó a través de biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

30 Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29:

FLLPPSTACCTQLYRKPLSDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQR  
SICIHPQNPSLSQWFEHQERKLGHTLPKLNFGMLRKXG

35 X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K(PEG-Biotina)

FLLPPSTACCTQLYRKPLSDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQR  
SICIHPQNPSLSQWFEHQERKLGHTLPKLNFGMLRKXG

40 X = K(ivDde)

45 FmocLys(ivDde)-OH se incorpora como resto 87 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 30). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. La quimiocina activa deseada puede de esta manera comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31:

FLLPPSTACCTQLYRKPLSDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQR  
SICIHPQNPSLSQWFEHQERKLGHTLPKLNFGMLRKXG

50 X = K(PEG-Biotina).

Un ejemplo adicional de una quimiocina se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo 13 a

continuación). El CXCL10 modificado (IP-10) corresponde a los restos 1 a 78 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N-terminal de 21 aminoácidos, que se escinde) y, por lo tanto, retiene el plegamiento de quimiocinas. Un aminoácido que es capaz de biotilación, tales como lisina u ornitina, por ejemplo, puede insertarse como resto 78. La inserción puede ser a través de un espaciador, tal como un espaciador de PEG.

- 5 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 32), antes de la fijación del espaciador de PEG, moléculas adicionales de lisina y biotina:

VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL  
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP

- 10 Por lo tanto, la posición 78 puede modificarse a través de biotilación. FmocLys(ivDde)-OH puede incorporarse como resto 78 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 33). Un espaciador adecuado, tal como un espaciador de PEG, puede incorporarse entre la funcionalidad ε-amino y la biotina. La versión biotilada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

- 15 Por lo tanto, se ejemplifica en el presente documento una quimiocina modificada que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34:

VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL  
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSPX

- 20 X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K(PEG-Biotina) y puede fijarse a través de una molécula espaciadora, por ejemplo, PEG-K(Biotina).

25 Las quimiocinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden sintetizarse a través de cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, las quimiocinas se sintetizan químicamente ya que esto facilita la modificación y el marcaje etc. Sin embargo, los enfoques basados en ADN recombinante también pueden emplearse en combinación con tecnologías apropiadas de marcaje y modificación según se requiera. Como se ha indicado anteriormente, es preferible el marcaje específico de sitio de las quimiocinas de las diversas realizaciones de la invención, aunque puede emplearse cualquier técnica de marcaje que no afecte significativamente la capacidad de unión al receptor de la quimiocina. Diversas quimiocinas biotiladas específicamente para el sitio y quimiocinas nativas están disponibles en el mercado, por ejemplo de Almac, Craigavon, RU. En realizaciones específicas, la una o más quimiocinas se biotilan a través de un grupo espaciador. El espaciador puede emplearse para evitar que el grupo biotina afecte a la actividad de la quimiocina, en particular la unión de la quimiocina a su receptor afin. Cualquier espaciador adecuado que facilite la retención de las propiedades de unión al receptor de la quimiocina puede emplearse en las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, en las realizaciones específicas descritas anteriormente, pueden emplearse espaciadores distintos de los espaciadores de PEG según sea apropiado. En realizaciones específicas, el espaciador es un espaciador de polietilenglicol (PEG). Se ha demostrado que el PEG es un espaciador eficaz que permite la unión de biotina a la quimiocina (que después puede inmovilizarse en el soporte sólido a través de la interacción con estreptavidina) sin comprometer la capacidad de unión al receptor. En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, el término "anticuerpo" incluye todas las inmunoglobulinas o moléculas similares a las inmunoglobulinas con afinidad de unión específica para el receptor de quimiocina relevante (incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como humanos, cabras, conejos y ratones).

45

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR5	PE	Biolegend
CXCR7	PE	Biolegend
CCR6	PE	BD Biosciences
CCR4	PerCP Cy5.5	BD Biosciences
CCR7	PerCP Cy5.5	Biolegend

(continuación)

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR6	PerCP Cy5.5	BD Biosciences
CXCR4	APC	R&D Systems
CCR8	APC	R&D Systems

- Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención también permite una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente sobre el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa el receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente/sujeto, en donde el reactivo de unión no es una quimiocina. El reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas puede ser un agonista o un antagonista del receptor de quimiocinas. En realizaciones específicas, el reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas se selecciona de un anticuerpo y un compuesto químico.
- 10 Los materiales de soporte sólidos para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención se conocen en la técnica. "Soporte sólido" se refiere a, por ejemplo, materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas y pueden tomar la forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. Un material de soporte útil es uno que no activa las células sanguíneas para hacerlas coagular o adherirse al soporte a medida que se aplica sangre entera periférica al dispositivo. En determinadas realizaciones, se emplea un soporte tratado con un agente para proporcionarle propiedades anticoagulantes, en particular un soporte heparinizado. Como alternativa, la sangre del paciente puede tratarse con un anticoagulante tal como heparina antes de la aplicación al soporte. Algunos materiales de soporte útiles comprenden carbohidratos de alto peso molecular, en particular carbohidratos que tienen un peso molecular de 100 kDa o más, tales como agarosa, en forma particulada, opcionalmente reticulada, y celulosa. Otros materiales de soporte preferidos son polímeros, tales como poliestireno carboxilado y vidrio. El soporte de las diversas realizaciones de la invención puede proporcionarse en forma de partículas o fibras. Las partículas de soporte pueden tener forma regular, tales como esferas o perlas, o forma irregular. Pueden ser porosas o no porosas. Un tamaño de partícula promedio preferido del soporte es de 50  $\mu\text{m}$  a 2 mm. En determinadas realizaciones Sepharose™, una forma reticulada en perlas de agarosa, se usa como la matriz de la columna. Se elige por su capacidad de distribución óptima y puede proporcionar un área grande disponible para la unión por afinidad. Pueden proporcionarse soportes sólidos en forma de perlas magnéticas, con el reactivo de unión específico inmovilizado en las perlas magnéticas. Después de la captura del receptor del receptor de quimiocina CCR7 que expresa células de la sangre, Las cuentas pueden retirarse de la sangre con la ayuda de un separador magnético apropiado.
- 30 Los métodos para inmovilizar reactivos de unión en un soporte sólido se conocen en la técnica. Un reactivo de unión, tal como una quimiocina, puede inmovilizarse en el soporte de manera directa o indirecta. La inmovilización puede ser por medio de un enlazador adecuado en algunas realizaciones. Un método preferido de inmovilización indirecta de un reactivo de unión, tal como una quimiocina, se basa en la interacción entre 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 a la exclusión sustancial de otras moléculas (pequeñas) que podrían estar presentes en una muestra biológica. Algunos ejemplos de avidina incluyen avidinas que están presentes de forma natural en la clara de huevo, proteína de semillas oleaginosas (por ejemplo, harina de soja) y granos (por ejemplo, maíz) y estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano. Por lo tanto, la biotinilación del reactivo de unión y el uso de una molécula de avidina 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 biotinilada, proporcionando un soporte sólido con estreptavidina inmovilizada en su superficie, poner en contacto el soporte con una solución acuosa del reactivo de unión biotinilado y enjuagar el soporte con un disolvente acuoso. Además, las interacciones de par de unión, tales como interacciones anticuerpo - antígeno, también pueden utilizarse para la inmovilización indirecta del reactivo de unión sobre un soporte. En tales realizaciones el soporte puede derivatizarse con un miembro de un par de unión, tales como un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, como se define en el presente documento, que tiene afinidad conocida por una secuencia peptídica particular o hapteno de molécula pequeña. Incorporando al otro miembro del par de unión, tal como un antígeno, la secuencia peptídica o el hapteno sobre o dentro del reactivo de unión facilita la inmovilización sobre un soporte sólido recubierto con el anticuerpo correspondiente o fragmento o derivado del mismo. Por lo tanto, el reactivo de unión puede modificarse para incluir la secuencia peptídica o hapteno en la molécula lineal o puede añadirse como una cadena lateral o marcador. Puede emplearse cualquier par de anticuerpo-antígeno adecuado. El fragmento de anticuerpo o derivado puede ser cualquier fragmento o derivado que retenga afinidad de unión específica por el antígeno apropiado. Algunos ejemplos incluyen Fab, fragmentos  $F(ab')_2$ , scFV, dominios VH, anticuerpos de dominio único (tales como nanocuerpos), anticuerpos de cadena pesada y versión humanizada de anticuerpos no humanos, etc. Pueden utilizarse otras interacciones de alta afinidad para la inmovilización de reactivos de unión, siempre que el reactivo de unión pueda sintetizarse o derivatizarse con uno de los compañeros que interactúan y el soporte sólido sintetizado o derivatizado con el otro compañero de interacción sin pérdida de actividad de unión (es decir, la unión

del reactivo de unión al receptor de quimiocinas apropiado). La inmovilización puede producirse esencialmente a través de la misma interacción inversa en algunas realizaciones. Por lo tanto, el reactivo de unión que puede ser una quimiocina, por ejemplo, puede fijarse a un anticuerpo como se define en el presente documento, y el soporte sólido derivatizado con el antígeno. La quimiocina puede producirse como una proteína de fusión con el anticuerpo.

5 Alternativamente los reactivos de unión, tales como las quimiocinas, pueden inmovilizarse directamente sobre un soporte sólido usando técnicas de bioconjugación establecidas en el campo. Por ejemplo, la inmovilización directa de proteínas en soportes sólidos activados con bromuro de cianógeno a través de funcionalidades amino dentro de la secuencia primaria de la proteína. Como alternativa, las funcionalidades sulfhidrilo dentro de las proteínas pueden usarse para inmovilizar directamente la proteína en soportes derivados de haluro de alquilo o soportes que contienen funcionalidades de tiol libres. En realizaciones adicionales, las proteínas que contienen funcionalidades de  $\alpha$ -tioéster pueden inmovilizarse directamente sobre soportes que contienen restos 1,2 amino tiol (por ejemplo, cisteína N-terminal) usando la reacción de ligadura química nativa. Alternativamente, las proteínas modificadas con cetonas y aldehídos pueden inmovilizarse sobre soportes sólidos derivatizados con hidrazinilo, funcionalidades de hidrazida y aminoxi usando reacciones de ligación que forman enlaces de hidrazona/oxima (y viceversa). Alternativamente, la química de 'Click' puede usarse para inmovilizar proteínas sobre soportes sólidos, por lo que la proteína y el soporte se derivatizan con las funcionalidades químicas apropiadas mutuamente reactivas (azidas y alquinos). En otras realizaciones, la química de ligación de Staudinger puede usarse para inmovilizar proteínas derivatizadas apropiadamente sobre los soportes sólidos adecuadamente derivatizados.

20 El soporte sólido está contenido en o se transporta por la columna de aféresis. Por lo tanto, por "cargado" se entiende que la columna lleva o contiene el soporte sólido de tal manera que la sangre (periférica) pueda fluir a través de la columna en contacto con el soporte sólido. Por lo tanto, el soporte sólido proporciona una matriz dentro de la columna a través de la cual fluye la sangre, de manera continua en ciertas realizaciones. Esto permite que las células que expresan el receptor de quimiocinas específico se retiren de la sangre que pasa a través de la columna, de tal manera que la sangre que sale de la columna se agota de las células específicas que expresan el receptor de quimiocina. 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 biotinilados, tales como las quimiocinas, unidos a la estreptavidina sobre el soporte. El soporte sólido puede estar compuesto por un carbohidrato de alto peso molecular, opcionalmente reticulado, tal como la agarosa.

25 Como se analizó anteriormente, el reactivo de unión está acoplado al soporte sólido. Las cantidades relativas de reactivo de unión pueden controlarse para garantizar que el acoplamiento entre el soporte sólido y el reactivo de unión sea inmediato, minimizando el riesgo de que el reactivo de unión se desacople del soporte sólido. Por lo tanto, puede asegurarse que haya un exceso relativo de sitios de inmovilización para el reactivo de unión en el soporte sólido. 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.

40 La columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como un tratamiento de leucaféresis para el cáncer. La columna actúa para retirar específicamente CCR7, explotando la interacción entre CCR7 expresado en la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado sobre un soporte sólido contenido dentro o transportado por la columna. En otras realizaciones, la columna actúa para eliminar específicamente una o más células que expresan el receptor Treg. La columna global típicamente comprende, consiste en, o consiste esencialmente en tres componentes combinados; 1) un alojamiento que contiene o transporta 2) el soporte sólido y 3) uno o más reactivos de unión (inmovilizados sobre el mismo) que se unen específicamente a uno o más receptores de quimiocinas. El alojamiento puede fabricarse con cualquier material adecuado para uso clínico. En determinadas realizaciones el alojamiento está compuesto por un material plástico. El alojamiento incluye un sitio de flujo de entrada para la entrada de sangre y un sitio de flujo de salida para que la sangre (vacía de células diana) salga de la columna. El alojamiento puede estar diseñado para mantener un flujo sanguíneo continuo a través de la matriz de soporte sólida. El alojamiento (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1) puede incluir una porción superior que comprende una placa de distribución (2) en el sitio de influjo (1) para esparcir la sangre de manera uniforme sobre toda el área de la matriz. La placa de distribución puede actuar como una primera barrera de seguridad que evita que partículas más grandes fluyan a través de la columna y dentro del paciente. Sin embargo, la placa de distribución no es esencial y puede retirarse en algunas realizaciones para disminuir la resistencia general en el sistema. La columna puede contener una o más unidades de filtro de seguridad (3 y 4) colocadas en los sitios de influjo (1) y/o flujo de salida (5) del alojamiento de plástico. Dichas unidades de filtro pueden actuar para evitar que partículas más grandes que las células sanguíneas entren y/o salgan de la columna. Las unidades de filtro de seguridad pueden contener una pluralidad de filtros, tales como dos, tres o cuatro filtros diseñados para ser una barrera robusta y detener todas las partículas más grandes que las células sanguíneas que pasan a través de la columna. La inclusión de filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos de la columna sirve para minimizar el riesgo de fuga de partículas en el paciente, incluso en el caso de que el dispositivo esté conectado incorrectamente, lo que da como resultado un flujo sanguíneo 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 sanguíneas pasen a través de la columna, como sería fácilmente entendible por un experto en la materia. Los filtros adecuados están disponibles en el mercado. En realizaciones específicas, el tamaño de poro del filtro o filtros está entre aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , más específicamente de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ . El soporte sólido y los componentes reactivos de unión se analizan con

más detalle en el presente documento. El volumen del alojamiento puede variar dependiendo de los volúmenes de sangre destinados a pasar 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. Para los tratamientos de leucemia, los volúmenes de alojamiento tienden a ser más altos, debido a la gran cantidad de células que se retirarán de la sangre. En dichas realizaciones, el volumen del alojamiento está típicamente en la región de aproximadamente 100 ml a 500 ml, tal como 100 ml a 300 ml o 120 ml a 150 ml. En realizaciones específicas, el volumen del alojamiento es de aproximadamente 120 ml.

La columna se aplica generalmente en forma de un circuito de aféresis. En este contexto, el sistema general incluye la columna de aféresis, tubos y una bomba adecuada para bombear la sangre alrededor del circuito. El sistema se ilustra en la figura 2. El paciente (1) está conectado al circuito extracorpóreo a través de agujas estériles a las venas en los brazos derecho e izquierdo. También se conecta una bolsa de solución salina (3) y la solución salina se bombea con una bomba adecuada (2). La sangre se extrae de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estériles mediante la bomba de sangre (4) y se hace pasar a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos puede conectarse a la columna a través de cualquier acoplamiento adecuado, tal como los acoplamientos de bloqueo de luer de diálisis convencionales. Los acoplamientos en la columna pueden estar codificados por colores para un ensamblaje correcto. Por ejemplo, tubos rojos para la entrada a la parte superior de la columna roja y tubos azules para el flujo de retorno al paciente. Un detector de aire (8) puede estar presente en el circuito. Los sensores de presión de entrada (5) y/o de Pven (7) pueden emplearse adicionalmente para controlar la presión en el circuito.

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

Un diagrama esquemático de una bomba adecuada, que muestra el detector de aire y el filtro óptico, se muestra en la figura 3. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba puede detenerse de inmediato. Alternativa o adicionalmente, puede emitirse una alarma visual/audible.

En el presente texto, las leucemias tales como la CLL se diagnostican sobre la base de los niveles de células que expresan CCR7. Puede hacerse un diagnóstico positivo en sujetos donde los niveles de células que expresan CCR7 son suficientes para interferir con la hematopoyesis normal. Esto puede ser cuando la mayoría de las células circulantes son leucémicas y además son CCR7 positivas. Por lo tanto, el diagnóstico puede hacerse basándose en la presencia de más de aproximadamente el 50 %, tales como 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 CCR7 en la muestra, como porcentaje del total de células en la muestra.

Las diversas realizaciones de la invención se describirán ahora con más detalle:

#### Descripción de las figuras

FIGURA 1 - El alojamiento de plástico y la parte superior muestran la placa de distribución (2) y las unidades de filtro de seguridad (3 y 4).

FIGURA 2 - El sistema general de leucaféresis.

FIGURA 3 - La bomba con detector de aire y detector óptico (4).

FIGURA 4 - Resultados de pruebas de agotamiento *in vitro* realizadas en la matriz acoplada a MIP-3a1 biotinilada que muestra la capacidad de eliminar los linfocitos que expresan CCR6 de la sangre de tres donantes sanos.

FIGURA 5 - Ejemplo de criterios de activación para monocitos que expresan CCR2

FIGURA 6 - Porcentaje de diferentes poblaciones de leucocitos en un paciente con leucemia linfática crónica y en un control saludable (HC). Se analizó la sangre de un paciente con CLL y un control sano para la expresión de marcadores específicos de células con citometría de flujo. Las células B se caracterizaron como CD19 positivas, las células T como CD3 positivas, los granulocitos como CD16 positivos y los monocitos como CD14 positivos.

FIGURA 7 - Expresión de CCR7 en células B de un paciente con leucemia linfática crónica. La sangre de un paciente con CCL se analizó para la expresión de diversos receptores de quimiocinas por citometría de flujo. Las células B se caracterizaron como linfocitos CD19+.

FIGURA 8 - Unión de la quimiocina biotinilada MIP3b (CCL19) a las células B de un paciente con leucemia linfática crónica. La sangre de un paciente con CLL se incubó con bMIP3b y se analizó por citometría de flujo. Las células B se caracterizaron como linfocitos CD19+.

5  
FIGURA 9 - Depleción de células B con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMIP3b. Las células sanguíneas de un paciente con CLL se incubaron con matriz bMIP3b-SepharoseEstreptavidina. Las células no unidas se recuperaron lavando la matriz con solución salina tamponada con fosfato. Las células (después del agotamiento) se analizaron después por citometría de flujo y se compararon con las células que no se habían incubado con la matriz MIP3b (antes del agotamiento).

10  
FIGURA 10 - Frecuencia de Tregs CCR4 positivos en ocho controles sanos (HC), dos pacientes con cáncer pancreático (PC) y un paciente con cáncer de vejiga urinaria (UBC). La expresión de receptores de quimiocinas y marcadores celulares específicos se analizó con citometría de flujo. Las Tregs se definieron como células CD4 positivas, CD25 positivas (hi), CD127 negativas.

15  
FIGURA 11 - Expresión de CCR4 en Tregs en comparación con células T en UBC (izquierda) y PC (derecha). La expresión de receptores de quimiocinas y marcadores celulares específicos se analizó con citometría de flujo en dos pacientes con PC y un paciente con UBC.

20  
FIGURA 12 - Unión de la quimiocina bMDC a Tregs. Las células sanguíneas de un paciente con PC se incubaron con quimiocina biotinilada o un anticuerpo anti-CCR4 y se analizaron con citometría de flujo.

25  
FIGURA 13 - Agotamiento de las células T que expresan CCR4 con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con MDC biotinilado (bMDC). Las células sanguíneas de un paciente con UBC se incubaron con matriz de quimiocina biotinilada-Sepharose-Estreptavidina. Las células no unidas se recuperaron lavando la matriz. Las células no unidas (después del agotamiento) se analizaron después con citometría de flujo y se compararon con las células que no se habían incubado con la matriz bquimiocina (antes del agotamiento).

### 30 **Descripción de las realizaciones preferidas**

El mecanismo detrás de la siembra de células metastásicas en órganos particulares es mediante la expresión de quimiocinas en el órgano que recluta células tumorales que expresan el receptor de quimiocina. Por ejemplo, las células metastásicas de cáncer de colon expresan CCR6 y van al hígado porque CCL20 se expresa en el hígado permitiendo la entrada de células cancerosas que expresan CCR6.

35  
En los linfomas no Hodgkinianos (T-NHL), la expresión de CCR7 indica una mayor diseminación linfática que se demostró que migra hacia CCL21, la quimiocina preferida para la entrada de células en los órganos linfoides. Las metástasis de cáncer de pulmón parecen depender de la expresión de CXCR4 en las células tumorales y la expresión local de la quimiocina correspondiente CXCL12 (SDF-1) para la metástasis exitosa. En línea con estos descubrimientos se está desarrollando el desarrollo de moléculas pequeñas para la inhibición de la metástasis mediada por CXCR4.

40  
Las células T reguladoras (Tregs) están reguladas por aumento en muchos tipos de cáncer como un mecanismo de escape inmunitario inducido por el tumor. Para evitar el reconocimiento inmunitario y la eliminación, los tumores activan y reclutan Tregs. La producción de quimiocinas por el tumor da como resultado el reclutamiento de Tregs circulantes y, por lo tanto, la protección contra el reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Las Tregs pueden reclutarse para el tumor por CCL17 y CCL22 uniéndose a CCR4 expresado sobre la Treg. Además, puede producirse el reclutamiento mediado por CCR8 por CCL1. Dado que muchos regímenes de tratamiento con quimioterapia implican la activación del sistema inmunitario, eliminar Tregs en la circulación por leucaféresis puede favorecer el reconocimiento y la eliminación inmunitarios de células tumorales, mejorando de esta manera la terapia contra el cáncer.

45  
En los trastornos leucémicos crónicos, el número de células tumorales circulantes inhibe la hematopoyesis normal y, por lo tanto, provoca síntomas. El aumento de la producción de quimiocinas tales como CCL3 se correlaciona con un mal pronóstico (Blood. 3 de feb 2011; 117(5): 1662-9. Epub 29 de nov 2010). Por lo tanto, la eliminación de las células leucémicas que expresan el receptor de quimiocina afectará favorablemente a la enfermedad en términos de síntomas y progresión de la enfermedad.

50  
Se muestra en el presente documento que los pacientes con cáncer, en particular sujetos que padecen UBC y PC, exhiben una mayor frecuencia de CCR4 que expresa Tregs circulantes y que esta respuesta es específica de Tregs (y no se aplica a otros linfocitos T). Las células que expresan CCR4 pueden marcarse como diana para tratar el cáncer. El tratamiento puede depender de reactivos de unión adecuados tales como CCL22 (MDC) y derivados de los mismos, como se describe en el presente documento con más detalle. También se muestra en el presente documento que los sujetos que padecen leucemias, tales como CLL, tienen un número muy elevado de células B circulantes. Las células B expresan receptores de quimiocinas característicos, tales como CCR7. También se muestra en el presente documento que las células B que expresan CCR7 pueden agotarse eficazmente usando MIP3b como un reactivo de

unión específico en un método de leucaféresis.

### **EJEMPLO DE REFERENCIA 1 - Leucaféresis a medida**

#### 5 DISEÑO DE COLUMNA Y PROPIEDADES

##### Introducción

10 La aféresis es un tratamiento establecido usado para el agotamiento de los componentes sanguíneos, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. La leucaféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para la extracción de glóbulos blancos, leucocitos. El paciente está conectado a un sistema circulatorio de sangre extracorpóreo; la sangre se extrae de una vena en un brazo, se pasa a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. Los efectos secundarios de los tratamientos de leucaféresis varían de eventos leves como dolor de cabeza, mareos, hipotensión, palpitación y rubor observados en el 0,1 al 5 % de los pacientes 15 tratados.

##### La columna

20 La columna está destinada a usarse como un tratamiento de leucaféresis para el cáncer. Retirá específicamente células que expresan CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR4, CXCR7, CCR4, CCR9, CCR10, CXCR3 y/o CXCR5, tales como células tumorales y leucocitos, tales como linfocitos T reguladores, mediante el uso de un reactivo de unión, más específicamente una resina que contiene MIP-3alfa (CCL20), CCL19, CCL21, CCL1, CXCL11, CXCL12, CCL25 (TECK), CCL27 (CTACK), CCL28 (MEC), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL13 (BCA-1), CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC), explotando la interacción CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR4, CXCR7, CCR4, CCR9, CCR10, CXCR3 y/o 25 CXCR5-quimiocina. Las células que expresan el receptor Treg, tales como el receptor CLA, las células que expresan CCR4 o CCR8 pueden retirarse específicamente mediante el uso de un reactivo de unión apropiado, más específicamente una resina que contiene SELE, CCL17, CCL22 y/o CCL1. La columna consiste en tres componentes combinados, el alojamiento de plástico, la matriz de estreptavidina (SA) Sepharose™ BigBeads y uno o más de MIP-3alfa biotinilado (CCL20), CCL19, CCL21, CCL1, CXCL11, CXCL12, CCL25 (TECK), CCL27 (CTACK), CCL28 (MEC), 30 CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL13 (BCA-1), CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC) y/o SELE, CCL17, CCL22 y/o CCL1 unidos a la matriz. El tratamiento se lleva a cabo usando las mismas técnicas que un procedimiento de aféresis convencional.

##### El alojamiento de plástico (FIGURA 1)

35 El alojamiento de plástico, diseñado para mantener un flujo sanguíneo 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 (1) para distribuir la sangre de manera uniforme en toda el área de la matriz. La placa es la primera barrera de seguridad que evita que las partículas más grandes fluyan a través de la columna hacia el paciente. Las unidades 40 de filtro de seguridad (3 y 4) se colocan en los sitios de in flujo (1) y flujo de salida (5) del alojamiento de plástico. La unidad de filtro de seguridad contiene tres filtros diseñados para ser una barrera robusta y detener todas las partículas más grandes que las células sanguíneas que pasan a través de la columna. El diseño del alojamiento de plástico se muestra en la Figura 1. El diseño con filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos del dispositivo de columna sirve para minimizar el riesgo de fuga de partículas en el paciente, incluso en el caso de que el dispositivo se coloque boca 45 abajo con el flujo de sangre en la dirección opuesta a la anticipada.

##### Estreptavidina Sepharose™ BigBeads

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

##### 55 Reactivo de unión

Acoplado a la matriz está el tercer componente del dispositivo, uno o más reactivos de unión que se unen específicamente a CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR4, CXCR7, CCR4, CCR9, CCR10, CXCR3 y/o CXCR5 y/o al receptor CLA, CCR4 y/o CCR8 donde las Tregs están específicamente marcadas como diana. Una o más quimiocinas seleccionadas del grupo que consiste en: MIP-3alfa (CCL20), CCL19, CCL21, CCL1, CXCL11, CXCL12, CCL25 (TECK), CCL27 (CTACK), CCL28 (MEC), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL13 (BCA-1), CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC) pueden emplearse. Como alternativa, SELE, CCL17, CCL22 y/o CCL1 pueden emplearse para dirigirse a Tregs. Estos péptidos pueden ser sintéticos, versiones diseñadas por ingeniería de la quimiocina humana, que están truncadas y biotiniladas, pero conservan la actividad vinculante para el receptor CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR4, 60 CXCR7, CCR4, CCR9, CCR10, CXCR3 y/o CXCR5 (o receptor CLA, CCR4 y/o CCR8 donde se marcan como diana las Tregs). Al biotinilar la quimiocina diseñada por ingeniería, es capaz de unirse a las moléculas de estreptavidina en

la matriz Sepharose™. Se sabe que la unión biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas más fuertes con un Kd del orden de  $4 \times 10^{-14}$  M. La relación calculada de estreptavidina: sitios de unión a biotina en la columna es 10:1. Por lo tanto, el acoplamiento entre la matriz y la quimiocina será inmediato, minimizando el riesgo de desacoplamiento de quimiocinas de la matriz.

5 El sistema de aféresis

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

10 El circuito

15 El sistema se ilustra en la Figura 2. El paciente (1) está conectado al circuito extracorpóreo a través de agujas estériles Venflon a las venas en los brazos derecho e izquierdo. También se conecta una bolsa de solución salina (3) y la solución salina se bombea con una bomba ACD (2). La sangre se extrae de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estériles mediante la bomba de sangre (4) y se hace pasar a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos está conectado a la columna a través de acoplamientos de bloqueo luer de diálisis convencionales. Los acoplamientos en la columna están codificados por colores para un ensamblaje correcto; tubos rojos para la entrada a la parte superior de la columna roja y tubos azules para el flujo de retorno al paciente. Un detector de aire (8) está presente. Los sensores de presión de entrada (5) y de Pven (7) se emplean para monitorizar la presión en el circuito.

La bomba 4008 ADS

25 Una bomba de aféresis, de Fresenius Medical Care, monitoriza el influjo y el flujo de salida del paciente, la presión en la circulación extracorpórea y puede discriminar el aire mediante un colector de burbujas y un detector de aire. Se coloca un filtro colector de coágulos dentro del colector de burbujas. La bomba también tiene un detector óptico para distinguir entre luz, por ejemplo, solución salina o aire presente en el sistema de tubos y oscuridad, por ejemplo, sangre presente en el sistema de tubos.

30 Un diagrama esquemático de la bomba, que muestra el detector de aire y el filtro óptico, se muestra en la Figura 3. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba se detiene inmediatamente y se emite una alarma visual/audible.

Leyenda de la FIGURA 3:

- 35
1. Monitor
  2. Soporte para bolsa de basura
  3. Módulos (de izquierda a derecha - Bomba de sangre, Bomba ACD, detector de aire)
  4. Lugares de reserva para módulos adicionales
  - 40 5. Soporte absorbente
  6. Detector de goteo
  7. Barra IV

Preparación del paciente

45 Al paciente se le administrarán anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Se usará una solución salina estéril con 5000 IE de heparina para preparar el sistema extracorpóreo, a partir de entonces, se añadirá una inyección en bolo con 4000 IE de heparina al circuito al comienzo de cada sesión de tratamiento.

50 Tiempo de leucaféresis y caudal

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

55 Condiciones de almacenamiento

60 Los dispositivos de columna deben almacenarse entre 1 y 25 °C evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Los datos de estabilidad > 3 meses indican que no hay diferencia en la funcionalidad a lo largo del tiempo o por temperatura (temperatura ambiente y refrigerada). Las columnas se mantendrán en condiciones refrigeradas hasta su uso. Deben evitarse los daños mecánicos como los que resultan de vibraciones violentas y traumas. La columna almacenada fuera de estas recomendaciones no debe usarse.

Condiciones de transporte

65 Los dispositivos de la columna serán transportados en condiciones refrigeradas, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Deben evitarse los daños mecánicos tales como los que resultan de vibraciones violentas

y traumas.

Agotamiento *in vitro* de poblaciones de células diana

- 5 Para investigar la capacidad de eliminar las células que expresan CCR6, se han realizado pruebas *in vitro* en la matriz biotinilada acoplada a MIP-3alfa. Se recogió sangre de donantes de sangre y se hizo pasar a través del dispositivo de columna que contenía matriz acoplada a MIP-3alfa biotinilada. Se tomaron muestras de sangre antes y después del pasaje por la columna y se analizaron por citometría de flujo (FACS) para el agotamiento de las células que expresan CCR6.
- 10 Los resultados demuestran un agotamiento significativo de los linfocitos que expresan CCR6 de la población diana después de la perfusión matricial. Se realizaron pruebas de agotamiento en sangre de tres donantes sanos. Los resultados se muestran en la Figura 4.
- Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de hasta alrededor del 15 % de las células que expresan CCR6 por la columna. Las células que no expresan CCR6 no se vieron afectadas (datos no mostrados).

15 **Ejemplo de REFERENCIA 2A - Tratamiento del paciente con leucemia linfática crónica (CLL)**

Materiales y métodos

- 20 1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón de Fijación (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 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 incubaron con suero humano al 10 % durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos (Tabla 2) a 4 °C durante 30 min. Las células se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

30 *Tabla 2. Lista de anticuerpos para el análisis de citometría de flujo.*

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD14	FITC	Beckman Coulter
Estreptavidina	PE, APC	Biolegend
CCR7	PerCP Cy5.5	Biolegend
CD16	PE Cy7	BD Biosciences
CD3	V450	BD Biosciences
CD19	V500	BD Biosciences

2. Prueba de unión de quimiocinas

35 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón de Fijación (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 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 incubaron con suero humano al 10 % durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos específicos de células junto con quimiocina biotinilada (1 μM) o el anticuerpo receptor de quimiocina correspondiente a 4 °C durante 30 min (Tabla 2). La quimiocina biotinilada se detectó a través de la interacción entre biotina y una Estreptavidina conjugada con fluoróforo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

3. Agotamiento celular por matriz conjugada con quimiocina biotinilada

45 Las células se prepararon a partir de sangre periférica (sección 1). Se lavó 1 ml de matriz de Sepharose BigBeads conjugada con 0,4 mg/ml de Estreptavidina (GE Healthcare) en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió quimiocina biotinilada (1 μM) al tubo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la inmovilización de la quimiocina en la matriz a través de la interacción biotina-estreptavidina.

50 A continuación, Las células se añadieron a la matriz de quimiocinas y se incubaron durante 20 min a TA. Las células que no se unieron a la matriz se retiraron lavando la matriz con PBS en un filtro de nylon estéril de 40 μm (BD Falcon™ Cell Strainer). Las células de flujo a través se tiñeron con anticuerpos (Tabla 2), se analizó por citometría de flujo y se comparó con las células de sangre periférica que no se habían incubado con la matriz de quimiocinas.

**Resultados y análisis**

1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

5 Los glóbulos blancos de un paciente con CLL se analizaron por citometría de flujo. El paciente tenía un número muy elevado de células B circulantes; el 92 % en comparación con aproximadamente el 2 % en sangre sana (Figura 6). Este descubrimiento es común en la CLL donde las células B neoplásicas se someten a una proliferación extensa, se acumulan en la médula ósea y la sangre y desplazan a las células sanguíneas sanas.

10 2. Prueba de unión de quimiocinas

Se demostró que todas las células B expresaban el receptor de quimiocinas CCR7 (FIGURA 7) basándose en datos de citometría de flujo y unión por un anticuerpo anti-CCR7. CCR7 es importante para la localización de los ganglios linfáticos que está mediada por la unión a quimiocinas tales como MIP3b (CCL19) y SLC (CCL21) que se expresan en el tejido linfóide. De acuerdo con la expresión de CCR7, todas las células B se unieron a MIP3b biotinilado (bMIP3b) (FIGURA 8).

3. Agotamiento celular por matriz conjugada con quimiocina biotinilada

20 Las células B se agotaron eficazmente usando matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMIP3b. Antes del agotamiento, las células B constituían el 89,1 % de las células y después del agotamiento, el 26,4 % (FIGURA 9).

Los presentes inventores concluyen que las células B en CLL expresan CCR7 y se unen al ligando bMIP3b. Adicionalmente la mayoría (62,7 %) de las células B que expresan CCR7 pueden eliminarse usando una matriz de Sepharose-Estreptavidina conjugada con bMIP3b.

**Ejemplo de REFERENCIA 2B - Tratamiento de cánceres mediante la retirada de Tregs que expresan CCR4 utilizando MDC biotinilado (CCL22)**

30 Materiales y métodos

1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

35 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón de Fijación (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 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 incubaron con suero humano al 10 % durante 15min a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos (Tabla 3) a 4 °C durante 30 min. Las células se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

*Tabla 3. Lista de anticuerpos para el análisis de citometría de flujo.*

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR4	PerCP Cy5.5	BD Biosciences
CD127	PE Cy7	Biolegend
CD4	V500	Biolegend
CD25	APCCy7	Biolegend
CD3	Pacific blue	BD Biosciences
Estreptavidina	PerCpCy5.5	BD Biosciences
CD25	FITC	BD Biosciences

2. Prueba de unión de quimiocinas

45 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón de Fijación (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 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 incubaron con suero humano al 10 % durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos específicos de células junto con quimiocina biotinilada (1 µM) o el anticuerpo receptor de quimiocina correspondiente a 4 °C durante 30 min (Tabla 3). La quimiocina biotinilada se detectó a través de la interacción entre biotina y una Estreptavidina conjugada con fluoróforo.

Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

3. Agotamiento celular por matriz conjugada con quimiocina biotinilada

5 Las células se prepararon a partir de sangre periférica (sección 1). Se lavó 1 ml de matriz de Sepharose BigBeads conjugada con 0,4 mg/ml de Estreptavidina (GE Healthcare) en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió quimiocina biotinilada (1 μM) al tubo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la inmovilización de la quimiocina en la matriz a través de la interacción biotina-estreptavidina.

10 A continuación, Las células se añadieron a la matriz de quimiocinas y se incubaron durante 20 min a TA. Las células que no se unieron a la matriz se retiraron lavando la matriz con PBS en un filtro de nylon estéril de 40 μm (BD Falcon™ Cell Strainer). Las células de flujo a través se tiñeron con anticuerpos (Tabla 3), se analizó por citometría de flujo y se comparó con las células de sangre periférica que no se habían incubado con la matriz de quimiocinas.

15 **Resultados y análisis**

Las células T reguladoras (Tregs) son una subpoblación de células T que suprimen el sistema inmunitario para mantener la homeostasis inmunitaria. En el cáncer, los Tregs pueden inhibir una respuesta inmunitaria eficaz contra el tumor y, por lo tanto, la retirada de los Tregs puede dar lugar a una mejor activación inmunitaria contra las células cancerosas. Se analizaron los glóbulos blancos de pacientes con cáncer de vejiga urinaria (UBC) y cáncer de páncreas (PC) para determinar la expresión de receptores de quimiocinas con citometría de flujo. Los pacientes con cáncer exhibieron una frecuencia aumentada de células T reguladoras circulantes (Tregs) que expresaron el receptor de quimiocinas CCR4, basado en datos de citometría de flujo y unión por un anticuerpo anti-CCR4 (Figura 10).

20 Tanto en pacientes con UBC como con PC, CCR4 estaba altamente regulado positivamente en Tregs en comparación con la población total de células T (Figura 11).

El ligando para CCR4 es la quimiocina MDC (CCL22). De acuerdo con la expresión de CCR4, los Tregs unidos a MDC biotinilado (bMDC) (Figura 12).

30 Las células T que expresan CCR4 podrían agotarse con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMDC (Figura 13).

Los presentes inventores concluyen que la frecuencia de Tregs que expresan CCR4 se mejora en PC y UBC. Estas células pueden unirse al ligando bMDC. Los Tregs expresan significativamente más CCR4 que las células T convencionales y, por lo tanto, pueden eliminarse específicamente con matriz de Sepharose Estreptavidina conjugada con bMDC.

40 **EJEMPLOS DE REFERENCIA 3 a 10:**

**PROTOCOLOS GENERALES - SÍNTESIS DE QUIMOCINAS**

Ensamblaje:

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

Retirada de la protección Dde:

55 El grupo protector Dde se retiró por tratamiento de resina con una solución de hidrazina al 2,5 % en DMF (200 ml) durante un período de 2 horas. La resina se lavó después con DMF.

Etapas de marcaje:

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

60 La resina se hinchó en DMF y después se añadió una solución de ácido Fmoc-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). La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 3 horas y después se lavó con DMF.

65 2. Protección terminal

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

3. Desprotección Fmoc

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

4. Acoplar Biotina-OSu

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

15 Escisión:

20 La resina seca se trató con TFA (10 ml) que contenía un cóctel eliminador que consistía en TIS (500 µl), tioanisol (500 µl), agua (500 ml), DMS (500 µl), EDT (250 µl), NH<sub>4</sub>l (500 µg) y fenol (500 µg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La solución se filtró en éter frío y la resina se enjuagó con TFA. El péptido precipitado se centrifugó, se lavó con éter, se centrifugó y se liofilizó.

Protocolo de purificación:

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

Protocolo de Plegamiento:

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

35

**Ejemplo de REFERENCIA 3 - biotinaMCP-2 (CCL8)**

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

40

45 Modificaciones: MCP-2 humano que corresponde a los restos 1-76, inicialmente se expresa como 99 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escinde. El Gln en el extremo N de la proteína está sujeto a la formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto el Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar que se generen especies mixtas de Gln N-terminal y piroGlu. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y uso de la columna. La lisina de origen natural en la posición 75 se modificó mediante biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad ε-amino y la biotina.

45

50 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 1), antes de la fijación del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 75 (K):

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE  
RWVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH<sub>2</sub>

X1 = piroGlu o Gln

55 X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

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

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE  
RWVVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH<sub>2</sub>

X1 = piroGlu o Gln  
X75 = K(ivDde)

5 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 75 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 2). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG

10 y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 3).

H-XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE  
RWVVRDSMKHLDQIFQNLXP-NH<sub>2</sub>

15 X1 = piroGlu o Gln  
X75 = K(PEG-biotina).

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

20 Datos de ensayo funcional:

Se analizó la actividad de biotina MCP-2 en un ensayo de Aequorin contra hCCR2b, (Euroscreen) y se demostró que era un agonista parcial con un valor CE50 de 50,9 nM. c.f. La CE50 para MCP-2 nativo recombinante es 23,5 nM (agonista parcial).

**Ejemplo de REFERENCIA 4 - biotinaRANTES (CCL5)**

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

Modificaciones: RANTES humano correspondiente a los restos 1-68, inicialmente se expresa como 91 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escinde. La metionina única (Met67) dentro 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 de la secuencia natural derivada. Esta sustitución de Met a Lys proporcionó una lisina en la posición 67 que se modificó a través de biotilación en la resina.

40 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 4), antes de la unión de la molécula de biotina al aminoácido 67 (K):

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEKS-OH

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

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEXS-RESIN

X= K(ivDde)

50 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 67 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 5). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento de la Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 6).

H-SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEXS-OH

5 X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado (por ejemplo, K-biotina), opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

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

10 Datos de ensayo funcional:

BiotinaRANTES se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequorin contra hCCR5, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 0,5 nM.

15 **Ejemplo de REFERENCIA 5 - biotinaMIP-3 $\alpha$  (CCL20)**

Molécula diana: MIP-3 $\alpha$  derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys (68) con PEG-Biotina (sal de TFA)

20 Modificaciones: MIP-3 $\alpha$  humano correspondiente a los restos 1-70, inicialmente se expresa como 96 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 26 aminoácidos que se escinde. La lisina de origen natural en la posición 68 se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

25 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 7), antes de la fijación del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 68 (K):

H-ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPK  
QTVVKYIVRLLSKKVKNM-OH

30 La secuencia MIP-3 $\alpha$  diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Wang), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPK

QTVVKYIVRLLSKKVXNM-RESIN

35 X= K(ivDde)

40 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 68 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 8). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 9).

H-ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANPK  
QTVVKYIVRLLSKKVXNM-OH

45 X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

50 Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaMip-3 $\alpha$  plegada purificada: obtenido = 8396,4 Da; esperado 8397,0 Da.

Datos de ensayo funcional:

BiotinaMIP-3 $\alpha$  se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerin contra hCCR6, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 1,6 nM. c.f. La CE50 para MIP-3 $\alpha$  nativo recombinante es 1,0 nM.

5 **Ejemplo de REFERENCIA 6 - biotinaSDF-1 $\alpha$  (CXCL12)**

Molécula diana: SDF-1 $\alpha$  derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys (64) con Biotina (sal de TFA)

10 Modificaciones: Forma truncada de SDF-1 $\alpha$  humano correspondiente a los restos 1-67 de la proteína madura, que abarca la secuencia correspondiente al plegamiento de quimiocinas. La proteína madura completa es de 72 aminoácidos (el péptido señal es de 21 aminoácidos en una proteína inmadura de 93 aminoácidos). La lisina de origen natural en la posición 64 se modificó mediante biotilación en la resina.

15 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 10), antes de la unión de la molécula de biotina al aminoácido 64 (K):

H-KPVLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI  
DPKLLKWIQEYLEKALN-OH

20 La secuencia SDF-1 $\alpha$  diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Wang), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-KPVLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI  
DPKLLKWIQEYLEKXALN-RESIN

25 X= K(ivDde)

FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 64 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 11). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento de la Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 12).

30

H-KPVLSYRCP RFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI  
DPKLLKWIQEYLEXALN-OH

35 X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, especialmente K(Biotina)

Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaSDF-1 $\alpha$  plegada purificada: obtenido = 8055,5 Da; esperado 8057,5 Da.

40

Datos de ensayo funcional:

La biotinaSDF-1  $\alpha$  se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo Aequerin contra hCXCR4, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 17,3 nM. c.f. La CE50 para SDF-1 $\alpha$  nativo recombinante es 12,0 nM.

45

**Ejemplo de REFERENCIA 7 - biotinaMDC (CCL22)**

Molécula diana: MDC derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys (66) con PEG-Biotina (sal de TFA)

50

Modificaciones: MDC humano correspondiente a los restos 1-69, inicialmente se expresa como 93 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 24 aminoácidos que se escinde. La lisina de origen natural en la posición 66 se modificó mediante biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

55

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 13), antes de la fijación del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 66 (K):

H-GPYGANMEDSVCCRDYVRYRLPLRVVKHIFYWTS DSCPRPGVLLTFRDK  
 EICADPRVPWVKMILNKLSQ-NH<sub>2</sub>

5 La secuencia MDC diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-GPYGANMEDSVCCRDYVRYRLPLRVVKHIFYWTS DSCPRPGVLLTFRDK  
 EICADPRVPWVKMILNXLSQ-RESIN

10 X= K(ivDde)

15 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 66 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 14). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 15).

H-GPYGANMEDSVCCRDYVRYRLPLRVVKHIFYWTS DSCPRPGVLLTFR  
 DKEICADPRVPWVKMILNXLSQ-NH<sub>2</sub>

20 X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, especialmente K (PEG-biotina).

25 Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaMDC plegada purificada: obtenido = 8456,1 Da; esperado 8456,9 Da.

Datos de ensayo funcional:

30 BiotinaMDC se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerin contra hCCR4, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 4,5 nM. c.f. La CE50 para MDC nativo recombinante es 3,6 nM.

**Ejemplo de REFERENCIA 8 - biotinaTARC (CCL17)**

35 Molécula diana: TARC derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral ε-amino de Lys (72) con PEG-Biotina (sal de TFA)

40 Modificaciones: TARC humano correspondiente a los restos 1-71, inicialmente se expresa como 94 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escinde. Se insertó una lisina adicional en el extremo C, en la posición 72, y se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad ε-amino y la biotina.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 16), antes de la fijación del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 72 (K):

H-ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRKLKTWYQTS EDCSRDAIVFVTVQGRAICS  
 DPNNKRVKNAVKYLQSLERSX-NH<sub>2</sub>

45 X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado (por ejemplo, K-biotina), opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

50 La secuencia TARC diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRKLKTWYQTSSEDCSRDAIVFVTVQG  
RAICSDPNNKRVKNAVKYLQSLERSX-RESIN

X= K(ivDde)

- 5 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 72 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 17). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 18).

10

H-ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRKLKTWYQTSSEDCSRDAIVFVTVQG  
RAICSDPNNKRVKNAVKYLQSLERSX-NH<sub>2</sub>

X = K(PEG-Biotina).

- 15 Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaTARC plegada purificada: obtenido = 8577,2 Da; esperado 8577,8 Da.

Datos de ensayo funcional:

- 20 BiotinaTARC se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequorin contra hCCR4, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 3,1 nM. c.f. La CE50 para TARC nativo recombinante es 2,6 nM.

#### Ejemplo 9 - biotinaMIP-3β (CCL19)

- 25 Molécula diana: MIP-3β derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral ε-amino de Lys (78) con Biotina (sal de TFA)

30 Modificaciones: MIP-3β humano correspondiente a los restos 1-77, inicialmente se expresa como 98 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 21 aminoácidos que se escinde. Se insertó una lisina adicional en el extremo C, en la posición 78, y se modificó mediante biotilación en la resina.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 19), antes de la unión de la molécula de biotina al aminoácido 78 (K):

H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-NH<sub>2</sub>

35

X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado (por ejemplo, K-biotina), opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K(PEG-biotina).

40

La secuencia MIP-3β diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-RESIN

45

X es FmocLys(ivDde)

- 50 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 78 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 20). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento de la Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 21).

H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-NH<sub>2</sub>

X es K(Biotina).

- 5 Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaMIP-3β plegada purificada: obtenido = 9148,8 Da; esperado 9149,7 Da.

Datos de ensayo funcional:

- 10 BiotinaMIP-3β se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerin contra hCCR7, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 11,0 nM. c.f. La CE50 para MIP-3β nativo recombinante es 1,6 nM.

**Ejemplo de REFERENCIA 10 - biotinaITAC (CXCL11)**

- 15 Molécula diana: ITAC derivatizado con Biotina en la funcionalidad de la cadena lateral ε-amino de una Lisina adicional insertada en el extremo C después de un espaciador de PEG (sal de TFA)

20 Modificaciones: ITAC humano correspondiente a los restos 1-73, inicialmente se expresa como 94 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 21 aminoácidos que se escinde. Se insertaron un espaciador de PEG y una lisina adicional en el extremo C y se modificaron mediante biotilación en la resina. El espaciador de PEG se incorporó en el extremo C entre la proteína y la lisina adicional.

25 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 22), antes de la fijación del espaciador de PEG, moléculas adicionales de lisina y biotina:

H-FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG  
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNF-OH

30 La secuencia ITAC diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Wang), usando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG  
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNFX-RESIN

X es PEG-K(ivDde)

- 35 El ácido Fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico seguido de FmocLys(ivDde)-OH se incorporó en el extremo C para facilitar el marcaje específico del sitio con biotina en la funcionalidad de la cadena lateral ε-amino de la Lys adicional (SEQ ID NO: 24). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento de la Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 25).

40

H-FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKG  
QRCLNPKSKQARLIKKVERKNFX-OH

X es PEG-K(Biotina).

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

Datos de ensayo funcional:

- 50 BiotinaITAC se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerin contra hCXCR3, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 15,7 nM. c.f. La CE50 para ITAC nativo recombinante es 0,7 nM.

**Ejemplo de REFERENCIA 11 - biotinaTECK (CCL25)**

Molécula diana: TECK (sustitución Met a Nleu) derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys72 con PEG-Biotina (sal TFA)

5 Modificaciones: Forma truncada de TECK humano correspondiente a los restos 1-74 de la proteína madura, que abarca la secuencia correspondiente al plegamiento de quimiocinas. La proteína madura completa es de 127 aminoácidos (el péptido señal es de 23 aminoácidos en una proteína inmadura de 150 aminoácidos). La metionina individual dentro de la secuencia se alteró a Norleucina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena, que se observó durante la síntesis de la secuencia natural derivada. El Gln en el extremo N de las  
10 proteínas está sujeto a la formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto el Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar que se generen especies mixtas de Gln N-terminal y piroGlu. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y uso de la columna. La lisina de origen natural en la posición 72 se modificó mediante biotinilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

15 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 26), antes de la fijación del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 72 (K):

H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG  
NPKSREVQRAXKLLDARNXVF-OH

20 X1 = piroGlu o Gln  
X64 = Norleucina  
X72 = un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K(PEG-biotina).  
25

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

30 H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG  
NPKSREVQRAXKLLDARNXVF-RESINA

35 X1 = piroGlu o Gln  
X64 = Norleucina  
X72 = K(ivDde)

40 FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 72 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 27). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 28).

H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG  
NPKSREVQRAXKLLDARNXVF-OH

45 X1 = piroGlu o Gln  
X64 = Norleucina  
X72 es K(PEG-Biotina).

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

Datos de ensayo funcional:

55 BiotinaTECK (sustitución Met a Nleu) se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo Aequorin contra hCCR9, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 63,6 nM. c.f. La CE50 para TECK nativo recombinante es 67,9 nM.

#### Ejemplo de REFERENCIA 12 - biotinaCTAC (CCL27)

60 Molécula diana: CTAC derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys (87) con PEG-Biotina (sal

de TFA)

Modificaciones: CTAC humano correspondiente a los restos 1-88, inicialmente se expresa como 112 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 24 aminoácidos que se escinde. La Met (87) dentro de la secuencia se mutó a lisina para proporcionar una lisina en la posición 87 que se modificó a través de biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

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

FLLPPSTACCTQLYRKPLSDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQR  
SICIHQPNSLSQWFEHQERKLGHTLPKLNFGMLRKXG

X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K(PEG-biotina).

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

H-FLLPPSTACCTQLYRKPLSDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQR  
SICIHQPNSLSQWFEHQERKLGHTLPKLNFGMLRKXG-RESINA

X = K(ivDde)

FmocLys(ivDde)-OH se incorporó como resto 87 para facilitar el marcaje específico del sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 30). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento del espaciador de PEG y Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 31).

H-FLLPPSTACCTQLYRKPLSDKLLRKVIQVELQEADGDCHLQAFVLHLAQR  
SICIHQPNSLSQWFEHQERKLGHTLPKLNFGMLRKXG-OH

X = K(PEG-Biotina).

Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotinaCTAC plegada purificada: obtenido = 10513,4 Da; esperado 10514,2 Da.

Datos de ensayo funcional:

BiotinaCTAC se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequorin contra hCXCR10, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 49,4 nM. c.f. La CE50 para CTAC nativo recombinante es 33,5 nM.

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 13 - biotinalP-10 (CXCL10)**

Molécula diana: IP-10 derivatizado con Biotina en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de una Lisina adicional insertada en el extremo C después de un espaciador de PEG (sal de TFA)

Modificaciones: IP-10 humano que corresponde a los restos 1-77, inicialmente se expresa como 98 aminoácidos que comprenden el plegamiento de quimiocinas y un péptido señal de 21 aminoácidos que se escinde. Se insertaron un espaciador de PEG y una lisina adicional en el extremo C y se modificaron mediante biotilación en la resina. El espaciador de PEG se incorporó en el extremo C entre la proteína y la lisina adicional.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 32), antes de la fijación del espaciador de PEG, moléculas adicionales de lisina y biotina:

H-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL  
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP-OH

La secuencia IP-10 diseñada por ingeniería se ensambló sobre un soporte sólido (resina Wang), usando protocolos

Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en la sección de protocolos generales:

H-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL  
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSPX-RESINA

5

X es K(ivDde), opcionalmente fijado a través de un espaciador tal como PEG, por ejemplo, -PEG-K(ivDde)

10

El ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioctanoico seguido de FmocLys(ivDde)-OH se incorporó en el extremo C para facilitar el marcaje específico del sitio con biotina en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de la Lys adicional (SEQ ID NO: 33). La posterior retirada del grupo protector ivDde, seguido del acoplamiento de la Biotina, se llevó a cabo como se describe en la sección de protocolo general. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se describe para proporcionar la quimiocina activa deseada. La quimiocina activa final de esta manera tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 34):

H-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCL  
NPESKAIKNLLKAVSKERSKRSPX-OH

15

X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K(PEG-Biotina) y puede fijarse a través de una molécula espaciadora, por ejemplo, PEG-K(Biotina).

20

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

25

Datos de ensayo funcional:

BiotinalP-10 se probó para determinar la actividad agonista en un ensayo de Aequerin contra hCXCR3, (Euroscreen) y se informó un valor de CE50 de 8,7 nM. c.f. La CE50 para IP-10 nativo recombinante es 4,4 nM.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ITH Immune Therapy Holdings AB

<120> TRATAMIENTO DEL CÁNCER

35

<130> P117755WO00

<160> 34

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 76

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido sintético

50

<220>

<221> X

<222> (1)..(1)

<223> X es piroglutamina o Gln

55

<220>

<221> X

<222> (75)..(75)

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

60

<400> 1

ES 2 800 316 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 2  
<211> 76  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

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

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

<400> 2

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

25 <210> 3  
<211> 76  
<212> PRT



ES 2 800 316 T3

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

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

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

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

Leu Glu Lys Ser  
65

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

<220>  
<223> Péptido sintético

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

<400> 5

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> 6  
<211> 68  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>

ES 2 800 316 T3

<221> X

<222> (67)..(67)

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

<400> 6

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

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

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

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

Leu Glu Xaa Ser  
65

10

<210> 7

<211> 70

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

20

<400> 7

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

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

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

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

Lys Lys Val Lys Asn Met  
65 70

25

<210> 8

<211> 70

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 800 316 T3

<220>  
<223> Péptido sintético

5  
<220>  
<221> X  
<222> (68)..(68)  
<223> X es FmocLys (ivDde)

10  
<400> 8

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

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

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

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

Lys Lys Val Xaa Asn Met  
65 70

15  
<210> 9  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> Péptido sintético

25  
<220>  
<221> X  
<222> (68).. (68)  
<223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K (PEG-Biotina)

<400> 9

ES 2 800 316 T3

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

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

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

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

Lys Lys Val Xaa Asn Met  
 65 70

- <210> 10
- <211> 67
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido sintetizado
- 10 <400> 10

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

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

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

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

Ala Leu Asn  
 65

- 15 <210> 11
- <211> 66
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Péptido sintético
- <220>
- <221> X
- 25 <222> (64)..(64)
- <223> X es FmocLys (ivDde)
- <400> 11

ES 2 800 316 T3

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

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

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

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

Leu Asn  
 65

5 <210> 12  
 <211> 67  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> X  
 <222> (64)..(64)  
 15 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K (PEG-Biotina)

20 <400> 12

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

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

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

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

Ala Leu Asn

65

25 <210> 13  
 <211> 69  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 800 316 T3

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <400> 13

Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr  
1 5 10 15

Val Arg Tyr Arg Leu Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr  
20 25 30

Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Phe Arg Asp  
35 40 45

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

Asn Lys Leu Ser Gln  
65

10 <210> 14  
<211> 69  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> X  
<222> (66)..(66)  
20 <223> X es FmocLys (ivDde)

<400> 14

Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr  
1 5 10 15

Val Arg Tyr Arg Leu Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr  
20 25 30

Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Phe Arg Asp  
35 40 45

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

25  
  
Asn Xaa Leu Ser Gln  
65

<210> 15  
<211> 69

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

10 <220>  
 <221> X  
 <222> (66)..(66)  
 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, especialmente K (PEG-Biotina)

15 <400> 15

Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr  
 1 5 10 15

Val Arg Tyr Arg Leu Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr  
 20 25 30

Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Phe Arg Asp  
 35 40 45

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

Asn Xaa Leu Ser Gln  
 65

20 <210> 16  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <220>  
 <221> X  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado (por ejemplo, K-biotina), opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, en particular K (PEG-Biotina)

<400> 16

35 Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys  
 1 5 10 15

ES 2 800 316 T3

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

Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala  
 35 40 45

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

Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser Xaa  
 65 70

5 <210> 17  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

15 <220>  
 <221> X  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X es FmocLys (ivDde)

<400> 17

Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys  
 1 5 10 15

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

Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala  
 35 40 45

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

Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser Xaa  
 65 70

20 <210> 18  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <220>  
 <221> X  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X es K (PEG-Biotina)

ES 2 800 316 T3

<400> 18

Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys  
1 5 10 15

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

Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala  
35 40 45

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

Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser Xaa  
65 70

5

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

10

<220>  
<223> Péptido sintético

15

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

20

<400> 19

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

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

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

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

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

25

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

ES 2 800 316 T3

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <220>  
<221> X  
<222> (78)..(78)  
<223> X es FmocLys (ivDde)

10 <400> 20

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

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

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

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

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

15 <210> 21  
<211> 78  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> X  
<222> (78)..(78)  
<223> X es lisina biotilada

25 <400> 21

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

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

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

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

ES 2 800 316 T3

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

5 <210> 22  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 22

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

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

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

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

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe  
 65 70

15 <210> 23  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético

25 <220>  
 <221> X  
 <222> (74)..(74)  
 <223> X = un resto que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG. El resto de aminoácido puede añadirse a través de una molécula espaciadora tal como PEG.

30 <400> 23

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

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

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

ES 2 800 316 T3

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

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

5 <210> 24  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> X  
 <222> (74)..(74)  
 15 <223> X es PEG-K(ivDde)

<400> 24

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

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

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

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

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

20 <210> 25  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintetizado

30 <220>  
 <221> X  
 <222> (74)..(74)  
 <223> X es PEG-K (Biotina)

35 <400> 25

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

ES 2 800 316 T3

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

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

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

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

- 5 <210> 26
- <211> 74
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Péptido sintetizado
- 15 <220>
- <221> X
- <222> (1)..(1)
- <223> X = piroGlu o Gln
- 20 <220>
- <221> X
- <222> (64)..(64)
- <223> X = Norleucina
- 25 <220>
- <221> X
- <222> (72)..(72)
- <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo, K (PEG-Biotina)
- <400> 26

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

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

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

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

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

30

ES 2 800 316 T3

<210> 27  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido sintetizado  
 10  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = piroGlu o Gln  
 15  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (64)..(64)  
 <223> X = Norleucina  
 20  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (72)..(72)  
 <223> X es K(ivDde)  
 25  
 <400> 27  
 Xaa Gly Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Ala Tyr His Tyr Pro Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Trp Ala Val Leu Arg Arg Ala Trp Thr Tyr Arg Ile Gln Glu Val Ser  
 20 25 30  
 Gly Ser Cys Asn Leu Pro Ala Ala Ile Phe Tyr Leu Pro Lys Arg His  
 35 40 45  
 Arg Lys Val Cys Gly Asn Pro Lys Ser Arg Glu Val Gln Arg Ala Xaa  
 50 55 60  
 Lys Leu Leu Asp Ala Arg Asn Xaa Val Phe  
 65 70  
 30  
 <210> 28  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Péptido sintetizado  
 40  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = piroGlu o Gln  
 45  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (64)..(64)  
 <223> X = Norleucina  
 <220>  
 <221> X

ES 2 800 316 T3

<222> (72)..(72)  
 <223> X es K (PEG-Biotina)

<400> 28

5

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

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

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

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

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

<210> 29  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido sintetizado

15

<220>  
 <221> X  
 <222> (87)..(87)

20

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

<400> 29

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

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

Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala  
 35 40 45

Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp  
 50 55 60

Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn  
 65 70 75 80

25

ES 2 800 316 T3

Phe Gly Met Leu Arg Lys Xaa Gly  
85

5 <210> 30  
<211> 88  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintetizado

<220>  
<221> X  
<222> (87)..(87)  
<223> X es K(ivDde)

15 <400> 30

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

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

Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala  
35 40 45

Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp  
50 55 60

Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn  
65 70 75 80

Phe Gly Met Leu Arg Lys Xaa Gly  
85

20 <210> 31  
<211> 88  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido sintetizado

<220>  
<221> X  
30 <222> (87)..(87)  
<223> X es K (PEG-Biotina)

<400> 31

35 Phe Leu Leu Pro Pro Ser Thr Ala Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Lys  
1 5 10 15

ES 2 800 316 T3

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

Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala  
35 40 45

Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp  
50 55 60

Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn  
65 70 75 80

Phe Gly Met Leu Arg Lys Xaa Gly  
85

<210> 32  
<211> 77  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintetizado

<400> 32

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

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

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

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

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

<210> 33  
<211> 78  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintetizado

<220>  
<221> X  
<222> (78)..(78)

<223> X es K(ivDde), opcionalmente fijado a través de un espaciador tal como PEG, por ejemplo, -PEG-K (ivDde)

ES 2 800 316 T3

<400> 33

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

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

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

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

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

- 5 <210> 34  
<211> 78  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Péptido sintetizado
- <220>  
<221> X
- 15 <222> (78)..(78)  
<223> X = un resto que puede estar biotinilado, tales como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG. El resto de aminoácido puede añadirse a través de una molécula espaciadora tal como PEG.
- 20 <400> 34

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

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

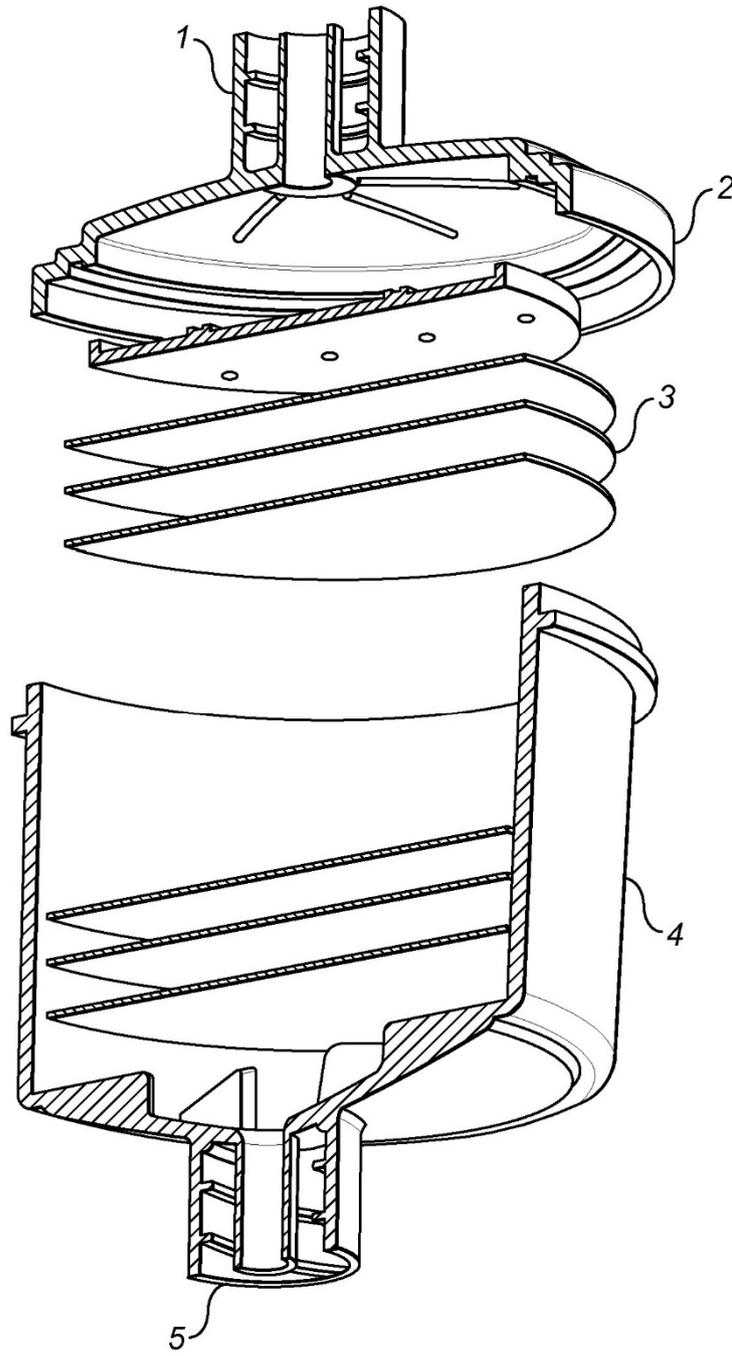
Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys  
35 40 45

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

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas, CCR7, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el reactivo de unión está inmovilizado sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de esta manera las células que expresan CCR7 de la sangre periférica del paciente, en donde el reactivo de unión es una quimiocina que se selecciona de CCL19 o CCL21.
- 10 2. El reactivo de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde:
- (i) el tratamiento del cáncer sirve para reducir los niveles de células tumorales circulantes; y/o
  - (ii) el tratamiento del cáncer sirve para reducir la incidencia de metástasis tumorales; y/o
  - (iii) el cáncer es una leucemia, opcionalmente en donde la leucemia se selecciona de leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, AML, ALL y fase leucémica de linfoma;
- 15 y/o
- (iv) el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR7 es un agonista o un antagonista del CCR7;
- y/o
- (v) el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR7 se selecciona de un anticuerpo y una quimiocina.
- 20 3. El reactivo de unión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2(i) - (iii) en donde el cáncer es PC o UBC o en donde las células que expresan CCR7 se seleccionan de células tumorales, linfocitos T de memoria centrales y linfocitos reguladores.
- 25 4. El reactivo de unión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el paciente se ha seleccionado para el tratamiento sobre la base de detectar un aumento en el nivel de células que expresan CCR7, los niveles de expresión de CCR7 y/o los niveles de células con alta expresión de CCR7 en una muestra obtenida del paciente, opcionalmente en donde el 20-90 % de la sangre del paciente se aplica a la columna en un solo tratamiento.
- 30 5. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a uno o más receptores de células T reguladoras, en particular el receptor de antígeno linfocitario cutáneo (CLA), para su uso en un método para tratar el cáncer en donde el reactivo de unión se inmoviliza directa o indirectamente sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente, retirando de esta manera una o más células T reguladoras que expresan el receptor de células T (Tregs) de la sangre periférica del paciente y en donde el reactivo de unión es capaz
- 35 de unirse a CCR7 en donde el reactivo de unión es una quimiocina que se selecciona de CCL19 o CCL21.



**FIG. 1**

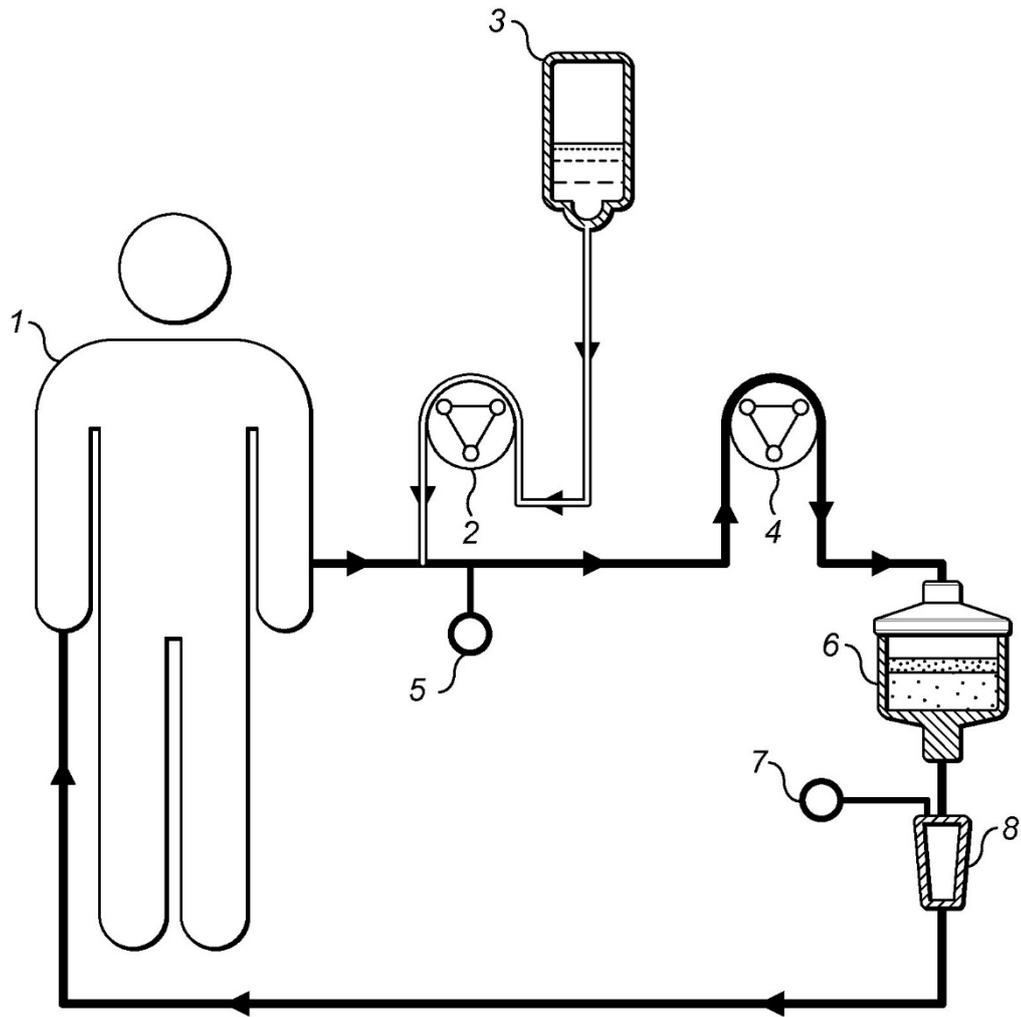


FIG. 2

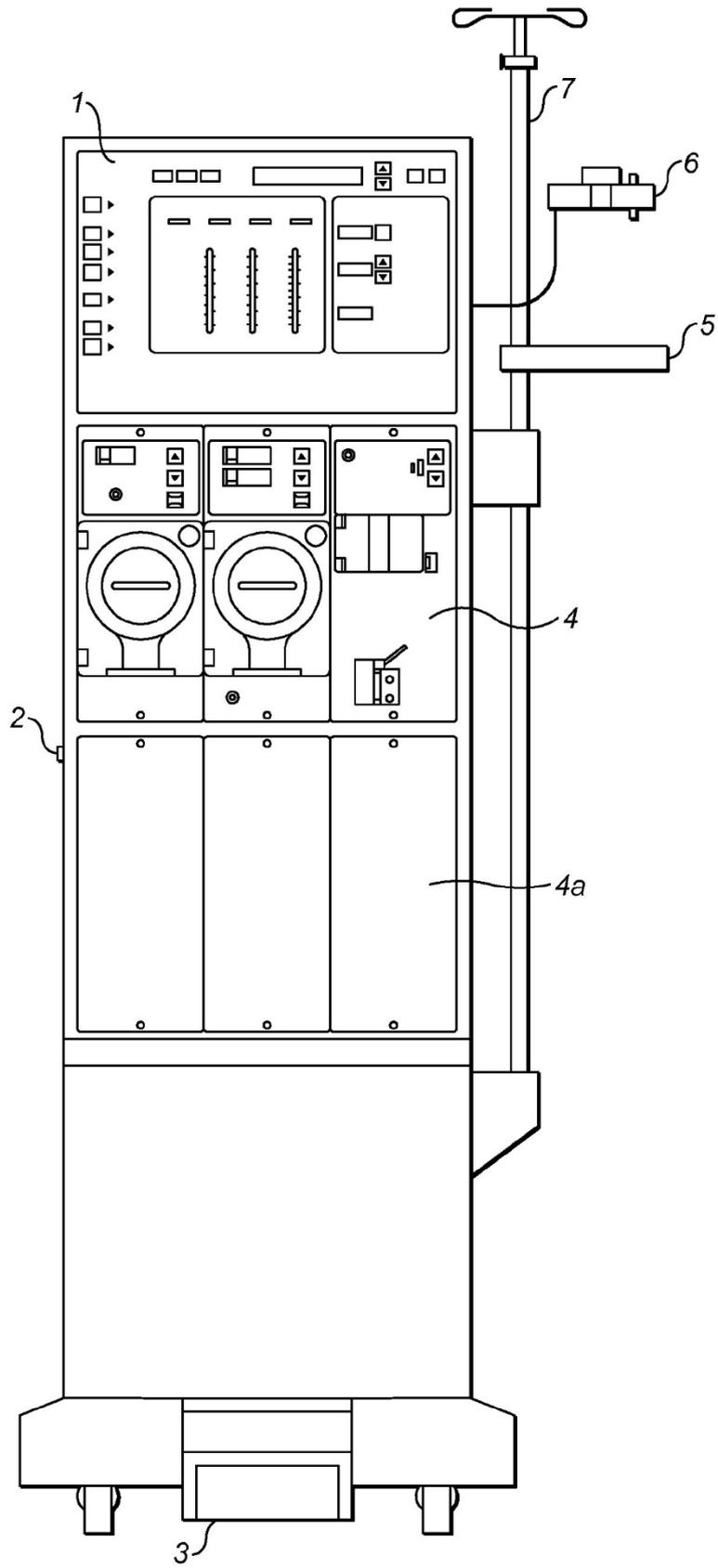
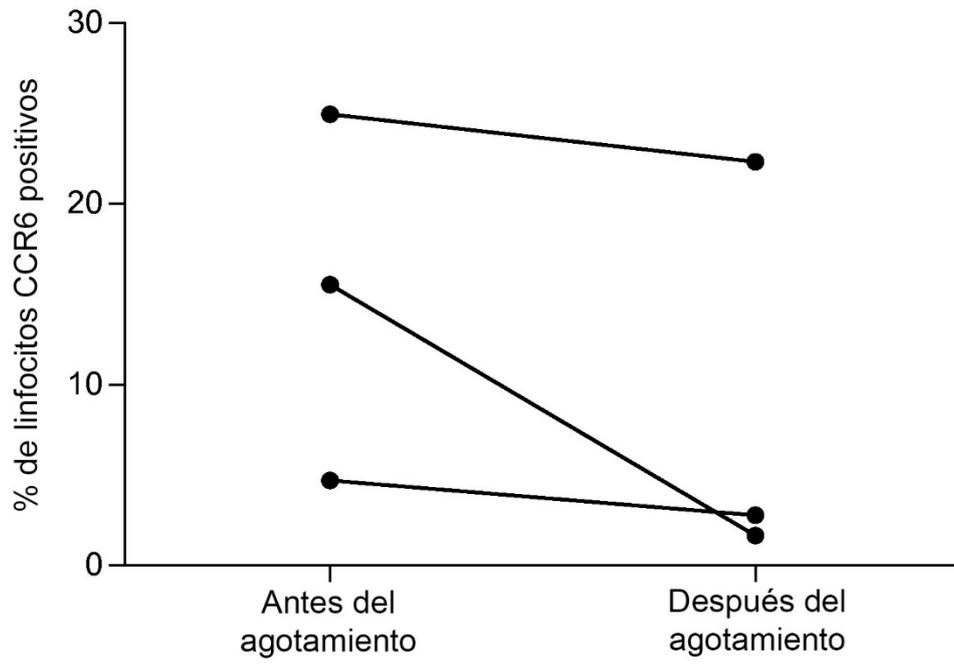


FIG. 3



*FIG. 4*

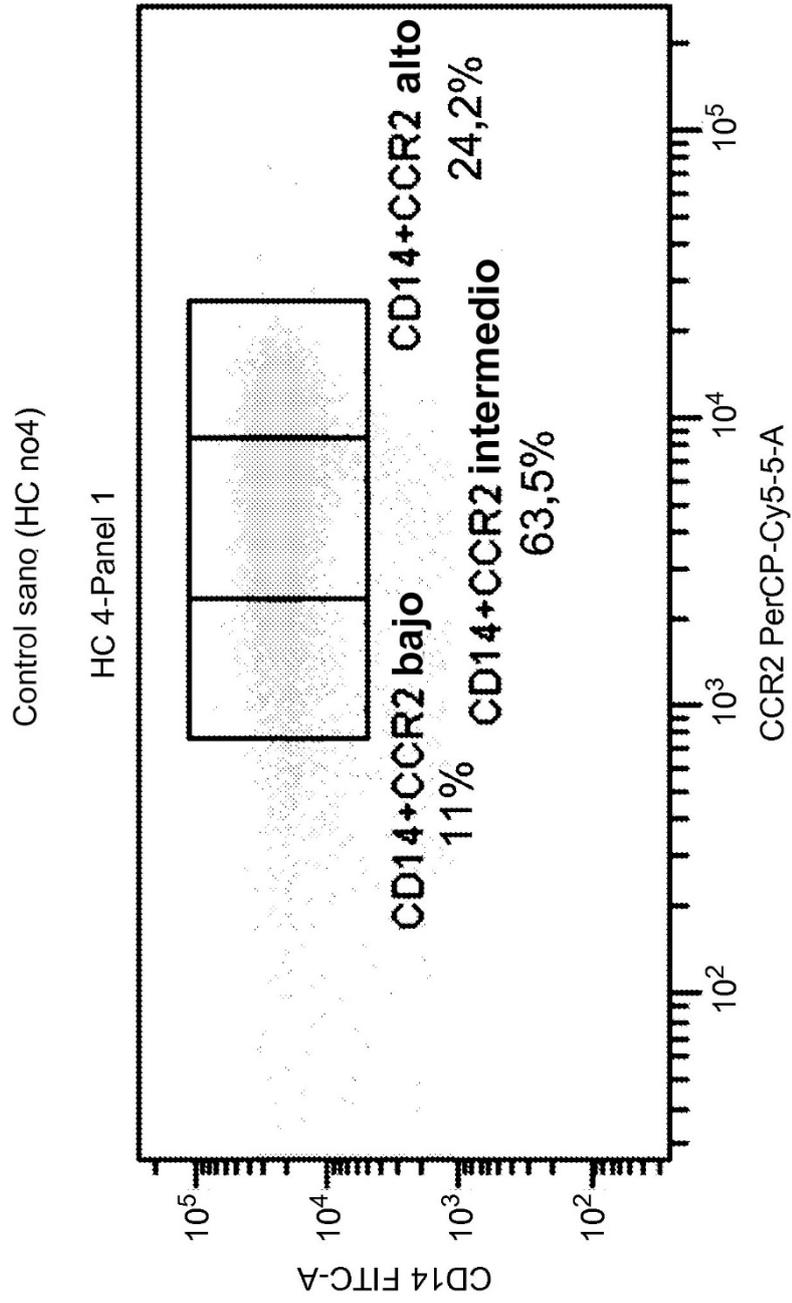
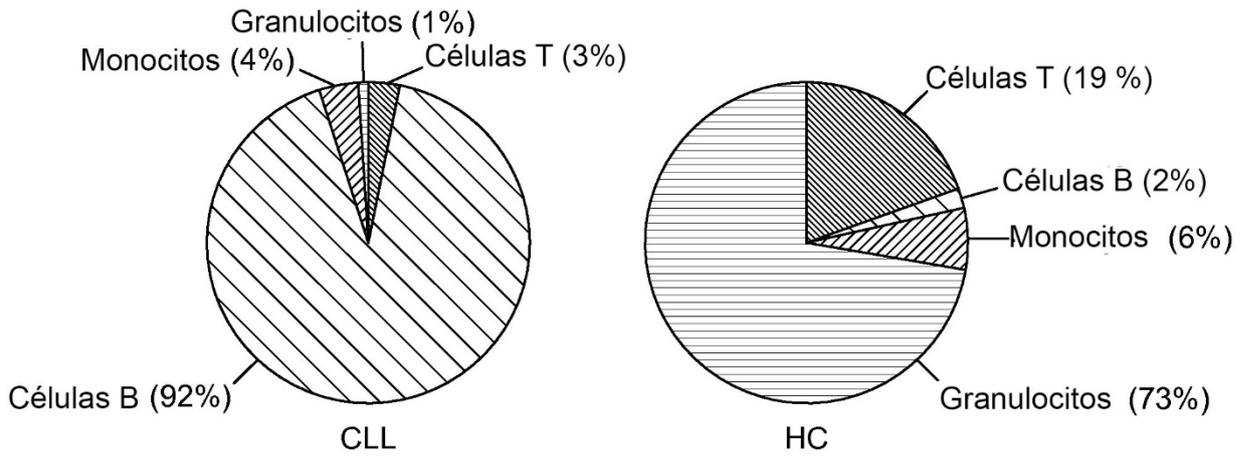
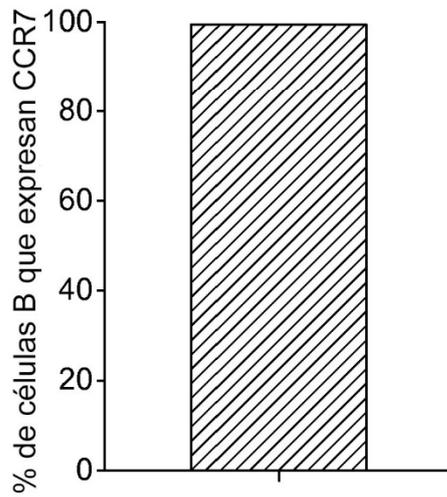


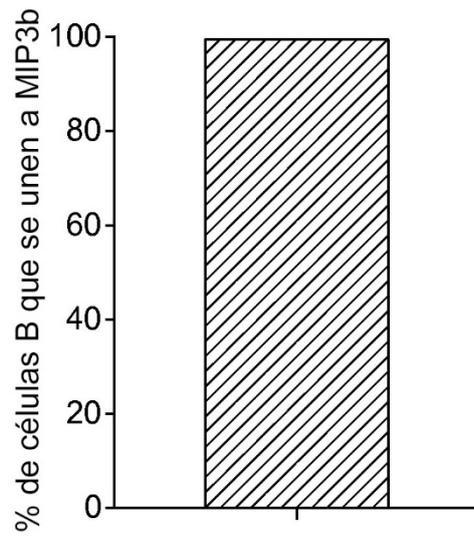
FIG. 5



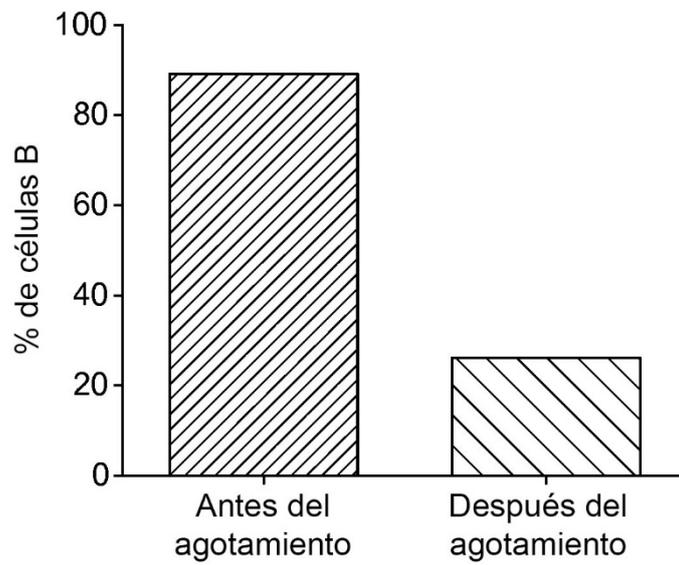
**FIG. 6**



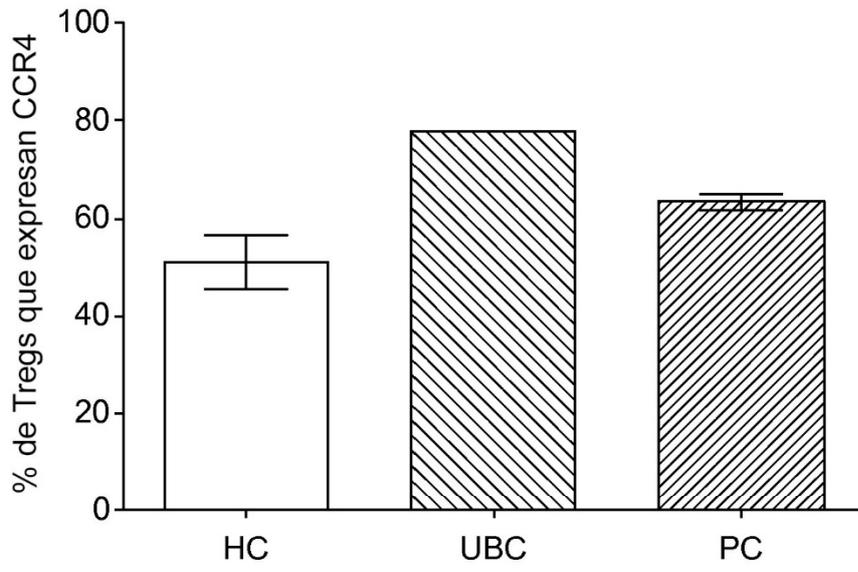
**FIG. 7**



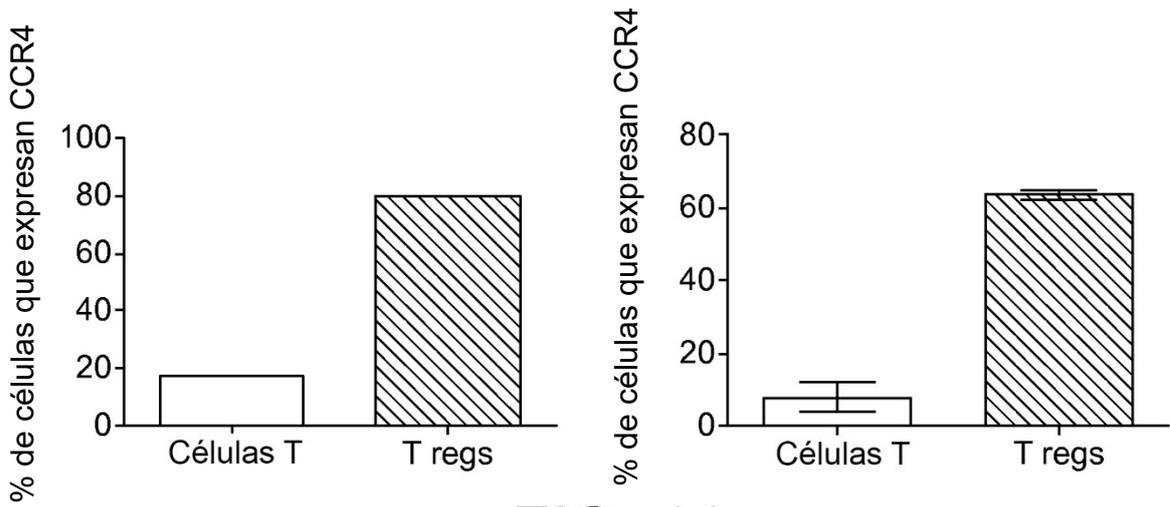
**FIG. 8**



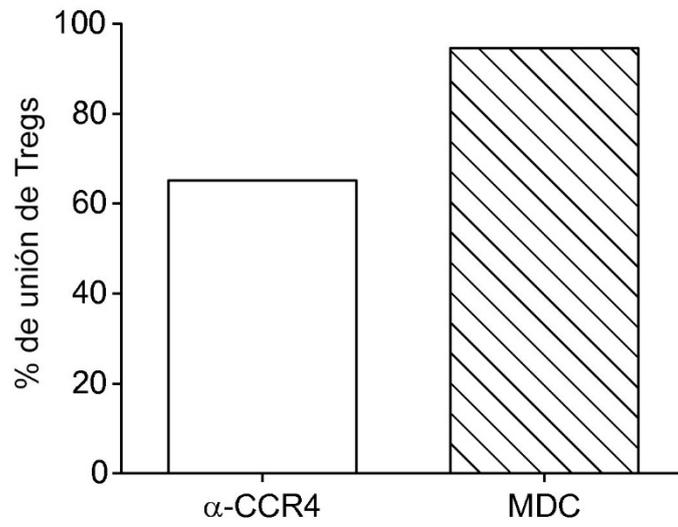
**FIG. 9**



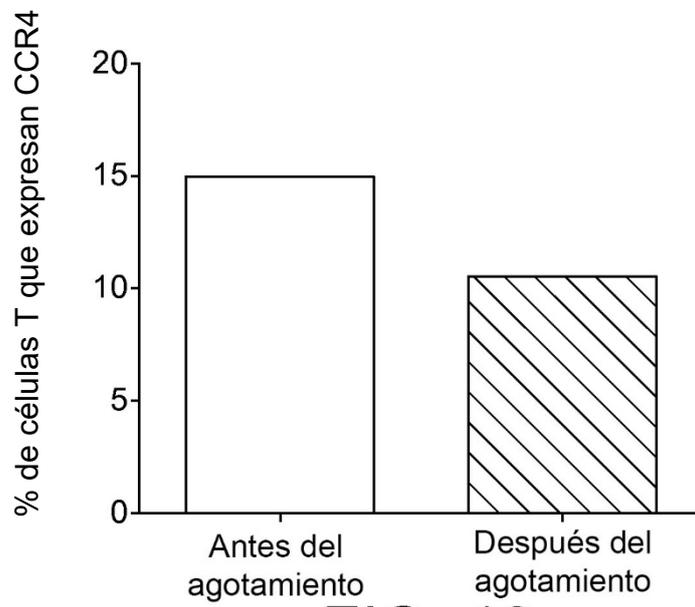
**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**



**FIG. 13**