

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 265**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2010 E 10167496 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2399598**

54 Título: **Bloqueo de la señalización de CCL18 a través de CCR6 como una opción terapéutica en enfermedades fibróticas y cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE

72 Inventor/es:

ZISSEL, GERNOT;
MÜLLER-QUERNHEIM, JOACHIM y
PRASSE, ANTJE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 265 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

Bloqueo de la señalización de CCL18 a través de CCR6 como una opción terapéutica en enfermedades fibróticas y cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de la actividad y/o expresión del receptor CCR6.

Antecedentes de la invención

- 10 Las enfermedades pulmonares intersticiales son un grupo heterogéneo de trastornos acompañados por varios grados de inflamación y fibrosis que resultan en el daño del parenquima pulmonar. Recientemente, el subgrupo de neumonías intersticiales idiopáticas se ha clasificado en siete síndromes diferentes. La más frecuentes de estas afecciones son fibrosis pulmonar idiopática (IPF), neumonía intersticial no específica (NSIP) y neumonía organizativa criptogénica (COP).

- 15 La etiología de dichas enfermedades ha permanecido esquiva y los mecanismos moleculares que dirigen su patogénesis se entienden poco. Sin embargo, la ruta final de la proliferación de fibroblastos y la liberación de la matriz extracelular se analiza con detalle y representa una ruta común de las enfermedades pulmonares fibrosantes con etiología conocida y desconocida incluyendo enfermedades inflamatorias colágeno-vasculares y sistémicas con manifestaciones pulmonares que dan lugar a fibrosis (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, escleroderma, neumonitis por hipersensibilidad, algunas formas de alveolitis inducida por fármacos).

- 20 IPF es un tipo distintivo de neumonía intersticial fibrosante crónica de causa desconocida. Cuando se examina el tejido pulmonar de pacientes que padecen IPF, éste muestra un conjunto característico de rasgos histológicos/patológicos conocidos como neumonía intersticial usual (UIP). NSIP se refiere por el contrario a casos de neumonía intersticial en los que puede identificarse un patrón distintivo de inflamación y fibrosis más homogéneo diferente de UIP.

IPF es ligeramente más común en hombres que en mujeres y ocurre habitualmente en pacientes de 50 años de edad o mayores.

- 25 Los síntomas más comunes de IPF son falta de aliento, especialmente durante o después de la actividad física, y una tos seca. Dichos síntomas no aparecen frecuentemente hasta que la enfermedad está avanzada y ya ha ocurrido un daño pulmonar irreversible.

El pronóstico de IPF es bastante pobre con un tiempo de supervivencia medio de 3 años desde el momento del diagnóstico.

- 30 Actualmente no están disponibles tratamientos eficaces ni cura para la fibrosis pulmonar. El tratamiento se limita frecuentemente a tratar la respuesta inflamatoria que ocurre en los pulmones.

- 35 La terapia estándar incluye fármacos anti-inflamatorios y citotóxicos como esteroides y ciclofosfamida o azatioprina, sin embargo, estas terapias sólo tienen algo de valor, por ejemplo, en NSIP (que también tiene un pronóstico mejor que IPF) o neumonía intersticial descamativa (DIP). IPF, sin embargo, es refractaria a la mayor parte de estas opciones terapéuticas. Los estudios de terapia experimental usando IFN γ , Bosentan® (antagonista de endotelina), Aviptadil® (péptido intestinal vasoactivo, VIP), o el inhibidor de tirosina quinasa Imatinib® tampoco revelaron ningún efecto beneficioso profundo de estos fármacos.

- 40 El desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de las distintas formas de fibrosis pulmonar, especialmente de IPF, permanece por lo tanto como una tarea esencial. Existe una necesidad de nuevas dianas celulares así como moléculas terapéuticas que puedan actuar eficazmente sobre estas dianas.

Las quimioquinas son una familia de citoquinas proinflamatorias que son esenciales para la homeostasis y activación del sistema inmune. Se unen a receptores específicos de la superficie celular que pertenecen a la familia de los receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G.

- 45 CCL18, también conocida como quimioquina pulmonar y regulada por activación (PARC), quimioquina CC 1 asociada a la activación de macrófagos alternativa (AMAC-1), proteína inflamatoria de macrófagos 4 (MIP-4) y quimioquina 1 derivada de células dendríticas (DCCK1), es una quimioquina que se expresa principalmente por un rango amplio de monocitos/macrófagos y células dendríticas. Se expresa constitutivamente a altos niveles en el pulmón humano. CCL18 atrae a las células T, células dendríticas inmaduras e induce la síntesis de colágeno por los fibroblastos. Además, hay indicios de que CCL18 también podría inducir la quimiotaxis de las células B.

Los niveles de CCL18 están aumentados en varios estados patológicos, tales como por ejemplo trastornos inflamatorios de la piel, pulmón y articulaciones. También se ha encontrado que CCL18 se libera en niveles elevados por los macrófagos alveolares de pacientes que padecen fibrosis pulmonar y los niveles séricos de esta quimioquina son un marcador de pronóstico en enfermedades fibróticas.

- 5 Además, pudo demostrarse que CCL18 induce la diferenciación de fibroblastos en mio-fibroblastos e induce la expresión de colágeno y α -actina de músculo liso. Debido a sus propiedades conocidas de inductor de colágeno, altos niveles de CCL18 podrían estar ligados directamente a la deposición incrementada de la matriz en la fibrosis pulmonar.

Sin embargo, el análisis exacto de los eventos de señalización y posibles intervenciones terapéuticas en la señalización de CCL18 está obstaculizado por el hecho de que no se conoce su receptor.

- 10 El cáncer es una clase de enfermedades en las que un grupo de células presenta un crecimiento incontrolado, invasión y algunas veces metástasis. Estas tres propiedades malignas de los cánceres les diferencian de los tumores benignos, que están auto-limitados y no invaden o metastatizan.

El cáncer es un problema de salud importante que causa aproximadamente el 13% de todas las muertes en el mundo. Según la American Cancer Society, 7,6 millones de personas murieron por cáncer en el mundo en 2007. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando, con 12 millones de muertes estimadas en 2030.

15

El desarrollo de nuevas terapias para combatir el cáncer permanece, por lo tanto, como una tarea esencial.

- 20 WO 01/32874 titulado "Novel polypeptides and nucleic acids encoding same" está dirigido a polinucleótidos NOVX aislados y polipéptidos codificados por los polinucleótidos NOVX. WO 01/032874 también proporciona anticuerpos que se unen inmunespecíficamente a un polipéptido NOVX o cualquier derivado, variante, mutante o fragmento del polipéptido, polinucleótido o anticuerpo NOVX. Finalmente, WO 01/32874 proporciona métodos en los que el polipéptido, polinucleótido y anticuerpo NOVX se utilizan en la detección y tratamiento de un amplio rango de estados patológicos.

EP 1 422 239 titulado "Mobilization of hematopoietic stem cells using a chemokine" está dirigido a nuevas quimioquinas para movilizar células madre y a métodos para movilizar células madre.

- 25 WO 00/55180 titulado "human lung cancer associated gene sequences and polypeptides" se refiere a polinucleótidos relacionados con el pulmón o con cáncer de pulmón recién identificados y a los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos, y a las secuencias génicas completas asociadas con ellos y a los productos de expresión de éstos. WO 00/55180 también se refiere *inter alia* al uso de dichos polinucleótidos y polipéptidos para la detección, prevención y tratamiento de trastornos del pulmón, particularmente la presencia de cáncer de pulmón. En WO 00/55180 también se describen métodos terapéuticos para tratar dichos trastornos.

30 **Objetivo y resumen de la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad del receptor CCR6.

- 35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos adecuados para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial y/o cáncer, en el que dicho cáncer es preferiblemente un adenocarcinoma, lo más preferiblemente un adenocarcinoma del pulmón.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica según la reivindicación 1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial y/o cáncer.

Leyendas de las figuras:

- 40 **Figura 1** Expresión del ARNm de CCR6 por diferentes líneas de fibroblastos de pacientes que padecen carcinoma escamoso (n= 3), NSIP (n= 2) y UIP (n= 3). La expresión de CCR6 se normalizó usando el gen constitutivo Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPdH).

Figura 2 Análisis de la expresión de CCR6 por diferentes líneas de fibroblastos de pacientes que padecen UIP (panel superior, izquierdo y central), NSIP (panel superior derecho) y carcinoma escamoso (SQ CA; panel inferior).

- 45 **Figura 3** CCR6 no se expresa en pulmón control (A), sin embargo, en los pulmones fibróticos la expresión de CCR6 puede encontrarse en la superficie apical de las células epiteliales alveolares (B y C, cabezas de flecha) y en fibroblastos (C, flechas) (aumento: A: x100, B: x200, C: x400).

- 5 **Figura 4** La liberación no estimulada (sin est.) de FGF2 se incrementa en fibroblastos de pulmones fibróticos (gris, n= 6 (UIP n= 3, sarcoidosis n= 1, NSIP n= 1, indefinido n= 1)) comparado con fibroblastos de pulmones no fibróticos (gris claro, "Contr.", n= 6). CCL18 induce una regulación al alza significativa de la liberación de FGF2 en fibroblastos de pulmones fibróticos pero sólo marginal en fibroblastos de pulmones no fibróticos. El bloqueo de CCR6 con un anticuerpo bloqueante inhibe la regulación al alza de la liberación de FGF2 inducida por CCL18. De nuevo, este efecto sólo se observa en fibroblastos de pulmones fibróticos.
- 10 **Figura 5** CCL18 indujo la expresión de ARNm de colágeno I en tres de cuatro (panel superior) y la expresión de ARNm de actina de músculo liso alfa (α SMA) en todas las líneas celulares de fibroblastos de pulmón humano investigadas (panel inferior) (las ordenadas indican los nombres de las líneas). La expresión de ARNm de colágeno I y la expresión de ARNm de actina de músculo liso alfa (α SMA) se bloquea con anti-CCR6 (rE= expresión relativa).
- 15 **Figura 6** La línea celular epitelial alveolar de rata transformada RLE-6TN experimenta transición epitelial-mesenquimal (EMT) después de estimulación con TGF β o CCL18. Las flechas indican células semejantes a fibroblastos. Periodo de cultivo= 6 días.
- 20 **Figura 7** Análisis por transferencia Western de la expresión de vimentina y α SMA cultivados durante 6 días bien sin estimular o en presencia de TGF β , TGF β +TNF α , CCL18 o CCL18+TNF α .
- 25 **Figura 8** La inmuno-reactividad para α SMA se evaluó por inmuno-fluorescencia en el día 6. Las células RLE-6TN se dejaron sin estimular (A) o se estimularon con (B) TGF β +TNF α , (C) CCL18 (D), o CCL18+TNF α . Los núcleos se tiñen con DAPI. α SMA sólo es visible en el panel B descubriendo la forma típica de los fibroblastos (cabezas de flecha). Por el contrario, en el panel C y D sólo son evidentes los núcleos.
- 30 **Figura 9** La inmuno-reactividad de CD90 se evaluó por inmuno-fluorescencia en el día 6. Las células RLE-6TN se dejaron sin estimular (A) o se estimularon con TGF β +TNF α (B), CCL18 (C). Los núcleos se tiñen con ToPro3. Las células sin estimular no expresan CD90 y sólo son visibles los núcleos. Por el contrario, las células estimuladas tanto con TGF β +TNF α como con CCL18 expresan CD90 como se demuestra por el descubrimiento de la forma celular.
- 35 **Figura 10** La expresión de α SMA inducida por CCL18 se encuentra en RLE-6TN transfectadas con CCR6 pero no en las células con transfección simulada. Por el contrario, TGF β induce expresión de α SMA en ambas líneas celulares.
- 40 **Figura 11** Se estimularon AECII primarias humanas 12 días con TGF β +TNF α o CCL18 en ausencia o presencia de TNF α . El lisado celular total se separó por SDS-PAGE al 10% y se analizó por transferencia Western. Las células sin estimular expresaron sólo marginalmente actina α de músculo liso (α SMA) y no expresaron vimentina. La estimulación con TGF β +TNF α y CCL18 solo o en combinación con TNF α regula al alza fuertemente ambas moléculas. De forma interesante, la citoqueratina está regulada a la baja por TGF β +TNF α pero se mantiene con CCL18 solo o en combinación con TNF α .
- 45 **Figura 12** Expresión de CCR6 por células mononucleares de sangre periférica después de 7 días de cultivo en presencia o ausencia de fitohemaglutinina (PHA; 5 μ g/ml). Las preparaciones celulares se agruparon en preparación con expresión "alta" o "baja" de CCR6 según su expresión inicial de CCR6. Después del periodo de cultivo, las preparaciones sin estimular no cambiaron el patrón de expresión de CCR6. Por el contrario, la estimulación con PHA redujo la expresión de CCR6 en el grupo con alta expresión pero incrementó la expresión en el grupo con baja expresión.
- 50 **Figura 13** Regulación a la baja del receptor CCR6 después de 20 minutos de incubación con CCL18 (10 ng/ml). La incubación con CCL18 da lugar a una regulación a la baja importante de la expresión superficial de CCR6. Este efecto podría estar causado por la internalización del receptor.
- Figura 14** Análisis FACS de la regulación a la baja de la expresión de CCR6 inducida por CCL18 en linfocitos humanos y su inhibición por el inhibidor PS-AU-1015 (polipéptido según SEQ ID NO: 1). Una subpoblación de linfocitos humanos recién aislados expresa el receptor de quimioquina CCR6 de forma visible como un pico inferior en el lado derecho del pico principal (control pos.). La incubación con CCL18 (10 ng/ml) durante 20 minutos disminuye el pico de forma importante (CCL18 solo). Después de incubar las células con CCL18 (10 ng/ml) en presencia del inhibidor PS-AU-1015 (SEQ ID NO.: 1; 100 ng/ml) esta regulación a la baja no ocurre (CCL18 + inhibidor). El inhibidor solo no presenta ningún efecto.
- Figura 15** Tinción de CCR6 en secciones de pulmón de pulmón control (A) y dos pulmones con adenocarcinoma (B, C). No es visible ninguna tinción en el pulmón control mientras las células tumorales son positivas para CCR6 (color rojo, flechas).
- Figura 16** Expresión de CCR6 en la superficie de células de adenocarcinoma de pulmón (panel superior) y células de mesotelioma pleural (panel inferior). El pico izquierdo indica control de isotipo, el pico derecho indica expresión de CCR6.

Dos de tres líneas celulares de adenocarcinoma y todas las líneas celulares de mesotelioma pleural presentan una expresión importante de CCR6.

Figura 17 Listado de los cebadores usados para PCR.

Figura 18 Listado de secuencias SEQ ID NO: 1 a 11.

5 Descripción detallada de la invención

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

Se introducen las definiciones siguientes.

10 Tal y como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones pretendidas, las formas singulares de “un” y “una” también incluyen los plurales respectivos a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

15 Debe entenderse que el término “comprenden” y variaciones tales como “comprende” y “que comprende” no es limitante. Para el propósito de la presente invención, el término “que consiste en” se considera que es una realización preferida del término “que comprende”. Si de aquí en adelante en la presente memoria un grupo se define para comprender al menos un determinado número de realizaciones, esto quiere decir que también engloba un grupo que consiste preferiblemente sólo en estas realizaciones.

Los términos “alrededor de” y “aproximadamente” en el contexto de la presente invención indican un intervalo de exactitud que un experto en la técnica entenderá que asegura aún el efecto técnico de la característica en cuestión. El término engloba típicamente una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$ y preferiblemente de $\pm 5\%$.

20 La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se consigue preferiblemente usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora, por ejemplo, en los programas BLASTn y BLASTp de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

La determinación del porcentaje de identidad se realiza preferiblemente con los parámetros estándar de los programas BLASTn y BLASTp.

25 Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se realizan preferiblemente con el programa BLASTn.

30 Para los parámetros generales, la caja “Secuencias Diana Max” puede ajustarse a 100, la caja “Consultas cortas” puede marcarse, la caja “Umbral esperado” puede ajustarse a 10 y la caja “Tamaño de palabra” puede ajustarse a 28. Para los parámetros de puntuación, las “Puntuaciones concordancia/falta de concordancia” pueden ajustarse a 1-2 y la caja “Costes de Hueco” puede ajustarse a lineal. Para los parámetros de Filtro y Enmascaramiento, la caja “Regiones de baja complejidad” puede no marcarse, la caja “Repeticiones específicas de especie” puede no marcarse, la caja “Enmascaramiento sólo para tabla de búsqueda” puede marcarse, la caja “Enmascarar letras en minúscula” puede no marcarse.

35 Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan preferiblemente con el programa BLASTp. Para los parámetros generales, la caja “Secuencias Diana Max” puede ajustarse a 100, la caja “Consultas cortas” puede marcarse, la caja “Umbral esperado” puede ajustarse a 10 y la caja “Tamaño de Palabra” puede ajustarse a “3”. Para los parámetros de puntuación, la caja “Matriz” puede ajustarse a “BLOSUM62”, la caja “Costes de Hueco” puede ajustarse a “Existencia: 11 Extensión:1”, la caja “Ajustes composicionales” puede ajustarse a “Ajuste de la matriz de puntuación composicional condicional”. Para los parámetros de Filtros y Enmascaramiento la caja “Regiones de baja complejidad” puede no marcarse, la caja de “Enmascaramiento sólo para tabla de búsqueda” puede no marcarse y la caja “Enmascaramiento de letras en minúscula” puede no marcarse.

45 El porcentaje de identidad se determina sobre la longitud completa de la secuencia de referencia respectiva, es decir, sobre la longitud completa de la secuencia según SEQ ID NO o SEQ ID NOs recitadas en el contexto respectivo. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1 presenta al menos 80% de identidad con SEQ ID NO.: 1 sobre la longitud completa de SEQ ID NO.: 1. En otro ejemplo, una secuencia que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 4 presenta al menos 80% de identidad con SEQ ID NO.: 4 sobre la longitud completa de SEQ ID NO.: 4.

El término “sujeto” tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un ser humano o un animal, preferiblemente un mamífero tal como, por ejemplo, primates no humanos, ratones, ratas, conejos, cobayas, perros, gatos, ganado,

caballos, ovejas, cerdos, cabras y semejantes. Preferiblemente, un "sujeto" en el contexto de la presente invención es un ser humano.

Los términos "receptor de quimioquina CCR6" o "receptor CCR6", "ligando quimioquina 18" o "CCL18" y "ligando quimioquina 20" o "CCL20" mencionados en el contexto de la presente invención son muy conocidos en la técnica. Por lo tanto, el experto en la técnica medio puede recuperar fácilmente las secuencias de polinucleótido y aminoácidos del receptor CCR6, CCL18 y CCL20 y ortólogos e isoformas de corte y empalme de éstos de cualquier base de datos pública adecuada tal como, por ejemplo, la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Los términos "receptor CCR6" y "CCR6" se usan indistintamente en la presente memoria.

"Receptor CCR6", "CCL18" y "CCL20" como se mencionan en el contexto de la presente invención son preferiblemente receptor CCR6, CCL18 y CCL20 de mamíferos, lo más preferiblemente receptor CCR6 humano, CCL18 humano y CCL20 humano. El receptor CCR6 humano puede encontrarse, por ejemplo, en la base de datos NCBI con el número de registro NM_004367.5 (variante de transcrito 1; SEQ ID NO.: 7) o NM_031409.3 (variante de transcrito 2; SEQ ID NO.: 8). CCL18 humano puede encontrarse, por ejemplo, en la base de datos NCBI con el número de registro NM_002988.2 (SEQ ID NO.: 9). CCL20 humano puede encontrarse, por ejemplo, en la base de datos NCBI con el número de registro NM_004591.2 (variante de transcrito 1; SEQ ID NO.: 10) o NM_001130046.1 (variante de transcrito 2; SEQ ID NO.: 11).

CCR6 también se refiere a veces como CD196. CCL18 también se refiere a veces como quimioquina pulmonar y regulada por activación (PARC), quimioquina CC 1 asociada con activación de macrófagos alternativa (AMAC-1), proteína 4 inflamatoria de macrófagos (MIP-4) o quimioquina 1 derivada de células dendríticas (DCCK1).

Los términos "IPF" (fibrosis pulmonar idiopática) y "UIP" (neumonía intersticial usual) se usan como sinónimos en la presente memoria.

Los inventores de la presente invención encontraron sorprendentemente que CCL18 es un agonista del receptor CCR6, un miembro de la familia de receptores de quimioquina acoplados con proteína G con siete dominios transmembrana. Los inventores encontraron además sorprendentemente que los inhibidores de la actividad del receptor CCR6 pueden usarse para la terapia de una enfermedad pulmonar intersticial o cáncer.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 1.

Preferiblemente, dicho receptor CCR6 es un receptor CCR6 humano. Lo más preferiblemente, dicho receptor CCR6 es un polipéptido según SEQ ID NO.: 7 o SEQ ID NO.: 8.

El término "aislado" en el contexto de la presente invención indica que un polipéptido o polinucleótido se ha extraído de su entorno natural y/o se presenta en una forma en la que no se encuentra en la naturaleza. Un polipéptido "aislado" o polinucleótido "aislado" también puede ser un polipéptido o polinucleótido que se ha generado in vitro.

En un ejemplo preferido, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta al menos 91%, incluso más preferiblemente al menos 92%, incluso más preferiblemente al menos 93%, incluso más preferiblemente al menos 94%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 96%, incluso más preferiblemente al menos 97%, incluso más preferiblemente al menos 98% o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1. En un ejemplo lo más preferido, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta 100% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1.

En algunos ejemplos preferidos, la secuencia de aminoácidos según (a) puede presentar al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 94%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 98% o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1.

En otros ejemplos preferidos, en la secuencia de aminoácidos según (a) no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1 están cambiados (es decir, delecionados, insertados, modificados y/o sustituidos por otros aminoácidos).

Una sustitución en una secuencia de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa o no conservativa, preferiblemente una sustitución conservativa. Una sustitución también incluye el intercambio de un aminoácido natural con un aminoácido no natural. Una sustitución conservativa comprende la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene una propiedad química similar al aminoácido que se sustituye. Preferiblemente, la sustitución conservativa es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una sustitución de un aminoácido básico con otro aminoácido básico diferente;

- (ii) una sustitución de un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido diferente;
- (iii) una sustitución de un aminoácido aromático con otro aminoácido aromático diferente;
- (iv) una sustitución de un aminoácido alifático, no polar con otro aminoácido alifático, no polar diferente; y
- (v) una sustitución de un aminoácido no cargado, polar con otro aminoácido no cargado, polar diferente.

5 Un aminoácido básico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en arginina, histidina, y lisina. Un aminoácido ácido es preferiblemente aspartato o glutamato. Un aminoácido aromático se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina y triptófano. Un aminoácido alifático, no polar se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, metionina e isoleucina. Un aminoácido no cargado, polar se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en serina, treonina, cisteína, prolina, asparagina y glutamina. A
10 diferencia de una sustitución de aminoácidos conservativa, una sustitución de aminoácidos no conservativa es el intercambio de un aminoácido con cualquier aminoácido que no se encuentra en las sustituciones conservativas indicadas anteriormente (i) a (v).

15 Los aminoácidos del polipéptido aislado también pueden estar modificados, por ejemplo, modificados químicamente. Por ejemplo, la cadena lateral o un grupo amino libre o extremo carboxi de un aminoácido de la proteína puede modificarse, por ejemplo, por glicosilación, amidación, fosforilación, ubiquitinación, etc.

20 En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1. Así, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 94%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 98%, incluso más preferiblemente al menos 99% o lo más preferiblemente 100% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1. En otro ejemplo preferido, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 94%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 98%, incluso más preferiblemente al menos 99% o lo más preferiblemente 100% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 8 o al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1.

30 En otro ejemplo preferido, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta al menos 95%, 98% ó 100% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1. En un ejemplo más preferido, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta al menos 95%, 98% ó 100% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 8 o al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1.

35 Un fragmento es típicamente una parte de la secuencia de aminoácidos a la que se refiere.

40 En un ejemplo preferido, el fragmento según (b) tiene una longitud de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o al menos 28 aminoácidos. En una realización preferida, el fragmento según (b) tiene una longitud de al menos 10, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos. En un ejemplo lo más preferido, el fragmento según (b) tiene una longitud de 15 aminoácidos.

En otra realización particularmente preferida, el polipéptido aislado según 1) consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO.: 1, en el que dicho polipéptido es capaz de unirse a e inhibir la actividad del receptor CCR6.

45 Si un polipéptido según la invención es capaz de unirse al receptor CCR6 puede determinarse por cualquier método adecuado conocido para el experto en la técnica. Por ejemplo, el experto en la técnica puede determinar si un polipéptido es capaz de unirse al receptor CCR6 usando un ensayo de dos híbridos en levadura o un ensayo bioquímico tal como, por ejemplo, un ensayo "pull-down", un ensayo de co-inmunoprecipitación, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un ensayo de unión de radioligando cuantitativo, un ensayo basado en separación celular activada por fluorescencia (FACS), un ensayo de resonancia de plasmón o cualquier otro método conocido para el experto en la técnica. Cuando se usan los ensayos "pull-down" o resonancia de plasmón, es útil fusionar al menos una de las
50 proteínas a una etiqueta de afinidad tal como etiqueta His, etiqueta GST u otra, como es muy conocido en la técnica de la bioquímica.

El término "inhibir la actividad del receptor CCR6" tal y como se usa en la presente memoria significa que la actividad del receptor CCR6 está regulada a la baja o suprimida y/o que la activación del receptor CCR6 está inhibida.

5 Por ejemplo, un polipéptido aislado o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 descrito en la presente memoria puede bloquear estéricamente el receptor CCR6, de manera que un agonista del receptor CCR6 (por ejemplo, CCL18 o CCL20) no puede activar el receptor. Así, una inhibición de la actividad del receptor CCR6 puede deberse, por ejemplo, a una inhibición de la interacción del receptor CCR6 con uno de sus ligandos, es decir, CCL18 y/o CCL20, por un polipéptido o cualquier otro compuesto que se una al receptor CCR6 pero que no media un evento de señalización por sí mismo.

10 Un polipéptido aislado según 1) capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 puede regular a la baja o suprimir la actividad existente del receptor CCR6.

15 Si un polipéptido aislado es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6 puede determinarse, por ejemplo, midiendo la expresión en la superficie celular de CCR6 como se describe más adelante en la presente memoria en el ejemplo 6 y en las figuras 13 y 14, en la que una inhibición de la internalización del receptor CCR6 en presencia de un agonista del receptor CCR6 (tal como, por ejemplo, CCL18) y el polipéptido aislado, en comparación con un control (por ejemplo, presencia del agonista del receptor CCR6 solo) indica que el polipéptido aislado es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6.

20 En otro ejemplo, el experto en la técnica también puede determinar la capacidad de un polipéptido aislado según 1) para inhibir la actividad del receptor CCR6 incubando células que expresan CCR6 en presencia de un agonista del receptor CCR6, tal como, por ejemplo, CCL18 o CCL20, y en presencia o ausencia del polipéptido aislado y posteriormente lisar las células y analizar la fosforilación de ERK, una molécula aguas abajo de la señalización de CCR6, por análisis por transferencia Western. En este ejemplo, un nivel menor de fosforilación de ERK en presencia del polipéptido frente al nivel de fosforilación de ERK en ausencia del polipéptido aislado indica que el polipéptido es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6. Un método para determinar la fosforilación de ERK por análisis de transferencia Western se describe, por ejemplo, en Lin et al. J Proteome Res. 2010 Ene; 9(1): 283-97. En un ejemplo análogo, puede analizarse la fosforilación de otros efectores aguas abajo de CCR6 tales como, por ejemplo, Akt, quinasas SAPK/JNK, fosfatidilinositol-3-quinasa o fosfolipasa C con el fin de determinar si un polipéptido aislado según la invención es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6.

30 Si un polipéptido aislado según 1) es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6 también puede determinarse, por ejemplo, midiendo la liberación de FGF2 estimulada por CCL18 o la inducción de colágeno y/o α SMA mediada por CCL18 en presencia de dicho polipéptido como se describe, por ejemplo, más adelante en la presente memoria en el ejemplo 4 y en las figuras 4 y 5. En este ejemplo, una inhibición de la regulación al alza de FGF2 inducida por CCL18 y/o una inhibición de la inducción de colágeno y/o expresión de α SMA mediada por CCL18 en presencia del polipéptido en comparación con un control, al que no se ha añadido el polipéptido, indica que el polipéptido aislado es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6. Además, con el fin de determinar la capacidad de un polipéptido aislado según 1) para inhibir la actividad del receptor CCR6, el experto en la técnica también puede determinar si la inducción de la Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) por CCL18 está regulada a la baja o suprimida.

35 Alternativamente o adicionalmente, pueden usarse cualesquiera métodos adicionales que sean adecuados para determinar la actividad del receptor CCR6 y que están comprendidos en la técnica y son conocidos por el experto en la técnica medio.

40 Un polipéptido aislado según 1) que es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, puede inhibir la actividad del receptor CCR6 al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% cuando se compara con un control. Un polipéptido según 1), que es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, puede inhibir la actividad del receptor CCR6 un 100%.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado según 1) o 2), en el que dicho nucleótido está comprendido en un vector de expresión.

50 El polinucleótido aislado tiene una longitud de menos de 6.000 nucleótidos, menos de 5.000 nucleótidos, menos de 4.000 nucleótidos, menos de 3.000 nucleótidos, menos de 2.000 nucleótidos, menos de 1.000 nucleótidos o menos de 500 nucleótidos.

El polinucleótido aislado tiene una longitud de entre al menos 24 y 9.000 nucleótidos, preferiblemente al menos 24 y 8.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 7.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 6.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 5.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y

4.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 3.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 2.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 1.000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 24 y 500 nucleótidos. En otro ejemplo preferido, un polinucleótido aislado tiene una longitud de al menos 24, al menos 87 o al menos 93 nucleótidos.

5 El polinucleótido aislado tiene una longitud de entre al menos 87 y 9.000 nucleótidos, preferiblemente al menos 87 y 8.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 7.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 6.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 5.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 4.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 3.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 2.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 1.000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al
10 menos 87 y 500 nucleótidos.

Un polinucleótido aislado tiene una longitud de al menos 87 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, al menos 1.000 nucleótidos, al menos 1.500 nucleótidos, al menos 2.000 nucleótidos, al menos 2.500 nucleótidos, al menos 3.000 nucleótidos, al menos 3.500 nucleótidos. En un ejemplo particularmente preferido, un polinucleótido aislado tiene una longitud de al menos 87
15 nucleótidos o al menos 100 nucleótidos.

El polinucleótido aislado tiene una longitud de entre al menos 93 y 9.000 nucleótidos, preferiblemente al menos 93 y 8.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 7.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 6.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 5.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 4.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 3.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y
20 2.000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 1.000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 93 y 500 nucleótidos.

Un polinucleótido aislado tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 87 nucleótidos, al menos 93 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, al menos 1.000 nucleótidos, al menos 1.500 nucleótidos, al menos 2.000 nucleótidos, al menos
25 2.500 nucleótidos, al menos 3.000 nucleótidos o al menos 3.500 nucleótidos. En un ejemplo particularmente preferido, el polinucleótido aislado tiene una longitud de al menos 24, al menos 87 o al menos 93 nucleótidos.

Será evidente para el experto en la técnica que debido a la degeneración del código genético un polipéptido dado puede estar codificado por diferentes secuencias de nucleótidos.

30 En una realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 4.

En un ejemplo preferido adicional, el polinucleótido comprende o consiste en una secuencia que presenta al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, incluso más preferiblemente al menos 92%, incluso más preferiblemente al menos 93%, incluso más preferiblemente al menos 94%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 96%, incluso más preferiblemente al menos 97%, incluso más preferiblemente al menos 98% o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con la secuencia según SEQ
35 ID NO.:4. El polinucleótido comprende o consiste en una secuencia que presenta al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% o incluso más preferiblemente al menos 98% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 4.

40 El polinucleótido comprende o consiste en una secuencia que presenta al menos 80%, al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, incluso más preferiblemente al menos 92%, incluso más preferiblemente al menos 93%, incluso más preferiblemente al menos 94%, incluso más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 96%, incluso más preferiblemente al menos 97%, incluso más preferiblemente al menos 98% o incluso más preferiblemente al menos 99% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 4.

45 En una realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta 100% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 4.

Un polinucleótido aislado puede ser una molécula de ARN o ADN mono o bicatenaria.

50 El polinucleótido aislado según la invención se inserta en un vector de expresión. El vector de expresión puede ser un vector de expresión procariota o eucariota tal como, por ejemplo, un plásmido, un minicromosoma, un cósmido, un fago bacteriano, un vector retroviral o cualquier otro vector conocido para el experto en la técnica. El experto en la técnica estará familiarizado con la forma de seleccionar un vector apropiado según la necesidad específica.

La presente invención se refiere así a un vector de expresión que comprende un polinucleótido como se reivindica en 3) y 4) de la reivindicación 1.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "hibridan" o "hibrida" se refiere a la hibridación de un primer con un segundo polinucleótido. Para determinar si dos polinucleótidos hibridan entre sí, el experto en la técnica realizará preferiblemente experimentos de hibridación in vitro en condiciones de hibridación moderadas o astringentes. Los ensayos y condiciones de hibridación son conocidos para los expertos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Las condiciones astringentes pueden ser, por ejemplo, condiciones en las que la hibridación tiene lugar en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 45°C, seguido de un lavado en 0,2X SSC, 0,1% SDS a 65°C.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 como se reivindica en la reivindicación 1.

Una composición farmacéutica según la invención puede administrarse oralmente, por ejemplo en la forma de pastillas, comprimidos, comprimidos laqueados, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, cápsulas de gelatina dura o blanda, disoluciones acuosas, alcohólicas o grasas, jarabes, emulsiones o suspensiones, o rectamente, por ejemplo en la forma de supositorios. La administración también puede llevarse a cabo parenteralmente, por ejemplo, subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente en la forma de disoluciones para inyección o infusión. Otras formas de administración adecuadas son, por ejemplo, administración percutánea o tópica, por ejemplo en la forma de pomadas, tinturas, pulverizadores o sistemas terapéuticos transdérmicos, o la administración por inhalación en la forma de pulverizadores nasales o mezclas de aerosol.

En un ejemplo preferido, una composición farmacéutica se administra parenteralmente, por ejemplo, en la forma de disoluciones para inyección o infusión, oralmente, por ejemplo, en la forma de un comprimido, pastilla, tableta o cápsula o mediante inhalación.

Para la producción de pastillas, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar y cápsulas de gelatina dura por ejemplo, pueden usarse lactosa, almidón, por ejemplo almidón de maíz, o derivados de almidón, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Los vehículos para las cápsulas de gelatina blanda y supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o endurecidos, etc. Los vehículos adecuados para la preparación de disoluciones, por ejemplo de disoluciones para inyección, o de emulsiones o jarabes son, por ejemplo, agua, disolución fisiológica de cloruro de sodio, alcoholes tal como etanol, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, manitol, aceites vegetales, etc.

En algún ejemplo, las composiciones farmacéuticas también contienen aditivos, tales como por ejemplo materiales de relleno, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, estabilizadores, emulsionantes, dispersantes, conservantes, edulcorantes, colorantes, saporíferos, aromatizantes, espesantes, diluyentes, sustancias tamponadoras, disolventes, solubilizantes, agentes para conseguir un efecto de liberación lenta, sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento o antioxidantes.

Los ejemplos de excipientes adecuados para las diferentes formas variadas de composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden encontrarse, por ejemplo, en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller.

En otra realización preferida, una composición farmacéutica según la invención comprende un compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento o prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o cáncer.

Los ejemplos de compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial son, por ejemplo, fármacos anti-inflamatorios tales como, por ejemplo, prednisona u otros corticosteroides, azatioprina, metotrexato, micofenolato o ciclofosfamida, antioxidantes, tales como, por ejemplo, acetilcisteína, agentes anti-fibróticos, tales como, por ejemplo bosentan o pirfenidona, minociclina, sildenafil, talidomida, anticuerpos anti-TNF, tales como, por ejemplo, Infliximab; etanercept, interferón gamma, anticuerpos anti-IL-13, inhibidores de endotelina, Zilcuton, anticoagulantes, macrólidos, inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) 4, tales como, por ejemplo, roflumilast, Aviptadil, hormona estimulante de melanocito alfa (alfa-MSH), inhibidores de tirosina quinasa, tales como, por ejemplo, imatinib, desatinib y nilotinib.

El compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento del cáncer es preferiblemente un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento del cáncer son muy conocidos para el experto en la técnica. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos son, por ejemplo, temozolomida, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citosina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel, toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina,

dactinomicina, mitomicinas, melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas y agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como tamoxifeno y onapristona.

5 La composición farmacéutica puede comprender uno o más de un compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento o prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o uno o más de un compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento o prevención del cáncer. En un ejemplo preferido, la composición farmacéutica comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 compuestos activos adicionales adecuados para el tratamiento o prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 compuestos activos adicionales adecuados para el tratamiento del cáncer.

10 Puede administrarse una o más composiciones farmacéuticas separadas que comprenden un compuesto activo adecuado para el tratamiento o prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o un compuesto activo adecuado para el tratamiento o prevención del cáncer a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, en combinación con una composición farmacéutica según la invención que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial y/o cáncer.

20 En un ejemplo preferido de la composición farmacéutica según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad pulmonar parenquimal difusa de causa conocida (preferiblemente, enfermedad colágeno-vascular o enfermedad pulmonar parenquimal difusa relacionada con el medioambiente o fármaco), enfermedad pulmonar parenquimal difusa granulomatosa (preferiblemente, sarcoidosis) y otras formas de enfermedad pulmonar parenquimal difusa (preferiblemente, linfangiolciomiomatosis (LAM), histiocitosis de las células de Langerhans/histiocitosis X (HX) pulmonar o neumonía eosinofílica).

En una realización particularmente preferida de la composición farmacéutica según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

25 En una realización preferida adicional de la composición farmacéutica según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizativa criptogenética, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. En una realización particularmente preferida de la composición farmacéutica según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática. Para una visión global de la clasificación de enfermedades pulmonares intersticiales, el experto en la técnica puede referirse, por ejemplo, a American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, American Thoracic Society; European Respiratory Society, Am J Respir Crit Care Med. 2002 Ene 15; 165(2): 277-304.

30 La enfermedad pulmonar intersticial puede estar causada por una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad pulmonar con esclerodermia, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, artritis reumatoide, lupus eritematoso y asbestosis.

35 En otro ejemplo preferido de la composición farmacéutica según la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de la sangre y cáncer de colon. En una realización preferida adicional de la composición farmacéutica según la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma del pulmón, pleuramesotelioma, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, Linfoma No de Hodgkin y Linfoma de Hodgkin.

40 En una realización particularmente preferida de la composición farmacéutica según la invención, el cáncer es cáncer de pulmón, lo más preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, o mesotelioma pleural. En una realización lo más preferida, el cáncer es adenocarcinoma de pulmón.

La presente invención se describirá ahora respecto a algunos de sus ejemplos específicos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y Métodos

Biblioteca de exposición en fago

50 Para la identificación de un resto de unión de CCL18 se usó una biblioteca de exposición en fago establecida (1).

Células y líneas celulares

Se establecieron líneas de fibroblastos bien a partir de material quirúrgico de neumectomías o lobectomías de pacientes que padecen varios tumores o a partir de material remanente obtenido de pulmones fibróticos por toracoscopia asistida por vídeo (VATS). Los pacientes padecían bien adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células no pequeñas o carcinoma escamoso. La fibrosis resultó de fibrosis pulmonar idiopática (UIP), neumonía intersticial no específica, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumoconiosis o escleroderma sistémico. El tejido se cortó en partes pequeñas (aprox. 0,5 cm de longitud de borde) y se puso en placas de 6 pocillos que contenían 1 ml de Quantum 333 (PAA, Pasching, Austria) con 1% de penicilina/estreptomicina. Los fibroblastos que crecieron se recogieron cuando alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia por tripsinización, se cultivaron en matraces de cultivo celular de 75 cm² (NUNC Thermo Fisher, Roskilde, Dinamarca) en Quantum 333 y posteriormente se dividieron (1:3 a 1:5). Las líneas establecidas se aplicaron en los estudios de los subcultivos 3 a 8.

Si no se menciona otra cosa, las células se estimularon con 10 ng/ml de CCL18 humano recombinante, 2,5 ng/ml de TGFβ ó 1 ng/ml de TNFα bien solos o en combinación.

Se aislaron AECII como se ha descrito previamente (2). Brevemente, se cortó en primer lugar tejido pulmonar macroscópicamente sin tumor y las secciones se lavaron tres veces a 4°C en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se digirieron en disolución de dispasa estéril (2,5 mg de dispasa II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) ml y 50 µg/ml de ADNasa I (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)) a 37°C durante 60 minutos. Después de la digestión con dispasa, las secciones se pipetearon concienzudamente durante varios minutos usando una pipeta de 10 ml con una entrada ancha. El tejido crudo y las suspensiones celulares se filtraron a través de una gasa de nilón con tamaños de malla de 50 y 20 µm. La suspensión celular se puso como una capa en una disolución de gradiente de densidad (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania) y se centrifugó a 800xg durante 20 min.

Las células de la interfase se lavaron y se incubaron en placas Petri de 100 mm (max. 6x10⁷ células/placa) en RPMI (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) con 10% de suero fetal de ternera (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Alemania) y 1% penicilina/estreptomicina (Biochrom AG, Berlín, Alemania) a 37°C en un incubador humidificado (5% CO₂, 37°C) durante 15, 20 y si es posible 30 minutos para eliminar las células adherentes (en su mayoría macrófagos alveolares, monocitos y fibroblastos) de las no adherentes.

Citometría de flujo

La expresión superficial de CCR6 de líneas de fibroblastos se estimó usando un anticuerpo anti-CCR6 humano marcado con FITC (R&D Systems, Minneapolis, MN). La expresión de CCR6 de RLE-6TN se analizó usando un anticuerpo anti-CCR6 de cabra policlonal (CKR6/C20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo anti-cabra de ratón marcado con FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

La expresión superficial de CCR6 de líneas celulares tumorales se estimó usando un anticuerpo anti-CCR6 humano marcado con PE (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se midió con un FACS Calibur (Beckton Dickinson, Heidelberg, República Federal Alemana).

Las células de adenocarcinoma de pulmón humano y células de mesotelioma pleural fueron un regalo generoso del Prof. HH Fiebig, Oncotest, Freiburg. Las células se cultivaron en RPMI 1640 que contenía 10% FCS y 100 U/ml de estreptomicina y penicilina. Los cultivos se dividieron 1:3 cuando los cultivos alcanzaron 90% de confluencia.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó como se describe (3, 4) usando mAb anti-CCR6 humano (clon 53103, isotipo IgG2b de ratón; R&D Systems Europe, Reino Unido) y una técnica de estreptavidina-biotina marcada con peroxidasa (DAKO LSAB2 System; DakoCytomation, Alemania). La contratinción se realizó con hemalum de Mayer. Para el control negativo incluido en cada serie de tinción, las secciones se tiñeron sin anticuerpo primario.

Análisis de la expresión de CCR6 en carcinoma de pulmón humano

Se cortó tejido de tumor recién aislado de adenocarcinoma del pulmón en partes de no más de 1x1x0,5 cm de longitud de borde. El tejido se estabilizó usando disolución estabilizadora HOPE (DCS, Hamburgo, República Federal Alemana) a 4°C y se incluyó en parafina.

Las secciones de tejido se desparafinaron y se tiñeron para expresión de CCR6 por la técnica de peróxidos (5) usando un anticuerpo disponible comercialmente (R&D Systems, Wiesbaden, República Federal Alemana).

ELISA de FGF2

Para estimar la liberación de FGF2 inducida por CCL18, se recogieron fibroblastos, se contaron y se sembraron 300.000 células por pocillo en una placa de cultivo celular de 6 pocillos en Quantum 333. Se dejó que las células se adhirieran toda la noche y el medio se reemplazó con 1 ml de DMEM más 10% FCS. Las células se dejaron bien sin estimular o se estimularon con 10 ng/ml de CCL18 humano recombinante. Para bloquear la interacción CCR6/CCL18, se añadió un anticuerpo bloqueante frente a CCR6 (R&D systems, Wiesbaden, República Federal Alemana) o un anticuerpo irrelevante (anti-IgG humana de ratón, R&D Systems) a una concentración final de 20 µg/ml en cultivos en paralelo. Después de 24 h de cultivo, el sobrenadante se recogió y se almacenó a -80°C hasta la determinación de FGF2.

Las concentraciones de FGF2 se midieron usando un kit de desarrollo ELISA (R&D) y se realizó como sugiere el proveedor.

PCR en tiempo real

Después del periodo de cultivo indicado, se extrajo el ARN total usando el Reactivo TRIzol según el protocolo del fabricante (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). El ARN total de transcribió de forma inversa con StrataScript RT (Stratagene, CA) usando cebador oligo (dT)12-18 para producir ADNc según el protocolo del fabricante. Los cebadores específicos para CCR6 humano, colágeno de tipo I, actina de músculo liso alfa y GAPDH se diseñaron usando software Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, EEUU; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), software Amplify 1.2 (Universidad de Wisconsin, EEUU; <http://engels.genetics.wise.edu/amplify>) usando las bases de datos LocusLink y GenBank (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/index.html>). Los números de código de registro para las secuencias de nucleótidos usadas para generar los cebadores respectivos y las secuencias de los cebadores se muestran en la figura 17.

Todos los cebadores abarcaron los intrones y se sintetizaron por MWG-Biotech (MWG-Biotech AG, Alemania). La PCR en tiempo real se realizó con iQ SYBR Green SuperMix, termociclador iCycler y software iCycler iQ 3.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Alemania) según el protocolo del fabricante. Para controlar la especificidad de los productos de la amplificación, se realizó un análisis de curva de fusión. No se observó amplificación de productos no específicos en ninguna de las reacciones. Se calculó un valor de umbral de ciclo (Ct) y se usó para calcular el nivel relativo de ARNm específico por la fórmula siguiente: "expresión relativa= $2^{-(Ct_{\text{GAPDH}} - Ct_{\text{CCR6}})}$ x 10.000" para cada muestra de ADNc.

Transferencia Western

Después del periodo de cultivo indicado, las células se lavaron una vez en PBS y se lisaron en tampón de lisis enfriado en hielo. Los lisados celulares totales se hirvieron a 93°C durante 5 minutos en volúmenes iguales de tampón de carga (0,5M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 20% 2-mercaptoetanol, 10% Glicerol).

Todas las muestras se sometieron a 12% dodecilsulfato de sodio-PAGE, se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Después de bloquear durante 2h en disolución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 5% de leche seca desnatada, las membranas se incubaron con anticuerpo primario (anti-colágeno I de conejo (Rockland, Gilbertsville PA); anti αSMA (anti-αSMA de conejo (Abcam, Cambridge, MA); anti vimentina (Santa Cruz); anti CCR6: CKR6/C20, Santa Cruz) diluido 1:700 con TBS a 4°C toda la noche. La visualización se realizó usando anticuerpos secundarios apropiados marcados con IRDye 800CW o IRDye 700CW (Li-COR Bioscience, Bad Hornburg, Alemania) diluidos 1:10.000-1:20.000 durante 2 h y se escaneó usando sistema Odyssey (Li-COR Bioscience) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de la expresión de CCR6 por PBMNC en presencia o ausencia de PHA

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana de sangre de punción venosa por centrifugación en densidad, se lavaron y se contaron. Las células se ajustaron a 1×10^6 células por ml en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con 10% suero de ternera fetal y 100 U de penicilina/estreptomicina) y se cultivaron durante 24 h bien en ausencia o presencia de 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). El porcentaje de células positivas para CCR6 se midió usando anticuerpos anti-CCR6 marcados con FITC (R&D Systems, Wiesbaden República Federal Alemana) y se contaron en un FACS calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, República Federal Alemana).

Inhibición de la regulación a la baja de CCR6

Se incubaron células mononucleares recién aisladas durante 20 minutos con 10 ng/ml de CCL18, 100 ng/ml del péptido inhibidor PS-AU-105 (polipéptido según SEQ ID NO.: 1), una combinación de ambos o se dejaron sin tratar. La incubación se realizó en RPMI 1640 con 10% suero de ternera fetal y 100 U/ml de Estreptomicina/Penicilina a 37°C. Después de la incubación, las células se centrifugaron y el sobrenadante se desechó. Las células se fijaron con 4%

paraformaldehído durante 5 minutos en hielo y se lavaron dos veces en PBS que contenía 1% FCS. Después de fijar, las células se tiñeron usando un anticuerpo conjugado con fluoresceína frente a CCR6 (R&D systems, Wiesbaden, República Federal Alemana) y se analizaron por citometría de flujo (FACScalibur y Quantquest; ambos de Becton Dickinson, Franklin Lakes, EEUU).

5 Estadísticas

Todas las estadísticas se realizaron usando estadísticas no paramétricas. El análisis por parejas del incremento o inhibición se realizó usando análisis de rangos con signo de Wilcoxon; los grupos no emparejados se analizaron usando el Ensayo U de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Los datos se presentan usando Gráficos de Cajas. En este caso, la mediana se proporciona como línea en un rectángulo indicando el percentil 25 y 75. El percentil 5 y 95 se indican como líneas por debajo o por encima del rectángulo, los valores más allá o por encima del percentil 5 y 95 se ilustran como punto.

10 Ejemplo 2 - Identificación de un péptido de unión de CCL18 usando exposición en fago

Después de 3 círculos de unión de los fagos de la biblioteca de fagos (como se describe en le ejemplo 1) a CCL18 humano unido a placa, se plaquearon E. coli infectadas con fago en agar y se tomaron 20 colonias, se expandieron y se aisló ADN para secuenciación. Algunas de las secuencias no fueron informativas o codificaban dianas génicas no humanas, sin embargo, se identificó una secuencia con una clara relación con el receptor de quimioquina CC 6 (CCR6).

15 Ejemplo 3 - Análisis de la expresión de CCR6 en líneas primarias de fibroblastos humanos

PCR

Los estudios de expresión usando cebadores para CCR6 revelaron una alta variabilidad de la expresión del ARNm de CCR6. La expresión más alta se encontró en líneas de fibroblastos derivadas del pulmón de pacientes que padecían neumonía intersticial usual (UIP). Las líneas derivadas de pacientes que padecían neumonía intersticial no específica (NSIP) o carcinoma escamoso sólo expresaban niveles marginales de ARNm de CCR6 (Fig. 1).

FACS

Los análisis de citometría de flujo de líneas de fibroblastos establecidas revelaron expresión detectable de CCR6 sólo en líneas de fibroblastos derivadas de pacientes que padecían UIP. Las líneas generadas a partir de pulmones de pacientes que padecían carcinoma escamoso o NSIP no expresan CCR6 detectable en su superficie (Fig. 2). La expresión incrementada de CCR6 de fibroblastos de pulmones fibróticos permaneció incrementada a lo largo de todos los subcultivos (datos no mostrados).

Inmunohistoquímica

Los estudios de inmunohistoquímica en secciones de tejido tomadas de pulmones de pacientes con IPF/UIP no revelaron expresión de CCR6 en tejido pulmonar normal (Fig. 3A). En pulmones fibróticos, la expresión de CCR6 se detectó en la superficie apical de células epiteliales alveolares (Fig. 3B) y en fibroblastos (Fig. 3C).

Ejemplo 4 - Análisis funcional de CCR6

Expresión de FGF2

Los fibroblastos derivados de pulmones no fibróticos liberaron sólo niveles marginales de FGF2. CCL18 estimula la liberación de FGF2 en estas células sólo marginalmente. Por el contrario, los fibroblastos no estimulados derivados de pulmones fibróticos liberan niveles incrementados de FGF2 ($p < 0,005$ comparado con los controles) que además está regulado al alza por CCL18 ($p < 0,05$, Fig. 4).

El bloqueo de CCR6 por un anticuerpo bloqueante no ejerce ningún efecto en la liberación de FGF2 estimulada por CCL18 por líneas de fibroblastos no fibróticas. En fibroblastos derivados de pulmones fibróticos el bloqueo de CCR6 disminuyó significativamente la regulación al alza de FGF2 inducida por CCL18 ($p < 0,05$).

Expresión de colágeno

Se ha reportado que CCL18 induce la expresión de colágeno y α SMA (7, 18). Por lo tanto, se determinó si la inducción de estas moléculas también depende de CCR6. Como se muestra en la Fig. 5 (panel superior), CCL18 regula al alza la expresión de colágeno I en tres de las cuatro líneas celulares analizadas. Esta inducción se inhibió en las tres líneas celulares reactivas para CCL18 por el bloqueo de CCR6 usando un anticuerpo bloqueante. Se obtuvo el mismo resultado

para la regulación al alza de α SMA inducida por CCL18. La misma línea celular que no presentó expresión incrementada de colágeno I por la estimulación con CCL18 tampoco reaccionó en el caso de α SMA (Fig. 5, panel inferior).

Ejemplo 5 - La Inducción de la Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) a mio-fibroblastos por CCL18 depende de CCR6

5 EMT de la línea celular epitelial alveolar de rata RLE-6TN

La línea celular epitelial alveolar de rata RLE-6TN presenta la típica forma de célula cuboidal de célula epitelial (Fig. 6 parte superior). El cultivo de estas células durante seis días en presencia de CCL18 induce una diferenciación a células semejantes a fibroblastos con forma fusiforme (Fig. 6 parte central, véanse las flechas) en algunas áreas. Esta diferenciación es más pronunciada en presencia de TGF β (Fig. 6 parte inferior, véanse las flechas) ya que casi todas las células presentan un fenotipo semejante a fibroblastos con forma fusiforme. Esto indica que CCL18 induce al menos parcialmente EMT en células RLE-6TN.

Los análisis por Transferencia Western de RLE-6TN después de EMT inducida bien por CCL18 o TGF β revelaron la expresión de vimentina después de cultivar en presencia de CCL18 que aumenta por TNF α (Figura 7). Sólo fue visible una expresión débil de α SMA en ambas condiciones. TGF β indujo una expresión fuerte de α SMA pero no indujo la expresión de vimentina.

La microscopía de fluorescencia demostró que la estimulación con TGF β induce de hecho la expresión de α SMA en células RLE-6TN (Fig. 8B) mientras CCL18 o CCL18/TNF α no lo hacen (Fig. 8C y D). Por el contrario, todas las estimulaciones indujeron la expresión de CD90 (Fig. 9B y C) aunque la expresión de CD90 fue más intensa usando CCL18. La PCR cuantitativa en tiempo real de RLE-6TN reveló una expresión débil de CCR6 de rata. Sin embargo, el análisis de la proteína CCR6 usando transferencia Western o citometría de flujo no pudo demostrar la expresión de CCR6 por RLE-6TN (datos no mostrados). Por lo tanto, las células se transfectaron transitoriamente con un plásmido disponible comercialmente que contenía una secuencia de ADN que codifica CCR6 humano. Después de la transfección, la estimulación con CCL18 indujo α SMA en las células transfectadas con CCR6, pero no en células con transfección simulada. Por el contrario, TGF β indujo la expresión de α SMA en ambos tipos celulares (Figura 10).

25 EMT de células epiteliales alveolares primarias humanas

La estimulación de células epiteliales alveolares primarias humanas aisladas tipo II estimuladas bien con TGF β +TNF α o CCL18 con o sin TNF α también induce EMT como se demuestra por la inducción de la expresión de vimentina y α SMA y la expresión reducida de citoqueratina (Fig. 11).

Ejemplo 6 - Inhibición de la regulación a la baja de la expresión de CCR6 inducida por CCL18 en PBMNC

30 Se agruparon células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) humana según su porcentaje basal de células CCR6⁺. El cultivo de PBMNC sin ninguna activación no altera el porcentaje de células CCR6⁺. Por el contrario, la activación con PHA incrementa el porcentaje de CCR6⁺ en preparaciones con una proporción inicial de CCR6⁺ baja (Fig. 12 barras sombreadas), pero lo disminuye en preparaciones con una proporción de CCR6⁺ alta (Fig. 12 barras blancas).

La incubación de PBMNC aisladas ricas en CCR6⁺ con CCL18 durante 20 minutos resultó en una disminución en el porcentaje de células CCR6⁺ (Fig. 13) debido posiblemente a la internalización del receptor CCR6. Esta reducción de la expresión de CCR6 inducida por CCL18 disminuye en presencia del péptido inhibidor PS-AU-105 (polipéptido según SEQ ID NO.: 1). La Fig. 14 demuestra una sub-población clara de células CCR6⁺ en cultivo sin estimular (control pos.). La estimulación con CCL18 disminuye esta subpoblación como se demuestra por un segundo pico disminuido (CCL18 solo). La estimulación con CCL18 en presencia del péptido inhibidor PS-AU-105 (polipéptido según SEQ ID NO.: 1) no reguló a la baja la subpoblación de CCR6⁺. El inhibidor solo no presenta ningún efecto (inhibidor solo).

Ejemplo 7 - Análisis de la expresión de CCR6 en carcinoma de pulmón humano

Inmunohistoquímica

El análisis de pulmón control no reveló tinción de CCR6 (Fig. 15A). Por el contrario, las células tumorales presentaron una expresión clara de CCR6 (Fig. 15 B y C, flechas). Además, algunos fibroblastos también presentaron una expresión débil de CCR6 (Fig. 15 C, cabezas de flecha).

FACS

El análisis FACS reveló una expresión clara de CCR6 en dos de tres líneas celulares de adenocarcinoma (Fig. 16 panel superior) y en todas las líneas celulares de mesotelioma pleural (Fig. 16 panel inferior). La línea celular de adenocarcinoma de pulmón LxFA 526L presenta expresión marginal de CCR6.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trepel, M., Arap, W., y Pasqualini, R. 2002. In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr Opin Chem Biol* 6:399-404.
2. Pechkovsky, D.V., Zissel, G., Ziegenhagen, M.W., Einhaus, M., Taube, C., Rabe, K.F., Magnussen, H., Papadopoulos, T., Schlaak, M., y Muller-Quernheim, J. 2000. Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur Cytokine Netw* 11:618-625.
3. Goldmann, T., Wiedorn, K.H., Kuhl, H., Olert, J., Branscheid, D., Pechkovsky, D., Zissel, G., Galle, J., Muller-Quernheim, J., y Vollmer, E. 2002. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 198:91-95.
4. Pechkovsky, D.V., Zissel, G., Goldmann, T., Einhaus, M., Taube, C., Magnussen, H., Schlaak, M., y Muller-Quernheim, J. 2002. Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L684-692.
5. Droemann, D., D. Albrecht, J. Gerdes, A.J. Ulmer, D. Branscheid, E. Vollmer, K. Dalhoff, P. Zabel, y T. Goldmann, *Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9*. *Respir Res*, 2005. 6(1): p. 1.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG
 <120> Bloqueo de la señalización de CCL18 a través de CCR6 como una opción terapéutica en enfermedades fibróticas y cáncer
- 10 <130> U7130/DB
 <160> 19
 <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> péptido inhibidor de CCR6
 <400> 1
 Glu Asp Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp Gln Ile His Pro Lys Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro Gln Cys Pro Lys
 20 25
- 30 <210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido inhibidor de CCR6
- 35 <400> 2
 Glu Leu Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro Gln Cys Pro Lys
 20 25
- 40 <210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido inhibidor de CCR6
- 45 <400> 3
 Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His Pro Lys Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys Asp Ile
 20 25 30

ES 2 523 265 T3

<210> 4
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido según la SEQ ID NO.: 1

 <400> 4
 gaggactgct gcctcgtcta tacctcctgg cagattcacc caaagttcat agttgactat 60
 10 tctgaaacca gccccagtg cccaag 87

 <210> 5
 <211> 87
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido según la SEQ ID NO.: 2
 20 <400> 5
 gagctctgct gcctcgtcta tacctcctgg cagattccac aaaagttcat agttgactat 60
 tctgaaacca gccccagtg cccaag 87

 <210> 6
 <211> 93
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido según la SEQ ID NO.: 3
 30 <400> 6
 tttgactgct gtcttgata cacagaccgt attcttcac ctaaatttat tgtgggcttc 60
 acacggcagc tggccaatga aggctgtgac atc 93

 <210> 7
 35 <211> 3216
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 523 265 T3

<400> 7
agtgtatggg tgaaggaggc agcagtgtgg ccggagagga gagctgggct gggagcacag 60
gaaggtcccc aggactctgt ggtcatcagt aagagagggc ccacgtgtat atgctgggta 120
acagaaatgt caaccttttc aaagtctgac atttaagaga aaaaactgtg gctggttggt 180
tgtggaacag acagctcctt ctttattgag tcacctctac tttcctgcta ccgctgcctg 240
tgagctgaag gggctgaacc atacactcct ttttctacaa ccagcttgca ttttttctgc 300
ccacaatgag cggggaatca atgaatttca gcgatgtttt cgactccagt gaagattatt 360
ttgtgtcagt caatacttca tattactcag ttgattctga gatgttactg tgctccttgc 420
aggaggtcag gcagttctcc aggctatttg taccgattgc ctactccttg atctgtgtct 480
ttggcctcct ggggaatatt ctggtgggta tcacctttgc tttttataag aaggccaggt 540
ctatgacaga cgtctatctc ttgaacatgg ccattgcaga catcctcttt gttcttactc 600

ES 2 523 265 T3

tcccattctg ggcagtgagt catgccaccg gtg⁻⁻⁻⁻cg⁻⁻⁻⁻tgggt tttcagcaat gccacgtgca 660
 agttgctaaa aggcattctat gccatcaact ttaactgcgg gatgctgctc ctgacttgca 720
 ttagcatgga ccggtacatc gccattgtac aggcgactaa gtcattccgg ctccgatcca 780
 gaacactacc gcgcagcaaa atcatctgcc ttgttgtgtg ggggctgtca gtcattcatct 840
 ccagctcaac ttttgtcttc aaccaaaaat acaacaccca aggcagcgat gtctgtgaac 900
 ccaagtacca gactgtctcg gagcccatca ggtggaagct gctgatgttg gggcttgagc 960
 tactctttgg tttctttatc cttttgatgt tcatgatatt ttgttacacg ttcattgtca 1020
 aaaccttggg gcaagctcag aattctaaaa ggcacaaagc catccgtgta atcatagctg 1080
 tgggtcttgt gtttctggct tgtcagattc ctcataacat ggtcctgctt gtgacggctg 1140
 caaatttggg taaaatgaac cgatcctgcc agagcgaaaa gctaattggc tatacgaaaa 1200
 ctgtcacaga agtcctggct ttctgcact gctgcctgaa ccctgtgctc tacgctttta 1260
 ttgggcagaa gttcagaaac tactttctga agatcttgaa ggacctgtgg tgtgtgagaa 1320
 ggaagtacaa gtcctcaggc ttctcctgtg ccgggaggta ctcaaaaaac atttctcggc 1380
 agaccagtga gaccgcagat aacgacaatg cgctgcctt cactatgtga tagaaagctg 1440
 agtctcccta aggcattgtg gaaacatact catagatggt atgcaaaaaa aagtctatgg 1500
 ccaggtatgc atggaaaatg tgggaattaa gcaaaatcaa gcaagcctct ctctgcggg 1560
 acttaacgtg ctcatgggct gtgtgatctc ttcagggtgg ggtggctctt gataggtagc 1620
 attttccagc actttgcaag gaatgtttg tagctctagg gtatatatcc gcctggcatt 1680
 tcacaaaaca gcctttggga aatgctgaat taaagtgaat tgttgacaaa tgtaaacatt 1740
 ttcagaaata ttcattgaagc ggtcacagat cacagtgtct tttggttaca gcacaaaatg 1800
 atggcagtgg tttgaaaaac taaaacagaa aaaaaaatgg aagccaacac atcactcatt 1860
 ttaggcaaat gtttaaacat ttttatctat cagaatgttt attgttgctg gttataagca 1920
 gcaggattgg ccggctagtg tttcctctca tttccctttg atacagtcaa caagcctgac 1980
 cctgtaaaat ggaggtggaa agacaagctc aagtgttcac aacctggaag tgcttcggga 2040
 agaaggggac aatggcagaa cagggtgttg tgacaattgt caccaattgg ataaagcagc 2100
 tcaggttgta gtgggccatt aggaaactgt cggtttgctt tgatttccct gggagctggt 2160
 ctctgtcgtg agtgtctctt gtctaaacgt ccattaagct gagagtgcta tgaagacagg 2220
 atctagaata atcttgctca cagctgtgct ctgagtgcct agcggagttc cagcaaacia 2280
 aatggactca agagagattt gattaatgaa tcgtaatgaa gttggggttt attgtacagt 2340
 ttaaaatggt agatgtttt aattttttaa ataaatggaa tactttttt ttttttttaa 2400
 agaaagcaac tttactgaga caatgtagaa agaagttttg ttccgtttct ttaatgtggg 2460
 tgaagagcaa tgtgtggctg aagacttttg ttatgaggag ctgcagatta gctaggggac 2520
 agctggaatt atgctggctt ctgataatta ttttaagggt gtctgaaatt tgtgatggaa 2580
 tcagatttta acagctctct tcaatgacat agaaagttca tggaaactcat gtttttaaag 2640
 ggctatgtaa atatatgaac attagaaaaa tagcaacttg tgttacaaaa atacaaacac 2700

ES 2 523 265 T3

atgtaggaa ggtactgtca tgggctaggc atggtggctc acacctgtaa tcccagcatt 2760
ttgggaagct aagatgggtg gatcacttga ggtcaggagt ttgagaccag cctggccaac 2820
atggcgaaac ccctctctac taaaaataca aaaatttgcc aggcgtggtg gcgggtgcct 2880
gtaatcccag ctacttggga ggctgaggca agagaatcgc ttgaaccag gaggcagagg 2940
ttgcagtgag ccgagatcgt gccattgcac tccagcctgg gtgacaaagc gagactccat 3000
ctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaggaaag aactgtcatg taaacatacc aacatgttta 3060
aacctgacaa tgggtgttatt tgaaacttta tattgttctt gtaagcttta actatatctc 3120
tctttaaata gcaaaataat gtcttaagat tcaaagtctg tatttttaa gcatggcttt 3180
ggctttgcaa aataaaaaat gtgttttgta catgaa 3216

<210> 8

5 <211> 3479

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 523 265 T3

<400> 8
aactcacacg gcctcttgca aacgttccca aatcttccca gtcggcttgc agagactcct 60
tgctcccagg agataaccag gtaaaggagt atgaaagttt gggtaacaac tcattgctgc 120
aaattgaaaa ccatgcaaag gctgtcttcc tctggggagt tcaatgcctc tctttttctt 180
atcactttac cattggttgg actttgattc cagggatcct acgattactc aataccctac 240
aggatataca tggttaacca tttgcatttg ggcaaatagg cgttactttt caataggaag 300
tggcaatcca gaacttgctt ttgggcaatt ctagtagctc accgcttttt tcttaatgac 360
tgctagaagc tgcactttat tgacagatgg tcatcacatt ggtgagctgg agtcatcaga 420
ttgtggggcc cggagtgagg ctgaaggag tggatcagag cactgcctga gagtcacctc 480
tactttcctg ctaccgctgc ctgtgagctg aaggggctga accatacact cctttttcta 540
caaccagctt gcattttttc tgcccacaat gagcggggaa tcaatgaatt tcagcgatgt 600
tttcgactcc agtgaagatt attttgtgtc agtcaatact tcatattact cagttgattc 660
tgagatgta ctgtgctcct tgcaggaggt caggcagttc tccaggctat ttgtaccgat 720
tgcctactcc ttgatctgtg tctttggcct cctggggaat attctggtgg tgatcacctt 780
tgctttttat aagaaggcca ggtctatgac agacgtctat ctcttgaaca tggccattgc 840
agacatcctc tttgttctta ctctccatt ctgggcagtg agtcatgcca ccggtgcgtg 900
ggttttcagc aatgccacgt gcaagttgct aaaaggcatc tatgccatca actttaactg 960
cgggatgctg ctctgactt gcattagcat ggaccggtac atcgccattg tacaggcgac 1020
taagtcatc cggctccgat ccagaacact accgcgagc aaaatcatct gccttgttgt 1080
gtgggggctg tcagtcatca tctccagctc aacttttgtc ttcaaccaa aatacaacac 1140
ccaaggcagc gatgtctgtg aaccaagta ccagactgtc tcggagccca tcaggtggaa 1200
gctgctgatg ttggggcttg agctactctt tggtttcttt atcccttga tgttcatgat 1260
atttgttac acgttcattg tcaaacctt ggtgcaagct cagaattcta aaaggcacia 1320

ES 2 523 265 T3

agccatccgt gtaatcatag ctgtggtgct tgtgtttctg gcttgtcaga ttcctcataa 1380
 catggtcctg cttgtgacgg ctgcaaattt gggtaaaatg aaccgatcct gccagagcga 1440
 aaagctaatt ggctatacga aaactgtcac agaagtcctg gctttcctgc actgctgcct 1500
 gaaccctgtg ctctacgctt ttattgggca gaagttcaga aactactttc tgaagatctt 1560
 gaaggacctg tgggtgtgta gaaggaagta caagtcctca ggcttctcct gtgccgggag 1620
 gtactcagaa aacatttctc ggagaccag tgagaccgca gataacgaca atgctgcgtc 1680
 cttcactatg tgatagaaag ctgagtctcc ctaaggcatg tgtgaaacat actcatagat 1740
 gttatgcaaa aaaaagtcta tggccaggta tgcattgaaa atgtgggaat taagcaaaat 1800
 caagcaagcc tctctcctgc gggacttaac gtgctcatgg gctgtgtgat ctcttcaggg 1860
 tgggggtgct tctgataggt agcattttcc agcactttgc aaggaatggt ttgtagctct 1920
 aggtatata tccgcctggc atttcacaaa acagcctttg ggaaatgctg aattaaagtg 1980
 aattgttgac aaatgtaaac attttcagaa atattcatga agcggtcaca gatcacagtg 2040
 tcttttggtt acagcacaaa atgatggcag tggtttgaaa aactaaaaca gaaaaaaaaa 2100
 tggagccaa cacatcactc attttaggca aatgtttaa catttttatc tatcagaatg 2160
 tttattgttg ctggttataa gcagcaggat tggccggcta gtgtttcctc tcatttcct 2220
 ttgatacagt caacaagcct gaccctgtaa aatggagggtg gaaagacaag ctcaagtgtt 2280
 cacaacctgg aagtgcctcg ggaagaaggg gacaatggca gaacagggtg tggtgacaat 2340
 tgtcaccaat tggataaagc agctcagggtt ttagtgggccc attaggaaac tgtcggtttg 2400
 ctttgatttc cctgggagct gttctctgtc gtgagtgtct cttgtctaaa cgtccattaa 2460
 gctgagagtg ctatgaagac aggatctaga ataatcttgc tcacagctgt gctctgagtg 2520
 cctagcggag ttccagcaaa caaaatggac tcaagagaga tttgattaat gaatcgtaat 2580
 gaagtgggg tttattgtac agtttaaaat gttagatggt ttttaatttt taaataaatg 2640
 gaatactttt tttttttttt taaagaaagc aactttactg agacaatgta gaaagaagtt 2700
 ttgttccggt tctttaatgt gttgaagag caatgtgtgg ctgaagactt ttgttatgag 2760
 gagctgcaga ttagctaggg gacagctgga attatgctgg cttctgataa ttattttaaa 2820
 ggggtctgaa atttgtgatg gaatcagatt ttaacagctc tcttcaatga catagaaagt 2880
 tcatggaact catgttttta aagggtctatg taaatatatg aacattagaa aaatagcaac 2940
 ttgtgttaca aaaatacaaa cacatgttag gaaggctactg tcatgggcta ggcatggtgg 3000
 ctcacacctg taatcccagc attttgggaa gctaagatgg gtggatcact tgaggtcagg 3060
 agtttgagac cagcctggcc aacatggcga aaccctctc tactaaaaat acaaaaattt 3120
 gccaggcgtg gtggcgggtg cctgtaatcc cagctacttg ggaggctgag gcaagagaat 3180
 cgcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccgagat cgtgccattg cactccagcc 3240
 tgggtgacaa agcgagactc catctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagga aagaactgtc 3300
 atgtaaacad accaacatgt ttaaacctga caatggtgtt atttgaaact ttatattggt 3360

ES 2 523 265 T3

cttgtaagct ttaactatat ctctctttaa aatgcaaaat aatgtcttaa gattcaaagt 3420
 ctgtatTTTT aaagcatggc tttggctttg caaaataaaa aatgtgtttt gtacatgaa 3479
 <210> 9
 <211> 793
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 aggagttgtg agtttccaag ccccagctca ctctgaccac ttctctgcct gccagcatc 60
 atgaagggcc ttgcagctgc cctccttgtc ctcgtctgca ccatggccct ctgctcctgt 120
 gcacaagttg gtaccaacaa agagctctgc tgcctcgtct atacctcctg gcagattcca 180
 caaaagttca tagttgacta ttctgaaacc agccccagt gcccgaagcc aggtgtcatc 240
 ctctaacca agagaggccg gcagatctgt gctgaccca ataagaagtg ggtccagaaa 300
 tacatcagcg acctgaagct gaatgcctga ggggcctgga agctgcgagg gccagtgaa 360
 cttggtgggc ccaggaggga acaggagcct gagccagggc aatggccctg ccaccctgga 420
 ggccacctct tctaagagtc ccatctgcta tgcccagcca cattaactaa ctttaacttt 480
 agtttatgca tcatatttca ttttgaaatt gatttctatt gttgagctgc attatgaaat 540
 tagtattttc tctgacatct catgacattg tctttatcat ctttcccct ttcccttcaa 600
 ctcttcgtac attcaatgca tggatcaatc agtgtgatta gctttctcag cagacattgt 660
 gccatatgta tcaaatgaca aatctttatt gaatggtttt gctcagcacc accttttaat 720
 atattggcag tacttattat ataaaaggta aaccagcatt ctactgtga aaaaaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa aaa 793
 10 <210> 10
 <211> 851
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

ES 2 523 265 T3

<400> 10
 agaatataac agcactccca aagaactggg tactcaacac tgagcagatc tgttctttga 60
 gctaaaaacc atgtgctgta ccaagagttt gctcctggct gctttgatgt cagtgctgct 120
 actccacctc tgcggcgaat cagaagcagc aagcaacttt gactgctgtc ttggatacac 180
 agaccgtatt cttcatccta aatttattgt gggcttcaca cggcagctgg ccaatgaagg 240
 ctgtgacatc aatgctatca tctttcacac aaagaaaaag ttgtctgtgt gcgcaaatcc 300
 aaaacagact tgggtgaaat atattgtgcg tctcctcagt aaaaaagtca agaacatgta 360
 aaaactgtgg cttttctgga atggaattgg acatagccca agaacagaaa gaaccttgct 420
 ggggttgag gtttcaactg cacatcatgg agggtttagt gcttatctaa tttgtgcctc 480
 actggacttg tccaattaat gaagttgatt catattgcat catagtttgc tttgtttaag 540
 catcacatta aagttaaact gtatattatg ttatttatag ctgtaggttt tctgtgttta 600
 gctatttaat actaattttc cataagctat tttggtttag tgcaaagtat aaaattatat 660
 ttggggggga ataagattat atggactttc ttgcaagcaa caagctattt tttaaaaaaa 720
 actatttaac attcttttgt ttatattggt ttgtctccta aattgttgta attgcattat 780
 aaaataagaa aaatattaat aagacaaata ttgaaaataa agaaacaaaa agttctttctg 840
 ttaaaaaaaaa a 851

5

<210> 11
 <211> 848
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

ES 2 523 265 T3

	<400> 11		
	agaatataac agcactccca aagaactggg tactcaacac tgagcagatc tgttctttga		60
	gctaaaaacc atgtgctgta ccaagagttt gctcctggct gctttgatgt cagtgctgct		120
	actccacctc tgcggcgaat cagaagcaag caactttgac tgctgtcttg gatacacaga		180
	ccgtattctt catcctaaat ttattgtggg cttcacacgg cagctggcca atgaaggctg		240
	tgacatcaat gctatcatct ttcacacaaa gaaaaagttg tctgtgtgcg caaatccaaa		300
	acagacttgg gtgaaatata ttgtgctgct cctcagtaaa aaagtcaaga acatgtaaaa		360
	actgtggcctt ttctggaatg gaattggaca tagcccaaga acagaaagaa ccttgctggg		420
	gttggagggt tcacttgcac atcatggagg gtttagtgct tatctaattt gtgcctcact		480
	ggacttgtcc aattaatgaa gttgattcat attgcatcat agtttgcttt gtttaagcat		540
	cacattaaag ttaaactgta ttttatgtta tttatagctg taggttttct gtgttttagct		600
	atttaatact aattttccat aagctatttt ggttttagtgc aaagtataaa attatatttg		660
	ggggggaata agattatatg gactttcttg caagcaacaa gctatttttt aaaaaaact		720
	atttaacatt cttttgttta tattgttttg tctcctaaat tgttgtaatt gcattataaa		780
	ataagaaaaa tattaataag acaaatattg aaaataaaga acaaaaagt tcttctgtta		840
	aaaaaaaa		848
5	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador directo de GAPDH		
	<400> 12		
	caccagggt gctttaact	20	
15	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> cebador inverso de GAPDH		
	<400> 13		
	gatctgctc ctggaagatg	20	
25	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> cebador directo de CCR6		

ES 2 523 265 T3

	<400> 14 gcacaaaatg atggcagtgg	20
5	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador inverso de CCR6	
	<400> 15 ccgaagcact tccaggtgt	20
15	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador directo de colágeno de tipo I	
25	<400> 16 ccctgtctgc ttcctgtaa ct	22
30	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso de colágeno de tipo I	
35	<400> 17 catgttcggt tggtaaaga ta	22
40	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo de alfaSMA	
45	<400> 18 catcatgcgt ctggatctgg	20
50	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso de alfaSMA	
55	<400> 19 ggacaatctc acgctcagca	20
60		

REVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 para uso como medicamento, en la que el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 se selecciona del grupo que consiste en el polipéptido aislado según 1) ó 2) y el vector de expresión según 3) ó 4), en la que
- 1) es un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 1; y
- (b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);
- en la que dicho polipéptido aislado es capaz de unirse a e inhibir la actividad del receptor CCR6;
- 10 2) es el polipéptido aislado según 1), en el que la secuencia de aminoácidos según (a) comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia según SEQ ID NO.: 1;
- 3) es un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según 1) ó 2);
- 4) es el vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según 3), en el que dicho polinucleótido comprende o consiste en una secuencia que presenta al menos 80% de identidad con la secuencia según SEQ ID NO.: 4.
- 15 2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial y/o cáncer.
3. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, en la que la composición comprende un compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial y/o cáncer.
- 20 4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizativa criptogenética, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica.
- 25 5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma del pulmón, pleuramesotelioma, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, Linfoma No de Hodgkin y Linfoma de Hodgkin.

Figura 1

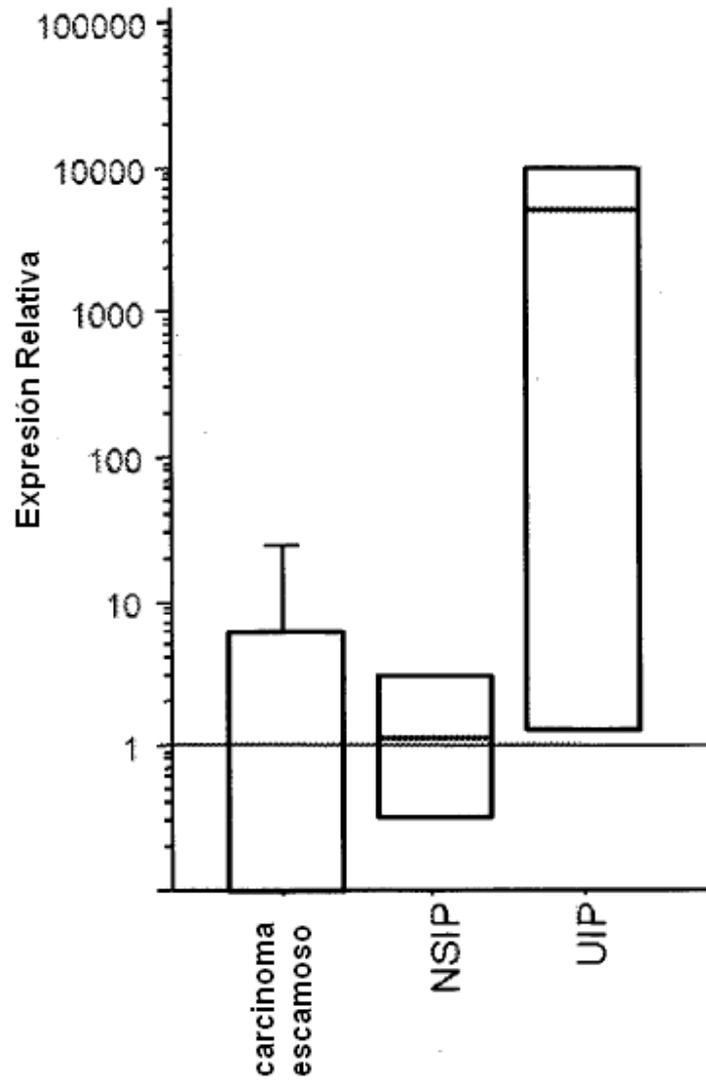


Figura 2

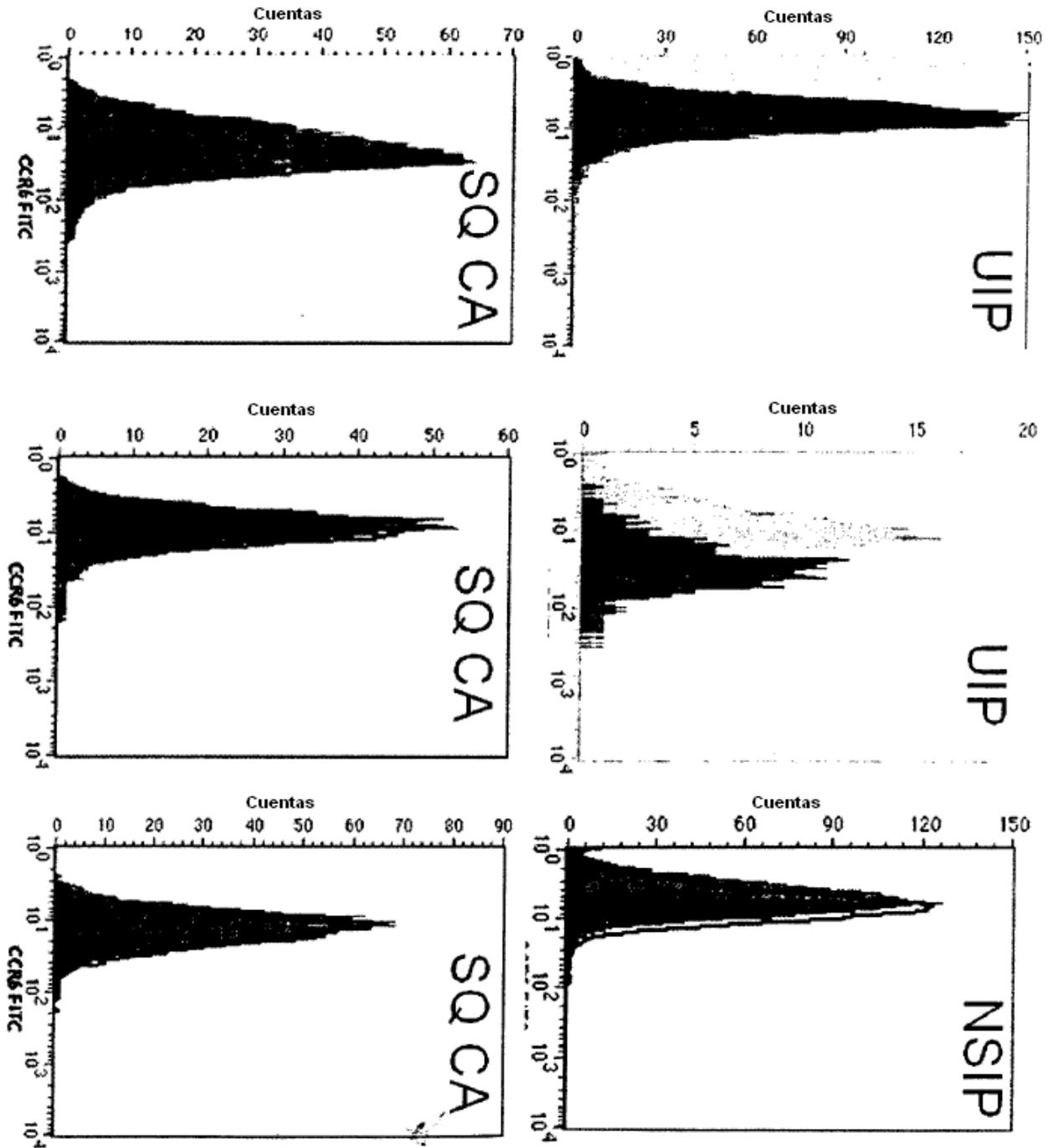


Figura 3

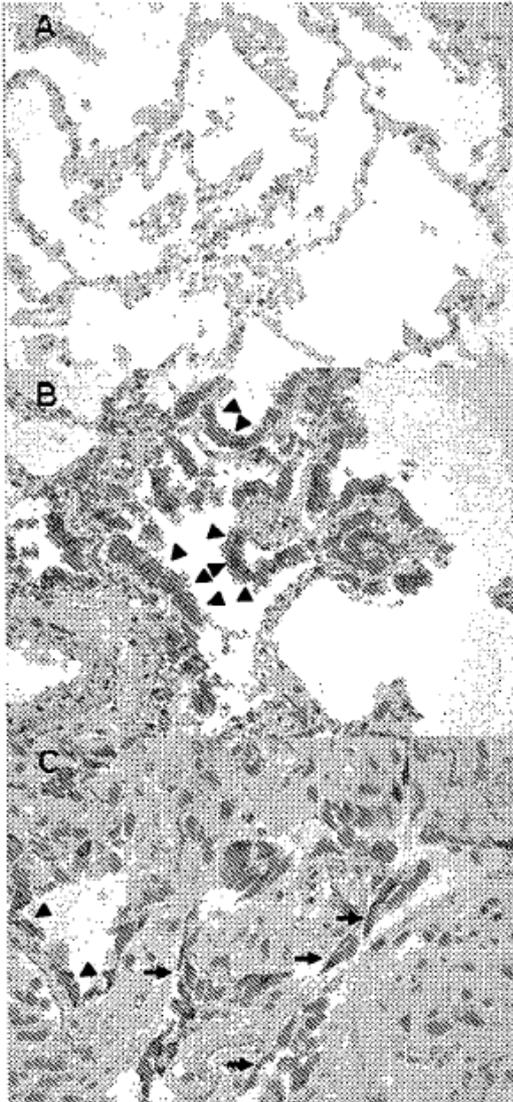


Figura 4

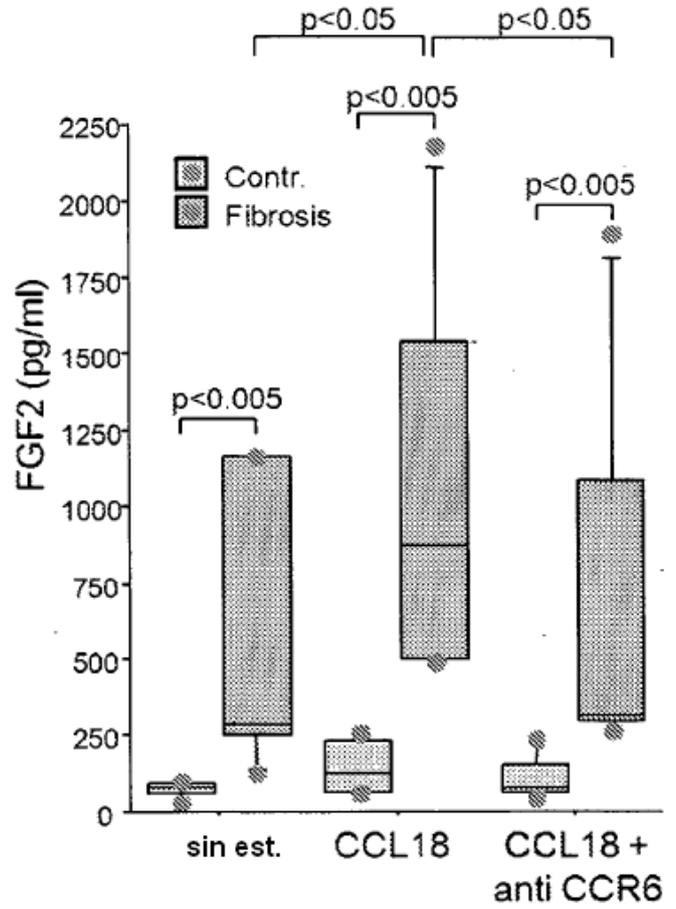


Figura 5

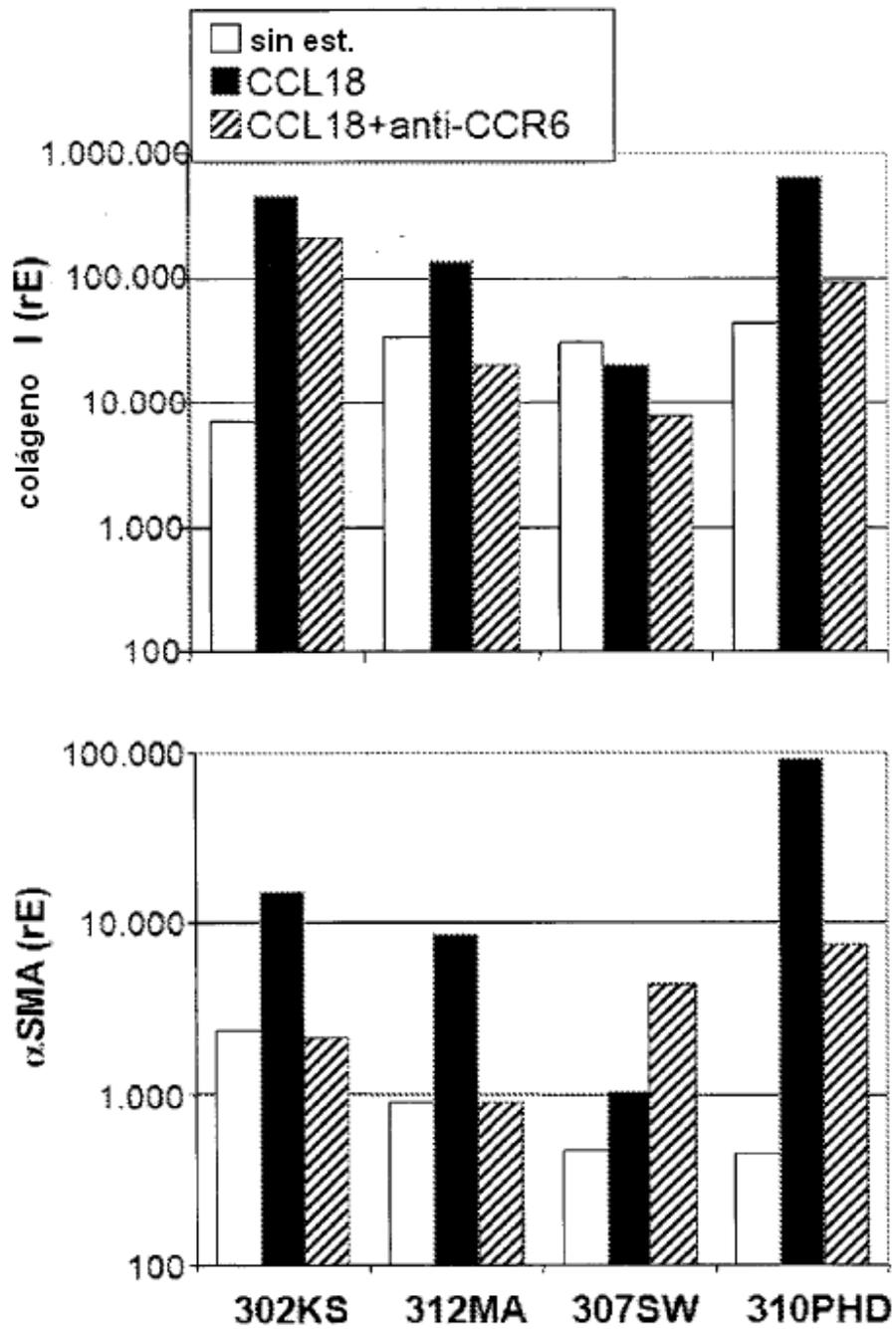


Figura 6

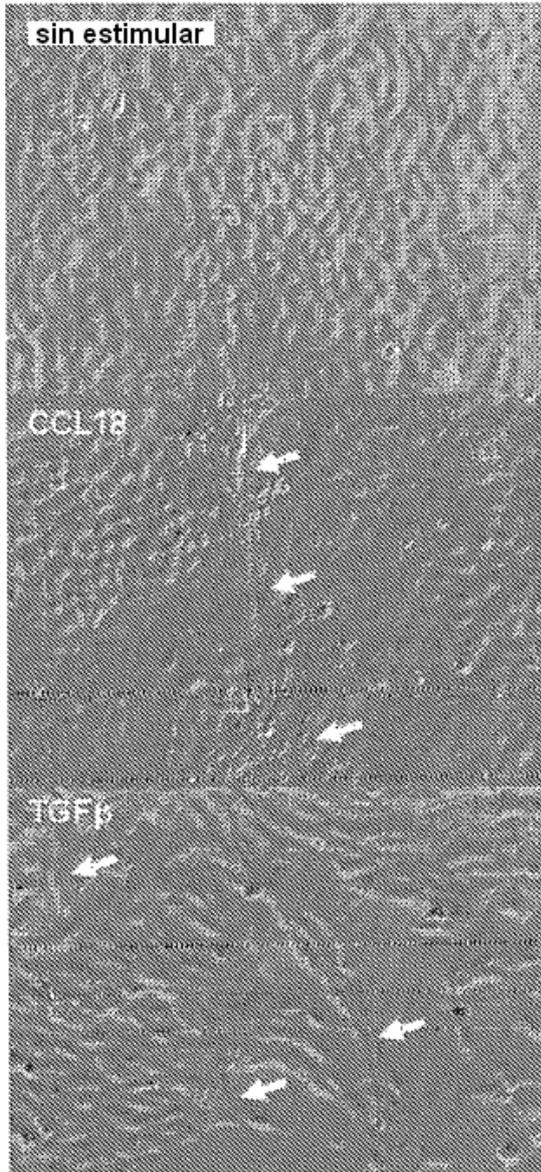


Figura 7

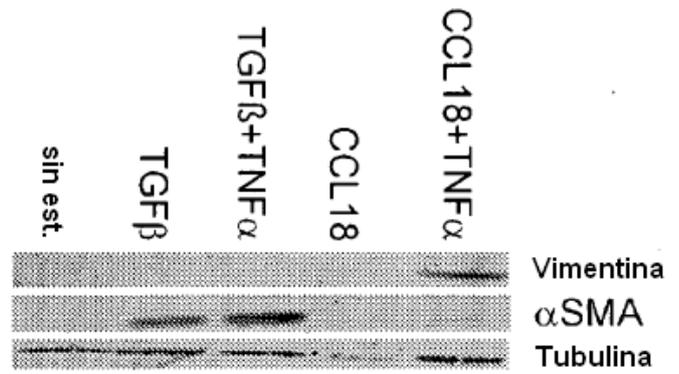


Figura 8

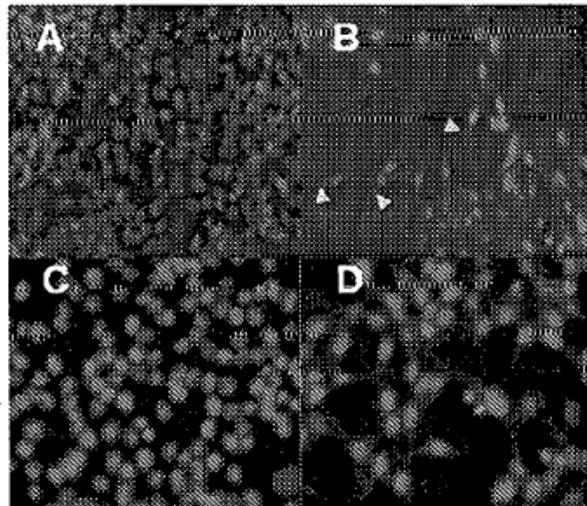


Figura 9

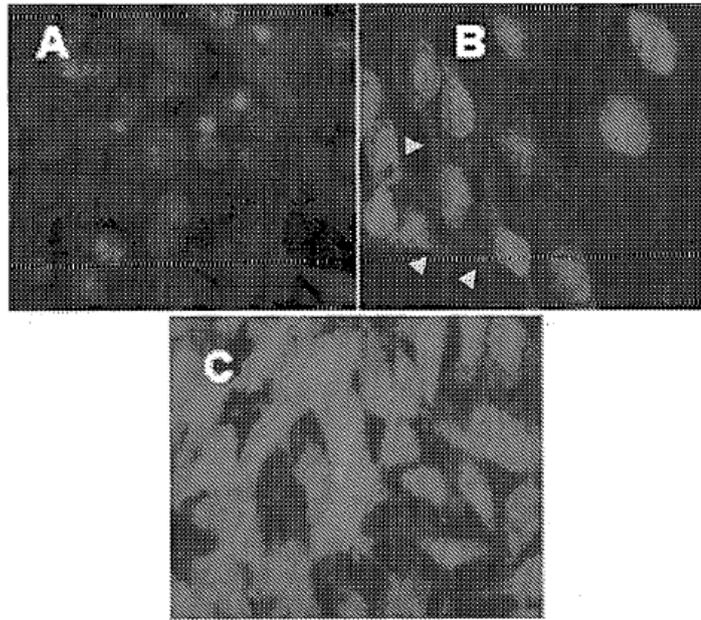


Figura 10

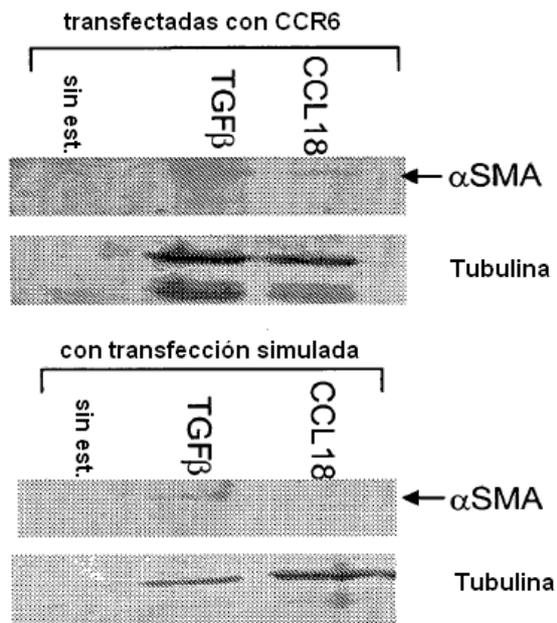


Figura 11

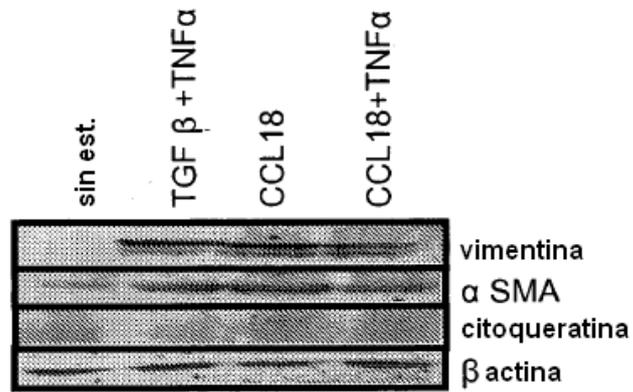


Figura 12

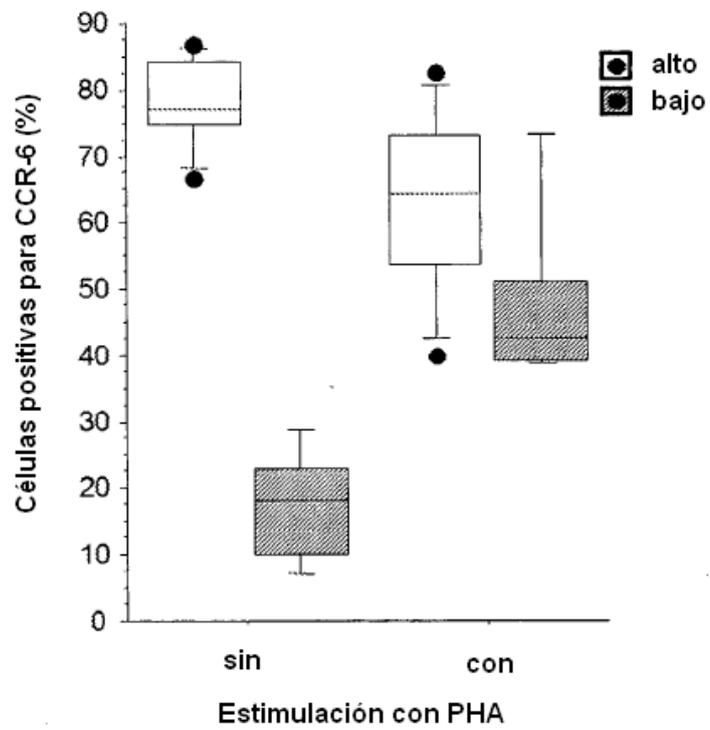


Figura 13

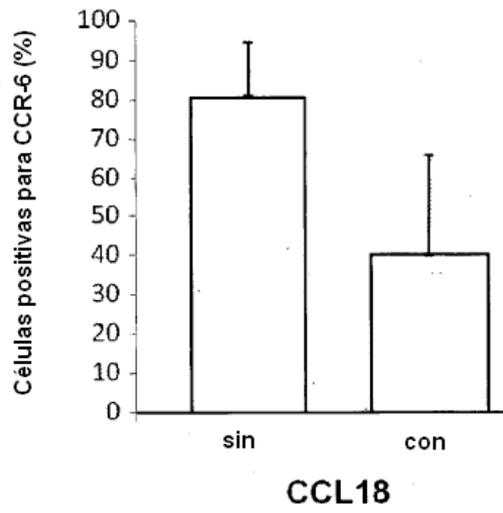


Figura 14

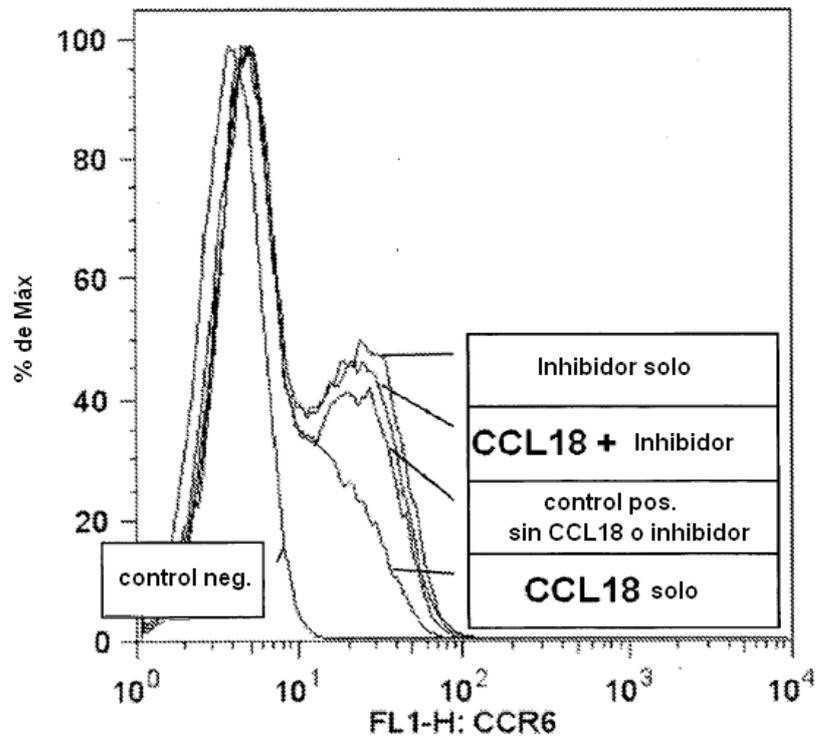


Figura 15

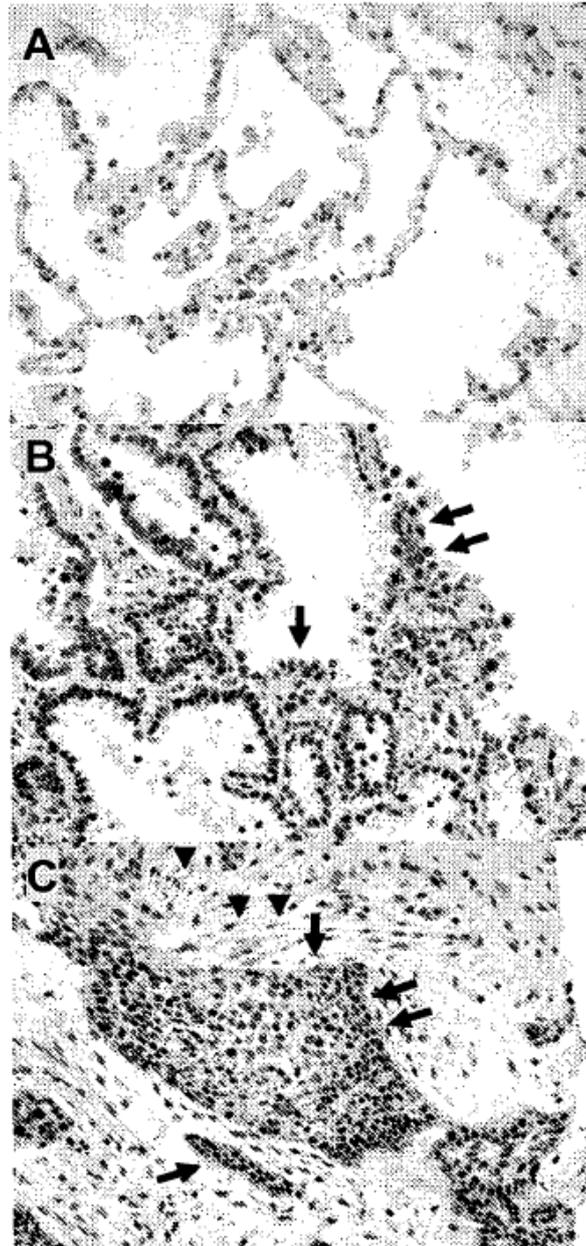


Figura 16

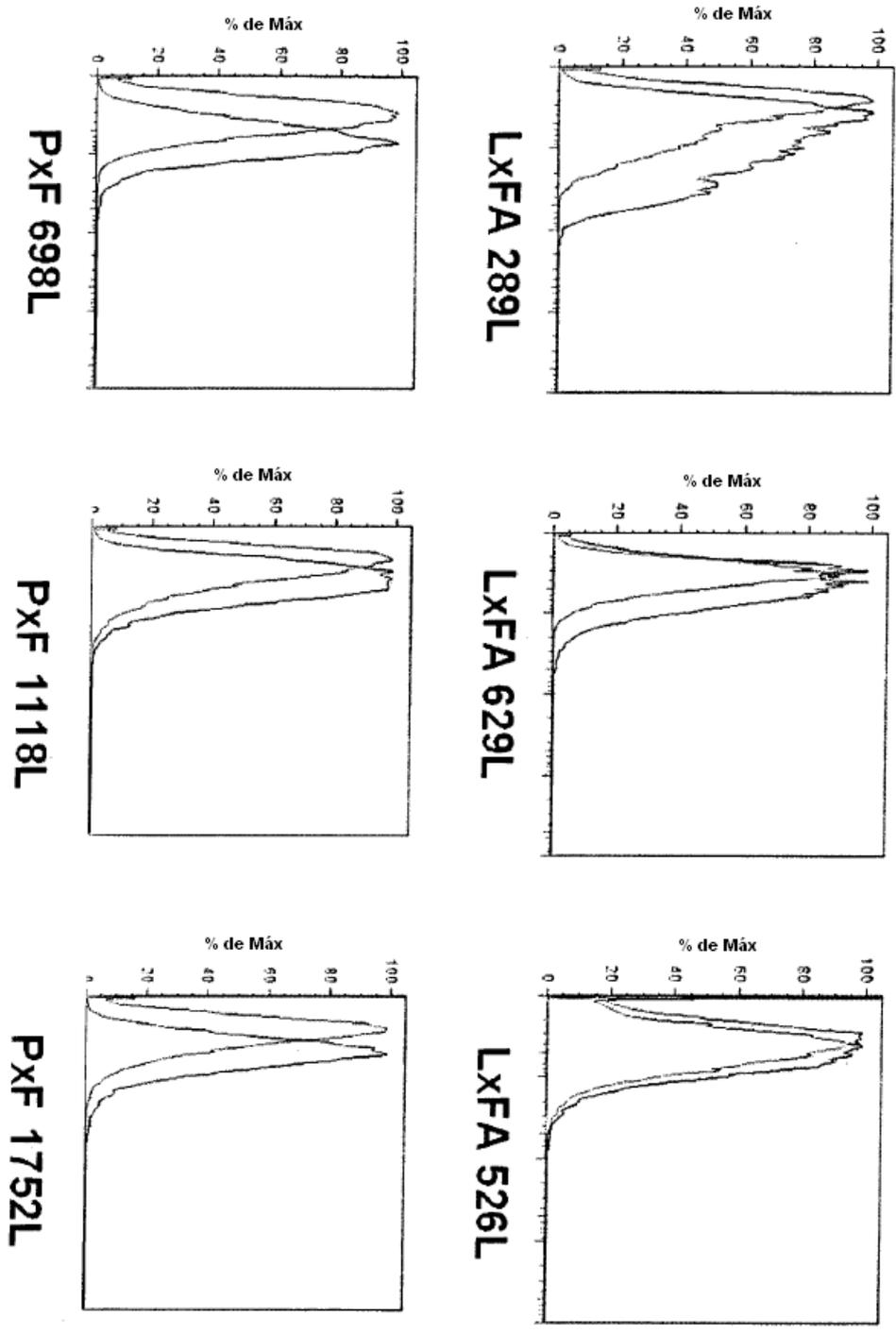


Figura 17

Gen	número de registro	cebador directo	cebador inverso
GAPDH	NM_002046.3	CACCAGGGCTGCTTTTAA CT (SEQ ID NO.: 12)	GATCTCGCTCCTGGAA GATG (SEQ ID NO.: 13)
CCR6	NM_004367.5 NM_031409.3	GCACAAAATGATGGCAG TGG (SEQ ID NO.: 14)	CCGAAGCACTTCCAGG TTGT (SEQ ID NO.: 15)
colágeno tipo I	NM_000088.3	CCCTGTCTGCTTCCTGTA AACT (SEQ ID NO.: 16)	CATGTTTCGGTTGGTCA AAGATA (SEQ ID NO.: 17)
α SMA	NM_00114194 5.1	CATCATGCGTCTGGATCT GG (SEQ ID NO.: 18)	GGACAATCTCACGCTC AGCA (SEQ ID NO.: 19)

Figura 18

SEQ ID NO.:1	EDCCLVYTSWQIHPKFIVDYSETSPQCPK (PS-AU-1015)
SEQ ID NO.:2	ELCCLVYTSWQIPQKFIVDYSETSPQCPK
SEQ ID NO.:3	FDCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDI
SEQ ID NO.:4	GAGGACTGCTGCCTCGTCTATACCTCCTGGCAGATTCACCCAAAG TTCATAGTTGACTATTCTGAAACCAGCCCCCAGTGCCCCAAG
SEQ ID NO.:5	GAGCTCTGCTGCCTCGTCTATACCTCCTGGCAGATTCCACA AAAGTTCATAGTTGACTATTCTGAAACCAGCCCCCAGTGCCCCAA G
SEQ ID NO.:6	TTTGACTGCTGTCTTGGATACACAGACCGTATTCTTCATCCTAAAT TTATTGTGGGCTTCACACGGCAGCTGGCCAATGAAGGCTGTGACA TC
SEQ ID NO.:7	secuencia de CCR6 según el número de registro NCBI NM_004367.5
SEQ ID NO.:8	secuencia de CCR6 según el número de registro NCBI NM_031409.3
SEQ ID NO.:9	secuencia de CCL18 según el número de registro NCBI NM_002988.2
SEQ ID NO.:10	secuencia de CCL20 según el número de registro NCBI NM_004591.2
SEQ ID NO.:11	secuencia de CCL20 según el número de registro NCBI NM_001130046.1