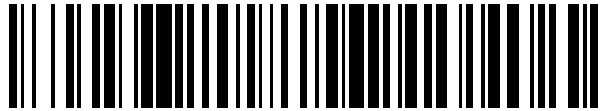


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 203**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2007 PCT/SE2007/000459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2007 WO07133147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2007 E 07748123 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2021025**

54 Título: **Método y medio para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal**

30 Prioridad:

12.05.2006 SE 0601075

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

24.02.2017

73 Titular/es:

**ITH IMMUNE THERAPY HOLDINGS AB (100.0%)
Unit L2:04 Karolinska University Hospital Solna
171 76 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**THÖRN, MAGNUS y
WINQVIST, OLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 603 203 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

Método y medio para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, y a un medio para su uso en el tratamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son manifestaciones de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Otras formas de EII incluyen la colitis linfocítica y la colitis colagenosa. Los pacientes con colitis ulcerosa fulminante se tratan actualmente con dosis altas de esteroides. Se están realizando ensayos clínicos en fase III con anti-TNF α .
15 Ambos fármacos son inhibidores generales de la inflamación. Son eficaces en aproximadamente el 50 % de los casos, pero producen efectos adversos graves. Con frecuencia, los pacientes también pueden tener episodios recurrentes de colitis fulminante. En los pacientes con colitis fulminante que no responden al tratamiento médico, es necesaria una intervención quirúrgica urgente. La colitis ulcerosa siempre está restringida al intestino grueso (colon). En la colitis fulminante el colon se reseca y se construye un ileostoma externo. Después de la recuperación y,
20 posiblemente, el tratamiento médico adicional de la inflamación del muñón rectal en la mayoría de los pacientes se realiza una anastomosis ileorrectal o cirugía reconstructiva con una bolsa pélvica para restaurar la continuidad intestinal. Ambos procedimientos quirúrgicos implican heces sueltas aproximadamente seis veces al día y alteraciones en los equilibrios hídrico y mineral.

25 Los pacientes con enfermedad de Crohn generalmente presentan la inflamación en la parte más distal del intestino delgado y en la primera parte del intestino grueso (región ileocecal), pero la inflamación puede localizarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal. El tratamiento médico no puede curar la enfermedad, aunque se puede proporcionar alivio temporal mediante fármacos antiinflamatorios, tales como esteroides y azatioprina. La cirugía con resección de segmentos intestinales estenóticos y con fistulas está indicada en aproximadamente el 50 % de los
30 pacientes; la mitad de ellos sufrirá recurrencias y necesitarán cirugía adicional. Por lo tanto, es muy necesario un método que pueda inactivar específicamente la inflamación en la EII y prevenir la enfermedad recurrente en el paciente individual.

El documento WO2005113037 da a conocer un filtro y un método para eliminar materiales seleccionados de una muestra de fluido biológico. El filtro comprende una carcasa exterior, una entrada y una salida. Una pluralidad de superficies del filtro se proporciona dentro de la carcasa exterior y se aplica al menos un recubrimiento a las superficies del filtro. El al menos un recubrimiento comprende al menos dos módulos de unión que, a su vez, se unen selectivamente entre sí. Un módulo de unión se une selectivamente a las superficies del filtro y otro módulo de unión está configurado para unirse selectivamente a los materiales seleccionados que se han de retirar de la muestra de fluido. Dado que se permite que la muestra de fluido pase a través de la entrada, la carcasa exterior y la salida, los materiales seleccionados se unen selectivamente a las superficies del filtro a través del recubrimiento. La muestra de fluido es una muestra de sangre. Un componente líquido seleccionado es un componente de la sangre elegido de entre otros, leucocitos, granulocitos y linfocitos.

45 Los medios de filtro y los aparatos para la separación de leucocitos de la sangre se divulgan en, entre otros: JP2003265596; US5885457; JP04187206; US4936993; JP03000074; JP02167071; JP02009823; JP10057477.

El documento WO 02/24307 da a conocer un dispositivo adsorbente para reducir el contenido de las células y/o plaquetas circulantes en una muestra biológica, tal como sangre, en el que el dispositivo adsorbente comprende un soporte y un agente de afinidad inmovilizado sobre el soporte. El agente de afinidad puede ser un anticuerpo que se une a una molécula expresada sobre la superficie de las células y/o plaquetas circulantes.

Lampinen M et al. (Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis, 2005, GUT vol 54; 12; 1714-1720) describen un estudio diseñado para investigar los eosinófilos, neutrófilos y granulocitos intestinales mediante citometría de flujo. El artículo demuestra un aumento en la expresión de CD66b en los neutrófilos obtenidos de muestras de biopsia de colon y de ileon de pacientes con colitis ulcerosa.

Sandborn W.J y Targan S.R (Biologic therapy of inflammatory bowel disease, 2001, Gastroenterology vol 122; 6; 1592-1608) revisan las terapias biológicas que se están desarrollando para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Estas terapias incluyen anticuerpos frente a las integrinas $\alpha 4\beta 7$, que se han desarrollado en un intento de inhibir el anclaje de los leucocitos a la mucosa del intestino.

Z Lui et al (IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production, The Journal of Immunology, vol 164; 7; 3608-3615) describen el efecto de la citocina IL-15 sobre la producción de citocinas proinflamatorias por las células T activadas y sugiere un papel para la IL-15 en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Sandborn (Preliminary data on the use of apheresis in inflammatory bowel disease, *Inflamm Bowel Dis*, vol.12; S15-21) describen el tratamiento de aféresis para la EII, en particular los sistemas de aféresis Adacolumn y Celsorba. El Adacolumn es un dispositivo de filtración relleno de perlas de acetato de celulosa, mientras que la columna Celsorba consiste en fibras no tejidas de poliéster.

Kanai et al. (The logics of leukocytapheresis as a natural biological therapy for inflammatory bowel disease, *Expert Opin. Biol Ther.* vol. 6(5); 453-466) es una revisión que describe los resultados de ensayos clínicos en los que se analiza la leucocitaféresis para el tratamiento de la EII. Los estudios descritos se basan en el uso de los sistemas de aféresis Adacolumn y Celsorba descritos anteriormente.

Objetivos de la invención

En el presente documento se describe un método para tratar la EII, en particular la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Es un objetivo de la invención proporcionar medios para su uso en el método.

Otros objetivos de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción corta de la invención, de realizaciones preferentes de la misma ilustradas en un dibujo, y de las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una columna de leucaféresis cargada con un soporte sobre el que se inmovilizan los anticuerpos contra marcadores de superficie celular de leucocitos activados seleccionados de los linfocitos T y granulocitos neutrófilos, en la que dichos anticuerpos contra los linfocitos T activados se seleccionan de anticuerpos contra CD69 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ y/o en el que dichos anticuerpos contra los granulocitos neutrófilos activados se seleccionan de anticuerpos contra CD66b.

La presente invención también proporciona un soporte para leucaféresis que comprende inmovilizados sobre el mismo uno o más anticuerpos producidos contra leucocitos activados seleccionados de los linfocitos T y granulocitos neutrófilos y en el que dichos anticuerpos contra los linfocitos T activados se seleccionan de anticuerpos contra CD69 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ y/o en el que dichos anticuerpos contra los granulocitos neutrófilos activados se seleccionan de anticuerpos contra CD66b.

En el proceso inflamatorio de la EII, las células T interactúan con los leucocitos. Los leucocitos liberan agentes nocivos tras la estimulación por ciertos cofactores. Estos agentes nocivos dañan las células intestinales. Por citometría de flujo del material obtenido a partir de biopsias intestinales de pacientes con EII activa, los inventores identificaron marcadores de la superficie celular de los leucocitos de linfocitos T activados y de granulocitos neutrófilos y eosinófilos activados, células que se acumulan en el sitio de la inflamación, pero que también están presentes en la sangre periférica en circulación.

La presente invención se basa en la hipótesis de que estas células activadas son responsables del inicio y el mantenimiento de la inflamación en la EII, y que su eliminación de la circulación puede reducir e incluso eliminar tal inflamación. El concepto comprende la idea de que el estado inflamatorio de cada paciente es único en términos del grado de activación de leucocitos y de la clase y proporciones relativas de células T invasoras, parámetros que varían de un paciente a otro y con la gravedad de la enfermedad, y están influenciados por los medicamentos administrados al paciente. La presente invención no recurre al uso de adsorbentes de leucocitos inespecíficos conocidos en la técnica, tales como algodón y otras fibras poliméricas. En el contexto de la invención, la EII comprende principalmente la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, pero también la colitis colagenosa caracterizada por diarreas acuosas, endoscopia normal, pero con acumulación histopatológica de colágeno en la submucosa intestinal, y la colitis linfocítica caracterizada por la presencia de grandes cantidades de linfocitos en la intestinal mucosa acompañada de diarrea.

Como se describe en el presente documento, se realiza una colonoscopia a un paciente con EII. Se toman una o varias biopsias de tejido intestinal enfermo. A partir del material de biopsia individual o combinado se prepara una suspensión de células individuales. La presencia de linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, granulocitos y granulocitos eosinófilos en la suspensión de células únicas se determina mediante citometría de flujo usando anticuerpos contra CD4, CD8, CD3, CD15, CD19. Además, el estado de activación de la mucosa que invade las células inmunitarias se investiga mediante el uso de anticuerpos contra marcadores de activación, tales como CD69, CD62 L, CD25, CD27, HLA-DR, CD44 y CD66b. En principio, el estado inflamatorio de cada paciente individual es único en términos del grado de activación y el tipo de invasión de células, y de los parámetros que varían con la gravedad de la enfermedad y con los medicamentos administrados. Basándose en el resultado de esta investigación se usa una columna de leucaféresis para la eliminación dirigida de la población de células dominantes causantes de la inflamación. Para la eliminación de los anticuerpos se usan linfocitos T B activados que reconocen el marcador de activación CD69 acoplado a un soporte sólido. Para la eliminación de los neutrófilos granulocitos activados se usan anticuerpos contra la molécula de anclaje intestinal o contra CD66b; una columna cargada con un soporte sobre el

que se inmoviliza un anticuerpo frente a la integrina $\alpha 4 \beta 7$ eliminará los leucocitos de este tipo. Por tanto, las células sanguíneas en la circulación periférica activadas en los ganglios linfáticos que drenan el sitio intestinal inflamatorio en ruta hacia la mucosa intestinal para proporcionar inflamación local adicional serán eliminadas mediante dicha leucaféresis basada en anticuerpos de la sangre periférica. Esto amortiguará o incluso inhibirá el reclutamiento adicional de células T autorreactivas intestinales.

De acuerdo con la presente invención, se divulga una columna de leucaféresis de acuerdo con las presentes reivindicaciones cargadas con un soporte sólido adecuado de una relación grande entre la superficie y el volumen, cuya superficie transporta anticuerpos capaces de unirse a leucocitos activados que circulan en la sangre periférica, seleccionándose los leucocitos activados de entre linfocitos T y granulocitos neutrófilos. Pasar la sangre periférica de un paciente que sufre inflamación por EII a través de la columna hará que los leucocitos activados se acoplen a los anticuerpos y, por lo tanto, los eliminen de la circulación. Mediante mecanismos homeostáticos, el agotamiento de los leucocitos activados en la sangre periférica circulante da lugar a una disminución del número de leucocitos activados en tráfico hacia el intestino y, por lo tanto, una reducción del número de leucocitos activados en el intestino. En esta aplicación, el término "anticuerpo" comprende anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, y fragmentos o modificaciones de los mismos que retienen la capacidad de unión a antígeno/anticuerpo del anticuerpo correspondiente, incluyendo anticuerpos recombinantes alterados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Este tipo de leucaféresis "a medida" es capaz de clasificar los leucocitos activados específicamente hacia las células de la mucosa intestinal, de modo que se elimina un factor importante en el proceso inflamatorio y se invierte la colitis fulminante. En pacientes con enfermedad de Crohn se aplica el mismo principio, pero los leucocitos; en este caso, los leucocitos se activan hacia el antígeno o antígenos localizados en zonas más profundas en la pared intestinal. Mediante la identificación de los antígenos que causan la inflamación, es posible seleccionar antígenos para su presentación en un estado inmovilizado sobre un soporte sólido a los leucocitos que pasan a través de la columna, y se unen a los leucocitos activados de esta manera.

Basándose en el tipo y grado de la activación inflamatoria en el intestino, la columna de leucaféresis se usa para la eliminación dirigida de la población de células dominantes causantes de la inflamación. Es particularmente preferente la depleción de los linfocitos T activados en sangre periférica.

Se prefiere la eliminación de los linfocitos T activados de la sangre periférica de un paciente con EII poniéndolos en contacto con anticuerpos contra CD69 o anticuerpos contra integrina $\alpha 4 \beta 7$; estos anticuerpos pueden usarse solos o en combinación. Los granulocitos neutrófilos activados pueden eliminarse de una manera correspondiente poniéndolos en contacto con anticuerpos contra CD66b.

Los granulocitos neutrófilos activados y los granulocitos eosinófilos también se pueden identificar en la sangre periférica de un paciente con EII.

La eliminación de los leucocitos T activados y/o los granulocitos neutrófilos activados se puede lograr mediante el uso de una columna que comprenda más de dos o más tipos de anticuerpos sobre el soporte sólido. Preferentemente, se usa un soporte separado para cada anticuerpo.

Los soportes separados, cada uno con un anticuerpo diferente o anticuerpos diferentes, pueden estar dispuestos en un número correspondiente de columnas separadas. Se prefiere que las columnas se acoplen en línea.

Como se describe en el presente documento, se pueden combinar varias biopsias obtenidas mediante colonoscopia de un paciente con EII tratadas mecánicamente para formar una suspensión de células individuales y se analizaron por citometría de flujo para identificar la presencia de leucocitos activados seleccionados de linfocitos T, granulocitos neutrófilos y granulocitos eosinófilos, opcionalmente linfocitos B activados, mediante su exposición a anticuerpos específicos, en particular anticuerpos contra CD4, CD8, CD3, CD 15 y CD19.

Como se describe en el presente documento, el estado de activación de las células inmunitarias que invaden la mucosa obtenidas de un paciente con EII mediante colonoscopia se puede determinar mediante la exposición de las células inmunitarias invasoras a anticuerpos contra marcadores de activación tales como CD69, CD62 L, CD25, CD27, HLA-DR, CD44 y CD66b.

Los linfocitos T con tendencia a migrar a la mucosa de la pared intestinal expresan el receptor $\alpha 4 \beta 7$ de la integrina que se une a MAdCAM-1 (molécula 1 de adhesión celular de adreína de la mucosa) expresada en el endotelio. De acuerdo con la presente invención, tales células T invasoras pueden retirarse de la circulación periférica mediante leucoféresis utilizando una columna que comprende un soporte sobre el que se inmoviliza un anticuerpo para el receptor de la integrina $\alpha 4 \beta 7$.

Por lo tanto, se puede someter a un paciente con EII, en el que las biopsias analizadas mediante citometría de flujo indican inflamación activa, a leucoféresis basada en anticuerpos diseñada para eliminar poblaciones celulares específicas responsables de la inflamación intestinal local. Un acceso intravenoso se introduce en, por ejemplo, las

venas antecubital acopladas a tubos heparinizados que se conectan a una bomba peristáltica que bombea aproximadamente 30 ml de sangre por minuto. La sangre pasa a través de la columna de la leucaféresis de anticuerpos diseñada y el tubo se vuelve a introducir en, por ejemplo, la vena antecubital contralateral. Por ejemplo, se somete al paciente a 60 minutos de leucaféresis, que eliminará las células activadas de aproximadamente la mitad o poco menos de la mitad del volumen de sangre (60 x 20 ml = 1800 ml). Con independencia del volumen de sangre eliminado en una leucaféresis, el tratamiento se repite durante 3-5 veces en el plazo de 1 a 3 semanas, a fin de eliminar las células inmunitarias activadas en el intestino transportadas por la sangre recién aparecidas. A continuación, se puede seguir el resultado mediante investigación adicional de las células individuales de biopsias intestinales mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

En el presente documento se describe un método de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que comprende: (a) proporcionar una muestra de biopsia intestinal obtenida de tejido inflamado de un paciente; (b) tratar mecánicamente la muestra para obtener una suspensión de células; (c) identificar marcadores de la superficie celular de leucocitos activados seleccionados de linfocitos T, granulocitos neutrófilos y granulocitos eosinófilos en la suspensión; (d) producir anticuerpos contra los leucocitos activados; (e) inmovilizar los anticuerpos contra los leucocitos activados en un soporte común o sobre soportes separados; (f) proporcionar una columna cargada con el soporte o soportes; (g) desviar una porción de la sangre periférica del paciente para hacerla pasar a través de la columna antes de volver a infundir al paciente para que dichos leucocitos activados se acoplen con los anticuerpos sobre el soporte o soportes, de modo que se eliminan de la circulación sanguínea. Se prefiere que los soportes que llevan anticuerpos contra los leucocitos T activados y contra los granulocitos neutrófilos activados y/o los granulocitos eosinófilos activados se proporcionen en columnas separadas, que pueden acoplarse en línea o en paralelo. También se prefiere que el método recurra a una única columna cargada con soportes separados en los que se han inmovilizado anticuerpos contra dos o más de linfocitos T activados, granulocitos neutrófilos activados y granulocitos eosinófilos activados, linfocitos B activados opcionalmente, respectivamente. Preferentemente, la columna de la invención tiene un volumen vacío de 20 a 100 ml, en particular de 30 a 50 ml, pero también es factible otro volumen más grande, tal como hasta 500 ml. Cuando se usan columnas de un volumen más grande es importante vaciarlos de sangre al final del tratamiento para mantener al mínimo la pérdida de sangre. Esto se puede realizar mediante su lavado con, por ejemplo, solución salina hasta que el medio de lavado haya desplazado la mayor parte de la sangre en la columna o esencialmente toda. Las superficies de la columna y los tubos que entran en contacto con la sangre deben ser de un tipo con el fin de evitar la coagulación; por lo tanto, se prefiere usar columnas y tubos con superficies heparinizadas. Los métodos para proporcionar o modificar las superficies que no activan el sistema de coagulación son bien conocidos en la técnica. Normalmente, de un tercio a dos tercios del volumen de la sangre del paciente, preferentemente de aproximadamente la mitad de su volumen de sangre o ligeramente menos, se hace pasar por la columna en un solo tratamiento. Por lo general, un solo tratamiento no será suficiente para obtener la remisión o la libertad a largo plazo o la supresión sustancial de los síntomas. Por tanto, el tratamiento se repite, preferentemente, de dos o tres a cinco veces y más en un plazo de una a tres semanas desde el tratamiento inicial. La muestra de la biopsia intestinal es una de varias de tales muestras obtenidas del paciente y en las que las muestras se combinan antes del tratamiento mecánico para proporcionar una suspensión celular. Son particularmente útiles en el método de la invención los anticuerpos contra CD69 o el anticuerpo contra la integrina $\alpha 4\beta 7$ con respecto a los linfocitos T activados en la circulación periférica, anticuerpos que también se prefieren para la inmovilización del soporte de la invención. La presencia de linfocitos T activados en la mucosa intestinal se detecta de forma ventajosa mediante la exposición de la suspensión celular o células aisladas de la suspensión a anticuerpos específicos contra uno o más de los marcadores de activación CD69, CD62 L, CD25, CD27, HLA-DR, CD44, CD66b.

"Producir anticuerpos" incluye la obtención de tales anticuerpos a partir de fuentes comerciales o de otro tipo.

La invención se describirá a continuación con más detalle con referencia a realizaciones preferentes de la misma ilustradas en un dibujo.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 - 4 muestran la expresión de marcadores de actividad sobre células T CD4+ y granulocitos neutrófilos de sangre periférica y de la mucosa intestinal;

Las figuras 5 - 9 muestran los efectos de la separación de las células T CD4+ activadas de sangre periférica y los granulocitos neutrófilos en columnas MACS (clasificación de células activada magnéticamente);

La figura 10 muestra una columna de la invención acoplada con la circulación de un paciente.

Descripción de las realizaciones preferentes

Materiales y métodos

Obtención y preparación de muestras. Durante la colonoscopia de un paciente de EII con colitis ulcerosa fulminante se obtuvieron muestras de biopsia, se transfirieron inmediatamente a tubos llenos de solución salina fisiológica y se procesaron después en una hora. Se obtuvieron suspensiones celulares individuales usando un homogeneizador de vidrio adaptado holgadamente. Después, las células se lavaron dos veces con un tampón de clasificación de células

activada por fluorescencia (FACS) que contiene 0,05 % de NaN_3 , 0,1 % de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,4 % de citrato trisódico dihidrato en PBS.

5 La sangre periférica heparinizada de un mismo individuo se hemolizó con un 0,83 % en peso de cloruro de amonio acuoso y se lavó dos veces en el tampón de FACS para obtener una suspensión de leucocitos.

Las suspensiones de células se incubaron por separado con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de un lavado final, se suspendieron las células en 500 μl del tampón de FACS y se analizaron.

10 *Anticuerpos.* Se usaron AcMo de ratón anti-humanos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), o proteína clorofila peridina (PerCP) para todos los antígenos (CD4, CD69, CD66b). También se realizó marcaje de control de isotipo equivalente utilizando IgM κ e IgG2bk de ratón anti-humanas conjugadas con fluorocromo como controles para la tinción no específica. Todos los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo se adquirieron en Becton Dickinson (BD) Biosciences/Pharmingen, San Diego, EE.UU. Las anti-microperlas conjugadas con FITC (partículas supramagnéticas de tamaño nano acopladas a anticuerpos específicos) se adquirieron en Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania.

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

20 *Columna de leucaféresis.* Un acceso por vía intravenosa en forma de una primera cánula 1 se introduce en la vena antecubital 8. La primera cánula 1 está acoplada a un primer tubo heparinizado 2 en el que funciona una bomba peristáltica 3, bombeando aproximadamente 30 ml de sangre por minuto. En su otro extremo el primer tubo heparinizado 2 se conecta a un extremo de una columna de leucaféresis 4 que tiene un volumen de 50 ml rellenos de un soporte sólido granular 5 tal como Sepharose® en el que se inmoviliza un anticuerpo producido contra los leucocitos T activados cosechados de un paciente. El soporte sólido 5 con el anticuerpo inmovilizado se mantiene en su lugar mediante los cuerpos del primero y el segundo filtro 10, 11. El otro extremo de la columna de leucaféresis 4 está conectado a un segundo tubo heparinizado 6 que está acoplado a una segunda cánula 7 en su otro extremo. La segunda cánula 7 se introduce en la vena antecubital contralateral 9. La sangre venosa que se ha hecho que fluya desde la vena antecubital 8 a la vena antecubital contralateral 9 de este modo se hace pasar a través de la columna 4, en la que los linfocitos T activados se acoplan al anticuerpo sobre el soporte 5 y son retenidos en la columna. Normalmente, una sesión de leucaféresis es una de 60 minutos, que eliminará las células activadas a partir de aproximadamente la mitad o poco menos de la mitad del volumen de sangre (en función del peso corporal de la persona; 60 x 20 ml = 1800 ml). El tratamiento se repite, por ejemplo, 3-5 veces en un plazo de 1 a 3 semanas para eliminar las células inmunitarias activadas en el intestino transportadas por la sangre. A continuación, se puede seguir el resultado mediante investigación adicional de las células individuales de biopsias intestinales mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. De un modo correspondiente se realiza la aféresis de los neutrófilos activados y/o los eosinófilos activados. Otros métodos para la unión de anticuerpos a soportes sólidos en la cromatografía de afinidad útiles en la invención se describen en Nisevitch M y Firer, MA, J Biochem Biophys Methods 49 (2001) 467-480.

40 Ejemplo 1

Separación por MACS. Dos ml de sangre periférica heparinizada de un donante sano se estimuló con SEB (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el anticuerpo monoclonal anti-CD28 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 2 horas a 37 °C para obtener células T y granulocitos neutrófilos activados. Con el fin de obtener una población mixta de células activadas y en reposo, posteriormente se añadieron 2 ml de sangre no estimulada. Los leucocitos se fijaron y los eritrocitos se eliminaron mediante lisis hipotónica. Los leucocitos se lavaron y se incubaron con anti-CD69 o CD66b conjugados con FITC. Después de 10 minutos de incubación a 4 °C en oscuridad, las células se lavaron y se incubaron durante otros 15 minutos con microperlas anti-FITC. Las células se separaron en una columna MACS; se recogieron las fracciones tanto negativas como positivas en diferentes tubos. Finalmente, las células se lavaron y se analizaron mediante FACS.

Ejemplo 2

55 *Los pacientes con EII tienen células T CD4+ en sangre periférica y en el intestino.* Los inventores investigaron suspensiones de células individuales de biopsias de sangre y de colon intestinal de 10 pacientes con Mb Crohn y 12 pacientes con colitis ulcerosa. Los pacientes con EII presentan células T CD4+ en sangre periférica con un fenotipo activado, ya que se encontraron células T colaboradoras que expresaban el marcador de activación muy temprano (Figura 1). En las biopsias de colon de pacientes con EII, la mayoría de las células T CD4+ expresan el marcador de activación CD69 como un signo de respuesta inflamatoria de células T acumulado en la pared intestinal del colon responsable de la destrucción autoinmune del colon (Figura 2). Las células T activadas que se encuentran en la sangre periférica son, probablemente, células T que se han activado en un ganglio linfático intestinal procedente del segmento de colon inflamatorio y estas células están en la ruta de la inflamación, una población de células que se debe eliminar.

65

Ejemplo 3

Los pacientes con EII tienen granulocitos neutrófilos activados en sangre periférica y en el intestino. Los granulocitos neutrófilos son una parte del sistema inmunológico innato y participan en la activación y el mantenimiento de la inflamación local. En la sangre periférica de pacientes con EII, la mayoría de los granulocitos neutrófilos expresan cantidades bajas de CD66b, sin embargo, una fracción de los granulocitos neutrófilos expresan cantidades altas de CD66b que indican un fenotipo activado (Figura 3). Una parte sustancial de los granulocitos neutrófilos de biopsias de colon de pacientes con EII activa son CD66bHi (Figura 4), lo que demuestra una activación del sistema inmunológico innato probablemente implicada en el desencadenamiento de la inflamación intestinal.

Ejemplo 4

Los linfocitos T CD4+ activados se pueden eliminar de la sangre periférica. Se puede lograr la eliminación de los linfocitos T activados que expresan el marcador de activación CD69 de sangre periférica (Figura 5), las células que están en la ruta a la mucosa de colon inflamada, mediante el uso de anticuerpos específicos y una columna. Una suspensión acuosa de linfocitos T marcados con el marcador de activación CD69 se hizo pasar a través de una columna cargada con un anticuerpo secundario conjugado a perlas magnéticas anti-FIT. Los linfocitos T no activados se separaron con éxito y enriquecieron en el eluato de la columna, que muestra que la mayoría de las células CD69+ se puede eliminar de la sangre periférica (Figura 6).

Ejemplo 5

Eliminación de granulocitos neutrófilos activados de la sangre periférica. Los granulocitos neutrófilos activados identificados por su expresión de niveles altos del marcador de superficie celular CD66b (Figura 7) se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con perlas magnéticas anti-FITC y se sometieron a purificación en columna. La mayoría de los neutrófilos activados que expresan cantidades de intermedias a altas del marcador de activación CD66b quedaron atrapados en la columna y, por tanto, se eliminaron de la sangre periférica (Figura 8).

Ejemplo 6

Ejemplo de tratamiento de un paciente con EII. Un paciente con EII se somete a una colonoscopia. Se toman varias biopsias. Se preparó una suspensión de células individuales a partir de las biopsias combinadas. Los leucocitos activados, es decir linfocitos T, linfocitos B, granulocitos neutrófilos y granulocitos eosinófilos, en la suspensión de células individuales se identifican mediante citometría de flujo usando anticuerpos contra, por ejemplo, CD4, CD8, CD3, CD15, CD19. Además, el estado de activación de la mucosa que invade las células inmunitarias se determina mediante el uso de anticuerpos contra marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD69, CD62 L, CD25, CD27, HLA-DR, CD44 y CD66b.

Se prepara una columna de leucaféresis que comprende anticuerpos contra los leucocitos y las células inmunitarias que invaden la mucosa que se encuentran activadas. El volumen de la columna puede variarse dentro de amplios límites, pero, por razones de economía y para mantener al mínimo la pérdida de sangre se prefiere un volumen de aproximadamente 30 - 50 ml. Los anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como Sepharose®, por cualquier técnica para acoplar covalentemente los anticuerpos a un soporte sólido. Por ejemplo, en un paciente en particular se usan anticuerpos contra el marcador de activación CD69 para la eliminación de las células T activadas y anticuerpos contra el anclaje al intestino o contra CD66b para la eliminación de los granulocitos neutrófilos activados o contra el anticuerpo frente a CD9 para la eliminación de los granulocitos eosinófilos activados. La columna se puede proporcionar precargada con un soporte sobre el que se inmovilizan uno o varios anticuerpos o se prepara de forma individual, tal como mediante una estrategia de inmovilización no covalente usando, por ejemplo, un soporte que contiene proteína A o estreptavidina que se unirá al dominio Fc del anticuerpo o un anticuerpo biotinilado, respectivamente. La columna de leucaféresis ya preparada o preparada individualmente está acoplado a la circulación periférica del paciente de forma similar a un riñón artificial durante un período de tiempo suficiente para permitir que pasen a su través varios volúmenes de sangre, preferentemente de aproximadamente tres a aproximadamente cinco volúmenes de sangre.

Ejemplo 7

Columnas de leucaféresis para atrapar una población celular específica o una combinación de poblaciones de células específicas. Una columna que comprende un soporte cargado con un anticuerpo frente a integrina $\alpha 4\beta 7$ elimina las células T que expresan la molécula de anclaje intestinal (Figura 9), por tanto, las células sanguíneas periféricas activadas en los ganglios linfáticos que drenan el sitio inflamado del intestino en la ruta a la mucosa intestinal y causan inflamación local adicional serán eliminadas en el procedimiento de la leucoféresis basada en anticuerpos. La carga de la columna con un soporte que lleva un anticuerpo contra CD69 eliminará los linfocitos T y B activados de la corriente sanguínea, de modo que se inhibe el reclutamiento adicional de las células T autorreactivas intestinales. De una manera similar, una columna cargada con un soporte que lleva un anticuerpo contra CD66b eliminará los granulocitos neutrófilos activados; para la eliminación correspondiente de los granulocitos eosinófilos activados se prefiere el anticuerpo CD9. Estos soportes se pueden utilizar uno por uno o en

combinación, tal como en columnas acopladas en paralelo o consecutivamente, conteniendo cada una un tipo de soporte o una sola columna que contiene varios tipos de soporte, tales como, por ejemplo, uno que lleva CD69 y otro que lleva CD66b. Para optimizar la eliminación de las células T en una columna de un tamaño dado y un soporte sólido se pueden variar la densidad del anticuerpo sobre la superficie de soporte, la afinidad de los anticuerpos, el caudal de la sangre que pasa a través de la columna, etc.

Por lo tanto, se somete a un paciente con EII, en el que las biopsias analizadas mediante citometría de flujo indican inflamación activa a leucoféresis basada en anticuerpos diseñada para eliminar poblaciones celulares específicas responsables de la inflamación intestinal local. Un acceso intravenoso se introduce en, por ejemplo, las venas antecubital acopladas a tubos heparinizados afectados por una bomba peristáltica que bombea aproximadamente 30 ml de sangre por minuto. Se hace pasar la sangre a través de la columna de la leucaféresis de la invención y el tubo se vuelve a introducir en, por ejemplo, la vena antecubital contralateral. Se somete al paciente a 60 minutos de leucaféresis, que eliminará las células activadas de aproximadamente la mitad del volumen de sangre (60 x 20 ml = 1800 ml). El tratamiento se repite 3-5 veces en un plazo de 1 a 3 semanas para eliminar las células inmunitarias activadas en el intestino transportadas por la sangre. A continuación, se puede seguir el resultado mediante investigación adicional de las células individuales de biopsias intestinales mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Leyendas de las figuras

- Figura 1 La expresión del marcador de actividad CD69 ES relativamente baja en los linfocitos T CD4+ de sangre periférica (expresado por el 3,8 % de las células T CD4+, con una intensidad media de fluorescencia (IMF) 20,0).
- Figura 2 Los linfocitos T CD4+ de la mucosa del colon tienen un aumento de la expresión de CD69 (72,8 %, IMF 33,5).
- Figura 3 La mayoría de los granulocitos neutrófilos de sangre periférica expresa cantidades bajas de CD66b; pero el 11,5 % tiene un aumento de la expresión, lo que indica activación celular. El IMF de las células en la puerta M1 es 104,3.
- Figura 4 Los granulocitos neutrófilos de la mucosa del colon tienen un IMF más alto de CD66b (629,7 en la puerta M1) y una mayor proporción de granulocitos neutrófilos activados.
- Figura 5 Linfocitos T CD4+ antes de la separación de las células positivas para CD69: el 5,9 % de las células expresan CD69.
- Figura 6 Linfocitos T CD4+ después de la separación de las células positivas para CD69: la fracción positiva consiste en un 61,6 % de células T CD4+ positivas para CD69.
- Figura 7 Granulocitos neutrófilos antes de la separación de las células positivas para CD66b: el 42,7 % de las células tiene una expresión de intermedia a alta de CD66b.
- Figura 8 Granulocitos neutrófilos después de la separación de las células positivas para CD66b: el 86,6 % de los neutrófilos en la fracción positiva tiene una expresión de intermedia a alta de CD66b.
- Figura 9 Linfocitos T CD4+ antes y después de la separación de células positivas para integrina $\alpha 4\beta 7$: el 37,4 % de las células tiene una expresión de intermedia a alta de la integrina $\alpha 4\beta 7$ antes de MACS y el 92,9 % después de MACS.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una columna de leucaféresis cargada con un soporte sobre el que se inmovilizan anticuerpos contra marcadores de superficie celular de leucocitos activados seleccionados de linfocitos T y granulocitos neutrófilos, en la que dichos anticuerpos contra linfocitos T activados se seleccionan de anticuerpos contra CD69 y $\alpha 4\beta 7$ integrina, y/o en la que dichos anticuerpos contra granulocitos neutrófilos activados se seleccionan de anticuerpos contra CD66b.
- 10 2. La columna de la reivindicación 1 que tiene un volumen de vacío de 20 cc a 100 cc.
3. La columna de la reivindicación 1 que tiene un volumen de vacío de 30 cc a 50 cc.
- 15 4. La combinación de dos o más columnas de leucaféresis de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 acopladas en paralelo o en línea.
5. Un aparato para leucaféresis que comprende la columna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una bomba de sangre acoplada en línea con la columna y medios para el acoplamiento de la bomba y la columna al sistema venoso de un paciente.
- 20 6. El aparato de la reivindicación 5, en el que los medios de acoplamiento de la bomba y de la columna al sistema venoso de un paciente comprenden dos cánulas.
7. El aparato de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la bomba es una bomba peristáltica que trabaja en un tubo flexible conectado a la columna.
- 25 8. Un soporte para leucoféresis que comprende inmovilizado sobre el mismo uno o más anticuerpos producidos contra leucocitos activados seleccionados de linfocitos T y granulocitos neutrófilos, y en donde dichos anticuerpos contra linfocitos T activados se seleccionan de anticuerpos contra CD69 y $\alpha 4\beta 7$ integrina, y/o en donde dichos anticuerpos contra granulocitos neutrófilos activados se seleccionan de anticuerpos contra CD66b.
- 30 9. El soporte de la reivindicación 8, en el que los leucocitos activados se han aislado de una o varias muestras de biopsia tomadas de tejido intestinal inflamado.

35

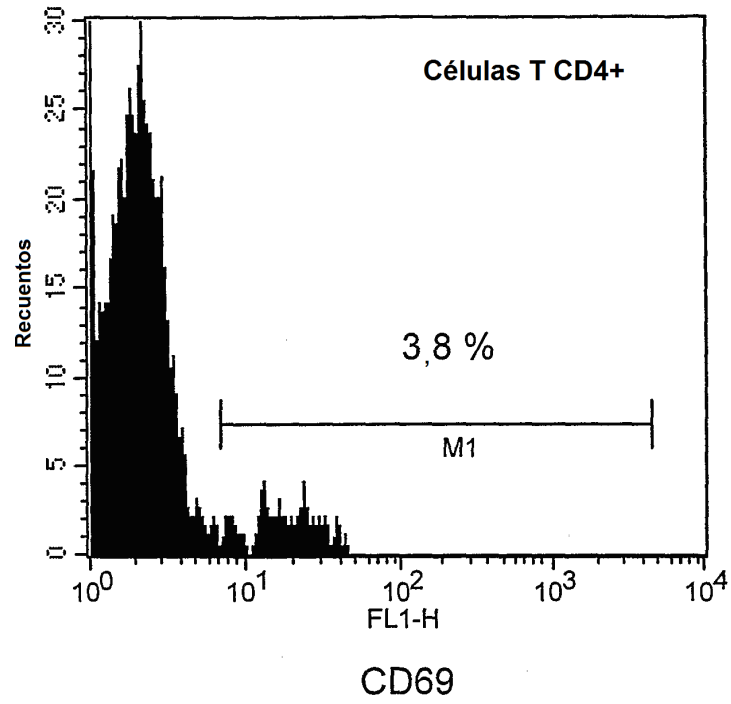


Fig. 1

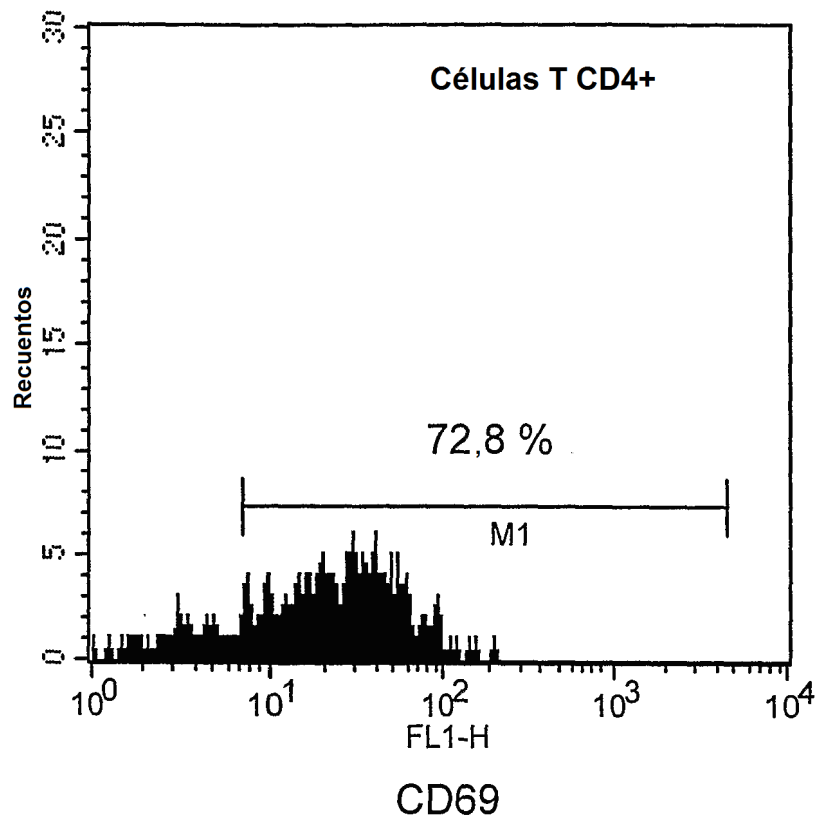


Fig. 2

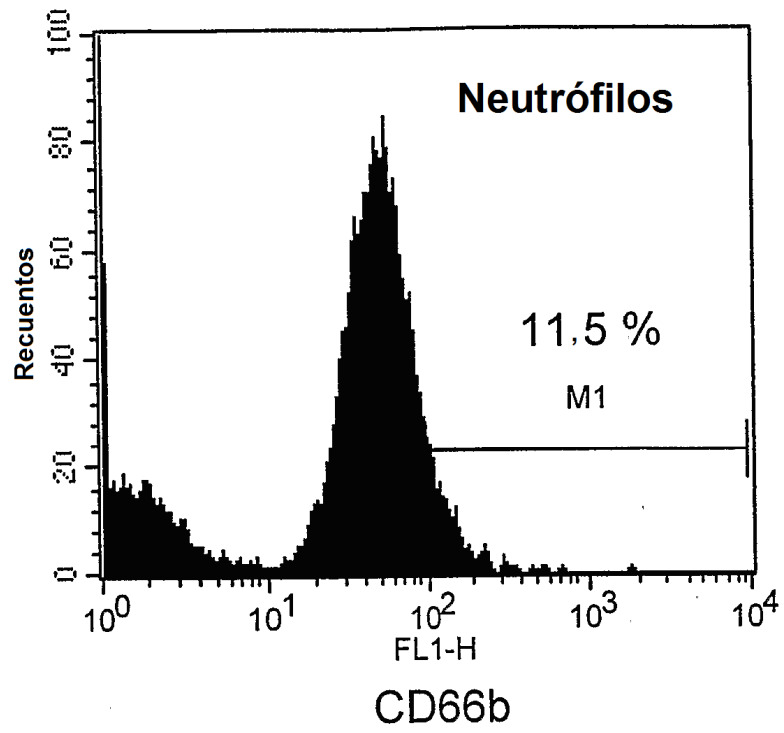


Fig. 3

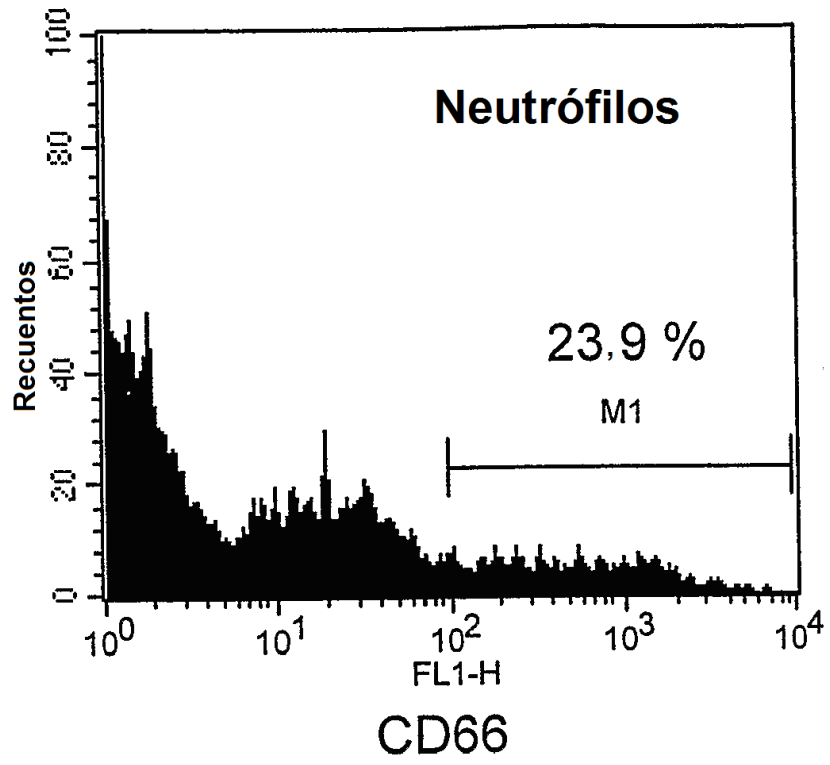


Fig. 4

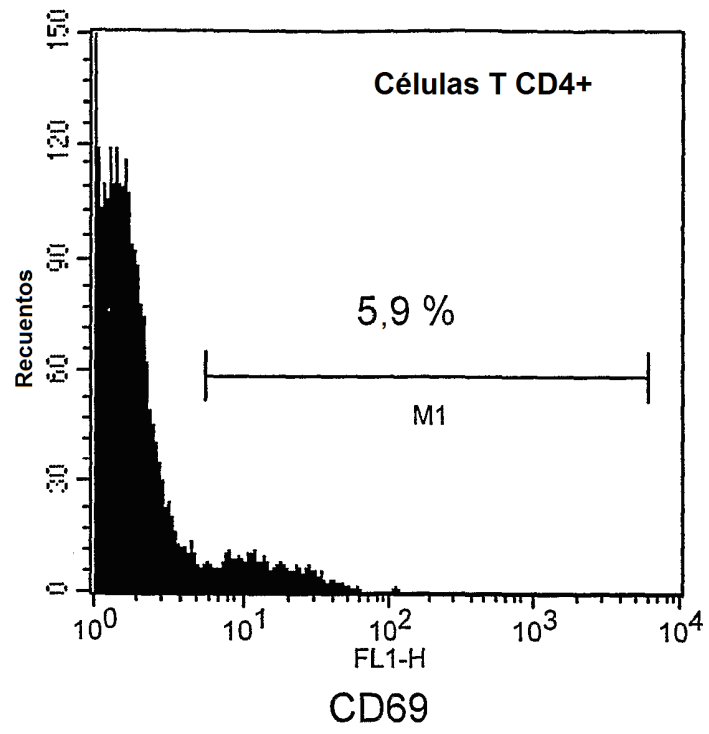


Fig. 5

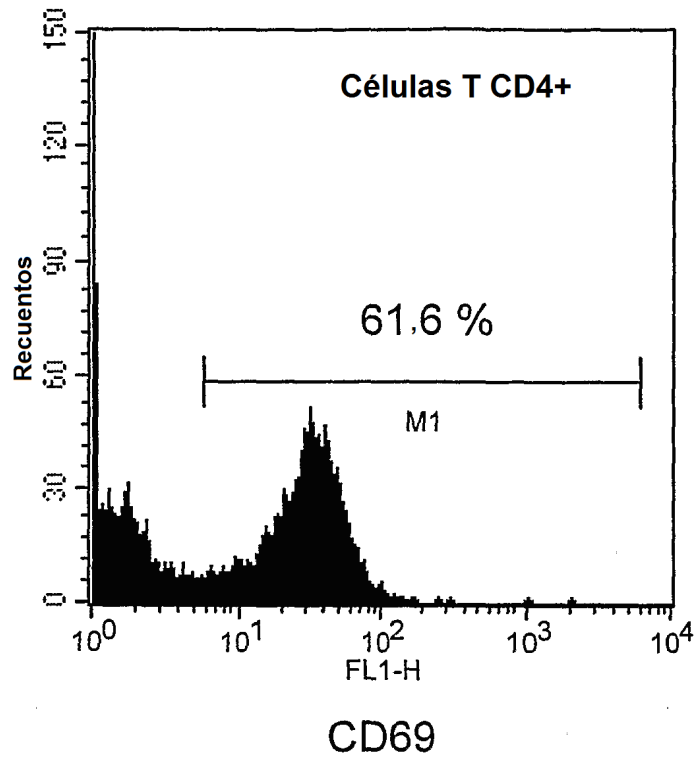


Fig. 6

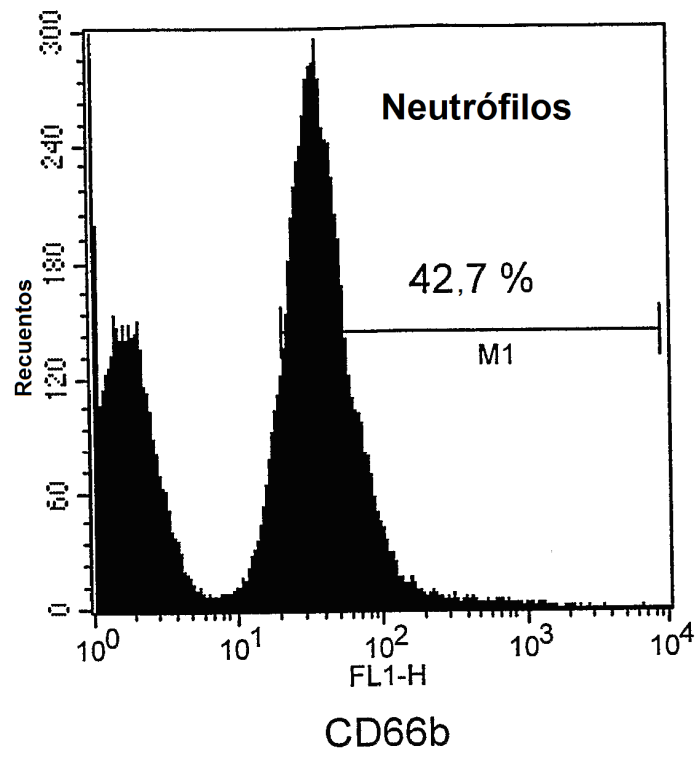


Fig. 7

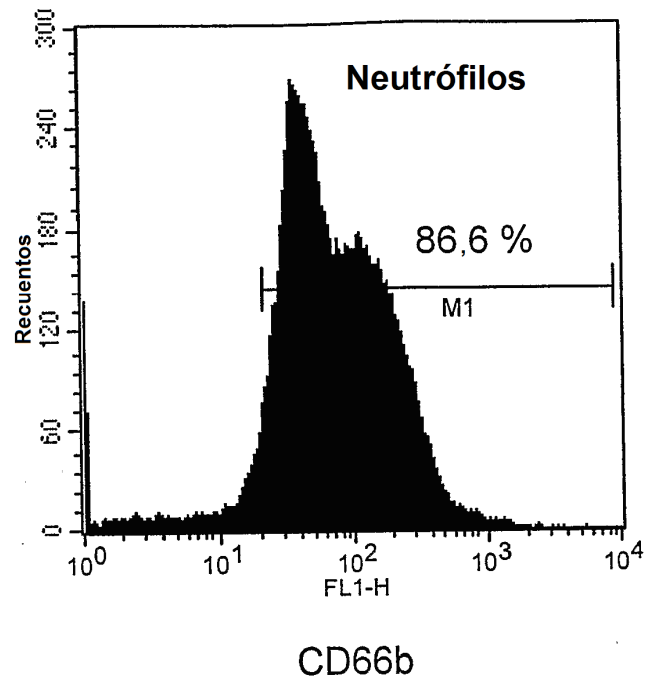


Fig. 8

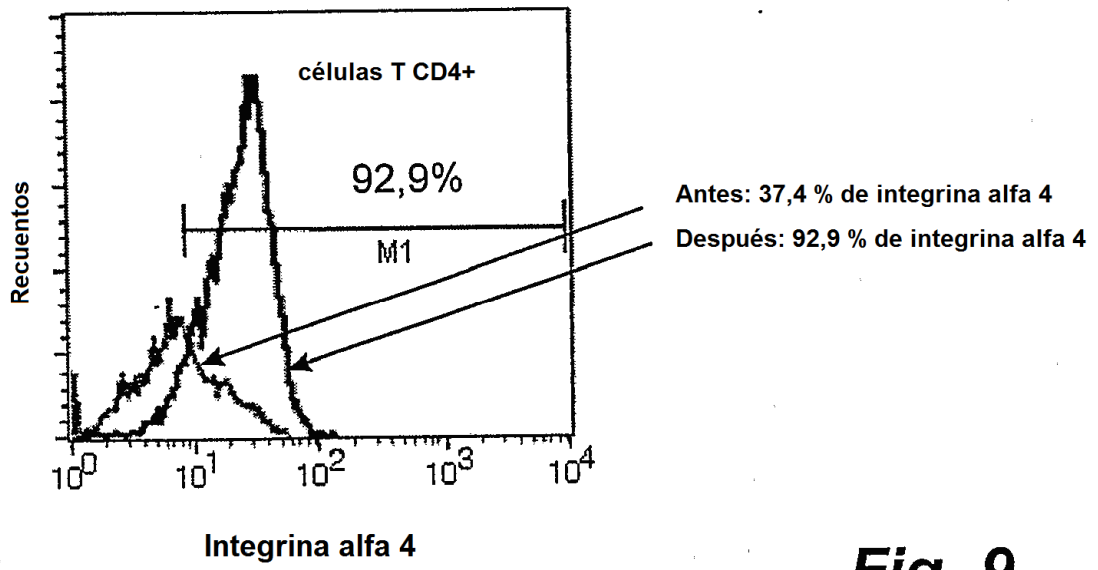


Fig. 9

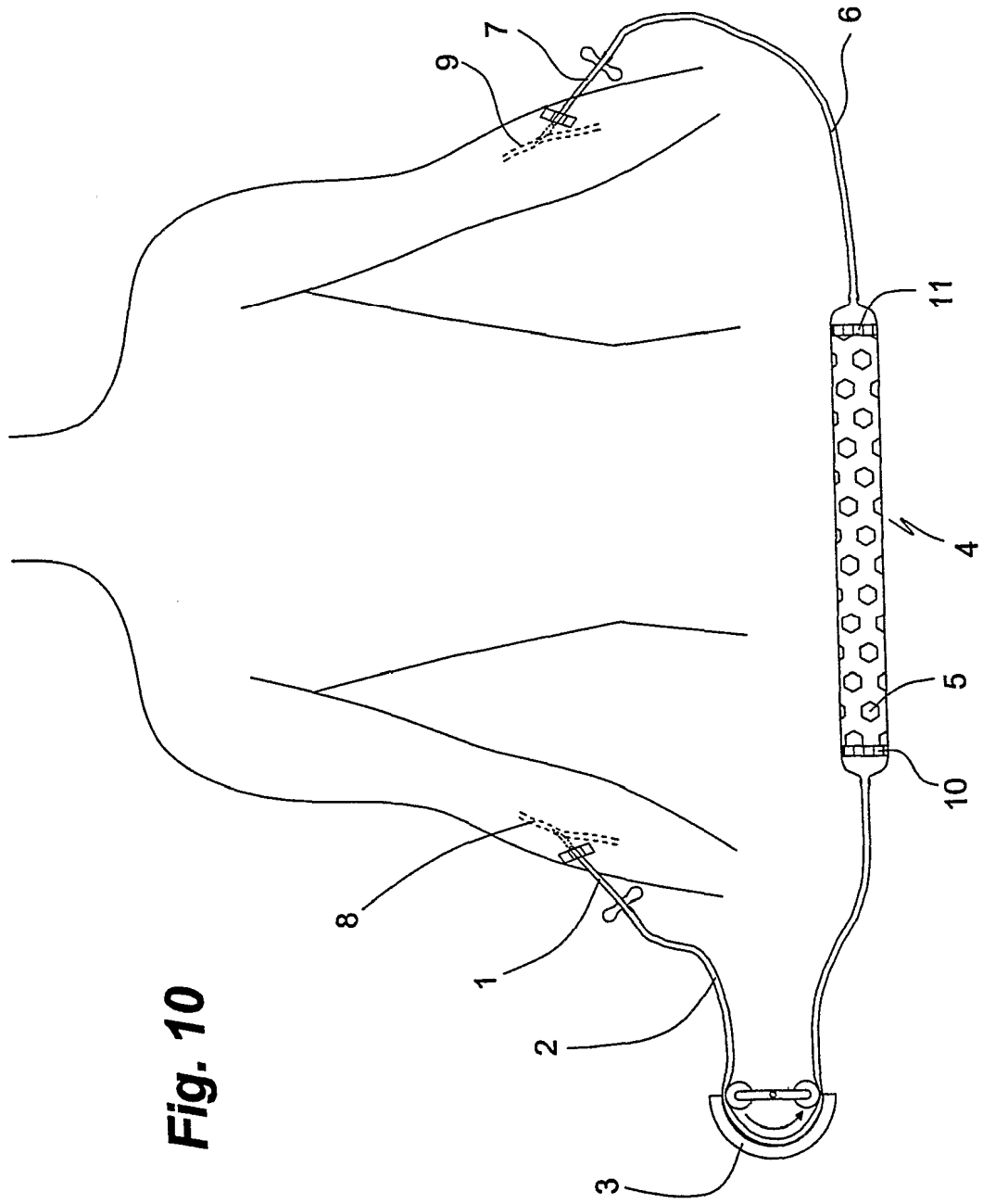


Fig. 10