

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 593**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
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/GB2012/051357**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO2012172347**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12727680 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2718723**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino y síndrome del intestino irritable**

30 Prioridad:

13.06.2011 US 201161496442 P

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

24.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WINQVIST, OLA y
COTTON, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 613 593 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

Diagnóstico y tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino y síndrome del intestino irritable

5 **Campo de la invención**

Las diversas realizaciones de la presente invención se refieren a productos y métodos para el tratamiento de afecciones inflamatorias, tales como enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). También se describen diagnósticos complementarios.

10

Antecedentes de la invención

La colitis ulcerosa fulminante es un empeoramiento de la colitis ulcerosa caracterizado por un alto recuento de glóbulos blancos y dolor abdominal grave. En la actualidad, los pacientes con colitis ulcerosa fulminante se tratan con altas dosis de esteroides. En estudios de fase III se ha investigado el tratamiento con anti TNF α . Ambos fármacos son inhibidores generales de la inflamación. Son eficaces en aproximadamente el 50 % de los casos pero tienen efectos adversos graves. Incluso si se trata con éxito la colitis ulcerosa fulminante tiene una tendencia a reaparecer.

15

20

En pacientes con colitis ulcerosa fulminante que no responden al tratamiento médico es obligatoria la intervención quirúrgica inmediata. La colitis ulcerosa siempre está restringida al intestino grueso (colon). Como una última medida el colon se reseca, y se construye un ileostoma externo. Después de un periodo de recuperación de al menos 6 meses y en ocasiones de tratamiento médico adicional de inflamación del muñón rectal se realizará anastomosis ileorrectal o cirugía reconstructiva con una bolsa pélvica en la mayoría de los pacientes para restaurar la continuidad intestinal. Ambos procedimientos implican heces sueltas aproximadamente seis veces al día y perturbaciones en los equilibrios de agua y minerales. También puede haber episodios fulminantes en enfermedad de Crohn (colitis de Crohn fulminante), que también son afecciones graves que necesitan intervención médica y/o quirúrgica inmediata.

25

30

Aunque la inflamación puede localizarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal en pacientes con enfermedad de Crohn, habitualmente se restringe a la parte más distante del intestino delgado y la primera parte del intestino grueso (región ileocecal). El tratamiento médico no puede curar la enfermedad aunque fármacos antiinflamatorios tales como esteroides y azatioprina alivian los síntomas. La cirugía con resección de segmentos intestinales estenóticos y con fistula está indicada en aproximadamente el 50 % de los pacientes; la mitad de ellos tendrán reparaciones y necesitarán cirugía adicional. Un método que puede desactivar específicamente la inflamación en EII y evitar la reaparición de enfermedad en el paciente individual es por lo tanto altamente necesario.

35

40

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

45

El documento WO2008/142405 desvela un método para predecir la respuesta de un paciente al tratamiento con un anticuerpo anti TNF alfa.

50

Autschbach *et al.*, Cellular Immunology (2005), vol. 236, páginas 110-114 se refiere a la expresión de receptores de quimiocinas en intestino normal e inflamado, amígdala e hígado mediante análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos monoclonales.

55

Walters *et al.*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2010), vol. 335, páginas 61-69 se refiere a la caracterización de CCX282-B, un antagonista biodisponible oralmente del receptor de quimiocina CCR9, para el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino.

60

Las quimiocinas son una clase de moléculas de citocinas implicadas en el reclutamiento y la activación celulares en inflamación. Las quimiocinas provocan quimiotaxis y activación de diversas poblaciones de células en el sistema inmunitario. La actividad de las quimiocinas está mediada principalmente a través de la unión estrecha con sus receptores en la superficie de leucocitos. En ciertas realizaciones la presente invención se basa en la comprensión de que la interacción entre quimiocinas (específicas) y células (específicas) que expresan sus receptores puede aprovecharse para el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Los inventores han determinado que la dirección a reclutamiento aumentado de células que expresan receptores de quimiocinas específicos al sitio de inflamación presenta un nuevo enfoque terapéutico para tratar dichas afecciones. Además, en dichas afecciones, puede aumentarse la expresión de receptores de quimiocinas en cada célula proporcionando de nuevo un enfoque terapéutico para tratar dichas afecciones.

65

Los inventores también han determinado que la frecuencia de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en circulación fue significativamente mayor en pacientes con EII con enfermedad de moderada a grave en comparación con controles sanos. Además, la presencia de estos monocitos se correlacionó significativamente con la actividad de enfermedad en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Esto proporciona una diana adicional para el tratamiento de EII que puede utilizarse en combinación con dirección a células que expresan receptores de quimiocinas. Esta población de monocitos expresa altos niveles de CCR7 y CCR9.

La invención se define en las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para diagnosticar, supervisar la progresión o supervisar el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino que comprende determinar los niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida de un sujeto, en el que:

(i) niveles aumentados de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en comparación con:

- (a) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
- (b) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
- (c) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de los niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de pacientes enfermos y comparando con niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de sujetos sanos;

indican la presencia de enfermedad inflamatoria del intestino;

(ii) niveles aumentados de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en comparación con:

- (a) una muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior; o
- (b) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
- (c) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
- (d) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de pacientes enfermos y comparando con niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de sujetos sanos;

indican la progresión de enfermedad inflamatoria del intestino; o

(iii) niveles disminuidos de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} se correlacionan con tratamiento exitoso.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar un tratamiento adecuado para enfermedad inflamatoria del intestino que comprende determinar los niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida de un sujeto, en el que altos niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} o niveles aumentados de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en comparación con el control, dan como resultado la selección de tratamiento con corticosteroides o una terapia de reducción de monocitos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente con el marcador CD14 de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} para uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, en el que el anticuerpo se inmoviliza en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo monocitos CD14+HLA-DR^{hi} de la sangre periférica del paciente o sujeto.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para diagnosticar, supervisar la progresión de o supervisar el tratamiento del síndrome del intestino irritable que comprende determinar:

- a) los niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan CCR9; y/o
- b) los niveles de células con alta expresión de CCR9 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que:

(i) altos niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles aumentados de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 en comparación con:

- (a) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
- (b) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o

(c) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de los niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenido de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de sujetos sanos;

indican la presencia de síndrome del intestino irritable;

(ii) altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 en comparación con:

- 5 (a) una muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior; o
 (b) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
 (c) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
 10 (d) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos a partir de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de sujetos sanos;

indican la progresión del síndrome de intestino irritable; o

- 15 (iii) niveles disminuidos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 se correlacionan con tratamiento exitoso.

En ciertas realizaciones la invención sirve para reducir el reclutamiento de leucocitos inflamatorios, que expresan receptores característicos, incluyendo receptores de quimiocinas, y posiblemente expresar receptores característicos, en particular receptores de quimiocinas a niveles aumentados, a sitios de inflamación ligados a trastornos tales como enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Esto se consigue usando reactivos de unión específicos para capturar leucocitos inflamatorios que expresan receptores específicos del paciente. En consecuencia, en ciertas realizaciones la invención proporciona en un primer aspecto un anticuerpo capaz de unirse específicamente con el marcador CD14 de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} para uso en un método para tratar enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) que comprende aplicar sangre periférica de un paciente a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende el anticuerpo, y opcionalmente uno o más reactivos de unión adicionales capaces de unirse específicamente con un marcador de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} seleccionados de CCR7 y CCR9, inmovilizados directa o indirectamente en el soporte retirando de este modo monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} de la sangre periférica del paciente. Se contemplan específicamente combinaciones de reactivos de unión que se dirigen a al menos dos y posiblemente tres de estos marcadores. La sangre periférica de la que se han retirando células que expresan receptores de quimiocinas puede después devolverse al paciente para completar el tratamiento. El tratamiento puede por lo tanto basarse en un circuito extracorpóreo continuo en algunas realizaciones. Como alternativa, el tratamiento puede comprender etapas de obtener sangre periférica del paciente, aplicar la sangre periférica a la columna y posteriormente devolver la sangre periférica de la que se han retirado las células que expresan receptor de quimiocinas al paciente.

Como se muestra en el presente documento, pueden inmovilizarse reactivos de unión adecuados en un soporte sólido, bien directa o bien indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células que expresan receptores relevantes. Cuando se observan niveles aumentados de expresión del receptor, dichas células pueden preferentemente retirarse de la sangre periférica usando las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, los métodos de diversas realizaciones de la invención preferentemente se dirigen a células CD14⁺HLA-DR^{hi} como se define en el presente documento para retirada de la sangre periférica. La expresión "alta" puede determinarse de acuerdo con técnicas de citometría de flujo convencionales, como se analiza en más detalle en el presente documento. Un ejemplo se muestra en la Figura 1 y la Figura 16 del presente documento de una estrategia de activación. HLA-DR es un receptor de superficie celular del MHC de clase II codificado por el complejo de antígenos de leucocitos humanos en el cromosoma 6, región 6p21.31.

Los inventores también han descubierto sorprendentemente que los pacientes con Síndrome del Intestino Irritable (SII), o sujeto que padece SII, presentan una frecuencia (o un nivel) aumentado de células que expresan receptores de quimiocinas, en particular monocitos, más específicamente monocitos que expresan CCR9. Por lo tanto, los pacientes con SII pueden presentar inflamación que es comparable a la mostrada por pacientes que padecen EII (los niveles de expresión de CCR9 pueden ser similares a los hallados en CU y EC como se analiza en el presente documento). El síndrome del intestino irritable (SII) es una afección caracterizada por dolor abdominal crónico, incomodidad, hinchazón y alteración de los hábitos intestinales. Se diagnostica en la actualidad basándose solamente en los síntomas. En consecuencia, la identificación de un componente proinflamatorio proporciona nuevas vías de tratamiento y diagnóstico para esta afección debilitante. En particular, se muestra en el presente documento que las células que expresan CCR9 aumentadas en pacientes con SII pueden agotarse usando un enfoque de leucoféresis y/o una terapia de reducción de monocitos. Esto puede basarse en el uso de un reactivo de unión adecuado tal como una quimiocina CCL25, como se describe en más detalle en el presente documento.

Por lo tanto, se describen en el presente documento medios para reducir el reclutamiento de leucocitos inflamatorios, que expresan receptores característicos, incluyendo receptores de quimiocinas, y posiblemente expresar receptores característicos, en particular receptores de quimiocinas a niveles aumentados, a sitios de inflamación ligados a SII. Esto se consigue usando reactivos de unión específicos para capturar leucocitos inflamatorios que expresan receptor específico del paciente. En consecuencia, se describe en el presente

documento un método para tratar el SII que comprende aplicar sangre periférica de un paciente a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con células que expresan receptores de quimiocinas, en particular células que expresan CCR9 inmovilizadas directa o indirectamente en el soporte retirando de este modo las células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica del paciente. La sangre periférica de la que se han retirado las células que expresan receptores de quimiocinas puede devolverse al paciente para completar el tratamiento. En ciertas realizaciones la invención puede por lo tanto basarse en un circuito extracorpóreo continuo en algunas realizaciones. Como alternativa, en ciertas realizaciones la invención puede comprender etapas para obtener sangre periférica del paciente, aplicar la sangre periférica a la columna y posteriormente devolver la sangre periférica de la que se han retirado las células que expresan receptores de quimiocinas al paciente.

Como se muestra en el presente documento, pueden inmovilizarse reactivos de unión adecuados en un soporte sólido, bien directa o bien indirectamente, para generar una columna de aféresis adecuada para capturar células que expresan receptores relevantes. Cuando se observan niveles aumentados de expresión de receptores, dichas células pueden retirarse preferentemente de la sangre periférica usando las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, los métodos de diversas realizaciones de la invención preferentemente se dirigen a células que expresan "CCR9hi" como se define en el presente documento para retirada de la sangre periférica. La expresión "alta" puede determinarse de acuerdo con técnicas de citometría de flujo convencionales, como se analiza en más detalle en el presente documento. Se muestra un ejemplo en la Figura 1 y la Figura 16 del presente documento de una estrategia de activación.

También se describe en el presente documento el uso de uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con un marcador de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} seleccionado de CD14, CCR7 y CCR9 para uso en la fabricación de una columna de aféresis para el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), en el que el o los reactivos de unión se inmovilizan en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} de la sangre periférica del paciente.

Se describen en el presente documento uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con células que expresan receptores de quimiocinas, en particular monocitos, más específicamente células/monocitos que expresan CCR9 para uso en el tratamiento de SII, en el que el reactivo de unión se inmoviliza, directa o indirectamente, en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas, en particular monocitos, más específicamente células/monocitos que expresan CCR9 de la sangre periférica del paciente. También se describe en el presente documento el uso de uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con células que expresan receptores de quimiocinas, en particular monocitos, más específicamente células/monocitos que expresan CCR9 para uso en la fabricación de una columna de aféresis para el tratamiento de SII, en el que el o los reactivos de unión se inmovilizan en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas, en particular monocitos, más específicamente células/monocitos que expresan CCR9 de la sangre periférica del paciente.

Todos los ejemplos descritos con respecto a los métodos de tratamiento se aplican a estos aspectos cambiando lo que de deba cambiarse y no se repiten por razones de precisión. Por lo tanto, el siguiente análisis realizado con referencia a los métodos de tratamiento también es aplicable a los aspectos de uso médico de las diversas realizaciones de la invención.

En ciertas realizaciones la invención se dirige al tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Por tratamiento se entiende una reducción de las células que expresan receptores específicos, incluyendo receptores de quimiocinas, en la sangre periférica del paciente. La reducción puede comprender una reducción de células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, a niveles aumentados en pacientes enfermos. El paciente es normalmente un paciente humano pero el término paciente puede incluir sujetos animales tanto humanos como no humanos en algunas realizaciones. En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, esto implica normalmente una reducción de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, tales como células que expresan CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}, en la sangre periférica del paciente. Las células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 comprenden, consisten esencialmente en o consisten en monocitos, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi}, en ciertas realizaciones. Este tipo celular puede caracterizarse de acuerdo con las técnicas desveladas en el presente documento (por ejemplo usando citometría de flujo).

También se describen medios dirigidos al tratamiento de SII. Por tratamiento se entiende una reducción de las células que expresan receptores específicos, incluyendo receptores de quimiocinas, en la sangre periférica del paciente. La reducción puede comprender una reducción de células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular CCR9, a niveles aumentados en pacientes enfermos. El paciente es normalmente un paciente humano, pero el término paciente puede incluir sujetos animales tanto humanos como no humanos en algunas realizaciones. En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, esto implica

normalmente una reducción en células de las células que expresan CCR9, células que expresan CCR9^{hi}, en la sangre periférica del paciente. Las células que expresan CCR9 comprenden, consisten esencialmente en o consisten en monocitos, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi}, en ciertas realizaciones. Este tipo celular puede caracterizarse de acuerdo con las técnicas desveladas en el presente documento (por ejemplo usando citometría de flujo).

Se producen monocitos por la médula ósea a partir de precursores de células madre hematopoyéticas denominados monoblastos. Los monocitos pueden diferenciarse en macrófagos o células dendríticas. Los monocitos y su descendencia de macrófagos y células dendríticas cumplen varias funciones en el sistema inmunitario incluyendo fagocitosis, presentación de antígenos y producción de citocinas. Los monocitos pueden caracterizarse con referencia a la expresión del marcador de superficie celular CD14, opcionalmente junto con CD16. Los monocitos clásicos pueden caracterizarse por alto nivel de expresión del receptor de superficie celular CD14 (monocito CD14⁺⁺CD16⁻). Los monocitos no clásicos pueden caracterizarse por bajo nivel de expresión de CD14 y con coexpresión adicional del receptor de CD16 (monocito CD14⁺CD16⁺⁺). Los monocitos intermedios pueden caracterizarse por alto nivel de expresión de CD14 y bajo nivel de expresión de CD16 (monocitos CD14⁺⁺CD16⁺). Los macrófagos derivan de monocitos y son responsables de la protección de tejidos de sustancias ajenas. Son células que poseen un núcleo grande y liso, una gran área de citoplasma y vesículas internas para procesamiento de material ajeno. El término "macrófago" puede referirse a una célula derivada de monocito que expresa uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular CD14, CD11b, Lisozima M, MAC-1/MAC-3 y CD68. El término macrófago incluye macrófagos tanto activados como inactivados. Los macrófagos activados pueden caracterizarse por la expresión de CD69, ENG, FCER2 e IL2RA, HLA-DR, CD86. Los macrófagos inactivados aún no han recibido señales activadoras mediante por ejemplo receptores TLR y por lo tanto expresan menos marcadores de activación en la superficie celular lo que se correlaciona con menor maduración. Los macrófagos M1 pueden caracterizarse por expresión de uno o más de CD16⁺CD32⁺CD64⁺ y secretan principalmente IL-23 e IL-1, TNF, IL-6 y altos niveles de IL-12 y además moléculas efectoras tales como iNOS y ROI. Los macrófagos M1 tienen características citotóxicas a diferencia de macrófagos M2. Los macrófagos M2 pueden caracterizarse por expresión de uno o más de SRA/B⁺CD163⁺MR⁺CD14⁺ y expresan TGFβ, IL-10 e IL-1 Ra. Los macrófagos asociados a tumores (TAM) comparten muchas características con los macrófagos M2 y se consideran macrófagos M2 polarizados. El paradigma M1/M2 también puede encontrarse en subconjuntos de monocitos en los que los monocitos CD14⁺CD16⁻CXC3R1^{bajo} se consideran el subconjunto "inflamatorio" y los CD14^{bajo}CD16⁺CXC3R1^{alto} son monocitos "residentes".

CCR9 y/o CCR7 expresados en estas células anteriormente mencionadas se unen con quimiocinas tales como CCL25, CCL21 y CCL19. CCR9 es el símbolo genético aprobado por el Comité de Nomenclatura de Genes HUGO para receptor de quimiocina (motivo C-C) 9. El ID de HGNC para este gen es 1610. El gen se localiza en la posición cromosómica 3p22. El símbolo y nombre previos para el gen es GPR28. Los sinónimos para este gen incluyen CDw199, GPR-9-6. La secuencia de referencia de Genbank para CCR9 es AJ132337.1 como está disponible el 13 de junio de 2011.

CCR7 es el símbolo genético aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica HUGO para receptor de quimiocinas (motivo C-C) 7. El ID de HGNC para este gen es 1608. El gen se localiza en la posición cromosómica 17q12-q21.2. El símbolo y nombre previos para el gen es CMKBR7, EBI1. Los sinónimos para este gen incluyen BLR2, CD197 y CDw197. La secuencia de referencia RefSeq para CCR1 es NM_001838.3 como está disponible el 13 de junio de 2011.

CD14 es el símbolo genético aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica HUGO para la molécula CD14. El ID de HGNC para este gen es 1628. El gen está localizado en la posición cromosómica 5q22-q32. El símbolo y nombre previo para el gen es "antígeno CD14". La secuencia de referencia RefSeq para CD14 es NM_000591.3 como está disponible el 13 de junio de 2011.

Las diversas realizaciones de los métodos de la invención pueden implicar interacciones de unión específicas con cualquiera de estos marcadores de superficie celular adicionales además de la retirada basada en la unión con CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7. Pueden prepararse reactivos de unión adecuados para unirse específicamente con estos marcadores de superficie celular. El análisis de reactivos de unión específicos de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 se aplica por lo tanto cambiando lo que deba cambiarse.

El tratamiento de EII de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención puede dar como resultado el alivio o la mejora de síntomas, prevención de la progresión, regresión de la afección o la recuperación completa. Los parámetros medibles de tratamiento exitoso incluyen uno o más, hasta todos, de puntuación de Mayo mejorada o UCDAI (para CU) o mejora en el índice de CDAI (EC). En realizaciones específicas, un único tratamiento es suficiente para provocar un agotamiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o más hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de células que expresan un receptor específico, incluyendo el receptor de quimiocinas, en particular CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse con referencia a agotamiento de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi}. El tratamiento puede conducir a agotamiento de entre aproximadamente 100

y 500 millones de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi}, en ciertas realizaciones y más particularmente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 millones de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7.

5 El tratamiento de SII tal como se describe en el presente documento puede dar como resultado alivio o mejora de síntomas, prevención de la progresión, regresión de la afección o recuperación completa. En realizaciones específicas, un único tratamiento es suficiente para provocar un agotamiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o mayor hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores entre e
10 incluyendo estas cantidades, de células que expresan un receptor específico, incluyendo receptor de quimiocinas, en particular CCR9, en particular monocitos que expresan CCR9 de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse en referencia al agotamiento de células que expresan CCR9, en particular monocitos que expresan CCR9, tales como monocitos CD14+HLA-DR^{hi}. El tratamiento puede conducir al agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan CCR9, en particular monocitos
15 que expresan CCR9, tales como monocitos CD14+HLA-DR^{hi}, en ciertas realizaciones y más particularmente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 millones de células que expresan CCR9.

20 Uniéndose con la columna mediante la interacción de reactivo de unión-receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, se inmovilizan células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas. Estas células inmovilizadas expresan receptores de quimiocinas desocupados adicionales, que pueden ser del mismo tipo o de un tipo diferente a los usados para captura. Estos receptores de quimiocinas adicionales pueden permitir que las quimiocinas en circulación que contribuyen a la afección inflamatoria se capturen de la sangre periférica. Por lo tanto, una reducción en los niveles de quimiocinas en circulación (específicas) puede proporcionar una medida del tratamiento exitoso.

25 La duración del tratamiento puede determinarse fácilmente por un experto en la materia y dependerá de factores tales como el caudal de la sangre periférica. La duración del tratamiento puede estar ligada a la supervisión del tratamiento en sí mismo, con el tratamiento considerado completo una vez que un parámetro medible del tratamiento ha alcanzado un umbral definido. Puede emplearse cualquier parámetro adecuado como se analiza en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, el tratamiento puede considerarse completo cuando se ha conseguido una
30 reducción de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 para EII, o células que expresan CCR9 para SII tal como una reducción del 50 % en células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 para EII o células que expresan CCR9 para SII, en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi}. El sistema de aféresis puede operarse a un caudal de aproximadamente 10-80 ml/min, o más específicamente entre aproximadamente 20 y 70 ml/min, o entre
35 aproximadamente 30 y 60 ml/min. En realizaciones específicas, el tratamiento se realiza durante un periodo de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, etc., o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, minutos. El tratamiento no se dirige normalmente a retirar todas las células que expresan el receptor, incluyendo el receptor de quimiocinas, en la sangre periférica, ya que se requiere un nivel basal de esas células, en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en sujetos sanos. Sin embargo, se ha descubierto
40 que solamente es necesario aplicar volúmenes sanguíneos bajos a las columnas de las diversas realizaciones de la invención para conseguir niveles eficaces de agotamiento de las células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas.

45 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, aproximadamente 10-80 % o más específicamente aproximadamente 20, 30, 40 o 50 %, o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de la sangre del paciente se aplica a la columna en un único tratamiento. El volumen de sangre que circula a través de la columna o sistema de aféresis puede estar en la región de aproximadamente 1000-3000 ml, tal como aproximadamente 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 o 2000 ml o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades. El tratamiento puede considerarse completo una vez que se ha circulado este volumen de sangre. Pueden administrarse al paciente
50 anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Puede usarse una solución adecuada, tal como una solución salina estéril, opcionalmente incluyendo un anticoagulante tal como heparina, para sensibilizar el sistema de aféresis (extracorpóreo). Puede añadirse un volumen adicional de anticoagulante al circuito al inicio de cada sesión de tratamiento, por ejemplo como una inyección de embolada.

55 En ciertas realizaciones la invención se basa en uno o más reactivos de unión que son capaces de unirse específicamente con un receptor, incluyendo receptor de quimiocinas. Esta reacción de unión específica permite que las células que expresan el receptor, incluyendo el receptor de quimiocinas, se retiren de la sangre periférica del paciente cuando la sangre se pasa sobre el soporte sólido sobre o dentro del cual se inmoviliza el reactivo de unión. Los receptores específicos, incluyendo receptores de quimiocinas de interés, incluyen CD14, HLA-DR, CCR9 y/o
60 CCR7, particularmente CD14, CCR9 y CCR7 y específicamente CCR9 en el caso de SII. El reactivo de unión puede ser cualquier reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor en cuestión. Por "unión específica" se entiende que el reactivo de unión presenta suficiente especificidad de unión y afinidad/cinética de unión apropiadas para permitir la retirada de células que expresan uno o más de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, y específicamente CCR9 en el caso de SII en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi} de la sangre periférica. Aunque no
65 se excluye que el reactivo de unión sea capaz de unirse con otras moléculas, tales como otro receptor, incluyendo receptores de quimiocinas, el reactivo de unión preferentemente se unirá con células que expresen uno o más de

CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y específicamente CCR9 en el caso de SII y en particular con células que expresan niveles aumentados de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y específicamente CCR9 en el caso de SII (como se define adicionalmente en el presente documento), en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi}.

5 Se prevé específicamente que puedan emplearse combinaciones de reactivos de unión para agotar niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 de sangre periférica. En particular, pueden emplearse reactivos de unión capaces de unirse específicamente CD14 junto con uno o ambos de CCR7 y CCR9. De forma similar, en algunas realizaciones, pueden utilizarse reactivos de unión capaces de unirse específicamente con CCR7 y CCR9 respectivamente.

10 El reactivo de unión capaz de unirse específicamente con CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y específicamente CCR9 en el caso de SII puede ser un agonista o un antagonista de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, respectivamente. Como la condición de enfermedad se basa en la desregulación de la expresión de o señalización mediante CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en ciertas realizaciones el reactivo de unión capaz de unirse específicamente con CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 es un antagonista de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, respectivamente. En el caso de SII, la condición de enfermedad se basa en la regulación positiva de la expresión de o señalización mediante CCR9 y por lo tanto, en ciertas realizaciones, el reactivo de unión capaz de unirse específicamente con CCR9 es un antagonista de CCR9. Las quimiocinas son normalmente, aunque no es necesario que sean exclusivamente (particularmente en el caso de formas truncadas o modificadas) agonistas de su receptor afín y actúan para activar las células que expresan el receptor relevante, como apreciaría un experto en la materia. Se considera en general que los anticuerpos contra el receptor de quimiocinas relevante son antagonistas, como apreciaría un experto en la materia. Los ejemplos específicos de reactivos de unión incluyen proteínas o polipéptidos, tales como anticuerpos y ligandos de receptores, en particular quimiocinas. El reactivo de unión puede ser una molécula de ácido nucleico en ciertas realizaciones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un aptámero. Los aptámeros de ácido nucleico son polinucleótidos de aproximadamente 15-40 nucleótidos de longitud. Pueden prepararse aptámeros de ácido nucleico usando el proceso de SELEX (evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial) o cualquier otro proceso conocido por los expertos en la materia.

30 En otras realizaciones, el reactivo de unión puede ser un péptido, y en ciertos casos, un aptámero peptídico. Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento artificiales que consisten en una secuencia peptídica variable insertada en una proteína de armazón constante (Baines IC, Colas P. Peptide aptamers as guides for small molecule drug discovery. Drug Discov Today. 2006; 11: 334-341). Están disponibles varias metodologías, tales como presentación en fagos, presentación en ribosomas y sistemas de exploración de dos híbridos de levadura para explorar una biblioteca de agentes de unión basados en péptidos potenciales. De forma similar pueden usarse armazones proteicos basados en dominios tales como fibronectinas, repeticiones de anquirina, proteína A, dominios SH3, lipocalinas y ubiquitina como el agente de unión. De nuevo están disponibles varias tecnologías tales como presentación en fagos y presentación en ribosomas para explorar una biblioteca de agentes de unión basados en proteínas. De forma similar, pueden explorarse bibliotecas de compuestos químicos candidatos para unión específica con el receptor relevante, incluyendo receptor de quimiocinas, usando técnicas de exploración adecuadas conocidas en este campo, que pueden ser exploraciones de alto rendimiento en ciertas realizaciones. El agente de unión candidato puede inmovilizarse en un soporte sólido y se determina la capacidad del agente para conservar específicamente células que expresan el receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, de interés o receptor marcado, incluyendo receptor de quimiocinas. Puede aplicarse una serie de tipos celulares a los soportes sólidos para confirmar la especificidad de unión, o como alternativa puede aplicarse una muestra mezclada (tal como sangre periférica) al soporte sólido. La conservación del tipo celular de interés (que expresa el receptor apropiado, incluyendo el receptor de quimiocinas) puede confirmarse para identificar agentes de unión adecuados.

50 CD14 se une con lipopolisacárido (LPS) y otras moléculas asociadas a patógenos. Esta unión requiere la presencia adicional de proteína de unión a lipopolisacárido (LBP). Por lo tanto, los reactivos de unión adecuados para unirse específicamente con células que expresan CD14 pueden basarse en CD14 como se asocia con LBP. Por ejemplo, la combinación puede utilizarse como un inmunógeno para inducir reactivos de unión basados en anticuerpos adecuados, como se analiza en más detalle en el presente documento. Sin embargo, en otras realizaciones, se producen anticuerpos que se unen solamente con CD14. Estos anticuerpos deberían ser capaces preferentemente de competir eficazmente con LBP por la unión con células que expresan CD14. Los reactivos de unión adecuados pueden basarse, en ciertas realizaciones, en LPS como una molécula con la que se sabe que se une CD14.

60 En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención, el término quimiocina también comprende quimiocinas biotiniladas o marcadas de otro modo. El término "quimiocina" también comprende versiones modificadas y truncadas de la quimiocina y fragmentos de quimiocina a condición de que la forma modificada o truncada conserve su capacidad para unirse con su receptor afín (y por lo tanto permanece funcional en el contexto de las diversas realizaciones de la invención). No es necesario que la quimiocina conserve actividad biológica ya que lo que se requiere es afinidad de unión específica para CCR9 y/o CCR7. En ciertas realizaciones, la quimiocina carece de actividad biológica, por ejemplo con respecto a activación del receptor (CCR9 y/o CCR7). Pueden realizarse modificaciones para mejorar la síntesis de proteínas, por ejemplo uniformidad de producto y rendimiento. 65 Las modificaciones pueden comprender adiciones, sustituciones, supresiones de aminoácidos u otras modificaciones de uno o más aminoácidos en la quimiocina. Como conocen los expertos en la materia, las

modificaciones a modo de ejemplo pueden comprender sustitución del aminoácido de tipo silvestre con aminoácidos no naturales tales como norleucina (NLeu) y aminoácidos derivatizados tales como ácido piroglutámico (piroGlu). Dichas modificaciones pueden realizarse para minimizar la formación de productos secundarios durante el almacenamiento y uso de las columnas de las diversas realizaciones de la invención. Las modificaciones pueden realizarse para mejorar el marcaje, por ejemplo inclusión de un espaciador de polietilenglicol (PEG) para facilitar la biotilación. La biotilación y/o conjugación con fluorocromos u otros grupos de marcaje de la quimiocina se realiza de una manera que no afecta sustancialmente a la capacidad de unión al receptor. Se prefiere biotilación específica de sitio u otro marcaje ya que el marcaje no selectivo de quimiocinas puede comprender actividad de unión a receptor. La biotilación u otro marcaje se prefiere en general en o hacia el extremo C terminal de la proteína ya que los inventores han descubierto que las modificaciones en este área se toleran en general bien (con respecto a efecto mínimo en la capacidad de unión al receptor). La biotilación puede llevarse a cabo de forma específica de sitio en cualquier aminoácido adecuado. Los ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen lisina, ácido diaminopropiónico y ornitina. En general, puede hacerse 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 supresión de aminoácidos N o C terminales según sea apropiado, o ambos. Normalmente, la versión truncada conservará los restos requeridos para que la quimiocina se pliegue correctamente, por ejemplo para conservar una estructura plegada de quimiocina, coherente con el requisito de que una versión truncada debe conservar la capacidad para unirse con el receptor relevante (expresado por (en la superficie de) un leucocito). Las moléculas de quimiocinas normalmente incluyen enlaces disulfuro entre el primer y tercer y segundo y cuarto 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 (a no ser que se indique de otro modo). Las versiones truncadas pueden comprender cualquier número entre 1 y 100 menos aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 4, 5, etc. aminoácidos, que la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre en ciertas realizaciones. Por supuesto, las versiones truncadas pueden comprender modificación adicional como se detalla en el presente documento. La versión modificada o truncada puede tener 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más identidad de secuencia de aminoácidos general con la quimiocina de tipo silvestre de longitud completa (donde una supresión se cuenta como una diferencia en la secuencia de aminoácidos) en ciertas realizaciones. Sobre la secuencia común entre las moléculas (es decir los aminoácidos que no se han suprimido), puede haber 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos en ciertas realizaciones. La identidad de secuencia puede determinarse usando algoritmos conocidos, tales como análisis de BLAST o GAP (Programa GCG) (aplicando parámetros por defecto), que están libremente disponibles. Las quimiocinas pueden carecer del péptido señal N terminal que se escinde durante la síntesis *in vivo*.

Quimiocinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la presente invención para unión con CCR9 y/o CCR7 incluyen CCL25, CCL19 y CCL21. CCL25, CCL21 y CCL19 son capaces de unirse con receptores de quimiocinas implicados en la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Más específicamente, CCL25, CCL21 y CCL19 son útiles para retirar células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi} de la sangre de un paciente. CCL25, que se une específicamente con CCR9, es relevante para el tratamiento de SII. Las quimiocinas descritas en mayor detalle en el presente documento (con referencia a las figuras y secuencias de aminoácidos relevantes, como se expone en la SEQ ID NO) pueden aplicarse cada una de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención.

Las quimiocinas modificadas y truncadas descritas en más detalle en el presente documento (en referencia a las secuencias de aminoácidos relevantes, como se exponen en las SEQ ID NO y ejemplos experimentales adjuntos) pueden aplicarse cada una de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención. Dichas formas no modificadas pueden instruir al experto en la materia con respecto a formas modificadas adicionales de la misma y otras quimiocinas que pueden ser adecuadas para uso en las diversas realizaciones de la invención. Las quimiocinas muestran homología de secuencia variable que varía de menos de 20 % a más de 90 %, pero todas comparten estructuras terciarias muy similares que consisten en un extremo N terminal desordenado, seguido de un largo bucle (el bucle N) que termina en una hélice 3_{10} , una lámina β de 3 cadenas y una hélice C terminal. La topología general se estabiliza por enlaces disulfuro. Esta estructura terciaria común es una característica común de la familia de proteínas de quimiocinas (Fernandez EJ y Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002, 42, 469-99; Allen SJ *et al*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820).

Los truncamientos dentro de esta región N terminal pueden mantener la unión con el receptor pero pueden conducir a un cambio o una pérdida de función (por ejemplo, Zhang YJ *et al*, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 15918; Gong J-H y Clark-Lewis I., *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 631-640; Fernandez EJ y Lolis E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002, 42, 469-99; Allen SJ *et al*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25, 787-820).

También pueden realizarse truncamientos en el extremo C terminal de la quimiocina y mantener la actividad de unión al receptor (Treating Inflammatory Disorders, Ola Winqvist y Graham Cotton, documento WO2010/029317).

En otras realizaciones, se usan fragmentos y variantes de quimiocinas en los dispositivos y métodos como se

desvela en el presente documento. Más particularmente, dichos fragmentos y variantes conservan la capacidad para unirse específicamente con su receptor de quimiocina afín. Los expertos en la materia saben que las quimiocinas comparten dominios de unión a receptores específicos, incluyendo un plegamiento monomérico similar, caracterizado, por ejemplo, por un dominio amino terminal desordenado, seguido de una región central conservada, que consiste en el llamado "bucle N", tres cadenas β anti paralelas y una hélice α carboxilo terminal. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que la interacción de quimiocina-receptor de quimiocinas es un mecanismo de dos etapas, en el que el núcleo de la quimiocina interacciona en primer lugar con un sitio de unión formado por los dominios extracelulares del receptor, mientras que se forma otra interacción entre el extremo N terminal de la quimiocina y un segundo sitio de unión del receptor para desencadenar la activación del receptor. Por lo tanto, se entiende que un "fragmento", tal como un fragmento funcional de una quimiocina, significa una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que conserva la unión con su receptor afín. El fragmento puede incluir, por ejemplo, la región de pliegue monomérico, o partes de la misma, tales como el dominio amino terminal, la región de núcleo conservada y/o el "bucle N", las cadenas β anti paralelas y/o la hélice α carboxilo terminal o combinaciones y partes de las mismas.

Además, se reconoce que un polipéptido puede mutarse considerablemente sin alterar materialmente una o más de las funciones del polipéptido, por ejemplo, sin alterar la unión específica y/o el plegamiento de la proteína. Se sabe bien que el código genético está degradado, y por lo tanto diferentes codones codifican los mismos aminoácidos. Incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácidos, la mutación puede ser conservativa y no tener ninguna influencia material en las funciones esenciales de una proteína (véase por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* 4^a Ed., W. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1995). Esto incluye, por ejemplo, la capacidad de la proteína para unirse e interactuar con otras proteínas, tales como una quimiocina truncada que se une con su receptor afín.

En algunos ejemplos, parte de una cadena polipeptídica puede suprimirse sin alterar o eliminar todas sus funciones. Por ejemplo, la supresión de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo C y/o N terminal, tales como supresiones de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos en el extremo C y/o N terminal, pueden dar como resultado una quimiocina que conserve la función, tal como unión específica de su receptor afín. Dichos truncamientos pueden conservar la función completa de una proteína completa y/o pueden permitir funciones conservadas tales como interacciones proteína-proteína como en el caso de interacciones ligando-receptor. También pueden usarse en los métodos y dispositivos desvelados en el presente documento quimiocinas que tengan supresiones de un número pequeño de aminoácidos, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 % (tal como menos de aproximadamente 18 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 2 % o menos de aproximadamente 1 %) del número total de aminoácidos en la quimiocina de tipo silvestre. Además, pueden realizarse inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, por ejemplo, añadiendo marcadores epítópicos, sin alterar o eliminar sus funciones (Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. y Wiley-Intersciences, 1998). Otras modificaciones que pueden realizarse sin alterar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones bioquímicas y químicas *in vivo* o *in vitro* o la incorporación de aminoácidos poco habituales. En algunos ejemplos, un fragmento funcional de una quimiocina puede consistir en aproximadamente 10 o más, aproximadamente 25 o más, aproximadamente 50 o más, aproximadamente 75 o más, aproximadamente 100 o más, aproximadamente 125 o más, aproximadamente 150, aproximadamente 175 o más, o aproximadamente más o 200 o más restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de quimiocina.

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

Los péptidos, tales como quimiocinas y fragmentos de las mismas, pueden modificarse por diversas técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad o función, tal como unión con un receptor afín, que los péptidos no modificados, y opcionalmente que tienen otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse grupos de ácido carboxílico de la proteína, bien carboxilo terminales o bien una cadena lateral, en forma de una sal o un catión farmacéuticamente aceptable o esterificarse para formar un éster C1-C16, o convertirse en una amida de fórmula NR1 R2 en la que R1 y R2 son cada uno independientemente H o

alquilo C1-C16, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, bien amino terminales o bien de cadena lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, tales como las sales de HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras orgánicas, o puede modificarse a alquilo C1-C16 o dialquilamino o convertirse adicionalmente a una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales peptídicas pueden convertirse a alcoxi C1-C16 o a un éster C1-C16 usando técnicas bien reconocidas. Pueden sustituirse anillos fenólicos y fenilo de las cadenas laterales peptídicas con uno o más átomos halógenos, 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 peptídicas pueden extenderse a alquilenos C2-C4 homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos de acetamida. Los expertos en la materia también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de la presente divulgación para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que dan como resultado estabilidad potenciada. Por ejemplo, puede añadirse una cisteína C o N terminal al péptido, de modo que cuando se oxide el péptido contendrá un enlace disulfuro, generando un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación de péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres carboxilo y amino terminales.

Realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas también están dentro del alcance de la presente divulgación, por lo que la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos peptidomiméticos y organomiméticos se asemejan a la disposición tridimensional de la cadena principal peptídica y cadenas laterales de aminoácidos componentes, dando como resultado dichos peptidomiméticos y organomiméticos de las proteínas de la presente divulgación. Para aplicaciones de modelación por ordenador, un farmacóforo es una definición tridimensional, idealizada, de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Pueden diseñarse peptidomiméticos y organomiméticos para ajustarse a cada farmacóforo con software de modelación por ordenador actual (usando diseño de fármaco asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman y Groves, eds., 1993, *Pharmaceutical Biotechnology*, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165 174 and *Principles of Pharmacology Munson* (ed.) 1995, C. 102, para descripciones de técnicas usadas en CADD. También se incluyen, dentro del alcance de la divulgación, miméticos preparados usando dichas técnicas.

Los aminoácidos en un péptido, polipéptido o proteína en general están unidos químicamente mediante enlaces amida (CONH). Adicionalmente, los aminoácidos pueden unirse entre sí por otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH = CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH (OH) CH₂- y -CHH₂SO- (estos y otros pueden encontrarse en Spatola, en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (marzo 1983), Vol. 1, n.º 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. Los fragmentos y variantes de las quimiocinas usadas en los dispositivos desvelados y el método como se desvela en el presente documento son fragmentos y variantes que conservan la capacidad de unirse específicamente con su receptor de quimiocinas. Las quimiocinas comparten un pliegue monomérico similar, caracterizado por un dominio amino terminal desordenado, seguido de una región de núcleo conservada, que consiste en el denominado "bucle N", tres cadenas β anti paralelas y una hélice α carboxilo terminal. Aunque sin quedar ligado a la teoría, se cree que la interacción de quimiocina-receptor de quimiocina es un mecanismo de dos etapas, en el que el núcleo de la quimiocina interacciona en primer lugar con un sitio de unión formado por los dominios extracelulares del receptor, mientras que se forma otra interacción entre el término N terminal de quimiocina y un segundo sitio de unión en el receptor para desencadenar activación del receptor. Por lo tanto, se entiende que un "fragmento", tal como un fragmento funcional de una quimiocina significa una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que conserva unión con su receptor afín. El fragmento puede incluir, por ejemplo, la región de pliegue monomérico, o partes de la misma tales como el dominio amino terminal, la región de núcleo conservado y/o el "bucle N", las cadenas β anti paralelas y/o la hélice α carboxilo terminal o combinaciones de los mismos. Además, se reconoce que un polipéptido puede estar considerablemente mutado sin alterar materialmente una o más de las funciones del polipéptido, por ejemplo, sin alterar la unión específica y/o el plegamiento de la proteína. Se sabe bien que el código genético está degradado, y por lo tanto diferentes codones codifican los mismos aminoácidos. Incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácidos, la mutación puede ser conservativa y no tener ninguna influencia material en las funciones esenciales de una proteína (véase por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* 4ª Ed., W. Freeman & Co., Nueva York, NY, 1995). En algunos ejemplos, parte de una cadena polipeptídica puede suprimirse sin alterar o eliminar todas sus funciones, por ejemplo, la supresión de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos en el extremo C y/o N terminal, tales como supresiones de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos en el extremo C y/o N terminal, puede dar como resultado una quimiocina que conserva la función, tal como unión específica de su receptor afín. Dichos truncamientos pueden conservar la función completa de una proteína completa. Las quimiocinas que tienen supresiones de un número pequeño de aminoácidos, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 % (tal como menos de aproximadamente 18 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de

aproximadamente 2 % o menos de aproximadamente 1 %) del número total de aminoácidos en la quimiocina de tipo silvestre también pueden usarse en los métodos y dispositivos desvelados en el presente documento. Además, pueden realizarse inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica por ejemplo añadiendo marcadores epitópicos, sin alterar o eliminar sus funciones (Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Y Wiley Intersciences, 1998). Otras modificaciones que pueden realizarse sin alterar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas o bioquímicas *in vivo* o *in vitro* o la incorporación de aminoácidos poco habituales. En algunos ejemplos, un fragmento funcional de una quimiocina puede consistir en 10 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más o 200 o más restos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de quimiocina.

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

Los péptidos, tales como quimiocinas, pueden modificarse por diversas técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad que los péptidos no modificados, y opcionalmente que tienen otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse grupos de ácido carboxílico de la proteína, bien carboxilo terminal o cadena lateral, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificado para formar un éster C1-C16, o convertirse a una amida de fórmula NR₁ R₂ en la que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo C1-C16, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, bien amino terminales o bien de cadena lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, tal como las sales HCl, HBr, acética, benzoica, toluenosulfónica, maleica, tartárica y otras orgánicas, o pueden modificarse a alquilo C1-C16 o dialquilamino o convertirse adicionalmente a una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de péptidos pueden convertirse a alcoxi C1-C16 o a un éster C1-C16 usando técnicas bien reconocidas. El fenilo y los anillos fenólicos de las cadenas laterales peptídicas pueden sustituirse con uno o más átomos halógenos, 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 peptídicas pueden extenderse a alquilenos C2-C4 homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos de acetamida. Los expertos en la materia reconocerán también métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de la presente divulgación para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que den como resultado estabilidad potenciada. Por ejemplo, puede añadirse una cisteína C o N terminal al péptido, de modo que cuando se oxide el péptido contendrá un enlace disulfuro, que genera un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación de péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres carboxilo y amino terminales. Las realizaciones de peptidomiméticos y organomiméticos también están dentro del alcance de la presente divulgación, por lo que la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos peptidomiméticos y organomiméticos imitan la disposición tridimensional de la cadena principal peptídica y cadenas laterales de aminoácidos componentes, dando como resultado dichos peptidomiméticos y organomiméticos de las proteínas de la presente divulgación. Para aplicaciones de modelación por ordenador, un farmacóforo es una definición tridimensional, idealizada, de los requisitos estructurales para actividad biológica. Pueden diseñarse peptidomiméticos y organomiméticos para ajustarse a cada farmacóforo con software de modelación por ordenador actual (usando diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman y Groves, eds., 1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165 174 and Principles of Pharmacology Munson (ed.) 1995, C. 102, para descripciones de técnicas usadas en CADD. También se incluyen, dentro del alcance de la divulgación, miméticos preparados usando dichas técnicas.

Los aminoácidos en un péptido, polipéptido o proteína generalmente están unidos químicamente entre sí mediante enlaces amida (CONH). Adicionalmente, los aminoácidos pueden estar unidos entre sí por otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH = CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH (OH) CH₂- y -CHH₂SO- (estos y otros pueden encontrarse en Spatola, en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo 1983), Vol. 1, n.º 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.

5 CCL25 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica HUGO para el ligando de quimiocina (motivo C-C) 25. El ID de HGNC para este gen es 10624. El gen se localiza en la posición cromosómica 19p13.2. El símbolo y nombre previos para el gen es SCYA25, "subfamilia de citocinas inducibles pequeñas A (Cys-Cys), miembro 25". Los sinónimos para este gen incluyen "Ck beta-15", Ckb15, TECK, "TECKvar", "quimiocina expresada en timo". La secuencia de referencia de Genbank para CCL25 es U86358.1 disponible el 13 de junio de 2011.

15 CCL21 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica HUGO para el ligando de quimiocina (motivo C-C) 21. El ID de HGNC para este gen es 10620. El gen está localizado en la posición cromosómica 9p13. El símbolo y nombre previos para el gen es SCYA21, "subfamilia de citocinas inducibles pequeñas A (Cys-Cys), miembro 21". Los sinónimos para este gen incluyen 6Ckina, "beta quimiocina exodus-2", CKb9, ECL, "Quimioatrayente Eficaz para Linfocitos", exodus-2, "quimiocina tisular linfoide secundaria", SLC, TCA4. La secuencia de referencia de Genbank para CCL21 es AB002409.1 disponible el 13 de junio de 2011.

20 CCL19 es el símbolo génico aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica HUGO para el ligando de quimiocina (motivo C-C) 19, también conocido como MIP-3b. El ID de HGNC para este gen es 10617. El gen está localizado en la posición cromosómica 9p13. El símbolo y nombre previos para el gen es SCYA19, "subfamilia de citocinas inducibles pequeñas A (Cys-Cys), miembro 19". Los sinónimos para este gen incluyen "quimiocina beta exodus-3", "ligando de quimiocina CC 19", "CK beta-11", CKb11, "quimiocina de ligando EB11", ELC, exodus-3, "proteína inflamatoria de macrófagos 3-beta", MIP-3b. La secuencia de referencia de Genbank para CCL19 es AB000887.1 disponible el 13 de junio de 2011.

30 Un ejemplo de una quimiocina de las diversas realizaciones de la invención que contiene tanto modificaciones como un truncamiento y adaptada específicamente para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento. El CCL25 truncado corresponde a los restos 1 a 74 de la proteína madura de longitud completa (y por tanto carece de los aminoácidos 75 a 127 y el péptido señal N terminal de 23 aminoácidos) y por tanto conserva el pliegue de quimiocina. Además, se incorpora una sustitución de metionina a Norleucina, para evitar la oxidación del resto durante el ensamblaje de la cadena. El resto de glutamina N terminal se sustituye con piroglutamina para permitir la uniformidad del producto durante la síntesis. Se consigue biotilación mediante un espaciador de PEG en la funcionalidad ϵ del resto de lisina hallado en la posición 72. La secuencia de aminoácidos de la molécula lineal (es decir sin el espaciador de PEG y molécula de biotina en el aminoácido 72 mostrado) comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 1. La proteína final puede por lo tanto comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

40 Un ejemplo adicional de una quimiocina de las diversas realizaciones de la invención que contiene modificaciones y adaptada específicamente para su uso en la invención se describe en detalle en el presente documento (véase Ejemplo 9 posterior). El CCL19 modificado (MIP-3 β) corresponde a los restos 1 a 77 de la proteína madura de longitud completa (y carece del péptido señal N terminal de 21 aminoácidos, que se escinde) y por lo tanto conserva el pliegue de quimiocina. Se inserta una lisina adicional en el extremo C, en la posición 78. La quimiocina puede por lo tanto comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Se incorpora FmocLys (ivDde)-OH como resto 78 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 5). La funcionalidad de cadena lateral ϵ -amina de Lys (78) se modifica mediante biotilación. La proteína final puede por lo tanto comprender, consistir esencialmente en o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

50 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención también emplea una quimiocina modificada que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 6.

SEQ ID NO: 4

GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNHFHYLLIKDGC RVP AVVFTTLRGRQLCA
PPDQPWVERIIQRLQR TSAKMKRRSSX

55 X es un resto de aminoácido que puede estar biotilado, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG

SEQ ID NO: 6

GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNHFHYLLIKDGC RVP AVVFTTLRGRQLCA
PPDQPWVERIIQRLQR TSAKMKRRSSX

60

X es K(Biotina)

Pueden sintetizarse quimiocinas útiles en las diversas realizaciones de la invención mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, las quimiocinas se sintetizan químicamente ya que esto facilita la modificación y el marcaje etc. Sin embargo, también pueden emplearse enfoques basados en ADN recombinante en combinación con marcaje apropiado y tecnologías de modificación según se requiera. Por lo tanto, en ciertas realizaciones la invención utiliza una molécula de ácido nucleico que codifica las quimiocinas de las diversas realizaciones de la invención. En ciertas realizaciones la invención también emplea un vector que contiene dicha molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que contiene el vector. El vector puede comprender adicionalmente un promotor adecuado unido operativamente con la molécula de ácido nucleico, para facilitar la transcripción de la molécula de ARNm correspondiente. La célula hospedadora puede ser capaz de expresar la proteína por transcripción y traducción de la molécula de ácido nucleico que codifica una quimiocina de las diversas realizaciones de la invención.

Las quimiocinas útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden biotinilarse por métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en 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, aunque puede emplearse cualquier técnica de marcaje que no afecte significativamente a la capacidad de unión al receptor de la quimiocina. Están disponibles en el mercado diversas quimiocinas biotiniladas de forma específica de sitio y quimiocinas nativas, por ejemplo de Almac, Craigavon, Reino Unido. En realizaciones específicas, la o las quimiocinas están biotiniladas mediante un grupo espaciador. El espaciador puede emplearse para evitar que el grupo de biotina influya en la actividad de la quimiocina, en particular la unión de la quimiocina con su receptor afin. Puede emplearse cualquier espaciador adecuado que facilite la conservación de propiedades de unión al receptor de la quimiocina en las diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, en las realizaciones específicas descritas anteriormente, pueden emplearse espaciadores distintos de espaciadores de PEG según sea apropiado. En realizaciones específicas, el espaciador es un espaciador de polietilenglicol (PEG). Se ha mostrado que PEG es un espaciador eficaz que permite la unión de biotina con la quimiocina (que después puede inmovilizarse en el soporte sólido mediante interacción con estreptavidina) sin comprometer la capacidad de unión al receptor.

En el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención el término "anticuerpo" incluye todas las inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina con afinidad de unión específica para el receptor relevante, incluyendo receptor de quimiocinas (incluyendo como ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de los mismos, y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones). Las inmunoglobulinas específicas útiles en las diversas realizaciones de la invención incluyen isotipos de IgG. Los anticuerpos útiles en las diversas realizaciones de la invención pueden ser de origen monoclonal o policlonal, pero son normalmente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos o versiones humanizadas de anticuerpos no humanos o anticuerpos quiméricos. Están bien establecidas diversas técnicas para humanización de anticuerpos y puede emplearse cualquier técnica adecuada. El término "anticuerpo" también se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une con un epítipo de un antígeno, y se extiende a todos los derivados y fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente con el receptor relevante, incluyendo el receptor de quimiocinas. Estos derivados y fragmentos pueden incluir fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de un único dominio, fragmentos Fc, etc. El término anticuerpo abarca anticuerpos constituidos por cadenas tanto pesadas como ligeras, pero también anticuerpos de cadena pesada (solamente). En realizaciones específicas, los anticuerpos pueden modificarse técnicamente para ser específicos para más de un receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, por ejemplo biespecíficos para permitir la unión con dos receptores diferentes, incluyendo receptores de quimiocinas. Se enumeran en la tabla 1 a continuación anticuerpos disponibles en el mercado adecuados que se unen con los receptores de quimiocinas de interés. Pueden estar o no marcados. Puede hacerse referencia en general a "Antibodies a laboratory manual: por E Harlow y D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988".

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CCR9	APC	R&D Systems
CD14	FITC	Beckman Coulter
CCR7	PerCP Cy5.5	Biologend
HLA-DR	APC Cy7	Biologend

Las células que expresan receptores de quimiocinas pueden por lo tanto ser dianas usando agentes de unión alternativos, tales como anticuerpos u otros compuestos químicos, como se definen en el presente documento, en lugar del compañero de unión de quimiocina natural. Este enfoque es un nuevo enfoque para tratar afecciones

inflamatorias, tales como EII, en particular CU o EC y SII.

También se describe una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente en el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa el receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina. El reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor de quimiocinas puede ser un agonista o un antagonista del receptor de quimiocinas. En realizaciones específicas, el reactivo de unión capaz de unirse específicamente con el receptor de quimiocinas se selecciona de un anticuerpo y un compuesto químico.

Por lo tanto, se describe en el presente documento un método para tratar una afección inflamatoria, en particular EII y SII, que comprende aplicar sangre periférica de un paciente/sujeto a una columna de aféresis como se ha definido anteriormente (una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente en el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa un receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina) retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica del paciente/sujeto. El método puede comprender devolver la sangre desprovista de las células que expresan receptores de quimiocinas al paciente/sujeto.

De forma similar, también se describe un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en particular EII y SII, en el que el reactivo de unión se inmoviliza en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis como se ha definido anteriormente (una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un receptor de quimiocinas inmovilizado directa o indirectamente en el soporte para permitir la retirada de una célula que expresa el receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente/sujeto, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina), al que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica del paciente.

Estos aspectos pueden integrarse en los aspectos terapéuticos más centrados de las diversas realizaciones de la invención y por lo tanto, el resto de la divulgación, incluyendo todas las realizaciones específicas, se aplica cambiando lo que deba cambiarse.

Se conocen en la técnica materiales de soporte sólido para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención. "Soporte sólido" se refiere, por ejemplo, a materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas, y pueden tomar la forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. Un material de apoyo útil es uno que no activa células sanguíneas para hacerlas coagular o adherirse con el soporte a medida que se aplica 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, la sangre del paciente puede tratarse con un anticoagulante tal como heparina antes de la aplicación al soporte. Los materiales de soporte útiles comprenden carbohidratos de alto peso molecular, en particular carbohidratos que tienen un peso molecular de 100 kDa o más, tales como agarosa, en forma de partículas, opcionalmente reticulada y celulosa. Otros materiales de soporte preferidos son polímeros, tales como poliestireno carboxilado, y vidrio. El soporte de las diversas realizaciones de la invención puede proporcionarse en forma de partículas o fibras. Las partículas de soporte pueden tener forma regular, tales como esferas o perlas, o forma irregular. Pueden ser porosas o no porosas. Un tamaño de partícula promedio preferido del soporte es de 50 µm a 2 mm. En ciertas realizaciones se usa Sepharose™, una forma de agarosa en perlas, reticulada, como matriz de columna. Se elige por su capacidad de distribución óptima y puede proporcionar una gran área disponible para unión de afinidad. Pueden proporcionarse soportes sólidos en forma de perlas magnéticas, con el reactivo de unión específico inmovilizado en las perlas magnéticas. Después de captura de las células que expresan receptores (CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7), incluyendo receptores de quimiocinas, en particular, monocitos CD14+HLA-DRhi de la sangre, las perlas pueden retirarse de la sangre con la ayuda de un separador magnético apropiado.

Se conocen en la técnica métodos para inmovilizar reactivos de unión en un soporte sólido. Un reactivo de unión, tal como una quimiocina, un anticuerpo, un péptido, un ácido nucleico o un compuesto químico, puede inmovilizarse en el soporte de una manera directa o indirecta. La inmovilización puede ser por medio de un enlazador adecuado en algunas realizaciones. Un método preferido de inmovilización indirecta de un reactivo de unión, tal como una quimiocina, se basa en la interacción entre moléculas de biotina y avidina. "Avidina" o "molécula de avidina" se refiere a cualquier tipo de proteína que se una específicamente con biotina excluyendo sustancialmente otras moléculas (pequeñas) que podrían estar presentes en una muestra biológica. Los ejemplos de avidina incluyen avidinas que están presentes de forma natural en la clara de huevo, proteína de semilla de aceite (por ejemplo, harina de soja) y grano (por ejemplo maíz), y estreptavidina, que es una proteína de origen bacteriano. Por lo tanto, la biotilación del reactivo de unión y uso de una molécula de avidina tal como estreptavidina inmovilizada en el soporte sólido permite la unión fiable del reactivo de unión con el soporte sólido de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Específicamente, dicho método puede comprender proporcionar el reactivo de unión en forma biotilada, que proporciona un soporte sólido que tiene estreptavidina inmovilizada en su superficie, poner en

contacto el soporte con una solución acuosa del reactivo de unión biotilado, y aclarar el soporte con un disolvente acuoso. Además, también pueden utilizarse interacciones de pares de unión, tales como interacciones anticuerpo-antígeno, para inmovilización indirecta de reactivo de unión en un soporte. En dichas 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 afinidad conocida por una secuencia peptídica particular o molécula pequeña de hapteno. La incorporación del otro miembro del par de unión, tal como un antígeno, secuencia peptídica o el hapteno en o sobre el reactivo de unión facilita la inmovilización en un soporte sólido recubierto con el anticuerpo correspondiente o fragmento o derivado del mismo. Por lo tanto, el reactivo de unión puede modificarse para incluir la secuencia peptídica o el hapteno en la molécula lineal o puede añadirse como una cadena lateral o marcador. Puede emplearse cualquier par de anticuerpo-antígeno adecuado. El fragmento de anticuerpo o derivado puede ser cualquier fragmento o derivado que conserve afinidad de unión específica por el antígeno apropiado. Los ejemplos incluyen Fab, fragmentos F(ab')₂, scFV, dominios VH, anticuerpos de dominios individuales (tales como nanocuerpos), anticuerpos de cadena pesada y una versión humanizada de anticuerpos no humanos, etc. Pueden utilizarse otras interacciones de alta afinidad para inmovilizaciones de reactivos de unión, siempre que el reactivo de unión pueda sintetizarse o derivatizarse con uno de los compañeros que interactúan y el soporte sólido sintetizarse o derivatizarse con el otro compañero que interactúa sin pérdida de actividad de unión (es decir unión del reactivo de unión con el receptor apropiado, incluyendo receptor de quimiocina). La inmovilización puede producirse esencialmente mediante la misma interacción a la inversa en algunas realizaciones. Por lo tanto, el reactivo de unión que puede ser una quimiocina por ejemplo, puede unirse con un anticuerpo como se define en el presente documento, y el soporte sólido derivatizarse con el antígeno. La quimiocina puede producirse como una proteína de fusión con el anticuerpo.

Como alternativa pueden inmovilizarse reactivos de unión, tales como quimiocinas y anticuerpos, directamente en un soporte sólido usando técnicas de bioconjugación establecidas en este campo. Por ejemplo la inmovilización directa de proteínas en bromuro de cianógeno activó soportes sólidos mediante funcionalidades de amino dentro de la secuencia primaria de la proteína. Como alternativa, pueden usarse funcionalidades de sulfhidrilo dentro de proteínas para inmovilizar directamente la proteína en soportes derivatizados de alquil haluro o soportes que contienen funcionalidades de tiol libre. En realizaciones adicionales, pueden inmovilizarse directamente proteínas que contienen funcionalidades de α -tioéster en soportes que contienen restos de 1,2 amino tiol (por ejemplo cisteína N terminal) usando la reacción de ligamiento químico nativa. Como alternativa pueden inmovilizarse proteínas modificadas con cetonas y aldehídos en soportes sólidos derivatizados con funcionalidades de hidrazinilo, hidrazida y aminoxi usando reacciones de ligamiento que forman enlaces de hidrazona/oxima (y viceversa). Como alternativa puede usarse química "Click" para inmovilizar proteínas en soportes sólidos, por lo que la proteína y el soporte se derivatizan con las funcionalidades químicas mutuamente reactivas apropiadas (azidas y alquinos). En otras realizaciones puede usarse química de ligamiento de Staudinger para inmovilizar proteínas derivatizadas de forma apropiada en los soportes sólidos derivatizados de forma apropiada.

El soporte sólido está contenido dentro de o portado por la columna de aféresis. Por lo tanto, por "cargado" se entiende que la columna transporta o contiene el soporte sólido de tal manera que la sangre (periférica) pueda fluir a través de la columna en contacto con el soporte sólido. Por lo tanto, el soporte sólido proporciona una matriz dentro de la columna a través de la que fluye la sangre, de manera continua en ciertas realizaciones. Esto permite que las células que expresan el receptor específico, incluyendo el receptor de quimiocina, se retiren de la sangre que pasa a través de la columna, de modo que la sangre que sale de la columna esté desprovista de células que expresan el receptor específico, incluyendo receptor de quimiocinas. En realizaciones específicas, la columna de aféresis se carga con un soporte que comprende estreptavidina inmovilizada en el soporte y uno o más reactivos de unión biotilados, tales como quimiocinas, unidos con la estreptavidina en el soporte. El soporte sólido puede comprender un carbohidrato de alto peso molecular, opcionalmente reticulado, tal como agarosa.

Como se ha analizado anteriormente, el reactivo de unión se acopla al soporte sólido. Las cantidades relativas de reactivo de unión pueden controlarse para asegurar que el acoplamiento entre el soporte sólido y el reactivo de unión sea inmediato, minimizando el riesgo de que el reactivo de unión se desacople del soporte sólido. Por lo tanto, puede asegurarse que haya un exceso relativo de sitios de inmovilización para el reactivo de unión en el soporte sólido. Como alternativa, o adicionalmente, después de la inmovilización del reactivo de unión en el soporte sólido, el soporte sólido puede lavarse para retirar cualquier reactivo de unión no unido.

La columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como un tratamiento de leucoféresis para enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). La columna actúa para retirar específicamente monocitos que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular monocitos CD14+HLA-DRhi aprovechando la interacción entre CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 expresados en la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado en un soporte sólido contenido dentro de o portado por la columna. De forma similar, la columna de aféresis utilizada en las diversas realizaciones de la presente invención actúa como un tratamiento de leucoféresis para SII. La columna actúa para retirar específicamente monocitos que expresan CCR9, en particular monocitos CD14+HLA-DRhi aprovechando la interacción entre CCR9 expresado en la superficie celular y un reactivo de unión específico inmovilizado en un soporte sólido contenido dentro de o portado por la columna.

La columna general normalmente comprende, consiste en, o consiste esencialmente en tres componentes combinados: 1) una carcasa que contiene o porta 2) el soporte sólido y 3) uno o más reactivos de unión (inmovilizados en el mismo) que se unen específicamente con uno o más receptores de quimiocinas. La carcasa puede fabricarse de cualquier material adecuado para uso clínico. En ciertas realizaciones la carcasa está compuesta de un material plástico. La carcasa incluye un sitio de entrada para la entrada de sangre y un sitio de flujo de salida para que la sangre (desprovista de células diana) salga de la columna. La carcasa puede diseñarse para mantener un flujo sanguíneo continuo 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 flujo de entrada (1) para dispersar la sangre uniformemente sobre el área de matriz completa. La placa de distribución puede actuar como una primera barrera de seguridad que evita que partículas mayores fluyan a través de la columna y al paciente. Sin embargo, la placa de distribución no es esencial y puede retirarse en algunas realizaciones para reducir la resistencia general en el sistema. La columna puede contener una o más unidades de filtro de seguridad (3 y 4) colocadas en los sitios de flujo de entrada (1) y/o flujo de salida (5) de la carcasa de plástico. Dichas unidades de filtro pueden actuar para evitar que partículas mayores que las células sanguíneas entren y/o salgan de la columna. Las unidades de filtro de seguridad pueden contener una pluralidad de filtros, tales como dos, tres o cuatro filtros diseñados para ser una barrera robusta y evitar que todas las partículas mayores que las células sanguíneas pasen 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 filtración de partículas al paciente, incluyendo en el caso de que el dispositivo se conecte incorrectamente dando como resultado flujo sanguíneo en la dirección opuesta a la pretendida. Los filtros de seguridad pueden comprender cualquier tamaño de poro adecuado para evitar que partículas mayores que las células sanguíneas pasen a través de la columna, como entendería fácilmente un experto en la materia. Están disponibles en el mercado filtros adecuados. En realizaciones específicas, el tamaño de poro del filtro o los filtros está entre aproximadamente 60 μm y 100 μm , más específicamente aproximadamente 80 μm . Los componentes de soporte sólido y reactivo de unión se analizan en más detalle en el presente documento.

El volumen de la carcasa puede variar dependiendo de los volúmenes sanguíneos que se pretende que pasen a través de la columna. Normalmente, el volumen de la carcasa es entre aproximadamente 40 ml y 200 ml, más específicamente de 50 ml a 150 ml o de 60 ml a 120 ml.

La columna se aplica en general en forma de un circuito de aféresis. En este contexto, el sistema general incluye la columna de aféresis, los tubos y una bomba apropiada para bombear la sangre por el circuito. El sistema se ilustra en la Figura 4. El paciente (1) está conectado al circuito extracorpóreo mediante agujas estériles para las venas en los brazos derecho e izquierdo. Una bolsa de solución salina (3) también está conectada y la solución salina se bombea con una bomba adecuada (2). Se extrae sangre de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estériles por la bomba sanguínea (4) y se pasa a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos puede conectarse a la columna mediante cualquier acoplamiento adecuado, tal como acoplamientos de cierre luer de diálisis convencionales. Los acoplamientos en la columna pueden estar clasificados por color para su correcto ensamblaje. Por ejemplo, tubos rojos para flujo de entrada a la parte superior de la columna roja y tubos azules para flujo de salida de vuelta al paciente. Puede estar presente un detector de aire (8) en el circuito. Pueden emplearse adicionalmente sensores de presión de entrada (5) y/o Pven (7) para supervisar la presión en el circuito.

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

Se muestra en la Figura 11 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, entonces la bomba debe detenerse inmediatamente. Como alternativa o adicionalmente puede emitirse una alarma visual/auditiva.

Los métodos descritos en el presente documento pueden así basarse por lo tanto en un circuito extracorpóreo. Los métodos pueden considerarse como métodos *ex vivo* o *in vitro* y definirse solamente en referencia a etapas realizadas fuera del paciente. En algunas realizaciones, sin embargo, el método comprende además, antes de la aplicación de la sangre a la columna, recoger sangre periférica del paciente. En una realización adicional, el método comprende además, después de la aplicación de la sangre a la columna, infundir la sangre desprovista de células que expresan receptores (CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7), incluyendo receptores de quimiocinas, al paciente. Este es entonces un método de tratamiento de leucoféresis completo. Por lo tanto, un método de leucoféresis, para tratar enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), comprende recoger sangre periférica del paciente; aplicar la sangre periférica a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con uno o más receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular el receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, particularmente CD14, CCR9 y/o CCR7 inmovilizados directa o indirectamente en

el soporte retirando de este modo células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 de la sangre periférica del paciente; e infundir la sangre desprovista (de células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas) al paciente. De forma similar, un método de leucoféresis, para tratar SII, comprende recoger sangre periférica del paciente; aplicar la sangre periférica a una columna de aféresis cargada con un soporte sólido que comprende uno o más reactivos de unión capaces de unirse específicamente con uno o más receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular el receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, CCR9 inmovilizado directa o indirectamente en el soporte retirando de este modo células que expresan CCR9 de la sangre periférica del paciente; e infundir la sangre desprovista (de células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas) al paciente.

La sangre periférica puede recogerse continuamente del paciente. De forma similar, la sangre desprovista puede infundirse continuamente al paciente, mediante el uso de un circuito apropiado como se describe en el presente documento. Por lo tanto, el soporte puede disponerse en una columna a través de la que se hace fluir a la sangre. Esto puede conseguirse usando una bomba adecuada por ejemplo, como se describe también en el presente documento. El flujo de sangre a través de la columna permite que el reactivo o los reactivos de unión se inmovilicen en el soporte sólido para capturar las células que expresan el receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, agotándolas de este modo en la sangre y evitando su contribución a la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) o SII.

Los métodos de las diversas realizaciones de la invención y reactivos de unión para uso en los métodos de las diversas realizaciones de la invención pueden requerir que el paciente se haya seleccionado para tratamiento basándose en la detección de un aumento en el nivel de células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular, CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida del paciente. Dichos métodos de diagnóstico complementarios se describen en más detalle en el presente documento y se basan, por ejemplo, en la observación de que los monocitos CD14+HLA-DR^{hi} están regulados positivamente en EII activa.

Por lo tanto, (en este contexto) en ciertas realizaciones la invención también proporciona un método para diagnosticar, supervisar la progresión de, o supervisar el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) que comprende determinar los niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida de un sujeto, en el que:

(i) niveles aumentados de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en comparación con:

- (a) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
- (b) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
- (c) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de sujetos sanos;

indican la presencia de enfermedad inflamatoria del intestino;

(ii) niveles aumentados de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en comparación con:

- (a) una muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior; o
- (b) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
- (c) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
- (d) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} obtenidos de sujetos sanos;

indican la progresión de enfermedad inflamatoria del intestino; o

(iii) niveles disminuidos de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} se correlacionan con tratamiento exitoso. También pueden investigarse los niveles de expresión de receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, a diferencia de los números de células, ya que los niveles aumentados de expresión de receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, por célula también pueden ser diagnósticamente relevantes.

De forma similar, se describen en el presente documento métodos y reactivos de unión para su uso en estos métodos que pueden requerir que el paciente se haya seleccionado para tratamiento basándose en la detección de un aumento en el nivel de células que expresan receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, en particular, CCR9, en particular monocitos que expresan CCR9 en una muestra obtenida del paciente. Dichos métodos de diagnóstico complementarios se describen en más detalle en el presente documento y se basan, por ejemplo, en la observación de que los monocitos que expresan CCR9 están regulados positivamente en SII, lo que sugiere que SII tiene un componente inflamatorio que puede ser diagnósticamente y terapéuticamente relevante.

Por lo tanto, (en este contexto) en ciertas realizaciones la invención también proporciona un método para diagnosticar, supervisar la progresión de o supervisar el tratamiento de SII que comprende determinar:

a) niveles de células que expresan CCR9, particularmente niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9; y/o

b) niveles de células con alta expresión de CCR9 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que:

5 (i) altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles aumentados de monocitos que expresan CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 en comparación con:

10 (a) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
 (b) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
 (c) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de sujetos sanos;

indican la presencia de síndrome del intestino irritable;

20 (ii) altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 en comparación con:

25 (a) una muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior; o
 (b) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
 (c) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
 (d) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenido de sujetos sanos;

30 indican la progresión de síndrome del intestino irritable; o

(iii) niveles disminuidos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 se correlacionan con tratamiento exitoso. También pueden investigarse los niveles de expresión de receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, a diferencia de números de células, ya que los niveles aumentados de expresión de receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, por célula también pueden ser diagnósticamente relevantes.

35 Se define en el presente documento que “diagnosticar” incluye explorar con respecto a una enfermedad/afección o preindicación de una enfermedad/afección, identificar una enfermedad/afección o preindicación de una enfermedad/afección y comprobar la reaparición de enfermedad/afección después del tratamiento. Los métodos de las diversas realizaciones de la invención también pueden tener valor de pronóstico, y esto se incluye dentro de la definición del término “diagnóstico”. El valor de pronóstico de los métodos de las diversas realizaciones de la invención puede usarse como un marcador de susceptibilidad potencial a enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) identificando niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 ligados a enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). De forma similar, el valor de pronóstico de los métodos de las diversas realizaciones de la invención puede usarse como un marcador de susceptibilidad potencial a SII identificando niveles de expresión de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 ligado a SII. Por lo tanto, pueden identificarse pacientes en riesgo antes de que la enfermedad tenga la posibilidad de manifestarse con respecto a síntomas identificables en el paciente. En ciertas realizaciones, puede realizarse un diagnóstico junto con otros indicadores objetivos de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) o SII respectivamente. Por lo tanto, en realizaciones específicas, se realiza un diagnóstico junto con los siguientes indicadores: el diagnóstico puede basarse en parámetros clínicos conocidos para EII. Puede realizarse evaluación histopatológica para determinar CU o EC. Para estadificación de inflamación la determinación de células proinflamatorias y expresión de receptores de quimiocinas puede proporcionar orientación para el tratamiento apropiado tal como la leucoféresis adaptada, como se describe en el presente documento.

60 “Supervisión de progresión de” incluye realizar los métodos para supervisar el estadio y/o el estado y la progresión de la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo la enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) o SII, respectivamente. La supervisión de la progresión puede implicar realizar los métodos de diagnóstico múltiples veces en el mismo paciente para determinar si los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, o células que expresan CCR9 en el caso de SII, o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 o CCR9 en el caso de SII están aumentando, reduciéndose o permaneciendo estables durante un cierto periodo de tiempo. Esto puede estar en el contexto de un régimen de tratamiento.

65 Se define que la “supervisión del éxito de un tratamiento particular” incluye determinar los niveles de células que

expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 antes y después de un tratamiento. El tratamiento es generalmente uno dirigido a tratar enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) y puede ser un tratamiento de acuerdo con uno de los métodos de las diversas realizaciones de la invención como se define en el presente documento. El tratamiento exitoso puede determinarse en referencia a una reducción de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 como resultado, o después, del tratamiento. Por lo tanto, en dichos métodos se determina un nivel de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 antes del tratamiento. Este nivel se registra y se realiza una evaluación adicional en un tiempo predeterminado después del tratamiento. La comparación de los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 permite supervisar el éxito del tratamiento. En realizaciones específicas, un tratamiento individual es suficiente para provocar un agotamiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o más, hasta 80 %, 90 %, 95 % o más, o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de una o más células que expresan receptor específico, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse en referencia al agotamiento de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9. El tratamiento puede conducir al agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan uno o más de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, tales como monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, en ciertas realizaciones. Pueden incluirse factores adicionales para determinar el tratamiento exitoso. Por ejemplo, una falta de aumento de las células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 después del tratamiento pueden indicar tratamiento exitoso con respecto a prevención de progresión adicional de la afección, opcionalmente combinado con una mejora en otros marcadores o estadificación de la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU).

En el caso de SII, se define que la "supervisión del éxito de un tratamiento particular" incluye determinar los niveles de células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 antes y después de un tratamiento. El tratamiento es en general uno dirigido a tratar SII y puede ser un tratamiento de acuerdo con uno de los métodos de las diversas realizaciones de la invención como se define en el presente documento. El tratamiento exitoso puede determinarse en referencia a una reducción de las células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 como resultado, o después, del tratamiento. Por lo tanto, en dichos métodos se determina un nivel de células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 antes del tratamiento. Este nivel se registra y se realiza una evaluación adicional en un tiempo predeterminado después del tratamiento. La comparación de niveles de células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 permite supervisar el éxito del tratamiento. En realizaciones específicas, un tratamiento individual es suficiente para provocar un agotamiento de aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %, o más, hasta 80 %, 90 %, 95 % o más o cualquier intervalo de valores entre e incluyendo estas cantidades, de uno o más receptores específicos, incluyendo receptores de quimiocinas, en particular células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 de la sangre periférica del paciente. En realizaciones específicas, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse en referencia al agotamiento de células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9. El tratamiento puede conducir a agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de una o más células que expresan CCR9, tales como monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, en ciertas realizaciones. Pueden incluirse factores adicionales para determinar el tratamiento exitoso. Por ejemplo, una falta de aumento de células que expresan CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 después del tratamiento puede indicar tratamiento exitoso con respecto a evitar la progresión adicional de la afección, opcionalmente combinado con una mejora de otros marcadores o estadificación del SII.

Uniéndose a la columna mediante la interacción de reactivo de unión-receptor, incluyendo receptor de quimiocinas, se inmovilizan células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas. Estas células inmovilizadas expresan receptores inoculados adicionales, incluyendo receptores de quimiocinas, que pueden ser de tipos iguales o diferentes a los usados para captura. Estos receptores adicionales, incluyendo receptores de quimiocinas, pueden permitir quimiocinas en circulación que contribuyen a la afección inflamatoria para capturar de la sangre periférica. Por lo tanto, una reducción de los niveles de quimiocinas (específicas) en circulación puede proporcionar una medida del tratamiento exitoso.

La muestra en la que se determinan los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9

y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi} HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) puede comprender cualquier muestra tisular adecuada o muestra de fluido corporal. En general, la muestra de ensayo se obtiene de un sujeto humano. Normalmente, la muestra es una muestra sanguínea, en particular una muestra de sangre periférica. La muestra puede comprender una biopsia mucosa en ciertas realizaciones. Los métodos pueden implicar determinar niveles de monocitos que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en particular niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 en ciertas realizaciones.

De forma similar, en el caso de SII, la muestra en la que se determinan los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) puede comprender cualquier muestra tisular o muestra de fluido corporal adecuada. En general, la muestra de ensayo se obtiene de un sujeto humano. Normalmente, la muestra es una muestra sanguínea, en particular una muestra de sangre periférica. La muestra puede comprender una biopsia de mucosa en ciertas realizaciones. Los métodos pueden implicar determinar los niveles de monocitos que expresan CCR9, en particular niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 en ciertas realizaciones.

Los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) pueden determinarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede emplearse citometría de flujo para determinar el número de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 en la muestra, para determinar niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, para determinar los niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o para identificar niveles de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}. Se describen técnicas de citometría de flujo en el presente documento y se exponen ejemplos de anticuerpos disponibles en el mercado marcados convenientemente para su uso en citometría de flujo en la Tabla 1 por ejemplo. Como alternativa, el método puede implicar etapas de recoger y fijar las células en la muestra, seguido de incubación con un reactivo de unión adecuado que se une específicamente con las células que expresan receptores de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 en la muestra. Puede emplearse cualquier reactivo de unión adecuado, como se define en el presente documento. Por ejemplo, puede emplearse un anticuerpo específico de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7. Puede adoptarse una etapa de lavado después de un periodo de incubación para retirar cualquier reactivo no unido. Los expertos en la materia conocerían bien etapas de lavado y condiciones de incubación adecuadas. El reactivo de unión puede marcarse directamente para permitir determinar directamente la unión de anticuerpo. Como alternativa puede emplearse un reactivo de unión secundario, tal como un anticuerpo, que se une con el primer reactivo de unión y porta un marcador. De nuevo, resultarían evidentes para un experto en la materia condiciones de incubación y etapas de lavado adecuadas. Los reactivos de unión primarios y secundarios pueden formar dos mitades de un par de unión. La interacción de unión no debería evitar que el reactivo de unión primario se una con las células que expresan receptores de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, a no ser que se emplee un ensayo de competición. Las dos mitades de un par de unión pueden comprender un par de antígeno-anticuerpo, anticuerpo-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-estreptavidina, etc. en ciertas realizaciones. Otras técnicas usadas para cuantificar niveles de células que expresan receptores de quimiocinas (CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7), para cuantificar niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, para cuantificar niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 y/o para cuantificar niveles de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi} incluyen técnicas basadas en PCR tales como QT-PCR y métodos basados en proteínas tales como transferencia de Western. Puede conseguirse cuantificación en referencia a líneas celulares fijadas que portan números conocidos de diversas células que expresan receptores y/o niveles conocidos de expresión de receptores por célula. Dichas líneas celulares fijas están disponibles en el mercado (por ejemplo líneas celulares ChemiScreen™ de Millipore). También pueden emplearse métodos análogos a los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, determinándose la unión de células que expresan CCR con el soporte sólido después de pasarse sangre periférica a través de la columna.

De forma similar, en el caso de SII, los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) pueden determinarse según cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede emplearse citometría de flujo para determinar el número de células que expresan CCR9 en la muestra, para determinar los niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, para determinar los niveles de expresión de CCR9 y/o identificar niveles de células CCR9^{hi}. Se describen en el presente documento técnicas citométricas de flujo y se exponen ejemplos de anticuerpos disponibles en el mercado marcados convenientemente para uso en citometría de flujo en la Tabla 1 por ejemplo. Como alternativa, el método puede implicar etapas de recoger y fijar las células en la muestra, seguido de incubación con un reactivo de unión adecuado que se une específicamente con las células que expresan receptor CCR9 en la muestra. Puede emplearse cualquier reactivo de unión adecuado, como se define en el presente documento. Por ejemplo, puede emplearse un anticuerpo específico de CCR9. Puede adoptarse una etapa de lavado después de un periodo de incubación para retirar cualquier reactivo no unido. Los expertos en la materia conocerían bien etapas de lavado y condiciones de incubación adecuadas. El reactivo de unión puede marcarse directamente para permitir que se determine directamente la unión a anticuerpo. Como alternativa puede emplearse un reactivo de unión secundario, tal como un anticuerpo, que se une con el

primer reactivo de unión y transporta un marcador. De nuevo, resultarían evidentes para los expertos en la materia condiciones de incubación y etapas de lavado adecuadas. Los reactivos de unión primarios y secundarios pueden formar dos mitades de un par de unión. La interacción de unión no debería evitar que el reactivo de unión primario se uniera con las células que expresan receptores CCR9, a no ser que se emplee un ensayo de competición. Las dos mitades de un par de unión pueden comprender un par de antígeno-anticuerpo, anticuerpo-anticuerpo, receptor-ligando, biotina-estreptavidina, etc. en ciertas realizaciones. Otras técnicas usadas para cuantificar niveles de células que expresan receptores de quimiocinas, para cuantificar niveles de expresión de CCR9, para cuantificar niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 y/o cuantificar niveles de células CCR9^{hi} incluyen técnicas basadas en PCR tales como QT-PCR y métodos basados en proteínas tales como transferencia de Western. Puede conseguirse cuantificación en referencia a líneas celulares fijas que portan números conocidos de diversas células que expresan receptores y/o niveles conocidos de expresión de receptores por célula. Dichas líneas celulares fijas están disponibles en el mercado (por ejemplo líneas celulares ChemiScreen™ de Millipore). Pueden emplearse también métodos análogos de los métodos de tratamiento en las diversas realizaciones de la invención, determinándose la unión de células que expresan CCR con el soporte sólido después de pasar sangre periférica a través de la columna.

Los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) pueden determinarse en relación con un control adecuado. Cuando se diagnostica enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), puede establecerse un nivel umbral de células, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, nivel de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o nivel de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) en el que o sobre el que se realiza un diagnóstico positivo. Este umbral puede determinarse basándose en la medición de los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) en muestras obtenidas de pacientes enfermos y comparando estos niveles con niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 y como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) en muestras obtenidas de sujetos sanos. El software adecuado está disponible libremente (tal como el proyecto R para cálculo estadístico) para realizar el análisis estadístico necesario de los datos obtenidos para calcular un umbral útil. El umbral puede ajustarse para maximizar la sensibilidad y/o especificidad del ensayo. El rendimiento del ensayo a este respecto puede medirse representando una curva de características operativas receptoras (ROC) (sensibilidad frente a especificidad). El área bajo la curva proporciona una indicación del rendimiento general del ensayo. Por lo tanto, una vez que se han establecido umbrales para diagnosticar la afección, no es necesario tener que realizar un experimento de control separado cada vez que se ensaya una muestra. En su lugar se puede hacer simplemente referencia a los umbrales preexistentes para determinar el diagnóstico. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la muestra se ensaya junto con una muestra de control tomada de un sujeto sano para proporcionar un comparador basado en condiciones experimentales esencialmente idénticas.

La muestra de ensayo se ensaya en general en paralelo con la muestra de control. El nivel de muestra de ensayo de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) pueden compararse después con el de la muestra de control para realizar el diagnóstico. También puede ensayarse en ciertas realizaciones una muestra de control de un paciente enfermo. La referencia a los controles permite identificar fácilmente niveles relativos ("alto", "bajo", etc.) de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 en la muestra de ensayo e interpretar la significación de los mismos. La referencia a controles también permite determinar los niveles relativos de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 ("alta", "baja", etc.) dentro de la población celular e interpretar el significado de los mismos. Dicha determinación puede indicar, por ejemplo, los niveles promedio de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 por célula en la muestra de ensayo.

Por lo tanto, en realizaciones específicas, los niveles altos o mayores de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, o niveles altos o mayores de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 o niveles altos o mayores de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, por ejemplo expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 promedio por célula, o niveles altos o mayores de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi} se correlacionan con enfermedad activa o enfermedad más activa. De forma similar, niveles menores o bajos de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles bajos o menores de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 o niveles bajos o menores de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, por ejemplo expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 promedio por célula, o niveles bajos o menores de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi} pueden correlacionarse con una falta de inflamación o enfermedad activa. Esto puede definirse como "enfermedad menos

activa". Puede preverse fácilmente que puedan evaluarse muestras de control y niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) determinados a lo largo del intervalo de gravedades de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Esto puede ayudar a correlacionar los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) en la muestra de ensayo con la gravedad relativa de la afección.

Cuando se supervisa progresión, o se supervisa tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), las muestras de control pueden tomarse del sujeto en un punto temporal anterior. Sin embargo, se pueden basar en valores de referencia conocidos como se ha analizado anteriormente. Por lo tanto, los niveles relativos de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles relativos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles relativos de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 incluyendo niveles relativos de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 promedio por célula o niveles relativos de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi} pueden ser con referencia a muestras tomadas del mismo sujeto en un punto temporal diferente. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles reducidos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles relativos reducidos de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 incluyendo niveles relativos reducidos de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 promedio por célula, o niveles relativos reducidos de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi} se correlacionan con tratamiento exitoso. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento adecuado, pero en realizaciones específicas es un tratamiento de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención.

Cuando se supervisa la progresión de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), los niveles aumentados de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles relativos aumentados de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 incluyendo niveles relativos aumentados de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 promedio por célula, o niveles relativos aumentados de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o células CCR7^{hi} pueden indicar la progresión de enfermedad o afección. Por lo tanto, si los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 y/o niveles de células con alta expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 (definidas como CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi}) aumentan en una muestra tomada después de una muestra del mismo paciente esto puede indicar progresión de la afección.

De forma similar, en el caso de SII, los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) pueden determinarse en relación con un control adecuado. Cuando se diagnostica SII, puede establecerse un nivel umbral de células, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, nivel de expresión de CCR9 y/o nivel de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) pueden en o sobre el cual se realiza un diagnóstico positivo. Este umbral puede determinarse basándose en la medición de los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) en muestras obtenidas de pacientes enfermos y comparando estos niveles con niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) en muestras obtenidas de sujetos sanos. El software adecuado está libremente disponible (tal como el proyecto R para cálculo estadístico) para realizar el análisis estadístico necesario de los datos obtenidos para calcular un umbral útil. El umbral puede establecerse para maximizar la sensibilidad y/o especificidad del ensayo. El rendimiento del ensayo en estos aspectos puede medirse representando una curva de características operativas receptoras (ROC) (sensibilidad frente a especificidad). El área bajo la curva proporciona un indicio del rendimiento general del ensayo. Por lo tanto, una vez que se han establecido los umbrales para diagnóstico de la afección, no es necesario tener que realizar un experimento de control separado cada vez que se ensaya una muestra. En su lugar puede hacerse referencia simplemente a los umbrales preexistentes para determinar el diagnóstico. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la muestra se ensaya junto con una muestra de control tomada de un sujeto sano para proporcionar un comparador basándose en condiciones experimentales esencialmente idénticas. La muestra de ensayo se ensaya en general en paralelo con la muestra de control. El nivel de muestra de ensayo de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) pueden después compararse con el de la muestra de control para realizar el diagnóstico. Una muestra de control de un paciente enfermo también puede ensayarse en ciertas realizaciones. La referencia a controles permite identificar fácilmente niveles relativos ("altos", "bajos", etc.) de células que expresan CCR9 en la muestra de ensayo e interpretar su significación. La referencia a controles también

permite determinar niveles relativos de expresión de CCR9 (“altos”, “bajos”, etc.) dentro de la población celular e interpretar su significación. Dicha determinación puede indicar, por ejemplo, los niveles promedio de expresión de CCR9 por célula en la muestra de ensayo.

5 Por lo tanto, en realizaciones específicas, niveles altos o mayores de células que expresan CCR9, niveles altos o mayores de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 o niveles altos o mayores de expresión de CCR9, por ejemplo expresión de CCR9 promedio por célula o niveles altos o mayores de células CCR9^{hi} se correlacionan con enfermedad activa o enfermedad más activa. De forma similar, niveles bajos o menores de células que expresan CCR9, niveles bajos o menores de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 o niveles bajos o menores de expresión de CCR9, por ejemplo expresión de CCR9 promedio por célula o niveles bajos o menores de CCR9^{hi} pueden correlacionarse con una falta de inflamación o enfermedad activa. Esto puede definirse como “enfermedad menos activa”. Puede preverse fácilmente que puedan evaluarse muestras de control y niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) determinados por todo el rango de gravedades de SII. Esto puede ayudar a correlacionar los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) en la muestra de ensayo con la gravedad relativa de la afección.

20 Cuando se supervisa la progresión o se supervisa el tratamiento de SII las muestras de control pueden tomarse del sujeto en un modo temporal anterior. Pueden basarse, sin embargo, en valores de referencia conocidos como se ha analizado anteriormente. Por lo tanto, los niveles relativos de células que expresan CCR9, niveles relativos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles relativos de expresión de CCR9 incluyendo niveles relativos de expresión de CCR9 promedio por célula o niveles relativos de células CCR9^{hi} pueden ser con referencia a muestras tomadas del mismo sujeto en un punto temporal diferente. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de células que expresan CCR9, niveles reducidos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles reducidos de expresión de CCR9 incluyendo niveles reducidos de expresión de CCR9 promedio por célula o niveles reducidos de células CCR9^{hi} se correlacionan con tratamiento exitoso. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento adecuado, pero en realizaciones específicas es un tratamiento de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención.

35 Cuando se supervisa la progresión de SII, los niveles aumentados de células que expresan CCR9, niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles relativos aumentados de expresión de CCR9 incluyendo niveles relativos aumentados de expresión de CCR9 promedio por célula o niveles relativos aumentados de células CCR9^{hi} pueden indicar la progresión de afección o enfermedad. Por lo tanto, si los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9^{hi}) aumentan en una muestra tomada más tarde que una muestra del mismo paciente esto puede indicar progresión de la afección.

40 En ciertas realizaciones, EII o SII se diagnostica basándose en niveles de las células que expresan receptores de quimiocinas relevantes (u otras, es decir CD14 o HLA-DR en el caso de EII), tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7. Puede realizarse un diagnóstico positivo en sujetos basándose en la presencia de más de aproximadamente 10 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 95 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra. En otras realizaciones, EII o SII se diagnostica basándose en la presencia de un aumento aproximadamente 1,2 veces o mayor, tal como un aumento de aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o mayor en células que expresan receptores de quimiocinas, tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en relación con controles sanos.

55 En realizaciones específicas, SII se diagnostica basándose en los niveles de células que expresan CCR9. Puede realizarse un diagnóstico positivo basándose en la presencia de más de aproximadamente 8 %, más de aproximadamente 9 %, más de aproximadamente 10 %, más de aproximadamente 12 %, más de aproximadamente 15 % o más células que expresan CCR9 en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra.

60 En ciertas realizaciones, la progresión de EII o SII, que puede ser en el contexto de un régimen de tratamiento, se supervisa basándose en los niveles de células que expresan receptores de quimiocinas (u otros) en puntos temporales diferentes, tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7. La progresión de EII o SII puede indicarse en sujetos basándose en un aumento de más de aproximadamente 10 %, tal como un aumento de más de aproximadamente 15 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 25 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 35 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 45 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de

- aproximadamente 75 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la progresión de EII o SII se confirma basándose en la presencia de un aumento de aproximadamente 1,2 veces o mayor, tal como un aumento de aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o mayor en células que expresan receptores de quimiocinas, tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en relación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.
- En realizaciones específicas, SII se supervisa basándose en los niveles de células que expresan CCR9. La progresión de enfermedad, que puede ser en el contexto de un régimen de tratamiento, puede indicarse basándose en la presencia de más de aproximadamente 10 %, o más de aproximadamente 15 % o más células que expresan CCR9 en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra o por un aumento de más de aproximadamente 10 %, tal como más de aproximadamente 15 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 25 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 35 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 45 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 % o más células que expresan CCR9 en la muestra, como porcentaje de células totales de la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.
- La regresión o el tratamiento exitoso se pueden supervisarse basándose en reducciones similares sobre diversos puntos temporales. Por ejemplo, la regresión o el tratamiento exitoso puede indicarse en sujetos basándose en una reducción de aproximadamente 10 %, tal como una reducción de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, como porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior. En otras realizaciones, la regresión de EII o SII se confirma basándose en la presencia de una reducción de aproximadamente 1,2 veces o mayor, tal como una reducción de aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces mayor en células que expresan receptores de quimiocinas, tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en relación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.
- En realizaciones específicas, SII se supervisa basándose en los niveles de células que expresan CCR9. La regresión o el tratamiento exitoso de la enfermedad puede indicarse basándose en una reducción de aproximadamente 50 %, tal como una reducción de aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o más células que expresan CCR9 en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra o por una reducción de aproximadamente 10 %, tal como una reducción de aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra, en comparación con una muestra tomada del mismo sujeto en un punto temporal anterior.
- Ya que los niveles de células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, niveles de expresión de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 o niveles de células CD14^{hi}, HLA-DR^{hi}, CCR9^{hi} y/o CCR7^{hi} son diagnósticamente relevantes, la determinación de dichos niveles en una muestra obtenida de un sujeto puede influir en la selección del tratamiento para ese sujeto. En consecuencia, en ciertas realizaciones la invención proporciona un método para seleccionar un tratamiento adecuado para enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) que comprende determinar:
- los niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida de un sujeto, en la que altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en comparación con un control, dan como resultado selección de tratamiento con corticosteroides o una terapia de reducción de monocitos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). En ciertas realizaciones, las células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, son células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en gran medida, en particular, células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 en gran medida, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9.
- De forma similar, ya que los niveles de células que expresan CCR9, niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 o niveles de células CCR9^{hi} son diagnósticamente

relevantes, la determinación de dichos niveles en una muestra obtenida de un sujeto puede influir en la selección del tratamiento para ese sujeto. En consecuencia, se describe en el presente documento un método para seleccionar un tratamiento adecuado para SII que comprende determinar:

- 5 a) los niveles de células que expresan CCR9, particularmente niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9
- b) niveles de expresión de CCR9; y/o
- c) niveles de células con alta expresión de CCR9

10 en una muestra obtenida de un sujeto, en la que altos niveles de células que expresan CCR9, altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9, altos niveles de expresión de CCR9 o altos niveles de células con alta expresión de CCR9 o niveles aumentados de células que expresan CCR9 en comparación con el control, niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9 en comparación con el control, niveles aumentados de expresión de CCR9 en comparación con un control o niveles aumentados de células con alta expresión de CCR9 en comparación con un control, dan como resultado la selección de un tratamiento como se define en el presente documento para el tratamiento del SII. Las células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, puede ser células que expresan receptores, incluyendo receptores de quimiocinas, en gran medida, en particular, células que expresan CCR9 en gran medida, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR9.

20 En realizaciones específicas, EII o SII se trata basándose en la medición de niveles de células que expresan receptores de quimiocinas (u otros) tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7. Por lo tanto, un tratamiento como se describe en el presente documento puede aplicarse basándose en la presencia de más de aproximadamente 10 %, más de aproximadamente 20 %, más de aproximadamente 30 %, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 55 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 65 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 95 % o más células que expresan receptores de quimiocinas en la muestra, como porcentaje de células totales en la muestra. En otras realizaciones, se trata EII o SII de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención basándose en la presencia de un aumento de aproximadamente 1,5 veces o más, tal como un aumento de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 20, 50 o 100 veces o más en células que expresan receptores de quimiocinas (u otros), tales como células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, en relación con controles sanos.

35 En ejemplos específicos, SII se trata basándose en la medición de niveles de células que expresan CCR9. Una decisión positiva para tratar al sujeto puede tomarse basándose en la presencia de más de aproximadamente 10 %, o más de aproximadamente 15 % o más células que expresan CCR9 en la muestra, como un porcentaje de células totales en la muestra.

40 Para evitar dudas, todas las realizaciones descritas con respecto a los métodos de las diversas realizaciones de la invención se aplican a estos aspectos cambiando lo que deba cambiarse y no se repiten por razones de concisión. Específicamente, la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) puede indicarse junto con los siguientes indicadores:

45 El diagnóstico puede basarse en parámetros clínicos conocidos para EII. Puede realizarse evaluación histopatológica para determinar CU o EC. Para estadificación de la inflamación la determinación de células proinflamatorias y expresión de receptores de quimiocinas puede proporcionar orientación para el tratamiento apropiado tal como leucoféresis adaptada, como se describe en el presente documento.

50 Los inventores han mostrado que los niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9 pueden ligarse a éxito mejorado con ciertos tratamientos para enfermedad inflamatoria del intestino. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tratamiento puede seleccionarse de un tratamiento de inmunosupresión o una terapia de reducción de monocitos. Más específicamente, el tratamiento de inmunosupresión puede comprender un tratamiento con corticosteroides.

55 Los métodos y usos médicos de las diversas realizaciones de la invención pueden por lo tanto adaptarse a la necesidad de pacientes individuales o grupos de pacientes basándose en los diversos métodos de diagnóstico de las diversas realizaciones de la invención. Retirando de la circulación células que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7, tales como monocitos, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que expresan CCR7 o CCR9 o tanto CCR7 como CCR9, regulado positivamente en diversas afecciones inflamatorias asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), un factor importante en el proceso inflamatorio de la enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) puede controlarse. De forma similar, los métodos y usos médicos de las diversas realizaciones de la invención pueden por lo tanto adaptarse a la necesidad de pacientes individuales o grupos de pacientes basándose en los diversos métodos de diagnóstico de las diversas realizaciones de la invención. Retirando de la circulación células que expresan CCR9, tales como monocitos, en particular monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o monocitos que

expresan CCR9, regulados positivamente en SII, puede controlarse un factor importante en el proceso inflamatorio de SII.

5 Las diversas realizaciones de la invención se describirán ahora en más detalle en referencia a las siguientes realizaciones y ejemplos no limitantes:

Descripción de las figuras

10 **Figura 1.** Diagramas de citometría de flujo representativas que muestran las estrategias de activación usadas en todo el estudio para las poblaciones de monocitos CD14+HLA-DRhi (abajo a la izquierda), CD14loCD16+ (abajo en el centro) y CD14+CD16- (abajo a la derecha).

15 **Figura 2. Los monocitos CD14+HLA-DRhi aumentan y se correlacionan con actividad de enfermedad en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.**

(A) Frecuencia de monocitos CD14+HLA-DRhi en sangre periférica de pacientes con EII en comparación con controles, como se determina por citometría de flujo. Las barras representan los valores medios \pm ETM de los controles (n = 11) y los pacientes (n = 31) con colitis ulcerosa activa (n = 20, UC-DAI 6-12) o enfermedad de Crohn (n = 11, HBI 8-16) (p = 0,006).
 20 (B) Análisis de regresión de monocitos CD14+HLA-DRhi y actividad de enfermedad clínica en pacientes con colitis ulcerosa (p = 0,024; r² = 0,072). Los datos representan medidas (n = 84) de 28 pacientes únicos en puntos temporales diferentes durante el tratamiento.
 (C) Análisis de regresión de monocitos CD14+HLA-DRhi y actividad de enfermedad clínica en pacientes con enfermedad de Crohn (p = 0,016; r² = 0,190). Los datos representan las medidas (n = 29) de 11 pacientes
 25 únicos en puntos temporales diferentes durante el tratamiento.

30 **Figura 3. Los monocitos CD14+HLA-DRhi son dianas para terapia en EII.** Niveles de monocitos CD14+HLA-DRhi en pacientes con EII durante el tratamiento con (A) aféresis de GMA (n = 18), (B) corticosteroides (n = 16) o (C) terapia biológica anti TNF- α (n = 14). Se incluyen niveles de referencia de pacientes de control (n = 11) en todas las gráficas. (D) pacientes con EII que recibieron terapia de GMA o corticosteroides, divididos en pacientes en remisión (n = 12) y sin remisión (n = 7) así como controles sanos (n = 11). Las barras de error representan valores medios de grupo \pm ETM.

35 **Figura 4. Los monocitos CD14+HLA-DRhi producen altos niveles de mediadores inflamatorios.**

(A) Diagramas de citometría de flujo representativos que describen pureza de CD14+HLA-DRhi y CD14+HLADRlo después de clasificación de citometría de flujo.
 (B) Análisis por PCR de TNF- α en monocitos CD14+HLA-DRhi después de activación de LPS durante 2 horas (n = 4, p = 0,0047).
 40 (C) Agrupamiento funcional de transcritos diana de análisis de matrices de PCR de monocitos CD14+HLADRhi y CD14+HLA-DRlo de tres donantes sanos independientes después de activación de LPS durante 6 h.
 (D) Los 20 transcritos diana que representan la regulación positiva y negativa más fuerte en análisis de matrices de PCR de monocitos en CD14+HLA-DRhi en comparación con la población de CD14+HLADRlo
 45 después de activación de LPS durante 6 h. Los factores de cambio varían entre 347,3-10,9 y -10,3-232,3, respectivamente.

50 **Figura 5. La expresión de receptor de quimiocinas relativa en monocitos CD14+HLA-DRhi.** (A) El subconjunto de CD14+HLA-DRhi se distingue de monocitos CD14loCD16+ y CD14+CD16- por su expresión de CCR7 y CCR9. (B) Receptores de quimiocinas cuyos niveles de expresión no diferencian la población de CD14+HLA-DRhi. (C) Tinción de control que muestra la diferencia en la expresión de CD16 y HLA-DR así como la morfología definida por aparición de dispersión lateral (SSC) y dispersión frontal (FSC) entre las poblaciones de monocitos analizadas en este estudio. Los datos presentados son de un paciente con EII representativo.

55 **Figura 6. Ensayo de interacción funcional de CCR9-CCL25 en monocitos CD14+HLA-DRhi.** Agotamiento de monocitos CD14+HLA-DRhi que expresan CCR9 de pacientes con EII usando microperlas recubiertas con CCL25 (n = 5; p = 0,0112).

60 **FIGURA 7a, 7b y 7c.** La unión de CCL25 biotinilado por linfocitos T CD4+, CD8+ y monocitos CD14+ respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un donante sano;

FIGURA 8a, 8b y 8c. La unión de CCL25 biotinilado por linfocitos T CD4+, CD8+ y monocitos CD14+ respectivamente, obtenidos de sangre periférica de un paciente con EC;

65 **FIGURA 9.** La carcasa de plástico y parte superior que muestra la placa de distribución (2) y unidades de filtros de seguridad (3 y 4).

FIGURA 10. El sistema de leucoféresis general.

FIGURA 11. La bomba con detector de aire y detector óptico (4).

5 **FIGURA 12.** Agotamiento de poblaciones de células que expresan CCR9 en un donante de sangre. Las poblaciones celulares totales no están afectadas después del pase de columna.

FIGURA 13. Agotamiento de poblaciones celulares que expresan CCR9 en un paciente con EII. Las poblaciones celulares totales no están afectadas después del pase de columna.

10 **FIGURA 14.** HPLC de Biotina-TECK (Nleu) plegada purificada.

FIGURA 15. Datos de ionización por electropulverización con espectrometría de masas en tándem (ES/MS) de Biotina-TECK (Nleu). plegada purificada.

15 **FIGURA 16.** Ejemplo de criterios de activación para monocitos que expresan CCR2.

FIGURA 17. Expresión de monocitos que expresan CCR9 en siete pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y en 20 controles sanos (CS). Se analizó sangre de pacientes con EC y controles sanos para la expresión de diversos receptores de quimiocinas por citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

20 **FIGURA 18.** Unión de la quimiocina bTECK (CCL25) con monocitos de un paciente con enfermedad de Crohn. Se incubó sangre de un paciente con EC con bTECK y se analizó con citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

25 **FIGURA 19.** Agotamiento de monocitos que expresan CCR9 con matriz de Estreptavidina de sepharose conjugada con bTECK. Las células sanguíneas de un paciente con EC se incubaron con matriz de Estreptavidina de Sepharose-bTECK. Se recuperaron las células no unidas lavando la matriz con solución salina tamponada con fosfato. Las células (después del agotamiento) se analizaron después con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz-bTECK (Antes del Agotamiento).

30 **FIGURA 20.** Los monocitos que expresan CCR9 muestran un 80 % de expresión de HLADRhi. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

35 **FIGURA 21.** Expresión de monocitos que expresan CCR9 en 2 pacientes con Síndrome del Intestino Irritable (SII) y en 20 controles sanos (CS). Se analizó sangre de pacientes con SII y controles sanos con respecto a la expresión de diversos receptores de quimiocinas por citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

40 **FIGURA 22.** Unión de la quimiocina bTECK (CCL25) con monocitos de un paciente con SII. Se incubó sangre de un paciente con SII con bTECK y se analizó con citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

45 **FIGURA 23.** Agotamiento de monocitos que expresan CCR9 con matriz de Estreptavidina de Sepharose conjugada con bTECK. Se incubaron células sanguíneas de un paciente con SII con matriz de Estreptavidina de Sepharose-bTECK. Se recuperaron las células no unidas lavando la matriz con solución salina tamponada con fosfato. Las células (después del agotamiento) se analizaron después con citometría de flujo y se compararon con células que no se habían incubado con matriz-bTECK (Antes del Agotamiento).

50 **FIGURA 24.** Expresión de monocitos que expresan CCR9 en 4 pacientes con Colitis Ulcerosa (CU), 2 pacientes con Síndrome del Intestino Irritable (SII) y 8 pacientes con Enfermedad de Crohn (Crohn). Se analizó la sangre de pacientes con respecto a la expresión de diversos receptores de quimiocinas por citometría de flujo. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

55 **FIGURA 25a.** Los monocitos que expresan CCR9 muestran un 25 % de expresión de HLADRhi.

FIGURA 25b. Los monocitos que expresan CCR9 que también tienen una alta expresión de HLADR pueden agotarse con matriz de sepharose conjugada con bTECK. Los monocitos se caracterizaron como células positivas para CD14.

60 **Descripción de realizaciones preferidas**

Ejemplo 1 monocitos sanguíneos CD14+HLA-DRhi que expresan CCR9 promueven la inflamación intestinal en EII

65 **Introducción**

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) (enfermedades inflamatorias del intestino, EII) son trastornos crónicos, inflamatorios, del tracto gastrointestinal que resultan de un equilibrio alterado entre el sistema inmunitario de la mucosa y la flora comensal. Hasta la fecha, la patofisiología inmunológica detrás de las EII sigue entendiéndose escasamente. Tradicionalmente, se ha creído que la inmunidad adaptativa desempeña un papel importante en la aparición de EII. Los estudios en pacientes y modelos animales han mostrado que la EC está conducida por señalización de T auxiliar 1 con producción de IL-12 e IFN- γ , mientras que la CU está caracterizada por respuestas de T auxiliar 2 e IL-13. (1) Sin embargo, el paradigma Th1/Th2 se ha cuestionado durante la última década. (2) Desde el descubrimiento del locus de susceptibilidad de *NOD2/CARD15* que codifica un receptor de reconocimiento de patrón expresado principalmente en células dendríticas y monocitos, la atención de la investigación de EII se ha desplazado hacia la inmunidad innata. (3, 4) En la actualidad, se cree que los mecanismos innatos son responsables de la aparición de inflamación de la mucosa aguda en individuos genéticamente susceptibles, mientras que el estado crónico podría mantenerse por elementos adaptativos. (5)

Los monocitos son leucocitos derivados de médula ósea de linaje mieloide que migran al tejido y se diferencian en macrófagos o células dendríticas (CD). Se han demostrado tasas de renovación aumentadas y niveles elevados de monocitos en circulación en EII (6, 7). Además, los monocitos tienen la capacidad de migrar a la mucosa inflamada y mediar en inflamación, pero el fenotipo de estos monocitos así como los mecanismos que subyacen a su relocalización sigue sin dilucidarse. (8-10) En la actualidad, se han caracterizado dos subpoblaciones de monocitos humanos. Se ha demostrado que las células CD14+CD16⁻ producen la citocina reguladora IL-10 y se denominan más habitualmente monocitos clásicos. El subconjunto CD14^{lo}CD16⁺ se caracteriza por la producción de citocinas proinflamatorias así como expresión alta en superficie de marcadores inflamatorios tales como CD43. (11-13) Sin embargo, se ha observado últimamente un mayor grado de heterogeneidad entre poblaciones de monocitos humanos con respecto a su expresión de antígeno superficial. (14) Se ha demostrado que la expresión de HLA-DR de monocitos desempeña un papel importante en afecciones caracterizadas por respuestas inmunitarias contra agentes bacterianos. (15, 16) Aunque se ha indicado que el subconjunto CD14+CD16⁻ expresa HLA-DR, la contribución específica de monocitos CD14+HLA-DR^{hi} a la inflamación intestinal no se ha estudiado. Ya que se ha establecido bien que la inducción de colitis en ser humano así como modelos animales requiere la presencia de bacterias, los inventores determinaron estudiar monocitos CD14+HLA-DR^{hi} en pacientes con inflamación intestinal crónica. (17)

Materiales y métodos

Pacientes

En total, se incluyeron 51 pacientes con EII (CU = 31, EC = 20) en este estudio (Tabla 1). Los pacientes se supervisaron durante el tratamiento con corticosteroides (n = 16), los anticuerpos anti TNF- α infliximab o adalimumab (Remicade® o Humira®; n = 17) o aféresis de Granulocitos/Monocitos (GMA, Adacolumn®; n = 18). Se recogieron de cuatro a seis biopsias de recto y sigmoide afectados junto con muestras sanguíneas antes del inicio del tratamiento, seguido de toma de muestras semanales durante cuatro semanas consecutivas. Los pacientes se evaluaron usando los índices de UC-DAI (CU) y Harvey-Bradshaw (HBI; EC). La remisión clínica se revisó en la semana 11 después del tratamiento y se definió como <3 para UC-DAI y <5 para HBI. (8, 41) Se incluyeron catorce controles sin EII en el estudio. Todos los pacientes se admitieron mediante consentimiento formal y el estudio lo aprobó el comité de ética regional.

Aislamiento y activación de leucocitos

Para estudios de citometría de flujo, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre completa heparinizada por incubación en tampón hipotónico (NH₄Cl 160 mM, Tris-HCl 10 mM, pH = 7,4). Para PCR y experimentos de agotamiento de CCL25, se obtuvieron PBMC de capas leucocíticas de donantes sanos anti coaguladas mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque (GE Healthcare). Para experimentos de PCR, se aislaron negativamente monocitos CD14⁺ usando el Kit de Aislamiento de Monocitos II (Miltenyi Biotec). Los monocitos se activaron posteriormente con LPS (lipopolisacárido; Sigma) (200 ng/ml/10⁶ células) durante 2 h (PCR de TNF- α) o 6 h (matriz de PCR) en medio RPMI (Hyclone) complementado con L-glutamina 1 % y PEST (penicilina-estreptomina) 1 %.

Citometría de flujo

Las PBMC se tiñeron con respecto a análisis de citometría de flujo o se clasificaron usando combinaciones de los conjugados de anticuerpos descritos en la Tabla 2. Todas las tinciones se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el conjugado de anticuerpo respectivo. Se usó un control de isotipo de IgG2a-FITC (BD Biosciences) para definir la positividad de CCR9. Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo y experimentos de clasificación usando un citómetro de FACSAria y se analizaron datos usando software FACSDiva (BD Biosciences).

Experimentos de PCR

Para experimentos de PCR de TNF- α , se realizó aislamiento de ARN usando reactivo TRIZOL (Invitrogen). Para el experimento de CCL25, se recogieron biopsias intestinales mediante sigmoidoscopia flexible de pacientes con CU y se sumergieron inmediatamente en RNAlater (Ambion). Se aisló posteriormente ARN usando Mini Kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para los experimentos de TNF- α y CCL25, se incluyeron 100 ng de ARN por muestra en una reacción de transcriptasa inversa usando kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). Para análisis de matrices de PCR, se aisló ARN de poblaciones de CD14+HLA-DRhi y CD14+HLA-DRlo clasificadas usando Mini Kit RNeasy (Qiagen). Para cada una de las poblaciones analizadas, se agruparon cantidades iguales de ARN de tres donantes independientes y se sintetizó ADNc usando el Kit de Primera Cadena RT2 (SABiosciences) de 150 ng de ARN. Posteriormente, se puso ADNc en una reacción de Mezcla Maestra de qPCR RT2 (SABiosciences) y se cargó en una placa de matriz de PCR de 96 pocillos de Respuesta Inflamatoria Humana y Autoinmunidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SABiosciences). En todos los experimentos de PCR, se realizó PCR cuantitativa en un sistema óptico iCyclerIQ usando supermezcla de IQ SYBR Green 2x y Software del Sistema Óptico iCycler IQ v3.1 (Bio-Rad) para recuperación de datos. En los experimentos de TNF- α y CCL25, se normalizaron los niveles de expresión para ARN polimerasa II usando los métodos de 2-_{Ct} (TNF- α , Figura 4B) o 2-_{Ct} (CCL25, Figura complementaria 1B). Los cebadores usados fueron TNF- α directo (5'-CTCTCTCCCTGGAAAGGAC-3'); TNF- α inverso (5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'); CCL25 directo (5'-AAGGTTTTTGCAAAGCTCCA-3'); CCL25 inverso (5'-TACTGCTGCTGATGGGATTG-3'); RPII directo (5'-GCACCACGTTCCAATGACAT-3'); RPII inverso (5'-GTGCGGCTGCTTCCATAA-3'). Para análisis de matrices de PCR, los niveles de expresión se normalizaron con respecto a la media aritmética de la expresión de los genes constitutivos B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH y ACTB usando el método de 2-_{Ct}.

Ensayo de agotamiento de CCL25

Se unió CCL25 biotilada (Almac Sciences) a un soporte sólido que consistía en una matriz de estreptavidina-sepharose (GE Healthcare). Se perfundieron PBMC de seis donantes sanos a través del dispositivo y se analizó la expresión de CCR9 antes y después de usar citometría de flujo.

Análisis estadísticos

Todos los análisis de grupo se llevaron a cabo usando ensayo de t de Student dependiente de dos colas (Figuras 2-4 y 6, Figura complementaria 1) o ensayo de t de Student independiente de dos colas (Figura 3). Se realizaron análisis de regresión usando ensayo de regresión ordinal para datos no paramétricos (Figura 2B-C). Todos los cálculos se llevaron a cabo en software GraphPad Prism v5 (GraphPad Software, Inc.). Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron significativos y se representan de la siguiente manera: $p \leq 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$. En todas las figuras, las barras de error representan \pm ETM.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Evaluación de Ética Regional de Estocolmo en Estocolmo, Suecia (<http://www.epn.se>). La aprobación ética se aplica a todos los centros de los que se reclutaron los pacientes (South Hospital, Estocolmo, Suecia, Karolinska Hospital, Estocolmo, Suecia, Danderyd Hospital, Estocolmo, Suecia). Todos los pacientes se admitieron mediante consentimiento escrito formal.

Resultados

La frecuencia de monocitos CD14+HLA-DRhi se correlaciona con actividad de enfermedad clínica en colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn

Para investigar el papel de monocitos CD14+HLA-DRhi en los pacientes con EII, se usó citometría de flujo para identificar la población en sangre periférica (Figura 1). Cuando se analizó sangre de pacientes y controles se descubrió que la inflamación activa en el colon se correlacionaba con una frecuencia significativamente mayor de estos monocitos en comparación con el grupo de control (Figura 2A, $p=0,006$).

Para evaluar la correlación entre los niveles de monocitos y la actividad de enfermedad, se llevaron a cabo análisis de regresión de frecuencia de CD14+HLA-DRhi frente a dos índices de actividad de enfermedad habitualmente usados para la evaluación de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, respectivamente. Se pudo observar una correlación significativa con la actividad de enfermedad tanto en CU (UCDAI) (Figura 2B; $p=0,0137$, $r^2=0,072$) como EC (Harvey-Bradshaw) (Figura 2C, $p=0,0182$, $r^2=0,1889$). Por lo tanto, la frecuencia de monocitos CDLA+HLA-DRhi proinflamatorios en circulación se correlaciona con índices de actividad de enfermedad establecidos de EII.

Los monocitos CD14+HLA-DRhi son dianas terapéuticas potenciales y marcadores de inflamación en colitis

A continuación, se investigó si la población CD14+HLA-DRhi se vio afectada por terapia de EII convencional. Los pacientes con inflamación intestinal activa que recibieron corticosteroides o anticuerpos anti TNF- α (infliximab o

adalimumab) se supervisaron durante cinco semanas consecutivas. Un grupo de tratamiento tratado con aféresis de granulocitos/monocitos se incluyó para comparación considerando la retirada selectiva de monocitos asociados con Adacolumn®. (18) Cuando se representan estos regímenes de tratamiento por separado, el grupo de pacientes que recibió terapia de GMA representó la reducción más prominente (Figura 3A). La población de monocitos también estaba ya atenuada después de una semana de terapia entre pacientes con corticosteroides. La supresión se mantuvo, alcanzando niveles muy por debajo de los de pacientes de control sanos en la semana 4 (Figura 3B, $p < 0,05$). La población reducida de CD14+HLA-DRhi durante el tratamiento no se vio influida por el diagnóstico de CU o EC, extensión de la enfermedad en el colon, tratamiento con azatioprina simultáneo o el sexo (datos no mostrados). Resulta interesante que la terapia biológica con anticuerpos contra TNF- α no afectó significativamente a la proporción de monocitos CD14+HLA-DRhi (Figura 3C). Entre estos pacientes, CD14+HLADRhi nunca alcanzó el nivel de referencia observado en los controles.

Finalmente, se investigó si la población CD14+HLA-DRhi se vio afectada selectivamente en pacientes que conseguían remisión a largo plazo en la semana 11 después del tratamiento. Entre los pacientes que recibieron corticosteroides o aféresis de GMA, la población de monocitos se redujo significativamente en los que posteriormente consiguieron o mantuvieron remisión. Esto no se observó entre los pacientes sin remisión (Figura 3D).

Monocitos CD14+HLA-DRhi producen altos niveles de mediadores inflamatorios

Con el fin de investigar la capacidad de monocitos CD14+HLA-DRhi para producir mediadores inflamatorios, se cultivaron monocitos de donantes de sangre sanos en presencia de lipopolisacárido (LPS). La población de HLA-DRhi y su homólogo CD14+HLA-DRlo se clasificaron posteriormente con citometría de flujo (Figura 4A). Las dos poblaciones celulares se investigaron con respecto a la producción de la citocina proinflamatoria TNF- α . Resulta interesante que la población CD14+HLA-DRhi produjo niveles aumentados 500 veces de transcritos de TNF- α tras estimulación con LPS en comparación con las células CD14+HLA-DRlo (Figura 4B). Además, se llevaron a cabo análisis de matrices de PCR en monocitos CD14+HLA-DRhi clasificados de tres donantes independientes después de activación con LPS para establecer el fenotipo distintivo de la población. De acuerdo con la hipótesis de los inventores varios transcritos génicos descritos como implicados en las respuestas inmunitarias mediadas por monocitos estaban regulados positivamente en los monocitos CD14+HLA-DRhi. Se descubrió principalmente expresión génica aumentada entre citocinas quimiotácticas y genes implicados en la respuesta inmunitaria humoral (Figura 4C; tabla Complementaria). El factor de cambio de diferencia más prominente entre los monocitos CD14+HLADRhi y los CD14+HLA-DRlo se observó para la citocina quimiotáctica CCL4. El transcrito con la regulación negativa más evidente entre monocitos HLA-DRhi fue el gen de HDAC4 que codifica una histona desacetilasa que actúa como un represor de la transcripción. (19) Juntos, estos datos muestran que los monocitos CD14+HLA-DRhi tienen fuerte potencial proinflamatorio.

Los monocitos CD14+HLA-DRhi expresan el receptor de quimiocinas que se dirige al intestino GCR9

A continuación, se estudió la expresión en superficie de diversos receptores de quimiocinas en monocitos CD14+HLA-DRhi en relación con los subconjuntos CD14+CD16- y CD14loCD16+. Aunque se pudo observar un solapamiento significativo entre muchos de estos marcadores con respecto a su expresión en los subconjuntos respectivos, la población CD14+HLA-DRhi se distinguió claramente por su expresión de CCR7 y CCR9 (Figura 5A). CCR7 se describe principalmente como un receptor que se dirige a ganglios linfáticos para células dendríticas y linfocitos T auxiliares, y no se ha indicado previamente que se expresen en monocitos en circulación. (20) Se ha mostrado que CCR9 es importante en la dirección de linfocitos al intestino mediante interacciones con su ligando CCL25, expresado en la mucosa intestinal. (21, 22) Aunque se han caracterizado bien interacciones CCR9-CCL25 en linfocitos T auxiliares, su papel en monocitos no está claro. La población de monocitos CD14+ general mostró expresión de CCR9 significativamente mayor en comparación con linfocitos T CD4+, que junto con linfocitos T CD8+ se han descrito como los principales tipos celulares que expresan CCR9 ($p < 0,05$; Figura complementaria 1A). (23) Cuando se compara la expresión de CCR9 en monocitos CD14+HLA-DRhi con CD14loCD16+ y CD14+CD16-, el subconjunto de HLA-DRhi presentó niveles significativamente aumentados (Figura 5A). Por el contrario, la expresión de CCR2, un receptor de quimiocinas responsable de la migración de monocitos general, no aumentó en los monocitos HLA-DRhi lo que indica que el fenotipo que se dirige al intestino constituye una característica específica de los monocitos en lugar de reflejar la activación inmunológica general (Figura 5B). (24) También se analizaron biopsias tisulares de mucosa colónica con PCR en tiempo real y se descubrió que el ligando de CCR9, CCL25/TECK, se expresaba en el colon (Figura complementaria 1B). Para establecer una interacción funcional entre CCL25 y CCR9, se llevaron a cabo experimentos de agotamiento mediante perfusión de células sanguíneas periféricas a través de un soporte sólido que contenía perlas de sepharose recubiertas con CCL25. La frecuencia de monocitos CD14+HLA-DRhi positivos para CCR9 se redujo significativamente después del encuentro con las perlas de sepharose recubiertas con CCL25, lo que muestra que CCR9 en los monocitos CD14+HLA-DRhi podría unirse con CCL25 y retirarse de la sangre ($p < 0,05$; Figura 6). En conclusión, los monocitos CD14+HLA-DRhi proinflamatorios expresan altos niveles del receptor de quimiocinas que se dirige al intestino CCR9 que los dirige al sitio de inflamación de la mucosa.

Discusión

En este estudio, se identifican monocitos sanguíneos CD14+HLA-DRhi que expresan CCR9 como un participante importante en la inflamación intestinal. La expresión de HLA-DR en monocitos es vital para la respuesta inflamatoria y se ha mostrado que determina la eficacia de la presentación de antígenos a linfocitos T auxiliares. (25, 26) También se ha mostrado que los monocitos con alta expresión de HLA-DR se infiltran en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide, y enfermedad inflamatoria tratada con éxito con anticuerpos de TNF- α (27). Además, portar el alelo del HLA de clase II-DRB1*0103 también se correlaciona con un riesgo aumentado de desarrollar colitis ulcerosa. (28)

Varios estudios han sugerido que los monocitos en sí mismos son objetivos de terapia de EII convencional. (6, 29, 30) Los resultados de los inventores sugieren que la regulación negativa específica de la subpoblación de HLA-DRhi puede ser un mecanismo importante detrás de la resolución de la inflamación. En este estudio, se añadieron pacientes tratados con aféresis de granulocitos/monocitos para comparación ya que la Adacolumn® es el único tratamiento que se dirige específicamente a monocitos en circulación. Estas células se retiran mediante unión del receptor de Fc γ a las perlas de acetato de celulosa en la columna, dejando los linfocitos T en circulación no afectados. (18) La terapia de corticosteroides media en una reducción en el número de monocitos CD14+HLA-DRhi en circulación que es comparable a GMA (Figura 3B). Esta supresión parece ser importante para la inducción de remisión, ya que se observa reducción significativa de monocitos CD14+HLA-DRhi solamente en los pacientes que consiguen remisión a largo plazo (Figura 3D). Resulta interesante que los pacientes sometidos a tratamiento biológico no presentaran una reducción de monocitos proinflamatorios (Figura 3C). Los inventores especulan que retirando TNF- α , uno de los principales productos de estos monocitos, podrían inducirse mecanismos de retroalimentación autocrinos que condujeran a la activación celular. La observación subraya la diferencia en el modo de acción entre anticuerpos anti TNF- α y corticosteroides y debería investigarse adicionalmente ya que el fracaso anti TNF- α puede depender parcialmente de la producción de monocitos de quimiocinas proinflamatorias adicionales, citocinas y receptores de integrina que contrarresten la supresión de TNF- α .

De forma clásica, las poblaciones de leucocitos se han definido por su capacidad para producir mediadores inflamatorios tales como citocinas y quimiocinas. Para obtener un entendimiento funcional de cómo los monocitos CD14+HLA-DRhi median en la inflamación, se investigó su potencial proinflamatorio en el nivel de ARNm en comparación con su homólogo que expresa HLA-DRlo. En este contexto, el subconjunto de HLA-DRhi produjo niveles notablemente elevados de transcritos génicos asociados con activación y fenotipo proinflamatorio. La población presentó un aumento de 500 veces de niveles de transcrito de TNF- α , lo que establece el subconjunto de HLA-DRhi como uno de los productores más importantes de esta citocina. También se investigaron otros genes por análisis de matrices de PCR, revelando la mayor regulación positiva en CCL4, CCL3 e IL-1 β , todas citocinas que se ha descrito previamente que están implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias a la mucosa intestinal en EII (Figura 4D). (31-35) La diferencia más prominente se observó en el gen de CCL4/MIP-1 β , con niveles de transcrito regulados positivamente de más de 300 veces. El papel inflamatorio de CCL4 se presentó por Bystry y colaboradores; se demostró que los linfocitos T auxiliares activados migraban eficazmente hacia un gradiente tisular de CCL4 mediante interacción con CCR5. (31) Por lo tanto, el hallazgo de que produjeron transcritos de CCL4 a altos niveles por monocitos CD14+HLA-DRhi apoya su potencial inflamatorio. (36) El transcrito con la regulación negativa más evidente en monocitos HLA-DRhi fue el gen de HDAC4 que codifica una histona desacetilasa que actúa como un represor de la transcripción. (19) Juntos, estos datos indican que CD14+HLA-DRhi es un subconjunto transcripcionalmente activo que expresa fácilmente genes importantes para mediar en respuestas inmunitarias de la mucosa.

En el nivel de superficie, los monocitos CD14+HLA-DRhi solamente expresan parcialmente CD16, lo que sugiere que la población constituye un subconjunto separado que no se incluye en su totalidad cuando se definen monocitos proinflamatorios mediante su expresión de CD14loCD16+ (Figura 5C). La población se define adicionalmente por su expresión de CCR7 y el receptor que se dirige al intestino CCR9, que distingue claramente monocitos HLA-DRhi de los subconjuntos CD14+CD16- y CD14loCD16+ (Figura 5).

En el contexto de la inflamación intestinal, las interacciones entre linfocitos T que expresan CCR9 y CCL25 (TECK) expresado en el epitelio del intestino se han implicado como un mecanismo importante para reclutar linfocitos en circulación a la mucosa intestinal. (21) Sin embargo, nunca se ha estudiado si este mecanismo también se aplica para la infiltración extensiva de monocitos sanguíneos a la mucosa intestinal observada durante la inflamación. (37) Se ha mostrado recientemente que monocitos que expresan CCR9 aumentan en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide. Sin embargo, el papel de estas células en EII permanece poco claro. De acuerdo con los resultados de este estudio, se muestra que los subconjuntos de CD14+CD16- y CD14loCD16+ expresan niveles similares de CCR9. (38) Estos niveles se superaron notablemente por la expresión de CCR9 en monocitos CD14+HLA-DRhi (Figura 5A). Sorprendentemente, esta expresión fue considerablemente mayor que la observada en linfocitos T, que se considera que es el principal tipo celular portador de CCR9 (Figura complementaria 1A). (23) Por el contrario, la expresión de CCR2, otro receptor de quimiocina importante para la relocalización de monocitos en varios grupos de enfermedad, no aumentó en monocitos HLA-DRhi (Figura 5B). (24) Esto sugiere que el aumento específico de la expresión de CCR9 entre CD14+HLA-DRhi puede reflejar un fenotipo específico del intestino, en lugar de un subconjunto activado en general. Se descubrió que el ligando para CCR9, CCL25 se expresaba en tejido

de la mucosa por análisis de QT-PCR, lo que está apoyado por otros informes que identifican CCL25 en el colon (Figura complementaria 1B). (22, 39) En conclusión, estos datos sugieren que los monocitos en general y CD14+HLA-DRhi en particular poseen la capacidad de relocalizarse a la mucosa intestinal mediante interacciones CCR9-CCL25.

5 Se ha mostrado que los linfocitos T adquieren su expresión de CCR9 mediante impronta dependiente de ácido retinoico por células dendríticas de ganglios linfáticos mesentéricos. (40) El problema de si la expresión de CCR9 en monocitos se adquiere mediante mecanismos similares parece controvertido, especialmente ya que no se conoce que los monocitos sanguíneos viajen a los ganglios linfáticos en el mismo grado que los linfocitos T. Aquí, los
10 inventores muestran que los monocitos CD14+HLA-DRhi se definen por su alta expresión de CCR7, un marcador principalmente descrito como un receptor de dirección a ganglios linfáticos para células dendríticas y linfocitos T auxiliares (Figura 5A). (20) Por lo tanto, es tentador especular que los monocitos CD14+HLA-DRhi que expresan CCR7 viajan a los ganglios linfáticos en un mayor grado de lo que se conocía previamente, y que puede producirse
15 impronta de CCR9 en estos monocitos mediante mecanismos similares a los presentados en linfocitos T. Más allá del alcance del presente estudio, es necesario abordar en el futuro los mecanismos detrás de la inducción de CCR9 en monocitos, así como el papel funcional de su expresión de CCR7.

En este estudio, se ha mostrado que los monocitos sanguíneos CD14+HLA-DRhi aumentan en pacientes con inflamación intestinal activa, y se correlacionan con gravedad de enfermedad como se define por los índices de actividad de enfermedad UC-DAI y HBI. Además, estos monocitos producen cantidades importantes de mediadores inflamatorios y expresan altos niveles del receptor que se dirige al intestino CCR9. En resumen, estos hallazgos indican que los monocitos sanguíneos CD14+HLA-DRhi desempeñan un papel importante en EII y que están altamente motivados estudios futuros que evalúen estos monocitos como dianas específicas para terapia de EII.

25 Referencias

1. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 521-533
2. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, *et al.* Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of
30 Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1997; 113: 118-126
3. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature.* 1996; 379: 821-823
4. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001; 411: 599-603
- 35 5. Arseneau KO, Tamagawa H, Pizarro TT, *et al.* Innate and adaptive immune responses related to IBD pathogenesis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2007; 9: 508-512
6. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, *et al.* Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103: 1210-1216
7. Mahida YR, Wu KC, Jewell DP. Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory
40 bowel disease. *Gut.* 1989; 30: 1362-1370
8. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, *et al.* A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2007; 132: 763-786
9. Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, *et al.* Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut.* 1994; 35: 669-674
- 45 10. Smythies LE, Maheshwari A, Clements R, *et al.* Mucosal IL-8 and TGF-beta recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 2006;80:492-499
11. Feng G, Lu J, Gross J. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Med.* 2004; 99: 255-267
12. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, *et al.* Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood.* 1996; 87: 373-377
- 50 13. Beige KU, Dayyani F, Horelt A, *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002; 168: 3536-3542
14. Tallone T, Turconi G, Soldati G, *et al.* Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4: 211-219
- 55 15. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, *et al.* Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect.* 2010; 60: 224-228
16. Fu Q, Cui N, Yu W, *et al.* Percentages of CD4+ T regulatory cells and HLA-DR expressing monocytes in severe intra-abdominal infections. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42: 475-478
17. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11: 648-656
- 60 18. Saniabadi AR, Hanai H, Takeuchi K, *et al.* Adacolumn, an adsorptive carrier based granulocyte and monocyte apheresis device for the treatment of inflammatory and refractory diseases associated with leukocytes. *Ther Apher Dial.* 2003; 7: 48-59
19. Bertos NR, Wang AH, Yang XJ. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol.* 2001; 79: 243-252
- 65 20. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 362-371

21. Johansson-Lindbom B, Agace WW. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev.* 2007; 215: 226-242

22. Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, *et al.* The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol.* 2000; 30: 262-271

23. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, *et al.* Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med.* 1999; 190: 1241-1256

24. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29: 313-326

25. Don Porto Carero A, Hoet PH, Nemery B, *et al.* Increased HLA-DR expression after exposure of human monocytic cells to air particulates. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32: 296-300

26. Portillo G, Turner M, Chantry D, *et al.* Effect of cytokines on HLA-DR and IL-1 production by a monocytic tumour, THP-1. *Immunology.* 1989; 66: 170-175

27. Ridley MG, Kingsley G, Pitzalis C, *et al.* Monocyte activation in rheumatoid arthritis: evidence for in situ activation and differentiation in joints. *Br J Rheumatol.* 1990; 29: 84-88

28. Anderson CA, Massey DC, Barrett JC, *et al.* Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology.* 2009; 136: 523-529 e523

29. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, *et al.* Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol.* 1998; 112: 501-506

30. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, *et al.* Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 161: 332-341

31. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, *et al.* B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol.* 2001; 2: 1126-1132

32. Ottonello L, Montecucco F, Bertolotto M, *et al.* CCL3 (MIP-1alpha) induces in vitro migration of GM-CSF-primed human neutrophils via CCR5-dependent activation of ERK 1/2. *Cell Signal.* 2005; 17: 355-363

33. Ramos CD, Canetti C, Souto JT, *et al.* MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 167-177

34. Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, *et al.* Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol.* 1999; 155: 331-336

35. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, *et al.* Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol.* 1996; 59: 804-812

36. Zhou L, Braat H, Faber KN, *et al.* Monocytes and their pathophysiological role in Crohn's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66: 192-202

37. Grimm MC, Pullman WE, Bennett GM, *et al.* Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J Gastroenterol Hepatol.* 1995; 10: 387-395

38. Schmutz C, Cartwright A, Williams H, *et al.* Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12: R161

39. Walters M, Berahovich R, Wang Y, *et al.* Presence of CCR9 and its ligand CCL25/TECK in the colon: Scientific rationale for the use of CCR9 small molecule antagonist CCX282-B in colonic disorders [resumen]. *Gut* 2008; OP184

40. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity.* 2004; 21: 527-538

41. Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, *et al.* Correlation between the Crohn's Disease Activity and Harvey-Bradshaw Indices in Assessing Crohn's Disease Severity. *Clin Gastroenterol Hepatol.*

Tablas

Tabla 1. Demografía de los pacientes.

Sexo	Hombre	32
	Mujer	19
Media de edad		37,9
Diagnóstico	Colitis ulcerosa	31
	Enfermedad de Crohn	20
Extensión	Extensiva	25
	En el lado izquierdo	19
	Proctitis	5
	Ileocecal	2
Intervención	Corticosteroides ^{1,2}	16
	Anti TNF- α ^{3,5}	17
	Aféresis de GMA ^{4,5}	18
Azatioprina	Sí	21
	No	30

1. Se introdujeron en quince pacientes 20-45 mg de prednisona seguido de reducción progresiva de 5 mg semanalmente.
2. Un paciente recibió corticosteroides tópicos para proctosigmoiditis ulcerosa.
3. Se administró tratamiento anti TNF- α bien como infusiones de 5 mg/kg de infliximab la semana 0, 2 y 6 o inyecciones subcutáneas de 80 mg de Adalimumab la semana 0 seguido de 40 mg cada dos semanas.
4. En el grupo de aféresis de GMA, cada paciente recibió un total de 5-8 sesiones de leucocitoféresis de Adacolumne 1-2 veces a la semana.
5. Algunos pacientes recibieron medicación de corticosteroides de línea basal

Tabla 2. Anticuerpos de citometría de flujo usados en el estudio

Marcador	Conjugado	Clon	Fabricante
CD4	Pacific Blue	RPA-T4	BD
CD14	APC	M5E2	BD
CD16	PE-Cy7	3G8	BD
HLA-DR	PerCP	L243	BD
CCR1	Alexa Fluor 647	TG4	Biolegend
CCR2	PerCP-Cy5.5	TG5	Biolegend
CCR3	PE	5E8	Biolegend
CCR5	PE	HM-CCR5	Biolegend
CCR6	PerCP-Cy5.5	11A9	BD
CCR7	PerCP-Cy5.5	TG8	Biolegend
CCR9	APC	112509	R&D Systems
CCR10	PE	314305	R&D Systems
CXCR1	APC	8F1	Biolegend
CXCR5	PerCP-Cy5.5	TG2	Biolegend
CXCR6	PE	56811	R&D Systems

Ejemplo 2 - Afinidad de células sanguíneas por CCL25.

5

Materiales y métodos

Aislamiento de leucocitos sanguíneos periféricos. Se fijó sangre periférica heparinizada de donantes de sangre sanos o pacientes con EI con paraformaldehído 4 % durante 4 minutos, se hemolizó durante 15 minutos con una solución de cloruro de amonio 0,83 % y se lavó dos veces en tampón de FACS para obtener una suspensión de leucocitos sanguíneos.

10

Quimiocinas. Los leucocitos se incubaron durante 30 min en oscuridad a 4 °C con las siguientes quimiocinas marcadas con Alexa647 Fluor® y biotiniladas: CCL25 (en concentraciones de 0,1 ng/ μ l, 0,5 ng/ μ l y 5 ng/ μ l). Las células se lavaron después con tampón de FACS y se analizaron por citometría de flujo. Todas las quimiocinas usadas en los Ejemplos se proporcionaron por Almac Sciences Scotland Ltd, Edimburgo, Escocia.

15

Ensayo de citometría de flujo. El ensayo de citometría de flujo se realizó en un citómetro FACS Calibur (BD Immunocytometry systems, San José, Ca, Estados Unidos). Se contaron diez mil células y se analizaron en cada muestra. Para análisis de datos, se usó software Cell Quest Pro de Becton Dickinson.

20

En el experimento con CCL25 biotinilado se descubrió que ni los linfocitos T (linfocitos CD4+; linfocitos CD8+) ni los monocitos (monocitos CD14+) de la sangre periférica de un donante sano (Figuras 7a, 7b y 7c) se unían con la quimiocina biotinilada. Por el contrario, aproximadamente 80 % de los linfocitos CD8+ y aproximadamente 90 % de los linfocitos CD4+ y los monocitos de un paciente con enfermedad de Crohn se unieron con CCL25 (Figuras 8a, 8b y 8c).

25

Ejemplo 3 - Preparación de una columna de quimiocinas para aféresis de células sanguíneas. A perlas de agarosa reticuladas con estreptavidina (ProZyme, San Leandro, CA, Estados Unidos) en el intervalo de 75 μ m a 300 μ m suspendidas (200 ml, ~50 %, v/v) en una solución acuosa de fosfato sódico 25 mM (pH 7,0) y NaCl 150 mM se añadió una solución de 75 μ g de CCL25 biotinilado (Almac Sciences) en el mismo tampón a 22 °C y se agitó lentamente de forma manual durante 3 min. Después de reposar durante otros 20 min, el soporte se filtró, se lavó tres veces con fosfato sódico acuoso neutro/cloruro sódico y se cargó en una columna de vidrio (i.d. 25 mm, longitud 12 cm).

30

35

Ejemplo 4 - Separación de monocitos de sangre periférica de un donante sano con la columna de quimiocinas del Ejemplo 3. Se analizó sangre periférica heparinizada de un donante masculino sano por citometría de flujo para linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y monocitos CD14. Se filtraron 100 ml de la sangre a través de la columna a un

caudal de aproximadamente 8 ml por minuto y se lavó con tampón de FACS. La sangre filtrada se analizó para las mismas células. Se descubrió que aproximadamente 95 % de los monocitos se habían retenido por la columna mientras que se había recuperado más del 90 % de cada uno de los linfocitos CD4+ y CD8+.

5 **Ejemplo 5 - Leucoféresis adaptada**

Diseño de columna y propiedades

Introducción

10 La aféresis es un tratamiento establecido usado para agotamiento de componentes sanguíneos, tales como anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y células sanguíneas. La leucoféresis es el tratamiento de aféresis usado para retirar glóbulos blancos, leucocitos. El paciente está conectado a un sistema de circulación sanguínea extracorpóreo; la sangre se extrae de una vena en un brazo, se pasa a través de un dispositivo de columna y se devuelve al otro brazo del paciente. Los efectos secundarios de tratamientos con leucoféresis varían de acontecimientos leves como cefalea, mareos, hipotensión, palpitación y sofocaciones vistos en de 0,1 a 5 % de los pacientes tratados.

La columna

20 Se presente que la columna se use como un tratamiento de leucoféresis para enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Retirárá específicamente leucocitos que se dirigen al intestino que expresan CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7 mediante el uso de reactivos de unión adecuados contenidos en una resina, aprovechando la interacción de CD14, HLA-DR, CCR9 y/o CCR7-reactivo de unión. La columna consiste en tres componentes combinados, la carcasa de plástico, la matriz BigBeads de estreptavidina (SA) Sepharose™ y reactivo de unión unido a la matriz. El tratamiento se realiza usando las mismas técnicas que un procedimiento de aféresis convencional.

La carcasa de plástico (FIGURA 9)

30 La carcasa de plástico, diseñada para mantener un flujo sanguíneo continuo a través de la matriz, consiste en un cuerpo transparente y parte superior de color rojo. La parte superior tiene una placa de distribución (2) en el sitio de flujo de entrada (1) para propagar la sangre uniformemente sobre el área de matriz completa. La placa es la primera barrera de seguridad que evita que partículas mayores fluyan a través de la columna y al paciente. Se colocan unidades de filtro de seguridad (3 y 4) en los sitios de flujo de entrada (1) y flujo de salida (5) de la carcasa de plástico. La unidad de filtro de seguridad contiene tres filtros diseñados para ser una barrera robusta y detener 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 9. El diseño con filtros de seguridad (3 y 4) en ambos extremos del dispositivo de columna minimizará el riesgo de filtración de partículas al paciente, incluyendo en el caso de que el dispositivo se coloque boca abajo con el flujo de sangre en la dirección opuesta a la anticipada.

BigBeads de estreptavidina Sepharose™

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

bTECK

50 Acoplado con la matriz está el tercer componente del dispositivo, en este ejemplo el bTECK. Este péptido bTECK es una versión sintética, modificada técnicamente de la quimiocina humana TECK, que está truncada y biotinilada, pero conserva su actividad de unión con el receptor de TECK CCR9. Biotinilando el TECK modificado técnicamente, se puede unir con las moléculas de estreptavidina en la matriz de Sepharose™. Se sabe que la unión de biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas más fuertes con una Kd en el orden de 4×10^{-14} M. La relación calculada de sitios de unión a estreptavidina:biotina en la columna es de 10:1. Por lo tanto, el acoplamiento entre la matriz y bTECK será inmediato, minimizando el riesgo de desacoplamiento de bTECK de la matriz.

El sistema de aféresis

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

El circuito

El sistema se ilustra en la Figura 10. El paciente (1) se conecta al circuito extracorpóreo mediante agujas Venflon estériles a venas en los brazos derecho e izquierdo. También está conectada una bolsa de solución salina (3) y la solución salina se bombea con una bomba ACD (2). Se extrae sangre de un brazo del paciente a través del sistema de tubos estériles por la bomba sanguínea (4) y se pasa a través de la columna (6) y de vuelta al paciente. El sistema de tubos está conectado a la columna mediante acoplamientos de cierre luer de diálisis convencionales. Los acoplamientos en la columna están clasificados por color para su correcto ensamblaje; tubos rojos para flujo de entrada a la parte superior de columna roja y tubos azules para flujo de salida de vuelta al paciente. Está presente un detector de aire (8). Se emplean la presión de entrada (5) y sensores Pven (7) para supervisar la presión en el circuito.

La bomba 4008 ADS

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

Se muestra un diagrama esquemático de la bomba, que muestra el detector de aire y el filtro óptico en la Figura 11. Si el sistema de bomba detecta burbujas de aire y fluctuaciones ópticas o si los valores de presión extracorpórea están fuera del intervalo establecido, entonces la bomba se detiene inmediatamente y se emite una alarma visual/auditiva.

Leyenda para la FIGURA 11:

1. Monitor
2. Soporte para bolsa de residuos
3. Módulos (de izquierda a derecha - Bomba sanguínea, bomba de ACD, detector de aire)
4. Sitios de reserva para módulos adicionales
5. Soporte de absorbente
6. Detector de goteo
7. Polo IV

Preparación del paciente

Se administrarán al paciente anticoagulantes antes de cada sesión de tratamiento. Se usará una solución salina estéril con heparina 5000 IE para preparación del sistema extracorpóreo, a continuación se añadirá una inyección de embolada con heparina 4000 IE al circuito al inicio de cada sesión de tratamiento.

Tiempo y caudal de leucoféresis

El sistema de leucoféresis debería manejarse a un caudal de 30-60 ml/min. Un tratamiento se finaliza después de haber circulado 1800 ml de sangre.

Condiciones de almacenamiento

Los dispositivos de columna deberían almacenarse a entre 1 y 25 °C evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Los datos de estabilidad >3 meses indican que no hay ninguna diferencia en funcionalidad a lo largo del tiempo o por temperatura (temperatura ambiente y refrigerado). Las columnas se mantendrán en condiciones refrigeradas hasta su uso. Debería evitarse el daño mecánico como los resultantes de vibraciones violentas y traumatismo. No debería usarse una columna almacenada fuera de estas recomendaciones.

Condiciones de transporte

Los dispositivos de columna se transportarán en condiciones refrigeradas, evitando la congelación y temperaturas más elevadas. Debería evitarse el daño mecánico tal como el resultante de vibraciones violentas y traumatismo.

Ejemplo 6 - estudios no clínicos

Agotamiento *in vitro* de poblaciones celulares diana

Para investigar la capacidad de eliminar células que expresan CCR9, se han realizado ensayos *in vitro* en la matriz acoplada a bTECK. Se recogió sangre de donantes de sangre y pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino y se pasó a través del dispositivo de columna que contenía matriz acoplada a bTECK. Se tomaron muestras de sangre antes y después del pase de columna y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) con respecto al agotamiento de células que expresan CCR9.

Los resultados demuestran agotamiento significativo de la población diana de células que expresan CCR9 CD14 positivas después de la perfusión de la matriz; mientras que las células CD14 positivas totales permanecieron sin cambios. Se realizaron ensayos de agotamiento en sangre de donantes sanos y pacientes con EII confirmando efectos similares. Los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13 respectivamente.

5 En conclusión, los resultados *in vitro* demuestran una reducción específica de 50-75 % de las células que expresan CCR9 por la columna. Las células que no expresaban CCR9 no se vieron afectadas.

10 **Ejemplo 7** - resumen de síntesis de TECK-PEG-Biotina

Molécula diana:

TECK (sustitución Met a Nleu) derivatizada en la funcionalidad de cadena lateral ϵ -amino de Lys72 con PEG-Biotina (sal de TFA)

15 Modificaciones:

Forma truncada de TECK humana correspondiente a los restos 1-74 de la proteína madura, que abarca la secuencia correspondiente al pliegue de quimiocina. La proteína madura de longitud completa es de 127 aminoácidos (el péptido señal es de 23 aminoácidos en una proteína inmadura de 150 aminoácidos). La metionina individual dentro de la secuencia se alteró a norleucina, para mitigar contra oxidación de este resto durante el ensamblaje de cadena, que se observó durante la síntesis del derivado de secuencia natural. La Gin en el extremo N terminal de las proteínas se somete a formación de piroGlu en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, Gln1 de la secuencia se sustituyó con piroglutamina para evitar que se generaran especies mixtas de Gin N-terminal y piroGlu. Esto mejora la producción de síntesis y asegura una preparación de quimiocina homogénea mediante fabricación en columna y uso. La lisina de origen natural en la posición 72 se modificó mediante biotilación en la resina. Se incorporó un espaciador de PEG entre la funcionalidad de ϵ amino y la biotina.

La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 1) se muestra, antes de la unión del espaciador de PEG y moléculas de biotina en el aminoácido 72 (K):

H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGNPKSREVQ RAXK-
LLDARNKVF-OH
X1 = piroGlu o Gin
X64 = Norleucina

35 La secuencia de TECK modificada técnicamente se ensambló en un soporte sólido, usando protocolos de Fmoc para síntesis de péptidos en fase sólida (SEQ ID NO: 2):

H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGNPKSREVQ RAXK-
LLDARNXVF-RESIN
X1 = piroGlu o Gin
X64 = Norleucina
X72 = K(Dde)

45 Se incorporó FmocLys(Dde)-OH como el resto 72 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína.

Sustitución de Met a Nle.

Sustitución de Gin N terminal a ácido piroglutámico.

50 Retirada de protección de Dde:

El grupo protector de Dde se retiró por tratamiento de toda la resina (2,5 g) con una solución de hidrazina al 2 % en DMF (100 ml) durante un periodo de 1 hora para proporcionar 2,0 g de resina.

55 Etapas de marcaje:

1. Acoplamiento de Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioctanoico

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

2. Recubrimiento

La resina se recubrió con solución de DMF/anhídrido acético 0,5 M (20 ml) durante 5 minutos y después se lavó con DMF.

5

3. Desprotección de Fmoc

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

10

4. Acoplamiento de Biotina-OSu

Se añadió una solución de Biotina-éster de NHS (341 mg, 1 mmol) y DIPEA (348 µl, 2 mmol) en DMF (10 ml) a la resina y la mezcla se sonicó durante 3 horas. La resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM y después se secó al vacío. Resina seca obtenida = 1,5 g.

15

Escisión:

Resina peptídica seca (1,5 g) y la mezcla se escindió con TFA (30 ml) que contenía un cóctel neutralizante consistente en TIS, tioanisol, agua, EDT y fenol y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La solución se filtró en éter frío y la resina se aclaró con TFA. El péptido se centrifugó, se lavó con éter, se centrifugó y se liofilizó para proporcionar 1,0 g de péptido en bruto.

20

Protocolo de plegamiento:

Se disolvió péptido en bruto (100 mg) en GnHCl 6 M (233 ml) y después se diluyó rápidamente hasta una concentración de GnHCl 2 M mediante la adición de TRIS 50 mM pH 8 (467 ml) que contenía GSSG 0,5 mM y GSH 5 mM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 días y después se analizó por HPLC (Columna Jupiter C18 de 250 x 4,6 mm, B 10-60 % durante 30 minutos). El análisis de HPLC confirmó la formación del producto deseado así como productos secundarios plegados erróneamente.

25

30

Purificación:

La proteína plegada se purificó por HPLC de fase inversa usando una columna Jupiter C18, de 250 x 21 mm, 9 ml/min, B 10-60 % durante 50 minutos. Se proporcionaron 11,1 mg de Nle-TECK-Biotina plegada pura.

35

La Figura 14 muestra HPLC de Biotina-TECK (Nleu) plegada purificada. La proteína se eluyó en un único pico a 21,6 min.

40

La Figura 15 muestra ionización por electropulverización con datos de espectrometría de masas en tándem (ES/MS) de Biotina-TECK (Nleu) plegada purificada. La masa esperada era de 8959,4 Da.

Datos de ensayos funcionales:

45

Se ensayó TECK-Biotina-Nle con respecto a actividad agonista en un ensayo de Aequorina contra hCCR9, (Euroscreen) y se indicó un valor de CE50 de 63,6 nM. En comparación la CE50 para TECK nativa es de 67,87 nM.

La quimiocina activa final tiene por lo tanto la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 3):

H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCG
50 NPKSREVQRAXKLLDARNXVF-OH

X1 = piroGlu

X64 = norleucina

X72 = un resto de aminoácido que puede biotinizarse, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente está biotinilado, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, tal como K(PEG-Biotina)

55

Ejemplo 8 - síntesis de biotina MIP-3β (CCL19)

60 Ensamblaje:

Se realizó síntesis química de quimiocinas usando técnicas de síntesis de péptidos de fase sólida (SPPS) Fmoc convencionales en un sintetizador peptídico ABI 433. Se usaron DIC (0,5 M en DMF) y OxymaPure (0,5 M en DMF) para activación, anhídrido acético (0,5 M en DMF) para recubrimiento y piperidina 20 % en DMF para desprotección

ES 2 613 593 T3

de Fmoc. Se utilizó resina de Amida Rink para la generación de quimioquinas de amida C terminales y resina Wang para quimioquinas de ácido C terminal. Después del ensamblaje, la resina se lavó con DMF y DCM y después se secó al vacío.

5 Retirada de protección de Dde:

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

10 Etapas de marcaje:

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

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

2. Recubrimiento

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

3. Desprotección de Fmoc

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

4. Acoplamiento de Biotina-OSu

30 Se añadió una solución de Biotina-OSu (341 mg, 1 mmol) y DIPEA (348 µl, 2 mmol) en DMF (10 ml) a la resina y la mezcla se sonicó durante 3 horas. La resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM y después se secó al vacío.

Escisión:

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

40 Protocolo de Purificación:

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

45

Protocolo de plegamiento:

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

50

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

55

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

60

Se muestra la secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 4), antes de unión de la molécula de biotina en el aminoácido 78 (K):

H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGORVPAVVFTTLRGRQLCA
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-NH₂

X es un resto de aminoácido que puede biotinilarse, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K (PEG-biotina).

- 5 La secuencia de MIP-3 β modificada técnicamente se ensambló en un soporte sólido (resina de Amida de Rink), usando protocolos de Fmoc para síntesis de péptidos de fase sólida como se describe en la sección de protocolos general:

H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-RESIN

- 10 X es FmocLys (ivDde)

- 15 Se incorporó FmocLys (ivDde)-OH como el resto 78 para facilitar el marcaje específico de sitio en esta posición de la proteína (SEQ ID NO: 5). Se llevó a cabo retirada posterior del grupo protector de ivDde, seguido de acoplamiento de la Biotina, como se describe en la sección de protocolo general. Se llevaron a cabo protocolos de escisión, purificación y plegamiento como se describe para facilitar la quimiocina activa deseada (SEQ ID NO: 6).

H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-NH₂

- 20 X es K (biotina)

Ionización por electropulverización con datos de espectrometría de masas en tándem (ESI-TOF-MS) de biotina MIP-3 β plegada purificada: obtenida = 9148,8 Da; esperada 9149,7 Da.

- 25 Datos de ensayos funcionales:

Se ensayó biotinaMip-3 β con respecto a actividad agonista en un ensayo de Aequerina frente a hCCR7 (Euroscreen) y se indicó un valor de CE50 de 11,0 nM. En comparación la CE50 para MIP-3 β nativo recombinante es de 1,6 nM.

- 30 **Ejemplo 9 Tratamiento de enfermedad de Crohn (CD)**

Materiales y métodos

- 35 1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

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

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD14	FITC	Beckman Coulter
Estreptavidina	PE, APC	Biolegend
CD16	PE Cy7	BD Biosciences
CCR9	APC	R&D Systems
HLADR	APC Cy7	Biolegend
CD3	V450	BD Biosciences
CD19	V500	BD Biosciences

- 45 2. Ensayo de unión a quimiocinas

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón Fix (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído al 4 %) durante 4 minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH₄Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las

células se lavaron en PBS con suero de cultivo bovino 2 %, se incubaron con suero humano 10 % durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos específicos de células junto con quimiocina biotinilada (1 μ M) o el anticuerpo de receptores de quimiocinas correspondientes a 4 °C durante 30 min (Tabla 2). La quimiocina biotinilada se detectó mediante la interacción entre biotina y una estreptavidina conjugada con fluoróforo.

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

3. Agotamiento de células por matriz conjugada con quimiocina biotinilada

10 Se prepararon células a partir de sangre periférica (sección 1). Se lavó 1 ml de matriz de Sepharose BigBeads con Estreptavidina 0,4 mg/ml (GE Healthcare) en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió quimiocina biotinilada (1 μ M) al tubo y se incubó durante 20 minutos a TA para permitir la inmovilización de la quimiocina en la matriz mediante la interacción de biotina-estreptavidina. A continuación, las células se añadieron a la matriz-quimiocina y se incubaron durante 20 minutos a TA. Las células que no se unieron con la matriz se retiraron lavando la matriz con PBS en un filtro de nylon de 40 μ m estéril (Tamiz Celular BD Falcon™). Las células de flujo continuo se tiñeron con anticuerpos (Tabla 2), se analizaron mediante citometría de flujo y se compararon con células de sangre periférica que no se había incubado con la matriz-quimiocina.

Resultados y análisis

20 Enfermedad de Crohn (EC)

1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

25 Se analizaron glóbulos blancos de pacientes con EC con citometría de flujo. Los pacientes mostraron números mayores de monocitos que expresaban CCR9 en circulación, una media de 13 % en comparación con aproximadamente 7 % en sangre sana (Figura 17).

2. Ensayo de unión a quimiocina

30 CCR9 se une con la quimiocina que se dirige al intestino TECK (CCL25) y es importante para la migración celular al intestino delgado. De acuerdo con la expresión de CCR9, el 14 % de los monocitos se unen con la TECK biotinilada (bTECK) (Figura 18).

35 3. Agotamiento celular mediante matriz conjugada con quimiocina biotinilada

89 % de los monocitos que expresaban CCR9 se agotaron eficazmente con Matriz de Estreptavidina de Sepharose conjugada con bTECK. Antes del agotamiento hubo 7,2 % de monocitos que expresaban CCR9 y después del agotamiento 0,8 % (Figura 19).

40 80 % de los monocitos que expresan CCR9 también tienen una alta expresión de HLADR lo que sugiere un fenotipo proinflamatorio (Figura 20).

45 Se concluye que los monocitos en EC (monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi}) expresan CCR9 y se unen con el ligando bTECK. Además, la mayoría de los monocitos que expresan CCR9 pueden retirarse con matriz de Estreptavidina de Sepharose conjugada con bTECK.

Ejemplo 10 Diagnóstico y tratamiento de SII

50 Los inventores han descubierto sorprendentemente que pacientes con Síndrome del Intestino Irritable (SII), o un sujeto que padece SII, presentan una frecuencia (o un nivel) aumentada de células que expresan receptores de quimiocinas, en particular monocitos, más específicamente monocitos que expresan CCR9.

55 Por lo tanto, los pacientes con SII pueden presentar inflamación que es comparable a la mostrada por pacientes que padecen EII. El síndrome del intestino irritable (SII) es una afección caracterizada por dolor abdominal crónico, incomodidad, hinchazón y alteración de los hábitos intestinales. Se diagnostica en la actualidad basándose solamente en los síntomas. En consecuencia, la identificación de un componente proinflamatorio proporciona nuevas vías de tratamiento y diagnóstico de esta afección debilitante.

60 Materiales y métodos

1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

65 Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos con heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón Fix (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído 4 %) durante 4 minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH₄Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las

células se lavaron en PBS con suero de cultivo bovino 2 %, incubado con suero humano 10 % durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos (Tabla 3) a 4 °C durante 30 min. Las células se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

5

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

Anticuerpo	Fluoróforo	Proveedor
CD14	FITC	Beckman Coulter
Estreptavidina	PE, APC	Biolegend
CD16	PE Cy7	BD Biosciences
CCR9	APC	R&D Systems
HLADR	APC Cy7	Biolegend
CD3	V450	BD Biosciences
CD19	V500	BD Biosciences

2. Ensayo de unión de quimiocina

Se recogió sangre periférica de pacientes y controles sanos en tubos de heparina. Los glóbulos rojos se lisaron usando Tampón Fix (citrato de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con paraformaldehído 4 %) durante 4 minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH₄Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de cultivo bovino 2 %, se incubaron con suero humano 10 % durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con anticuerpos específicos de células junto con quimiocina biotinilada (1 µM) o el anticuerpo de receptor de quimiocina correspondiente a 4 °C durante 30 min (Tabla 3). La quimiocina biotinilada se detectó mediante la interacción entre biotina y una estreptavidina conjugada con fluoróforo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

3. Agotamiento de células por matriz conjugada con quimiocina biotinilada

Se prepararon células a partir de sangre periférica (sección 1). Se lavó 1 ml de matriz de Sepharose BigBeads conjugada con Estreptavidina 0,4 mg/ml (GE Healthcare) en 50 ml de PBS y se añadió a un tubo de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Se añadió quimiocina biotinilada (1 µM) al tubo y se incubó durante 20 minutos a TA para permitir la inmovilización de la quimiocina en la matriz mediante la interacción de biotina-estreptavidina. A continuación, las células se añadieron a la matriz de quimiocina y se incubaron durante 20 minutos a TA. Las células que no se unieron con la matriz se retiraron por lavado de la matriz con PBS en un filtro de nylon de 40 µm estéril (Tamiz Celular BD Falcon™). Las células de flujo continuo se tiñeron con anticuerpos (Tabla 3), se analizaron mediante citometría de flujo y se compararon con células de sangre periférica que no se habían incubado con la quimiocina-matriz.

Resultados y análisis

Síndrome del intestino irritable (SII)

Se analizaron glóbulos blancos de pacientes con SII con citometría de flujo. Los pacientes mostraron números aumentados de monocitos que expresaban CCR9 en circulación en comparación con sangre sana (Figura 21).

El síndrome de intestino irritable es una afección caracterizada por dolor abdominal crónico, incomodidad, hinchazón y alteración de los hábitos intestinales. Se diagnostica en la actualidad basándose solamente en los síntomas. Los síntomas del SII son muy similares a EII, enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), que también muestran un aumento de monocitos que expresan CCR9 (Figura 24).

CCR9 se une con la quimiocina que se dirige al intestino TECK (CCL25) y es importante para la migración celular al intestino delgado. Los monocitos en sangre de pacientes con SII se unen con la TECK biotinilada (bTECK) (Figura 22).

Se muestra el agotamiento de monocitos que expresan CCR9 en pacientes con SII usando matriz de estreptavidina de sepharose conjugada con bTECK en la Figura 23.

Aproximadamente el 25 % de los monocitos que expresan CCR9 también tienen una alta expresión de HLADR lo que sugiere un fenotipo proinflamatorio (Figura 25a). Estas células pueden agotarse usando matriz de estreptavidina de sepharose conjugada con bTECK (Figura 25b).

Se concluye que los monocitos en SII expresan CCR9 y se unen con el ligando bTECK. Además, la mayoría de los monocitos que expresan CCR9 pueden retirarse con matriz de Estreptavidina de Sepharose conjugada con bTECK.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> ITH Immune Therapy Holdings AB
- <120> DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO Y SÍNDROME DEL INTESTINO IRRITABLE
- 10 <130> P117752WO00
- <160> 6
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 74
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido sintetizado
- 25 <220>
<221>x
<222> (1)..(1)
<223> x = piroGlu o Gln
- 30 <220>
<221>X
<222> (64)..(64)
<223> X = Norleucina
- 35 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Gly | Val | Phe | Glu | Asp | Cys | Cys | Leu | Ala | Tyr | His | Tyr | Pro | Ile | Gly | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Trp | Ala | Val | Leu | Arg | Arg | Ala | Trp | Thr | Tyr | Arg | Ile | Gln | Glu | Val | Ser |
| | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Gly | Ser | Cys | Asn | Leu | Pro | Ala | Ala | Ile | Phe | Tyr | Leu | Pro | Lys | Arg | His |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Arg | Lys | Val | Cys | Gly | Asn | Pro | Lys | Ser | Arg | Glu | Val | Gln | Arg | Ala | Xaa |
| | 50 | | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lys | Leu | Leu | Asp | Ala | Arg | Asn | Lys | Val | Phe | | | | | | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | | | | | | |
- 40 <210> 2
<211> 74
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Péptido sintetizado

ES 2 613 593 T3

<220>
 <221>X
 <222> (1)..(1)
 <223> X = piroGlu o Gln
 5

<220>
 <221>X
 <222> (64)..(64)
 <223> X = Norleucina
 10

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

<400> 2

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Péptido sintetizado
 25

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

<220>
 <221>X
 <222> (64)..(64)
 <223> X = Norleucina
 35

<220>
 <221>X
 <222> (72)..(72)
 <223> X es un resto de aminoácido que puede biotinilarse, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y
 opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo
 K(PEG-Biotina)
 40

<400> 3
 45

ES 2 613 593 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 4
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintetizado

<220>
 <221>X
 15 <222> (78)..(78)
 <223> X es un resto de aminoácido que puede biotinilarse, tal como lisina, ornitina o ácido diaminopropiónico y opcionalmente se biotinila, opcionalmente mediante una molécula espaciadora tal como PEG, por ejemplo K(PEG-Biotina)

20 <400> 4

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

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

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

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

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

25 <210>5
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido sintetizado

<220>

<221>X

5 <222> (78)..(78)

<223> X es K(ivDde)

<400>5

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

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

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

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

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

<210>6

<211> 78

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintetizado

20 <220>

<221>X

<222> (78)..(78)

<223> X es K(Biotina)

25 <400> 6

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar, supervisar la progresión de o supervisar el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende determinar los niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida de un sujeto, en donde:
- 5
- (i) niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en comparación con:
- 10
- (a) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
 (b) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
 (c) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} obtenidos de sujetos sanos;
- 15
- indican la existencia de enfermedad inflamatoria del intestino;
 (ii) niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en comparación con:
- 20
- (a) una muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior; o
 (b) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
 (c) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
 (d) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} obtenidos de sujetos sanos;
- 25
- indican la progresión de enfermedad inflamatoria del intestino; o
 (iii) niveles disminuidos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} se correlacionan con tratamiento exitoso.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- 30
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la muestra es una muestra de sangre periférica.
4. El método de cualquier reivindicación anterior en el que niveles mayores de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en comparación con la muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior, la muestra de control o el valor umbral predeterminado se correlacionan con enfermedad más activa.
- 35
5. El método de cualquier reivindicación anterior en el que niveles bajos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en comparación con la muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior, la muestra de control o el valor umbral predeterminado se correlacionan con una falta de inflamación activa.
- 40
6. El método de la reivindicación 1, en el que el tratamiento se selecciona de un tratamiento de inmunosupresión o una terapia de reducción de monocitos.
7. El método de la reivindicación 6 en el que el tratamiento de inmunosupresión comprende tratamiento con corticosteroides.
- 45
8. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} indican la progresión de enfermedad inflamatoria del intestino.
- 50
9. Un método para seleccionar un tratamiento adecuado para enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende determinar los niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en una muestra obtenida de un sujeto, en donde niveles altos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} o niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} en comparación con un control, dan como resultado selección de tratamiento con corticosteroides o una terapia de reducción de monocitos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino.
- 55
10. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente al marcador CD14 de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} para uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, en donde el anticuerpo es inmovilizado en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente retirando de este modo monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} de la sangre periférica del paciente o el sujeto; e infundiendo la sangre empobrecida al paciente.
- 60
11. El anticuerpo para uso de la reivindicación 10, en donde la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- 65
12. El anticuerpo para uso de las reivindicaciones 10 u 11, en donde:

- (i) el paciente se ha seleccionado para tratamiento usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
y/o
5 (ii) la columna de aféresis está cargada con un soporte sólido que comprende al menos un reactivo de unión adicional capaz de unirse específicamente con un marcador de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} seleccionado de CCR7 y CCR9 inmovilizado directa o indirectamente en el soporte, opcionalmente en el que los reactivos de unión se seleccionan de CCL25, CCL21 y CCL19.
13. Un método para diagnosticar, supervisar la progresión de o supervisar el tratamiento de síndrome del intestino irritable, que comprende determinar:
10
- a) niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9; y/o
b) niveles de células con alta expresión de CCR9 en una muestra obtenida de un sujeto, en donde:
- 15 (i) altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 en comparación con:
- (a) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
20 (b) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
(c) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de sujetos sanos;
25
- indican la existencia de síndrome del intestino irritable;
(ii) altos niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 en comparación con:
- 30 (a) una muestra obtenida del sujeto en un punto temporal anterior; o
(b) una muestra de control obtenida de un sujeto sano; o
(c) una muestra de control obtenida de un sujeto enfermo; o
(d) un valor umbral predeterminado calculado por análisis estadístico de niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9
35 obtenidos de pacientes enfermos y en comparación con niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan altos niveles de CCR9 o niveles de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 obtenidos de sujetos sanos;
- indican la progresión de síndrome del intestino irritable; o
40 (iii) niveles reducidos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 se correlacionan con tratamiento exitoso.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que:
- 45 (i) la muestra es una muestra de sangre periférica;
y/o
(ii) niveles mayores de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 se correlacionan con enfermedad más activa;
y/o
50 (iii) niveles bajos de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 se correlacionan con una falta de inflamación activa o enfermedad menos activa;
y/o
(iv) niveles aumentados de monocitos CD14⁺HLA-DR^{hi} que expresan CCR9 indican la progresión de enfermedad.

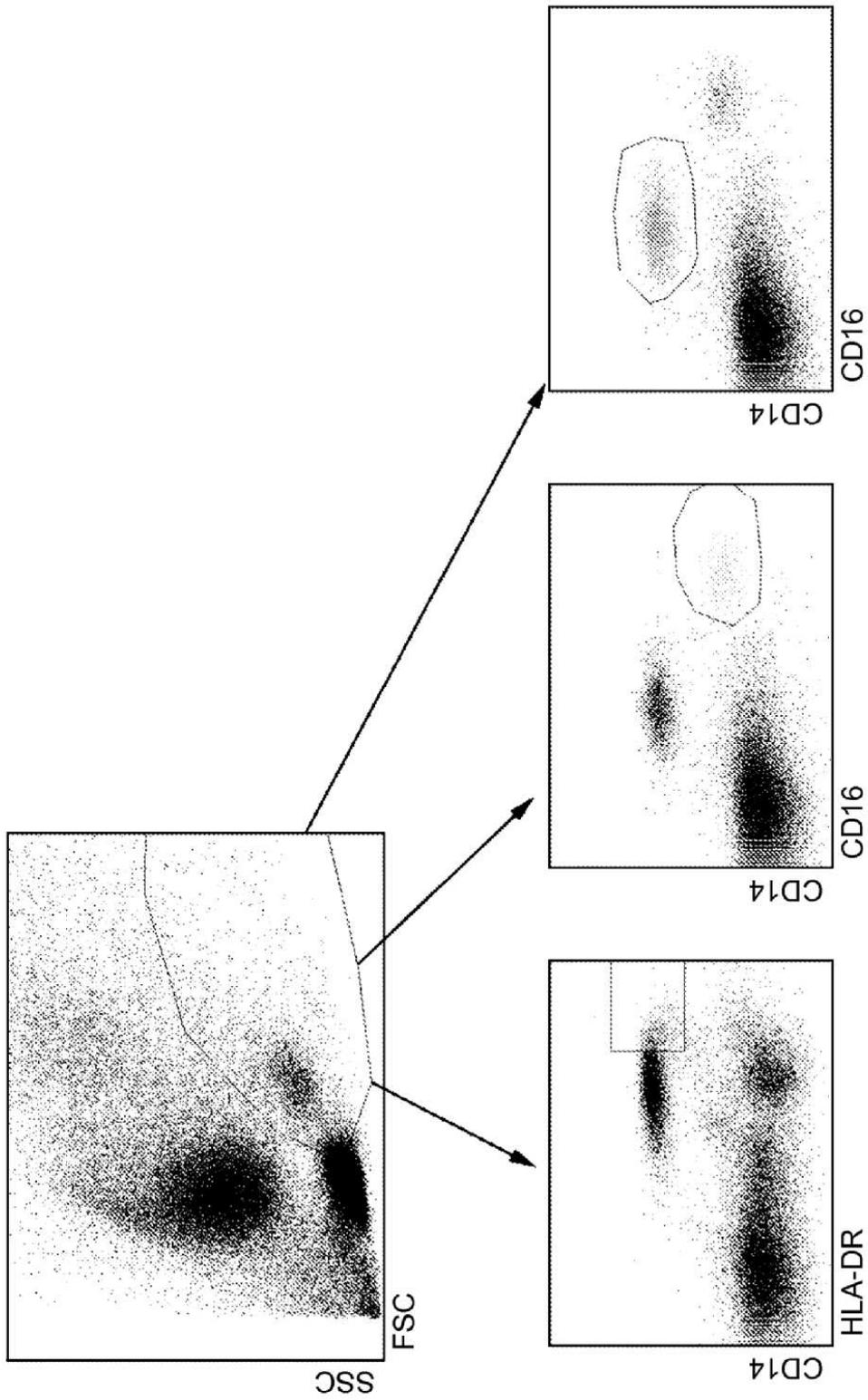


FIG. 1

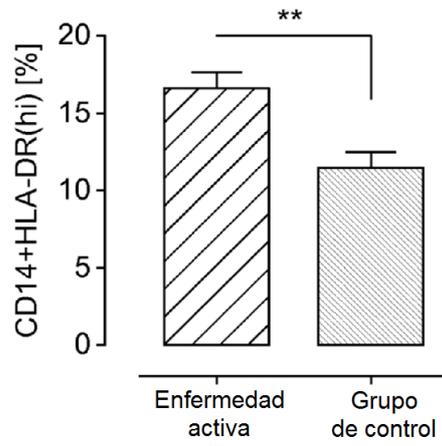


FIG. 2a

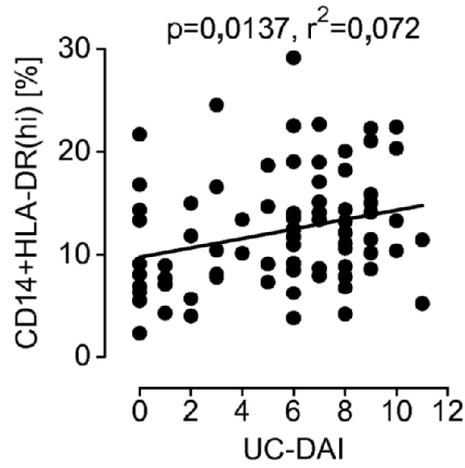


FIG. 2b

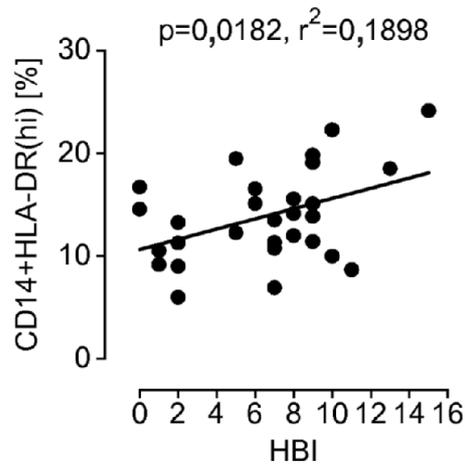


FIG. 2c

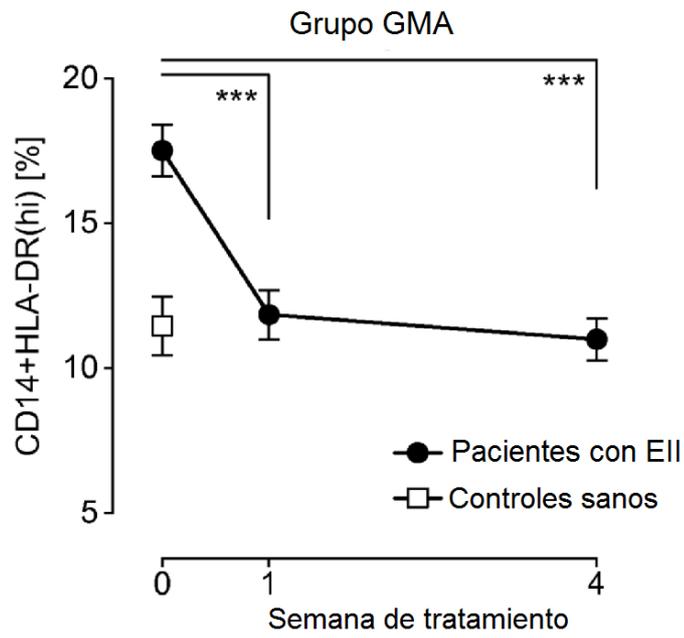


FIG. 3a

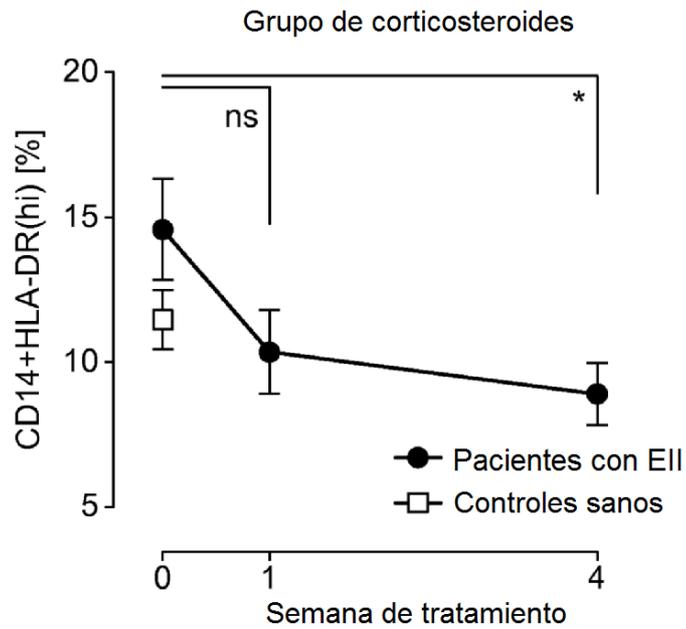


FIG. 3b

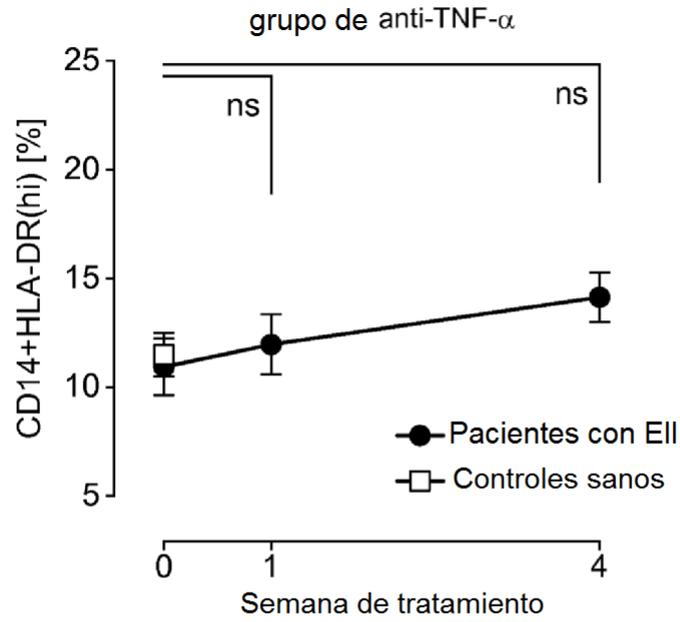


FIG. 3c

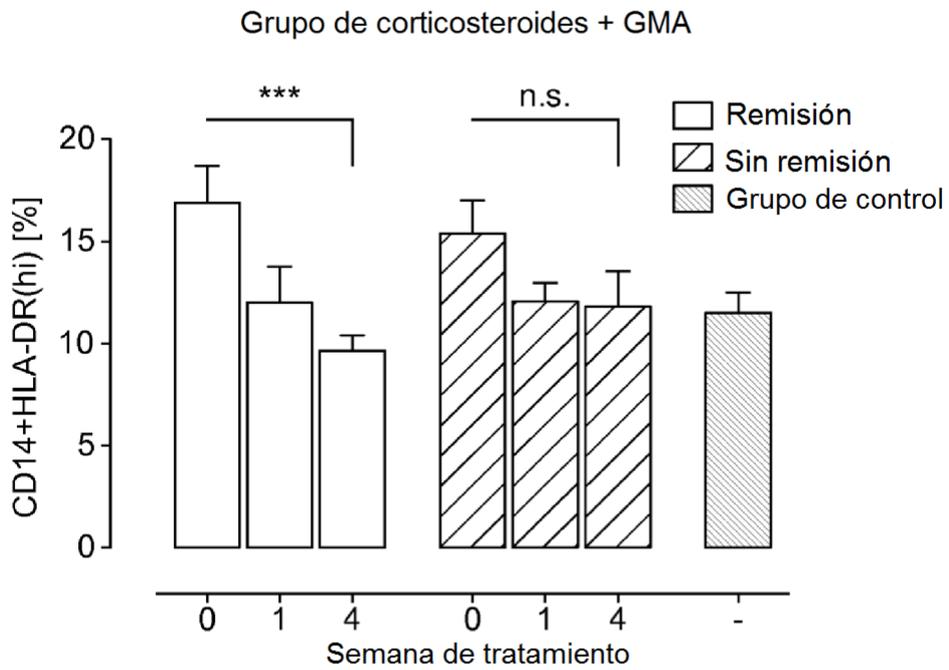


FIG. 3d

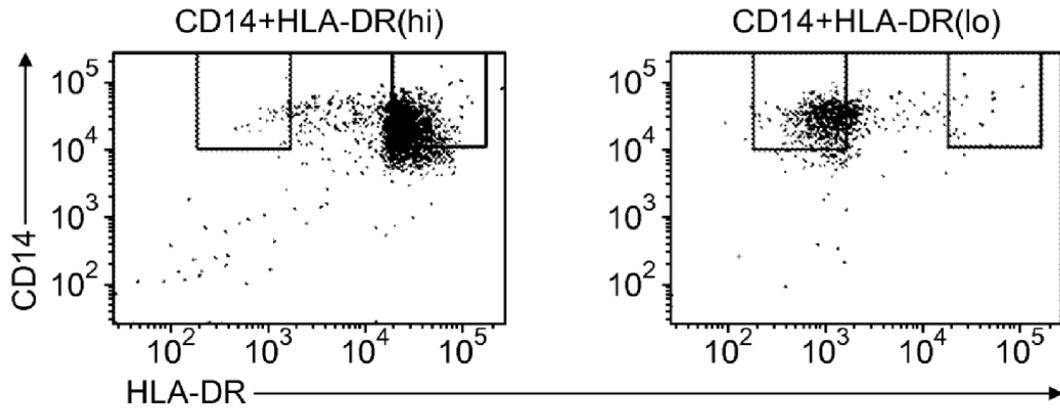


FIG. 4a

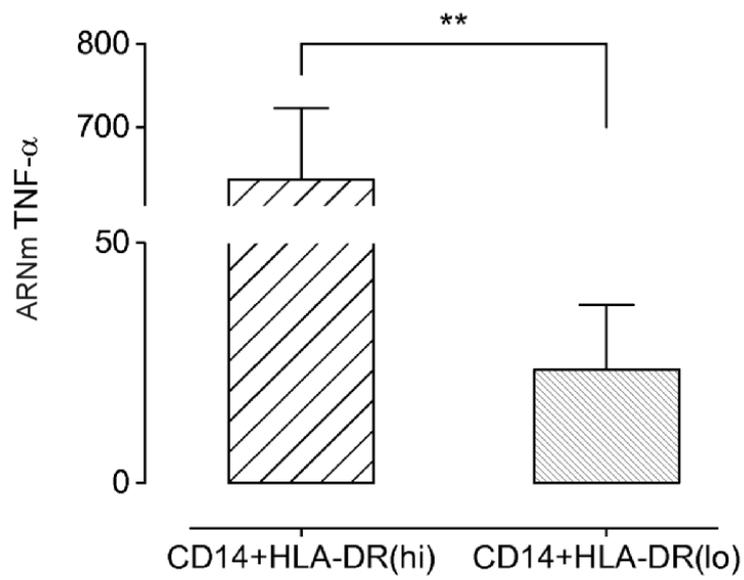


FIG. 4b

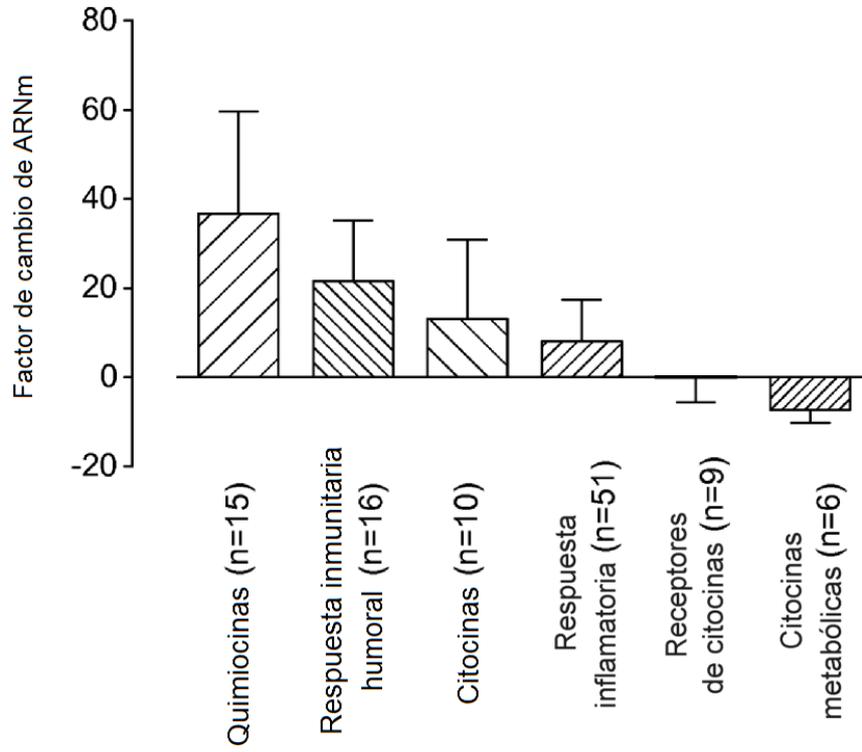


FIG. 4c

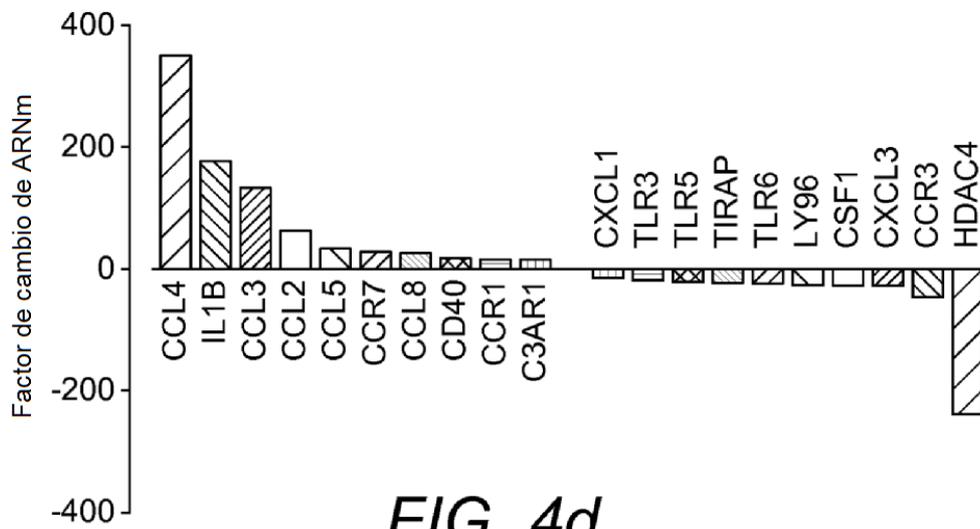


FIG. 4d

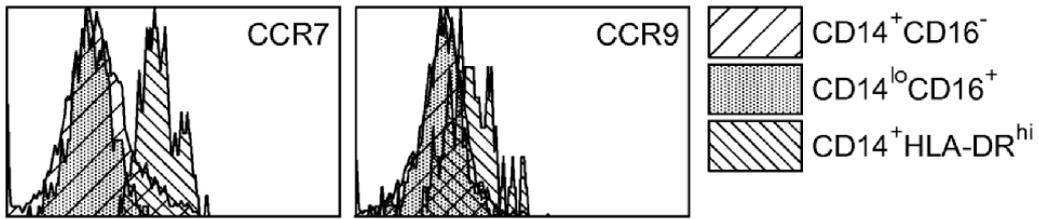


FIG. 5a

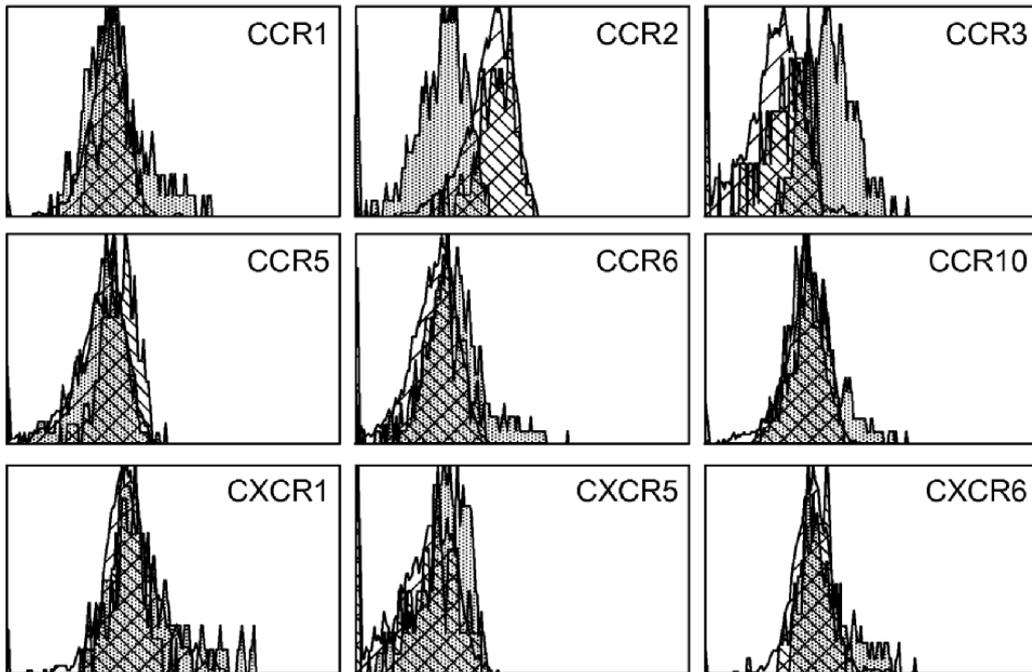


FIG. 5b

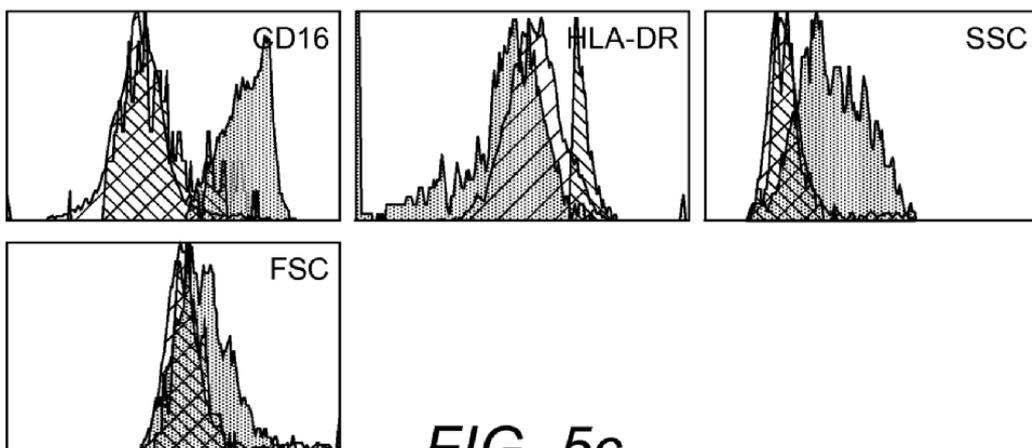


FIG. 5c

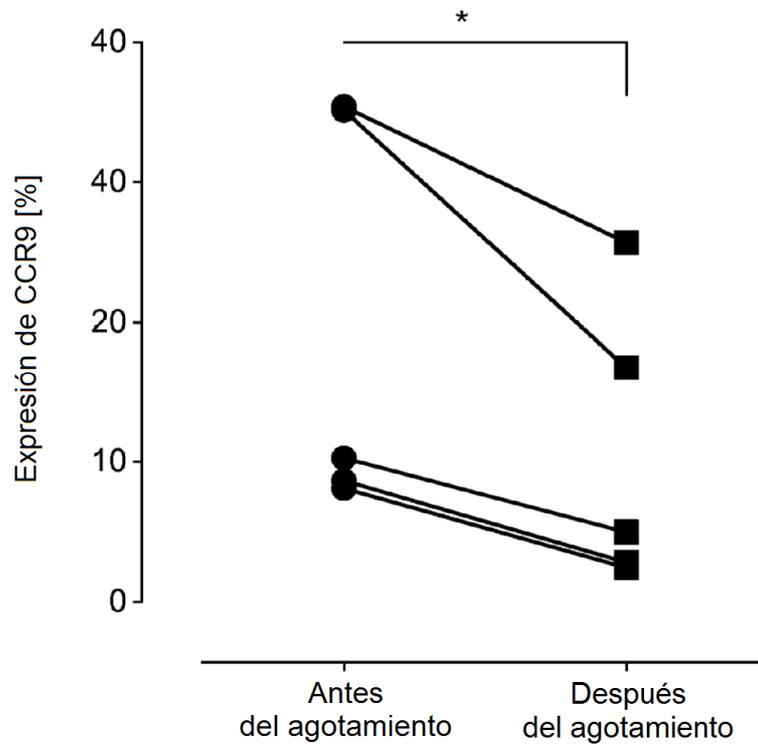


FIG. 6

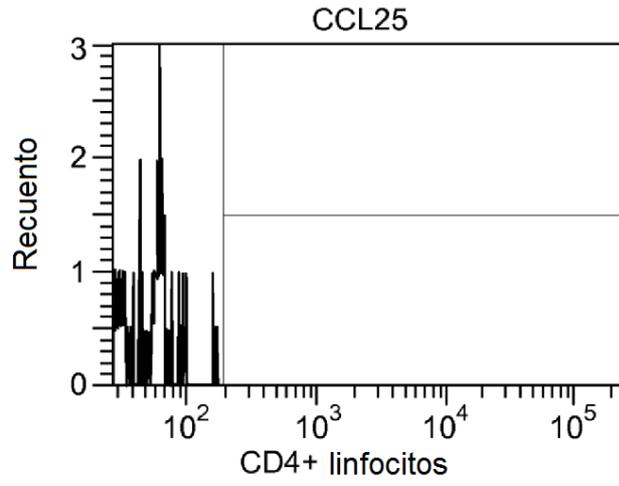


FIG. 7a

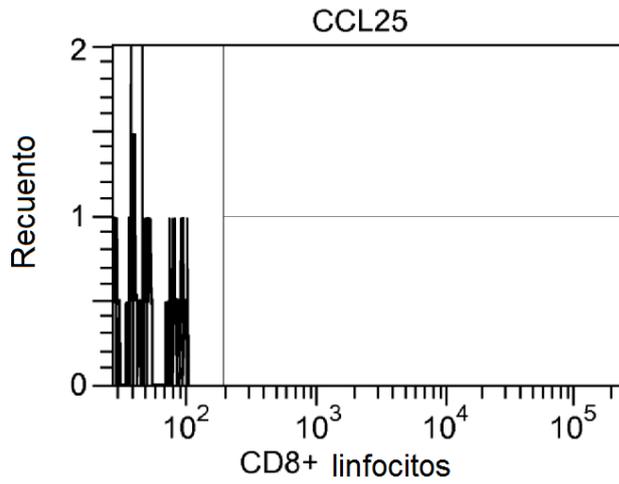


FIG. 7b

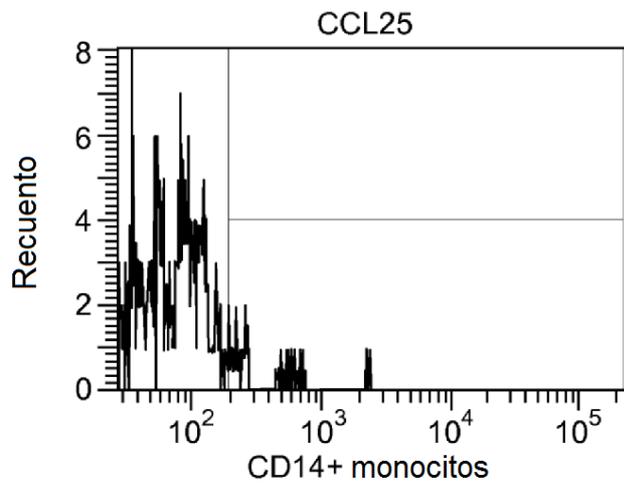


FIG. 7c

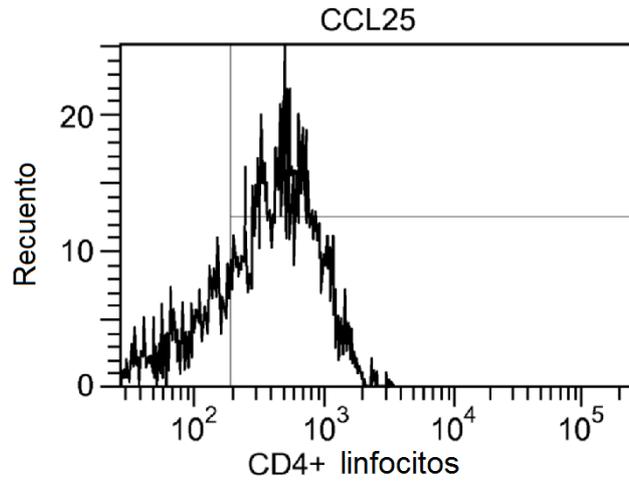


FIG. 8a

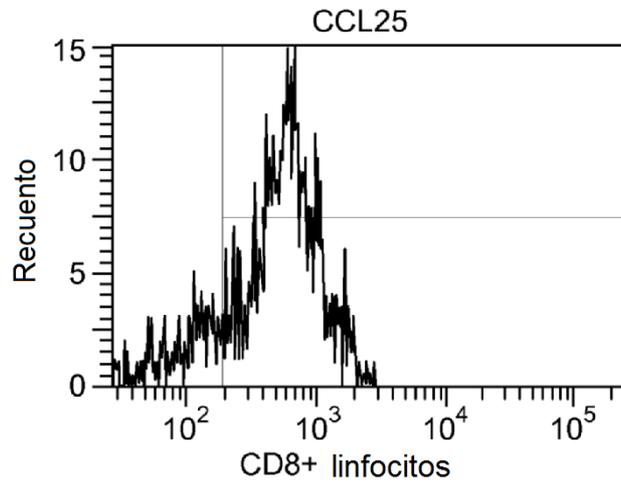


FIG. 8b

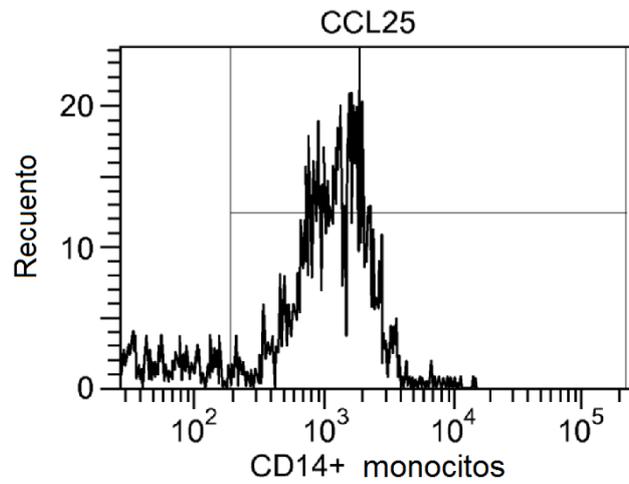


FIG. 8c

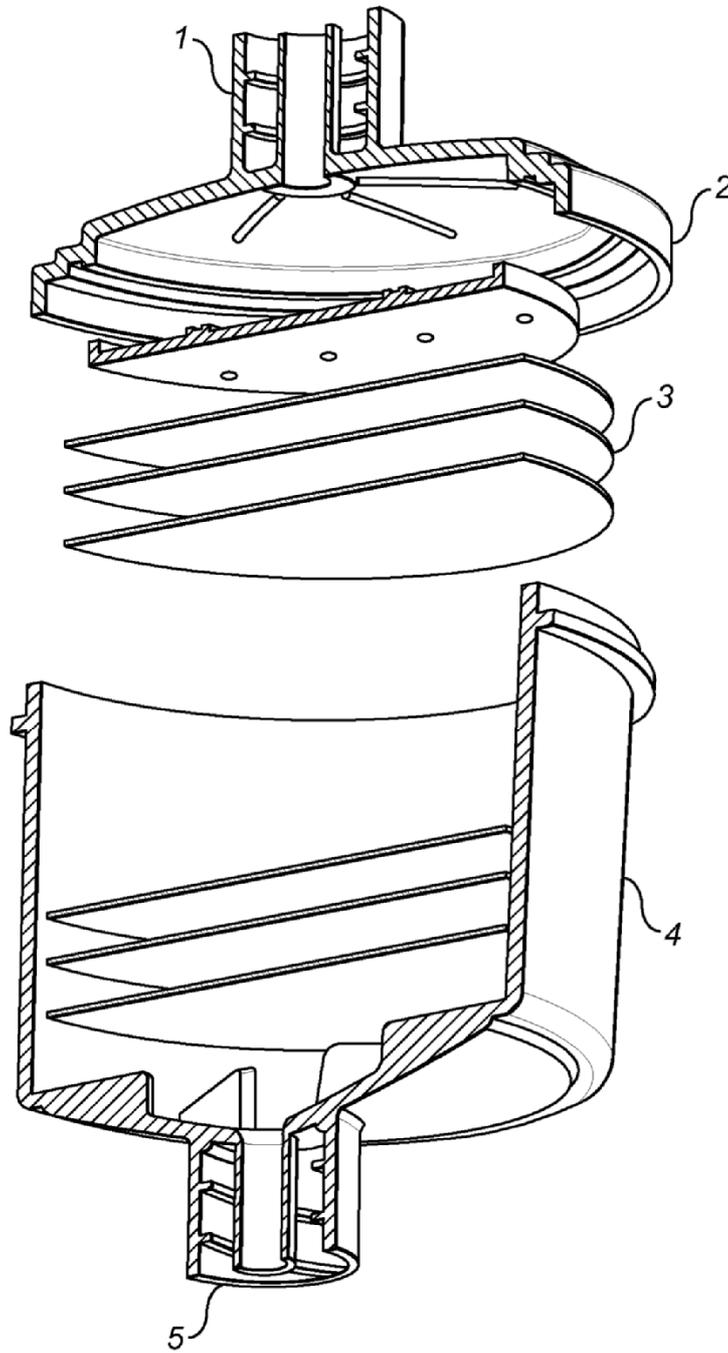


FIG. 9

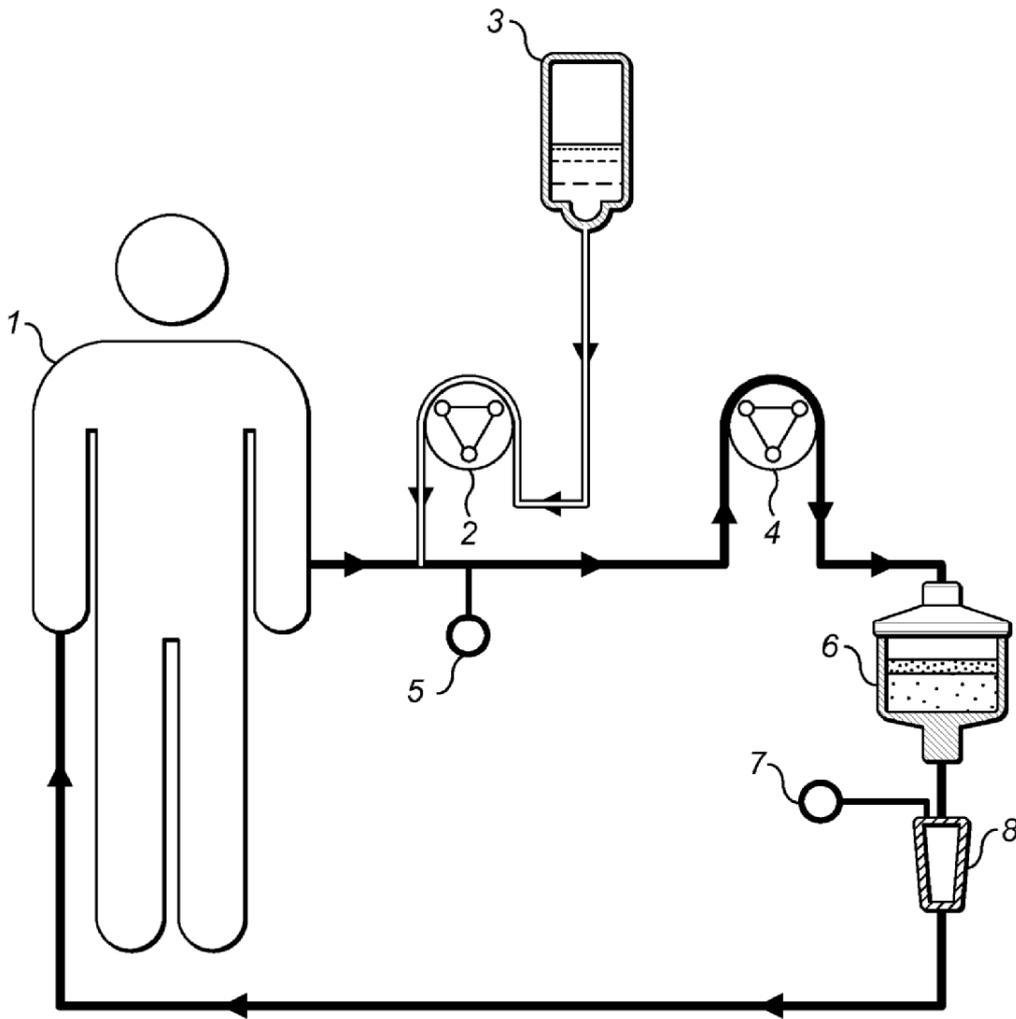


FIG. 10

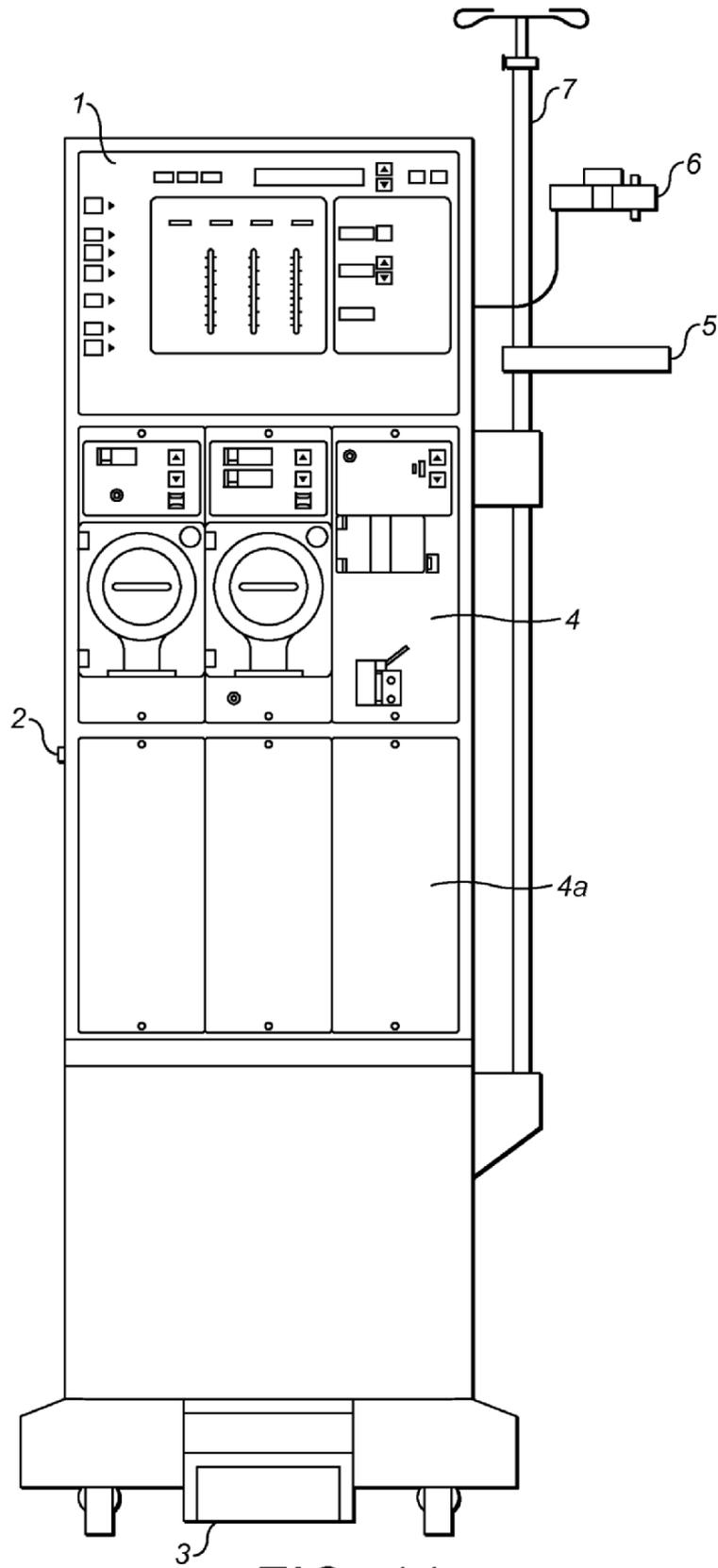


FIG. 11

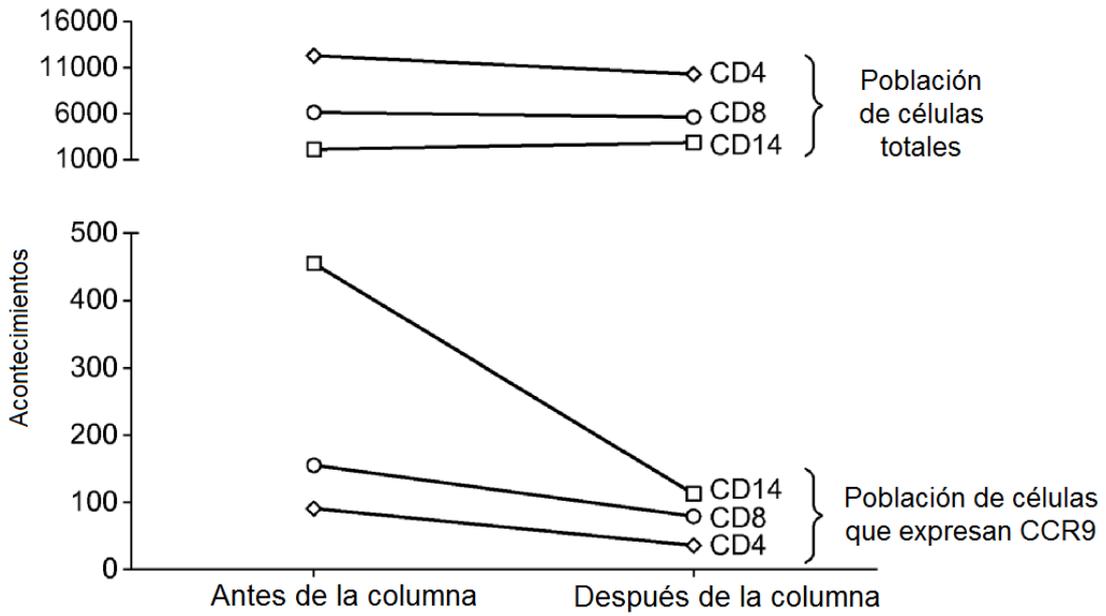


FIG. 12

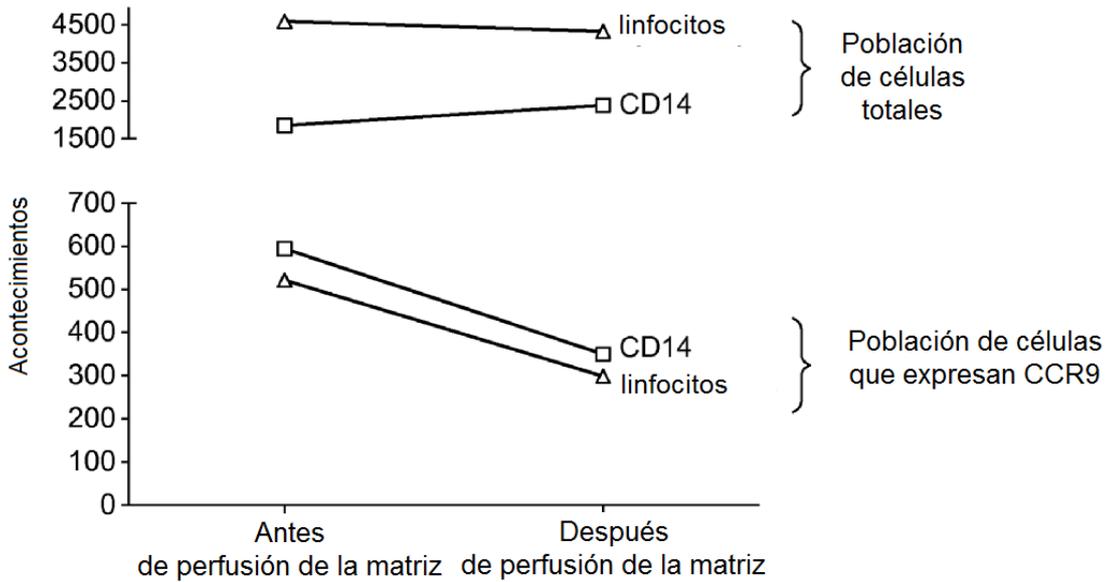


FIG. 13

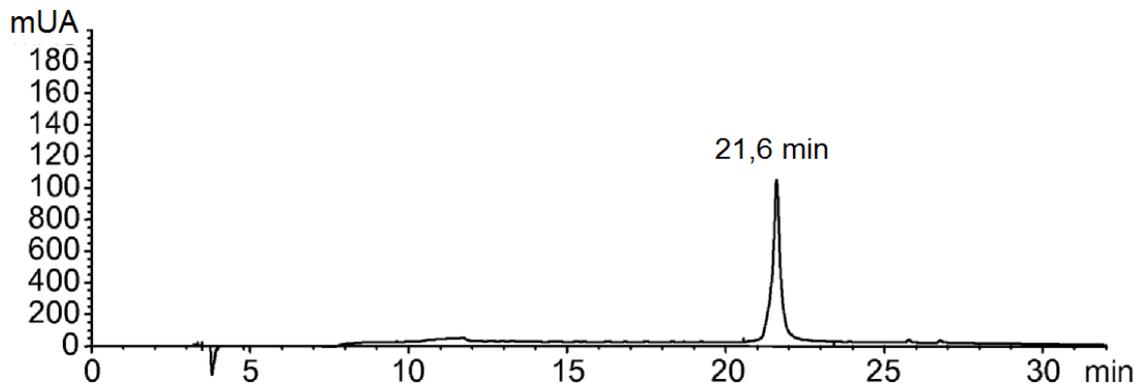


FIG. 14

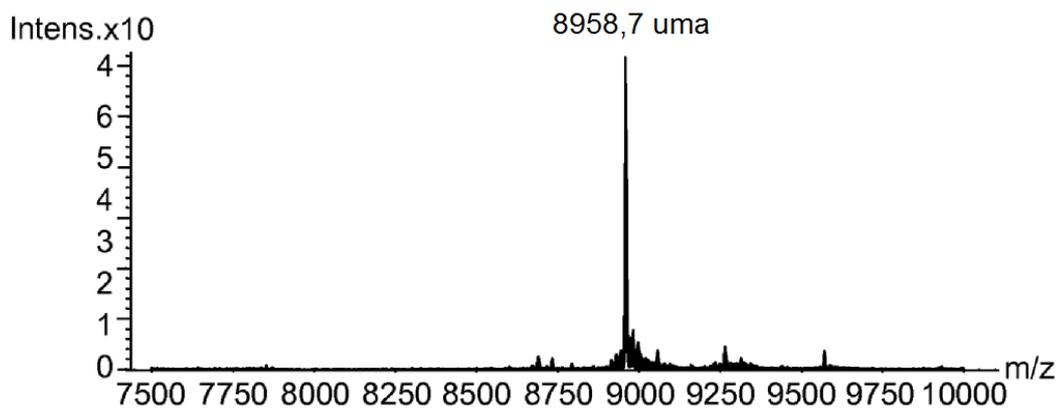


FIG. 15

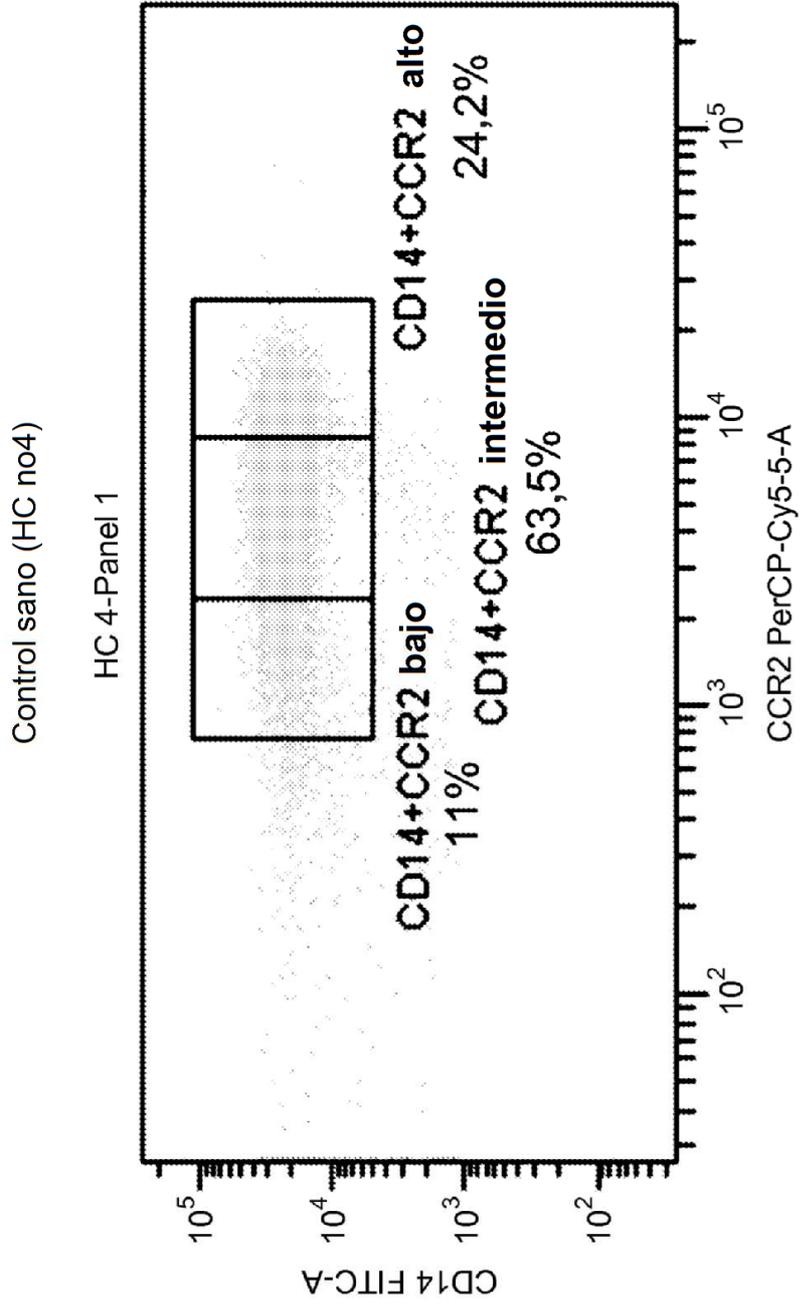


FIG. 16

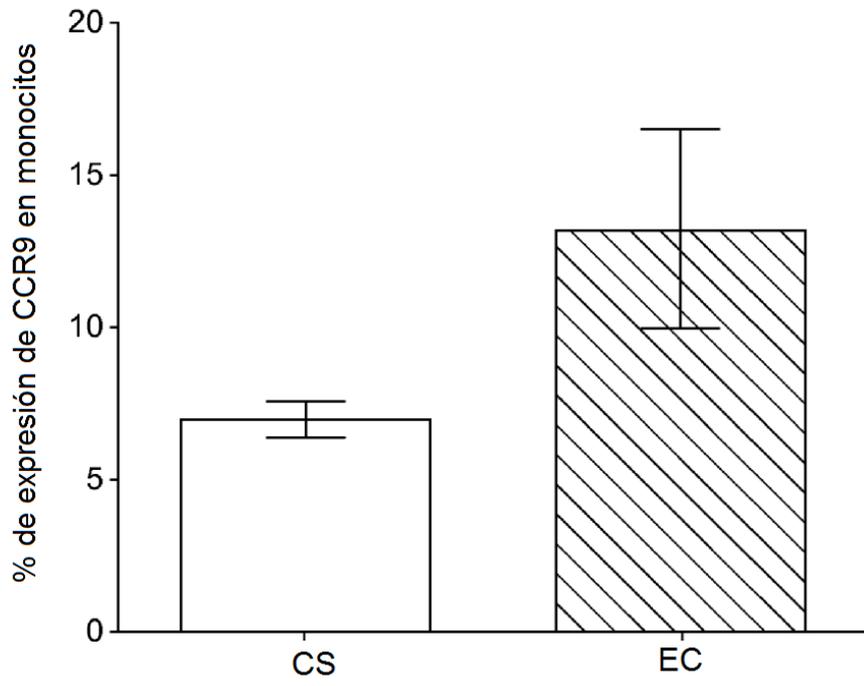


FIG. 17

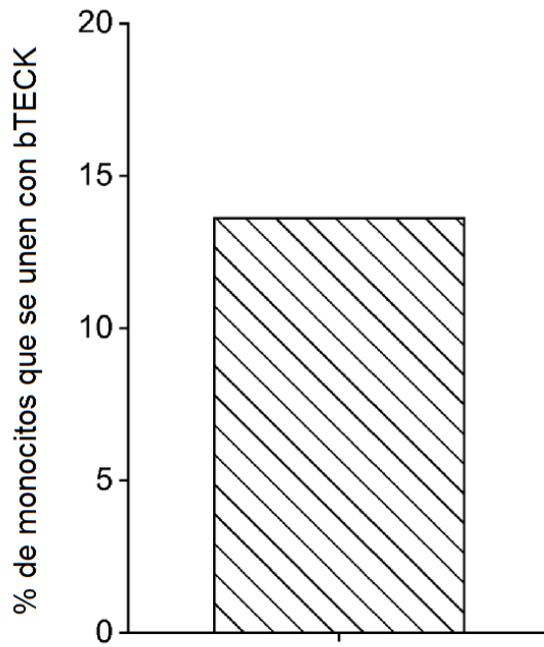


FIG. 18

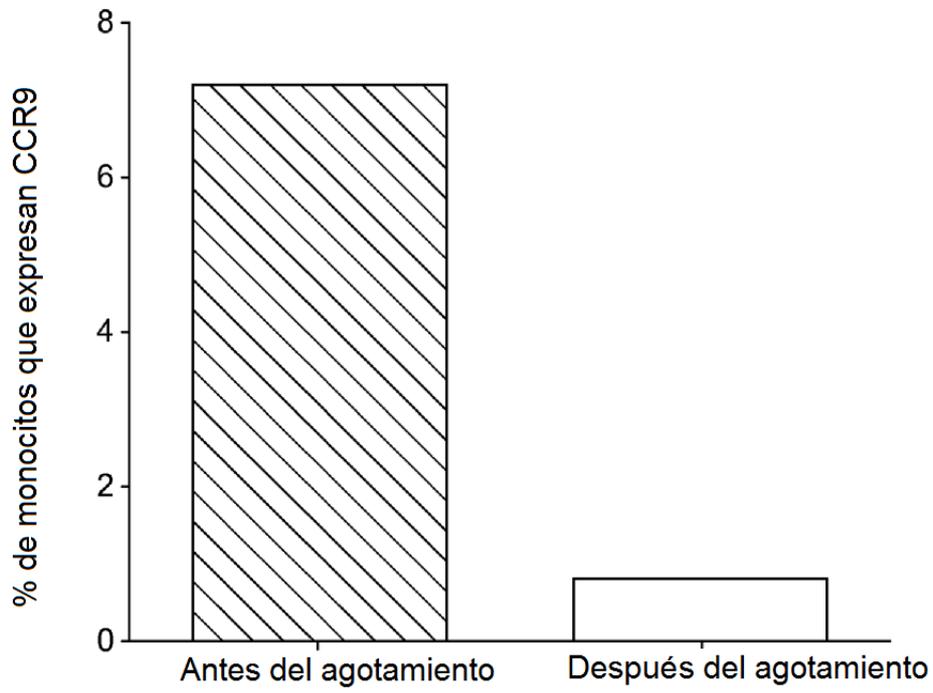


FIG. 19

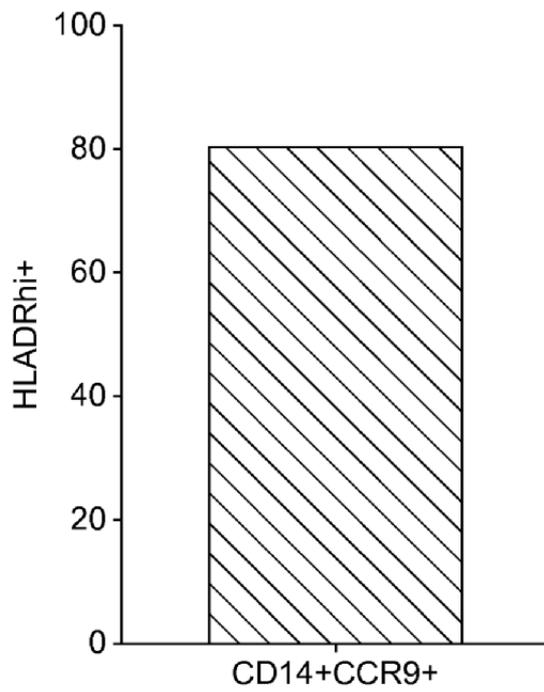


FIG. 20

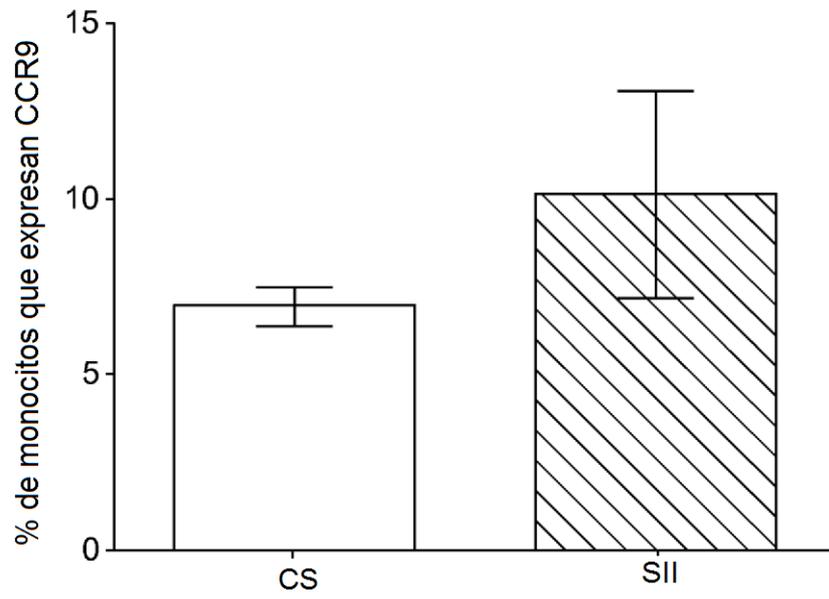


FIG. 21

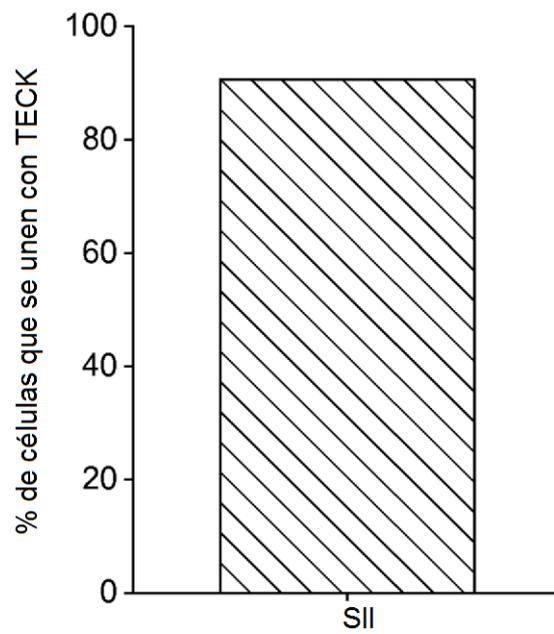


FIG. 22

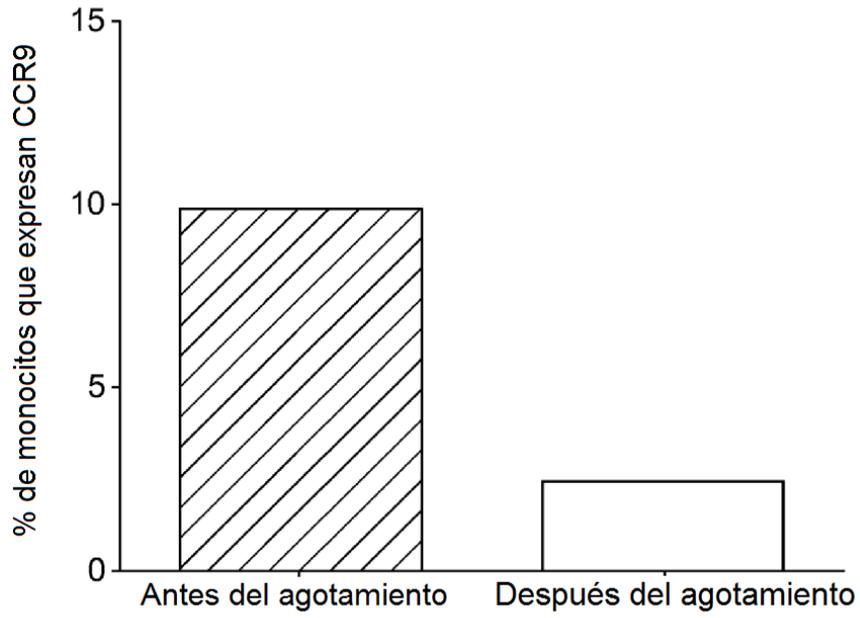


FIG. 23

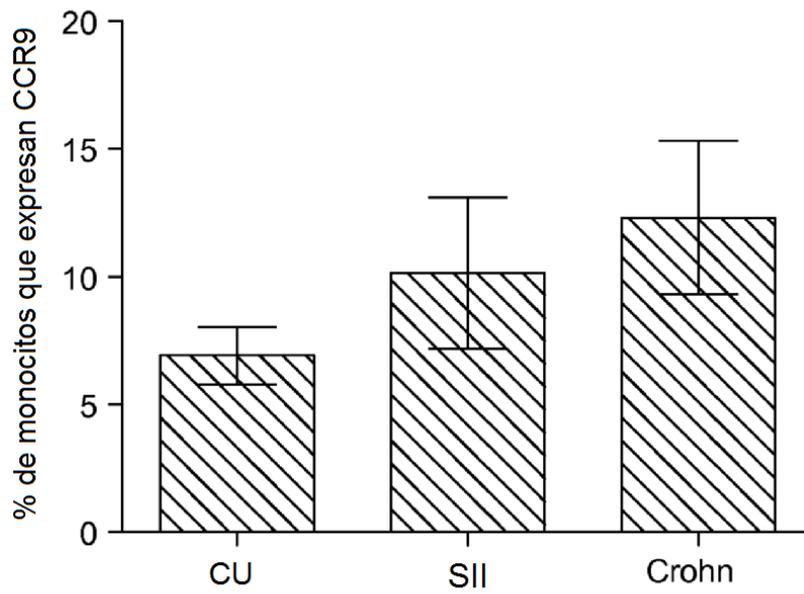


FIG. 24

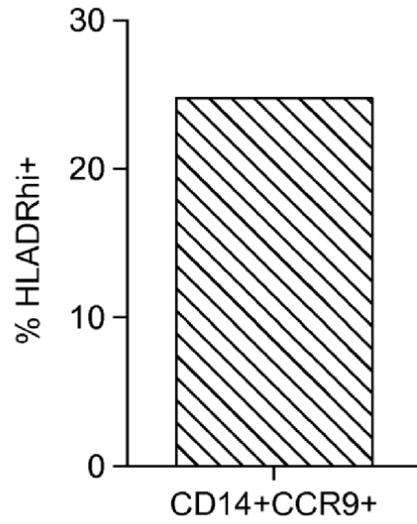


FIG. 25a

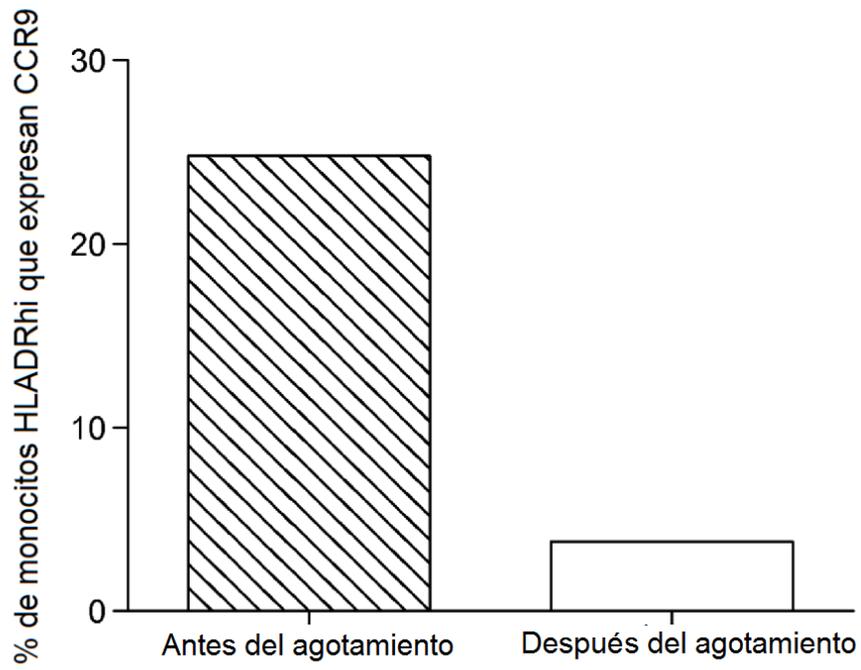


FIG. 25b