

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 300**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C07K 14/52** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61M 1/36** (2006.01)  
**B01J 20/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 16200905 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3176583**

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

**13.05.2020**

73 Titular/es:

**TLA TARGETED IMMUNOTHERAPIES AB  
(100.0%)  
Avd L2:04, Karolinska Universitetssjukhuset,  
Solna  
171 76 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**WINQVIST, OLA y  
COTTON, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 760 300 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 la enfermedad inflamatoria del intestino y del 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 $\alpha$ . 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 fístula 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

Autschbach, F *et al.*, Cellular Immunology, 2005, 236, pág. 110-114, se refiere a las quimiocinas como mediadores importantes implicados en el reclutamiento de leucocitos en los tejidos linfoides y en los sitios de inflamación, identificando anticuerpos monoclonales adecuados para inmunohistoquímica, por el análisis de un panel de nuevos reactivos proporcionados por la sección de receptores de citocinas/quimiocinas del 8º taller de HLDA, sobre cortes de criostato de intestino, amígdala e hígado humanos normales. Además, se analizaron los tejidos intestinales inflamados de individuos con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Los resultados revelan una expresión regulada al alza de receptores de quimiocinas como CCR6, CCR7, CCR9, CXCR1 y CXCR3 en el intestino inflamado.

50

55

Matthew, J. W., *et al.*, J. Pharmacol. Experimental Ther., 2010, 335(1), pág. 61-69, se refiere al descubrimiento de una molécula pequeña, CCX282-B, que es un antagonista potente, selectivo y biodisponible por vía oral del CCR9 humano. CCX282-B inhibió la movilización de Ca(2+) mediada por CCR9 y la quimiotaxis en células Molt-4 con valores de CI(50) de 5,4 y 3,4 nM, respectivamente. En presencia de suero humano al 100 %, CCX282-B inhibió la quimiotaxis mediada por CCR9 con un CI(50) de 33 nM, y la adición de glucoproteína ácida  $\alpha$ 1 no afectó su potencia. CCX282-B inhibió la quimiotaxis de células primarias que expresan CCR9 hacia CCL25 con un CI(50) de 6,8 nM. CCX282-B fue un inhibidor equipotente de la quimiotaxis dirigida por CCL25 de ambas formas de corte y empalme de CCR9 (CCR9A y CCR9B), con valores de CI(50) de 2,8 y 2,6 nM, respectivamente. CCX282-B también inhibió la quimiotaxis mediada por CCR9 de ratón y rata. La inhibición de CCR9 con CCX282-B da como resultado la normalización de la enfermedad de Crohn, como la histopatología asociada con los ratones TNF ( $\Delta$ ARE).

60

**Sumario de la invención**

65

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.

Los inventores también han determinado que la frecuencia de monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup> 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.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un marcador de monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup> seleccionado de CCR9, para uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, en el que el reactivo de unión 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<sup>hi</sup> de la sangre periférica del paciente o sujeto, y en el que el reactivo de unión es un anticuerpo.

Además, la presente invención también se refiere a un método para diagnosticar, supervisar la progresión de o supervisar el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende determinar los niveles de monocitos que expresan CCR9 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que altos niveles de monocitos que expresan CCR9 o niveles aumentados de monocitos que expresan CCR9 en comparación con los niveles de monocitos que expresan CCR9 en un sujeto sano, indican la presencia o la progresión de la enfermedad inflamatoria del intestino y en el que se ha tratado al sujeto utilizando un agente de unión de acuerdo con la invención.

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 se dirigen a células CD14+HLA-DR<sup>hi</sup> 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.

Por lo tanto, en determinadas realizaciones la invención sirve para reducir el reclutamiento de leucocitos inflamatorios, que expresan receptores característicos, incluyendo receptores de quimiocinas, y posiblemente expresan 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, la divulgación permite 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 divulgación. Por lo tanto, los métodos de diversas realizaciones de la invención preferentemente se dirigen a células que expresan "CCR9<sup>hi</sup>" 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.

En otras realizaciones, la invención proporciona además un reactivo de unión capaz de unirse específicamente con un marcador de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> seleccionado de CCR9, para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, incluida la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), en el que el reactivo de unión se inmoviliza, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente, retirando así los monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> de la sangre periférica del paciente. En determinadas realizaciones, la invención también proporciona el uso de un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un marcador de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> seleccionados de 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<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> de la sangre periférica del paciente.

En determinadas partes, la divulgación permite el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, incluida la enfermedad de Crohn (EC) y la 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 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 otras partes, la divulgación se dirige 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 comprende una reducción de células que expresan receptores, es decir, el receptor 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<sup>hi</sup>, en la sangre periférica del paciente. Las células que expresan CCR9 comprenden, consisten esencialmente en o consisten en monocitos, en particular monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>, 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<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>). Los monocitos no clásicos pueden caracterizarse por bajo nivel de expresión de CD14 y con coexpresión adicional del receptor de CD16 (monocito CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). Los monocitos intermedios pueden caracterizarse por alto nivel de expresión de CD14 y bajo nivel de expresión de CD16 (monocitos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>). 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<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>MR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>

CXC3R1<sup>bajo</sup> se consideran el subconjunto “inflamatorio” y los CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup>CXC3R1<sup>alto</sup> son monocitos “residentes”.

CCR9 expresado en estas células anteriormente mencionadas se unen con quimiocinas tales como CCL25. CCR9 es el símbolo génico 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.

El tratamiento de EII de acuerdo con las diversas divulgaciones 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 CCR9, en particular monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup> de la sangre periférica del paciente. En partes específicas de la divulgación, se consigue al menos aproximadamente 50 % de agotamiento en un único tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento exitoso puede definirse con referencia al agotamiento de monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup>. El tratamiento puede conducir al agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup>.

El tratamiento de SII de acuerdo con la divulgación 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 incluyendo estas cantidades, de células que expresan CCR9, en particular monocitos que expresan CCR9 de la sangre periférica del paciente. En partes específicas de la divulgación, 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<sup>hi</sup>. El tratamiento puede conducir al agotamiento de entre aproximadamente 100 y 500 millones de células que expresan CCR9, en particular monocitos que expresan CCR9, tales como monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup>, en ciertas realizaciones y más particularmente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 millones de células que expresan CCR9.

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. 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 CCR9, y específicamente CCR9 en el caso de SII en particular monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup> de la sangre periférica.

Se prevé específicamente que puedan emplearse combinaciones de reactivos de unión para agotar niveles de monocitos CD14+HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9 de sangre periférica.

Los anticuerpos contra el receptor de quimiocina relevante generalmente se consideran antagonistas, como apreciaría un experto en la materia. Los reactivos de unión específicos incluyen anticuerpos.

En el contexto de la divulgación, 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). 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.

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 6Ck $\alpha$ , “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.

5 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  
10 disponible el 13 de junio de 2011.

Un ejemplo de una quimiocina de la divulgación 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  
15 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.

25 Un ejemplo adicional de una quimiocina de la divulgación 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-3β) 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.

35 Por lo tanto, en la presente divulgación, 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

GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX

40 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

GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX

45 X es K(Biotina)

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, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de los  
50 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')<sub>2</sub>, 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, pág. 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	Biolegend
HLA-DR	APC Cy7	Biolegend

Las células que expresan receptores de quimiocinas pueden por lo tanto ser dianas usando agentes de unión alternativos, tales como anticuerpos, 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.

Por lo tanto, en determinadas partes la divulgación proporciona 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.

De forma similar, otras partes de la divulgación proporcionan un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un receptor de quimiocinas para su uso en el tratamiento de la EII, 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 un receptor de quimiocinas de la sangre periférica de un paciente/sujeto, en el que el reactivo de unión no es una quimiocina) a la que se aplica sangre periférica de un paciente, retirando de este modo células que expresan receptores de quimiocinas de la sangre periférica del paciente.

Se conocen en la técnica materiales de soporte sólido para inmovilizar los reactivos de unión de las diversas realizaciones de la invención. "Soporte sólido" se refiere, 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,

que es un anticuerpo, 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 biotinilación 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 biotinilada, 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 biotinilado, 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, 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.

Como alternativa, los anticuerpos pueden inmovilizarse 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  $\alpha$ -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, es decir, el receptor CCR9, 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 biotinilados, 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 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. 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. 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.

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, comprende determinar los niveles de monocitos que expresan CCR9 en una muestra obtenida de un sujeto, en el que los altos niveles de monocitos que expresan CCR9, o los niveles aumentados de monocitos que expresan CCR9 en comparación con los niveles de monocitos que expresan CCR9 en un sujeto sano, indican la presencia o progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal, y en el que el sujeto se ha tratado utilizando un agente de unión de acuerdo con la invención.

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 CCR9 o niveles de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>.

“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 la colitis ulcerosa (CU). La supervisión de la progresión puede implicar realizar los métodos de diagnóstico múltiples veces en el mismo paciente para determinar si los niveles de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan 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.

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 en el presente documento. Por lo tanto, los niveles relativos de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9, niveles relativos de células HLA-DR<sup>hi</sup>, CCR9<sup>hi</sup>, pueden ser con referencia a muestras tomadas del mismo sujeto en un punto temporal diferente. En ciertas realizaciones, los niveles reducidos de CCR9, niveles reducidos de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9, niveles relativos reducidos de expresión de CCR9 incluyendo niveles relativos reducidos de expresión de CCR9 promedio por célula, o niveles relativos reducidos de células CD14<sup>hi</sup>, HLA-DR<sup>hi</sup>, CCR9<sup>hi</sup>, se correlacionan con tratamiento exitoso.

Cuando se supervisa la progresión de enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), los niveles aumentados de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9, la expresión de CCR9 incluyendo niveles relativos aumentados de células HLA-DR<sup>hi</sup>, CCR9<sup>hi</sup>, pueden indicar la progresión de la afección o enfermedad. Por lo tanto, si los niveles de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9 aumentan en una muestra tomada más tarde que una muestra del mismo paciente, esto puede indicar la progresión de la afección.

Por lo tanto, en realizaciones específicas, niveles altos o mayores de células que expresan CCR9, niveles altos o mayores de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> 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<sup>hi</sup> 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<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> 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<sup>hi</sup> 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<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9<sup>hi</sup>) 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<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9, niveles de expresión de CCR9 y/o niveles de células con alta expresión de CCR9 (definidas como CCR9<sup>hi</sup>) en la muestra de ensayo con la gravedad relativa de la afección.

Los inventores han mostrado que los niveles de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> o monocitos que expresan CCR9 pueden ligarse a éxito mejorado con ciertos tratamientos para enfermedad inflamatoria del intestino.

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

### Descripción de las figuras

**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<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> (abajo a la izquierda), CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> (abajo en el centro) y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (abajo a la derecha).

**Figura 2. Los monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> aumentan y se correlacionan con actividad de enfermedad en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.**

(A) Frecuencia de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> 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).

(B) Análisis de regresión de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> y actividad de enfermedad clínica en pacientes con colitis ulcerosa (p = 0,024; r<sup>2</sup> = 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<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> y actividad de enfermedad clínica en pacientes con enfermedad de Crohn (p = 0,016; r<sup>2</sup> = 0,190). Los datos representan las medidas (n = 29) de 11 pacientes

únicos en puntos temporales diferentes durante el tratamiento.

**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- $\alpha$  (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.

**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- $\alpha$  en monocitos CD14+HLA-DRhi después de activación de LPS durante 2 horas (n = 4, p = 0,0047).

(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 después de activación de LPS durante 6 h. Los factores de cambio varían entre 347,3-10,9 y -10,3-232,3, respectivamente.

**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.

**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).

**FIG. 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;

**FIG. 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;

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

**FIG. 10.** El sistema de leucoféresis general.

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

**FIG. 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.

**FIG. 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.

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

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

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

**FIG. 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.

**FIG. 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.

**FIG. 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).

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

**FIG. 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.

**FIG. 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.

**FIG. 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).

**FIG. 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.

**FIG. 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.

## Descripción de realizaciones preferidas

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

#### 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- $\gamma$ , 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<sup>-</sup> producen la citocina reguladora IL-10 y se denominan más habitualmente monocitos clásicos. El subconjunto CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> 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-DRhi 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-DRhi 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- $\alpha$  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 (NH<sub>4</sub>Cl 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/10<sup>6</sup> células) durante 2 h (PCR de TNF- $\alpha$ ) o 6 h (matriz de PCR) en medio RPMI (Hyclone) complementado con L-glutamina 1 % y PEST (penicilina-estreptomicina) 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- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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- $\alpha$  y CCL25, se normalizaron los niveles de expresión para ARN polimerasa II usando los métodos de 2-<sub>Ct</sub> (TNF- $\alpha$ , Figura 4B) o 2-<sub>Ct</sub> (CCL25, Figura complementaria 1B). Los cebadores usados fueron TNF- $\alpha$  directo (5'-CTCTCTCCCTGGAAAGGAC-3'); TNF- $\alpha$  inverso (5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'); CCL25 directo (5'-AAGGTTTTTGCAAAGCTCCA-3'); CCL25 inverso (5'-TACTGCTGCTGATGGGATTG-3'); RPII directo (5'-GCACCACGTCCAATGACAT-3'); RPII inverso (5'-GTGCGGCTGCTCCATAA-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-<sub>Ct</sub>.

### Ensayo de agotamiento de CCL25

Se unió CCL25 biotinilada (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

5 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

15 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***

25 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,  $p=0,006$ ).

30 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***

40 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- $\alpha$  (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- $\alpha$  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.

50 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***

60 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- $\alpha$ . Resulta interesante que la población CD14+HLA-DRhi produjo niveles aumentados 500 veces de transcritos de TNF- $\alpha$  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 CCR9***

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- $\alpha$  (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 $\gamma$  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- $\alpha$ , 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- $\alpha$  y corticosteroides y debería investigarse adicionalmente ya que el fracaso anti TNF- $\alpha$  puede depender parcialmente de la producción de los monocitos de quimiocinas proinflamatorias adicionales, citocinas y receptores de integrina que contrarresten la supresión de TNF- $\alpha$ .

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- $\alpha$ , 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 $\beta$ , 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 $\beta$ , 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.

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 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 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.

## 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 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
  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 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
  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
  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
  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
  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
  20. Forster R, Davalos-Miszlitz 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], Gut2008: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.

<b>Sexo</b>	Hombre	32
	Mujer	19
<b>Media de edad</b>		37,9
<b>Diagnóstico</b>	Colitis ulcerosa	31
	Enfermedad de Crohn	20
<b>Extensión</b>	Extensiva	25
	En el lado izquierdo	19
	Proctitis	5
	Ileocecal	2
<b>Intervención</b>	Corticosteroides <sup>1,2</sup>	16
	Anti TNF- $\alpha$ <sup>3,5</sup>	17
	Aféresis de GMA <sup>4,5</sup>	18
	Sí	21
<b>Azatioprina</b>	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- $\alpha$  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 Adacolumn® 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	Biologend
CCR2	PerCP-Cy5.5	TG5	Biologend
CCR3	PE	5E8	Biologend
CCR5	PE	HM-CCR5	Biologend
CCR6	PerCP-Cy5.5	11A9	BD
CCR7	PerCP-Cy5.5	TG8	Biologend
CCR9	APC	112509	R&D Systems
CCR10	PE	314305	R&D Systems
CXCR1	APC	8F1	Biologend
CXCR5	PerCP-Cy5.5	TG2	Biologend
CXCR6	PE	56811	R&D Systems

**EJEMPLO DE REFERENCIA 2 - Afinidad de células sanguíneas por CCL25.**

Materiales y métodos

5 Aislamiento de leucocitos sanguíneos periféricos. Se fijó sangre periférica heparinizada de donantes de sangre sanos o pacientes con EII 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/μl, 0,5 ng/μl y 5 ng/μl). 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 DE REFERENCIA 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 μm a 300 μm 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 μg 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).

35 **EJEMPLO DE REFERENCIA 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+.

40 **EJEMPLO DE REFERENCIA 5 - Leucoféresis adaptada**

Diseño de columna y propiedades

45 Introducción

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.

55 La columna

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). Retirá 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.

65 La carcasa de plástico (FIGURA 9)

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™

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

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  $4 \times 10^{-14}$  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

5 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.

10 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.

15 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.

20

Condiciones de transporte

25 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 DE REFERENCIA 6 - estudios no clínicos**

30 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.

35

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.

40

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.

45

**EJEMPLO DE REFERENCIA 7 - resumen de síntesis de TECK-PEG-Biotina**

Molécula diana:

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

Modificaciones:

55 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 Gln 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 Gln 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.

60

65 La secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 1) se muestra, antes de la unión del espaciador de PEG y

## ES 2 760 300 T3

moléculas de biotina en el aminoácido 72

(K):H-XGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGNPKSREVQ

RAXKLLDARNKVF-OH

X1 = piroGlu o Gln

5 X64 = Norleucina

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 RAXKLLDARNXVF-

10 RESINA

X1 = piroGlu o Gln

X64 = Norleucina

X72 = K(Dde)

15 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 Gln N terminal a ácido piroglutámico.

Retirada de protección de Dde:

20 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.

Etapas de marcaje:

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

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.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

55 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.

60 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.

65

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

5 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:

10 Se ensayó TECK-Biotina-Nleu 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

NPKSREVQRAXKLLDARNXVF-OH

15 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)

20

### **EJEMPLO DE REFERENCIA 8 - síntesis de biotina MIP-3β (CCL19)**

Ensamblaje:

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

30

Retirada de protección de Dde:

35 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.

Etapas de marcaje:

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

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.

45 2. Recubrimiento

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.

50 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 una. La resina se lavó con DMF.

55 4. Acoplamiento de Biotina-OSu

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.

60 Escisión:

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), NH<sub>4</sub>I (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.

65

Protocolo de Purificación:

5 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 %].

Protocolo de plegamiento:

10 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.

15 Molécula diana: MIP-3 $\beta$  derivatizado en la funcionalidad de cadena lateral  $\epsilon$  amino de Lys (78) con Biotina (sal de TFA)

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

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

25 H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRN FHYLLIKD GCRVPAVVF TTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-NH2

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

30 La secuencia de MIP-3 $\beta$  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:

35 H-GTND AEDCCLSVTQKPIPGYIVRN FHYLLIKD GCRVPAVVF TTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-RESINA

X es FmocLys (ivDde)

40 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 AEDCCLSVTQKPIPGYIVRN FHYLLIKD GCRVPAVVF TTLRGRQLCA  
PPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSSX-NH2

X es K (biotina)

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

Datos de ensayos funcionales:

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

**EJEMPLO DE REFERENCIA 9 Tratamiento de enfermedad de Crohn (CD)**

55 **Materiales y métodos**

1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

60 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 NH<sub>4</sub>Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de cultivo bovino 2 %, se incubaron con suero humano 10 % durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron 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).

65

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

## 2. Ensayo de unión a quimiocinas

5 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 NH<sub>4</sub>Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de 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 biotilada (1 µM) o el anticuerpo de receptores de quimiocinas correspondientes a 4 °C durante 30 min (Tabla 2). La quimiocina biotilada se detectó mediante la interacción entre biotina y una estreptavidina conjugada con fluoróforo. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Canto con el software FACSDiva (BD Biosciences).

## 15 3. Agotamiento de células por matriz conjugada con quimiocina biotilada

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 biotilada (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-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 µm 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.

25

## Resultados y análisis

### Enfermedad de Crohn (EC)

#### 30 1. Análisis citométrico de flujo de sangre periférica

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).

35

#### 2. Ensayo de unión a quimiocina

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 biotilada (bTECK) (Figura 18).

40

#### 3. Agotamiento celular mediante matriz conjugada con quimiocina biotilada

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).

45

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

50

Se concluye que los monocitos en EC (monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>) 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 DE REFERENCIA 10 Diagnóstico y tratamiento de SII

5 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. Por lo tanto, los  
10 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.

#### 15 Materiales y métodos

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

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  
20 minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de 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).

25 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  
30 minutos a 37 °C y tampón de lisis (PBS con Tris 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 160 mM, pH 7,5) durante 15 min a 37 °C. Las células se lavaron en PBS con suero de 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.  
35 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

40 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.  
45  
50

## Resultados y análisis

Síndrome del intestino irritable (SII)

- 5 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).

10 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).

15 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.

20 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).

25 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.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un reactivo de unión capaz de unirse específicamente a un marcador de monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> seleccionado de CCR9, para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, en donde el reactivo de unión se inmoviliza en un soporte sólido contenido dentro de una columna de aféresis, a la que se aplica sangre periférica de un paciente, retirando así los monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup> de la sangre periférica del paciente o sujeto, y en donde el agente de unión es un anticuerpo anti CCR9.
- 10 2. El reactivo de unión de la reivindicación 1, en donde la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- 15 3. Un método para diagnosticar, supervisar la progresión o supervisar el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende determinar los niveles de monocitos que expresan CCR9 en una muestra obtenida de un sujeto, en donde niveles altos de monocitos que expresan CCR9 o niveles aumentados de monocitos que expresan CCR9 en comparación con los niveles de monocitos que expresan CCR9 en un sujeto sano, indican la presencia o la progresión de la enfermedad inflamatoria del intestino, y en donde el sujeto ha sido tratado utilizando un agente de unión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que la muestra es una muestra de sangre periférica.
- 25 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que niveles disminuidos de monocitos que expresan CCR9 se correlacionan con un tratamiento exitoso.

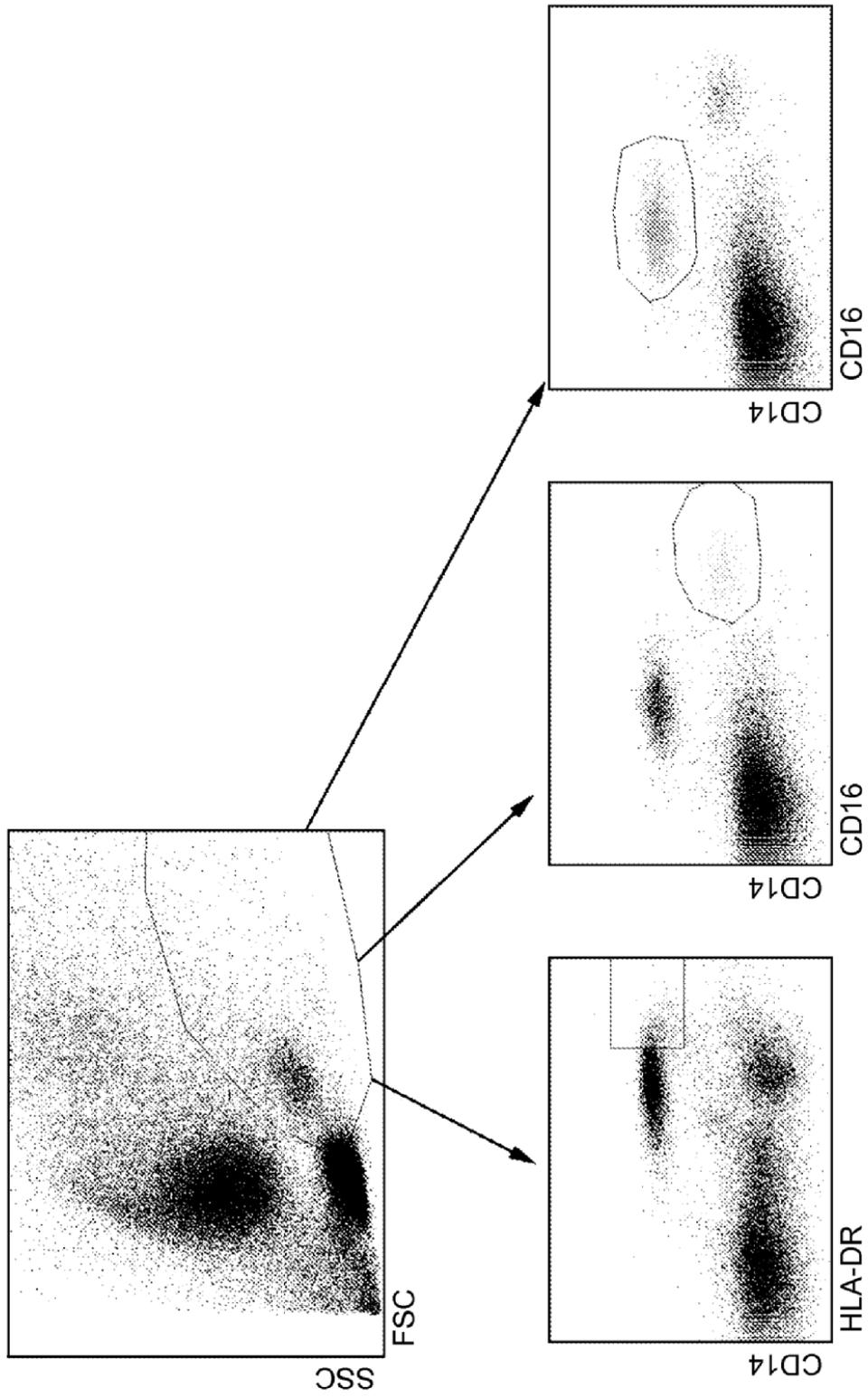
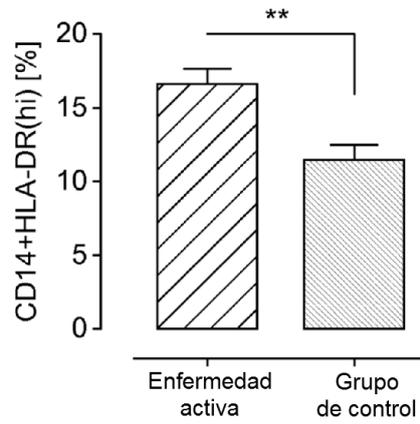
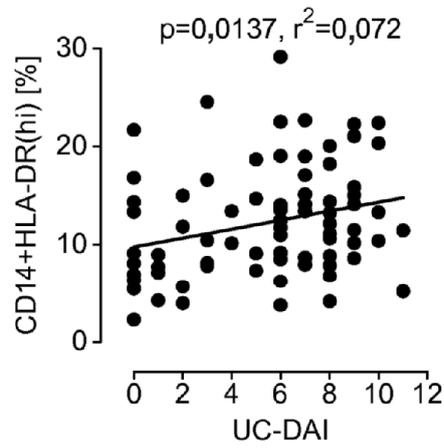


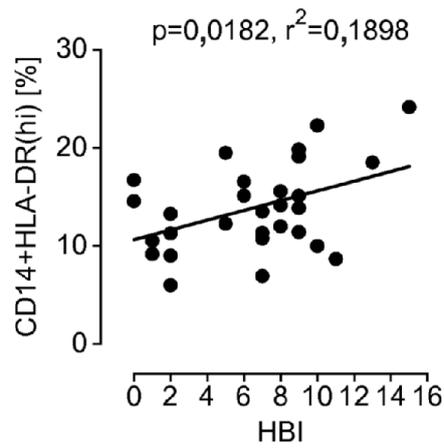
FIG. 1



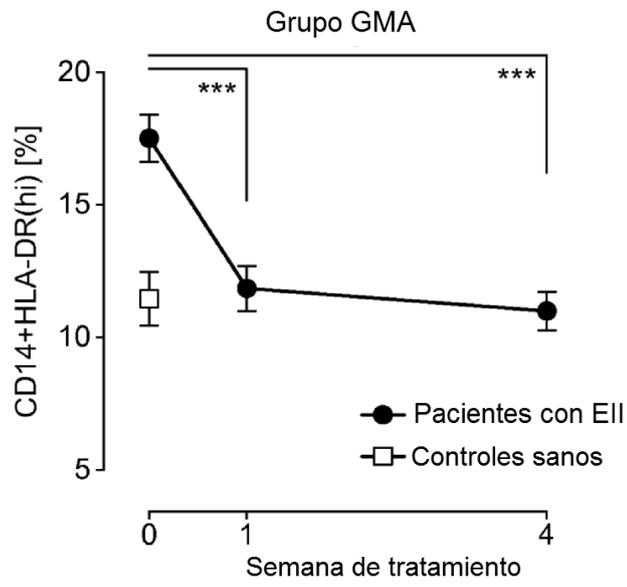
**FIG. 2a**



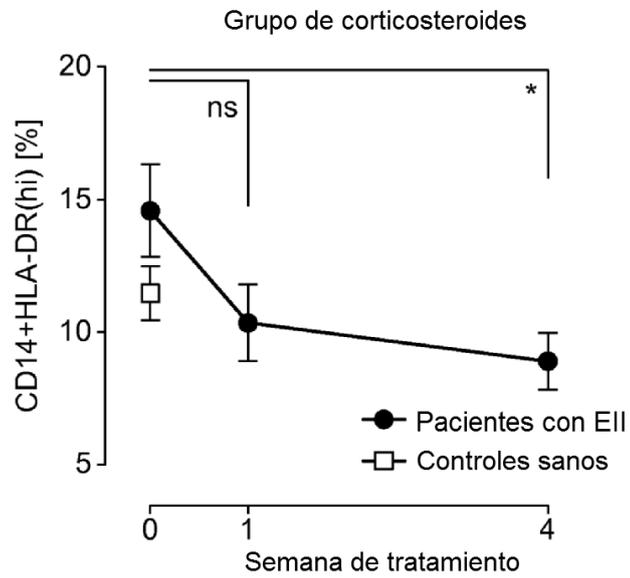
**FIG. 2b**



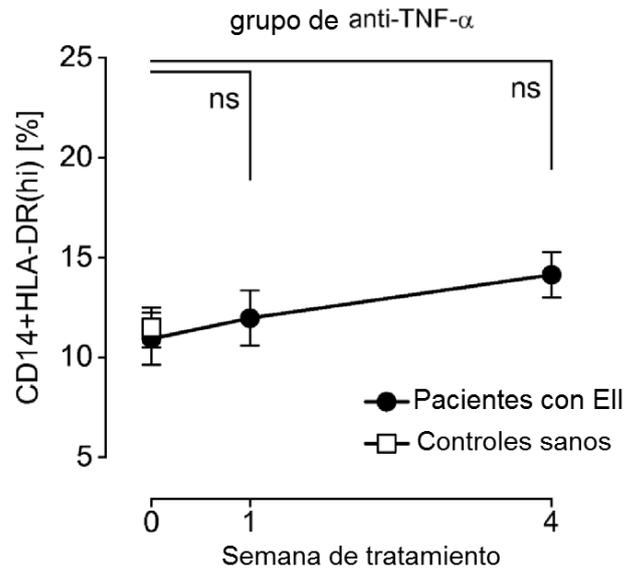
**FIG. 2c**



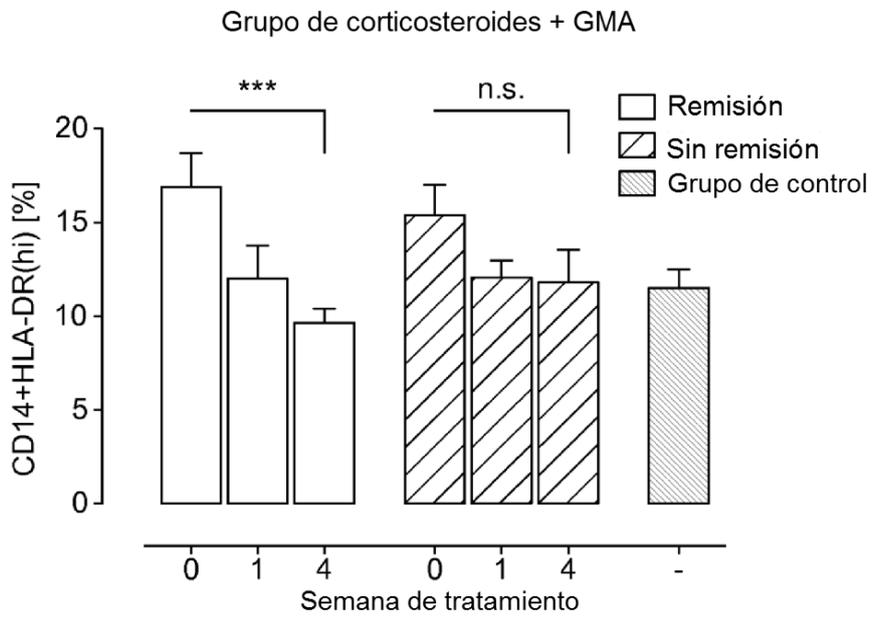
**FIG. 3a**



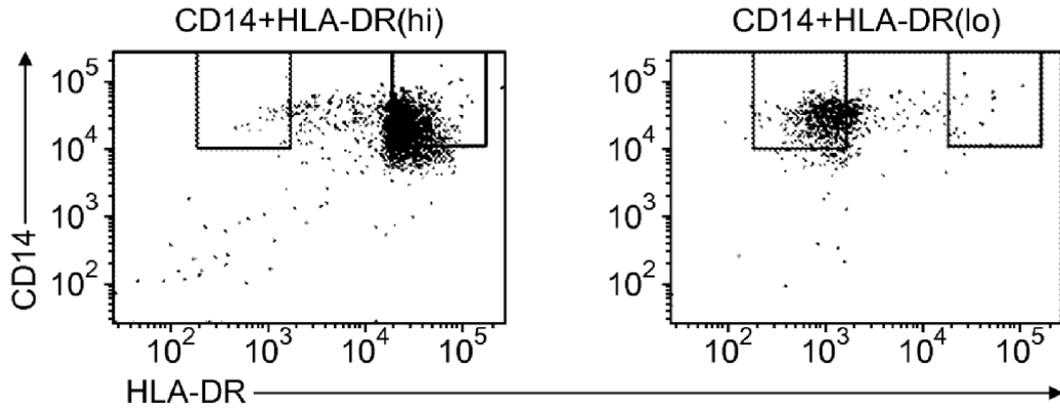
**FIG. 3b**



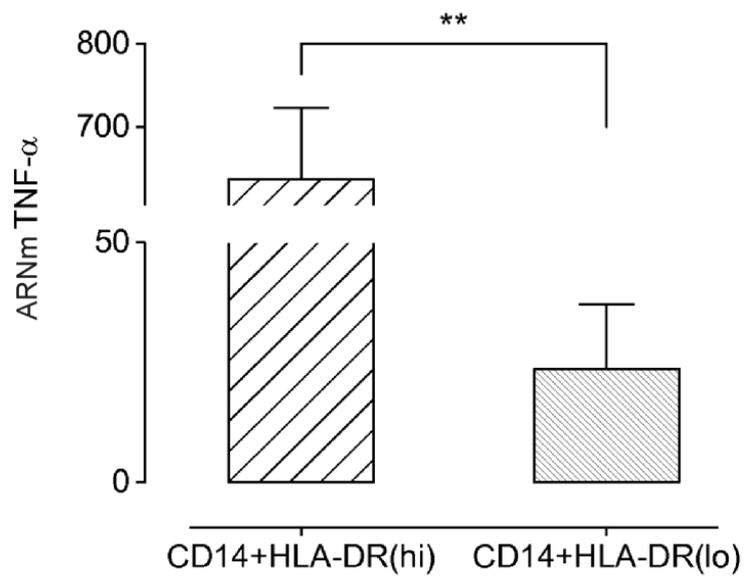
**FIG. 3c**



**FIG. 3d**



**FIG. 4a**



**FIG. 4b**

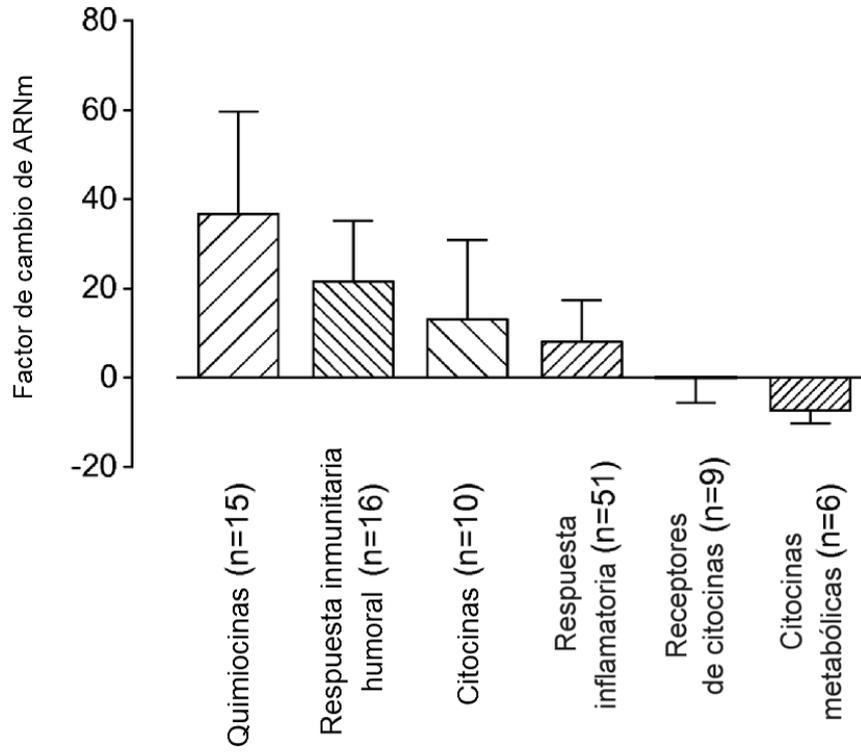


FIG. 4c

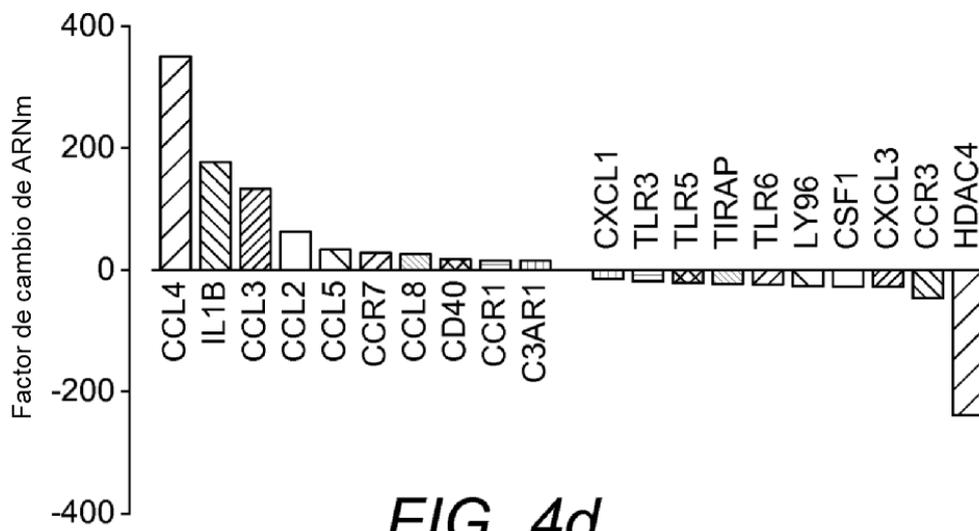
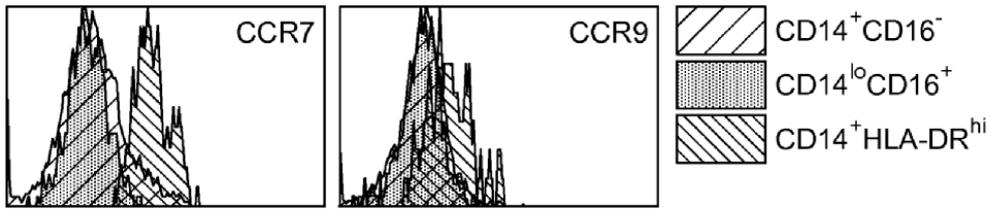
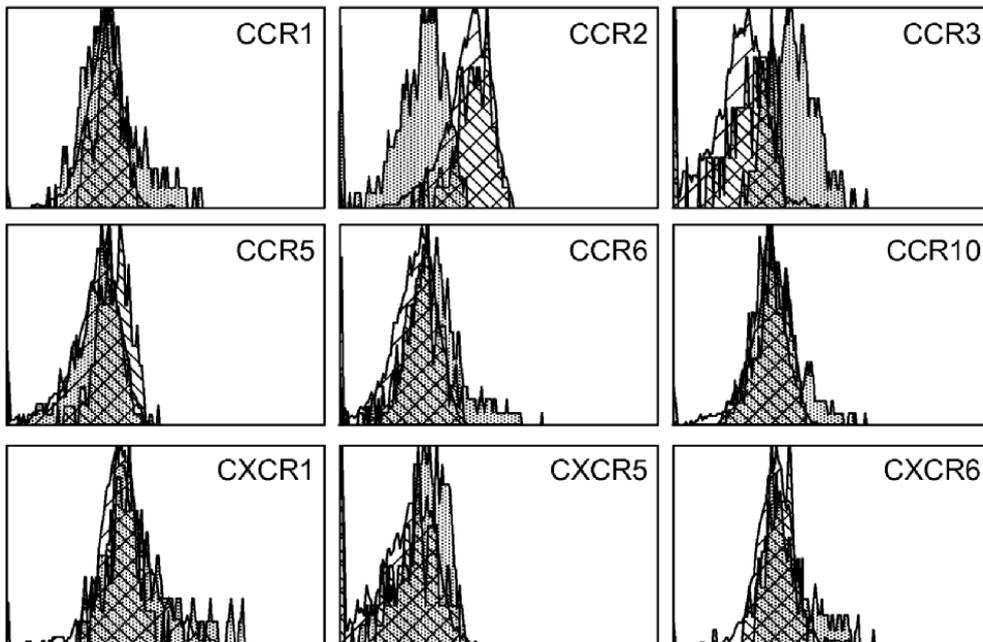


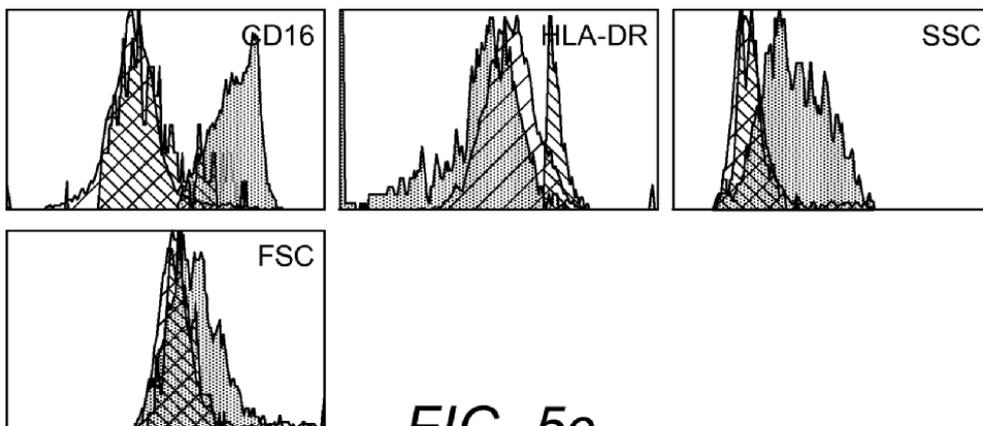
FIG. 4d



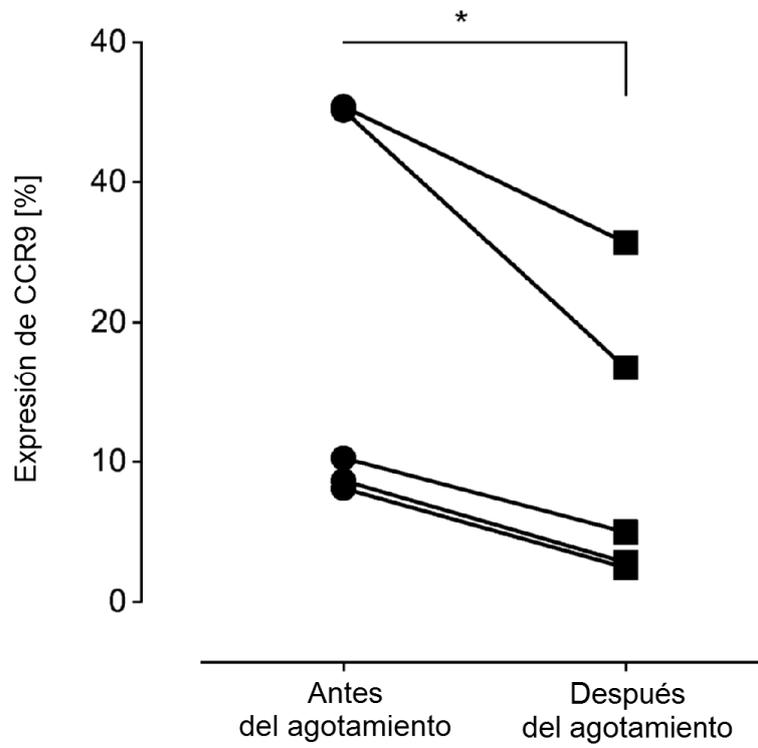
*FIG. 5a*



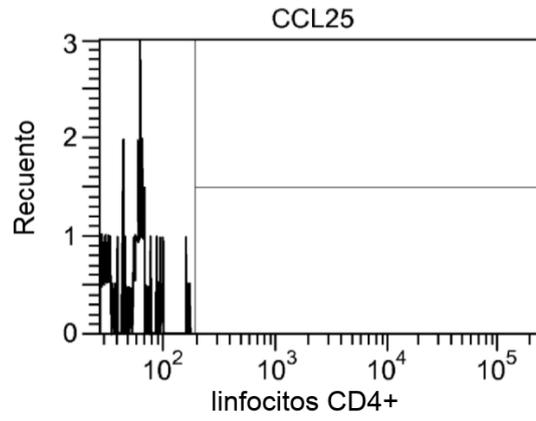
*FIG. 5b*



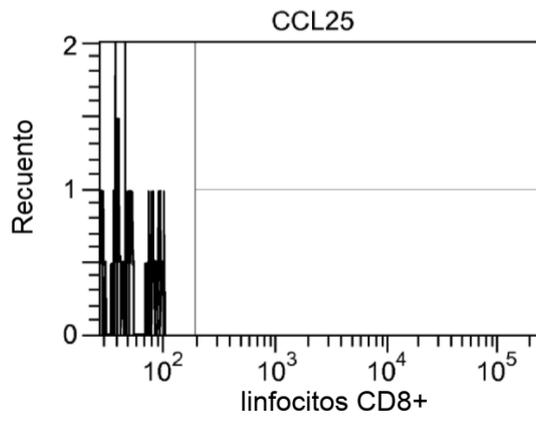
*FIG. 5c*



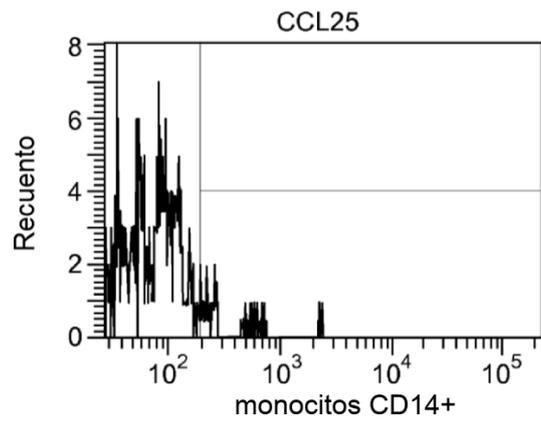
**FIG. 6**



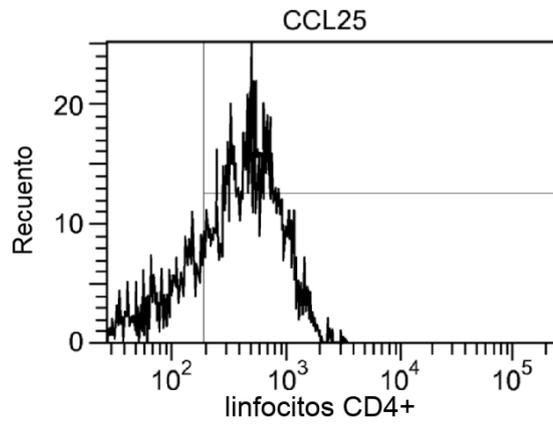
**FIG. 7a**



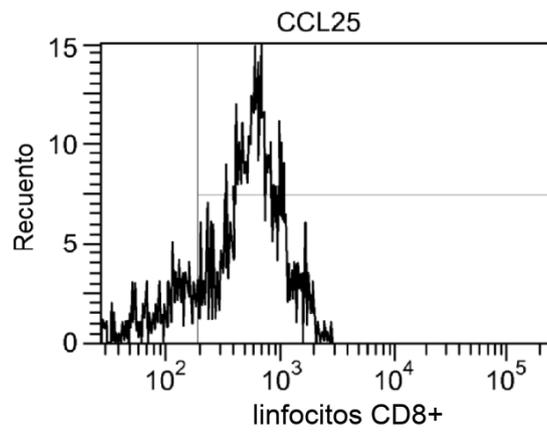
**FIG. 7b**



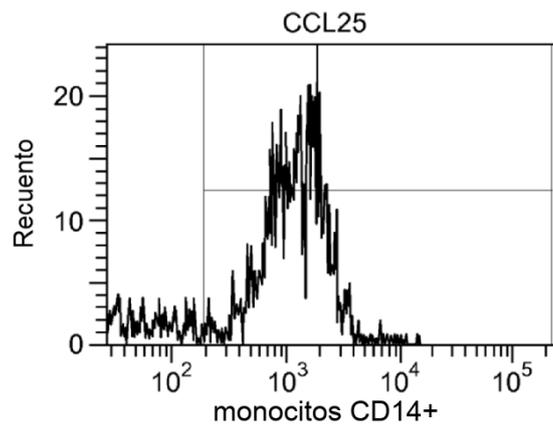
**FIG. 7c**



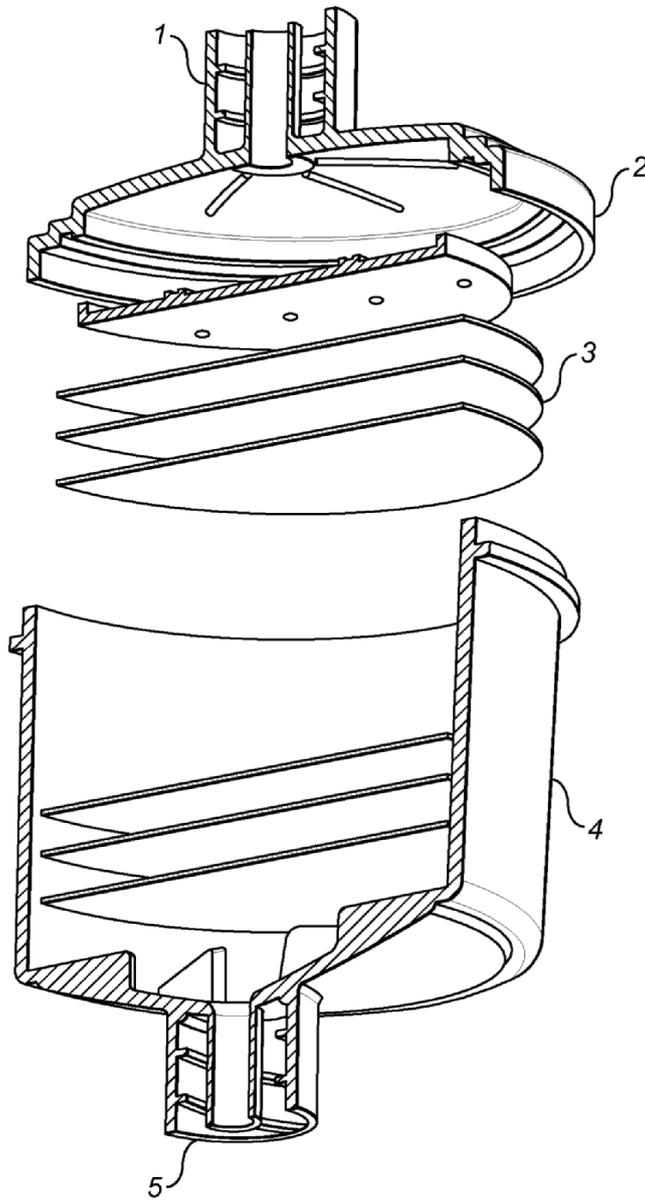
**FIG. 8a**



**FIG. 8b**



**FIG. 8c**



**FIG. 9**

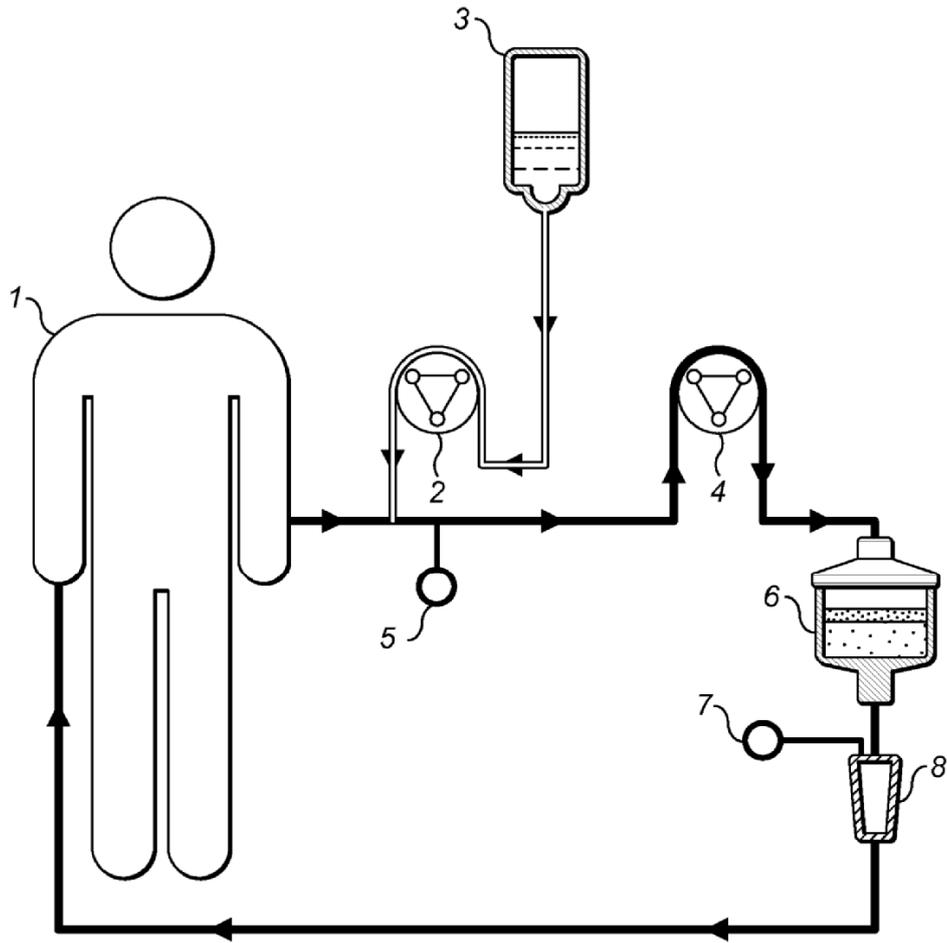


FIG. 10

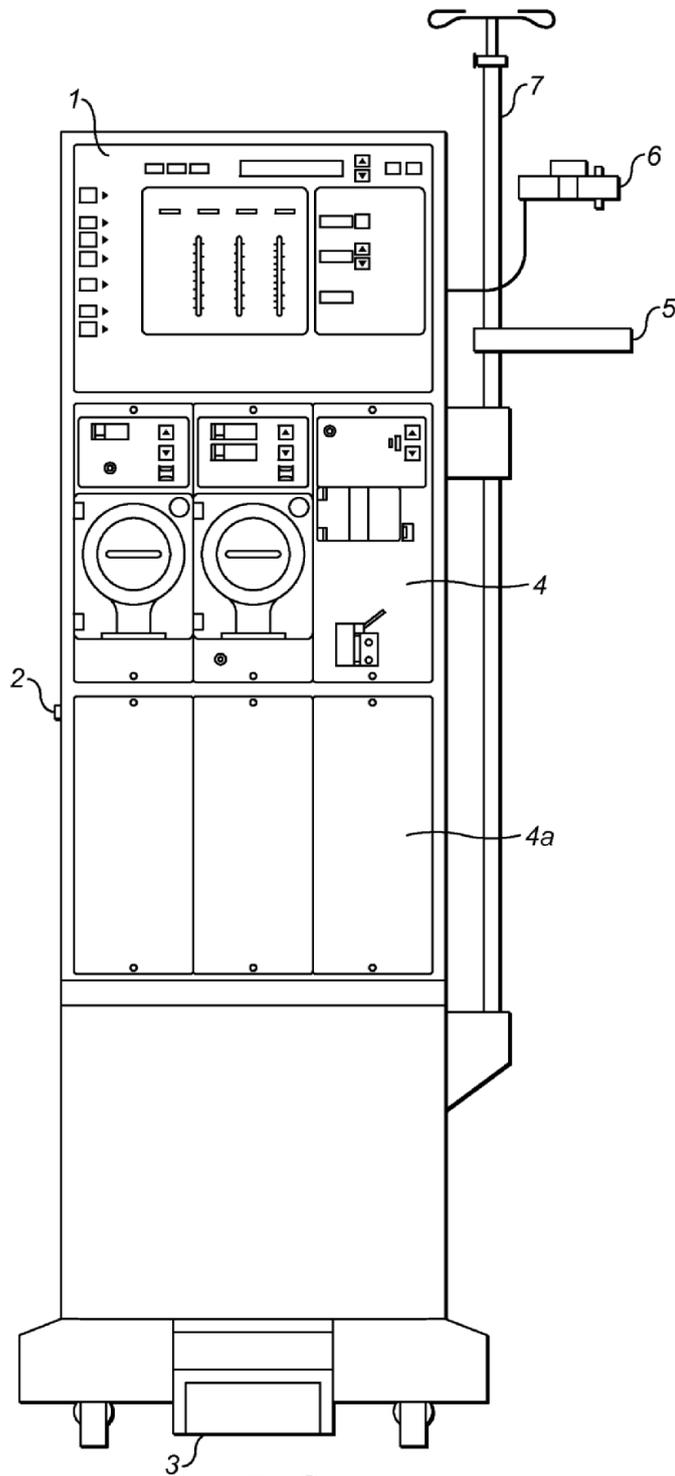


FIG. 11

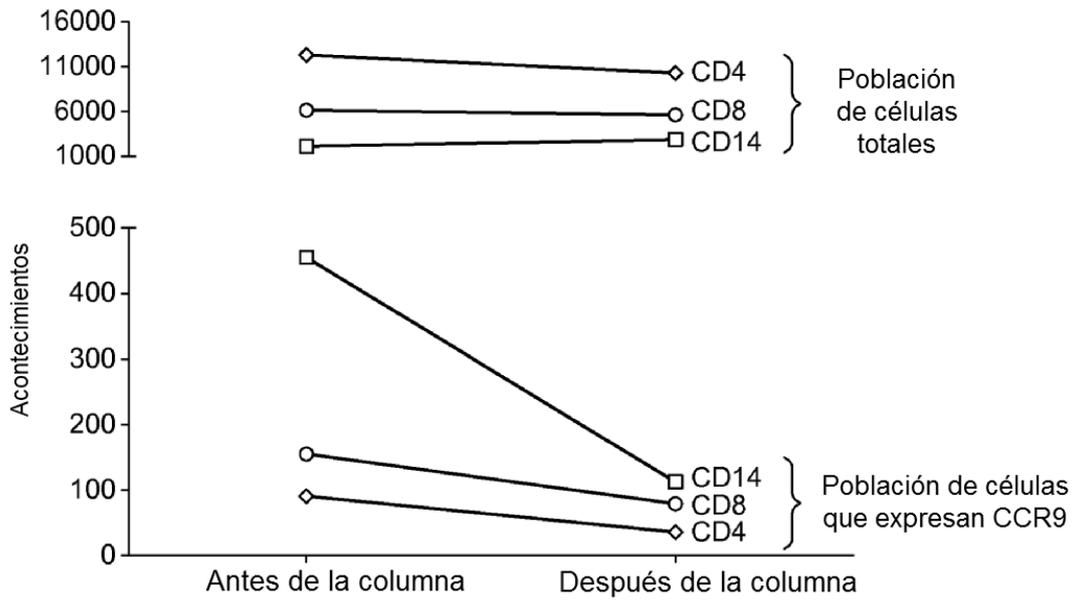


FIG. 12

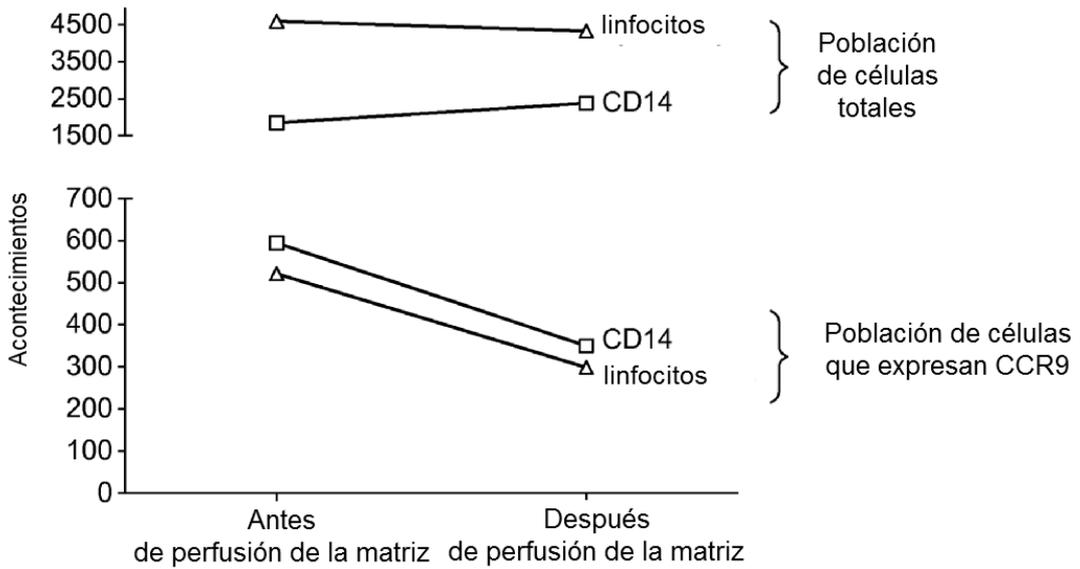
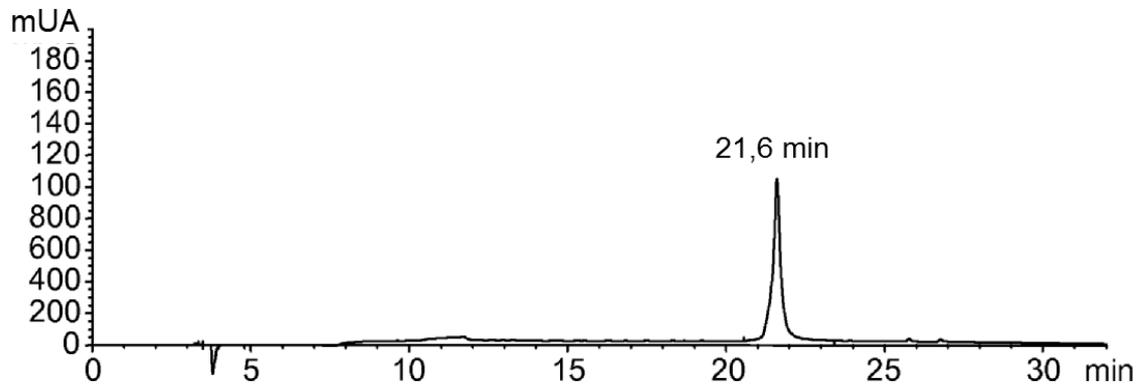
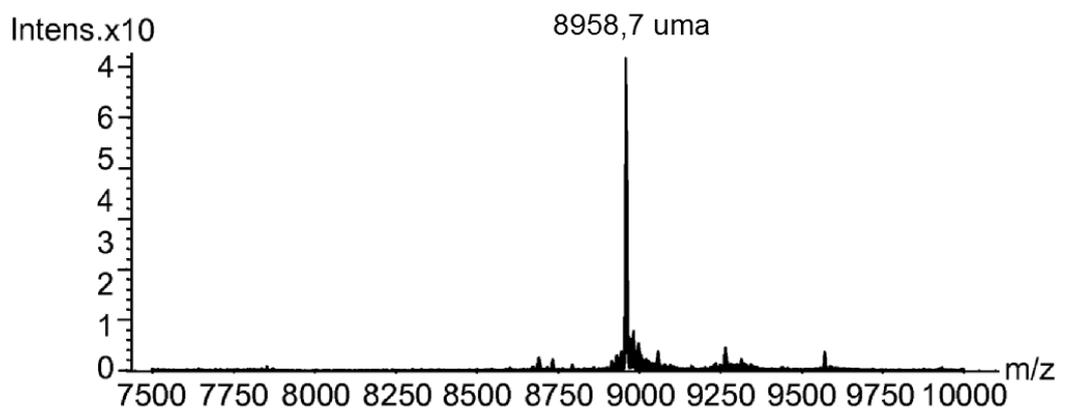


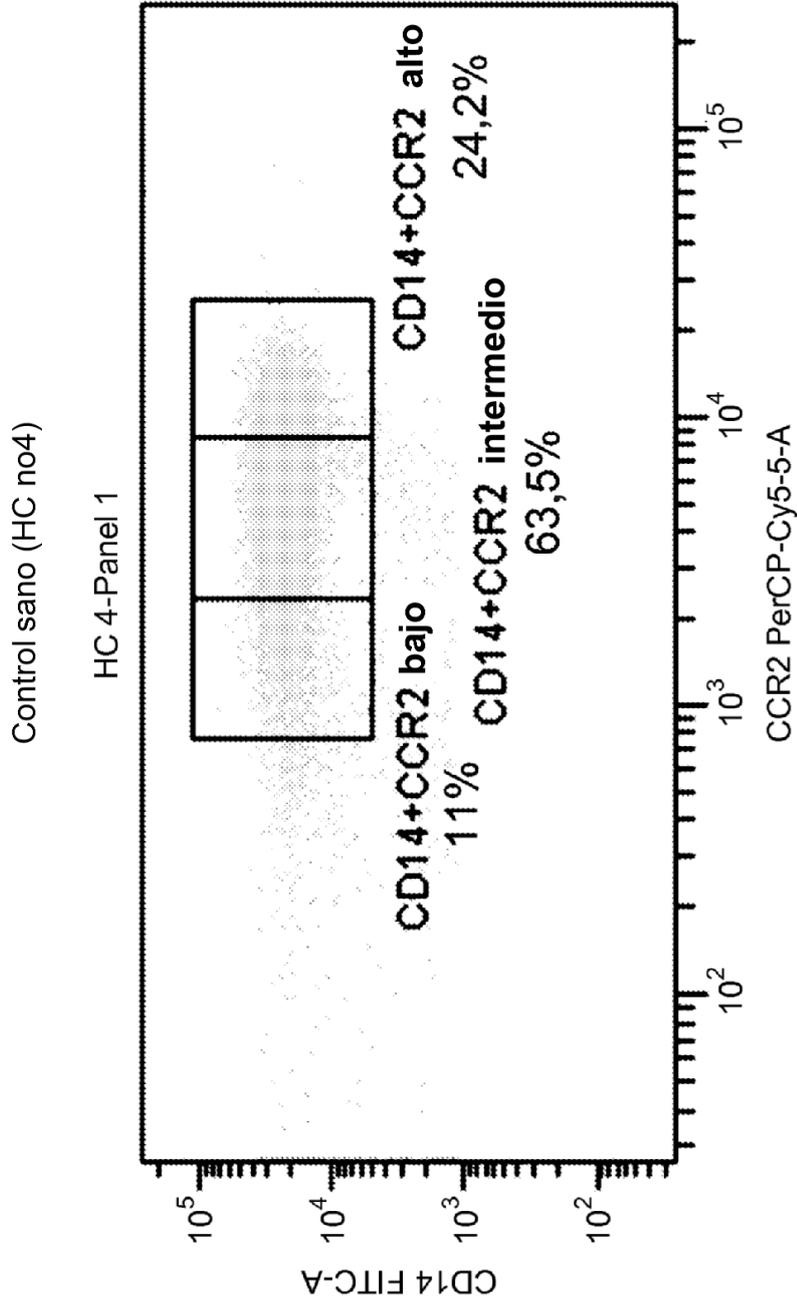
FIG. 13



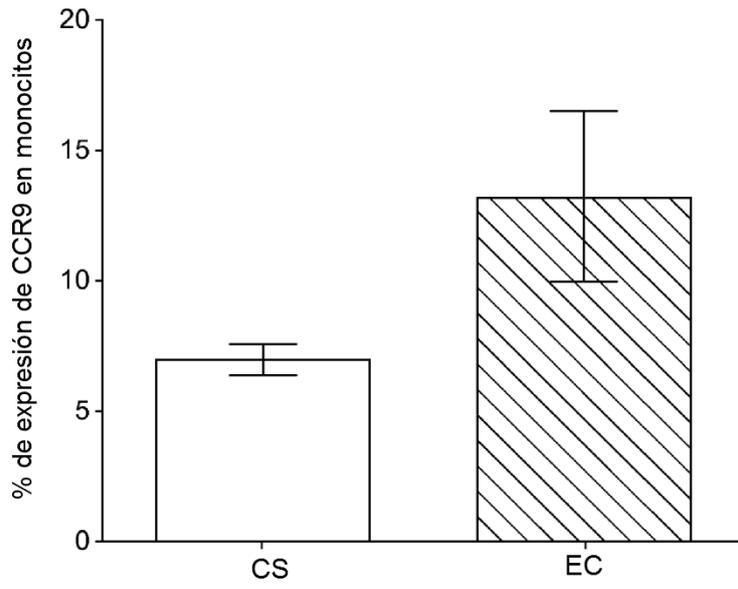
**FIG. 14**



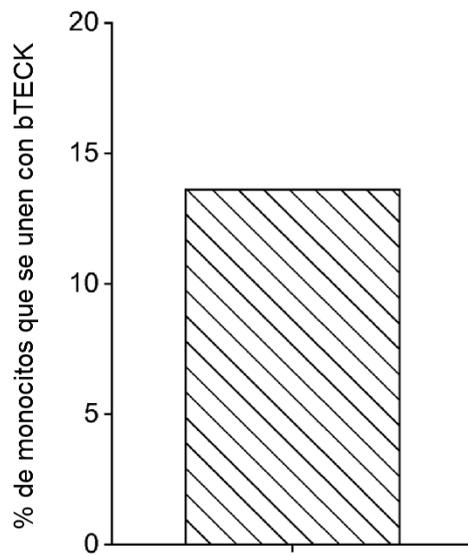
**FIG. 15**



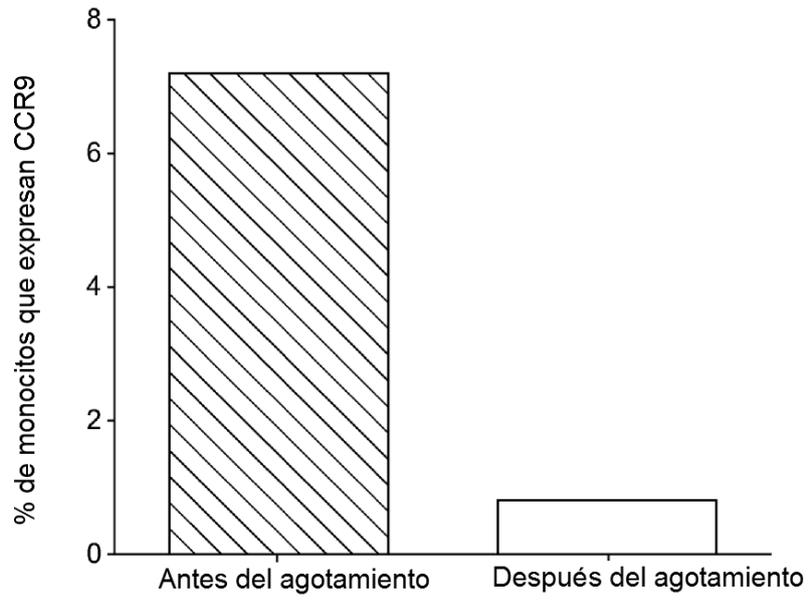
**FIG. 16**



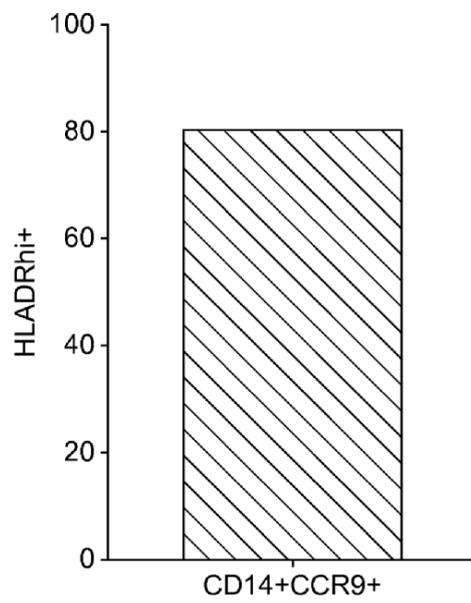
**FIG. 17**



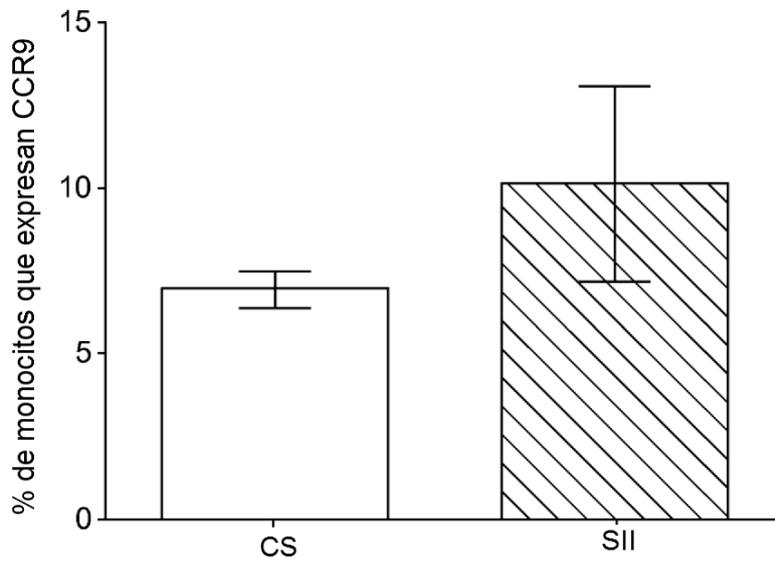
**FIG. 18**



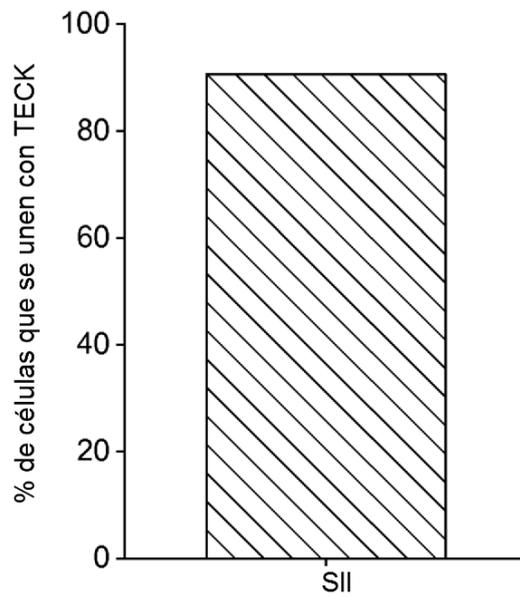
**FIG. 19**



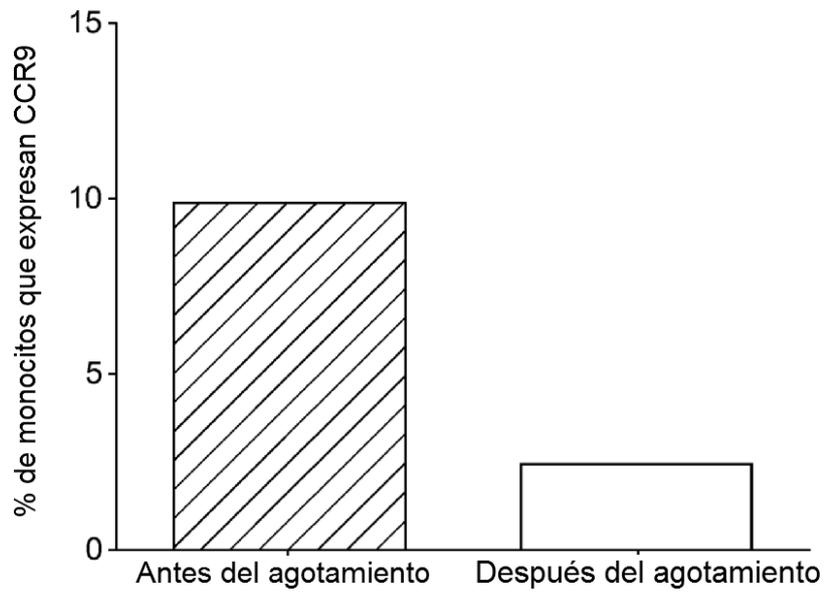
**FIG. 20**



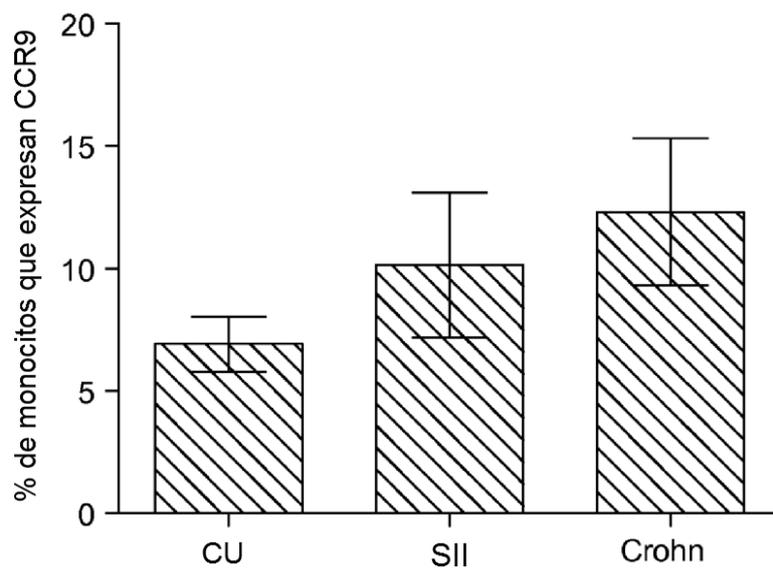
**FIG. 21**



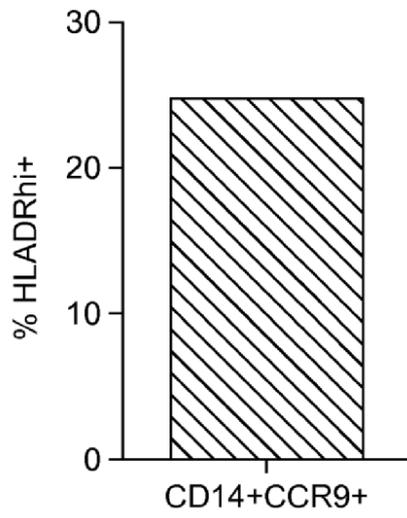
**FIG. 22**



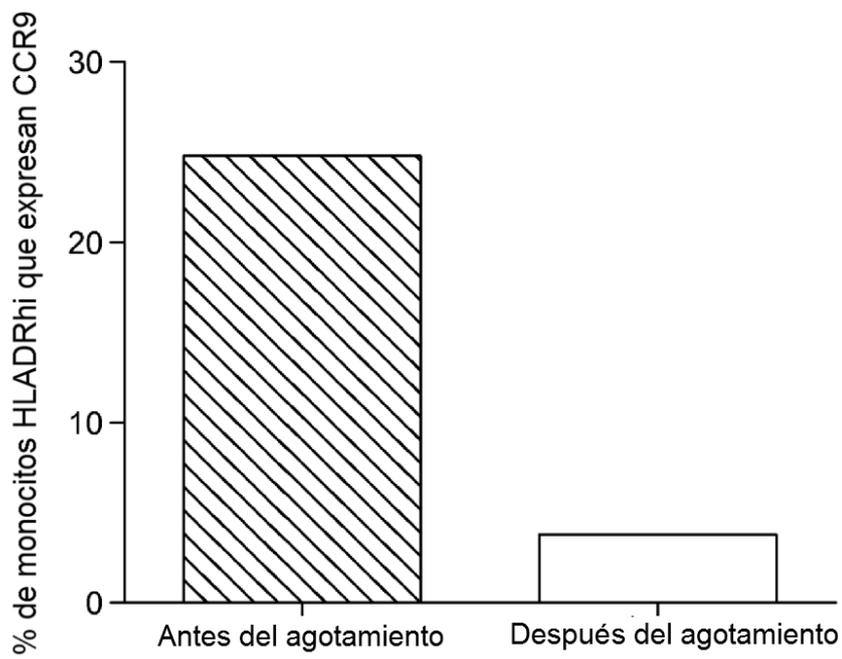
**FIG. 23**



**FIG. 24**



**FIG. 25a**



**FIG. 25b**