

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 901**

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/GB2012/051349**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041833**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12727914 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2717940**

54 Título: **Tratamiento de afecciones asociadas al síndrome metabólico**

30 Prioridad:

**13.06.2011 US 201161496167 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.01.2021**

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 2 801 901 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Tratamiento de afecciones asociadas al síndrome metabólico

**5 Campo de la invención**

Las diversas realizaciones de la presente invención se refieren a productos para utilizar en el tratamiento de la diabetes.

**10 Antecedentes de la invención**

La Fundación Internacional de la Diabetes (IDF; del inglés, International Diabetes Foundation) define el síndrome metabólico como sigue:

Para que una persona sea definida como que tiene el síndrome metabólico ha de tener:

15 Obesidad central (definida como circunferencia de la cintura  $\geq 94$  cm para hombres caucásicos y  $\geq 80$  cm para mujeres caucásicas, con valores específicos de etnicidad para otros grupos) además de dos cualesquiera de los siguientes cuatro factores:

- 20 • nivel de triglicéridos (TG) elevado:  $\geq 150$  mg/dl (1,7 mmol/l) o tratamiento específico para esta anomalía lipídica
- colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL; del inglés, high-density lipoprotein) reducido:  $< 40$  mg/dl (1,03 mmol/l\*) en varones y  $< 50$  mg/dl (1,29 mmol/l\*) en mujeres o tratamiento específico para esta anomalía lipídica
- 25 • tensión arterial (BP; del inglés, blood pressure) elevada: BP sistólica  $\geq 130$  o BP diastólica BP  $\geq 85$  mm Hg o tratamiento de hipertensión previamente diagnosticada
- glucosa plasmática en ayunas elevada (FPG; del inglés, fasting plasma glucose)  $\geq 100$  mg/dl (5,6 mmol/l) o diabetes tipo 2 previamente diagnosticada

30 Si supera los 5,6 mmol/l o 100 mg/dl, se recomienda encarecidamente una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT; del inglés, oral glucose tolerance test), pero no es necesario para definir la presencia del síndrome.

Mientras que la patogénesis del síndrome metabólico y cada uno de sus componentes es compleja y no se conoce bien, se han reconocido la obesidad central y la resistencia a la insulina como factores causales importantes.

35 La adiposis dolorosa, o enfermedad de Dercum, es una afección progresiva rara caracterizada por lipomas múltiples, dolorosos, subcutáneos que normalmente ocurren en mujeres obesas, postmenopáusicas (Dercum FX. Three cases of a hitherto unclassified affection resembling in its grosser aspects obesity, but associated with special symptoms: adiposis dolorosa. Am J Med Sci 1892; 104:521-35).

40 La aféresis es un tratamiento utilizado para la reducción de componentes sanguíneos, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL; del inglés, low-density lipoproteins) y células sanguíneas. La leucoféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para quitar los glóbulos blancos, leucocitos. Se conecta al paciente a un sistema de circulación sanguínea extracorpóreo; la sangre se extrae de una vena de 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. Por otra parte, el documento EP 2 067 495 se refiere a la aportación de una columna de adsorción celular que tiene un adsorbente con un área superficial donde preocupa menos la desnaturalización y la inducción de diferenciación de células causada por un contacto del adsorbente con las células y cuyo volumen de llenado de adsorbente es pequeño y que tiene una propiedad compacta para mejorar la operabilidad y reducir una molestia sobre un paciente. Por tanto, el documento EP 2 067 495 proporciona una columna de adsorción rellena con un adsorbente que contiene una fibra cuyo diámetro de fibra es de 0,5  $\mu\text{m}$  o más y 10  $\mu\text{m}$  o menos y que tiene un área superficial de 0,5  $\text{m}^2$  o más y menos de 10 $\text{m}^2$ , en la que el volumen de llenado de adsorbente es 100 ml o menos.

**55 Sumario de la invención**

Las quimiocinas son un tipo moléculas de citocinas implicadas en el reclutamiento y activación de células en una inflamación. Las quimiocinas provocan quimiotaxis y la activación de diversas subpoblaciones de células en el sistema inmunitario. La actividad de las quimiocinas está mediada principalmente a través de la unión estrecha a sus receptores sobre la superficie de leucocitos. En ciertas realizaciones la presente invención se basa en la comprensión de que la interacción entre quimiocinas y las células que expresan sus receptores, se pueden explotar para el tratamiento de afecciones inflamatorias específicas asociadas al síndrome metabólico. Los inventores han determinado que centrarse en el reclutamiento incrementado de células que expresan receptores de quimiocinas específicas para el sitio de inflamación presenta una aproximación terapéutica nueva para tratar tales afecciones.

65 En el presente documento se muestra que los monocitos proinflamatorios que expresan CCR2 (tales como los

macrófagos) se pueden reducir en pacientes de diabetes utilizando una quimiocina adecuada tal como MCP-1 (CCL2), en particular MCP-1 biotinilada. Esto ofrece al tejido inflamado, tal como tejido adiposo o hepático, la oportunidad de curarse y ayuda a prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina.

5 Por tanto, en ciertas realizaciones de la invención sirve para reducir el reclutamiento de leucocitos inflamatorios, que expresan receptores de quimiocinas características y posiblemente expresan receptores de quimiocinas características a niveles incrementados, para sitios de inflamación ligados a trastornos tales como la diabetes. Esto se consigue utilizando reactivos de unión específicos para capturar leucocitos inflamatorios que expresan receptores de quimiocinas específicas del paciente.

10 Como se muestra en este documento, los reactivos de unión adecuados se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido, directa e indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células que expresan receptores de quimiocinas relevantes. Cuando se observan niveles incrementados de expresión de receptores de quimiocinas, se pueden extraer preferentemente tales células de la sangre periférica utilizando las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Por tanto, los métodos de las diversas realizaciones de la invención pueden dirigirse a células CCR2<sup>hi</sup> preferentemente como se define en el presente documento para extraerlas de la sangre periférica. La expresión "elevada/o" (del inglés, high) se puede determinar según las técnicas de citometría de flujo estándar. El nivel puede medirse respecto a niveles de expresión del receptor de quimiocinas en células tomadas de un sujeto sano. La Figura 15 adjunta proporciona un ejemplo de una estrategia de acotamiento (del inglés, gating).

20 En otras realizaciones, la invención proporciona adicionalmente un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas CCR2 para utilizarlo en el tratamiento de una afección de diabetes, en el que se inmovilizan uno o más reactivos de unión, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente extrayendo por tanto las células que expresan el receptor de quimiocinas CCR2 de la sangre periférica del paciente y en el que el reactivo de unión es MCP-1.

25 En consecuencia, la presente invención se refiere a un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas CCR2 para utilizarlo en el tratamiento de una afección de diabetes, en el que 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 extrayendo por tanto las células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente y en el que el reactivo de unión es MCP-1.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a una quimiocina de MCP-1 modificada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, en la que se ha hecho una o más de las siguientes modificaciones:

- a) el resto de glutamina en la posición 1 de la SEQ ID NO: 2 se ha reemplazado con piroglutamina,
- b) el extremo C se produce como un derivado de amida,
- 40 c) el resto de lisina en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1 o en la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 o en la posición 67 de la SEQ ID NO: 3, que se puede reemplazar con un aminoácido alternativo adecuado tal como el ácido diaminopropiónico o la ornitina, se biotinila, opcionalmente a través de un grupo espaciador, para permitir la inmovilización de la quimiocina sobre un soporte sólido,
- d) el resto de metionina en la posición 87 de la SEQ ID NO: 1 o en la posición 64 de la SEQ ID NO: 2 o en la posición 56 de la SEQ ID NO: 3 se ha reemplazado con norleucina.

45 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una quimiocina CCL2 modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.

50 Los monocitos se producen en la médula ósea a partir de precursores de células madre hematopoyéticas denominados monoblastos. Los monocitos se pueden diferenciar en macrófagos o en células dendríticas. Los monocitos y su progenie de macrófagos y células dendríticas cumplen una serie de funciones en el sistema inmunitario, incluyendo fagocitosis, presentación de antígeno y producción de citocinas. Los monocitos se pueden caracterizar en referencia a la expresión del marcador de superficie celular CD14, opcionalmente junto con CD16. Los monocitos clásicos se pueden caracterizar por un nivel de expresión elevado del receptor de superficie CD14 (CD14<sup>++</sup> CD16-monocito). Los monocitos no clásicos se pueden caracterizar por un nivel bajo de expresión de CD14 y con coexpresión adicional del receptor CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocito). Los monocitos intermedios se pueden caracterizar por un nivel elevado de expresión de CD14 y un nivel bajo de expresión de CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocitos). Los macrófagos se derivan de monocitos y son responsables de proteger tejidos de sustancias extrañas. Son células que poseen un núcleo liso grande, un área grande de citoplasma y vesículas internas para procesar material extraño. El término "macrófago" puede referirse a una célula derivada de monocito que expresa uno o más de los siguientes marcadores de superficie CD14, CD11b, Lisozima M, MAC-1/MAC-3 y CD68. El término macrófago incluye tanto macrófagos activados como no activados. Los macrófagos activados se pueden caracterizar por la expresión de uno o más de CD69, ENG, FCER2 y IL2RA, HLA-DR, CD86. Los macrófagos no activados todavía no han recibido señales de activación a través de, por ejemplo, receptores TLR y por tanto, expresan menos marcadores de activación sobre la superficie celular que se corresponde con una maduración menor. Los macrófagos M1 se pueden caracterizar por la expresión de uno o más de CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> y secretar principalmente IL-23 e IL-1, TNF, IL-6 y niveles elevados de IL-12 y además

moléculas efectoras tales como iNOS y ROI. Los macrófagos M1 tienen características citotóxicas a diferencia de los macrófagos M2. Los macrófagos M2 se pueden caracterizar por la expresión de uno o más de SRA/B+CD163+MR+CD14+ y expresar TGFβ, IL-10 e IL-1Ra. Los macrófagos asociados a tumores (TAM; del inglés tumor associated macrophages) comparten muchas características con los macrófagos M2 y se consideran macrófagos M2 polarizados. El paradigma M1/M2 se puede encontrar también en los subconjuntos de monocitos donde los monocitos CD14<sup>+</sup>C016<sup>-</sup>CXC3R1<sup>baja</sup> se consideran el subconjunto "inflamatorio" y los CD14<sup>baja</sup>CD16<sup>+</sup>CXC3R1<sup>elevada</sup> son monocitos "residentes".

Los tres tipos principales de linfocitos son los linfocitos T, linfocitos B y las células citolíticas naturales (NK; del inglés, natural killer). El término "linfocito T" incluye linfocitos T CD4<sup>+</sup> tales como los linfocitos T colaboradores (linfocitos Th1 y linfocitos Th2) y linfocitos CD8<sup>+</sup> tales como los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos Th1 se pueden caracterizar por la expresión de CCR5 y/o por la producción de IFN-γ. Los linfocitos Th2 se pueden caracterizar por la expresión de CCR3 y/o por la producción de IL-4.

CCR2, CCR1, CCR3, CCR4 o CCR5 expresado en estas células mencionadas anteriormente se une a quimiocinas tales como la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1, CCL2) o CCL5. MCP-1 es un quimioatrayente muy importante para monocitos y linfocitos T de memoria por medio de su unión a su receptor de superficie celular específico, CC-quimiocina receptor-2. CCL5 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 5 de quimiocinas (motivo C-C), también conocido como RANTES. La HGNC ID para este gen es 10632. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q11.2-q12. El símbolo anterior y el nombre para el gen es D17S136E, SCYA5, "citocina A5 pequeña inducible (RANTES)". Los sinónimos para este gen incluyen "betaquimiocina RANTES", MGC17164, RANTES, "regulada tras la activación, expresada en T normalmente y presumiblemente secretada", "SIS-delta", SISd, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 5", "proteína p288 específica de linfocitos T", "proteína RANTES específica de linfocitos T" y TCP228. La secuencia de referencia del Genbank para CCL5 es AF043341.1. RANTES se une a CCR1, CCR3 o CCR5.

CCR1 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el receptor 1 de quimiocinas (motivo C-C). La HGNC ID para este gen es 1602. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 3p21. El símbolo anterior y el nombre es CMKBR1, SCYAR1. Los sinónimos para este gen incluyen CD191, CKR-1, MIP1α R. La secuencia de referencia de Entrez Gene para CCR1 es 1230 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

CCR2 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el receptor 2 de quimiocinas (motivo C-C). La HGNC ID para este gen es 1603. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 3p21. El símbolo anterior y el nombre para el gen es CMKBR2. Los sinónimos para este gen incluyen CC-CKR-2, CD192, CKR2, FLJ78302, MCP-1-R. La secuencia de referencia del NCBI es NM\_001123041.2 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

CCR3 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el receptor 3 de quimiocinas (motivo C-C). La HGNC ID para este gen es 1604. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 3p21.3. El símbolo anterior y el nombre para el gen es CMKBR3. Los sinónimos para este gen incluyen CC-CKR-3, CD193 y CKR3. La secuencia de referencia de Entrez Gene para CCR3 es AF247361.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

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

CCR4 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el receptor 4 de quimiocinas (motivo C-C). La HGNC ID para este gen es 1605. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 3p24-p21.3. Los sinónimos para este gen incluyen CC-CKR-4, CD194, ChemR13, CKR4, CMKBR4, k5-5. La secuencia de referencia de Genebank para CCR4 es X85740.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

Se ha observado que la expresión de CCR2 en monocitos es elevada en pacientes diabéticos. Asimismo, los ratones transgénicos con una expresión de MCP-1 específica de tejido adiposo tienen infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, contenido de triacilglicerol hepático elevado y resistencia a la insulina. Los ratones knockout MCP-1 alimentados con una dieta rica en grasas tienen una acumulación de macrófagos reducida considerablemente en el tejido adiposo y esteatosis hepática en comparación con ratones silvestres con alimentación rica en grasas. La inhibición de la función de MCP-1 mediante la expresión aguda de un mutante negativo dominante de MCP-1 mejoró la resistencia a la insulina en ratones db/db y en ratones silvestres con alimentación rica en grasas. Por otra parte, un nivel incrementado de MCP-1 en suero se correlaciona con afecciones asociadas al síndrome metabólico, que incluye obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hipertensión y concentraciones incrementadas de triacilglicerol en suero. En el presente documento se muestra que se puede utilizar MCP-1 para reducir los niveles de monocitos que expresan CCR2 en sujetos diabéticos. Esto ofrece al tejido inflamado, tal como tejido adiposo o hepático, la

oportunidad de curarse y ayuda a prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina.

La presente invención se basa en un reactivo de unión que es capaz de unirse específicamente a un receptor de quimiocinas. Esta reacción de unión específica permite a las células que expresan el receptor de quimiocina que sean eliminadas de la sangre periférica del paciente cuando la sangre se pasa por el soporte sólido, sobre o dentro del cual está inmovilizado el reactivo de unión. Los receptores de quimiocinas específicos de interés incluyen CCR2. Mediante "unión específica" se quiere expresar que el reactivo de unión muestra suficiente especificidad de unión y afinidad/cinética de unión apropiada para permitir la extracción de células que expresan CCR2 de la sangre periférica. El reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR2 puede ser un agonista o un antagonista de CCR2. Dado que la afección de la enfermedad se basa en la regulación al alza de la expresión de o la señalización a través de CCR2, en ciertas realizaciones el reactivo de unión capaz de unirse específicamente a CCR2 es un antagonista de CCR2. 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, tal como apreciaría un experto en la materia. Las quimiocinas son ejemplos específicos de reactivos de unión.

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

Los truncamientos pueden implicar la deleción de los aminoácidos del extremo N terminal o del extremo C terminal según proceda, o ambos. Normalmente, la versión truncada retendrá los restos requeridos para que la quimiocina se pliegue correctamente, por ejemplo, para retener una estructura plegada de quimiocina, coherente con el requerimiento de que una versión truncada debe retener la capacidad de unirse al receptor relevante (expresado mediante (sobre la superficie de) un leucocito). Las moléculas de quimiocina incluyen normalmente enlaces disulfuro entre el 1º y el 3º y el 2º y 4º restos de cisteína respectivamente, como entendería un experto en la materia. Cuando se presentan secuencias en el presente documento, se supone que estos enlaces disulfuro se formarán en la proteína plegada (salvo que se indique otra cosa).

Las quimiocinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la presente invención para unirse a CCR2 incluyen MCP-1. MCP-1 se une solamente al receptor de quimiocinas CCR2 y por tanto se prefiere esta quimiocina. De manera más específica, MCP-1 es útil para extraer las células que expresan CCR2 de la sangre de un paciente.

Las quimiocinas modificadas y truncadas descritas en mayor detalle en el presente documento (en referencia a las secuencias de aminoácidos relevantes, como se expone en las SEQ ID NO y ejemplos experimentales acompañantes). Tales formas modificadas pueden instruir al experto en la materia en cuanto a formas modificadas adicionales de la misma y otras quimiocinas que pueden ser adecuadas para utilizar en la invención. Las quimiocinas muestran homología de secuencias que varía desde menos de un 20 % a más de un 90 %, pero todas comparten estructuras terciarias muy similares que consisten en un extremo N terminal desordenado, seguido de un bucle largo (el bucle N) que termina en una hélice 3<sub>10</sub>, una lámina β tricatenaria y una hélice del extremo C terminal. La topología general se establece mediante enlaces disulfuro. Esta estructura terciaria común es una característica frecuente de la familia de proteínas de quimiocinas (Fernandez EJ and Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002, 42, 469-99; Allen SJ et al, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820).

Los truncamientos dentro de esta región del extremo N terminal pueden mantener la unión al receptor, pero pueden

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

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

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

Los aminoácidos en un péptido, polipéptido, o proteína se unen químicamente junto con enlaces amida (CONH) habitualmente. Adicionalmente, los aminoácidos se pueden unir juntos mediante otros enlaces químicos. Por ejemplo, las uniones para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH- (cis y trans), -COCH<sub>2</sub>-CH(OH)CH<sub>2</sub>- y -CHH<sub>2</sub>SO- (Estos y otros se pueden encontrar en Spatola, en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo de 1983), Vol. 1, Artículo 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci pp. 463-468, 1980; Hudson, et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185, 1979; Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249, 1986; Harm J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314, 1982; Almquist et al. J. Med. Chem. 23: 1392-1398, 1980; Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533, 1982; Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404, 1983; y Hruby Life Sci 31:189-199, 1982.

CCL2 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 2 de quimiocinas (motivo C-C), también conocido como MCP-1. La HGNC ID para este gen es 10618. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q11.2-q21.1. El símbolo anterior y el nombre para este gen es SCYA2 "citocina A2 pequeña inducible (proteína 1 quimiotáctica de monocitos, homóloga a Sig-je de ratón)". Los sinónimos para este gen incluyen GDCF-2, HC11, MCP1, MGC9434, SMC-CF, "proteína-1 quimioatrayente de monocitos", "factor quimiotáctico y de activación de monocitos", "proteína 1 quimiotáctica de monocitos, homóloga a Sig-je de ratón", "proteína JE secretora de monocitos", "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 2". La secuencia de referencia de Genbank para CCL2 es BC009716.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

CCL8 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 8 de quimiocinas (motivo C-C), también conocido como MCP-2. La HGNC ID para este gen es 10635. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q11.2. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA8, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 8 (proteína 2 quimiotáctica de monocitos)". Otro sinónimo para este gen es HC14. La secuencia de referencia de Genbank para CCL8 es X99886.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

CCL7 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 7 de quimiocinas (motivo C-C), también conocido como MCP-3. La HGNC ID para este gen es 10634. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q11.2-q12. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA6, SCYA7, "citocina A7 inducible pequeña (proteína 3 quimiotáctica de monocitos)". Los sinónimos para este gen incluyen FIC, MARC, MCP-3, MCP3, NC28, "proteína 3 quimiotáctica de monocitos", "proteína 3 quimiotáctica de monocitos". La secuencia de referencia de Genbank para CCL7 es AF043338 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

CCL13 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 13 de quimiocinas (motivo C-C), también conocido como MCP-4. La HGNC ID para este gen es 10611. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q11.2. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA13, "subfamilia A de

citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 13". Los sinónimos para este gen incluyen CKb10, MCP-4, MGC17134, NCC-1, SCYL1. La secuencia de referencia de Genebank para CCL13 es AJ001634 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

5 MCP-5 es una quimiocina de ratón en la familia de quimiocinas CC. Se conoce también como ligando 12 de la quimiocina (motivo C-C) (CCL12) y debido a su similaridad con la quimiocina humana MCP-1, a veces se denomina quimiocina relacionada con MCP-1. El gen para MCP-5 se encuentra en un clúster de quimiocinas CC en el cromosoma 11 de ratón. La secuencia de referencia de NCBI para CCL12 es NC\_000077.5. El símbolo previo para MCP-5 es SCYA12. La secuencia de referencia de NCBI para CCL12 es NC\_000077.5 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

15 CCL5 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 5 de quimiocinas (motivo C-C), también conocido como RANTES. La HGNC ID para este gen es 10632. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 17q11.2-q12. El símbolo anterior y el nombre para el gen es D17S136E, SCYA5, "citocina A5 pequeña inducible (RANTES)". Los sinónimos para este gen incluyen "betaquimiocina RANTES", MGC17164, RANTES, "regulada tras la activación, expresada en T normalmente y presumiblemente secretada", "SIS-delta", SISd, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 5", "proteína p288 específica de linfocitos T", "proteína RANTES específica de linfocitos T", TCP228. La secuencia de referencia de Genebank para CCL5 es AF043341.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

20 CCL17 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 17 de quimiocinas (motivo C-C). La HGNC ID para este gen es 10615. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 16q13. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA17, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 17". Los sinónimos para este gen incluyen ABCD-2, TARC. La secuencia de referencia de Genebank para CCL17 es D43767.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

30 CCL21 es el símbolo del gen aprobado por el Comité de nomenclatura de genes de HUGO para el ligando 21 de quimiocinas (motivo C-C). La HGNC ID para este gen es 10620. El gen se encuentra en la posición del cromosoma 9p13. El símbolo anterior y el nombre para el gen es SCYA21, "subfamilia A de citocinas inducibles pequeñas (Cys-Cys), miembro 21". Los sinónimos para este gen incluyen 6CKine, "betaquimiocina exodus-2", CKb9, ECL, "quimioatrayentes eficaces para linfocitos", exodus-2, "quimiocina de tejido linfóide secundaria", SLC, TCA4. La secuencia de referencia de Genebank para CCL21 es AB002409.1 como estaba disponible el 13 de junio de 2011.

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

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

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

60 El aminoácido (región C terminal), que puede ser un resto de lisina o un equivalente funcional, en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1 o en la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 o en la posición 67 de la SEQ ID NO: 3 puede estar biotilado a través de un grupo espaciador adecuado, tal como un grupo espaciador de polietilenglicol (PEG), para permitir la inmovilización de la quimiocina sobre un soporte sólido. En realizaciones específicas, el espaciador de PEG es ácido 3,6-dioxo aminooctanoico. En las figuras 7 a 9 respectivamente se muestran la secuencia y la biotilación de las quimiocinas MCP-1 modificadas de la invención. Las quimiocinas MCP-1 modificadas pueden ser agonistas o antagonistas de la actividad de CCR2. Pueden ensayarse para la actividad en un ensayo adecuado, tal como en

ensayos basados en células. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas se pueden determinar en un ensayo funcional basado en células sobre un receptor CCR2 humano.

5 Un ejemplo adicional de una quimiocina de las diversas realizaciones de la invención que contiene modificaciones y que se adapta específicamente para la utilización en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase un ejemplo más adelante). El CCL2 modificado (MCP-1) se corresponde con los restos 1 a 76 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal del extremo N terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y por tanto retiene el pliegue de la quimiocina. La Gln en el extremo N terminal de la proteína (Gln1) se sustituye con piroglutamina para evitar las especies mixtas de la Gln del extremo N terminal y pyroGlu que se están generando. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y el uso de la columna. Se incorpora FmocLys(ivDde)-OH como resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 10). Se puede incorporar un espaciador adecuado, tal como un espaciador de PEG, entre la funcionalidad de  $\epsilon$ -amino y la biotina. La versión biotinilada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

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

20 SEQ ID NO: 9:  
 XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC  
 ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT

X = pyroGlu o Gln

25 y/o SEQ ID NO: 11:  
 XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC  
 ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT

X1 = pyroGlu o Gln

30 X75 es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, opcionalmente K(PEG-Biotina)

35 Un ejemplo adicional de una quimiocina de la divulgación que contiene modificaciones y que se adapta específicamente se describe en detalle en el presente documento (véase el ejemplo 4, más adelante). El CCL5 modificado (RANTES) se corresponde con los restos 1 a 68 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal del extremo N terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y por tanto retiene el pliegue de la quimiocina. La única metionina (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: 12). Esta sustitución de Met a Lys proporciona una lisina en la posición 67 que se puede modificar mediante biotinilación. Se incorpora FmocLys(ivDde)-OH como resto 67 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 13). La versión biotinilada comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

45 Por tanto, la divulgación también se refiere a una quimiocina modificada que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14:

SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
 ANPEKKWVREYINSLEXS

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

55 Un ejemplo adicional de una quimiocina según la divulgación que contiene modificaciones y se adapta específicamente para la utilización en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase el ejemplo 3, más adelante). El CCL8 modificado (MCP-2) se corresponde con los restos 1 a 76 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal del extremo N terminal de 23 aminoácidos, que se escinde) y por tanto retiene el pliegue de la quimiocina. La Gln en el extremo N terminal de la proteína se somete a la formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Por tanto, se sustituye Gln1 de la secuencia con piroglutamina para evitar que se formen especies mixtas de Gln y pyroGlu del extremo N terminal (SEQ ID NO: 15). Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y el uso de la columna. Se incorpora FmocLys(ivDde)-OH como resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 16). La lisina de origen natural en la posición 75 se modifica a través de biotinilación. Se puede incorporar un espaciador adecuado, tal como un espaciador de PEG, entre la funcionalidad de  $\epsilon$ -amino y la biotina (SEQ ID NO: 17):

Por tanto, la divulgación también se refiere a una quimiocina modificada que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17:

**XPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKE  
RWVRDSMKHLDQIFQNLXP**

5

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

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

10

Las quimiocinas útiles en las diversas realizaciones de la invención se pueden biotinilar mediante métodos conocidos en la técnica tal como se describe el documento WO 00/50088 A2. Como se ha indicado anteriormente, es preferible el marcaje específico de sitio de las quimiocinas de las diversas realizaciones de la invención, aunque se puede utilizar cualquier técnica de marcaje que no afecte significativamente la capacidad de unión al receptor de la quimiocina. Están disponibles comercialmente diversas quimiocinas biotiniladas específicamente de sitio y quimiocinas nativas, por ejemplo de Almac, Craigavon, Reino Unido. En realizaciones específicas las quimiocinas se biotinilan a través de un grupo espaciador. El espaciador se puede emplear para evitar que el grupo biotina impacte sobre la actividad de unión de la quimiocina, en particular que se una a la quimiocina de su receptor afín. Puede utilizarse cualquier espaciador adecuado que facilite la retención de las propiedades de unión del receptor de la quimiocina en las diversas realizaciones de la invención. Por tanto, en las realizaciones específicas descritas anteriormente, se pueden emplear espaciadores diferentes de los espaciadores de PEG según proceda. En realizaciones específicas, el espaciador es un espaciador de polietilenglicol (PEG). El PEG ha demostrado ser un espaciador eficaz que permite la unión de la biotina a la quimiocina (que se puede inmovilizar a continuación sobre el soporte sólido a través de la interacción con estreptavidina) sin comprometer la capacidad de unión del receptor.

25

En el contexto de la divulgación el término "anticuerpo" incluye todas las inmunoglobulinas o moléculas análogas a inmunoglobulina con afinidad de unión específica por 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 seres humanos, cabras, conejos y ratones). El término "anticuerpo" también se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una cadena ligera o una cadena pesada de la región variable de inmunoglobulina que reconoce específicamente y que se une a un epítipo de un antígeno y se extiende a todos los derivados y fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al receptor de la quimiocina relevante. Estos derivados y fragmentos pueden incluir fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fc, etc. El término anticuerpo abarca anticuerpos compuestos tanto por cadenas pesadas como ligeras, pero también anticuerpos (solo) de cadena pesada. En la tabla 1, más adelante, se enumeran anticuerpos a modo de ejemplo comercialmente disponibles que se unen a los receptores quimiocinas de interés. Pueden o no estar marcados. Se puede hacer una referencia general a "Antibodies a laboratory manual: By E Harlow and D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988". Los anticuerpos Anti-CCR2 se describen, por ejemplo, en el documento WO 2010/021697. Entre los ejemplos adicionales de anticuerpos se incluye MLN-1202, un anticuerpo monoclonal anti-CCR2, actualmente en fase de ensayos clínicos (Millennium Pharmaceuticals).

30

35

40

45

Tabla 1. Anticuerpos marcados con fluoróforo comercialmente disponibles contra receptores de quimiocinas específicos

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR5	PE	Biologend
CCR3	PE	Biologend
CCR1	Alexa Fluor 647	Biologend
CCR2	PerCP Cy5.5	BD Biosciences
CCR4	PerCP Cy5.5	BD Biosciences

50

Se conocen en la técnica materiales de soporte sólido para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención. El "soporte sólido" se refiere a, por ejemplo, materiales que tienen una superficie rígida o semirrígida y que 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 de manera que las haga coagular o adherirse al soporte según se aplica la sangre periférica completa al dispositivo. En ciertas realizaciones, se emplea un soporte tratado con un agente para proporcionarle propiedades anticoagulantes, en particular, un soporte heparinizado. Como alternativa, se puede tratar la sangre del paciente con un anticoagulante tal como la heparina antes de la aplicación al soporte. Los materiales de soporte útiles comprenden carbohidratos de peso molecular elevado, en particular, carbohidratos que tienen un peso molecular de 100 kDa o más, tales como agarosa, en forma de partículas, reticulada opcionalmente y celulosa. Otros materiales de soporte preferidos son polímeros, tales como el poliestireno carboxilado

55

y vidrio. El soporte de las diversas realizaciones de la invención se puede proporcionar en la forma de partículas o fibras. Las partículas de soporte pueden tener una forma regular, tales como esferas o perlas, o una forma irregular. Pueden ser porosas o no porosas. Un tamaño de partícula promedio preferido del soporte es de 50  $\mu\text{m}$  a 2 mm. En determinadas realizaciones se usa como matriz de la columna la Sepharose™, una agarosa reticulada, en forma de perlas. Se elige por su capacidad de distribución óptima y puede proporcionar un área disponible grande para la unión por afinidad. Se pueden proporcionar soportes sólidos en forma de perlas magnéticas, con el reactivo de unión específico inmovilizado sobre las perlas magnéticas. Tras la captura de las células que expresan receptores de quimiocina CCR2 de la sangre, se pueden extraer las perlas de la sangre con la ayuda de un separador magnético apropiado.

Los métodos para inmovilizar reactivos de unión sobre un soporte sólido son conocidos en la técnica. Un reactivo de unión, tal como una quimiocina, se puede inmovilizar sobre el soporte de una forma directa o indirecta. La inmovilización puede ser mediante un enlazador adecuado en algunas realizaciones. Un método preferido de inmovilización indirecta de un reactivo de unión, tal como una quimiocina, depende de la interacción entre moléculas de biotina y avidina. La "avidina" o "molécula de avidina" se refiere a cualquier tipo de proteína que se une específicamente a biotina para la exclusión sustancial de otras moléculas (pequeñas) que pueden estar presentes en una muestra biológica. Entre los ejemplos de avidina se incluyen avidinas que están presentes de forma natural en la clara de huevo, proteína de semillas oleaginosas (por ejemplo, harina de soja) y grano (por ejemplo, maíz) y estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano. Por tanto, la biotilación 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 según los métodos conocidos en la técnica. Específicamente, dicho método puede comprender proporcionar el reactivo de unión en forma biotilada, proporcionar un soporte sólido que tiene estreptavidina inmovilizada sobre su superficie, poner en contacto el soporte con una solución acuosa del reactivo de unión biotilado y lavar el soporte con un disolvente acuoso. Además, las interacciones de los pares de unión, tales como interacciones anticuerpo - antígeno, se pueden utilizar también 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, tal como un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, como se define en el presente documento, que tiene una afinidad conocida para una secuencia peptídica particular o un hapteno de molécula pequeña. Incorporando el otro miembro del par de unión, tal como un antígeno, la secuencia peptídica o el hapteno sobre o en el reactivo de unión facilita la inmovilización sobre un soporte sólido revestido con el anticuerpo o fragmento correspondiente o derivado del mismo. Por tanto, el reactivo de unión se puede modificar para incluir la secuencia peptídica o hapteno en la molécula lineal o se puede añadir como una cadena secundaria o marca. Se puede emplear cualquier par de anticuerpo-antígeno adecuado. El fragmento o derivado de anticuerpo puede ser cualquier fragmento o derivado que retiene la afinidad de unión específica por el antígeno adecuado. Entre los ejemplos se incluyen taxol, 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. Se pueden utilizar otras interacciones de afinidad elevada para la inmovilización de reactivos de unión, siempre que el reactivo de unión se pueda sintetizar o derivatizar con una de las moléculas asociadas que interactúan y el soporte sólido sintetizado o derivatizado con la otra molécula asociada que interactúa sin pérdida de la actividad de unión (es decir, unión del reactivo de unión al receptor de quimiocina adecuado). La inmovilización puede ocurrir a través de la misma interacción esencialmente a la inversa en algunas realizaciones. Por tanto, el reactivo de unión que puede ser una quimiocina, por ejemplo, se puede unir a un anticuerpo como se define en el presente documento y el soporte sólido derivatizarse con el antígeno. La quimiocina se puede producir como una proteína de fusión con el anticuerpo.

Como alternativa, los reactivos de unión, por ejemplo, las quimiocinas, se pueden inmovilizar directamente sobre un soporte sólido utilizando técnicas de bioconjugación establecidas sobre el terreno. Por ejemplo, la inmovilización directa de proteínas sobre bromuro de cianógeno activó soportes sólidos a través de funcionalidades amino dentro de la secuencia primaria de la proteína. Como alternativa, se pueden usar funcionalidades de sulfhidrilo dentro de proteínas para inmovilizar directamente la proteína en los soportes derivatizados con haluro de alquilo o soportes que contienen funcionalidades tiol libres. En realizaciones adicionales, las proteínas que contienen funcionalidades  $\alpha$ -tioéster se pueden inmovilizar directamente sobre soportes que contienen fracciones de 1,2 amino tiol (por ejemplo, cisteína en el extremo N terminal) utilizando la reacción de ligadura química natural. Como alternativa, se pueden inmovilizar las proteínas modificadas con cetonas y aldehídos sobre soportes sólidos derivatizados con funcionalidades de hidrazinilo, hidracida y aminoxi, utilizando hidrazona / oxima unidas formando reacciones de ligadura (y viceversa). Como alternativa, se puede utilizar la química de 'Click' para inmovilizar proteínas sobre soportes sólidos, por la cual la proteína y el soporte se derivatizan con las funcionalidades químicas reactivas mutuamente adecuadas (azidas y alquinos). En otras realizaciones, se puede usar la química de ligadura de Staudinger para inmovilizar proteínas derivatizadas adecuadamente sobre los soportes sólidos derivatizados adecuadamente.

El soporte sólido está contenido dentro o se lleva por la columna de aféresis. Por tanto, se entiende por "cargado" que la columna transporta o contiene el soporte sólido de manera que la sangre (periférica) puede fluir a través de la columna en contacto con el soporte sólido. Por tanto, el soporte sólido proporciona una matriz dentro de la columna a través de la cual la sangre fluye, de manera continua en ciertas realizaciones. Esto permite que las células que expresan el receptor de quimiocina específico sean eliminadas de la sangre que pasa a través de la columna, de manera que se reducen las células que expresan el receptor de la quimiocina específico de la sangre que sale de la

columna. En realizaciones específicas, se carga la columna de aféresis con un soporte que comprende estreptavidina inmovilizada sobre el soporte y uno o más reactivos de unión biotinilados, tales como quimiocinas, unidas a la estreptavidina sobre el soporte. El soporte sólido puede comprender un hidrato de carbono de peso molecular elevado, opcionalmente reticulado, tal como agarosa.

5 Como se mencionó anteriormente, el reactivo de unión se acopla al soporte sólido. Las cantidades relativas del reactivo de unión se pueden controlar para asegurar que el acoplamiento entre el soporte sólido y el reactivo de unión será inmediato, minimizando el riesgo de que se desacople el reactivo de unión del soporte sólido. Por tanto, se puede asegurar que hay un exceso relativo de sitios de inmovilización para el reactivo de unión sobre el soporte sólido. Como alternativa o además, tras la inmovilización del reactivo de unión sobre el soporte sólido, el soporte sólido se puede lavar para extraer cualquier reactivo de unión no unido.

15 La columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como un tratamiento de leucoféresis para las afecciones asociadas al síndrome metabólico. La columna actúa para extraer específicamente los monocitos o leucocitos que expresan CCR2 mediante la explotación de la interacción entre CCR2 expresado sobre la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado sobre un soporte sólido contenido dentro o se lleva por la columna. Habitualmente la columna general comprende, consiste en o consiste esencialmente en tres componentes combinados; 1) una carcasa que contiene o transporta 2) el soporte sólido y 3) uno o más reactivos de unión (inmovilizado sobre el anterior) que se une(n) específicamente a uno o más receptores de la quimiocina. La carcasa se puede fabricar a partir de cualquier material para uso clínico. En ciertos aspectos de la divulgación, la carcasa está compuesta de un material de plástico. La carcasa incluye un sitio de entrada de flujo para la entrada de sangre y un sitio de salida de flujo para salida de sangre (reducida de células diana) de la columna. La carcasa se puede diseñar para mantener un flujo continuo de sangre a través de la matriz de soporte sólido. La carcasa (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 3) puede incluir una parte superior que comprende una placa de distribución (2) en el sitio de entrada del flujo (1) para diseminar la sangre uniformemente sobre el área de la matriz completa. La placa de distribución puede actuar como una primera barrera de seguridad que evita que fluyan las partículas más grandes a través de la columna hacia el 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 filtros de seguridad (3 y 4) colocadas en la entrada (1) y/o sitios de salida (5) de la carcasa de plástico. Tales unidades de filtro pueden actuar para evitar que las partículas mayores que las células sanguíneas pasen por dentro y/o fuera de la columna. Las unidades de filtro de seguridad pueden contener una pluralidad de filtros, tal como dos, tres o cuatro filtros, diseñados para ser una barrera sólida y detener a todas las partículas mayores 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 fugas de partículas hacia el paciente, incluyendo el caso en el que el dispositivo esté conectado incorrectamente dando como resultado un flujo de sangre en la dirección opuesta a la prevista. Los filtros de seguridad pueden estar comprendidos por cualquier tamaño de poro adecuado para evitar que partículas mayores que las células sanguíneas pasen a través de la columna, como se entendería fácilmente por experto en la materia. Los filtros adecuados están disponibles comercialmente. En realizaciones específicas, el tamaño del poro del(los) filtro(s) está entre aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , más específicamente, aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ . El soporte sólido y los componentes del reactivo de unión se describen en detalle adicionalmente en el presente documento.

45 Se puede variar el volumen del alojamiento dependiendo de los volúmenes de sangre que esté previsto que pasen a través de la columna. Normalmente, 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.

50 La columna se aplica habitualmente en forma de circuito de aféresis. En este contexto, el sistema general incluye la columna de aféresis, la conducción y una bomba adecuada para bombear la sangre alrededor del circuito. El sistema se ilustra en la Figura 4. El paciente (1) se conecta al circuito extracorpóreo a través de agujas estériles a las venas de los brazos derecho e izquierdo. Se conecta también una bolsa (3) de suero salino 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 conducción estéril mediante la bomba de sangre (4) y se pasa a través de la columna (6) y vuelve al paciente. El sistema de conducción se puede conectar a la columna a través de cualquier acoplamiento adecuado, tal como acoplamientos de tipo luer-lock de diálisis estándar. Los acoplamientos de la columna pueden tener un código de colores para un montaje correcto. Por ejemplo, conducción de color rojo para la entrada a la parte superior de la columna roja y conducción azul para la salida de vuelta al paciente. Puede estar presente en el circuito un detector (8) de aire. Se pueden emplear adicionalmente sensores de presión de entrada (5) y/o Pven (7) para monitorizar la presión en el circuito.

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

65 En la figura 5 se muestra un diagrama esquemático de una bomba adecuada, que muestra el detector de aire y el filtro

óptico. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, a continuación la bomba se puede detener inmediatamente. Como alternativa o adicionalmente, se puede emitir una alarma visual/audible.

- 5 Las diversas realizaciones de la invención y la divulgación se describirán en más detalle ahora en referencia a las siguientes realizaciones y ejemplos:

**Descripción de las figuras**

- 10 FIG. 1a, 1b y 1c - la unión de MCP-1 biotinilado por linfocitos T CD4+, CD8+ y monocitos CD14+, respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un donante sano.
- 15 FIG. 2a - unión de MCP-1 a monocitos (línea discontinua) en sangre periférica tomada de pacientes de EII (en inglés, IBD). El gráfico representa un sumario de cuatro pruebas.
- FIG. 2b - unión de anticuerpo CCR2 a monocitos (línea) en sangre periférica tomada de pacientes de EII. El gráfico representa un sumario de cuatro pruebas.
- 20 FIG. 3 - El alojamiento de plástico y parte superior mostrando la placa de distribución (2) y las unidades de filtro de seguridad (3 y 4).
- FIG. 4 - El sistema general de leucoféresis.
- 25 FIG. 5 - La bomba con detector de aire y detector óptico (4).
- FIG. 6a - Resultados de pruebas de reducción *in vitro* realizadas sobre la matriz acoplada de bMCP-1 que muestra la capacidad para eliminar células que expresan CCR2 de la sangre de tres donantes sanos.
- 30 FIG. 6b - Resultados de pruebas de reducción *in vitro* realizadas sobre la matriz acoplada de RANTES biotinilado que muestra la capacidad para eliminar células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica extraída de un donante sano.
- 35 FIG. 7 - Secuencia y biotinilación, a través de un grupo espaciador, del derivado de la proteína madura MCP-1 que contiene la modificación de Gln a pyroGlu.
- FIG. 8 - Secuencia y biotinilación, a través de un grupo espaciador, del derivado de la proteína madura MCP-1 que contiene la sustitución de Met a Norleu.
- 40 FIG. 9 - Secuencia y biotinilación, a través de un grupo espaciador, del derivado MCP-1 truncado que contiene la sustitución de Met a Norleu.
- FIG. 10 - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de MCP-1 y MCP-5.
- 45 FIG. 11 - Secuencia y biotinilación, a través de un grupo espaciador, del derivado de MCP-5 truncado (extremo C terminal) que contiene la modificación de Ile a Lys.
- FIG. 12 - Secuencia y biotinilación, del derivado de RANTES.
- 50 FIG. 13 - Ejemplo de criterios de acotamiento para monocitos que expresan CCR2.
- FIG. 14 - Expresión de monocitos que expresan CCR2 en 9 pacientes con diabetes mellitus (DM) y en 20 controles sanos (HC). Se analizó la sangre proveniente de pacientes con DM y de controles sanos en cuanto a la expresión de diversos receptores de quimiocinas mediante citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas CD14.
- 55 FIG. 15 - Unión de la quimiocina bMCP1 (CCL2) a monocitos de 3 pacientes con diabetes mellitus y en 20 controles sanos (HC). Se incubó la sangre de 3 pacientes con DM con bMCP1 y se analizó con citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas CD14.
- 60 FIG. 16 - Reducción de monocitos que expresan CCR2 con matriz de Streptavidin Sepharose conjugada con bMCP1. Se incubaron las células sanguíneas de un paciente con DM con matriz de Streptavidin Sepharose-bMCP1. Las células no unidas se recuperaron mediante el lavado de la matriz con solución salina tamponada con fosfato. Las células (después de la reducción) se analizaron a continuación con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz de bMCP1 (antes de la reducción).
- 65 FIG. 17 - Expresión de linfocitos B que expresan CCR2 en siete pacientes con adiposis dolorosa (AD) y en 20

controles sanos (HC). Se analizó la sangre proveniente de pacientes con AD y de controles sanos respecto a la expresión de diversos receptores de quimiocinas mediante citometría de flujo. Los linfocitos B se caracterizaron como células positivas CD19.

5 FIG. 18 - Unión de la quimiocina bMCP1 (CCL2) a linfocitos B de siete pacientes con adiposidad dolorosa. Se incubó la sangre de un paciente con AD con bMCP1 y se analizó con citometría de flujo. Los linfocitos B se caracterizaron como células positivas CD19.

10 FIG. 19 - Reducción de linfocitos B que expresan CCR2 con matriz de Streptavidin Sepharose conjugada con bMCP1. Se incubaron las células sanguíneas de un paciente con AD con matriz de Streptavidin Sepharose-bMCP1. Las células no unidas se recuperaron mediante el lavado de la matriz con solución salina tamponada con fosfato. Las células (después de la reducción) se analizaron a continuación con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz de bMCP1 (antes de la reducción).

15 FIG. 20 - Frecuencia incrementada de monocitos que expresan CCR1 en 4 pacientes con adiposidad dolorosa en comparación con controles sanos.

20 FIG. 21 - Reducción de monocitos que expresan CCR1 con matriz-SepharoseStreptavidin-bRANTES. Las células de un control sano se incubaron con matriz de Streptavidin Sepharose-quimiocina biotinilada. Las células no unidas se recuperaron mediante el lavado de la matriz. Las células (después de la reducción) se analizaron a continuación con citometría de flujo y se compararon con células que se habían incubado con matriz de quimiocina (antes de la reducción).

25 FIG. 22 - Frecuencia incrementada de linfocitos T que expresan CCR4 en cuatro pacientes con diabetes tipo 2.

FIG. 23 - Frecuencia incrementada de linfocitos T que expresan CCR5 en cuatro pacientes con diabetes tipo 2.

#### Descripción de realizaciones preferidas

30 Se ha demostrado (Jianli Niu and Pappachan E. Kolattakudy. *Clinical Science* (2009) 117, 95-109) que la expresión de CCR2 sobre monocitos es elevada en pacientes diabéticos. Los ratones transgénicos con una expresión de MCP-1 específica de tejido adiposo tienen infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, contenido de triacilglicerol hepático elevado y resistencia a la insulina. Los ratones knockout MCP-1 alimentados con una dieta rica en grasas tienen una acumulación de macrófagos reducida considerablemente en el tejido adiposo y esteatosis hepática en comparación con ratones silvestres con alimentación rica en grasas. La inhibición de la función de MCP-1 mediante la expresión aguda de un mutante negativo dominante de MCP-1 mejoró la resistencia a la insulina en ratones db/db y en ratones silvestres con alimentación rica en grasas. Por otra parte, un nivel incrementado de suero MCP-1 se correlaciona con marcadores del síndrome metabólico, que incluye obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hipertensión y concentraciones incrementadas de triacilglicerol en suero. La proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) es un quimioatrayente muy importante para monocitos y linfocitos T de memoria por medio de su unión a su receptor de superficie celular específico, el receptor-2 de quimiocina CC (CCR2). Sobre esta base, los inventores han seleccionado células que expresan CCR2 como una diana para el tratamiento de afecciones asociadas al síndrome metabólico.

45 En el presente documento se muestra que se puede utilizar MCP-1 para reducir los niveles de monocitos que expresan CCR2 en sujetos diabéticos.

#### Materiales y métodos

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

55 *Quimiocinas.* Los leucocitos se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 4 °C con MCP-1 marcado con biotinilado y Alexa647 Fluor® (en concentraciones de 10 ng/μl y 50 ng/μl). A continuación, las células se lavaron con tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo. Almac Sciences Scotland Ltd, Edimburgo, Escocia, proporcionaron todas las quimiocinas utilizadas en los Ejemplos.

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

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

**Ejemplo 2** - Los monocitos se investigaron en cuanto a su expresión de CCR2 (Fig. 2b) y su capacidad para unirse a MCP-1 (Fig. 2a). Se observó expresión de CCR2 en todos los monocitos con la mayoría de los monocitos expresando niveles elevados, utilizando un anticuerpo anti-CCR2 (Fig. 2b). La unión de MCP-1 a monocitos mostrada en la Fig. 2a se corresponde con la población que expresa CCR2<sup>hi</sup> mostrada en la Fig. 2b. Por tanto, MCP-1 se une favorablemente a células que expresan CCR2<sup>hi</sup>.

### **Ejemplo 3 - Leucoféresis a medida**

## 10 DISEÑO Y PROPIEDADES DE LA COLUMNA

### Introducción

15 La aféresis es un tratamiento establecido utilizado para la reducción de componentes sanguíneos, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. La leucoféresis es el tratamiento de aféresis utilizado para quitar los glóbulos blancos, leucocitos. Se conecta al paciente a un sistema de circulación sanguínea extracorpórea; la sangre se extrae de una vena de un brazo, se pasa a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. Los efectos secundarios de la leucoféresis son variables, desde casos leves como cefalea, mareo, hipotensión, palpitaciones y rubefacción en el 0,1 al 5 % de los pacientes tratados.

### 20 La columna

La columna está prevista para utilizarse como un tratamiento de leucoféresis para una afección asociada al síndrome metabólico. Extraerá específicamente CCR2 y leucocitos que expresan CCR1, CCR3, CCR4 o CCR5 como ejemplos de referencia/comparación, en particular monocitos, a través del uso de un reactivo de unión, más específicamente un MCP-1 y una resina que contiene MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y/o RANTES como ejemplos de referencia/comparación, explotando la interacción quimiocina-CCR2, CCR1, CCR3, CCR4 o CCR5. La columna consiste en tres componentes combinados, la carcasa de plástico, la matriz de Sepharose™ BigBeads de estreptavidina (SA) y uno o más de MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y RANTES biotinilados unidos a la matriz. El tratamiento se realiza utilizando las mismas técnicas de un procedimiento de aféresis estándar.

### La carcasa de plástico (Fig. 3)

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

### 45 Streptavidin Sepharose™ BigBeads

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

### Reactivo de unión

55 El tercer componente del dispositivo está acoplado a la matriz, uno o más reactivos de unión que se unen específicamente a CCR2, CCR1, CCR3, CCR4 o CCR5. Se pueden emplear una o más hemocinas seleccionadas del grupo que consiste en: MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, RANTES, CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC). Estos péptidos pueden ser sintéticos, versiones modificadas por ingeniería genética de la quimiocina humana, que están truncados o biotinilados, pero que retienen la actividad de unión al receptor de CCR2, CCR1, CCR3, CCR4 o CCR5. Al biotinar la quimiocina modificada por ingeniería genética, se puede unir a las moléculas de estreptavidina en la matriz de Sepharose™. Se sabe que la unión biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas más fuertes, con un valor de K<sub>d</sub> del orden de 4 x 10<sup>-14</sup> M. La proporción calculada de los sitios de unión estreptavidina:biotina en la columna es 10:1. Por tanto, el acoplamiento entre la matriz y la quimiocina será inmediato, minimizando el riesgo de que la quimiocina se desacople de la matriz.

### 65 El sistema de aféresis

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

5 El circuito

El sistema se ilustra en la Figura 4. El paciente (1) se conecta al circuito extracorpóreo a través de agujas estériles Venflon a las venas de los brazos derecho e izquierdo. Se conecta también una bolsa (3) de suero salino 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 conducción estéril mediante la bomba de sangre (4) y se pasa a través de la columna (6) y vuelve al paciente. El sistema de conducción se puede conectar a la columna a través de acoplamientos luer-lock de diálisis. Los acoplamientos sobre la columna pueden tener un código de colores para un montaje correcto; conducción de color rojo para la entrada a la parte superior de la columna roja y conducción azul para la salida de vuelta al paciente. Está presente un detector de aire (8). Se emplean sensores de presión de entrada (5) y Pven (7) para monitorizar la presión en el circuito.

La bomba 4008 ADS

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

En la figura 5 se muestra un diagrama esquemático de la bomba, que muestra el detector de aire y el filtro óptico. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, a continuación la bomba se detiene inmediatamente y se emite una alarma visual/audible.

30 Leyenda para la Fig. 5:

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

40 Preparación del paciente

Al paciente se le administrarán anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Se utilizará una solución salina estéril con Heparina 5000 IE para cebar el sistema extracorpóreo, Después de eso, se añadirá una inyección en bolo de Heparina 4000 IE en el circuito al inicio de cada sesión de tratamiento.

45 Tiempo y caudal de leucoféresis

El sistema de aféresis debe operarse a un caudal de 30-60 ml/min. El tratamiento finaliza cuando han circulado 1800 ml de sangre.

50 Condiciones de almacenamiento

Los dispositivos de columna deben almacenarse entre 1 y 25 °C, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Los datos de estabilidad de > 3 meses indican que no hay diferencias en la funcionalidad a lo largo del tiempo o por temperatura (temperatura ambiente y refrigeradas). Las columnas se mantendrán en condiciones de refrigeración hasta que se utilicen. Deben evitarse daños mecánicos, como los que resultan de vibraciones bruscas y golpes. No deberán utilizarse columnas almacenadas en condiciones diferentes a estas recomendaciones.

60 Condiciones de transporte

Los dispositivos de columna se transportarán en condiciones refrigeradas, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Deben evitarse daños mecánicos tales como los que resultan de vibraciones bruscas y golpes.

65 Reducción *in vitro* de poblaciones de células diana

Para investigar la capacidad de eliminar las células que expresan CCR2, se han realizado ensayos *in vitro* sobre la

matriz acoplada de bMCP-1. Se recogió sangre de donantes de sangre y pasó a través del dispositivo de columna que contenía la matriz acoplada de bMCP-1. Se tomaron muestras de sangre antes y después del paso por la columna y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) para la reducción de células que expresan CCR2.

5 Los resultados demuestran una reducción importante de la población diana de monocitos que expresan CCR2 tras la perfusión de la matriz. Los ensayos de reducción se realizaron sobre sangre procedente de tres donantes sanos. Los resultados se muestran en la Figura 6a.

10 Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de hasta un 80 % de las células que expresan CCR2 por la columna. De forma notable, los individuos con menos células que expresan CCR2 inicialmente alcanzaron una reducción menor. Los niveles restantes de monocitos fueron aproximadamente un 20-30 % en cada caso, independientemente del punto de partida. Las células que no expresan CCR2 no se vieron afectadas (datos no mostrados).

15 Para investigar la capacidad de eliminar células que expresan CCR1 (como ejemplo de referencia/comparación), 3 y 5, se han realizado ensayos *in vitro* sobre la matriz acoplada RANTES biotinilada (como ejemplo de referencia/comparación). Se recogió sangre de donantes de sangre y pasó a través del dispositivo de columna que contenía la matriz acoplada de RANTES. Se tomaron muestras de sangre antes y después del paso por la columna y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) para la reducción de células que expresan CCR1, 3 o 5.

20 La molécula de RANTES fue sintetizada por Almac. La secuencia de aminoácidos de RANTES biotinilado se expone como la SEQ ID NO: 8:

H2N-  
 SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYI  
 NSLEKS  
 -CO2H

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

30 La cadena lateral de lisina 67 se biotiniló directamente para dar la estructura primaria de la proteína mostrada en la figura 12. La proteína se plegó y se formaron enlaces disulfuro entre la primera y tercera cisteína en la secuencia y entre las cisteínas 2ª y 4ª.

35 Los resultados demuestran una reducción importante de la población diana de células que expresan receptores de quimiocinas tras la perfusión de la matriz. Los ensayos de reducción se realizaron sobre sangre de un donante sano. Los resultados se muestran en la Figura 6b. Los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de alrededor de un 20 % de las células que expresan receptores de quimiocinas por la columna. Las células que no expresan CCR1, 3 y 5 no se vieron afectadas (datos no mostrados).

**Ejemplo 4 - DERIVADOS DE MCP1**

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

MKVSAALLCL LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP  
 KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT

45 La secuencia de aminoácidos de la proteína madura expone como la SEQ ID NO: 2,

QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ  
 KWVQDSXDHL DKQTQTPKT

50 X = Met o Norleucina

Los inventores han determinado que las quimiocinas pueden exhibir propiedades de unión mejoradas cuando la quimiocina se biotinila a través de un grupo espaciador. El espaciador puede evitar que el grupo biotina impacte sobre la afinidad de unión de la quimiocina.

55 Por tanto, se sintetizará MCP-1 derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral ε-amino de Lys75 con PEG-Biotina (sal de TFA). El espaciador de PEG será el ácido 3,6, -dioxoaminoctanoico. La Gln del extremo N terminal de las

proteínas se somete a formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Por tanto, la primera glutamina (Gln1) de la secuencia se sustituirá con piroglutamina. La molécula se sintetizará como una amida del extremo C terminal (a través de la síntesis de un enlazador de amida). La molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

- 5 Se sintetizará un análogo de biotinaMCP-1 Met a Nleu. La única metionina dentro de la secuencia se alterará a Norleucina, para mitigar la oxidación de este resto durante el ensamblaje de la cadena y mejorar la estabilidad del producto final. La molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 8, véase también la SEQ ID NO: 2.

- 10 Una vez sintetizada, se determinará la actividad de los diversos derivados de biotinaMCP-1 en ensayos basados en células. En particular, las propiedades agonistas y antagonistas se determinarán en un ensayo celular funcional de aequorina del receptor CCR2 humano. Las moléculas relevantes se han sintetizado, véase el Ejemplo 7, más adelante.

**Ejemplo 5 - SÍNTESIS DE UNA BIOTINAMCP-1 ANTAGONISTA DE CCR2 QUE SE UNE AL RECEPTOR SIN ACTIVACIÓN**

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

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

VTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL  
DKQTQTPKT

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

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

- 35 **Ejemplo 6 - DEMOSTRAR LA EXTRACCIÓN DE CÉLULAS QUE EXPRESAN CCR2 UTILIZANDO UN LIGANDO DE QUIMIOCINA ALTERNATIVO DEL MCP-1 (Experimento de comparación/referencia)**

- 40 CCR2 también se une a las quimiocinas MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5 y HCC-4, además de a MCP-1. MCP-5 solo se une a CCR2 y debe ser selectivo en su extracción de células que expresan CCR2. MCP5 es una quimiocina de ratón de demostrado quimiotactismo para células CCR2 humanas con EC50 < 3 nM.

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

MKISTLLCLL LIATTISPQV LAGPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRITSSQCPR  
EAVIFRTILD KEICADPKEK WVKNSINHLD KTSQTFIL EP SCLG

- 45 La secuencia de aminoácidos de la quimiocina MCP-5 procesada en el extremo N terminal es de 82 aminoácidos de longitud y se expone como la SEQ ID NO: 5

GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK  
WVKNSINHLD KTSQTFIL EP SCLG

- 50 Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos sugiere que MCP-5 tiene una extensión en el extremo C terminal cuando se compara con la secuencia de MCP-1. Los resultados de este alineamiento se muestran en la figura 10. Basándose en esto, se sintetizará una versión de MCP-5 truncada del extremo C terminal. Esta versión truncada comprenderá los restos 1-76 de MCP-5, expuesta como la SEQ ID NO: 6:

GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRITSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK  
WVKNSINHLD KTSQTFIL

55

- En la versión truncada, Ile75 se sustituye con Lys, expuesta como la SEQ ID NO: 7:

GPDAVSTP VTCCYNVVKQ KIHVRKLKSY RRTSSQCPR EAVIFRTILD KEICADPKEK  
WVKNSINHLD KTSQTFKL

5 Tras la sustitución, la versión sustituida se biotinará en la posición 75, una lisina u otro resto adecuado tal como ornitina o ácido diaminopropanoico a través de un espaciador de PEG (ácido 3,6 - dioxoaminooctanoico). La proteína se sintetizará sobre un enlazador de amida para producir un derivado de amida en el extremo C terminal. La molécula se muestra esquemáticamente en la Figura 11.

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

### Ejemplos 7 a 9

## 15 SÍNTESIS DE QUIMIOCINAS ADICIONALES

### Protocolos generales

Ensamblaje:

20 La síntesis química de las quimiocinas se realizó utilizando síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc estándar (SPPS) en un sintetizador de péptidos ABI 433. Se utilizaron DIC (0,5 M en DMF) y OxymaPure (0,5 M en DMF) para la activación, anhídrido acético (0,5 M en DMF) para taponar (del inglés, capping) y piperidina al 20 % en DMF para la desprotección de Fmoc. Se utilizó resina Rink Amida para la generación de quimiocinas de amida en el extremo C terminal y una resina Wang para las quimiocinas de ácido en el extremo C terminal. Tras el ensamblaje, se lavó la resina se lavó DMF y DCM y a continuación se secó *in vacuo*.

Eliminación de la protección Dde:

30 El grupo de protección Dde se extrajo mediante el tratamiento de la resina con una solución de hidracina al 2,5 % en DMF (200 ml) durante un periodo de 2 horas. A continuación, la resina se lavó con DMF.

Etapas de marcaje:

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

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

#### 40 2. Taponado (del inglés, capping)

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

#### 45 3. Desprotección de Fmoc

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

#### 50 4. Par Biotina-OSu

Se añadió una solución de Biotina-OSu (341 mg, 1 mmol) y DIPEA (348 µl) en DMF (10 ml) a la resina y la mezcla se soncó durante 3 horas. Se lavó bien la resina con DMF y DCM y a continuación se secó *in vacuo*.

#### 55 Escisión:

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

Protocolo de purificación:

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

5 Protocolo de plegamiento:

El péptido puro (10 mg) se disolvió en GnHCl 6M (16 ml) y a continuación se diluyó rápidamente hasta una concentración de GnHCl 2M por 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 a continuación se analizó mediante RP-HPLC (columna Jupiter C18, 250 x 4,6 mm, B al 10-60 % durante 30 minutos. La purificación mediante RP-HPLC utilizando un gradiente optimizado proporcionó el producto deseado.

**Ejemplo 7 - biotinaMCP-1 (CCL2)**

15 Molécula diana: MCP-1 derivatizado en la funcionalidad de la cadena lateral  $\epsilon$ -amino de Lys(75) con PEG-Biotina (sal de TFA)

Modificaciones: El MCP-1 humano que corresponde a los restos 1-76, se expresó inicialmente como los 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimiocina y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escindió. La Gln en el extremo N terminal de la proteína se somete a la formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Por tanto, se sustituye Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar que se formen especies mixtas de Gln y pyroGlu del extremo N terminal. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas homogénea a través de la fabricación y el uso de la columna. La lisina de origen natural en la posición 75 se modificó a través de biotilación sobre la resina. Se incorporó un espaciador entre la funcionalidad  $\epsilon$ -amino y la biotina.

25 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 9), antes de la unión del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 75 (K):

H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC  
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT-NH<sub>2</sub>

30 X = pyroGlu o Gln

La secuencia MCP-1 modificada por ingeniería genética se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), utilizando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se ha descrito en la sección de protocolos generales:

40 SEQ ID NO: 10  
H-  
XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQT  
PXT-RESINA

X1 = pyroGlu o Gln  
X75 = K(ivDde)

45 Se incorpora FmocLys(ivDde)-OH como resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína. La retirada posterior del grupo protector ivDde, seguido por el acoplamiento del espaciador de PEG y la biotina, se llevó a cabo como se ha descrito en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimiocina activa.

SEQ ID NO: 11  
H-XPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEIC  
ADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPXT-NH<sub>2</sub>

50 X1 = pyroGlu o Gln  
X75 es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG, opcionalmente K(PEG-Biotina)

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

Datos de ensayos funcionales:

La biotinaMCP-1 se sometió a prueba respecto a la actividad agonista en un ensayo de Aequorina contra hCCR2b, (Euroscreen) y se registró un valor de EC50 de 9,6 nM, c.f. La EC50 para MCP-1 recombinante natural es 3,1 nM.

#### Ejemplo 8 - biotinaRANTES (CCL5), ejemplo de referencia/comparación

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

Modificaciones: El RANTES que corresponde a los restos 1-68, se expresó inicialmente como los 91 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimiocina y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escindió. La única metionina (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 del derivado de la secuencia natural. Esta sustitución de Met a Lys proporcionó una lisina en la posición 67 que se modificó a través de la biotilación sobre la resina.

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 12), antes de la unión de la molécula de biotina en el aminoácido 67 (K):

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEKS-OH

La secuencia RANTES modificada por ingeniería genética se ensambló sobre un soporte sólido (resina Wang), utilizando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se ha descrito en la sección de protocolos generales:

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEXS-RESIN

X es K(ivDde)

Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como resto 67 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 13). La retirada posterior del grupo protector ivDde, seguida por el acoplamiento de la biotina, se llevó a cabo como se ha descrito en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 14).

H-SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEXS-OH

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

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

Datos de ensayos funcionales:

biotinaRANTES se sometió a prueba respecto a la actividad agonista en un ensayo de Aequorina contra hCCR5, (Euroscreen) y se registró un valor de EC50 de 0,5 nM.

#### Ejemplo 9 - biotinaMCP-2 (CCL8), ejemplo de referencia/comparación

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

Modificaciones: La MCP-2 humana que corresponde a los restos 1-76, se expresó inicialmente como los 99 aminoácidos que comprenden el pliegue de la quimiocina y un péptido señal de 23 aminoácidos que se escindió. La Gln en el extremo N terminal de la proteína se somete a la formación de pyroGlu en condiciones fisiológicas. Por tanto, se sustituye Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar que se formen especies mixtas de Gln y pyroGlu del extremo N terminal. Esto mejora el rendimiento de la síntesis y asegura una preparación de quimiocinas

homogénea a través de la fabricación y el uso de la columna. La lisina de origen natural en la posición 75 se modificó a través de biotilación sobre la resina. Se incorporó un espaciador entre la funcionalidad ε-amino y la biotina.

5 Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 15), antes de la unión del espaciador de PEG y las moléculas de biotina en el aminoácido 75 (K):

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

10 X = pyroGlu o Gln

La secuencia MCP-2 modificada por ingeniería genética se ensambló sobre un soporte sólido (resina Rink Amide), utilizando protocolos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida como se ha descrito en la sección de protocolos generales:

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

X1 = pyroGlu o Gln X75 = K(ivDde)

20 Se incorporó FmocLys(ivDde)-OH como resto 75 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 16). La retirada posterior del grupo protector ivDde, seguido por el acoplamiento del espaciador de PEG y la biotina, se llevó a cabo como se ha descrito en la sección de protocolos generales. Los protocolos de escisión, purificación y plegamiento se llevaron a cabo como se ha descrito para proporcionar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 17):

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

X1 = pyroGlu o Gln

30 X75 = un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal 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).

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.

35 Datos de ensayos funcionales:

La biotinaMCP-2 se sometió a prueba respecto a la actividad agonista en un ensayo de Aequorina contra hCCR2b, (Euroscreen) y demostró ser un agonista parcial con un valor de EC50 de 50,9 nM. c.f. La EC50 para MCP-2 recombinante natural es 23,5 nM (agonista parcial).

40

### Ejemplo 10 - Diagnóstico y tratamiento de diabetes mellitus (DM)

#### Materiales y métodos

45 1. Análisis de citometría de flujo de sangre periférica

50 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando Fix Buffer (tampón fosfato salino (PBS) citrato con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisado (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 (RT; del inglés, room temperature) 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 con el software FACSDiva (BD Biosciences).

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD14	FITC	Beckman Coulter
CCR5	PE	Biolegend

55

(continuación)

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR3	PE	Biolegend
Streptavidin	PE, APC	Biolegend
CCR2	PerCP Cy5.5	Biolegend
CD3	V450	BD Biosciences
CD19	V500	BD Biosciences
CD16	PE Cy7	BD Biosciences
CCR4	PerCP Cy5.5	BD Biosciences

## 2. Prueba de unión de quimiocinas

5 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando Fix Buffer (tampón fosfato salino (PBS) citrato con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisado (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 (RT) y se tiñeron con anticuerpos junto con quimiocina biotinilada (1 µM) o el correspondiente anticuerpo receptor de quimiocina a 4 °C durante 30min (Tabla 2). La quimiocina biotinilada se detectó a través de la interacción  
10 entre la biotina y un Streptavidin conjugado con fluoróforo. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS con el software FACSDiva (BD Biosciences).

## 3. Reducción de células mediante matriz conjugada con quimiocina biotinilada

15 Se prepararon células de sangre periférica (sección 1). 1 ml de la matriz Sepharose BigBeads conjugada con Streptavidin (GE Healthcare) 0,4 mg/ml se lavó en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió la quimiocina biotinilada (1 µM) al tubo y se incubó durante 20 min a RT para permitir la inmovilización de la quimiocina sobre la matriz a través de la interacción biotina-estreptavidina. A continuación, se añadieron las células a la matriz de quimiocina y se incubaron durante 20 min a RT. Las células que no se unieron a  
20 la matriz se extrajeron mediante el lavado de la matriz con PBS en un filtro de nailon estéril de 40µm (BD Falcon™ Cell Strainer). El flujo a través de las células se tiñó con anticuerpos (Tabla 2), se analizó mediante citometría de flujo y se comparó con células de sangre periférica que no se habían incubado con la matriz de quimiocinas.

## Resultados y discusión

25 Diabetes mellitus (DM)

### 1. Análisis de citometría de flujo de sangre periférica

30 Se analizaron glóbulos blancos de pacientes de DM con citometría de flujo. Se demuestra que aproximadamente el 80 % de los monocitos expresan el receptor de quimiocinas CCR2 (Fig. 14) basándose en los datos de citometría de flujo y de unión mediante un anticuerpo anti-CCR2. CCR2 y su ligando MCP1 (CCL2) son importantes para la migración de monocitos y la infiltración en el tejido inflamado. CCR2 se expresa sobre la mayoría de los monocitos tanto en  
35 pacientes de diabetes como en controles sanos. La expresión del receptor CCR2 sobre monocitos no se incrementa en pacientes de diabetes; sin embargo, los monocitos en diabetes son potencialmente diferentes en su perfil proinflamatorio con respecto a otros mediadores. Asimismo, el ligando MCP-1 se secreta por tejido inflamado y dañado, tal como el páncreas en diabetes y atraerá monocitos que expresan CCR2. En individuos sanos, la señal está ausente y los monocitos no migrarán al tejido a pesar de que expresan CCR2. Por tanto, la migración de monocitos proinflamatorios que expresan CCR2 es más bien regulada por el nivel del ligando MCP-1 que por el nivel de expresión  
40 de CCR2.

La Figura 22 muestra una frecuencia incrementada de linfocitos T que expresan CCR4 en cuatro pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con controles sanos. La Figura 23 muestra una frecuencia incrementada de linfocitos T que expresan CCR5 en cuatro pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con controles sanos. Estas células se  
45 pueden reducir utilizando quimiocinas adecuadas tales como CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC), que solo se unen a CCR4 y CCL5 (RANTES) que se une a CCR5.

## 2. Prueba de unión de quimiocinas

50 De acuerdo con la expresión de CCR2, todos los monocitos se unen a MCP1 biotinilado (bMCP1) (Fig. 15).

## 3. Reducción de células mediante matriz conjugada con quimiocina biotinilada

55 El 21 % de los monocitos que expresan CCR2 se redujeron eficazmente con la matriz de Streptavidin Sepharose conjugada con bMCP1. Antes de la reducción había un 80 % de monocitos que expresan CCR2 y después de la

reducción un 63 % (Fig. 16).

Los presentes inventores concluyen que los monocitos en DM expresan CCR2 y se unen al ligando bMCP1. Asimismo, El 20 % de los monocitos que expresan CCR2 se puede extraer con la matriz de Streptavidin Sepharose conjugada con bMCP1.

### Ejemplo 11 - Diagnóstico y tratamiento de adiposidad dolorosa, ejemplo de referencia/comparación

#### Materiales y métodos

##### 1. Análisis de citometría de flujo de sangre periférica

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando Fix Buffer (tampón fosfato salino (PBS) citrato con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisado (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 (RT) 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 con el software FACSDiva (BD Biosciences).

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD14	FITC	Beckman Coulter
Streptavidin	PE, APC	Biolegend
CCR2	PerCP Cy5.5	Biolegend
CD16	PE Cy7	BD Biosciences
HLADR	APC Cy7	Biolegend
CD3	V450	BD Biosciences
CD19	V500	BD Biosciences

##### 2. Prueba de unión de quimiocinas

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando Fix Buffer (tampón fosfato salino (PBS) citrato con paraformaldehído al 4 %) durante cuatro minutos a 37 °C y tampón de lisado (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 (RT) y se tiñeron con anticuerpos junto con quimiocina biotinilada (1 μM) o el correspondiente anticuerpo receptor de quimiocina a 4 °C durante 30min (Tabla 3). La quimiocina biotinilada se detectó a través de la interacción entre la biotina y un Streptavidin conjugado con fluoróforo. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS con el software FACSDiva (BD Biosciences).

##### 3. Reducción de células mediante matriz conjugada con quimiocina biotinilada

Se prepararon células de sangre periférica (sección 1). 1 ml de la matriz Sepharose BigBeads conjugada con Streptavidin (GE Healthcare) 0,4 mg/ml se lavó en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió la quimiocina biotinilada (1 μM) al tubo y se incubó durante 20 min a RT para permitir la inmovilización de la quimiocina sobre la matriz a través de la interacción biotina-estreptavidina. A continuación, se añadieron las células a la matriz de quimiocina y se incubaron durante 20 min a RT. Las células que no se unieron a la matriz se extrajeron mediante el lavado de la matriz con PBS en un filtro de nailon estéril de 40um (BD Falcon™ Cell Strainer). El flujo a través de las células se tiñó con anticuerpos (Tabla 3), se analizó mediante citometría de flujo y se comparó con células de sangre periférica que no se habían incubado con la matriz de quimiocinas.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 1. Análisis de citometría de flujo de sangre periférica

Se analizaron glóbulos blancos de pacientes de AD con citometría de flujo. Los pacientes exhibieron un incremento del doble del número de linfocitos B que expresan CCR2 en circulación (promedio de 1,8 % en comparación con aproximadamente el 0,7 % en sangre sana) (Fig. 17).

La Figura 20 muestra una frecuencia incrementada de monocitos que expresan CCR1 en 4 pacientes con adiposidad dolorosa en comparación con controles sanos.

##### 2. Prueba de unión de quimiocinas

CCR2 se une a la quimiocina MCP1 (CCL2) y es importante para el reclutamiento de células para los sitios de

inflamación. El 65 % de los linfocitos B se une a la MCP1 biotinilado (bMCP1) (Fig. 18).

3. Reducción de células mediante matriz conjugada con quimiocina biotinilada

5 El 67 % de los linfocitos B que expresan CCR2 se redujeron eficazmente con la matriz de Streptavidin Sepharose conjugada con bMCP1. Antes de la reducción había un 3 % de linfocitos B que expresan CCR2 y después de la reducción un 1 % (Fig. 19).

10 Los presentes inventores concluyen que los linfocitos B en AD expresan CCR2 y se unen al ligando bMCP1. Asimismo, El 67 % de los linfocitos B que expresan CCR2 se puede extraer con la matriz de Streptavidin Sepharose conjugada con bMCP1.

15 La Figura 21 muestra la reducción de monocitos que expresan CCR1 con matriz-SepharoseStreptavidin-bRANTES. Las células de un control sano se incubaron con matriz de Streptavidin Sepharose-quimiocina biotinilada. Las células no unidas se recuperaron mediante el lavado de la matriz. Las células (después de la reducción) se analizaron a continuación con citometría de flujo y se compararon con células que se habían incubado con matriz de quimiocina (antes de la reducción). Por tanto, los monocitos que expresan CCR1 están regulados al alza en AD. Se pueden reducir estas células eficazmente utilizando una quimiocina, en este caso CCL5 biotinilado (RANTES).

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ITH Immune Therapy Holdings AB

25 <120> TRATAMIENTO DE AFECCIONES ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO

<130> P117417WO00

<160> 17

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40 <400> 1

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Thr

<210> 2

ES 2 801 901 T3

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

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221>X  
 10 <222> (64)..(64)  
 <223> X = metionina o norleucina

<400> 2

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

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

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

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

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

<210> 3  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

25 <400> 3

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

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

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

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

Thr Pro Lys Thr  
 65

<210> 4

ES 2 801 901 T3

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

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 4

10 Met Lys Ile Ser Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Thr Thr Ile  
 1 5 10 15  
 Ser Pro Gln Val Leu Ala Gly Pro Asp Ala Val Ser Thr Pro Val Thr  
 20 25 30  
 Cys Cys Tyr Asn Val Val Lys Gln Lys Ile His Val Arg Lys Leu Lys  
 35 40 45  
 Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Gln Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile  
 50 55 60  
 Phe Arg Thr Ile Leu Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Trp Val Lys Asn Ser Ile Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe  
 85 90 95  
 Ile Leu Glu Pro Ser Cys Leu Gly  
 100

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

20 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 5

Gly Pro Asp Ala Val Ser Thr Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Val Val  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Lys Ile His Val Arg Lys Leu Lys Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
 20 25 30  
 Ser Ser Gln Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Arg Thr Ile Leu Asp  
 35 40 45  
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys Trp Val Lys Asn Ser Ile  
 50 55 60  
 Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe Ile Leu Glu Pro Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Leu Gly

25 <210> 6

ES 2 801 901 T3

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

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 6

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

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

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

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

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

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

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

20 <400> 7

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

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

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

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

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

25 <210> 8  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 8

ES 2 801 901 T3

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

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

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

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

Leu Glu Lys Ser  
65

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

10 <220>  
<223> Péptido sintético

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

<400> 9

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

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

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

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

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

20 <210> 10  
<211> 76  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido sintético

30 <220>  
<221> X

ES 2 801 901 T3

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

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

10  
 <400> 10

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

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

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

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

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

15  
 <210> 11  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

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

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

<400> 11

ES 2 801 901 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 12  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 12

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 Glu  
 35 40 45

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

Leu Glu Lys Ser  
 65

15 <210> 13  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético

25 <220>  
 <221> X  
 <222> (67)..(67)  
 <223> X is K(ivDde)

<400> 13

ES 2 801 901 T3

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

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

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

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

Leu Glu Xaa Ser  
65

<210> 14

<211> 68

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (67)..(67)

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

<400> 14

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

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

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

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

Leu Glu Xaa Ser  
65

<210> 15

<211> 76

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

ES 2 801 901 T3

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

5  
 <400> 15

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

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

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

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

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

10 <210> 16  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

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

<220>  
 <221> X  
 25 <222> (75)..(75)  
 <223> X = K(ivDde)

<400> 16

ES 2 801 901 T3

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 76

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (1)..(1)

15 <223> X = pyroGlu o Gln

<220>

<221> X

<222> (75)..(75)

20 <223> X es un resto de aminoácido que puede estar biotinilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente a través de una molécula espaciadora tal como PEG

<400> 17

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

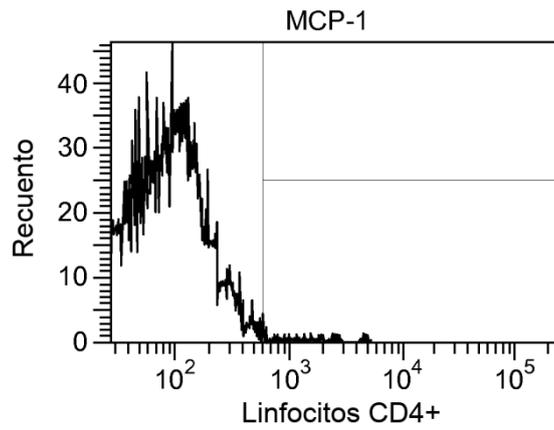
Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met  
50 55 60

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

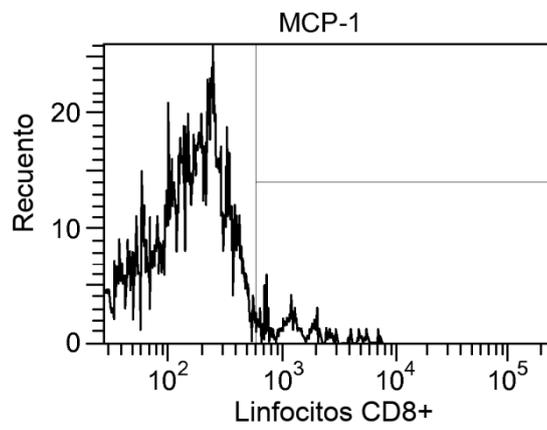
25

## REIVINDICACIONES

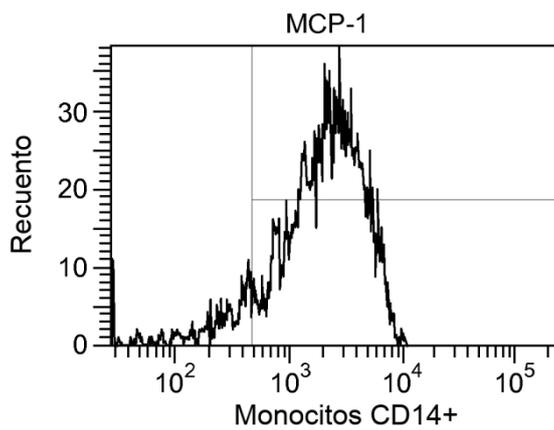
1. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente al receptor de quimiocinas CCR2 para utilizarlo en el tratamiento de una afección de diabetes, en donde el reactivo de unión está inmovilizado sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente extrayendo por tanto las células que expresan CCR2 de la sangre periférica del paciente y en donde el reactivo de unión es MCP-1.
2. El reactivo de unión para utilizar según la reivindicación 1, en donde:
- (i) las células son monocitos que expresan CCR2 y cuando se trata diabetes; y/o
  - (ii) se ha seleccionado al paciente para el tratamiento sobre la base de la detección de un incremento en el nivel de células que expresan CCR2, niveles de expresión de CCR2 y/o niveles de células con expresión elevada de CCR2 en una muestra obtenida del paciente; y/o
  - (iii) se aplica a la columna un 20-50 % de la sangre del paciente en un tratamiento único.
3. Una quimiocina MCP-1 modificada para utilizar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, en las que se ha hecho una o más de las siguientes modificaciones:
- a) el resto de glutamina en la posición 1 de la SEQ ID NO: 2 se ha reemplazado con piroglutamina
  - b) el extremo C terminal se produce como un derivado de amida
  - c) el resto de lisina en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1 o en la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 o en la posición 67 de la SEQ ID NO: 3, que se puede reemplazar con un aminoácido alternativo adecuado tal como el ácido diaminopropiónico o la ornitina, es biotinilado, opcionalmente a través de un grupo espaciador, para permitir la inmovilización de la quimiocina sobre un soporte sólido
  - d) el resto de metionina en la posición 87 de la SEQ ID NO: 1 o en la posición 64 de la SEQ ID NO: 2 o en la posición 56 de la SEQ ID NO: 3 se ha reemplazado con norleucina.
4. La quimiocina MCP-1 modificada para utilizar según la reivindicación 3 en donde:
- (i) el resto de lisina en la posición 98 de la SEQ ID NO: 1 o en la posición 75 de la SEQ ID NO: 2 o en la posición 67 de la SEQ ID NO: 3 es biotinilado a través de un grupo espaciador de polietilenglicol (PEG), para permitir la inmovilización de la quimiocina sobre un soporte sólido, opcionalmente en donde el espaciador de PEG es un ácido 3,6 - dioxoaminooctanoico; y/o
  - (ii) la quimiocina MCP-1 modificada tiene la estructura mostrada en una cualquiera de las figuras 7 a 9; y/o
  - (iii) la quimiocina MCP-1 modificada es una agonista o una antagonista de la actividad de CCR2.
5. Una quimiocina MCP-1 modificada para utilizar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.



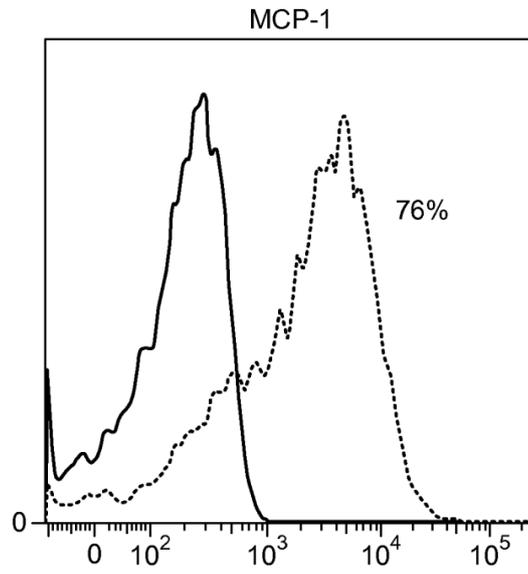
*FIG. 1a*



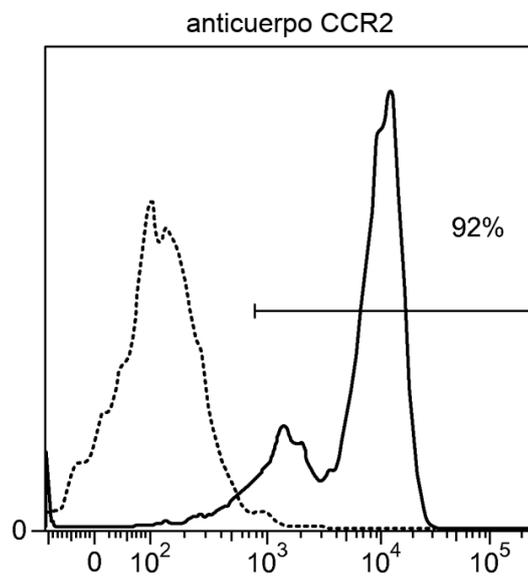
*FIG. 1b*



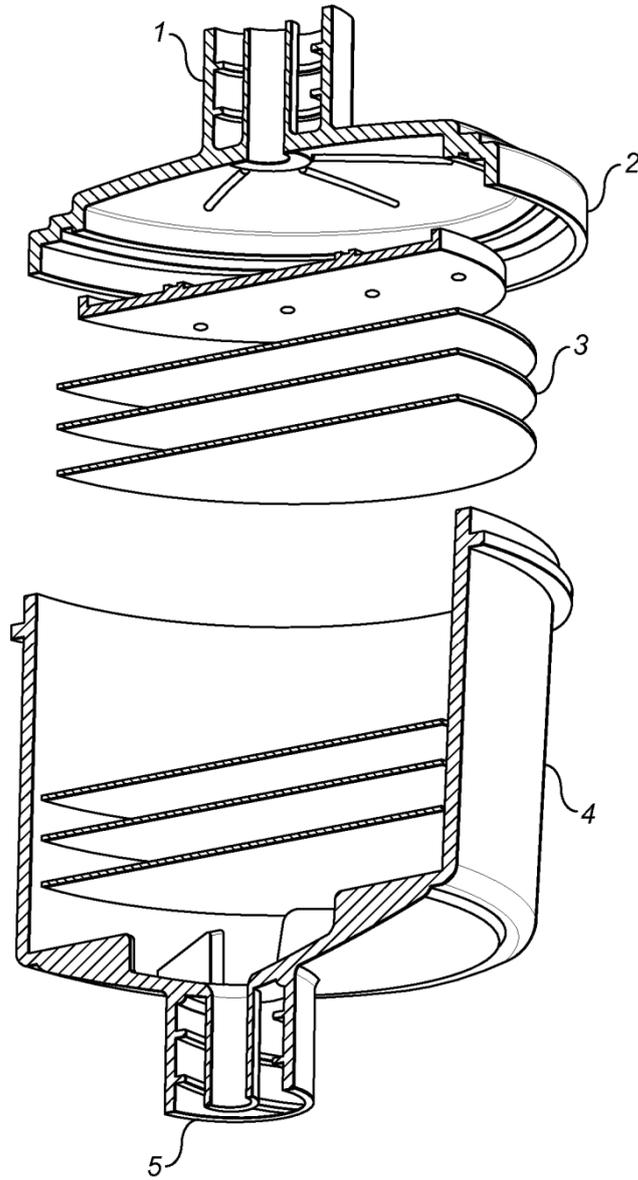
*FIG. 1c*



*FIG. 2a*



*FIG. 2b*



**FIG. 3**

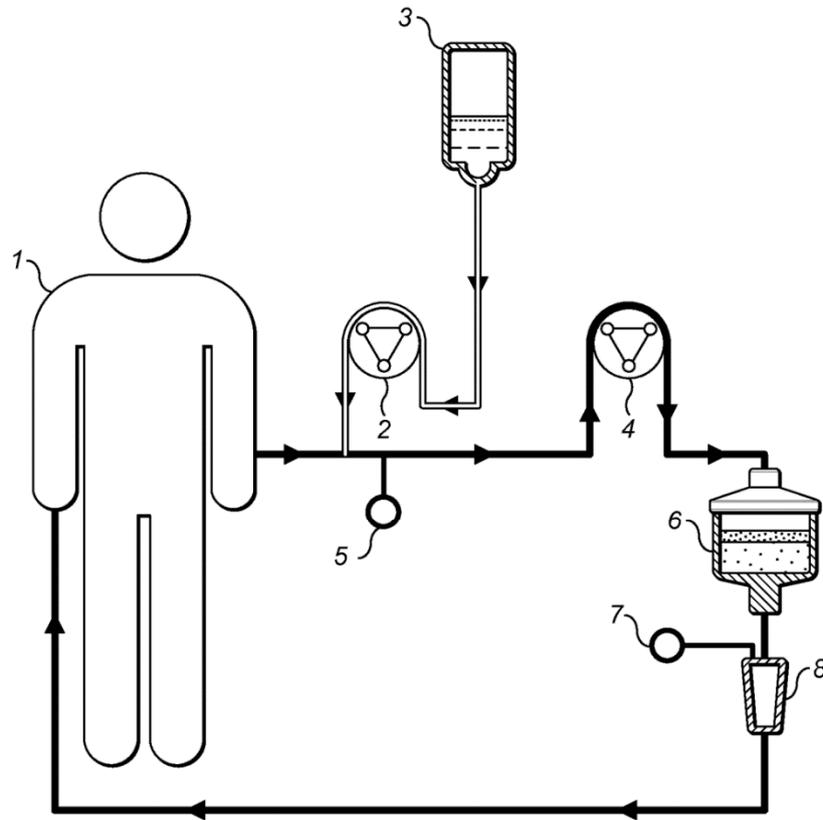


FIG. 4

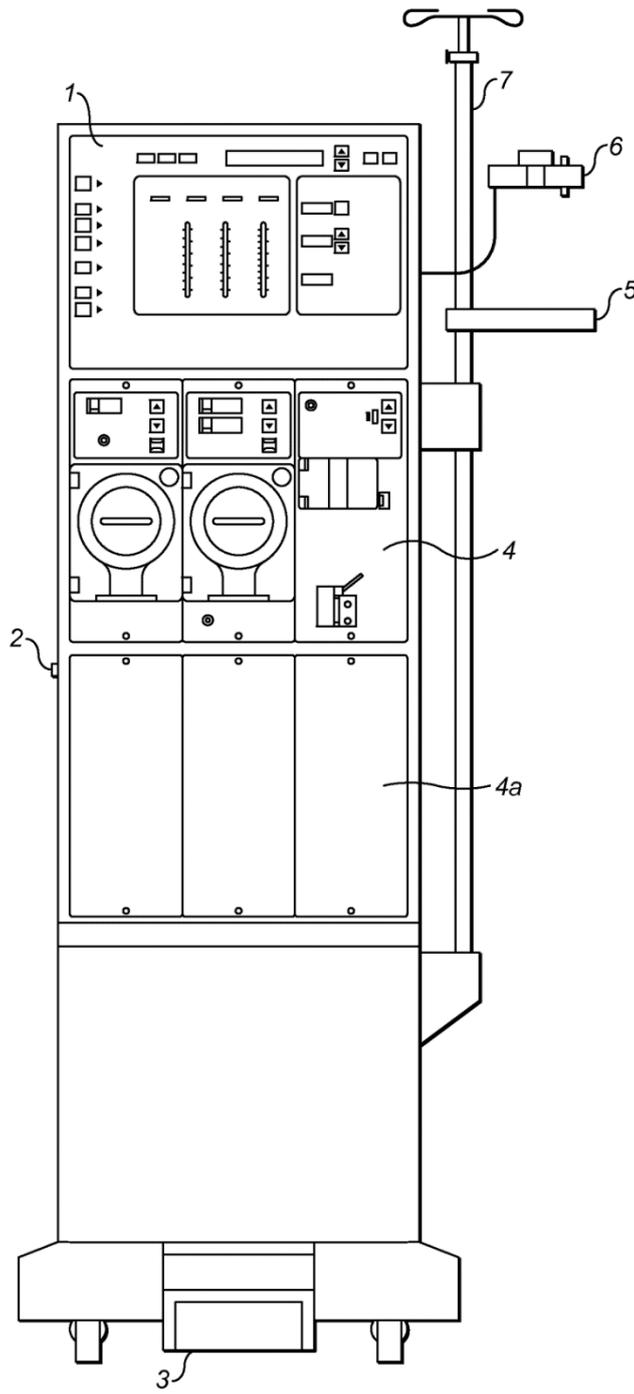
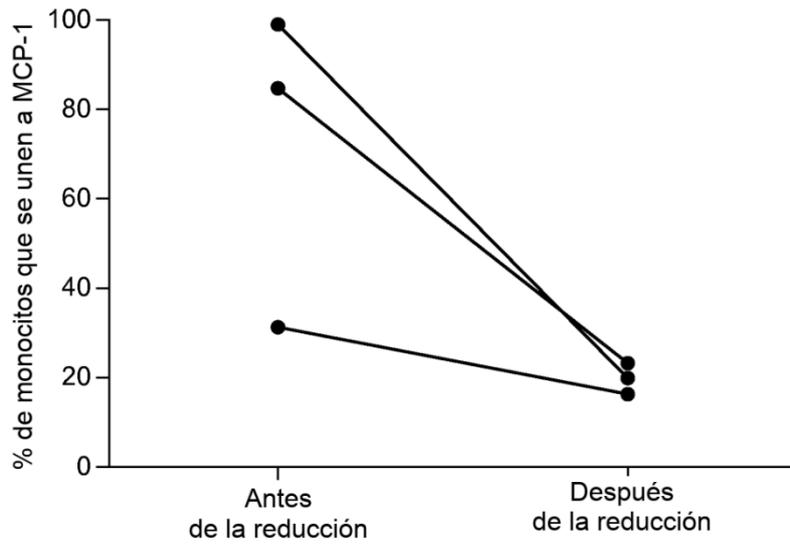
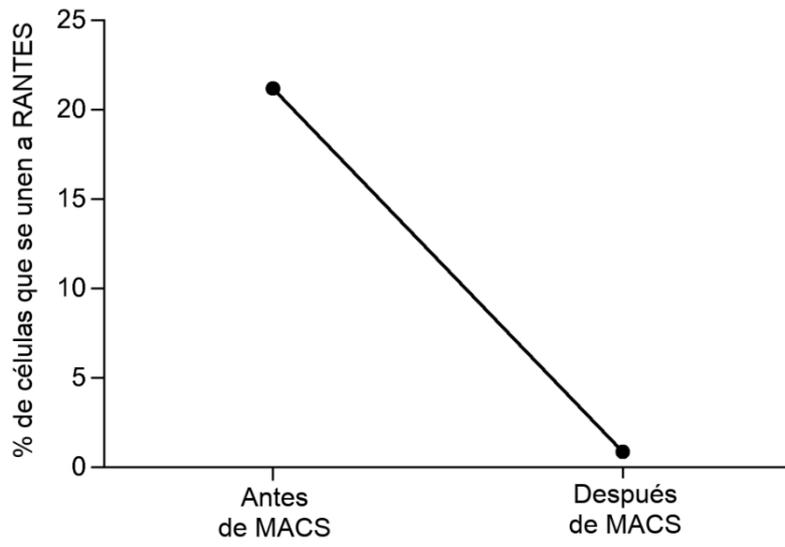


FIG. 5



*FIG. 6a*



*FIG. 6b*

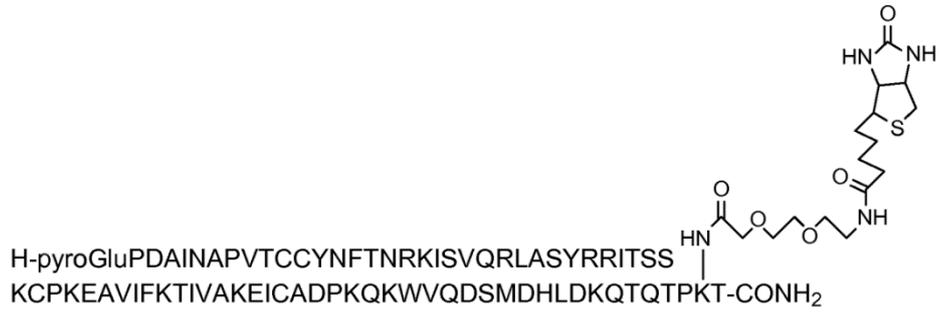


FIG. 7

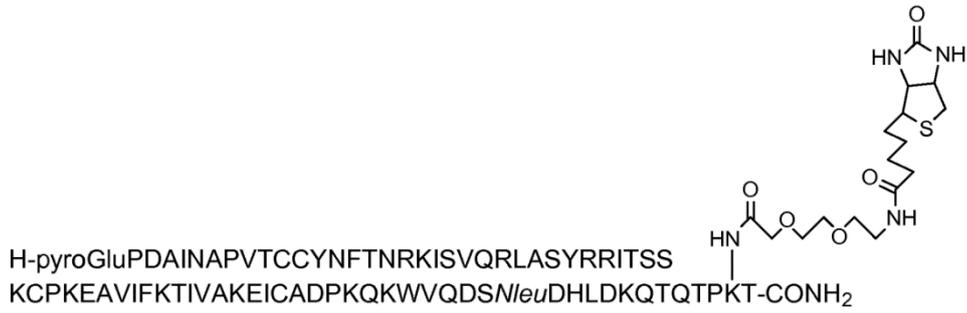


FIG. 8

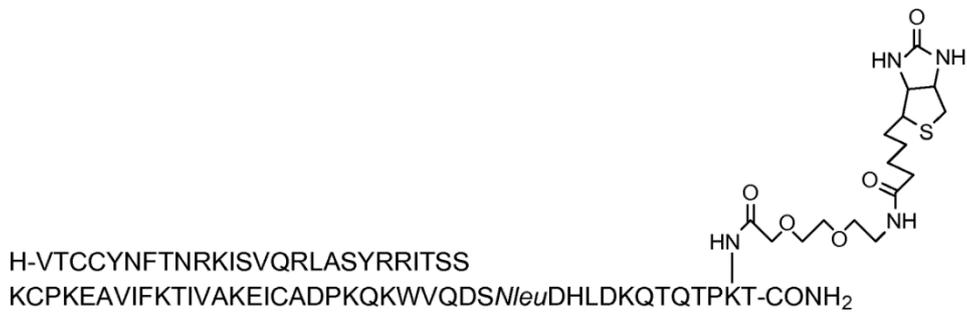


FIG. 9

# ES 2 801 901 T3

```
ulimit -t30; /usr/molbio/bin/lalign -f -14 -g -4 -K 3 ./wwtmp/.11134.1.seq
./wwtmp/.11134.2.seq > ./wwtmp/.11134.out LALIGN encuentra los mejores
alineamientos locales entre dos secuencias versión 2.1u09 Diciembre 2006 Por favor citar: X.
Huang y W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 alineamiento < (E
0,05); puntuación 38 (3 máx)
Comparación de:
(A) ./wwtmp/.11134.1.seq MCP1 (humano) 76 pb
- 76 aa
(B) ./wwtmp/.11134.2.seq MCP-5 (ratón) 82 pb
- 82 aa
utilizando el archivo matriz:BL50 (15/-5), hueco-abierto/ext:-14/-4 E
(límite) 0,05

68,1 % de identidad en 72 aa solapamiento (2-73: 2-73); puntuación:
370 E(10000): 1,6e-31

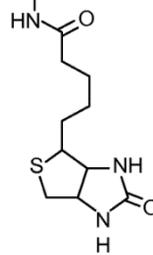
      10      20      30      40      50      60
MCP1  PDAINAPVTCYNFNTRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWVQ
      :::::::::::  ....  ...  :::::::::::  :::::::::::
MCP-5  PDAVSTPVTCCYNVVKQKIHVRKLSYRRITSSQCPREAVIFRTILDKEICADPKEKWK
      10      20      30      40      50      60

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

**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**

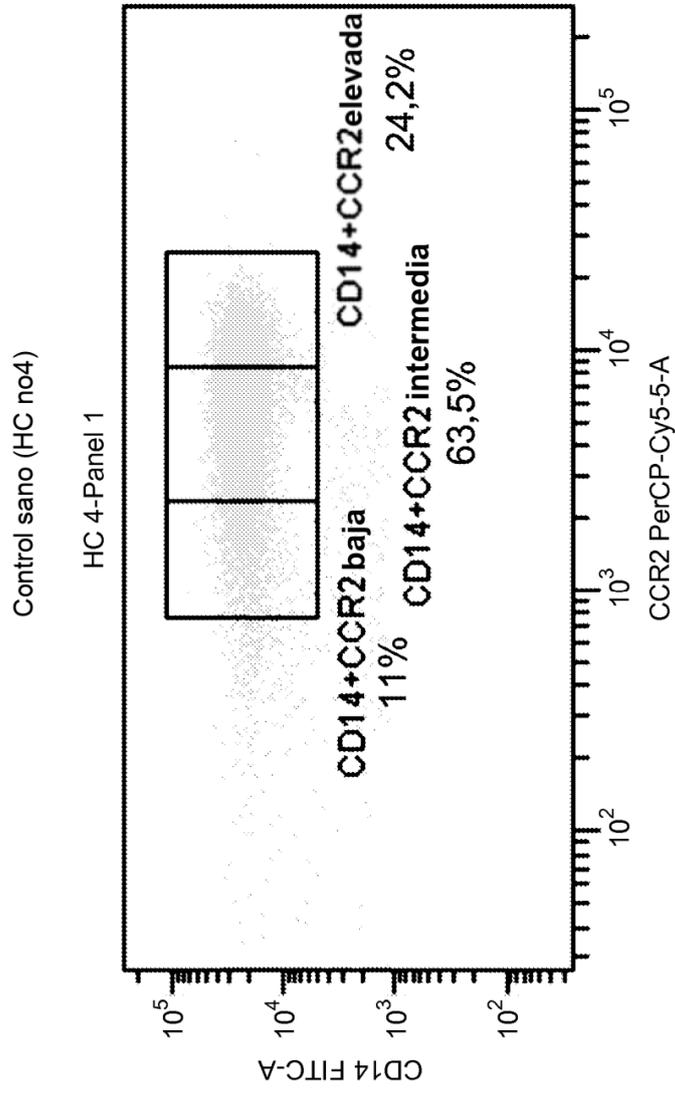
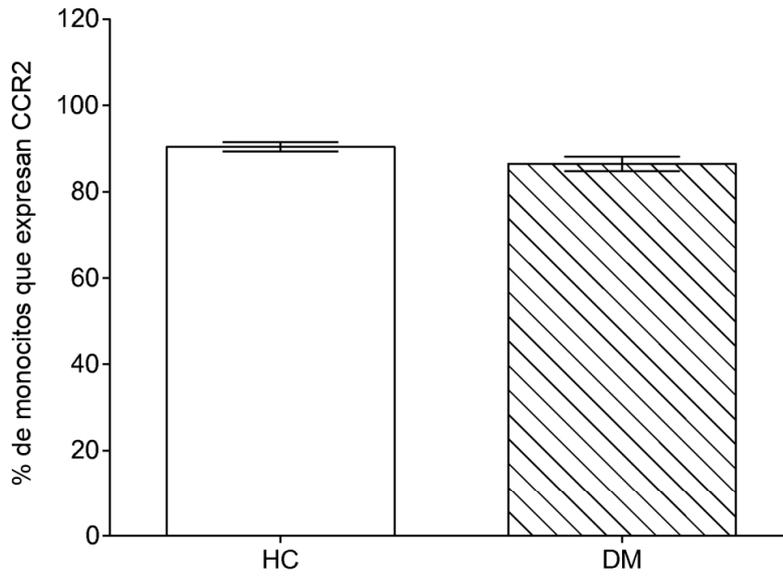
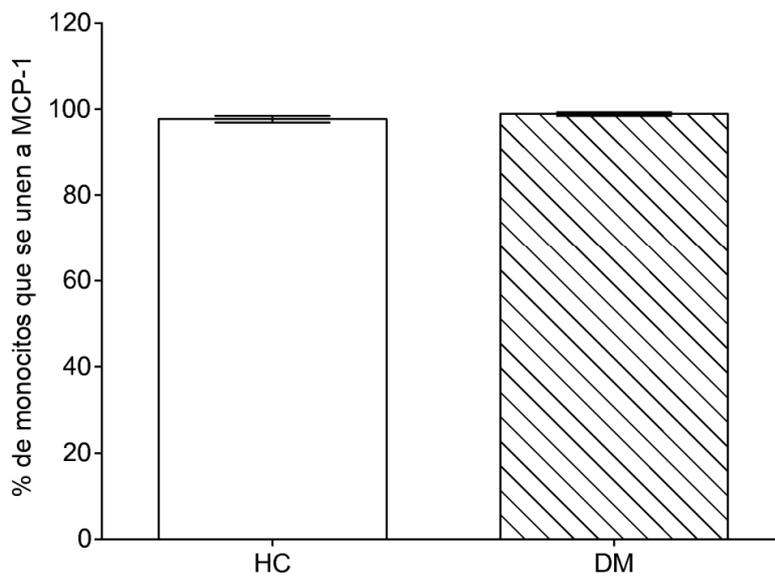


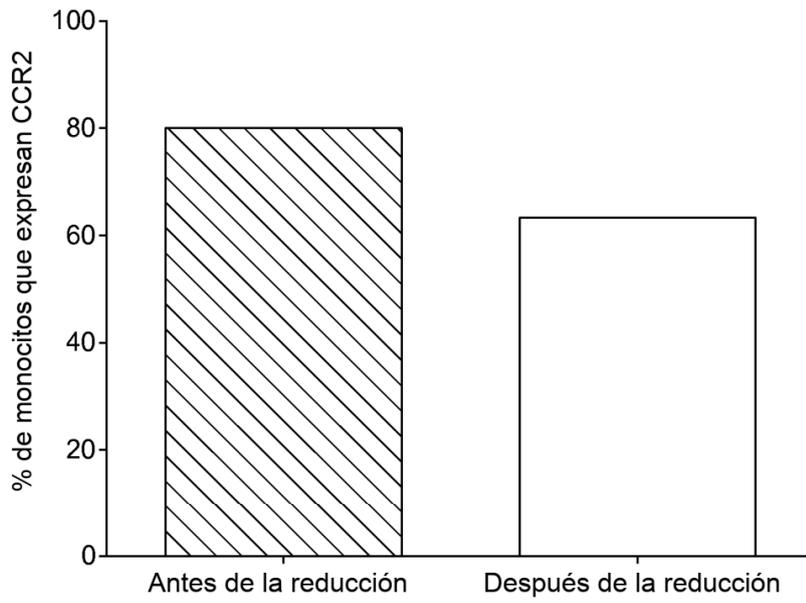
FIG. 13



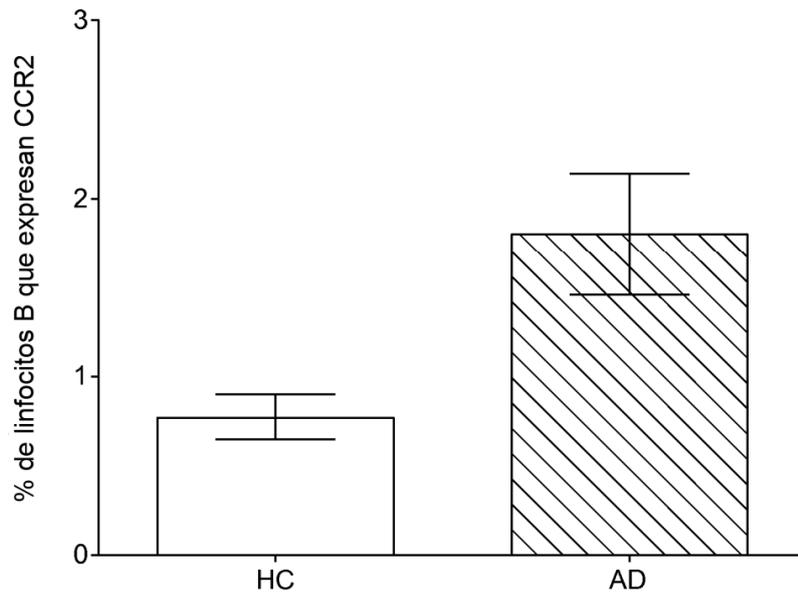
**FIG. 14**



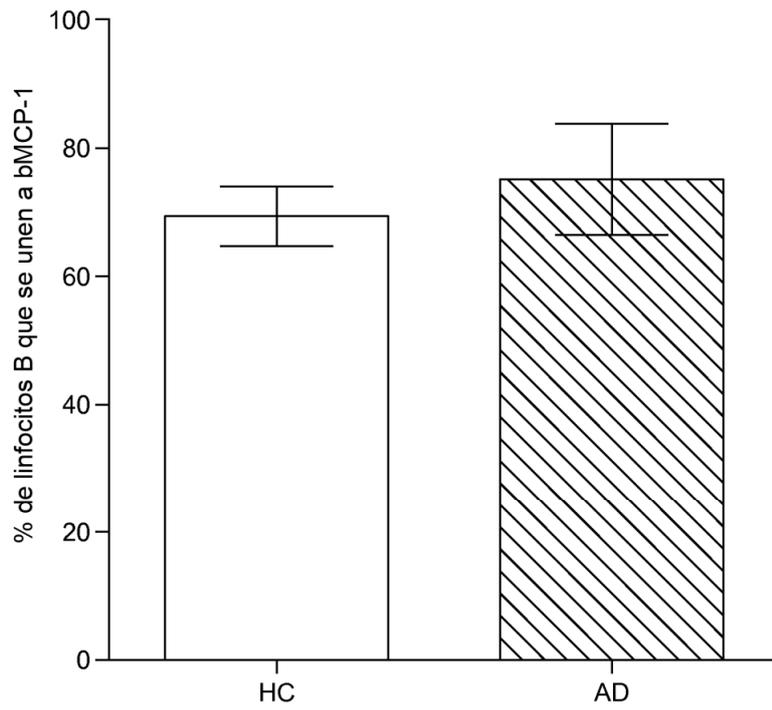
**FIG. 15**



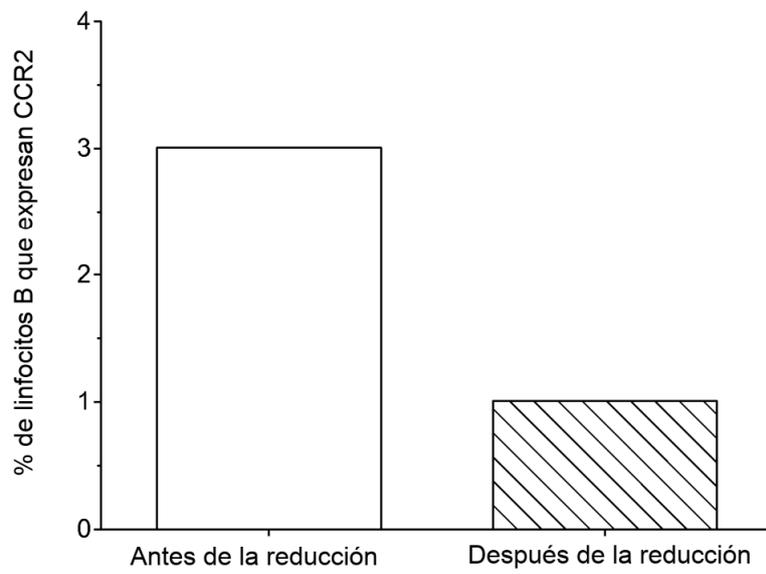
**FIG. 16**



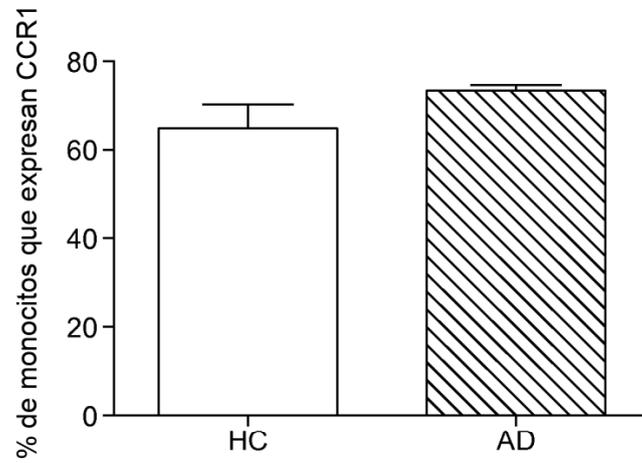
**FIG. 17**



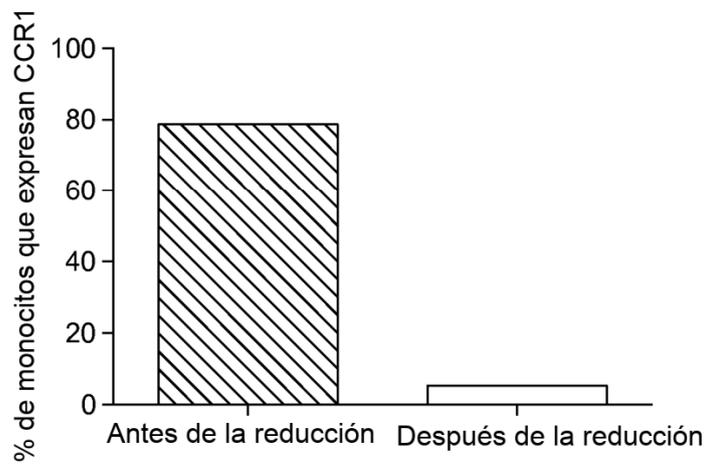
**FIG. 18**



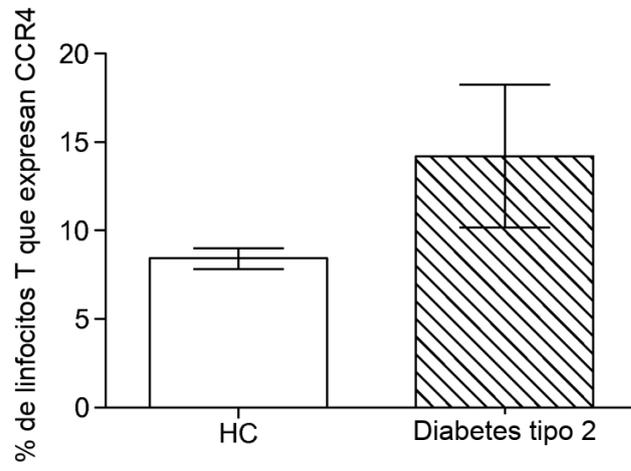
**FIG. 19**



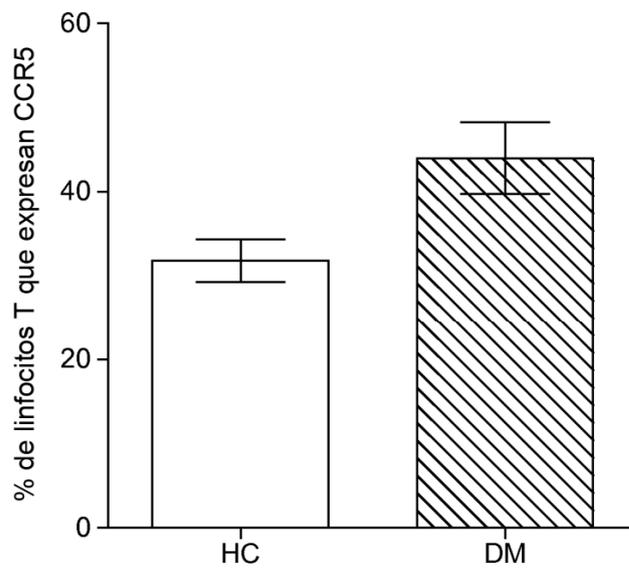
*FIG. 20*



*FIG. 21*



**FIG. 22**



**FIG. 23**