

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 507**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2008 E 12182790 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2533047**

54 Título: **CCR4 como diana terapéutica para cáncer**

30 Prioridad:

18.09.2007 GB 0718167

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

03.11.2016

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)**

**Angel Building 407 St John Street
London EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**SLETTENAAR, VIOLET;
WILSON, JULIA;
WANG, YAOHE;
SCHIOPPA, TIZIANA y
BALKWILL, FRANCES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 588 507 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

CCR4 como diana terapéutica para cáncer

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la oncología y agentes que inhiben CCR4 para su uso en métodos de tratamiento del cáncer. El campo de la invención por lo tanto se refiere a marcadores de valor clínico en el tratamiento del cáncer y el uso de medicamentos para el tratamiento del cáncer. La invención también se refiere a ensayos de exploración para identificar agentes anticancerosos activos.

Antecedentes de la invención

15 Los receptores de quimiocinas y sus ligandos dirigen el tráfico de células en la homeostasis del tejido normal y en la enfermedad, influyendo en la motilidad, la invasividad y la supervivencia celular [1]. En la inflamación y en el cáncer, las quimiocinas en los tejidos enfermos contribuyen a la rodadura, la inmovilización y la invasión de leucocitos desde los vasos sanguíneos a través de la membrana basal de las células endoteliales y al parénquima [2].

20 CCR4 es uno de los 18 receptores de quimiocinas conocidos. Los receptores de quimiocinas se expresan generalmente en las células inmunes y en el microentorno del tumor están presentes varios receptores y sus ligandos en el producto infiltrado de células inmunes.

En muchos tipos de cáncer, las células malignas también expresan ciertos receptores de quimiocina, receptores que no se encuentran usualmente en sus contrapartes normales. Se cree que las células cancerosas metastásicas obtienen características de los leucocitos que expresan el receptor de quimiocinas, utilizando las quimiocinas para ayudar a su migración hacia, y a su supervivencia en, sitios distantes del tumor original [3, 4, 5]. La presencia inapropiada en las células cancerosas de receptores de quimiocina que normalmente tienen un patrón muy restringido de expresión también apoya la hipótesis de que los receptores de quimiocina específicas pueden ayudar a las células a propagarse hacia, y/o sobrevivir en, diferentes sitios de metástasis [8]. En los carcinomas, melanomas y tumores malignos hematológicos, la expresión de los receptores de quimiocina, especialmente CXCR4 y CCR7, en las células malignas en una enfermedad avanzada, se correlaciona con el aumento de metástasis en los ganglios linfáticos, una mayor diseminación de la enfermedad, una supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia general más bajas [6, 7, 8]. CXCR5 normalmente se restringe a las células B y algunos subtipos de células T, pero que también es expresado por las células de cáncer de páncreas en las que está implicado en el establecimiento de las metástasis hepáticas; siendo el hígado el un sitio de producción del ligando de CXCR4, CXCL13 [9]. Las células de melanoma que se han metastatizado en el intestino expresan CCR9 [10]. En la homeostasis, el ligando de CCR9 CCL25 recluta subconjuntos de células T raras al intestino. En el cáncer de páncreas, se ha observado la expresión de CCR6 [38] [39]. También se ha informado sobre la expresión de CCR6 en el carcinoma renal humano, junto con CCR3 y CXCR2 [40].

40 Esto demuestra que unos pocos receptores de quimiocina son conocidos por estar regulados al alza en células epiteliales tumorales en la carcinogénesis de fase avanzada, incluyendo el CXCR4, y se piensa que desempeñan un papel en la invasión y la metástasis. En contraste, solamente se ha informado previamente de que CCR4 está regulado al alza en algunos cánceres de la sangre, concretamente en linfomas de células T.

45 Como se describió anteriormente, CXCR4 se encuentra comúnmente en células malignas en muchos cánceres humanos avanzados. Además, Woerner *et al.* encontraron que CXCR4 también estaba presente en las fases tempranas de la enfermedad en el glioblastoma [20]. Sin embargo, utilizando un anticuerpo anti-CXCR4 específico del grupo fosfo, encontraron que en las lesiones de Grado 1 menos malignas, el nivel de activación del receptor era mucho menor.

Aunque en general se ha informado de que la expresión del receptor de quimiocinas en células malignas se asocia con la enfermedad avanzada, también existen algunos otros informes en la técnica sobre la expresión de un receptor de quimiocinas en las células malignas en las fases tempranas y preinvasivas de cáncer, pero todos estos están relacionados con CXCR4. En un gran estudio de matrices de tejidos (más de 2000 muestras) de cáncer de mama, se informó de la expresión en citoplasma/membrana de CXCR4 en 67 % de carcinomas ductales *in situ*, DCIS [21]. Esto fue confirmado en un estudio de Schmid *et al.* que demostró que tanto CXCR4 como su ligando CXCL12 era expresados en DCIS [22]. Los autores de la presente invención también han encontrado CXCR4 en las células epiteliales de los tumores de cáncer de ovario no invasivos de bajo potencial (Kulbe *et al.*, Manuscrito en preparación) y esto también ha sido referido por Pils *et al.* [23].

60 No se encuentran disponibles datos sobre la expresión de otros receptores de quimiocinas en células epiteliales en cánceres tempranos, pero existe evidencia de que las rutas oncogénicas pueden inducir a expresión de receptores de quimiocinas en células epiteliales. El oncogén RET/PTC1 es necesario y suficiente para la transformación maligna de tirocitos primarios [24]. Este oncogén induce un programa pro-inflamatorio en los tirocitos que incluye la inducción de CXCR4 funcional. El rabdomiosarcoma alveolar es un tumor muy agresivo que se caracteriza por

fusiones de genes PAX3 y PAX7-FKHR recurrentes. La transferencia de PAX3-FKHR a células de rhabdomyosarcoma embrionario también activa la expresión de CXCR4 [Libura, 2002 Núm. 9346].

5 En todos estos estudios la conclusión es que la adquisición de ciertos receptores de quimiocinas por las células malignas parece ser un evento relativamente tardío en la progresión del tumor maligno, y en el caso de CCR4, no se ha informado sobre la expresión en ninguna fase de desarrollo del tumor sólido

10 La expresión de CCR4 se restringe generalmente al sistema inmune, y es conocido como un marcador de células Th2 y T reguladoras. En el entorno del tumor, estas células actúan suprimiendo las células T citotóxicas y la maduración de células dendríticas, suprimiendo por lo tanto las respuestas inmunitarias antitumorales. Además, se ha demostrado que CCR4 es expresado en tumores malignos hematológicos, incluyendo una alta proporción de linfomas de células T adultas (ATL), y fue un factor pronóstico significativo asociado con la metástasis en la piel [35], [41]. Como tal, CCR4 tiene de interés como diana terapéutica en ATL [37], [42]. La expresión de CCR4 por la leucemia de células T del adulto está asociada con metástasis en la piel; sus ligandos CCL17 y CCL22 son producidos tanto por las células malignas como por el microentorno de tumor de piel [36]. Ishida *et al.* han desarrollado un anticuerpo monoclonal terapéutico anti-CCR4 para el tratamiento de linfoma de células T del adulto que induce la actividad ADCC contra las células tumorales y también puede actuar sobre las células Treg malignas inmunosupresoras encontradas en esta enfermedad [37].

20 El único informe en la bibliografía académica sobre una línea celular de tumor sólido positiva para CCR4 es la línea celular de cáncer de pulmón humano SBC-5 [34]. Estas células migraban hacia gradientes de CCL22 y en xenoinjertos SBC-5 metastásicos en hueso hubo una estrecha localización simultánea de osteoclastos que expresaban CCL22 y células SBC-5 que expresaban CCR4. No hay informes sobre la expresión de CCR4 en células de tumores humanos primarios.

25 El documento WO05106471 (BAYER HEALTH CARE AG) describe métodos de escrutinio para agentes de uso potencial en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades; que consisten específicamente en trastornos cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales y del hígado, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos hematológicos, trastornos por cáncer, trastornos neurológicos, enfermedades respiratorias y trastornos de la reproducción en un mamífero. El método de escrutinio determina el grado de unión, o por lo demás de agentes candidato, a CCR4. También existe una descripción del escrutinio de una amplia gama de células y tejidos humanos para determinar su nivel de expresión de CCR4 con respecto a la expresión de un gen constitutivo. Las células y los tejidos se obtuvieron de fuentes dispares y solo unos pocos aislados fueron células/tejidos cancerosos; p. ej., células de cáncer de tiroides, íleon, HeLa, Jurkat, pulmón y mama. Los resultados de la expresión relativa de CCR4 no muestran ningún patrón distinguible asociado con ninguna enfermedad en particular. De hecho, entre las células tumorales sometidas a ensayo, p. ej., tiroides e íleon, hubo bajos niveles de expresión relativa de CCR4 y otras células no tumorales mostraron mayores niveles de expresión relativa de CCR4.

40 El documento WO 962306 (GLAXO GROUP LIMITED) describe un receptor de quimiocina capaz de unirse a la Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1 (MCP-1/CCL2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP1 α /CCL3) y/o 'RANTES' (Regulador de la Activación de Células t Normalmente Secretadas y Expresadas/CCL5). Se describen una secuencia de nucleótidos y una de aminoácidos para CCR4 (CC-CKR-4/K5.5. K5.5 y CC-CKR-4 son nombres alternativos para CCR4). La expresión de CCR4 se descubrió en un intervalo relativamente limitado de tejidos humanos normales y en una gama de muestras de células T. También existe una descripción general de análisis de escrutinio para agentes capaces de activar los linfocitos T o bloquear la unión de ligandos MCP-1, MIP-1 α y/o RANTES al receptor de quimiocinas. Hay alguna sugerencia de que los agentes activos obtenidos a través de escrutinio pueden ser útiles en el tratamiento de alergias, por ejemplo.

50 El documento WO0041724A1 (LELAN STANFORD/LEUKOSITE) propone la modulación del tráfico de células T de la memoria sistémica por medio de la administración de agentes moduladores de CCR4. Esto está pensado como un tratamiento para enfermedades inflamatorias de la piel. Se utilizan sustancias capaces de modular la unión de CCR4 a sus ligandos en ensayos *in vitro* para demostrar cómo se ve afectada la migración de las células T.

55 Se conocen anticuerpos reactivos contra CCR4. El documento WO0164754 (Kyowa Hakko Kogyo) describe un anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo supuestamente reactivos específicamente con el dominio extracelular de CCR4. También se describe una secuencia de polipéptido de tal anticuerpo. También se describe un anticuerpo que reacciona con una célula positiva para CCR4 y que es citotóxico o provoca la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Estos anticuerpos se proponen para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunitarias mediadas por Th2 o cáncer de la sangre, específicamente leucemia.

60 El documento WO05035582 (Kyowa Hakko Kogyo) describe un anticuerpo capaz de unirse específicamente a CCR4 y también describe un anticuerpo para CCR4 que tiene una glicosilación unida a N compleja en la región Fc. También se describen anticuerpos para los dominios extracelulares de CCR4.

65 El documento WO03018635 (Kyowa Hakko Kogyo) Describe 'anticuerpos y fragmentos injertados con CDR humanas'. Se describe una CDR (región determinante de complementariedad) específica que se une

específicamente a CCR4. Se proponen los anticuerpos para su uso en el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades inmunitarias mediadas por Th2 o cánceres, tales como cánceres de la sangre.

5 El documento WO05053741 (Kyowa Hakko Kogyo) describe un medicamento que comprende un anticuerpo recombinante, que se une específicamente a CCR4, combinado con al menos otro agente. Se propone el anticuerpo para el tratamiento de tumores, específicamente tumores de órganos hematopoyéticos.

10 El documento WO0042074 (MILLENIUM PHARMACEUTICALS) describe anticuerpos para CCR4 y anticuerpos que pueden competir con su unión. No se describen aplicaciones de diagnóstico específicas. Se propone la terapia de trastornos inflamatorios.

También se conoce en la técnica una variedad de moléculas pequeñas que se unen al receptor CCR4.

15 El documento WO04007472 (ONO PHARMACEUTICAL CO.) describe un compuesto tricíclico de molécula pequeña con actividad anti-CCR4.

El documento WO05023771 (ONO PHARMACEUTICAL CO.) describe compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno de molécula pequeña con actividad anti-CCR4.

20 El documento WO02094264 (TULARIK INC.) describe compuestos específicos con actividades inhibitoras de CCR4.

El documento WO023035 (TULARIK/ChemoCentryx) describe diversos compuestos que se unen a CCR4 y sus usos para el tratamiento de diversas enfermedades, pero que no incluyen el cáncer.

25 El documento WO0230357 (CHEMOCENTRYX) describe compuestos que son antagonistas de CCR4. Esta solicitud describe usos para el tratamiento de enfermedades y afecciones inflamatorias.

30 El documento WO051236976 (ASTELLAS PHARMA INC.) describe derivados de quinazolina como reguladores de CCR4.

El documento WO05085212 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) describe derivados de pirimidina como moduladores de CCR4.

35 El documento WO05082865 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) describe derivados de pirimidina bicíclicos fusionados como agentes controladores de la función de CCR4.

El documento WO04108717 (ASTRAZENECA AB) describe compuestos de sulfonamida que modulan la actividad de los receptores de quimiocinas (especialmente CCR4).

40 El documento EP 1633729 (ASTRAZENECA AB) describe compuestos de sulfonamida que modulan la actividad de los receptores de quimiocinas (especialmente CCR4).

45 El documento WO 03014153 (TOPIGEN PHARMACEUTIQUE INC) describe otra tecnología en la técnica, un método de modulación de la infección viral de una célula mediante la modulación de la interacción entre los receptores de quimiocinas (incluidos CCR4) y un virus.

50 El documento WO 2004/045526 (Morehouse School of Medicine) describe anticuerpos para quimiocinas y receptores de quimiocinas concretos y su uso en la inhibición del crecimiento y la metástasis de las células cancerosas. Los anticuerpos se originaron contra receptores de quimiocinas concretos y sus ligandos, que no incluyen CCR4. También se describen los métodos para someter a ensayo la expresión en exceso de quimiocinas concretas en un tumor y la sugerencia de que tales tumores pueden ser tratados por medio de la administración de anticuerpos contra la quimiocina o receptor de quimiocinas expresados en exceso concretos.

55 El documento WO 99/15666 (Icos Corporation) describe secuencias de nucleótidos y secuencias de polipéptidos de una quimiocina CC derivada de macrófagos denominada 'Quimiocina Derivada de Macrófagos' (MDC). MDC aparece como sinónimo de CCL22. TARC aparece como sinónimo de CCL17. Se describen métodos para la producción recombinante o sintética de la proteína MDC o fragmentos de polipéptidos. También se describen anticuerpos reactivos con MDC, así como los análisis para la identificación de moduladores de la actividad de las quimiocinas MDC y TARC.

60 El cáncer de cuello de útero es el segundo tipo más común de cáncer en mujeres en todo el mundo. Los síntomas a menudo están ausentes hasta que el cáncer está en una fase avanzada y por lo tanto el cáncer de cuello de útero, ha sido objeto de un intenso programa de escrutinio poblacional utilizando un frotis de Pap, que puede detectar cambios pre-malignos mediante histopatología. Aunque un frotis de Pao anómalo indica una posible neoplasia cervical, este no es suficiente para el diagnóstico, se lleva a cabo con posterioridad por medio de biopsia y procedimientos invasivos adicionales ('colposcopia'). En total, se ha informado de 24.000 mujeres en el Reino Unido

65

cada año con frotis de Pap anómalos. El frotis de Pap tiene solo 70 % de sensibilidad, por lo tanto, una proporción significativa de las mujeres con cáncer de cuello de útero o lesiones pre-invasivas permanece sin diagnosticar. Por lo tanto, se requieren métodos de escrutinio más precisos para i) permitir que el escrutinio sea más automatizado y menos subjetivo ii) para mejorar la sensibilidad del escrutinio.

5 La Infección por el VPH (Virus del Papiloma Humano) se encuentra en la mayor parte de los carcinomas de cuello de útero invasivos, una estrategia consiste en el escrutinio para determinar de la presencia de marcadores de VPH, tales como E6 y E7 en concierto con el frotis de Pap. Sin embargo, debido al alto nivel de infección por VPH en la población sexualmente activa (hasta 80 % de historiales de infección), esto también da como resultado la
10 identificación de un gran número de falsos positivos y hace que la exactitud de la prueba dependa de la prevalencia del VPH. Como tal, la identificación de nuevos biomarcadores para el cáncer de cuello de útero sigue siendo un área de interés activo.

15 Además se requieren biomarcadores nuevos o alternativos para otras formas de cáncer, incluyendo, pero no limitados a, los siguientes tipos de cáncer: bronquial, nasofaríngeo, de laringe, de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, de piel (p. ej., melanoma o carcinoma de células basales), de cerebro, pancreático, de cuello, de pulmón, de riñón, de hígado, de mama, de colon, de vejiga, de esófago, de estómago, cervical, de ovario, de células germinales y de próstata. Un biomarcador característico de un tipo de cáncer puede ser compartido con otros tipos de cáncer, por lo tanto el uso de un biomarcador puede extenderse más allá del tipo de cáncer original al que se encontró que estaba asociado.

Existe una necesidad de biomarcadores mejorados para una variedad de cánceres que permiten para la estratificación de pacientes que necesitan tratamiento anti-canceroso.

25 La fase de un cáncer es un descriptor (por lo general los números I a IV), de cuánto se ha diseminado el cáncer. La fase a menudo tiene en cuenta el tamaño de un tumor, cuán profundamente ha penetrado, si ha invadido órganos adyacentes, si ha habido metástasis en los ganglios linfáticos y en cuántos, y si se ha propagado a órganos distantes. La estadificación del cáncer es importante porque la fase de diagnóstico es el predictor de supervivencia más potente, y los tratamientos a menudo se cambian basándose en la fase.

30 La estadificación correcta es crítica ya que el tratamiento está directamente relacionado con la fase de la enfermedad. De este modo, una estadificación incorrecta podría conducir a un tratamiento inadecuado, y a una disminución material de la supervivencia del paciente. La estadificación correcta, sin embargo, puede ser difícil de lograr. La estadificación patológica, en la que un patólogo examina secciones de tejido, puede ser particularmente problemática por dos razones específicas: la discreción visual y muestreo aleatorio de los tejidos. "Discreción Visual" significa ser capaz de identificar las células cancerosas individuales entremezcladas con células sanas en una
35 diapositiva. La supervisión de una célula puede significar una estadificación errónea y conducir a una propagación inesperada, grave del cáncer. "Muestreo aleatorio" se refiere al hecho de que las muestras se eligen al azar entre los ganglios linfáticos de los pacientes y se examinan. Si sucede que las células cancerosas presentes en el ganglio linfático no están presentes en las secciones de tejido visualizadas, se puede producir una estadificación incorrecta y un tratamiento inadecuado.

45 Existe una necesidad continua de nuevos tratamientos contra el cáncer, impliquen estos la mejora de las formas de administración de los agentes anticancerosos, o impliquen estos la identificación, el ensayo y la verificación de nuevos agentes anticancerosos eficaces. También existe una necesidad continua de métodos mejorados para la vigilancia de la eficacia de los agentes anticancerosos existentes y cualquiera nuevo en el curso de un régimen de tratamiento dado. Se necesitan métodos mejorados de generación de datos de valor predictivo. La dosificación y frecuencia de tratamientos con agentes anticancerosos es un factor importante. Además, el momento del inicio de un tratamiento anticanceroso con respecto a la fase de progresión de un cáncer, o respecto a un grupo de pacientes, son factores importantes. Se requieren métodos mejorados de control con el fin de buscar tratamientos óptimos para los pacientes, ya sea como individuos o clasificados en grupos, en virtud de las características genéticas, fenotípicas y otras.

55 Un ejemplo de la función de pronóstico de un biomarcador en la elección del tratamiento para un paciente es el uso del fármaco anticanceroso Herceptin® (Trastumuzab). El gen HER2/neu es un proto-oncogén localizado en el brazo largo del cromosoma humano 17 (17q11.2-q12) y la amplificación de HER2/neu se produce en 25-30 % de los cánceres de mama en fase temprana. En el cáncer, las señales que promueven el crecimiento de HER2/neu son transmitidas de forma constitutiva, promoviendo la invasión, la supervivencia y la angiogénesis de las células. Además la expresión en exceso también puede conferir resistencia terapéutica a terapias contra el cáncer.
60 Herceptin® (Trastumuzab) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al segmento extracelular del receptor HER2/neu, (también conocido como ErbB-2) y solo es eficaz en el tratamiento de cáncer de mama, en el que se expresa en exceso el receptor HER2/neu. Debido a su papel pronóstico, así como su capacidad para predecir la respuesta de un paciente a Herceptin®, los tumores de mama se comprueban rutinariamente para determinar la expresión en exceso de HER2/neu por medio de una variedad de técnicas que incluyen
65 inmunohistoquímica (IHC), hibridación in situ cromogénica y fluorescente (CISH y FISH, respectivamente).

También existe la necesidad de métodos más precisos y fiables de diagnóstico/estadificación de los cánceres y la necesidad de nuevos métodos para explorar agentes anticancerosos.

Sumario de la invención

5 Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que en ciertos tumores sólidos, la expresión del receptor de quimiocina CCR4 es un evento temprano en la carcinogénesis. Además los autores de la presente invención han descubierto que la expresión de dos ligandos de CCR4, CCL17 y CCL22, aumenta durante la progresión del tumor.

10 La presente invención proporciona un agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer que tiene un tumor sólido o un tumor no hematológico, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan CCR4 en las que el agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 es:

- 15
- (i) un anticuerpo que se une con CCR4;
 - (ii) un anticuerpo que se une con ligandos de CCR4 CCL17 o CCL22; o
 - (iii) un antagonista de CCR4.

20 Se desvela un método de obtención de información de carácter predictivo o diagnóstico para un paciente de cáncer, que comprende la etapa de medir la cantidad y/o la actividad del receptor de quimiocina CCR4 expresado por las células tumorales en una muestra de tumor sólido o en una muestra de tumor celular no hematológico tomada del paciente, proporcionando la cantidad y/o la actividad de CCR4 la información de carácter predictivo o diagnóstico.

25 Los tumores hematológicos derivan de células sanguíneas, incluyendo las células inmunitarias e incluyen leucemias y linfomas de varios tipos. La invención, no está relacionada por tanto con los tumores hematológicos.

30 En los tumores sólidos o no hematológicos con los que tiene que ver la invención, CCR4 es expresado por las células del tumor. Los métodos desvelados en el presente documento y los usos de la invención tienen que ver por tanto con CCR4 expresado por muestras de las células tumorales del paciente (o células de referencia) y sustancialmente no por células del sistema inmunitario. En la medida en la que CCR4 se origina en cualquiera de las muestras tumorales de patentes a partir de una fuente no deseada, tal como células inmunitarias infiltrantes, la cantidad y/o actividad de CCR4 que se está midiendo de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento es o bien no significativa o bien está controlada para cualquiera de las mediciones que se está realizando.

35 La cantidad y/o nivel de actividad de referencia de CCR4 se pueden medir en una o más muestras no tumorales. Se puede tomar del paciente la, o al menos una, muestra no tumoral. Cuando se determinan una cantidad y/o nivel de actividad de referencia de CCR4 a partir de células no tumorales del paciente, se puede tomar del paciente una sola muestra de tejido no tumoral. Si se desea, se pueden tomar múltiples muestras no tumorales de diferentes localizaciones del mismo paciente. La cantidad de referencia, puede ser por lo tanto una cifra media determinada a partir de varias muestras tomadas del paciente.

40 Las una o más muestras no tumorales no se toman opcionalmente del paciente. Tales muestras se pueden tomar de otros pacientes y pueden incluir líneas de células tumorales cultivadas.

45 La información se puede utilizar para pronosticar si el tumor sólido o el tumor celular no hematológico del paciente serán susceptibles a un tratamiento anticanceroso. Esto permite ventajosamente la estratificación de los pacientes de cáncer. Esto permite identificar un tratamiento o régimen contra el cáncer óptimos para un paciente individual dado.

50 En situaciones preferidas, el paciente recibirá un tratamiento anticanceroso y las mediciones de la cantidad y/o la actividad de CCR4 en la muestra de tumor sólido o la muestra de tumor no hematológico del paciente se pueden realizar antes y después del inicio del tratamiento, y la información obtenida se utiliza a continuación para determinar si el tumor sólido o el tumor celular no hematológico del paciente ha respondido al tratamiento contra el cáncer. Esto permite ventajosamente el seguimiento de los pacientes de cáncer para determinar cómo está progresando su tratamiento individual. Los ajustes del régimen de tratamiento se pueden realizar a la luz del progreso que está teniendo lugar.

55 La información se puede utilizar en el diagnóstico o estadificación de un tumor sólido o de un tumor celular no hematológico.

60 También se desvela un método para obtener información de carácter predictivo o diagnóstico para un paciente con cáncer cuyas células tumorales expresan el receptor de quimiocina CCR4, que comprende la etapa de medir la cantidad y/o actividad del ligando de CCR4 CCL17 y/o CCL22 en una muestra tumor sólido o en una muestra de tumor celular no hematológico tomada del paciente, proporcionando la cantidad y/o actividad de CCL17 y/o CCL22 la

información de carácter predictivo o de diagnóstico.

El agente se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones suspensiones, y emulsiones estériles, acuosas o no acuosas. Las composiciones pueden comprender además agentes coadyuvantes o excipientes, como se conoce en la técnica, véanse, p. ej., Berkow *et al.*, The Merck Manual, 16^a edición Merck & Co., Rahmān, NJ (1992), Avery's Drug_Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3^a edición, ADIS Press, Ltd., Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1987) & Osol (ed.), Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980). Las composiciones farmacéuticas administradas de acuerdo con la invención se presentan preferiblemente en forma de dosis individuales (dosis unitarias).

Una composición o medicamento empleados en los métodos y usos de la invención pueden comprender adicionalmente sales, tampones, u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición. La administración de la composición o el medicamento de acuerdo con la invención puede ser local o sistémica.

La invención también incluye el uso de un agente inhibidor de receptor de quimiocina CCR4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de tumores sólidos o tumores no hematológicos, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan CCR4 en las que el agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 es:

- (i) un anticuerpo que se une con CCR4;
- (ii) un anticuerpo que se une con ligandos de CCR4 CCL17 o CCL22; o
- (iii) un antagonista de CCR4.

En todos los aspectos de uso anteriormente mencionados de la invención, el agente que modula o inhibe la expresión o actividad de CCR4 puede ser preferentemente:

- (i) un anticuerpo anti-CCR4 como se describe en cualquiera de los documentos WO0041724, WO0164754, WO05035582, WO03018635, WO05053741, WO0042074; o
- (ii) anticuerpos anti-CCL17 o anti-CCL22 como se describe en el documento WO 99/15666 o Ishida, T., *et al* (2004) Clin Cancer Res 10:7529-7539; o
- (iii) un antagonista de CCR4 como se describe en cualquiera de los documentos WO04007472, WO05023771, WO02094264, WO0230358, WO0230357, WO051236976, WO05085212, WO05082865, WO04108717, EP 1633729, WO03014153.

Las composiciones y formulaciones adecuadas de agentes activos incluyen las descritas en las publicaciones anteriormente mencionadas.

La invención también incluye un método de exploración para un agente anticanceroso activo contra un tumor sólido o un tumor no hematológico, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan el receptor de quimiocina CCR4, que comprende las etapas de:

- i) proporcionar células de ensayo que expresan CCR4 y son capaces de, o están en el proceso de, mostrar una actividad biológica seleccionada de (a) proliferación, (b) migración, (c) secreción de una proteína o una molécula de señalización o (d) supervivencia celular cuando se cultivan en condiciones específicas;
- ii) exponer las células de ensayo a un agente candidato durante un periodo de tiempo;
- iii) medir la actividad biológica de las células de ensayo, por la que la ausencia de actividad biológica o actividad biológica que es menor que la actividad esperada de dichas células de ensayo en ausencia de agente candidato identifica un agente anticanceroso.

En métodos preferidos, una alícuota de control de células de ensayo no se expone al agente candidato y se mide la actividad biológica de las células de control de modo que se determine la actividad biológica esperada.

La actividad biológica de las células de ensayo y cualquier célula de control puede inducirse mediante la adición de un ligando del receptor CCR4, preferentemente CCL17 y/o CCL22.

En todos los aspectos de la invención, el tumor sólido o el tumor no hematológico puede ser un cáncer seleccionado entre cáncer de cuello del útero, esófago, riñón, cerebro, mama, ovario, próstata, estómago o páncreas. La invención puede tener una ventaja concreta en relación con los cánceres de cuello de útero, esófago, riñón, cerebro, mama y ovario.

También se desvela un método para determinar si un paciente con cáncer es adecuado para el tratamiento con un agente que modula la expresión de CCR4 y/o la actividad de CCR4, que comprende la determinación de la cantidad o la actividad de CCR4 en una muestra de células tumorales del paciente.

- 5 La idoneidad de un paciente de cáncer para el tratamiento con un agente terapéutico concreto se rige por una multiplicidad de factores, algunos relacionados entre sí. La edad del paciente, el sexo, la fase del cáncer, el tipo de cáncer, la constitución genética del paciente, los factores de estilo de vida, tales como la dieta o el hábito de fumar, pueden afectar todos al resultado potencial de un régimen de tratamiento dado. La estratificación se realiza por lo general con el fin de agrupar los pacientes basándose en una multiplicidad de parámetros seleccionados que pueda permitir realizar predicciones en términos de resultado clínico para un grupo de pacientes o un paciente individual que entre dentro de un grupo.
- 10 En general, un aumento del nivel o actividad de CCR4, y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 en una muestra de tumor del paciente es indicativo de un paciente para el cual resulta beneficioso el tratamiento con los agentes anti-cancerosos descritos en la presente memoria.
- 15 También se desvela un método para controlar la eficacia de un tratamiento anticanceroso en un paciente que comprende determinar la cantidad o actividad de CCR4 en una muestra de células tumorales del paciente.
- También se desvela un método para controlar la eficacia de un tratamiento anticanceroso en un paciente que comprende determinar la cantidad o actividad de CCL17 y/o CCL22 en una muestra de células tumorales del paciente.
- 20 En los métodos antes mencionados, la toma de muestras de células tumorales puede tener lugar antes, durante y/o después de que se administre el agente anticanceroso.
- 25 En todos los métodos y usos de la invención se hayan definido o descrito aquí anteriormente o en lo sucesivo, los tipos de cáncer son aquellos que dan lugar a tumores sólidos. El cáncer es también preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer bronquial, nasofaríngeo, de laringe, de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, de piel (p. ej., melanoma o carcinoma de células basales), de cerebro, de páncreas, de cuello, de pulmón, de riñón, de hígado, de mama, de colon, de vejiga, de esófago, de estómago, de cuello de útero, de ovario, de células germinales y de próstata. Más preferiblemente, los cánceres son cánceres de cuello de útero, de esófago, de riñón, de cerebro, de mama y de ovario.
- 30 En otras realizaciones, el cáncer puede ser un carcinoma, preferiblemente un carcinoma de células escamosas (SCC) o un adenocarcinoma, preferiblemente seleccionado entre los cánceres del cuello de útero, de esófago, de riñón, de cerebro, de mama y de ovario.
- 35 Se puede determinar el nivel de CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 producido en células no tumorales y comparar el nivel en células tumorales y no tumorales.
- 40 El nivel de CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 en las células tumorales se puede comparar con niveles predeterminados. Los niveles predeterminados pueden derivar de tejido no canceroso normal, tejido canceroso de una fase anterior, de datos obtenidos de bases de datos o directamente de material o muestras biológicas disponibles.
- 45 Se pueden emplear varias maneras para determinar el nivel de CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22. Preferiblemente, el nivel de proteína y/o actividad de CCR4 y/o CCL17 y/o CCL22 se pueden utilizar como una medida de los productos génicos de CCR4 y/o CCL17 y/o CCL22 en la muestra.
- 50 El nivel de proteína de CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 se puede medir utilizando un anticuerpo reactivo contra CCR4, CCL17 y CCL22 respectivamente, preferiblemente un anticuerpo específico, p. ej. un anticuerpo monoclonal.
- 55 La ubicación y la cantidad de las proteínas específicas se pueden detectar por medio de microscopía y técnicas histológicas. Utilizando mecanismos de preparación, tinción y sondeo de la muestra bien conocidos en la técnica, se puede mostrar la estructura de las células y se pueden detectar las proteínas específicas asociadas con ellas y su ubicación dentro de la muestra encontrada.
- 60 Las tinciones histoquímicas son bien conocidas en la técnica y se pueden utilizar para mostrar la morfología de la célula y/o componentes celulares más específicos. Las tinciones comúnmente utilizadas incluyen hematoxilina (que tiñe los ácidos nucleicos y el ergastoplasma, de color azul) y la eosina (que tiñe las fibras elásticas y reticulares, de color rosa).
- 65 La inmunohistoquímica es una técnica mediante la cual se utilizan anticuerpos para proteínas específicas para la detección de dichas proteínas en las muestras. La unión del anticuerpo al antígeno en la muestra se puede detectar de varias maneras.
- El método más convencional consiste en conjugar una enzima que cataliza una reacción de cambio de color (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) con el anticuerpo, de ese modo el uso de un sustrato cromogénico

- adecuado permite la visualización de la localización del antígeno bajo el microscopio óptico. Una variación sobre este método es la inmunofluorescencia por medio de la cual el anticuerpo se conjuga con un fluoróforo (p. ej., FITC, rodamina, Rojo Texas) que emite una señal detectable cuando es excitado por una fuente adecuada de energía. Normalmente esta es luz de una longitud de onda específica. La inmunofluorescencia es ventajosa debido a que el uso de múltiples fluoróforos unidos a diferentes anticuerpos permite la detección de múltiples dianas dentro de una muestra y es particularmente adecuado para la microscopía de barrido láser confocal, que es altamente sensible y también se puede utilizar para visualizar las interacciones entre múltiples proteínas. A menudo, la detección del antígeno específico se lleva a cabo por medio de un método indirecto, de múltiples fases. Se utiliza un anticuerpo "primario" no marcado o no conjugado, originado contra el antígeno está siendo sometido a ensayo para unir dicho antígeno. Este anticuerpo "primario" puede ser detectado a continuación por un anticuerpo "secundario" conjugado con un marcador detectable y originado de manera que reaccionará con la inmunoglobulina de la especie que originó el anticuerpo "primario".
- La medición de los niveles de proteína utilizando anticuerpos puede emplear técnicas tales como ELISA (análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoanálisis), EMIT (Técnica de Inmunoensayo Enzimático Múltiple), análisis de micromatrices de proteínas, citometría de flujo, transferencia Western, transferencia puntual o transferencia en ranura, preferentemente la metodología es cuantitativa.
- La citometría de flujo es una técnica para contar, examinar, y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de las células individuales que fluyen a través de un aparato de detección óptica y/o electrónica.
- La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es un tipo especializado de la citometría de flujo. Proporciona un método para la clasificación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula cada vez, basándose en las características de dispersión de luz y fluorescencia específicas de cada célula. Es un instrumento científico útil, ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de las señales fluorescentes procedentes de células individuales, así como la separación física de las células de interés particular.
- La población de células en una muestra es normalmente heterogénea. Con el fin de detectar las diferencias entre las células, estas se tratan con técnicas químicas e inmunoquímicas similares a las de la histoquímica. La detección inmunoquímica de antígenos se puede realizar utilizando anticuerpos marcados con fluoróforos tales como FITC, Cy5 y GFP. La tinción de las células con colorantes (como los colorantes de unión a ADN SYBR-Green y DAPI) se puede utilizar para detectar diferencias tales como el tamaño celular o fase del ciclo celular dentro de y entre las muestras. La utilización de estas técnicas combinadas permite asignar perfiles de fluorescencia específicos a diferentes células dentro de la heterogeneidad que se pueden distinguir mediante el citómetro de flujo. De esta manera se pueden detectar células que expresan antígenos concretos o asociados a perfiles de dispersión de luz concretos y medir su prevalencia dentro de la población de la muestra.
- Como alternativa, el nivel de CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 se puede determinar midiendo el nivel de ARNm que codifica CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 como una medida del nivel de los productos génicos de CCR4 y/o CCL17 y/o CCL22 en la muestra.
- El nivel de ARNm se puede medir por medio de un método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR), preferiblemente un método de qPCR donde el molde es el producto de una reacción con transcriptasa inversa (RT-qPCR).
- El ARNm se puede extraer de la muestra y someterse a transcripción inversa para producir ADNc antes de la qPCR.
- El nivel de transcripción de CCR4 y opcionalmente además CCL17 y/o CCL22 se puede medir utilizando un análisis de protección de nucleasa, preferiblemente la sonda utilizada es específica para CCR4 y/o CCL17 y/o CCL22.
- El nivel de ARNm se puede medir utilizando una micromatriz de ADN.
- Una micromatriz de ADN (también conocida como gen o chip de genoma, chip de ADN, o la matriz génica) es una colección de puntos de ADN microscópicos, que representan comúnmente genes individuales, dispuestos sobre una superficie sólida mediante unión covalente a matrices químicamente adecuadas. Las mediciones cualitativas o cuantitativas con micromatrices de ADN utilizan la naturaleza selectiva de la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN en condiciones muy rigurosas. La detección basada en fluoróforos se puede utilizar para determinar el grado de hibridación a partir del cual se puede calcular una medición cuantitativa.
- En realizaciones preferidas, el cáncer es un cáncer maligno. Como alternativa, el cáncer puede ser un cáncer de premaligno. El método desvelado en el presente documento puede identificar de forma ventajosa la fase hasta la cual ha progresado el cáncer en un paciente, permitiendo de este modo la identificación del curso de tratamiento más apropiado.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona el uso de un agente inhibidor de receptor de quimiocina CCR4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de tumores sólidos o tumores no hematológicos, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan CCR4 en las que el agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 es:

- 5
- (i) un anticuerpo que se une con CCR4;
 - (ii) un anticuerpo que se une con ligandos de CCR4 CCL17 o CCL22; o
 - (iii) un antagonista de CCR4.

10 En una realización preferida, el medicamento comprende un anticuerpo específico para CCR4 y puede ser un anticuerpo monoclonal.

En una realización preferida adicional, el medicamento comprende un anticuerpo específico para CCL17 y puede ser un anticuerpo monoclonal.

15 En una realización preferida adicional, el medicamento comprende un anticuerpo específico para CCL22 y puede ser un anticuerpo monoclonal.

20 En otra realización el medicamento comprende un anticuerpo que puede ser un fragmento Fab en el que dicho fragmento Fab se puede seleccionar del grupo que consiste en: fragmentos scFv, F(ab')₂, Fab, Fv y Fd, o regiones CDR3.

25 El fragmento de unión a antígeno (fragmento Fab) es una región de un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Estos dominios conforman el paratopo - el sitio de unión al antígeno - en el extremo amino terminal del monómero. Los dos dominios variables se unen al epítipo en sus antígenos específicos.

30 Se pueden generar fragmentos Fc y Fab. Se puede utilizar la enzima papaína para escindir un monómero de inmunoglobulina en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. La enzima pepsina escinde por debajo de la región bisagra, de manera que se puede formar un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fc. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se pueden fusionar entre sí para formar un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), que tiene solo la mitad del tamaño del fragmento Fab aunque conserva la especificidad original de la inmunoglobulina parental.

35 Una región determinante de la complementariedad (CDR) es una secuencia corta de aminoácidos que se encuentra en los dominios variables de las proteínas receptoras de antígenos (p. ej., inmunoglobulina y receptor de células T), que complementa un antígeno y por lo tanto proporciona al receptor su especificidad para ese antígeno concreto. La mayor parte de la variación de secuencia asociada con las inmunoglobulinas y los receptores de células T se encuentra en las regiones CDR, estas regiones son referidas a veces dominios hipervariables. Entre estos, CDR3 muestra la mayor variabilidad, ya que está codificada por una recombinación de las regiones VJ.

40 En otra realización, el medicamento comprende anticuerpos que pueden ser anticuerpos humanizados o quiméricos.

45 Los anticuerpos humanizados o los anticuerpos quiméricos son un tipo de anticuerpo monoclonal que se sintetizan utilizando la tecnología de ARN recombinante para eludir el problema clínico de la respuesta inmunitaria a los antígenos foráneos. El procedimiento convencional de la producción de anticuerpos monoclonales produce anticuerpos de ratón. Aunque los anticuerpos murinos son muy similares a los anticuerpos humanos las diferencias son lo suficientemente significativas para que el sistema inmunitario humano reconozca los anticuerpos de ratón como foráneos, eliminándolos rápidamente de la circulación y ocasionando efectos inflamatorios sistémicos.

50 Los anticuerpos humanizados se pueden producir mediante la fusión del ADN que codifica la porción de unión de un anticuerpo monoclonal de ratón con el ADN productor de anticuerpo humano. A continuación se utilizan cultivos de células de mamíferos para expresar este ADN y producir estos anticuerpos con parte de ratón y parte humana que no son tan inmunogénico como la variedad puramente murina.

55 Se pueden realizar modificaciones en los anticuerpos monoclonales que se unen solamente a los antígenos específicos de la célula y preferiblemente inducen una respuesta inmunológica contra las células cancerosas diana. Tales anticuerpos monoclonales se modifican preferiblemente para la liberación de una toxina, radioisótopo, citocina u otro producto conjugado activo.

60 En otro aspecto de la tecnología de anticuerpos, se pueden diseñar anticuerpos biespecíficos que se pueden unir con sus regiones Fab tanto al antígeno diana como a un producto conjugado o célula efectora. Asimismo, todos los anticuerpos intactos se pueden unirse a los receptores celulares u otras proteínas con su región Fc.

65 La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes también puede implicar tecnologías, referidas como clonación de repertorios o presentación en fagos/presentación en levadura. Estas pueden implicar el uso de virus o

levaduras para crear anticuerpos, en lugar de los ratones. Estas técnicas se basan en la rápida clonación de segmentos de genes de inmunoglobulina para crear bibliotecas de anticuerpos con secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes a partir de las cuales se pueden seleccionar anticuerpos con las especificidades deseadas. Este proceso se puede utilizar para mejorar la especificidad con la cual los anticuerpos reconocen a los antígenos, alterar su estabilidad en diversas condiciones ambientales, aumentar su eficacia terapéutica, y modular su detectabilidad en aplicaciones de diagnóstico.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de exploración para un agente anticanceroso activo contra un tumor sólido o un tumor no hematológico, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan el CCR4, que comprende las etapas de:

- i) proporcionar células de ensayo que expresan CCR4 y son capaces de, o están en el proceso de, mostrar una actividad biológica seleccionada de (a) proliferación, (b) migración, (c) secreción de una proteína o una molécula de señalización o (d) supervivencia celular cuando se cultivan en condiciones específicas;
- ii) exponer las células de ensayo a un agente candidato durante un periodo de tiempo;
- iii) medir la actividad biológica de las células de ensayo, por la que la ausencia de actividad biológica o actividad biológica que es menor que la actividad esperada de dichas células de ensayo en ausencia de agente candidato identifica un agente anticanceroso.

En ciertas realizaciones preferidas, se induce que las células de ensayo proliferen, preferentemente antes de exposición al agente candidato.

En otras realizaciones preferidas, se induce que las células de ensayo proliferen mediante la adición de un ligando del receptor CCR4.

En realizaciones preferidas, la proteína secretada o molécula de señalización es una citocina o quimiocina.

En otras realizaciones preferidas, el nivel de la proteína secretada o molécula de señalización se mide en cualquier momento antes, durante o después de exposición de las células de ensayo al agente candidato.

En ciertas realizaciones preferidas, se induce que las células de ensayo secreten una proteína particular, u otra molécula de señalización, preferentemente una quimiocina o citocina, preferentemente antes de exposición al agente candidato.

En otras realizaciones preferidas, se induce que las células de ensayo secreten una proteína particular, u otra molécula de señalización, preferentemente una quimiocina o citocina, mediante la adición de un ligando del receptor CCR4.

La quimiotaxis es el fenómeno en el que las células corporales, bacterias y otros organismos unicelulares o multicelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con ciertos productos químicos en su ambiente. Esto es importante para que las bacterias encuentren alimento (por ejemplo, glucosa) nadando hacia la mayor concentración de moléculas alimentarias, o huyan de venenos (por ejemplo, fenol). En organismos multicelulares, la quimiotaxis y la migración celular son críticas para el desarrollo así como para la función normal. Además, se conoce en la técnica que mecanismos que permiten la quimiotaxis y migración celular en animales pueden subvertirse durante la metástasis de cáncer.

La quimiotaxis se denomina positiva si el movimiento es en la dirección de una concentración mayor del producto químico en cuestión y negativa si la dirección es la opuesta.

En haptotaxis el gradiente del quimioatrayente se expresa o se une en una superficie, a diferencia de la forma clásica de quimiotaxis cuando el gradiente se desarrolla en un espacio soluble.

La necrotaxis encarna un tipo de quimiotaxis cuando las moléculas quimioatrayentes se liberan de células necróticas o apoptóticas. Dependiendo del carácter químico de las sustancias liberadas, la necrotaxis puede acumular o repeler células, lo que subraya la significación patofisiológica de este fenómeno.

En ciertas realizaciones preferidas, se induce que las células de ensayo migren, preferentemente antes de exposición al agente candidato.

En otras realizaciones preferidas, se induce que las células de ensayo migren mediante la adición de un ligando del receptor CCR4.

Los ensayos de migración celular e invasión celular miden la capacidad de ciertos tipos celulares para moverse a través de una membrana porosa o matriz hacia un factor quimioatrayente o de crecimiento. La migración e invasión celular pueden ser procesos críticos en la angiogénesis y metástasis tumoral. La invasión celular puede medirse en

una o más dimensiones usando condiciones de cultivo adecuadas y una matriz porosa adecuada para que las células la atraviesen.

5 De acuerdo con métodos de exploración preferidos, la invasión celular puede medirse preferentemente usando una cámara de matrigel Boyden.

En aspectos del método de la invención definidos en el presente documento el ligando puede ser CCL17 y/o el ligando puede ser CCL22.

10 En realizaciones o métodos de exploración preferidos para agentes anticancerosos, las células de ensayo o células cancerosas tienen capacidad de, o están en el proceso de, proliferación. En métodos de exploración para agentes anticancerosos, la célula o las células pueden ser de una muestra de biopsia tumoral o pueden ser células de cáncer del cuello uterino, por ejemplo C-41 (ATCC, Rockville MD, Estados Unidos) u otra línea celular que expresa de forma endógena CCR4.

15 La invención se describirá ahora en detalle, incluyendo a modo de experimentación ejemplos y con referencia a los dibujos en los que:

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1 - La expresión del ARNm de CCR4 se incrementa en biopsias de cuello de útero malignas en comparación con tejidos normales.

25 (A) Resumen del porcentaje de muestras que expresan ARNm del receptor de quimiocinas CC y CXC en tejido de cuello de útero no neoplásico (barras de color blanco) y maligno (barras de color negro) después del análisis de protección de ribonucleasa (RPA) para la expresión de ARNm.

(B) RPA de muestras de tejido no neoplásico 1 a 14 y tejidos malignos: Biopsias de adenocarcinoma, muestras 1 a 4 y biopsias de carcinoma de células escamosas (SCC), muestras 1 a 11. Las fases de los tejidos de adenocarcinoma fueron: 1 a 3, 1B1; 4, 1B2. Las fases de SCC fueron: 1, 1A2; 2 a 8-11, 1B1; 9, 1B2 y 10, 2A.

30 (C) Regulación al alza de la expresión del gen de CCR4 en compartimentos epiteliales y estromales cuando se comparan con sus contrapartes no neoplásicas. La expresión de ARNm en el tejido de cuello de útero no neoplásico se utilizó como un punto de partida para comparar el ARNm de tejido maligno y se representa como valor "1".

35 Figura 2 - Inmunohistoquímica para CCR4 durante la progresión maligno de cuello de útero. Expresión de la proteína CCR4 en el estroma de (A) tejido de cuello de útero no neoplásico, 200x, (B) CIN 200x; (C) tejido de cuello de útero invasivo, 200x. Expresión de la proteína CD68+ en (D) normal, 400x; (E) CIN, 200x; y (F) cáncer de cuello de útero invasivo, 400x. tinción de proteínas FoxP3+ en (G) del tejido de cuello de útero no neoplásico, 200x; (H) CIN, 400x; e (I) cáncer de cuello de útero invasivo, 400x. Expresión de proteína CCR4 epitelial en (J) no neoplásico, 200x; (K) CIN, 400x y (L) cáncer de cuello de útero invasivo, 400x.

40 Figura 3 - Puntuación inmunohistoquímica para células positivas para CCR4, CD68 y FoxP3 durante la progresión maligna del cuello de útero

45 (A) Puntuación total para la tinción de células epiteliales (barras de color negro) y células del estroma (barras de color blanco) para CCR4, calculada por la "positividad" X "intensidad" en normal (n = 23), CIN (n = 63) y SCC (n = 45), cáncer recurrente (n = 15), metástasis de ganglios linfáticos (n = 10) y adenocarcinoma (n = 10). (B) Puntuación media de CD68+ (+ET) de la infiltración intra- y peritumoral de macrófagos en normal (n = 11), CIN (n = 16), adenocarcinomas (n = 16), cáncer recurrente (n = 24) y depósitos metastásicos en ganglios linfáticos (n = 11); **p < 0,001, *p < 0,005. (C) Puntuación media para FoxP3 + (+ET) de la infiltración intra- y peritumoral de células Treg en normal (n = 11), CIN (n = 16), SCC (n = 44), adenocarcinomas (n = 16), cánceres recurrentes (n = 24) y depósitos metastásicos en ganglios linfáticos (n = 11), *p < 0,01. (D) Puntuación total para CCR4 en células epiteliales (barras de color negro) y células del estroma (barras de color blanco) calculada por "positividad" X "intensidad" en CIN I (n = 26), CIN II (n = 19) y CIN III (n = 17).

55 Figura 4 - Expresión de ARNm y proteína del ligando de CCR4 CCL22 en cuello de útero normal, CIN y SCC

60 (A) Niveles de expresión de ARNm de CCL22 evaluados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real en biopsias de cuello uterino normales (n = 14) y SCC (n = 11) (P = 0,43). Expresión de la proteína CCL22 en (B) tejidos normales no neoplásico, 200x; (C) CIN, 200x y (D) SCC, 200x. (E) Puntuación total de CCL22 de células epiteliales (barras de color negro) y células del estroma (barras de color blanco) calculada mediante "Positividad X Intensidad" en muestras del cuello de útero normal (n = 16), CIN (n = 17), SCC (n = 19) y adenocarcinomas (n = 5).

65 Figura 5 - Expresión ARNm y proteína del ligando de CCR4 CCL17 en cuello de útero normal, CIN y SCC

(A) Niveles de expresión de ARNm de CCL17 evaluados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real en biopsias de cuello de útero normal (n = 7), en comparación con SCC (n = 11) (P = 0,02). Expresión de la proteína

CCL17 en (B) no neoplásico, 200x; (C) CIN, 200x y (D) SCC, 200x.

(E) Puntuación total CCL17 de células epiteliales (barras de color negro) y células del estroma (barras de color blanco) calculada mediante "positividad X intensidad" en muestras del cuello de útero normal (n = 21), CIN (n = 33), SCC (n = 20) y adenocarcinomas (n = 4).

5
 10
 15
 20
 25

Figura 6 - CCR4 es funcional en la línea celular de cáncer de cuello de útero C-41
 (A) Se midió la expresión de las proteínas CCR4, CCL17 y CCL22 (líneas de color azul) en la línea celular de cáncer de cuello de útero C-41 mediante el uso de citometría de flujo. Se examinó la expresión/internalización de CCR4 por C-41 después de la estimulación con 100 ng/ml de (B) CCL17 y (C) CCL22 (la línea de color azul representa el control de CCR4 a los 0 minutos; la línea de color naranja indica la expresión de la proteína CCR4 después de la estimulación con el ligando apropiado). (D) Migración de células de cáncer de cuello de útero C-41 en respuesta a CCL17 y CCL22. Los valores son la media \pm DT de 10 determinaciones, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (E y F) crecimiento de C-41 en condiciones subóptimas después de la estimulación con 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml de CCL17 y CCL22 durante 2, 4 y 6 días. Después de 6 días C-41 mostró un aumento significativo del crecimiento después de la estimulación con 10 ng/ml de CCL17; ($P = 0,017$) y 100 ng/ml de CCL17 ($P = 0,044$), pero no con 1 ng/ml de CCL17 ($P = 0,383$). La estimulación con 1 ng/ml de CCL22 y 100 ng/ml de CCL22 también mostró aumento significativo del crecimiento: 1 ng/ml de CCL22; ($P = 0,026$) y 100 ng/ml de CCL22 ($p = 0,043$), pero no con 10 ng/ml de CCL22 ($P = 0,195$).

30
 35

Figura 7 - Expresión de CCR4 en carcinogénesis de esófago
 Expresión de CCR4 en células epiteliales normales (A, x40, D, x40), hiperplásicas (B, x100), displásicas (C, x40, D, x40) de esófago y células cancerosas invasivas (H, x200). Expresión CCR4 en el estroma durante la carcinogénesis de esófago: E, esófago normal (x200); F, displasia I (x200); G, displasia III (x200); H, cáncer invasivo (x200).

40
 45

Figura 8 - Resultados de la puntuación inmunohistoquímica de células del estroma positivas para CCR4 durante la progresión maligna del cuello de útero
 La puntuación se evaluó mediante el número de células positivas para CCR4 y mediante la intensidad de la tinción de CCR4. El número de células se midió como la media de 15 HPF: 0 = sin expresión de proteína CCR4; +1 = 1-10 células positivas para CCR4 por HPF; +2 = 10-20 células positivas por HPF; +3 (21-30 células por HPF); +4 (>30 células). La intensidad se midió como: 0 = sin expresión; 1+ = expresión leve, 2++ = expresión moderada; 3+++ = expresión fuerte.

50
 55

Figura 9 - Resultados de puntuación inmunohistoquímica de células epiteliales positivas para CCR4 durante la progresión maligna del cuello de útero
 La puntuación se evaluó mediante el número de células positivas para CCR4 y mediante la intensidad de la tinción de CCR4. 0 = sin expresión de la proteína CCR4 en las células epiteliales; +1 = menos de 25 % de la sección tiene expresión de CCR4; +2 = 26-50 % de células positivas; +3 = 51-75 % de células positivas; +4 más de 76 % de células positivas para CCR4. La intensidad se mide como: 0 = sin expresión; 1+ = expresión leve, 2++ = expresión moderada; 3+++ = expresión fuerte.

60
 65

Figura 10 - Resultados del escrutinio para determinar la expresión de CCR4 en una gama más amplia de tumores utilizando una biblioteca de ADNc derivada de tejidos humanos (Cancer Research UK). La biblioteca contiene ADNc generado a partir de ARN aislado de 5-10 muestras tumorales y 2-5 muestras normales de 11 tipos de tumores diferentes: de pulmón, colon, vejiga, estómago, páncreas, piel, mama, cerebro, esófago, ovario y próstata. Los niveles de expresión de ARNm de CCR4 se midieron utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis FACS para la expresión de CCR4 en líneas de células de cuello de útero (C41, C33A) y líneas celulares de cáncer renal (786, A498, CAKI). Línea discontinua: anticuerpo control de isotipo coincidente; línea de color gris: expresión de CCR4.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis FACS de la expresión de CCR4 en células C41 después de 24 h de estimulación con IL-10, TGF- β y FGF. Línea discontinua: control de isotipo; línea de color gris: expresión de CCR4; línea en negrita: expresión de CCR4 después de la estimulación de citocinas.

La Figura 13 muestra una secuencia de ADNc de CCR4. Este es el SEQ ID NO: 1 referido en la presente memoria.

60 Descripción Detallada de la Invención

65 Los autores de la presente invención han descubierto que la expresión del receptor de quimiocinas CCR4 es un evento temprano en la carcinogénesis en ciertos tipos de tumores. La expresión epitelial de un receptor para las quimiocinas homeostáticas generalmente presentes en un tejido puede conferir una ventaja de supervivencia en la célula iniciada.

El receptor de quimiocinas CCR4 estuvo presente en las lesiones no invasivas displásicas del cuello de útero y el esófago. Esto fue particularmente sorprendente en algunas de las muestras de cáncer de esófago donde las zonas displásicas positivas para CCR4 se observaron claramente adyacentes a las zonas epiteliales normales en la misma sección (p. ej., Figura 7C y D).

El receptor de quimiocina CCR4 aumentó con la progresión maligna del cuello de útero. Esto no solamente se debió al aumento de la infiltración de macrófagos positivos para CCR4 y las células Treg, sino también a la adquisición de la expresión de CCR4 por las células epiteliales. Un hallazgo inesperado fue que CCR4 se expresaba fuertemente en células epiteliales no invasivas en lesiones intraepiteliales (CIN) así como en células cancerosas invasivas. La progresión de CIN a enfermedad invasiva se asoció con un aumento de expresión en células del estroma de los ligandos de CCR4 CCL17 y 22 y estas quimiocinas estimularon el crecimiento y la migración de una línea celular de cáncer de cuello de útero positiva para CCR4 (p. ej., Figura 4 y Figura 6). También se detectó CCR4 en células displásicas así como epiteliales invasivas en el cáncer de esófago, de nuevo con aumento de los niveles de CCL17 y CCL22 durante la progresión maligna. Los cambios en los gradientes de CCL17 y 22 ayudan a la transición de enfermedad pre-invasiva a invasiva y atraen leucocitos promotores de tumores que ayudan a las células iniciadas a evadir la vigilancia inmunitaria.

Las dos quimiocinas de unión a CCR4, CCL17 y CCL22, también se encontraron en la superficie de los vasos sanguíneos y linfáticos en las biopsias de tumores. No fue posible cuantificar esto, pero observaciones preliminares indican un aumento en la intensidad de la tinción con la progresión maligna.

Otro elemento del sistema de CCR4 es el receptor D6 de quimiocinas no señalizador que tiene una alta afinidad para CCL17 y CCL22 [18]; se esperaría que su presencia en los tejidos influyera en los gradientes de estas quimiocinas [19].

La Figura 6 muestra que el receptor CCR4 es funcional en la línea celular de cáncer de cuello de útero C-41. CCR4 puede ser regulado al alza por el microambiente. Las células positivas y negativas para CCR4 se expusieron a varias citocinas (TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-4 e IL-10) que se sabe que están presentes en el microambiente cervical y para las cuales era probable que estuvieran presentes los receptores en las células tumorales. Ninguna de estas influyó en la expresión de CCR4. Sin embargo, los niveles de ARNm de CCR4, pero no los niveles de proteína, fueron regulados al alza por medio del cultivo simultáneo de células C-41 con los macrófagos.

CCR4 y D6 se localizan en el cromosoma 3p cerca de donde se cree que se localizan los genes supresores de tumores de cáncer de cuello de útero críticos con aberraciones complejas (pérdida de heterocigosidad, homocigosidad y amplificación génica) referidas [25, 26, 27]. Aunque ni *CCR4* ni *D6* están implicados directamente en estos cambios [26], las alteraciones genéticas próximas pueden tener impacto en su regulación.

Las células B inmortalizadas con EBV secretan CCL22, así como CCL3 y CCL4 [28]. La expresión estable del oncogén de EBV LMP1 también indujo CCL17 y CCL22 en una línea de células B y la expresión de CCL17 y CCL22 inducida por LMP1 fue regulada por NF- κ B. Se sugirió que la inducción de estas dos quimiocinas por EBV ayuda a las células malignas evadir la vigilancia inmunitaria mediante la atracción de las células Th2 y Treg. Otros cambios oncogénicos pueden inducir la producción de CCL17 y CCL22 por las células epiteliales.

Los autores de la presente invención llevaron a cabo la cuantificación detallada de dos componentes del producto infiltrado mononuclear en el cáncer de cuello de útero, específicamente macrófagos CD68 + y Treg FoxP3+. La densidad de células infiltrantes positivas para CCR4 aumenta en CIN en comparación con el cuello de útero normal y aumenta adicionalmente tanto en SCC como en adenocarcinomas. Los macrófagos CD68+ siguen el mismo patrón, y los autores de la presente memoria encontraron que estos eran positivos para CCR4. La intercomunicación entre los macrófagos y las células malignas es fundamental en todas las fases de la progresión del cáncer, influyendo en la supervivencia de las células malignas, ayudando al interruptor angiogénico, polarizando leucocitos y ayudando a la invasión de células malignas [29,30,31]. En los cánceres de cuello de útero y de esófago, las quimiocinas CCL17 y CCL22 juegan un papel en el reclutamiento de macrófagos mientras que en otros tipos de cáncer, por ejemplo cáncer de ovario, quimiocinas tales como CCL2 son críticas [32].

CCL17 y CCL22 también son importantes en el reclutamiento de Treg que aumentan de manera paralela a las células CD68+ en las biopsias de cuello de útero. El reclutamiento de las células Treg a las lesiones premalignas y malignas fomenta privilegio inmunitario. Por ejemplo, en el linfoma de Hodgkin, LH, las células malignas están rodeadas por un gran número de linfocitos CCR4+ FoxP3+ [33]. Estas células, reclutadas por las células LH malignas, crean un ambiente favorable para que las células malignas escapen del sistema inmunitario del anfitrión. Los autores de la presente invención creen que este es también el caso del cáncer de cuello de útero y de esófago. Por lo tanto no solamente los cambios en los gradientes de CCL17 y CCL22 fomentan directamente la supervivencia y diseminación de las células tumorales, sino que atraen a los leucocitos que también pueden proporcionar factores de supervivencia a las células del tumor y contribuir al privilegio inmunitario/inmunosupresión que impide respuestas del anfitrión eficaces contra el tumor.

Estos datos demuestran que la presencia de CCR4 epitelial es a la vez un biomarcador altamente sensible y altamente específico para la neoplasia cervical tanto premaligna como maligna. El papel de la expresión de CCR4 en la progresión del cáncer de cuello de útero es, hasta ahora, no está claro aunque los datos de los autores de la presente invención sugieren que CCR4 puede ofrecer protección a las células contra los estímulos apoptóticos dentro del entorno del tumor, además de ser necesario para la invasión por células tumorales de la membrana basal. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, existe el potencial para que CCR4 sea utilizado como un biomarcador de diagnóstico para todas las etapas de cáncer de cuello de útero.

Posteriormente los autores de la presente invención también sometieron a ensayo la expresión de CCR4 en 31 muestras de tumores esofágicos, otro tipo de tumor que tiene una fuerte vinculación con la inflamación. Por medio de IHC encontraron que CCR4 no era detectable en cualquier tejido epitelial del esófago normal, pero estaba presente en las células epiteliales de todas las lesiones preinvasivas e invasivas. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, existe el potencial para que CCR4 sea utilizado como un biomarcador de diagnóstico para todas las etapas de cáncer de esófago.

En resumen, el receptor de quimiocina CCR4 y sus ligandos aumentan durante la progresión maligna de los cánceres de cuellos de útero, esófago, riñón, cerebro, ovario o mama. Los cambios en CCR4 y los gradientes de su ligando tienen varias implicaciones protumorales. En primer lugar la estimulación CCR4 aumenta el crecimiento y la supervivencia de las células de cáncer de iniciadas e invasivas; en segundo lugar, los cambios en los gradientes de quimiocinas ayudan a la invasión de la membrana basal y el movimiento subsiguiente de las células malignas en los vasos sanguíneos o el sistema linfático. Finalmente CCL17 y CCL22 atraen los tipos de células, incluyendo macrófagos M2 y Treg FoxP3 que fomentan el crecimiento del tumor y permiten que las células iniciadas escapen a la vigilancia inmunitaria. CCR4 y sus ligandos pueden ser marcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas útiles en las neoplasias epiteliales.

La invención se describe en parte a modo de trabajo experimental y ejemplos, en los que se emplearon los siguientes materiales y métodos:

Ejemplos

Muestras de tejido de cuello de útero y especímenes esofágicos

Para los estudios del ARNm, se obtuvieron quince biopsias de tumores de pacientes con cáncer de cuello de útero (11 de carcinoma de células escamosas, S1-S11, y 4 adenocarcinomas, A1-A4) y 14 muestras de tejido de cuello de útero no neoplásico (N1-N14) durante la cirugía y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. El diagnóstico fue realizado por el departamento de patología de Barts y The London NHS Trust. Las muestras de pacientes se dividieron de acuerdo con la clasificación de la FIGO (fase I, II, III, IV) y las biopsias de los tumores se clasificaron de acuerdo con el aumento del grado de atipia nuclear (1, 2, 3) o también, moderada o escasa diferenciación.

Para la inmunohistoquímica, se obtuvieron muestras incluidas en parafina (n = 166) de 150 pacientes diferentes de Barts y The London NHS Trust y el Centro Clínico de Serbia, Belgrado. El acceso a muestras humanas frescas e incluidas en parafina satisfizo los requisitos del East London and City Health Authority Research Ethics Subcommittee (LREC núm. T/02/046).

También se incluyeron en este trabajo especímenes resecados de treinta y un pacientes con carcinoma esofágico escamoso primario. Estos pacientes eran de una zona de alto riesgo de carcinoma esofágico en la ciudad de Anyang, provincia de Henan, China. Todos los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico en el Departamento de Cirugía del Hospital Central de Anyang. Ninguno de estos pacientes había sido sometido a quimioterapia, radioterapia o terapia inmunomoduladora antes de la cirugía. Se tomaron muestras de zonas macroscópicamente cancerosas y las zonas normales correspondientes del mismo paciente de cáncer. Los tejidos se fijaron en PBS que contenía 10 % de formalina tamponada neutra.

Extracción de ARN y Ensayo de protección contra ARNasa (RPA)

Se homogeneizaron biopsias de tejido de cuello de útero utilizando un molino enfriado con nitrógeno líquido 6750 (Glen Creston Ltd., Stanmore) y se solubilizaron en el Tri Reagent™ (Sigma, Poole, Reino Unido). El ARN extraído se trató con 10 unidades de ADNasa (Pharmacia, St Albans, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RPA se realizó utilizando conjuntos de moldes hCR5 y hCR6 RiboQuant® (BD Pharmingen, Oxford, Reino Unido) y UTP[α ³²P] (Amersham International plc, Aylesbury, Reino Unido). Se hicieron correr fragmentos protegidos contra ARNasa en un gel de secuenciación de acrilamida-urea (BioRad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Reino Unido), se adsorbieron sobre papel de filtro y se secaron a vacío. La autorradiografía se realizó utilizando película Kodak® Biomax® MS con una pantalla amplificadora Transcreen LE (Sigma).

Microdissección y Matriz génica

Se cortaron tejidos del cuello de útero incluidos en parafina en condiciones libres de ARNasa y se montaron en portas con membrana PALM® tratados con UV (PALM, Microlaser Technologies, Alemania). Estos se desparafinizaron a continuación en xileno y se rehidratan por medio de alcoholes graduados. Las muestras se tiñeron durante 1 min con una disolución de hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y se secaron al aire antes de su procesamiento. Las secciones se microdisecaron con láser siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, las áreas de interés se microdisecaron con láser y se lanzaron a una tapa de microcentrífuga que contenía tampón de Proteína Quinasa (PK). Se lanzaron aproximadamente 500-5000 células en cada sesión. Las células microdisecadas por medio de láser se disolvieron en 100 µl de Tampón de PK mezclado con 5 µl de PK. A continuación, se extrajo el ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARN en bloque de parafina (1902, Ambion, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se amplificó como se ha descrito anteriormente y se analizó utilizando tarjetas microfluídicas de matrices génicas diseñadas a medida (PE Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El perfil de expresión génica de los genes individuales en siete muestras de tumor de cuello de útero se comparó con cinco muestras de cuello de útero normales. Los niveles de expresión génica en las muestras de células epiteliales o estromales normales se utilizaron como un valor inicial de "1" y se compararon con el valor medio de cualquiera de las células epiteliales tumorales o las células estromales tumorales, respectivamente. Las muestras de tumor microdisecadas por medio de láser se componían de una muestra de la fase 1A2 y 2B, y cinco de la fase 1B1.

Inmunohistoquímica

Se tiñeron secciones incluidas en parafina (4 µm) para determinar CCR4, CCL17 y CCL22. En resumen, las secciones se separaron de la cera en xileno y se deshidrataron a través de un gradiente de etanol. Tras el lavado con PBS el antígeno se expuso utilizando Disolución de Recuperación de la Diana por "Target Retrieval Solution" (S1700, DAKO) a 95 °C durante 20 min o Disolución Desenmascaradora de Antígeno por "Antigen Unmasking Solution" (H-3300, Vector) durante 9 min en un microondas. Las secciones se bloquearon con suero de conejo o de cabra normal durante 30 min y se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario: CCR4 (1:300, ab1669, AbCam, Cambridge), CCL17 (01:50, ab9816-50, AbCam, Cambridge) y CCL22 (1:20, 500-P107, Peprotech). Después de la incubación con un anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG de cabra o conejo, 1:200, Vector) durante 30 min a temperatura ambiente, los antígenos se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma). Los portas se contratiñeron a continuación con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron. Se utilizó la omisión del anticuerpo primario como control negativo. Para comprobar la especificidad del anticuerpo contra CCR4, se transfectaron algunas células negativas para CCR4 con ADNc para este receptor de quimiocinas. El anticuerpo contra CCR4 detectó proteína de superficie solamente en las células transfectadas con éxito.

Tinción doble, CD68, FoxP3, SR-A: Métodos de puntuación y categorías

Para la evaluación de la expresión de CCR4, CCL17 y CCL22 en las células epiteliales no malignas y malignas, cada muestra se evaluó semi-cuantitativamente con el siguiente sistema de puntuación: 0 (sin expresión de la proteína positiva), +1 (<25 % de la sección transversal de promedio tiene expresión positiva), +2 (26-50 %), +3 (51-75 %), +4 (>76 %). La intensidad de las células positivas se analizó de la siguiente manera: 0 (sin expresión), 1 (expresión leve), 2 (expresión moderada), 3 (expresión fuerte). La puntuación de la expresión de CCR4, CCL17 y CCL22 en el estroma tumoral (células infiltrantes intratumorales) y la frontera invasiva del tumor (células infiltrantes peritumorales) se realizó basándose en el método de la 'media del recorrido' [43]. Se evitaron las áreas necróticas. Se contaron un total de 15 campos de alta potencia (aumento X400). Se establecieron cinco escalas de la siguiente manera: 0 = ninguna expresión de la proteína CCR4; +1 = 1-10 células positivas para CCR4 por HPF; +2 = 10-20 células positivas por HPF; +3 (21-30 células por HPF); +4 (>30 células). El resultado global de la tinción se obtuvo mediante el cálculo del "porcentaje" X "intensidad". La puntuación IHC en tumores y células infiltrantes fue realizada por un patólogo certificado por el colegio de médicos (YW).

Cultivo de línea celular de cáncer de cuello de útero

La línea celular de cáncer de cuello de útero C-41 (ATCC, Rockville, MD, USA) se cultivó en medio DMEM con un suplemento de FCS al 10 %. En algunos experimentos las células se estimularon con 1, 10, 100, o 1000 ng/ml de CCL17 o CCL22 (PeproTech, Londres, Reino Unido). La proliferación y la migración se evaluaron utilizando los métodos descritos anteriormente [11].

Análisis estadístico

La significación estadística se evaluó utilizando la prueba t no pareada con la corrección de Welch (soporte lógico InStat, San Diego, CA). Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Experimento 1- Ensayo de protección contra ribonucleasa para receptores de quimiocinas

Se utilizaron ensayos de protección contra ribonucleasa (RPA) para escrutar 13 ARNm de receptores de quimiocinas en biopsias frescas congeladas de tejido de cuello de útero humano. Como se puede observar a partir del gráfico de resumen en la Figura 1A, se encontró una gama de ARNm de los receptores de quimiocinas en extractos de tejido de cuello de útero con algunas diferencias discretas entre biopsias no neoplásicas y malignas. De particular interés fue el receptor de quimiocinas CCR4, que estaba presente en el cuello de útero maligno pero no en extractos de biopsias no neoplásicas de cuello de útero (Figura 1B).

Puesto que se examinaba la expresión del receptor de quimiocinas en extractos de tejidos completos que contenían una población mixta de células del estroma y células epiteliales, los autores de la presente memoria investigaron a continuación la fuente celular del ARNm de CCR4. El ARNm se extrajo de zonas de células estromales y epiteliales de biopsias de cuello de útero normales y malignas microdisecadas con láser, y se utilizó RT-PCR semicuantitativa en Tiempo Real para analizar la expresión de CCR4 con ARNr 18S como control. Como se muestra en la Figura 1C, el ARNm de CCR4 se reguló al alza en las zonas del estroma de tejidos malignos cuando estos se compararon con sus contrapartes no neoplásicas. Además, y de forma inesperada, el ARNm de CCR4 también se reguló al alza en extractos de las zonas de células epiteliales malignas en comparación con el epitelio normal.

Para investigar adicionalmente estas observaciones referentes al ARNm de CCR4, los autores de la presente memoria tiñeron una cohorte de biopsias para determinar CCR4 mediante inmunohistoquímica, IHC. Los autores de la presente memoria evaluaron la expresión de la proteína CCR4 en 166 muestras de tejidos de cuello de útero incluidos en parafina de 150 pacientes diferentes: no neoplásicas, n = 23; CIN I, n = 30; CIN II, n = 17; CIN III, n = 16; SCC, n = 45; tumor recurrente, n = 15; metástasis en ganglio linfático (mets GL), n = 10; adenocarcinoma, n = 10. Tanto los leucocitos como las células epiteliales expresan la proteína CCR4. Para cuantificar los resultados de los autores de la presente memoria, una puntuación IHC se calculó multiplicando la "positividad" e "intensidad" (véase la descripción de los métodos y las Figuras 8 y 9 para más detalles).

Experimento 2 - La proteína CCR4 se encuentra en leucocitos infiltrantes en biopsias de cuello de útero humanas.

Como se muestra en la Figura 2 (A-C), los leucocitos en las zonas del estroma de las biopsias se tiñeron positivas para CCR4. La puntuación IHC para la positividad de CCR4 en las zonas del estroma se resume en la Figura 3A (barras de color blanco). Los tejidos no neoplásicos fueron negativos para los leucocitos CCR4 (Figuras 2A, 3A). Hubo más células del estroma que expresaban CCR4 en las muestras de CIN (Figura 2B, 3A) y esto aumentó adicionalmente en las muestras de cuello de útero neoplásicas invasivas (Figura 2C, 3A). La intensidad de la expresión de CCR4 en los leucocitos infiltrantes también aumentó con la progresión maligna. En los tejidos no neoplásicos esta fue leve; la intensidad fue de moderada a fuerte en CIN y adenocarcinomas, y la intensidad fue fuerte en SCC invasivo, tumores recurrentes y metástasis en los ganglios linfáticos (Figura 8).

El estroma consiste en varios tipos de células, y se llevaron a cabo ensayos para determinar cuáles de las células infiltrantes contribuía a la expresión de CCR4. Puesto que los macrófagos y las células Treg expresan CCR4, la expresión de la proteína CCR4 se examinó en estos dos tipos de células y también se contó el número de macrófagos CD68+ y células Treg FoxP3+ en las biopsias de tejido.

Experimento 3 - Los macrófagos positivos para CCR4 y las células Treg aumentan con la progresión maligna.

El número de macrófagos CD68+ y Treg FoxP3+ aumentó con la progresión maligna del cuello de útero. Como se muestra en la Figura 2D-I hubo pocas células CD68 y FoxP3 en las biopsias de cuello de útero normal, pero el número aumentó en CIN y ambos tipos de células fueron prominentes en los cánceres invasivos.

El número de células CD68+ y FoxP3+ se contó a continuación en las biopsias 122 y 33 respectivamente. Como se muestra en la Figura 3B hubo un aumento significativo ($p < 0,001$) de células CD68+ en las lesiones CIN en comparación con el cuello de útero normal. El número de células CD68+ en 13 se incrementó adicionalmente en SCC, adenocarcinoma, cánceres recurrentes y metástasis en ganglios linfáticos ($p < 0,001$, y para mets GL $P < 0,05$, en comparación con el cuello de útero normal). Se produjo un aumento similar en células FoxP3+ con progresión maligna mostrando el SCC, los adenocarcinomas y las metástasis en ganglios linfáticos aumentos significativos en el producto infiltrado de FoxP3+ en comparación con cuello de útero normal ($p < 0,01$).

Para estudiar el fenotipo de las células que expresan CCR4 infiltrantes, se realizó una evaluación de la expresión en la superficie celular de CCR4 por los macrófagos y Treg utilizando tinción inmunohistoquímica doble para CD68 y FoxP3. Esto confirmó que las células CD68+ y FoxP3+ también expresan la proteína CCR4 (datos no mostrados). También se tiñó un subconjunto de 33 tejidos incluidos en parafina para determinar la proteína del receptor basurero A (SR-A) (no neoplásico = 10, CIN = 10, SCC = 10, adenocarcinoma = 3). El SR-A es un marcador de superficie celular para macrófagos activados alternativamente M2 [12]. El SR-A no se pudo detectar en las células del estroma en las lesiones no neoplásicas, pero en CIN y cáncer invasivo, una proporción de las células CD-68+ expresaron SR-A (datos no mostrados).

Estos estudios muestran, en primer lugar, que la progresión maligna del cuello de útero se asocia con un aumento en el número de macrófagos CD68+ y células Treg FoxP3+. Estas células podrían proporcionar los factores de

crecimiento pro-tumorales para las células malignas y también ayudar a crear un microentorno inmunosupresor que ayudaría a las células transformadas a evadir la vigilancia inmunitaria. En segundo lugar, estos resultados mostraron que la observación original de un aumento del ARNm de CCR4 en cáncer de cuello de útero maligno en comparación con el normal fue debida, al menos en parte, a un aumento del producto infiltrado de leucocitos que expresan CCR4, incluyendo macrófagos y células Treg.

Sin embargo, el resultado de la microdissección por láser mostró que el ARNm de CCR4 también se incrementó en las zonas epiteliales de los tumores, y cuando se evaluó la proteína CCR4 en leucocitos infiltrantes, resultó evidente que el receptor de quimiocinas también estaba presente en algunas células epiteliales (véase la Figura 2B y C). Esto fue inesperado y justificó una investigación adicional.

Experimento 4 - Las células epiteliales en las biopsias de cuello de útero también expresan CCR4

En las biopsias de cuello de útero no neoplásicas, las células epiteliales normales no expresan CCR4 (Figura 2A). Sin embargo las células epiteliales en más de 90 % de los casos de CIN expresaron CCR4 (Figura 2B y 2E). 96 % de las muestras de SCC tenía células epiteliales positivas para CCR4 (Figura 2C y 2F) y las células epiteliales de 90 % de las muestras de adenocarcinoma fueron positivas para CCR4 (Figura 2G). Las células epiteliales malignas en todos los tumores recurrentes y metástasis de ganglios linfáticos expresaron la proteína CCR4. Los detalles completos de los resultados de IHC para la proteína CCR4 sobre las células epiteliales se muestran en la figura 9 y se resumen en la Figura 2D (barras de color negro). La expresión de CCR4 no se limitó a una minoría de células epiteliales. Las Figuras 2E-G y 9 muestran que la mayoría de las células epiteliales malignas en las biopsias de cuello de útero de CIN y cáncer invasivo eran positivas para CCR4.

Se muestran más detalles referentes a la puntuación de IHC para las diferentes fases de CIN en la Figura 2H. Esta muestra que la expresión de CCR4 epitelial permaneció esencialmente inalterable a través de la progresión de CIN I a III, pero que los niveles en estroma de CCR4 aumentaron de CIN I a III.

Experimento 5 - Análisis estadístico de la expresión de CCR4 durante la progresión del cáncer de cuello de útero

El análisis estadístico de los datos de las Figuras 8 y 9 mostró que las lesiones CIN mostraron una regulación al alza significativa de proteína CCR4 en los compartimentos tanto epitelial ($P = 0,0001$) como estromal ($P = 0,0001$) en comparación con los tejidos del cuello de útero no neoplásicos. La expresión de CCR4 en SCC invasivo también se incrementó significativamente en los compartimentos tanto epitelial ($P = 0,0001$) como estromal ($P = 0,0001$) en comparación con los tejidos no neoplásicos. También en muestras de adenocarcinoma, CCR4 fue regulado al alza en células epiteliales ($P = 0,0006$) y estromales ($P = 0,0050$) en comparación con el tejido de cuello de útero no neoplásico.

Experimento 6 - Los niveles de ARNm y de proteína de CCL22 cambian con la expresión maligna

En tejidos normales, CCL22 es un producto de los macrófagos, monocitos, células DC, B y T [13, 14]. También se encuentra en tejidos epiteliales; por ejemplo el epitelio intestinal produce constitutivamente CCL22 que puede ser regulado al alza por citocinas inflamatorias tales como TNF- α [15]. El ARNm fue aislado de 14 biopsias de cuello de útero normal, 11 SCC y 4 adenocarcinomas y los niveles de CCL22 evaluados mediante RT-PCR en tiempo real. Como se muestra en la Figura 4A los niveles de ARNm de CCL22 fueron más bajos en los tejidos malignos en comparación con las biopsias normales, pero esto no fue significativo ($P = 0,43$). Se evaluaron un total de 52 muestras de tejidos incluidos en parafina de cuello de útero de 50 pacientes diferentes para determinar la proteína CCL22: no neoplásicos, $n = 16$; CIN, $n = 17$; SCC, $n = 19$. En todas las biopsias de cuello de útero, se detectó CCL22 en las células epiteliales (Figura 4B-D). Catorce de 16 muestras normales, 15/17 CIN, 14/19 SCC tuvieron células epiteliales positivas para CCL22. Los leucocitos infiltrantes en todas las biopsias contenían CCL22 (Figura 4C, D). La puntuación epitelial IHC disminuyó ligeramente entre las lesiones CIN y SCC (Figura 4E barras de color negro). Sin embargo, la puntuación estromal para CCL22 aumentó de normal a CIN y SCC (Figura 4E barras de color blanco).

Experimento 7- Los niveles de ARNm y de proteína de CCL17 cambian con la expresión maligna

En los tejidos normales, CCL17 es expresado por células endoteliales vasculares y linfáticas, pero también es producido por los macrófagos, DC y queratinocitos [16, 17, 55]. Se aisló ARNm a partir de 14 biopsias de cuello de útero normal, 11 SCC y 4 adenocarcinomas y se evaluaron los niveles de CCL17 mediante RT-PCR en tiempo real. Como se muestra en la Figura 5^a los niveles de ARNm de CCL17 fueron más altos en SCC en comparación con cuello de útero normal. Se evaluaron un total de 74 muestras de tejidos de cuello de útero incluidos en parafina de 70 pacientes diferentes para determinar la proteína CCL17: no neoplásico, $n = 21$; CIN, $n = 33$; SCC, $n = 20$. Las biopsias de cuello de útero normales tenían bajos niveles de CCL17 en una minoría de muestras tanto de epitelio como de estroma (Figura 5B). Solamente 2/19 muestras normales tenían células positivas para CCL17 en el epitelio en comparación con 23/33 muestras de CIN y 13/20 de SCC. El número de células estromales que eran positivas para CCL17 se incrementó en CIN (Figura 5C) y SCC (Figura 5D) en comparación con las muestras normales. Seis de 21 biopsias normales tenían células estromales positivas para CCL17 en comparación con 25/33 de CIN y 15/20

de SCC. La puntuación IHC para CCL17 epitelial y estromal se incrementó en CIN y SCC en comparación con biopsias normales (Figura 5E). Cuando se analizaron las puntuaciones IHC de biopsias individuales, hubo una diferencia estadísticamente significativa en la puntuación IHC de CCL17 en el estroma de CIN ($P = 0,001$) y SCC ($P = 0,002$) en comparación con las biopsias normales. Hubo también una diferencia en las puntuaciones IHC en las zonas epiteliales de CIN ($P = 0,001$) y SCC ($P = 0,009$) en comparación con las normales. Estos datos muestran que los gradientes de quimiocinas cambiaron con la transición de la neoplasia intraepitelial a enfermedad invasiva.

Experimento 8 - CCR4 es funcional en células de cáncer de cuello de útero

Para investigar la importancia biológica de la expresión de CCR4 en células de cáncer de cuello de útero se escrutaron una serie de líneas celulares de cáncer de cuello de útero (CaSki, Mel 80, Hela-Ohio, Hela-S3, Siha, C33A, C41-1) para determinar la expresión de CCR4. La línea celular C-41 expresó CCR4 de la superficie celular de una manera constitutiva (Figura 6A). Utilizando el análisis FACS se demostró que las células C-41 expresan CCR4 en la superficie de la célula. Esta línea celular también tuvo proteína CCL22 intracelular pero el otro ligando de CCR4 CCL17 no estuvo presente (Figura 6A). Después de la estimulación con 100 ng/ml de CCL22, la proteína CCR4 de la superficie celular se internalizó en células C-41 después de 2 horas y volvió de nuevo a la superficie después de 3 horas (Figura 6B). Después de la estimulación con 100 ng/ml de CCL17, la proteína CCR4 de la superficie celular también se internalizó en células C-41 después de 2 horas y volvió de nuevo a la superficie después de 3 horas (Figura 6C). Las células C-41 mostraron una respuesta quimiotáctica en forma de campana típica tanto hacia CCL17 como hacia CCL22, en los ensayos de migración transpocillo (Figura 6D). A 10 ng/ml, CCL17 indujo una migración significativa ($P = 0,036$) y también a 100 ng/ml y 1000 ng/ml ($P = 0,0006$ y $P = 0,0004$, respectivamente). Se observaron resultados similares con CCL22 a 10 ng/ml ($P = 0,0081$), 10 ng/ml ($p = 0,0009$) y a 1000 ng/ml ($P = 0,0348$).

Las células C-41 mostraron aumento de la proliferación después de la estimulación con 10 ng/ml ($P = 0,017$) o 100 ng/ml ($P = 0,044$) de CCL17. 1 ng/ml de CCL22; ($P = 0,026$), 100 ng/ml de CCL22 ($P = 0,043$), pero no 10 ng/ml de CCL22 ($P = 0,195$), también estimularon el crecimiento de células C-41 (Figura 5C y D). CCR4 fue por lo tanto funcional en esta línea celular de cáncer de cuello de útero, lo que sugiere que también puede ser funcional *in vivo*.

Experimento 9 - CCR4 se expresa en células epiteliales y estromales durante la progresión maligna del esófago

No se sabía si la expresión de CCR4 y los cambios en el ligando de quimiocina eran específicos del cáncer de cuello de útero o si se observaron en algunos otros tumores malignos epiteliales que tuvieran un vínculo con la inflamación. El cáncer de esófago es un cáncer epitelial en el que los ejemplos de todas las fases de la progresión neoplásica se pueden obtener fácilmente, a menudo de forma simultánea a partir del mismo paciente. La expresión de CCR4 fue examinada en 31 muestras de pacientes con cáncer de esófago. En 27 de los casos, todas las fases de la carcinogénesis del esófago: normal, hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ* y cáncer invasivo, estaban presentes en las biopsias del mismo paciente. Cuatro de los 31 casos tenían lesiones pre-invasivas, sin zonas de cáncer invasivo. Como se muestra en la Figura 7A, no hubo expresión de CCR4 detectable en células epiteliales normales de esófago, aparte de unas pocas células positivas para CCR4 alrededor de la capa basal del epitelio hiperplásico (Figura 7B). En 30 de 31 casos la proteína CCR4 estuvo presente en las células epiteliales en todas las fases de las lesiones pre-invasivas (Figura 7C, D), la intensidad y el porcentaje de células que expresan CCR4 en lesiones displásicas fue mucho mayor que en las células epiteliales hiperplásicas. Las células epiteliales en el cáncer invasivo fueron también positivas para CCR4 (Figura 7H). En algunos lugares, hubo una transición abrupta entre la mucosa normal y anormal Fig. 7C, D). Lo más interesante, hubo altos niveles de expresión de CCR4 en las células displásicas, pero las células en las capas superficiales, y la mucosa normal adyacente fueron negativas. Las células positivas para CCR4 también estuvieron presentes en el estroma, siendo el patrón el mismo que en el cáncer de cuello de útero. Como se muestra en la Figura 7E, hubo pocas células positivas para CCR4 en la submucosa normal; con la progresión maligna, hubo más células positivas para CCR4 que infiltraban el estroma (Figura 7F-H).

Experimento 10 - CCL17 y CCL22 en biopsias esofágicas

Se utilizó IHC para evaluar la expresión de CCL17 y CCL22 en 23 de las muestras de esófago en las que estaban presentes todas las etapas de la carcinogénesis en cada muestra. CCL17 estuvo generalmente ausente tanto en las zonas epiteliales como estromales de los tejidos normales, aunque hubo unas pocas células positivas para CCL17 en el estroma y una minoría de áreas hiperplásicas. El número de muestras que continúan siendo células epiteliales o estromales positivas para CCL17 aumentó en la displasia y fue más alto en zonas invasivas mostrando 10/23 de estas alguna positividad para CCL17. De particular interés fue la fuerte inmunorreactividad de CCL17 en las células endoteliales o los vasos sanguíneos/linfáticos en la submucosa del epitelio displásico pero no normal.

De manera similar a lo observado en el cáncer de cuello de útero, los niveles de positividad estromal para CCL22 también aumentaron con la progresión maligna. Solo 1/23 muestras mostraron células positivas para CCL22 en el estroma de las zonas normales, pero en las zonas displásicas y las zonas invasivas 20/23 y 18/23 muestras contenían respectivamente células positivas para CCL22 en el estroma. La positividad para CCL22 de las células del estroma aumentó con el grado de displasia. Ocho de cada 23 muestras de displasia I tenían células positivas para CCL22 en el estroma, lo que aumentó a 19 de 23 muestras de displasia II y 20/23 muestras de displasia III. Hubo

una diferencia entre el epitelio de cuello de útero y de esófago ya que CCL22 no se detectó en el epitelio normal aunque se ha informado de que está presente en el epitelio intestinal normal [15]. La expresión de CCL22 epitelial aumentó con la progresión maligna del esófago; 0/23 muestras fueron positivas en las zonas normales, 2/23 hiperplasias, 7/23 displasias y 14/23 zonas invasivas tenían células epiteliales positivas para CCL22. Finalmente, más células endoteliales de los vasos sanguíneos dentro del estroma de los tejidos de cáncer invasivos fueron positivas para la tinción de CCL22 en comparación con el epitelio normal y displásico.

Experimento 11 - Resultados de un escrutinio para determinar la expresión de CCR4 en una gama más amplia de tumores

Se utilizó una biblioteca de ADNc tumoral (Cancer Research UK) que contenía los ADNc generados a partir de ARN aislado de 5-10 muestras de tumor y 2-5 muestras normales para 11 tipos de tumores diferentes: pulmón, colon, vejiga, estómago, páncreas, piel, mama, cerebro, esófago, ovario y próstata. Los niveles de expresión de ARNm de CCR4 se midieron utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Los niveles de ARNm de CCR4 fueron significativamente elevados en los cánceres de cuello de útero, esófago, riñón, cerebro, mama y ovario.

Experimento 12 - Análisis de la expresión de CCR4 en líneas celulares de cáncer de cuello de útero y renales

La Figura 11 muestra los resultados del Análisis de Clasificación Celular Activado por Fluorescencia de "Fluorescence Activated Cell Scanning" (FACS) de líneas celulares de cuello de útero (C41, C33A) y de cáncer renal utilizando un anticuerpo anti-CCR4 para detectar la expresión de CCR4. Todas las líneas celulares expresaron CCR4. Las líneas discontinuas en la Figura 11 muestran los datos para un anticuerpo de control de isotipo coincidente.

Experimento 13 - Efectos de citocinas comunes sobre la expresión de CCR4 por las células tumorales

Las citocinas más comunes presentes en un tumor son IL-10, TGF- β , FGF, TNF- α . La línea celular de cáncer de cuello de útero C41 se estimuló en cultivo con diferentes citocinas (IL-10, TNF- α , TGF- β , FGF; 20 ng/ml) durante 24 h. A continuación se determinó la expresión de CCR4 por medio de análisis FACS. Como se muestra en la Figura 12, CCR4 fue regulado al alza en términos de porcentaje de células positivas después de la estimulación con IL-10, TGF- β y FGF (línea de color azul) en comparación con las células no estimuladas (línea de color negro). La línea discontinua muestra los datos de un control de isotipo. La línea en negrita muestra la expresión de CCR4 después de la estimulación. Los resultados indican que el microentorno del tumor puede inducir la expresión de CCR4 en las células tumorales.

Referencias

1. Allen, S.J., Crown, S.E., y Handel, T.M. 2006. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25:787-820.
2. Ballcwill, F.R. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 4:540-550.
3. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
4. Scotton, C.J., Wilson, J.L., Milliken, D., Stamp, G., y Balkwill, F.R. 2001. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61:4961-4965.
5. Zeelenberg, I.S., Ruuls-Van Stalle, L., y Roos, E. 2003. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 63:3833-3839.
6. Balkwill, F. 2004. The significance of cancer cell expression of CXCR4. *Seminars in Cancer Biology* 14:171-179.
7. Burger, J.A., y Kipps, T.J. 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107:1761-1767.
8. Zlotnik, A. 2006. Chemokines and cancer. *Int J Cancer* 119:2026-2029.
9. Meijer, J., Zeelenberg, I.S., Sipos, B., y Roos, E. 2006. The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver. *Cancer Res* 66:9576-9582.
10. Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., G., A., Asemisen, A.M., Thiel, E., y Scheibenbogen, C. 2004. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 122:685-690.
11. Scotton, C.J., Wilson, J.L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G.D., Fricker, S., Bridger, G., y Balkwill, F.R. 2002. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Research* 62:5930-5938.
12. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunol* 3:23-35.
13. Godiska, R., Chantray, D., Raport, C.J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., y Gray, P.W. 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 185:1595-1604.
14. Mantovani, A., Gray, P.A., Van Damme, J., y Sozzani, S. 2000. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 68:400-404.

15. Berin, M.C., Dwinell, M.B., Eckmann, L., y Kagnoff, M.F. 2001. Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1217-G1226.
16. Imai, K., Kobayashi, M., Wang, J., Shinobu, N., Yoshida, H., Hamada, J., Shindo, M., Higashino, F., Tanaka, J., Asaka, M., *et al.* 1999. Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow. *Br J Haematol* 106:905-911.
17. Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., y Lanzavecchia, A. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29:1617-1625.
18. Fra, A.M., Locati, M., Otero, K., Sironi, M., Signorelli, P., Massardi, M.L., Gobbi, M., Vecchi, A., Sozzani, S., y Mantovani, A. 2003. Cutting Edge: Scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol* 170:2279-2282.
19. Graham, G.J., y McKimmie, C.S. 2006. Chemokine scavenging by D6: a movable feast? *Trends in Immunol* 27:381-386.
20. Woerner, B.M., Warrington, N.M., Kung, A.L., Perry, A., y Rubin, J.B. 2005. Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res* 65:11392-11399.
21. Salvucci, O., Bouchard, A., Baccarelli, A., Deschenes, J., Sauter, G., Simon, R., Bianchi, R., y Basik, M. 2006. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Br Ca Res & Treat* 97:275-283.
22. Schmid, B.C., Rudas, M., Rezniczek, G.A., Leodolter, S., y Zeillinger, R. 2004. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. *Br Ca Res & Treat* 84:247-250.
23. Pils, D., Pinter, A., Reibenwein, J., Alfan, A., Horak, P., Schmid, B.C., Hefler, L., Horvat, R., Reinhaller, A., Zeillinger, R., *et al.* 2007. In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway. *Br J Cancer* 96:485-491.
24. Borrello, M.G., Alberti, L., Fischer, A., Degl'innocenti, D., Ferrario, C., Gariboldi, M., Marchesi, F., Allavena, P., Greco, A., Collini, P., *et al.* 2005. Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *PNAS* 102:14825-14830.
25. Braga, E., Senchenko, V., Bazov, I., Loginov, W., Liu, J., Ermilova, V., Kuzubskaya, T., Garkavtseva, R., Mazurenko, N., Kisseljov, F.L., *et al.* 2002. Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3p in major human epithelial malignancies: allelotyping and quantitative real-time per. *Int J Cancer* 100:534-541.
26. Senchenko, V., Liu, J., Braga, E., Mazurenko, N., Loginov, W., Seryogin, Y., Bazov, I., Protopopov, A., Kisseljov, F.L., Kashuba, V., *et al.* 2003. Deletion mapping using quantitative real-time PCR identifies two distinct 3-21.3 regions affected in most cervical carcinomas. *Oncogene* 22:2984-2992.
27. Acevedo, C.M., Henriquez, M., Emmert-Buck, M.R., y Chuaqui, R.F. 2002. Loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 6q in microdissected 33 adenocarcinomas of the uterine cervix and adenocarcinoma in situ. *Cancer* 94:793-802.
28. Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Kakayama, M., Kawa, K., y Yoshie, O. 2004. Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 78:1665-1674.
29. Balkwill, F., Charles, K.A., y Mantovani, A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-217.
30. Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N.F., Pluddemann, A., Charles, K., Gordon, S., y Balkwill, F.R. 2006. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol* 176:5023-5032.
31. Condeelis, J., y Pollard, J.W. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266.
32. Negus, R.P.M., Stamp, G.W.H., Relf, M.G., Burke, F., Malik, S.T.A., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozzani, S., Mantovani, A., y Balkwill, F.R. 1995. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* 95:2391-2396.
33. Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Inagaki, H., y Ueda, R. 2006. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res* 66:5716-5722.
34. Nakamura, E.S., Koizumi, K., Kobayashi, R., Saitoh, Y., Arita, Y., Nakayama, T., Sakurai, H., Yoshie, O., y Saiki, I. 2006. RANKL-induced CCL22/macrophage-derived chemokine produced from osteoclasts potentially promotes the bone metastasis of lung cancer expressing its receptor CCR4. *Clin Exp Metastasis* July 5.
35. Ishida, T., Inagaki, H., Utsunomiya, A., Takatsuka, Y., Komatsu, H., Iida, S., Takeuchi, G., Eimoto, T., Nakamura, S., y Ueda, R. 2004. CXC chemokine receptor 3 and CC chemokine receptor 4 expression in T-cell and NK-cell lymphomas with special reference to clinicopathological significance for peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Clin Cancer Res* 10:5494-5500.
36. Ishida, T., y Ueda, R. 2006. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Sci* 97:1139-1146.
37. Ishida, T., Iida, S., Akatsuka, Y., Ishii, T., Miyazaki, M., Komatsu, H., Inagaki, H., Okada, N., Fujita, T., Shitara, K., *et al.* 2004. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 10:7529-7539.
38. Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Büchler MW, Zlotnik A, Korc M. Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor

in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 17 May 1999;81(4):650-7.

39. Kimsey TF, Campbell AS, Albo D, Wilson M, Wang TN. Co-localization of macrophage inflammatory protein-3alpha (Mip-3 alpha) and its receptor, CCR6, promotes pancreatic cancer cell invasion. *Cancer J*. Nov-Dic 2004;10(6):374-80.

5 40. Jöhner K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, Gander H, Höftl L, Bartsch G, Greil R, Thurnher M. Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1 Abr 2005;11(7):2459-65.

41. Ferenczi, K., Fuhlbrigge, R.C., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S. y Kupper, T.S. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 119, 1405-1410 (2002).

10 42. Baatar, D., Olkhanud, P., Newton, D., Sumitomo, K. y Biragyn, A. CCR4-expressing T cell tumors can be specifically controlled via delivery of toxins to chemokine receptors. *J Immunol* 179, 1996-2004 (2007).

43. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, van Krieken JH. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect—a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Ital Cancer*. 2001;1:7. Epub 16 Jul 2001.

15 44. Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, Marquez L, Peiper SC, Barr FG, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. "CXCR4-SDF-1 signalling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion." *Blood*. 1 Oct 2002;100(7):2597-606.

20 45. Bange, J; Zwick E, Ullrich A. (2001). "Molecular targets for breast cancer therapy and prevention". *Nature Medicine* 7: 548 - 552

46. Ménard, S; Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E (2003). "Biologic and therapeutic role ofHER2 in cancer". *Oncogene* 22: 6570 - 6578

47. Kute, T; Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrutt K, Mitchell T, Vaughn JP (2004). "Development of herceptin resistance in breast cancer cells". *Cytometry* 57A: 86-93.

25 48. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol*. Oct 2000;115(4):640-6.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Cancer Research Technology Ltd

<120> Marcador de cancer y marcador terapéutico

35 <130> 68.111623/06

<150> EP08806315.1

<151> 18-09-2008

40 <150> PCT/GB2008/003160

<151> 18-09-2008

<150> GB 0718167.0

<151> 18-09-2007

45 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 1083

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 1

ES 2 588 507 T3

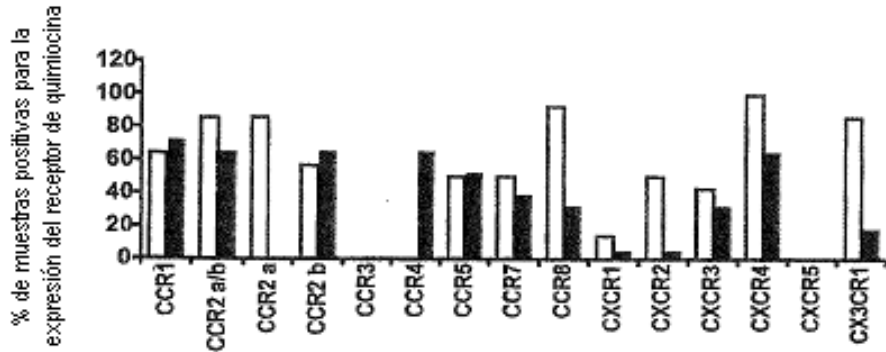
atgaacccca cggatatagc agataccacc ctcgatgaaa gcatatacag caattactat	60
ctgtatgaaa gtatccccaa gccttgcaacc aaagaaggca tcaaggcatt tggggagctc	120
ttcctgcccc cactgtattc cttggttttt gtatttggtc tgcttgaaa ttctgtggtg	180
gttctggtcc tgttcaaata caagcggctc aggtccatga ctgatgtgta cctgctcaac	240
cttgccatct cggatctgct cttegtgttt tcctccctt ttggggcta ctatgcagca	300
gaccagtggg tttttgggct aggtctgtgc aagatgattt cctggatgta cttggtggc	360
ttttacagtg gcatattctt tgtcatgctc atgagcattg atagatacct ggcgatagtg	420
cacgcgggtg tttccttgag ggcaaggacc ttgacttatg gggcatcac cagtttggt	480
acatggctcag tggctgtgtt cgcctccctt cctggatttc tgttcagcac ttgttatact	540
gagcgoaacc atacctactg caaaaccaag tactctctca actccacgac gtggaaggt	600
ctcagctccc tggaaatcaa cattctcgga ttggtgatcc ccttagggat catgctgttt	660
tgctactcca tgatcatcag gaccttgcaag cattgtaaaa atgagaagaa gaacaaggcg	720
gtgaagatga tctttgccgt ggtggtcctc ttccttggtt tctggacacc ttacaacata	780
gtgctcttcc tagagaccct ggtggagcta gaagtccttc aggactgcac ctttgaaga	840
tacttggaact atgccatcca ggccacagaa actctggctt ttgttcaactg ctgccttaat	900
cccatcatct acttttttct gggggagaaa tttcgcaagt acatcctaca gctcttcaaa	960
acctgcaggg gcctttttgt gctctgcaa tactgtgggc tcctccaaat ttactctgct	1020
gacaccccca gctcatctta cacgcagtcc accatggatc atgatcttca tgatgctctg	1080
tag	1083

REIVINDICACIONES

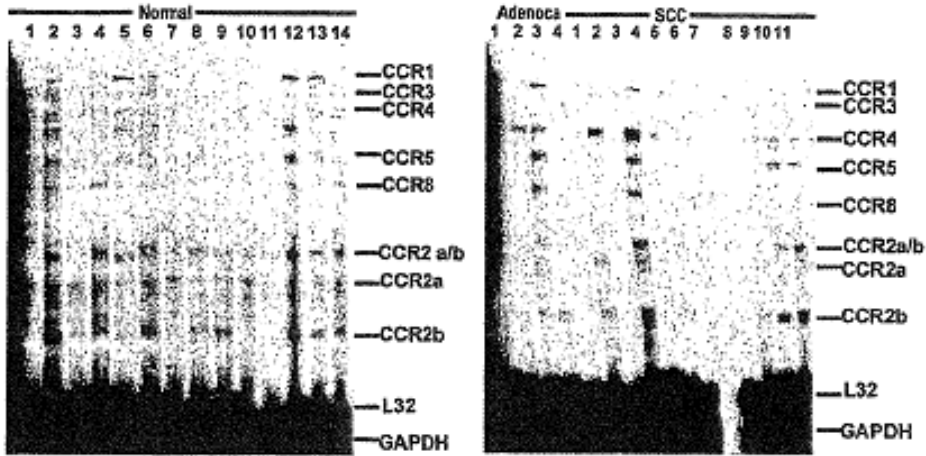
- 5 1. Un agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer que tiene un tumor sólido o un tumor no hematológico, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan CCR4 en las que el agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 es:
- 10 (i) un anticuerpo que se une con CCR4;
(ii) un anticuerpo que se une con ligandos de CCR4 CCL17 o CCL22; o
(iii) un antagonista de CCR4.
- 15 2. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de riñón.
3. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de esófago.
4. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de cuello uterino.
- 20 5. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de cerebro.
6. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de mama.
- 25 7. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de ovario.
8. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de próstata.
- 30 9. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de estómago.
- 35 10. Un agente de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que el tumor sólido o el tumor no hematológico es cáncer de páncreas.
- 40 11. Un agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer como se define en la reivindicación 1, en el que dicho agente se selecciona de un anticuerpo anti-CCR4 como se describe en cualquiera de los documentos WO0041724, WO0164754, WO05035582, WO03018635, WO05053741, WO0042074; o anticuerpos anti-CCL17 o anti-CCL22 como se describe en el documento WO99/15666 o Ishida, T., *et al* (2004) Clin Cancer Res 10:7529-7539; o un antagonista de CCR4 como se describe en cualquiera de los documentos WO04007472, WO05023771, WO02094264, WO0230358, WO0230357, WO051236976, WO05085212, WO05082865, WO04108717, EP 1633729, WO03014153.
- 45 12. El uso de un agente inhibidor del receptor de quimiocina CCR4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de tumores sólidos o tumores no hematológicos, comprendiendo dichos tumores células tumorales epiteliales que expresan CCR4 en las que el agente que inhibe la expresión o actividad de CCR4 es:
- 50 (i) un anticuerpo que se une con CCR4;
(ii) un anticuerpo que se une con ligandos de CCR4 CCL17 o CCL22; o
(iii) un antagonista de CCR4.
- 55 13. Un uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el tumor sólido o tumor no hematológico es un cáncer seleccionado de cáncer de riñón, esófago, cuello uterino, cerebro, mama, ovario, próstata, estómago o páncreas.
- 60 14. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que dicho agente se selecciona de un anticuerpo anti-CCR4 como se describe en cualquiera de los documentos WO0041724, WO0164754, WO05035582, WO03018635, WO05053741, WO0042074; o anticuerpos anti-CCL17 o anti-CCL22 como se describe en el documento WO99/15666 o Ishida, T., *et al* (2004) Clin Cancer Res 10:7529-7539; o un antagonista de CCR4 como se describe en cualquiera de los documentos WO04007472, WO05023771, WO02094264, WO0230358, WO0230357, WO051236976, WO05085212, WO05082865, WO04108717, EP 1633729, WO03014153.
- 65 15. Un método de exploración para un agente anticanceroso activo contra un tumor sólido o un tumor no hematológico, comprendiendo dicho tumor células tumorales epiteliales que expresan CCR4, que comprende las etapas de:

- i) proporcionar células de ensayo que expresan CCR4 y son capaces de, o están en el proceso de, mostrar una actividad biológica seleccionada de (a) proliferación, (b) migración, (c) secreción de una proteína o una molécula de señalización o (d) supervivencia celular cuando se cultivan en condiciones específicas;
- 5 ii) exponer las células de ensayo a un agente candidato durante un periodo de tiempo;
- iii) medir la actividad biológica de las células de ensayo, por la que la ausencia de actividad biológica o actividad biológica que es menor que la actividad esperada de dichas células de ensayo en ausencia de agente candidato identifica un agente anticanceroso.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que una alícuota de control de células de ensayo no se expone al agente candidato y se mide la actividad biológica de las células de control de modo que se determine la actividad biológica esperada.
- 10
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 o reivindicación 16, en el que la actividad biológica de las células de ensayo y cualquier célula de control se induce mediante la adición de un ligando del receptor CCR4, preferentemente CCL17 y/o CCL22.
- 15

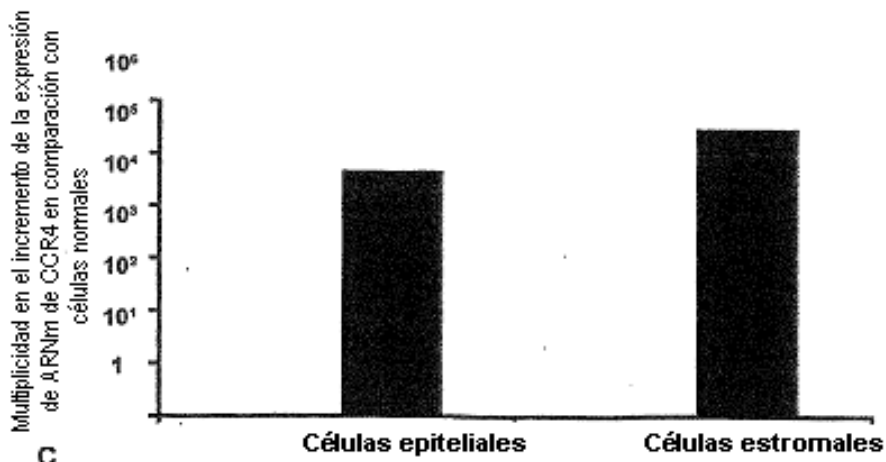
Figura 1



A



B



C

Figura 2

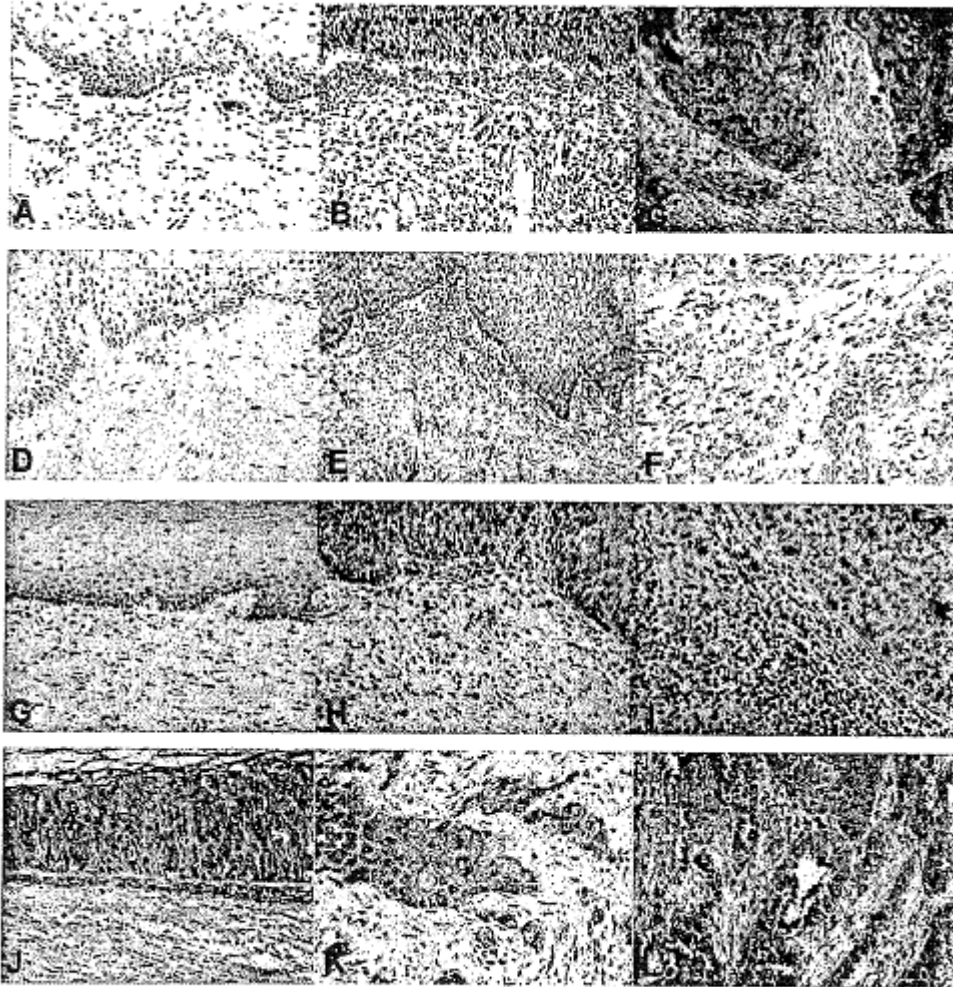


Figura 3

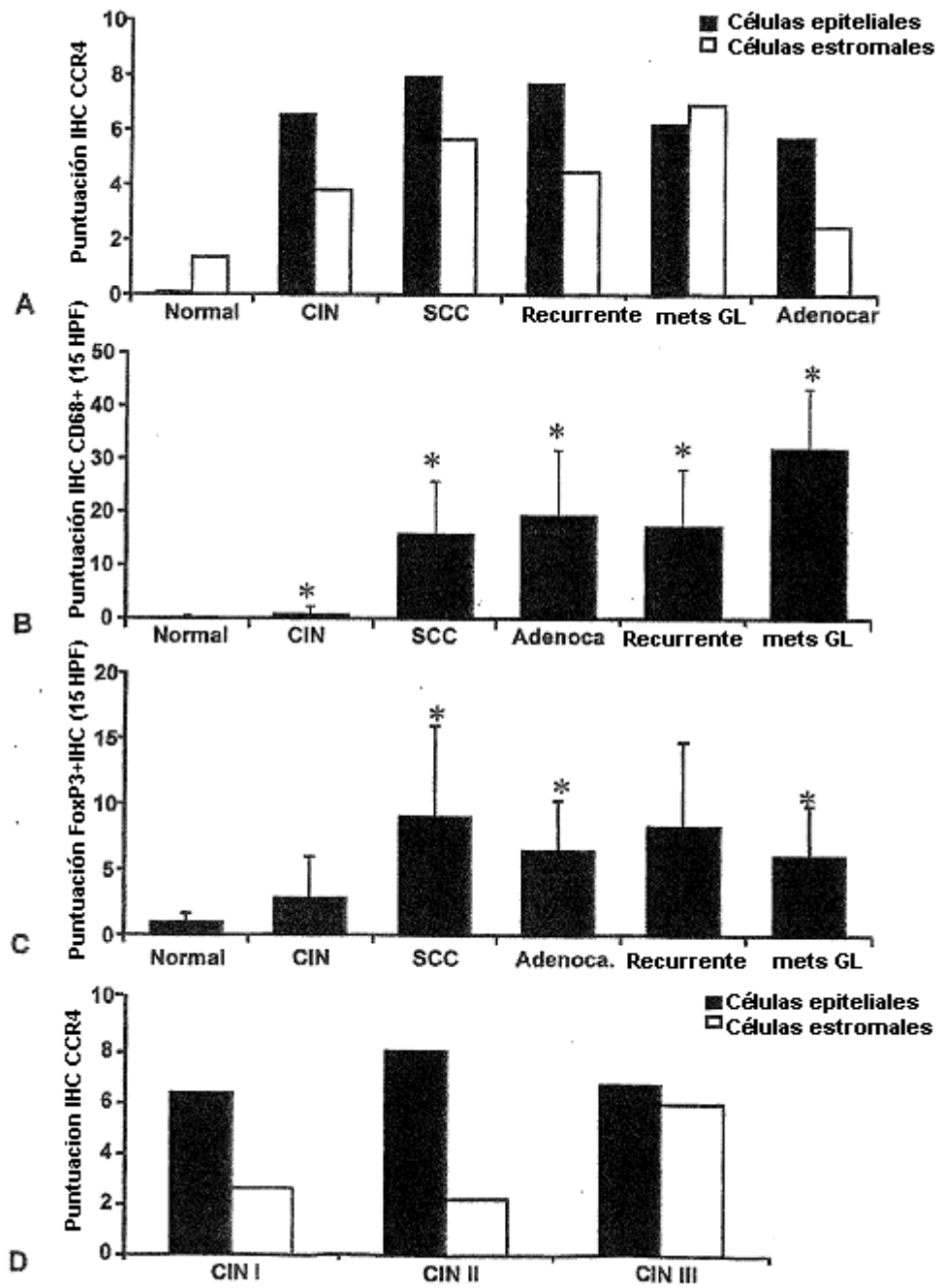


Figura 4

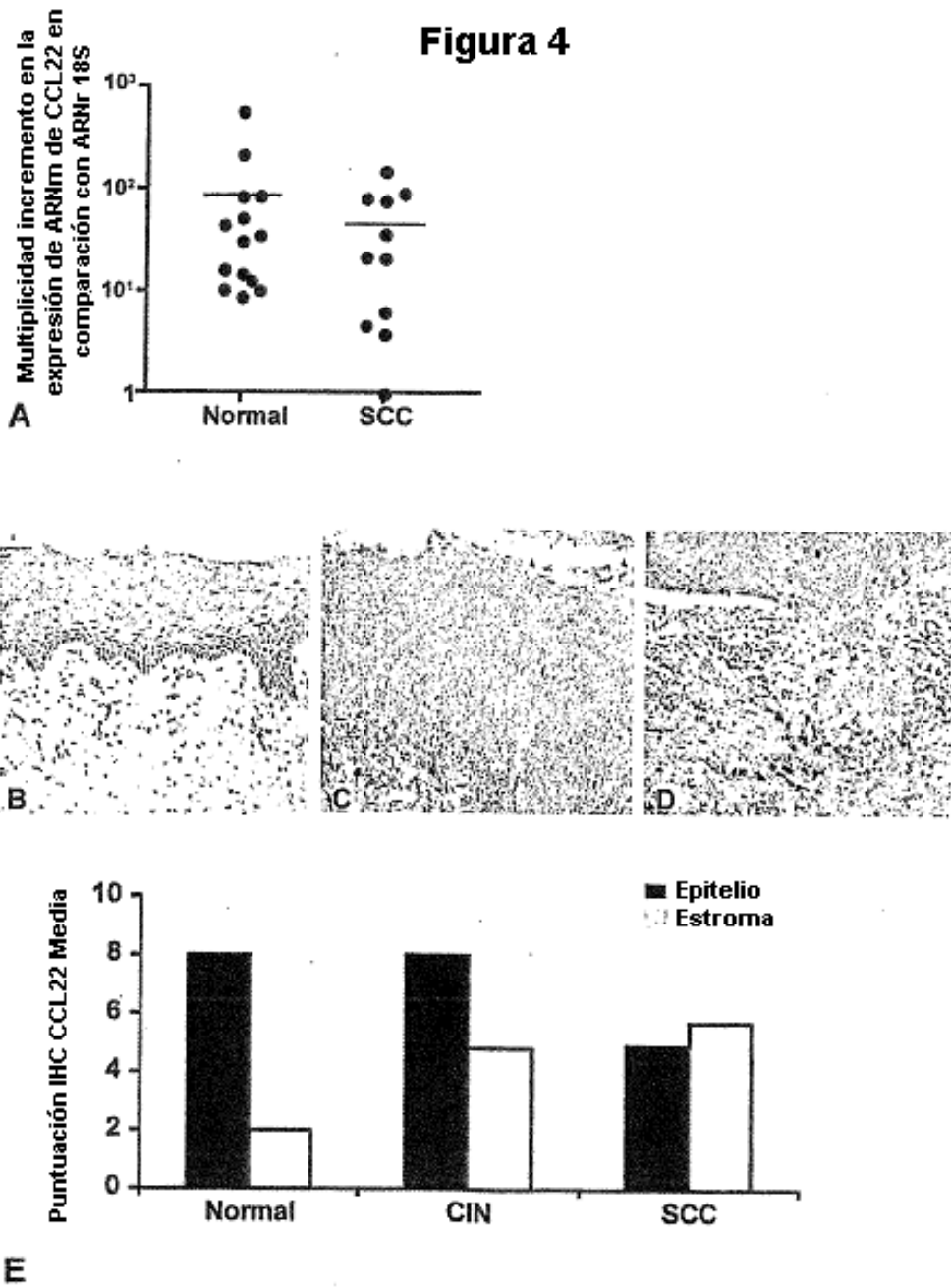


Figura 5

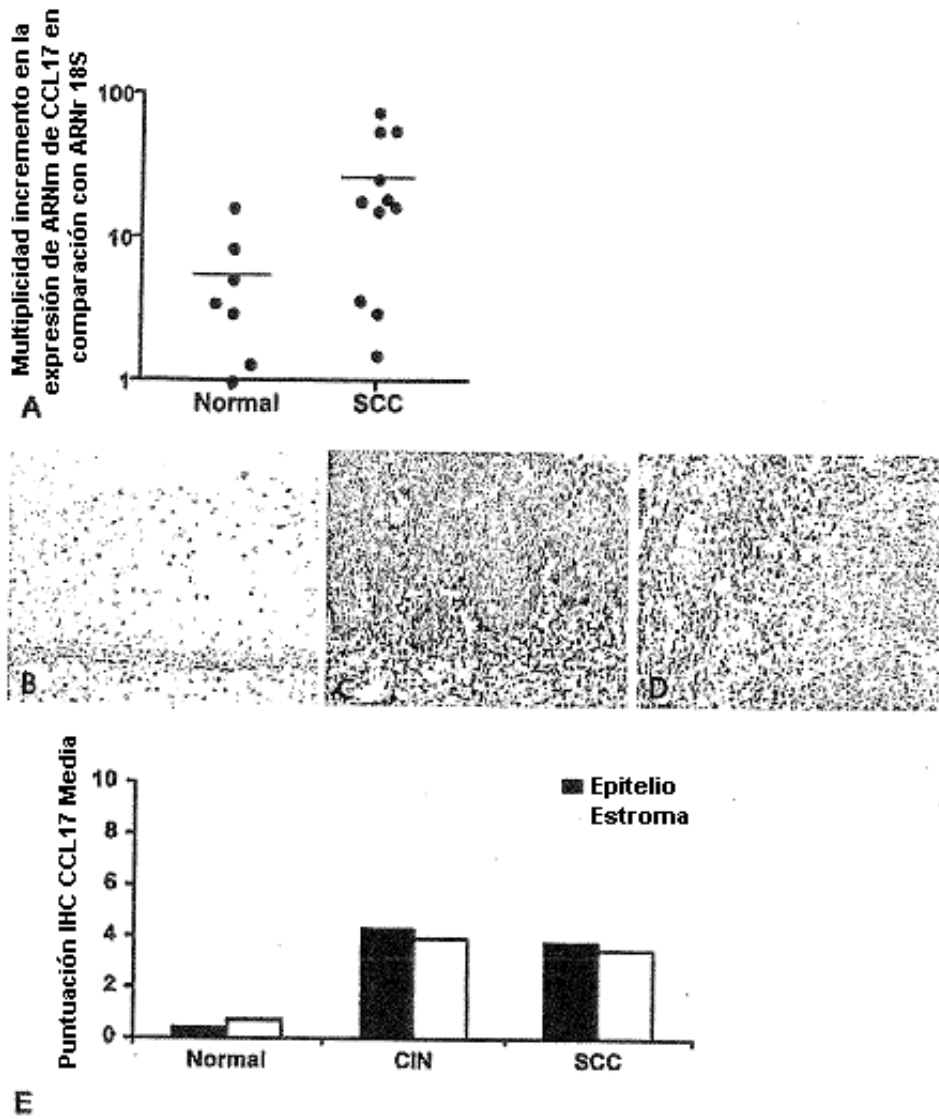


Figura 6

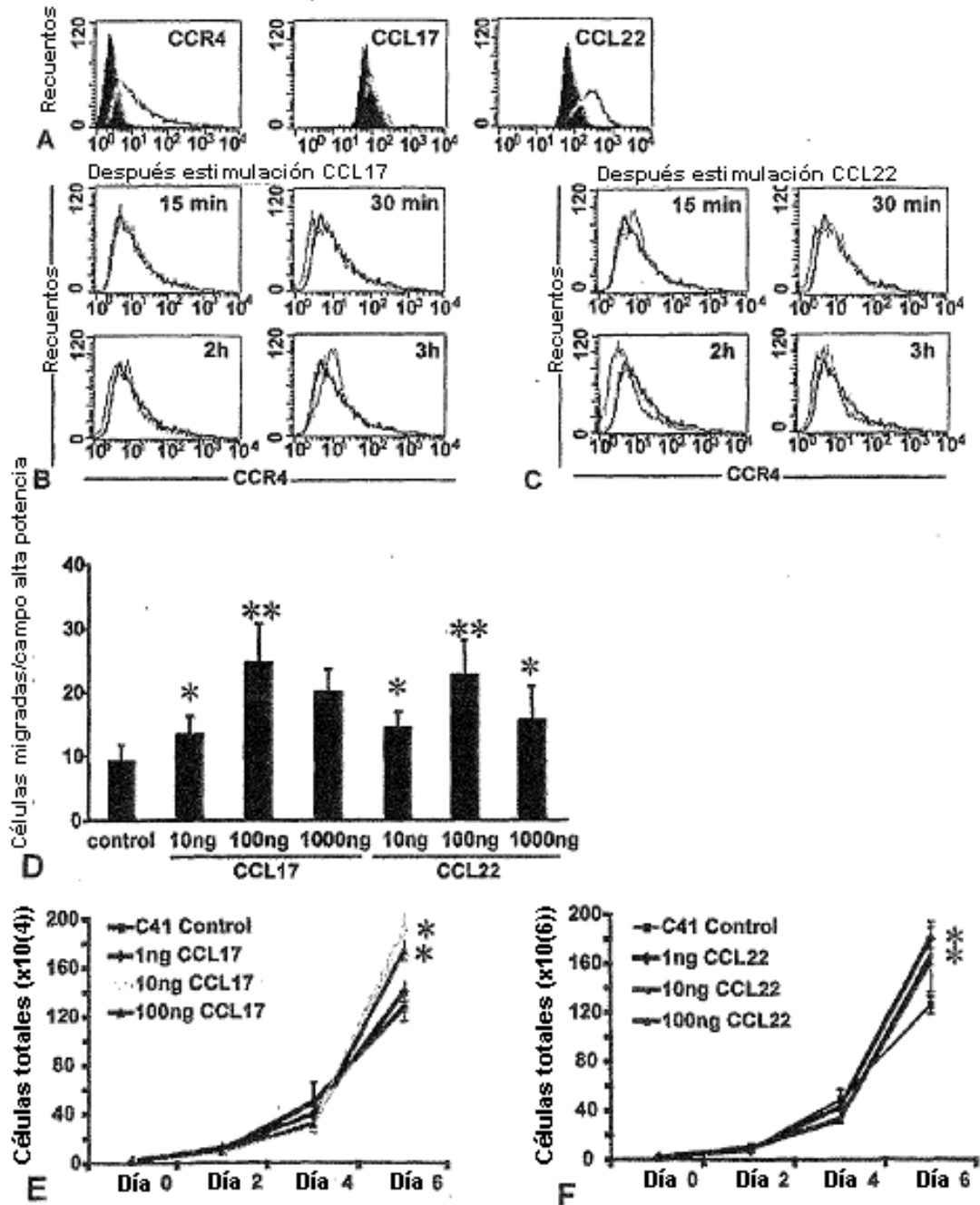


Figura 7

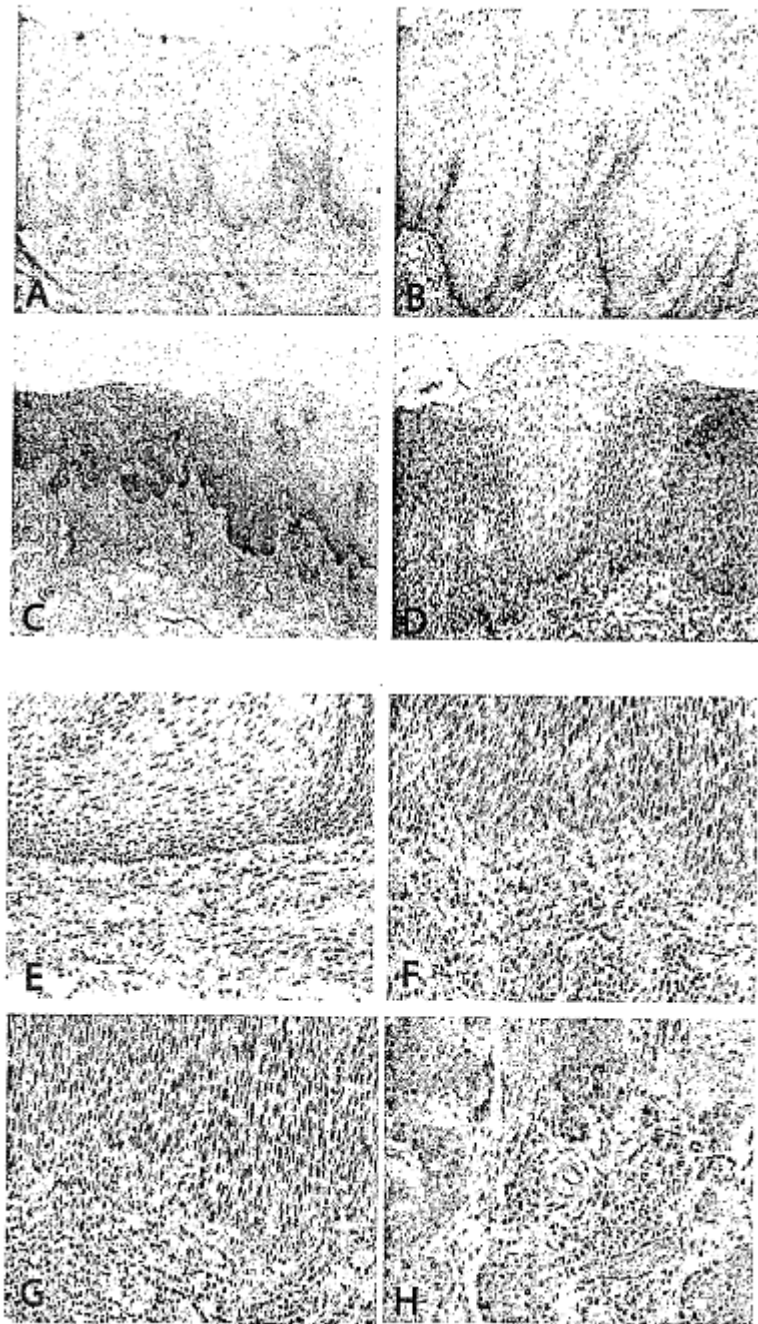


Figura 8

Panel A: Positividad/Porcentaje de células

Fase	n=	+0 (0)	+1 (0-10)	+2 (10-20)	+3 (21-30)	+4 (>30)
Normal	23	13,00% (3/23)	86,96% (20/23)	0	0	0
CIN I	30	3,33% (1/30)	40,00% (12/30)	43,33% (13/30)	10,00% (3/30)	3,33% (1/30)
CIN II	17	5,88% (1/17)	41,18% (7/17)	41,18% (7/17)	5,88% (1/17)	5,88% (1/17)
CIN III	14	0	50,00% (7/14)	42,86% (6/14)	0	7,14% (1/14)
SCC	41	2,44% (2/41)	14,63% (6/41)	41,46% (17/41)	31,71% (13/41)	9,76% (4/41)
RECUR.	15	0	53,33% (8/15)	26,67% (4/15)	13,33% (2/15)	6,67% (1/15)
METS GL	10	0	10,00% (1/10)	30,00% (3/10)	50,00% (5/10)	10,00% (1/10)
ADENOCA	10	10,00% (1/10)	60,00% (6/10)	30,00% (3/10)	0	0

Panel B: Intensidad de tinción

Fase	n=	0 (ninguno)	1(+)	2 (**)	3 (+++)
Normal	23	13,04% (3/23)	52,17 (12/23)	21,73% (5/23)	13,04% (3/23)
CIN I	30	3,33% (1/30)	6,66% (2/30)	50,00% (15/30)	40,00% (12/30)
CIN II	17	5,88% (1/17)	17,65 (3/17)	47,05% (8/17)	29,41% (5/17)
CIN III	14	0	21,43% (3/14)	42,86% (6/14)	35,71% (5/14)
SCC	41	2,43% (1/41)	7,31% (3/41)	34,15% (14/41)	56,10% (23/41)
RECUR.	15	0	13,33% (2/15)	33,33% (5/15)	53,33% (8/15)
METS GL	10	0	0	20,00% (2/10)	80,00% (8/10)
ADENOCA	10	10,00% (1/10)	20,00% (2/10)	50,00% (5/10)	20,00% (2/10)

Panel A: Positividad/Porcentaje de células

FASE	n=	+0 (0%)	+1 (<25%)	+2 (26-50%)	+3 (51-75%)	+4 (>76%)
Normal	23	95,65% (22/23)	0	4,34% (1/23)	0	0
CIN I	30	3,33% (1/30)	13,33% (4/30)	16,66% (5/30)	6,66% (2/30)	60,00% (18/30)
CIN II	17	5,88% (1/17)	11,76% (2/17)	5,88% (1/17)	17,75% (3/17)	58,82% (10/17)
CIN III	16	6,25% (1/16)	6,25% (1/16)	12,50% (2/16)	25,00% (4/16)	50,00% (8/16)
SCC	45	4,44% (2/45)	2,22% (2/45)	0	11,11% (5/45)	82,22% (37/45)
RECUR.	15	0	6,67% (1/15)	13,33% (2/15)	0	80,00% (12/15)
METS GL	10	0	10,00% (1/10)	0	20,00% (2/10)	70,00% (7/10)
ADENOCA	10	10,00% (1/10)	10,00% (1/10)	20,00% (2/10)	20,00% (2/10)	40,00% (4/10)

Panel B: Intensidad de tinción

FASE	n=	0 (ninguno)	1(+)	2 (++)	3 (+++)
Normal	23	95,65% (22/23)	4,34% (1/20)	0	0
CIN I	30	3,33% (1/30)	16,66% (5/30)	30,00% (9/30)	50,00% (15/30)
CIN II	17	5,88% (1/17)	29,41% (5/17)	35,29% (6/17)	29,41% (5/17)
CIN III	16	6,25% (1/16)	25,00% (4/16)	50,00% (8/16)	18,75% (3/16)
SCC	45	4,44% (2/45)	22,22% (10/45)	37,78% (17/45)	35,56% (16/45)
RECUR.	15	0	26,66% (4/15)	26,66% (4/15)	46,67% (7/15)
METS GL	10	0	40,00% (4/10)	20,00% (2/10)	40,00% (4/10)
ADENOCA	10	10,00% (1/10)	30,00% (3/10)	30,00% (3/10)	30,00% (3/10)

Figura 9

Figura 10a

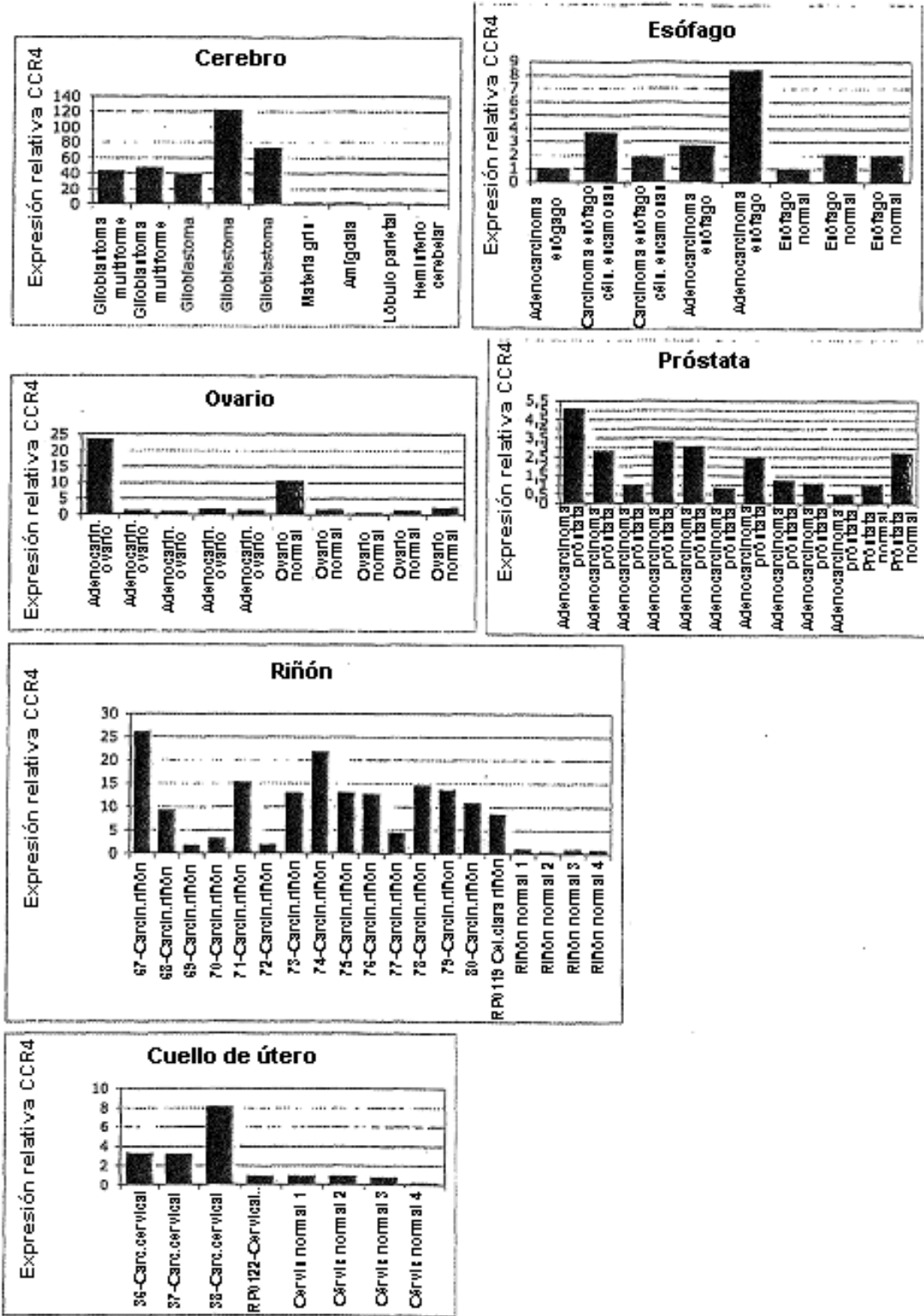


Figura 11

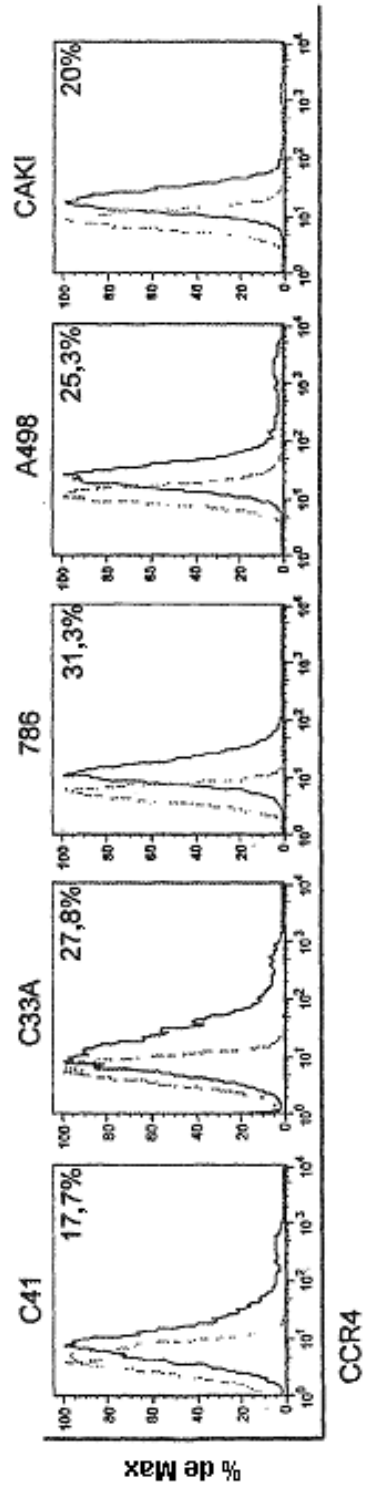


Figura 12

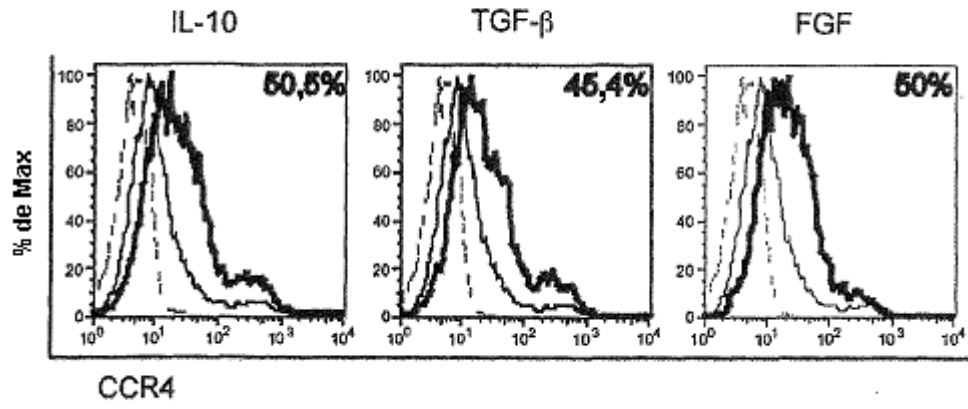


Figura 13

```

<400> 1
atgaaccccc cggatatagc agataccaacc ctcgatgaaa gcatatacag caattactat      60
ctgtatgaaa gtatccccc aaacttgcacc aaagaaggca tcaaggcatt tggggagctc      120
ttctgcgcc cactgtattc cttggttttt gtatttgctc tgcttggaaa ttctgtggtg      180
gttctggtc tgttcaaata caagcggctc aggtccatga ctgatgtgta cctgctcaac      240
cttgccatct cggatctgct cttcgtgttt tccctccctt tttggggcta ctatgcagca      300
gaccagtggg tttttgggct aggtctgtgc aagatgattt cctggatgta cttggtgggc      360
ttttacagtg gcatattctt tgtcatgctc atgagcattg atagatacct ggcgatagtg      420
cacgcggtgt tttccttgag ggcaaggacc ttgacttatg gggcatcac cagtttgct      480
acatggtcag tggctgtgtt cgcctccctt cctggctttc tgttcagcac ttgttatact      540
gagcgcacc atacctactg caaaaccaag tactctctca actccacgac gtggaagctt      600
ctcagctccc tggaaatcaa cattctcgga ttggtgatcc ccttagggat catgctgttt      660
tgctactcca tgatcatcag gaccttgccg cattgtaaaa atgagaaga gascaaggcg      720
gtgaagatga tttttgcgt ggtggtctc ttccttgggt tctggacacc ttacaacata      780
gtgctcttcc tagagaccct ggtggagcta gaagtcctc aggaactgac ctttgaaga      840
tacttggact atgcatcca ggccacagaa actctggctt ttgttactg ctgecttaat      900
cccatcatct actttttct gggggagaaa tttcgcaagt acatcctaca gctcttcaa      960
acctgcaggg gcctttttgt gctctgcaa tactgtgggc tcttccaaat ttactctgct      1020
gacaccccc gctcatotta cacgcagtc accatggatc atgatcttca tgatgctctg      1080
tag                                                                                   1083

```