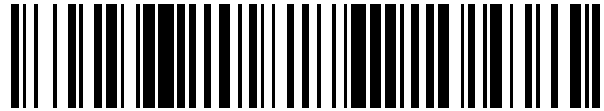


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 108**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2011 PCT/EP2011/060641**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12000906**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011 E 11727455 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2585089**

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

30 Prioridad:

09.06.2011 EP 11169326
28.06.2010 EP 10167496

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 604 108 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

5 La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Toda materia identificada en la presente solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que quede fuera del alcance de la invención definido por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada sino que sirve de información general para comprender mejor la invención.

10 La presente invención se refiere a un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20 y a un método para cuantificar la concentración de un polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra líquida de un sujeto. La presente invención también se refiere a un método para detectar y/o definir el pronóstico de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en un sujeto determinando el nivel de un polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra de dicho sujeto y además proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20 para el tratamiento de dichas enfermedades. La presente invención se refiere además a un polipéptido aislado capaz de unirse e inhibir la actividad del receptor de quimiocinas CCR6 y a un método para identificar otros inhibidores de la actividad del receptor CCR6. La presente invención también se refiere a un método para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto determinando el nivel de expresión del gen CCR6 en una muestra de dicho sujeto y proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de la actividad y/o de la expresión del receptor CCR6 para el tratamiento de dichas enfermedades.

Antecedentes de la invención

25 Las enfermedades pulmonares intersticiales son un grupo heterogéneo de trastornos que cursan con distintos grados de inflamación y fibrosis que dañan el parénquima pulmonar. Recientemente, el subgrupo de neumonías intersticiales idopáticas se ha clasificado en siete síndromes diferentes. Los más frecuentes son la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la neumonía intersticial idiopática (NII) y la neumonía organizada criptogénica (NOC). Todavía no se conoce la etiología de dichas enfermedades y se sabe poco de los mecanismos moleculares que dirigen la patogénesis. No obstante, las enfermedades pulmonares fibrosantes de etiología conocida y desconocida, entre las que están la colagenosis vascular y las enfermedades inflamatorias sistémicas con manifestaciones pulmonares que provocan fibrosis (p. ej. la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica, el escleroderma, la neumonitis por hipersensibilidad y algunas formas de alveolitis inducidas por fármacos) tienen en común la vía final de proliferación de fibroblastos y de liberación de la matriz extracelular.

35 La FPI es un tipo específico de neumonía intersticial fibrosante crónica de etiología desconocida. Al examinar el tejido pulmonar de los pacientes que padecen FPI se observa un conjunto de características histológicas/patológicas típicas que se conoce como neumonía intersticial usual (NIU). La NII, por el contrario, se refiere a los casos de neumonía intersticial en los que se puede identificar un patrón de inflamación y fibrosis más homogéneas distinto del de la NIU.

La FPI es ligeramente más frecuente entre los hombres que entre las mujeres y normalmente se observa en pacientes de 50 años o más.

40 La citología del lavado broncoalveolar (BAL) es un método utilizado con frecuencia para diagnosticar y controlar las enfermedades pulmonares intersticiales, tales como, p. ej., la FPI. El lavado broncoalveolar de los pacientes que padecen FPI, se caracteriza por un una cantidad de células totales y macrófagos y un porcentaje de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos significativamente mayores que en el lavado broncoalveolar de los controles sanos.

45 Otros síntomas frecuentes de la FPI son disnea, especialmente durante o después de la actividad física y tos seca. A menudo, estos síntomas no aparecen hasta que la enfermedad está avanzada y ya se ha producido daño pulmonar irreversible.

El pronóstico de la FPI es bastante malo, con un tiempo de supervivencia medio de 3 años desde el diagnóstico.

50 Actualmente no existen tratamientos eficaces ni cura para la fibrosis pulmonar. Con frecuencia, el tratamiento se limita a tratar la respuesta inflamatoria que se produce en los pulmones. El tratamiento habitual incluye antiinflamatorios y fármacos citotóxicos como los esteroides y las ciclofosfamidas o la azatioprina, sin embargo, estas terapias solo muestran alguna eficacia p. ej. en la NII (que también tiene mejor pronóstico que la FPI) o en la neumonía intersticial descamativa (NID). La FPI, sin embargo, es resistente a la mayoría de las opciones terapéuticas. En los estudios con fármacos experimentales como el IFN γ , Bosentan® (antagonista de la endotelina), Aviptadil® (péptido intestinal vasoactivo, VIP) o el inhibidor de la tirosina cinasa Imatinib® tampoco se ha observado un gran beneficio.

La publicación internacional WO2005/095953 describe métodos diagnósticos y productos terapéuticos para las enfermedades asociadas al CCR6.

5 Por eso, desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de las distintas formas de la fibrosis pulmonar, especialmente de la FPI, sigue siendo un objetivo esencial. Se necesitan nuevas dianas celulares y también de moléculas terapéuticas que puedan actuar sobre estas dianas eficazmente.

Las quimiocinas son una familia de citocinas proinflamatorias quimiotácticas que son esenciales para la homeostasis y la activación del sistema inmunitario. Dirigen la migración de las células inmunitarias a los sitios de inflamación e infección. Las quimiocinas se unen a receptores específicos de la superficie celular que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana.

10 La CCL18, también llamada quimiocina pulmonar y de activación regulada (PARC), quimiocina CC alternativa asociada a la activación de macrófagos 1 (AMAC-1), proteína inflamatoria de macrófagos-4 (MIP-4) y quimiocina derivada de dendritas (DCCK1), es una quimiocina expresada fundamentalmente por una amplia gama de monocitos/macrófagos y células dendríticas. En el pulmón humano se expresa constitutivamente en grandes cantidades. La CCL18 atrae a los linfocitos T, a las células dendríticas inmaduras, e induce la síntesis de colágeno en los fibroblastos. Además, hay datos que apuntan a que la CCL18 también podría inducir la quimiotaxis de los linfocitos B.

20 El nivel de la CCL18 aumenta en distintas enfermedades, tales como, p. ej., los trastornos inflamatorios de la piel, el pulmón y las articulaciones. También se ha observado que los macrófagos alveolares de los pacientes con fibrosis pulmonar liberan una mayor cantidad de CCL18 y el nivel sérico de esta quimiocina es un marcador del pronóstico en las enfermedades fibróticas.

Además, se pudo demostrar que la CCL18 induce la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos e induce la expresión de colágeno y de la actina α de músculo liso. Teniendo en cuenta su conocida capacidad de inducir la formación de colágeno, el nivel alto de CCL18 podría estar directamente relacionado con el aumento de la deposición de la matriz en la fibrosis pulmonar.

25 Pero el estudio preciso de los eventos de señalización y las posibles intervenciones terapéuticas en la señalización de la CCL18 se está viendo dificultado por el desconocimiento de su receptor.

30 Recientemente se han introducido los receptores solubles en la medicina clínica como forma novedosa de tratamiento. La mayoría de los receptores solubles compiten con sus homólogos unidos a la membrana por los ligandos y así actúan como antagonistas competitivos. Los receptores solubles cuentan con la ventaja de que son altamente específicos, se unen a sus dianas con una afinidad alta, y es menos probable que induzcan una respuesta inmunitaria que pueda atenuar su actividad. Además, pueden actuar a distancia, por lo que pueden administrarse lejos del sitio de acción. Estas ventajas hacen que los receptores solubles tengan un gran potencial terapéutico.

35 El cáncer es un tipo de enfermedad en el que un conjunto de células prolifera de forma incontrolada, invade y algunas veces forma metástasis. Estas tres propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los tumores benignos que son autolimitados y no invaden ni forman metástasis.

El cáncer es un importante problema de salud responsable de aproximadamente el 13 % de las muertes en todo el mundo. Según la American Cancer Society, durante 2007, 7,6 millones de personas fallecieron por cáncer en todo el mundo. La previsión es que la mortalidad del cáncer siga aumentando, y se calcula que llegará a los 12 millones en 2030.

40 Por eso sigue siendo fundamental desarrollar tratamientos novedosos para combatir el cáncer.

45 El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer y uno de los neoplasmas malignos más importantes por su alta prevalencia y creciente incidencia. Casi el 80 % de los casos de cáncer de pulmón se definen histológicamente como cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). A pesar del avance de las nuevas tecnologías y del desarrollo de nuevos fármacos que contribuyen a un diagnóstico mucho más precoz y a un tratamiento más adecuado, el CPNM sigue siendo una enfermedad potencialmente mortal. La supervivencia global a 5 años entre los pacientes con CPNM sigue siendo baja e incluso en los primeros estadios de la enfermedad, la tasa de recidiva es relativamente alta. El mal pronóstico se debe a que el tumor es muy agresivo, como demuestra su rápido crecimiento y metástasis temprana. Aunque todavía se desconoce el mecanismo preciso de la carcinogénesis y la metástasis en el CPNM, el microentorno del tumor parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de las enfermedades malignas y en la diseminación de las células tumorales.

"CPNM" es un término que describe distintos tipos de tumores. El 25-40 % de los CPNM son adenocarcinomas. Este tipo de tumores se desarrolla a partir de células mucosecretoras y se localiza principalmente en la periferia del pulmón. El segundo tipo de histología tumoral más frecuente es el carcinoma de células escamosas que se desarrolla a partir de las células escamosas que tapizan la superficie de los alvéolos y los bronquiolos.

5 El microentorno de los tumores sólidos es una mezcla compleja de factores celulares y no celulares. Sobre todo son las células inmunitarias localizadas alrededor del tumor y las interacciones entre las quimiocinas las que fomentan el desarrollo de las células tumorales y su diseminación. Los macrófagos asociados al tumor (MAT) son uno de los subgrupos más importantes de células inmunitarias del microentorno del tumor y representan hasta el 50 % de la masa del tumor. Algunos estudios han demostrado una importante correlación entre el número de MAT y el mal pronóstico de las enfermedades malignas.

Objeto y resumen de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20.

10 Un objeto adicional de la invención es proporcionar un método para cuantificar la concentración de un polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra líquida de un sujeto además de un método de diagnóstico *in vitro* que puede usarse para detectar y/o determinar el pronóstico de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en un sujeto.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor de la actividad del receptor CCR6. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un método para identificar inhibidores de la actividad del receptor CCR6.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos adecuados para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer, en el que dicha enfermedad pulmonar intersticial es preferiblemente la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y en el que dicho cáncer es preferiblemente un adenocarcinoma, lo más preferiblemente un adenocarcinoma de pulmón.

20 Estos y otros objetos que serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones subsiguientes se realizan mediante la materia de las reivindicaciones independientes. Algunas de las realizaciones preferibles se definen en las reivindicaciones dependientes.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:

25 (a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1; y

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);

en el que dicho polipéptido receptor CCR6 soluble aislado es capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para cuantificar la concentración de un polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra líquida de un sujeto, en el que dicho método comprende las etapas de:

(a) inmovilizar una molécula de captura específica para el receptor CCR6 soluble sobre un soporte sólido;

(b) añadir la muestra líquida del sujeto;

35 (c) opcionalmente añadir un ligando del receptor CCR6 soluble, en el que dicho ligando es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20 o la SEQ ID NO.: 21;

(d) añadir un agente de detección específico para el ligando según (c), en el que dicho agente de detección comprende un marcador detectable;

(e) cuantificar la señal del agente de detección según (d).

40 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para detectar y/o determinar el pronóstico de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto, en el que el método comprende la etapa de determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble presente en una muestra de dicho sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención para uso en tratamiento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención para uso en la detección de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en una muestra de un sujeto.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22 o 23; y

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);

en el que dicho polipéptido aislado es capaz de unirse e inhibir la actividad del receptor CCR6.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido según la invención.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, en el que el método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un receptor CCR6 con un compuesto experimental;

15 (b) añadir un agonista del receptor CCR6, en el que dicho agonista es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 5 o la SEQ ID NO.: 18;

(c) determinar la actividad de dicho receptor CCR6; y

20 (d) seleccionar dicho compuesto experimental como el compuesto capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, si la actividad del receptor CCR6 determinada en (c) es inferior a la actividad del receptor CCR6 determinada en un control.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto, que comprende la etapa de determinar el nivel de expresión del gen CCR6 en una muestra de dicho sujeto.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6.

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

30 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o expresión del receptor CCR6 o de una composición farmacéutica según la invención para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

Leyendas de las figuras:

35 Figura 1. Expresión del ARNm del CCR6 en diferentes líneas de fibroblastos de pacientes con carcinoma escamoso (n = 3), NIU (n = 2) y NIU (n = 3). La expresión del CCR6 se normalizó usando el gen de referencia gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPdH).

Figura 2. Análisis de la expresión del CCR6 en distintas líneas de fibroblastos de pacientes con NIU (gráficas superior, izquierda y media), NIU (gráfica superior derecha), y carcinoma escamoso (CAR. ESQ.; gráficas inferiores).

40 Figura 3. En el pulmón de control no se expresa CCR6 (A), sin embargo, en el pulmón fibrótico, la expresión de CCR6 se puede encontrar en la superficie apical de las células epiteliales de los alvéolos (B y C, puntas de flecha) y en los fibroblastos (C, flechas) (aumento: A: x100, B: x200, C: x400).

45 Figura 4. Sin estimulación (Sin est.) La liberación del FGF2 es mayor en los fibroblastos del pulmón fibrótico (gris, n = 6 (NIU n = 3, sarcoidosis n = 1, NIU n = 1, indefinido n = 1)) que en los fibroblastos de pulmón no fibrótico (gris claro, "Contr.", n = 6). La CCL18 induce un importante aumento de la liberación del FGF2 en los fibroblastos de pulmón fibrótico pero el aumento es mínimo en los fibroblastos de pulmón no fibrótico. El bloqueo de la CCR6 con un anticuerpo bloqueante inhibe el aumento de la liberación del FGF2 inducido por la CCL18. También en este caso el efecto solo se observa en los fibroblastos de pulmón fibrótico.

Figura 5. Expresión del ARNm del colágeno I inducida por la CCL18 en tres de las cuatro líneas de fibroblastos de pulmón humano analizadas (gráfica superior) y expresión del ARNm de la actina alfa de músculo liso (α SMA) en todas ellas (gráfica inferior) (en la ordenada se indican los nombres de las líneas). Los anticuerpos anti-CCR6

bloquean la expresión del ARNm del colágeno I y la expresión del ARNm de la actina alfa de músculo liso (α SMA) (Er = expresión relativa).

5 Figura 6. La línea de células epiteliales de alvéolo de rata transformadas RLE-6TN sufre transición epitelio-mesénquima (TEM) tras la estimulación con TGF β o CCL18. Las flechas indican las células fibroblastoides. Periodo de cultivo = 6 días.

Figura 7. Análisis por Western blot de la expresión de la vimentina y la α SMA en células cultivadas durante 6 días sin estimulación o en presencia de TGF β , TGF β +TNF α , CCL18, o CCL18+TNF α .

10 Figura 8. La inmunorreactividad por α SMA se analizó por inmunofluorescencia el día 6. Las células RLE-6TN no se estimularon (A) o se estimularon con (B) TGF β +TNF α , (C) CCL18 (D) o CCL18+TNF α . Los núcleos muestran tinción con DAPI. la α SMA solo es visible en la imagen B y revela la forma típica de los fibroblastos (puntas de flecha). Por el contrario, en las imágenes C y D solo se observan los núcleos.

15 Figura 9. La inmunorreactividad del CD90 se determinó por inmunofluorescencia el día 6. Las células RLE-6TN no se estimularon (A) o se estimularon con TGF β +TNF α (B), CCL18 (C). Los núcleos se tiñeron con ToPro3. Las células no estimuladas no expresan el CD90 y solo es visible el núcleo. Por el contrario, las células estimuladas con TGF β +TNF α y CCL18 expresan el CD90 como se demuestra al revelarse la forma de la célula.

Figura 10. Se observa la expresión de la α SMA inducida por la CCL18 en las células RLE-6TN transfectadas con CCR6, pero no en las células con transfección simulada. Por el contrario, el TGF β induce la expresión de la α SMA en ambas líneas celulares.

20 Figura 11. Se estimularon AECII primarias humanas 12 días con TGF β +TNF α o CCL18 en ausencia o en presencia de TNF α . El lisado celular completo se separó mediante SDS-PAGE al 10 % y se analizó por Western blot. Las células no estimuladas expresan una cantidad mínima de actina α de músculo liso (α SMA) y nada de vimentina. La estimulación con TGF β +TNF α y CCL18 sola o combinada con TNF α aumenta mucho el nivel de ambas moléculas. Es interesante destacar que la citoqueratina disminuye en presencia de TGF β +TNF α pero se mantiene con la CCL18 sola o combinada con TNF α .

25 Figura 12. Expresión del CCR6 en las células mononucleares de sangre periférica después de 7 días de cultivo en presencia o ausencia de fitohemaglutinina (PHA; 5 μ g/ml). Las preparaciones celulares se clasificaron como de expresión "alta" o "baja" del CCR6 según su expresión inicial del CCR6. Después del periodo de cultivo, las preparaciones no estimuladas no cambiaron el patrón de expresión del CCR6. Por el contrario, la estimulación con PHA redujo la expresión del CCR6 en el grupo de expresión alta pero aumentó la expresión en el grupo de expresión baja.

Figura 13. Disminución de la expresión del receptor CCR6 después de 20 minutos de incubación con CCL18 (10 ng/ml). La incubación con CCL18 provoca un notable descenso de la expresión del CCR6 en la superficie. Este efecto lo provoca la internalización de los receptores después de la interacción entre ligando y receptor.

35 Figura 14. Análisis por FACS de la disminución de la expresión del CCR6 inducida por la CCL18 en linfocitos humanos y su inhibición por el inhibidor PS-AU-1015 (polipéptido según la SEQ ID NO: 9). Una subpoblación de linfocitos humanos recién aislados expresa el receptor de quimiocinas CCR6 que se visualiza como un pico más bajo a la derecha del pico principal (control positivo). La incubación con CCL18 (10 ng/ml) durante 20 minutos reduce notablemente el pico (solo CCL18). Al incubar las células con CCL18 (10 ng/ml) en presencia del inhibidor PS-AU-1015 (SEQ ID NO: 9; 100 ng/ml) no se observa esta reducción (CCL18 + inhibidor). Con el inhibidor solo no se observan efectos.

Figura 15. Tinción del CCR6 en cortes de pulmón: pulmón de control (A) y dos pulmones con adenocarcinoma (B, C). No se observa tinción en el pulmón de control pero las células del tumor son positivas para el CCR6 (color rojo, flechas).

45 Figura 16. Expresión del CCR6 en la superficie de las células de adenocarcinoma de pulmón (gráficas superiores) y de las células de mesotelioma pleural (gráficas inferiores). El pico de la izquierda indica el control de isotipo, el pico de la derecha indica la expresión del CCR6. Dos de las tres líneas celulares de adenocarcinoma y todas las líneas celulares de mesotelioma pleural muestran una marcada expresión del CCR6.

Figura 17. Listado de los cebadores utilizados para la PCR.

50 Figura 18. Análisis por Western blot del suero de voluntarios sanos que hicieron de controles (n = 3; carriles 1-3) y de pacientes con fibrosis (NIU) (n = 3; carriles 4-6) (A). Al margen de la gráfica se incluyen los tamaños moleculares. (C = control; M = marcador de proteína). Análisis densitométrico de las Western blots (B).

Figura 19. Análisis del suero de control de voluntarios sanos (n = 9) y de pacientes con fibrosis (NIU, n = 19).

Figura 20. Detección del bloqueo del CCR6 soluble (sCCR6) por ELISA usando los ligandos del CCR6 CCL18 y CCL20 (100 ng/ml cada uno) durante 1 h. Las concentraciones bajas y medias quedan totalmente bloqueadas, mientras que la concentración alta se reduce un tercio. Los sueros 1, 2 y 3 son los de los voluntarios sanos.

5 Figura 21. Porcentaje de linfocitos del lavado broncoalveolar de los controles sCCR6 positivos y sCCR6 negativos y los pacientes (NIU). El porcentaje de linfocitos aumenta significativamente en los pacientes positivos para sCCR6 en suero. Este efecto es menos pronunciado en los controles (no significativo).

Figura 22. Porcentaje de linfocitos CD3⁺ y HLA-DR⁺, células NK y células dendríticas CD1a⁺ en el lavado broncoalveolar de pacientes (NIU) sCCR6 positivos y sCCR6 negativos.

10 Figura 23. El nivel sérico de CCL18 de todos los grupos de pacientes fue significativamente mayor que el de los controles.

Figura 24. El nivel medio de CCL18 en todos los estadios T fue significativamente mayor que en los controles ($p < 0,0002$). Además, se observó una diferencia significativa entre los grupos de pacientes con los estadios más bajos y con los dos más altos.

15 Figura 25. Determinación del punto de corte de la curva de la característica operativa del receptor (ROC, izquierda) y gráficas en función del valor de criterio (derecha). El análisis ROC reveló un punto de corte de 83 ng/ml que permite diferenciar a los controles de los pacientes con tumores. La gráfica del criterio reveló un punto de corte de 160 ng/ml para el criterio de muerte dentro del periodo de observación.

Figura 26. Análisis por Kaplan-Meier del tiempo de supervivencia de los pacientes con CPNM en función del nivel sérico de CCL18.

20 Figura 27. Análisis por Kaplan-Meier del tiempo de supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma en función del nivel sérico de CCL18.

Figura 28. En el subgrupo de pacientes con adenocarcinoma, el estadio N medio del grupo con el nivel sérico de CCL18 más alto es significativamente mayor que en el subgrupo con un nivel sérico de CCL18 normal.

25 Figura 29. La CCL18 aumenta la expresión de la FSP1 en las células de adenocarcinoma (A549). El TGFb se usó a 2 ng/ml. La expresión se determinó por qPCR después de 72 h de cultivo. (C = células no estimuladas).

Figura 30. La CCL18 induce la expresión de snail en las células de adenocarcinoma (A549). El TGFb se usó a 2 ng/ml. La expresión se determinó por Western blot después de 72 h de cultivo. (C = células no estimuladas).

Figura 31. La CCL18 reduce la expresión de la E-cadherina en las células de adenocarcinoma (A549). El TGFb se usó a 2 ng/ml. La expresión se determinó por qPCR después de 72 h de cultivo. (C = células no estimuladas).

30 Figura 32. Porcentaje de fibroblastos positivos para el CCR6 en líneas de fibroblastos procedentes del pulmón de pacientes con diferentes tumores.

Figura 33. Lista de secuencias SEQ ID NO: 1 a 9 y SEQ ID NO: 18-27.

Descripción detallada de la invención

35 Antes de pasar a describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos específicos recogidos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología que se usa en la presente memoria únicamente se emplea para describir realizaciones particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitado solo por las reivindicaciones anexas. Salvo que se defina de forma diferente, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente memoria tienen el mismo significado que normalmente entiende una persona
40 se experiencia ordinaria en la técnica.

Se presentan las siguientes definiciones. Como se emplea en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones pretendidas, las formas singulares "un" y "una" también incluyen los plurales respectivos a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

45 Debe entenderse que el término "comprende", y variaciones como "comprenden" y "que comprende" no es limitante. Para los fines de la presente invención, la expresión "consiste en" se considera como realización preferida de la expresión "que comprende".

Si a continuación se define un grupo que comprende al menos un cierto número de realizaciones, se pretende que también englobe un grupo que preferiblemente consiste solo en estas realizaciones.

El término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención denota un intervalo de precisión que un experto en la técnica entenderá que sigue procurando el efecto técnico de la característica en cuestión. El término normalmente engloba una desviación a partir de la cifra indicada de $\pm 10\%$ y preferiblemente de $\pm 5\%$.

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

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

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

Para los parámetros generales, el recuadro "Max Target Sequences" se debe ajustar a 100, marcando el recuadro "Short queries", el recuadro "Expect threshold" se debe ajustar a 10 y el recuadro "Word Size" a 28. Para los parámetros de la puntuación, las "Match/mismatch Scores" deben ajustarse a 1,-2 y el recuadro "Gap Costs" ponerse en lineal. En los "Filters" y "Masking parameters", no se debe marcar el recuadro "Low complexity regions", ni el recuadro "Species-specific repeats", ni el "Mask lower case letters" pero sí el "Mask for lookup table only".

Las búsquedas de proteínas en BLAST preferiblemente se realizan con el programa BLASTn.

20 Para los parámetros generales, el recuadro "Max Target Sequences" debe ajustarse a 100, marcando el recuadro "Short queries", el recuadro "Expect threshold" debe ajustarse a 10 y el recuadro "Word Size" a "3". Para los parámetros de la puntuación, el recuadro "Matrix" debe ajustarse a "BLOSUM62", el recuadro de "Gap Costs" a "Existence: 11 Extension:1" y el recuadro de "Compositional adjustments" a "Conditional compositional score matrix adjustment". En los "Filters" y "Masking parameters", no se debe marcar el recuadro "Low complexity regions", ni el recuadro "Mask for lookup table only", ni el "Mask lower case letters".

25 La identidad porcentual se determina para la longitud completa de la secuencia de referencia respectiva, es decir, para toda la longitud de la secuencia según la SEQ ID NO o las SEQ ID NO citadas en el contexto respectivo. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80% con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 presenta una identidad de al menos el 80% con la SEQ ID NO.: 1 en la longitud completa de la SEQ ID NO.: 1. En otro ejemplo, una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80% con la secuencia según la SEQ ID NO.: 8 presenta una identidad de al menos el 80% con la SEQ ID NO.: 8 en la longitud completa de la SEQ ID NO.: 8.

30 El término "sujeto" como se emplea en la presente memoria se refiere a un humano o a un animal, preferiblemente un mamífero, tal como, p. ej., primates no humanos, ratones, ratas, conejos, cobayas, perros, gatos, bovinos, caballos, ovejas, cerdos, cabras y similares. Preferiblemente un "sujeto" en el contexto de la presente invención es un humano.

35 Las expresiones "receptor de quimiocinas CCR6" o "receptor CCR6", "ligando de la quimiocina 18" o "CCL18" y "ligando de la quimiocina 20" o "CCL20" que se mencionan en el contexto de la presente invención son conocidas en la técnica. Por tanto, la persona de experiencia ordinaria en la técnica podrá recuperar fácilmente las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos del receptor CCR6, de la CCL18 y de la CCL20 y sus isoformas ortólogas y de splicing alternativo de cualquier base de datos pública adecuada tal como, p. ej., la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Los términos "receptor CCR6" y "CCR6" se usan indistintamente en la presente memoria.

45 El "receptor CCR6", la "CCL18" y la "CCL20" como se menciona en el contexto de la presente invención son preferiblemente el receptor CCR6, la CCL18 y la CCL20 humanos, lo más preferiblemente el receptor CCR6 humano y la CCL18 humana o la CCL20 humana. El receptor CCR6 humano se puede encontrar, p. ej., en la base de datos del NCBI con el número de acceso NM_004367,5 (variante de transcrito 1; SEQ ID NO.: 3) o NM_031409,3 (variante de transcrito 2; SEQ ID NO.: 4). La CCL18 humana se puede encontrar, p. ej., en la base de datos del NCBI con el número de acceso NM_002988,2 (SEQ ID NO.: 5). La CCL20 humana se puede encontrar, p. ej., en la base de datos del NCBI con el número de acceso NM_004591,2 (variante de transcrito 1; SEQ ID NO.: 6) o NM_001130046,1 (variante de transcrito 2; SEQ ID NO.: 7).

50 El receptor CCR6 a veces también se denomina CD196. La CCL18 a veces también se denomina quimiocina pulmonar y de activación regulada (PARC), quimiocina CC alternativa asociada a la activación de macrófagos 1 (AMAC-1), proteína inflamatoria de macrófagos-4 (MIP-4) o quimiocina derivada de dendritas (DCCK1). Los términos "FPI" (fibrosis pulmonar idiopática) y "NIU" (neumonía intersticial usual) se usan de forma sinónima en la presente memoria.

55 Los autores de la presente invención sorprendentemente encontraron que la CCL18 es un ligando/un agonista del receptor CCR6, miembro de la familia de los receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana. Además, los autores sorprendentemente encontraron un polipéptido receptor CCR6 soluble que se

encuentra en el suero de los voluntarios humanos sanos pero que no se encuentra, o solo en cantidades menores, en el suero de los pacientes humanos que padecen FPI. Los autores también encontraron un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado que se puede usar en tratamiento, especialmente en el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer. Los autores también encontraron sorprendentemente que los inhibidores de la actividad del receptor CCR6 pueden emplearse para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer.

Por tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1; y

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);

en el que dicho polipéptido receptor CCR6 soluble aislado es capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20.

En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende además una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma. En una realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende además una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 95 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma. En otra realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende además la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma. En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 o un fragmento de la misma y una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma. En otra realización preferida adicional, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 90 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 o un fragmento de la misma y una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 90% con la secuencia según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma. En otra realización preferida más, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 95% con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 o un fragmento de la misma y una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 95% con la secuencia según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma.

En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 1 o un fragmento de la misma y una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la misma.

Preferiblemente, la CCL18 y/o la CCL20 son la CCL18 humana y/o la CCL20 humana. Lo más preferiblemente dicha CCL18 es un polipéptido según la SEQ ID NO.: 18 y dicha CCL20 es un polipéptido según la SEQ ID NO.: 19.

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

La expresión "polipéptido receptor CCR6 soluble aislado", como se emplea en la presente memoria, pretende diferenciar al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención de los polipéptidos receptores unidos a la membrana, tales como, p. ej., el receptor CCR6 unido a la membrana. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención todo polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural que, en condiciones endógenas, esté disuelto en un fluido corporal de un sujeto (tal como, p. ej., suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina) y que no esté integrado o unido a una membrana celular se considera "soluble".

Así, en un ejemplo, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención puede ser un polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural que haya sido aislado de una muestra de un sujeto.

En otro ejemplo, un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención también puede ser un polipéptido recombinante que se ha generado *in vitro* y que es abundantemente soluble en soluciones acuosas, tales como, p. ej., soluciones acuosas fisiológicas, preferiblemente en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. Lo más preferiblemente en suero.

En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención es al menos 50 %, preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 % o lo más preferiblemente al menos 90 % soluble en una solución acuosa, preferiblemente en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. En una realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la

invencción es al menos 75 % soluble en una solución acuosa, preferiblemente en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. Para determinar la solubilidad porcentual de un polipéptido CCR6 soluble aislado según la invencción, el experto en la técnica, p. ej., puede centrifugar una muestra que contiene dicho polipéptido y posteriormente medir la cantidad de polipéptido presente en el sobrenadante y la cantidad total de polipéptido presente en la muestra. Entonces puede calcularse la solubilidad porcentual en términos de porcentaje de la cantidad de polipéptido presente en el sobrenadante respecto a la cantidad total de polipéptido en la muestra antes de centrifugar.

En una realización preferida, la solubilidad del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invencción en las soluciones acuosas mencionadas anteriormente no requiere la adición de detergentes. En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invencción no comprende un dominio transmembrana.

En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad del 90 %, 95 % o 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

En otra realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) es la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. Si el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invencción consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 1, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invencción preferiblemente tiene una longitud de 48 aminoácidos.

En otra realización preferida, en la secuencia de aminoácidos según (a) no se han cambiado (es decir, eliminado, insertado, modificado y/o sustituido por otros aminoácidos) más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

Una sustitución en una secuencia de aminoácidos según la invencción puede ser una sustitución conservadora o no conservadora, preferiblemente es una sustitución conservadora. En algunas realizaciones, una sustitución también incluye la sustitución de un aminoácido que existe de manera natural por un aminoácido no que existe de manera natural. Una sustitución conservadora comprende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene unas propiedades químicas similares a las del aminoácido que sustituye. Preferiblemente, la sustitución conservadora es una sustitución que se selecciona del grupo que consiste en:

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

Un aminoácido básico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en arginina, histidina y lisina. Un aminoácido ácido, es preferiblemente aspartato o glutamato.

Un aminoácido aromático se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina y triptófano. Un aminoácido alifático no polar se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, metionina e isoleucina. Un aminoácido polar no cargado se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en serina, treonina, cisteína, prolina, asparagina y glutamina. Al contrario que la sustitución conservadora de un aminoácido, una sustitución no conservadora de un aminoácido es la sustitución de un aminoácido por cualquier aminoácido que no esté incluida en las sustituciones conservadoras definidas anteriormente en (i) a (v).

Los aminoácidos del polipéptido CCR6 soluble aislado según la invencción también pueden estar modificados, p. ej., químicamente modificados. Por ejemplo, la cadena lateral o el extremo amino o carboxi libre de un aminoácido de la proteína se puede modificar, p. ej., por glucosilación, amidación, fosforilación, ubiquitinación, etc. Para aumentar la estabilidad intracelular y/o para reducir la respuesta inmunitaria de un sujeto al polipéptido CCR6 soluble aislado según la invencción, el polipéptido CCR6 soluble aislado según la invencción, puede modificarse, p. ej., por acetilación, PEGilación, amidación o incorporación de un D-aminoácido.

En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40 o al menos 45 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. En una realización particularmente preferida, la secuencia de

aminoácidos según (a) comprende al menos 8, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 40 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

5 En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, más preferiblemente al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 96 %, más preferiblemente al menos el 97 %, más preferiblemente al menos el 98 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 % o lo más preferiblemente el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 8, más preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 30, más preferiblemente al menos 35, más preferiblemente al menos 40 y lo más preferiblemente al menos 45 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

10 En otra realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 % o al menos el 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 40 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. En la realización más preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 o presenta una identidad de al menos el 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1 y comprende al menos 25 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

15 En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de menos de 3000 aminoácidos, preferiblemente menos de 2000 aminoácidos, más preferiblemente menos de 1000 aminoácidos, más preferiblemente menos de 500 aminoácidos, más preferiblemente menos de 300 aminoácidos, más preferiblemente menos de 200 aminoácidos, más preferiblemente menos de 100 aminoácidos o lo más preferiblemente menos de 80 aminoácidos.

20 En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 8 y al menos 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 8 y al menos 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y al menos 1000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y 500 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y 300 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y 200 aminoácidos, e incluso más preferiblemente entre al menos 8 y 100 aminoácidos o entre al menos 8 y 80 aminoácidos.

25 En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 20 y al menos 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 20 y al menos 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 20 y al menos 1000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 20 y 500 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 20 y 300 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 20 y 200 aminoácidos, e incluso más preferiblemente entre al menos 20 y 100 aminoácidos o entre al menos 20 y 80 aminoácidos. En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 30 y al menos 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 30 y al menos 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 30 y al menos 1000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 30 y 500 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 30 y 300 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 30 y 200 aminoácidos, e incluso más preferiblemente entre al menos 30 y 100 aminoácidos o entre al menos 30 y 80 aminoácidos.

30 En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 40 y al menos 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 40 y al menos 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 40 y al menos 1000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 40 y 500 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 40 y 300 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 40 y 200 aminoácidos, e incluso más preferiblemente entre al menos 40 y 100 aminoácidos o entre al menos 40 y 80 aminoácidos. En otra realización preferida adicional, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 50 y al menos 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 50 y al menos 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 50 y al menos 1000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 50 y 500 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 50 y 300 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 50 y 200 aminoácidos, e incluso más preferiblemente entre al menos 50 y 100 aminoácidos o entre al menos 50 y 80 aminoácidos. En una realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 20 y al menos 500 aminoácidos.

35 En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de al menos 8, más preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 30, más preferiblemente al menos 40, más preferiblemente al menos 45 e incluso más preferiblemente al menos 48 aminoácidos. En una realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de al menos 30, al menos 40 o al menos 48 aminoácidos. En una realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención tiene una longitud de 48 aminoácidos.

Un fragmento es habitualmente una porción de la secuencia de aminoácidos a la que se refiere.

En una realización preferida, el fragmento según (b) tiene al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27 o al menos 28 aminoácidos de longitud. En una realización preferida, el fragmento según (b) tiene una longitud de al menos 10, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos. En una realización particularmente preferida, el fragmento según (b) tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 30 o lo más preferiblemente al menos 40 aminoácidos. En otra realización particularmente preferida, el fragmento según (b) tiene una longitud de al menos 40 aminoácidos.

La capacidad de un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención de unirse a la CCL18 y/o la CCL20 puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, el experto en la técnica puede determinar si un polipéptido receptor CCR6 soluble según la invención es capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20 usando un sistema de doble híbrido en levadura o un ensayo bioquímico tal como p.ej. un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de unión a radioligandos cuantitativo, un ensayo de resonancia de plasmones o cualquier otro método conocido por el experto en la técnica. A la hora de utilizar ensayos de inmunoprecipitación o de resonancia de plasmones, es útil fusionar al menos una de las proteínas a un marcador de afinidad tag como His-Tag, GST-Tag u otro, como es conocido en la técnica de la bioquímica.

En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención es capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20.

La expresión "inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20" como se emplea en la presente memoria quiere decir reducir o anular la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 mediante el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 descrito en la presente memoria (tal como p.ej. un anticuerpo específico para la CCL18 y/o la CCL20).

Por ejemplo, en una realización el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 descrito en la presente memoria, al unirse a la CCL18 y/o la CCL20 puede inhibir la interacción de la CCL18 y/o la CCL20 con el receptor CCR6 unido a la membrana, de tal forma que la CCL18 o la CCL20 no puedan activar dicho receptor. Así, una inhibición de la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 puede deberse, p.ej., a una inhibición de la interacción de la CCL18 y/o la CCL20 con el receptor CCR6 unido a la membrana. En otra realización, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 descrito en la presente memoria, al unirse a la CCL18 y/o la CCL20 puede inhibir la actividad quimiotáctica de la CCL18 y/o la CCL20. En una realización preferida adicional, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 descrito en la presente memoria al unirse a la CCL18 y/o la CCL20 puede inhibir la interacción de la CCL18 y/o la CCL20 con el receptor CCR6 unido a la membrana y la actividad quimiotáctica de la CCL18 y/o la CCL20. El polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 descrito en la presente memoria puede, p.ej., inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 secuestrando dichas proteínas y reduciendo así su biodisponibilidad.

La capacidad del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o de cualquier otro compuesto a analizar de inhibir la actividad de los ligandos del receptor CCR6 CCL18 y/o CCL20 puede determinarse, p.ej., midiendo la actividad del receptor CCR6 unido a la membrana.

En un ejemplo, el experto en la técnica, p.ej., puede determinar la capacidad del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o de cualquier otro compuesto a analizar de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 incubando células que expresan el receptor CCR6 unido a la membrana en presencia de la CCL18 o la CCL20, y en presencia o ausencia del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o de cualquier otro compuesto a analizar y posteriormente lisar las células y analizar la fosforilación de la ERK, una molécula situada más abajo en la vía de señalización de CCR6, por Western blot. En este ejemplo un nivel de fosforilación de la ERK en presencia del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o de cualquier otro compuesto a analizar menor que el nivel de fosforilación de la ERK en ausencia del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o de cualquier otro compuesto a analizar, indica que el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o el otro compuesto analizado es capaz de inhibir la activación del receptor CCR6 unido a la membrana por la CCL18 y/o la CCL20. Un método para determinar la fosforilación de la ERK por Western blot se describe, p.ej., en Lin et al. J Proteome Res. 2010 ene; 9(1):283-97. En un ejemplo análogo, puede analizarse la fosforilación de otros efectores situados más abajo del receptor CCR6 tales como, p.ej., las cinasas Akt, SAPK/JNK, la fosfatidilinositol 3-cinasa o la fosfolipasa C para determinar si el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o cualquier otro compuesto a analizar es capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20.

La capacidad del polipéptido CCR6 soluble aislado según la invención o cualquier otro compuesto a analizar de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 también puede determinarse, p.ej., midiendo la actividad quimiotáctica de la CCL18 y/o la CCL20.

5 La actividad quimiotáctica de la CCL18 y/o la CCL20 puede determinarse, p.ej., realizando ensayos de quimiotaxis en presencia o ausencia del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o cualquier otro compuesto a analizar. El experto en la técnica puede realizar, p.ej., un ensayo de quimiotaxis en cámara. Un ejemplo de este tipo de ensayo se describe, p.ej., en Christopherson et al. J Pharmacol Exp Ther. 2002 jul;302(1):290-5. La menor actividad quimiotáctica de la CCL18 y/o la CCL20 en presencia del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, o de otro compuesto a analizar, indica que el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o el otro compuesto analizado es capaz de inhibir la actividad quimiotáctica de la CCL18 y/o la CCL20.

15 Asimismo, la capacidad del polipéptido CCR6 soluble aislado según la invención, o de cualquier otro compuesto a analizar, de inhibir la actividad de la CCL18 también puede determinarse, p.ej., midiendo la liberación del FGF2 estimulada por la CCL18 o la inducción de colágeno y/o α -SMA por la CCL18 en presencia de dicho polipéptido CCR6 soluble aislado u otro compuesto. En este ejemplo una inhibición del aumento del nivel de FGF2 inducido por la CCL18 y/o una inhibición de la inducción de la expresión de colágeno y/o de α -SMA mediada por la CCL18 en presencia del polipéptido CCR6 soluble aislado o de otro compuesto a analizar relativas a un control, al que no se ha añadido el polipéptido CCR6 soluble aislado u otro compuesto, indica que el polipéptido CCR6 soluble aislado u otro compuesto es capaz de inhibir la actividad de la CCL18. Además, para poder determinar la capacidad del polipéptido CCR6 soluble aislado según la invención o de cualquier otro compuesto a analizar de inhibir la actividad de la CCL18, el experto en la técnica también puede determinar si estos compuestos reducen o anulan la inducción por la CCL18 de la transición epitelio-mesénquima (TEM).

20 Como alternativa o además, se puede emplear cualquier otro método que sea adecuado para determinar la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 y que estén comprendidos en la técnica y sean conocidos por las personas de experiencia ordinaria en la técnica.

25 El polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, o cualquier otro compuesto que sea capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20, inhibirá la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un control. En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, o cualquier otro compuesto que sea capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20, inhibe la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 al menos un 50 %, al menos un 60 % o al menos un 70 %. En otras realizaciones preferidas el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, o cualquier otro compuesto descrito en la presente memoria que sea capaz de inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20, puede inhibir la actividad de la CCL18 y/o la CCL20 un 100 %.

30 En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención no comprende un dominio transmembrana.

35 El término "dominio transmembrana" se usa en la presente memoria según el significado convencional y conocido en la técnica. Un dominio transmembrana puede ser, p.ej., una porción de una proteína que comprende un porcentaje alto de restos de aminoácidos hidrófobos, no polares, tales como, p. ej., valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina o triptófano, y que hace que una proteína atraviese una membrana bicapa lipídica. La expresión "porcentaje alto de restos de aminoácidos hidrófobos, no polares" quiere decir que al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 60 %, más preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 90 %, lo más preferiblemente al menos el 95 % o más de los aminoácidos de un dominio transmembrana son restos de aminoácidos hidrófobos, no polares.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención.

45 En una realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de menos de 9000 nucleótidos, menos de 8000 nucleótidos, menos de 7000 nucleótidos, menos de 6000 nucleótidos, menos de 5000 nucleótidos, menos de 4000 nucleótidos, menos de 3000 nucleótidos, menos de 2000 nucleótidos, menos de 1000 nucleótidos, menos de 500 nucleótidos o menos de 300 nucleótidos.

50 En una realización preferida adicional, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 24 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 24 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 24 y 500

nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 24 y 300 nucleótidos. En otra realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 60 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 60 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 60 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 60 y 500 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 60 y 300 nucleótidos. En otra realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 90 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 90 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 90 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 90 y 500 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 90 y 300 nucleótidos. En otra realización preferida adicional, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 120 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 120 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 120 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 120 y 500 nucleótidos. En otra realización preferida adicional, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 140 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 140 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 140 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 140 y 500 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 140 y 300 nucleótidos.

En otra realización preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, al menos 1000 nucleótidos, al menos 1500 nucleótidos, al menos 2000 nucleótidos, al menos 2500 nucleótidos, al menos 3000 nucleótidos o al menos 3500 nucleótidos. En una realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 24, al menos 50 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos. En una realización particularmente preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 140 nucleótidos.

En otra realización particularmente preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de 144 nucleótidos.

Resultará evidente para el experto en la técnica que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido según la invención dado, puede ser codificado por distintas secuencias de nucleótidos.

En una realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 8.

En otra realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 8. En una realización particularmente preferida, el polinucleótido según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 % o incluso más preferiblemente al menos el 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 8.

En una realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 8. En otra realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia según la SEQ ID NO.: 8.

Un polinucleótido aislado según la invención puede ser una molécula de ARN o ADN monocatenario o bicatenario.

En algunas realizaciones el polinucleótido aislado según la invención puede estar insertado en un vector de expresión. El vector de expresión puede ser, p. ej., un vector de expresión procariota o eucariota tal como, p. ej., un

plásmido, un minicromosoma, un cósmido, un bacteriófago, un vector retroviral o cualquier otro vector conocido por el experto en la técnica. El experto en la técnica sabrá cómo seleccionar un vector adecuado según la necesidad específica.

5 La presente invención, por tanto, también se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido según la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para cuantificar la concentración de un polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra líquida de un sujeto, en el que el método comprende las etapas de:

10 (a) inmovilizar una molécula de captura para dicho polipéptido receptor CCR6 soluble sobre un soporte sólido;

(b) añadir la muestra líquida del sujeto;

15 (c) opcionalmente añadir un ligando de dicho polipéptido receptor CCR6 soluble, en el que dicho ligando es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20 o la SEQ ID NO.: 21;

(d) añadir un agente de detección específico para un ligando según (c), en el que dicho agente de detección comprende un marcador;

(e) cuantificar la señal del agente de detección según (d).

20 En una realización preferida del método anterior, las etapas (a), (b), (c), (d), (e) se realizan en ese orden. El método es preferiblemente se realiza *in vitro*.

25 La expresión "polipéptido receptor CCR6 soluble" como se emplea en la presente memoria se refiere a un polipéptido receptor CCR6 que no está integrado ni unido a una membrana celular. Un "polipéptido receptor CCR6 soluble" por tanto es distinto de un "receptor CCR6 unido a la membrana". Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, todo polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural, que en condiciones endógenas esté disuelto en un fluido corporal de un sujeto (tal como, p. ej., suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina) y que no esté integrado o unido a una membrana celular se considera "soluble".

30 Así, en un ejemplo, un "polipéptido receptor CCR6 soluble" en el contexto del método según la invención referido puede ser un polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural. En una realización preferida, dicho polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural se puede detectar con un anticuerpo anti-CCR6 dirigido al dominio extracelular del extremo N del CCR6.

En otra realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1; y

35 (b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);

en el que dicho polipéptido receptor CCR6 soluble aislado es capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20.

40 En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 % o incluso más preferiblemente al menos el 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. En la realización más preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

En otra realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 1.

45 En otro ejemplo, un "polipéptido receptor CCR6 soluble aislado" en el contexto del método de la invención referido también puede ser un "polipéptido receptor CCR6 soluble aislado" recombinante que se ha generado *in vitro* y que es abundantemente soluble en soluciones acuosas, tales como, p. ej., soluciones acuosas fisiológicas, preferiblemente en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble es el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención.

50 Preferiblemente, un "polipéptido receptor CCR6 soluble" en el contexto del método según la invención referido es al menos 50 %, más preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al

menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 % o lo más preferiblemente al menos 90 % soluble en una solución acuosa, preferiblemente en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. En una realización particularmente preferida, un "polipéptido receptor CCR6 soluble" en el contexto del método según la invención referido es al menos 75 % soluble en una solución acuosa, preferiblemente en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. Para determinar la solubilidad porcentual de un "polipéptido receptor CCR6 soluble", el experto en la técnica puede, p. ej., centrifugar una muestra que contiene el polipéptido receptor CCR6 soluble y posteriormente medir la cantidad de dicho polipéptido en el sobrenadante y la cantidad total de dicho polipéptido en la muestra. Entonces puede calcularse la solubilidad porcentual en términos de porcentaje de la cantidad del polipéptido receptor CCR6 presente en el sobrenadante de la cantidad total de polipéptido receptor CCR6 presente en la muestra antes de centrifugar.

En una realización preferida del método según la invención referido, la muestra líquida de un sujeto se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva y orina. En una realización particularmente preferida, la muestra líquida de un sujeto es suero. Preferiblemente, la muestra está aislada del cuerpo del sujeto del que se obtiene.

En una realización preferida, dicha molécula de captura de (a) y/o dicho agente de detección de (d) es un anticuerpo o un aptámero.

Un "aptámero" puede ser un aptámero de ADN, ARN o peptídico. Un aptámero polinucleotídico tiene preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 10 y 60 nucleótidos de longitud. Los aptámeros pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica, como, p. ej., métodos de síntesis, recombinación y purificación.

Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo también puede seleccionarse de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂.

Una molécula de captura o un agente de detección es específico para un compuesto dado, tal como, p. ej., un polipéptido receptor CCR6 soluble o un ligando de un polipéptido receptor CCR6 soluble, si se une a dicho compuesto con una afinidad mayor que a cualquier otro compuesto de una muestra (es decir un compuesto no diana). Preferiblemente, una molécula de captura o un agente de detección es específico para un compuesto dado si se une solo a dicho compuesto y no se une en absoluto a otros compuestos no diana. El agente de detección de (d) comprende un marcador. Se puede emplear cualquier marcador adecuado que pueda unirse al agente de detección. Preferiblemente, el marcador es detectable o cataliza una reacción enzimática del producto que es detectable.

En una realización preferida, el marcador está unido de forma covalente o no covalente al agente de detección. Los ejemplos de marcadores que pueden unirse al agente de detección incluyen, p. ej., tintes fluorescentes tales como, p. ej., tintes de cianina, p. ej., Cyanine 3, Cyanine 5 o Cyanine 7, tintes Alexa Fluor, p. ej., Alexa 594, Alexa 488 o Alexa 532, tintes de la familia de la fluoresceína, R-ficoeritrina, Texas Red, rodamina e isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los agentes de detección también pueden marcarse con enzimas tales como, p. ej., peróxidas de rábano, fosfatasa alcalina o beta-lactamasa, con radioisótopos tales como, p. ej., ³H, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S o ¹²⁵I, con metales tales como, p. ej., oro o con biotina. En una realización particularmente preferida, el marcador es un marcador fluorescente. En otra realización, el marcador también puede ser un agente de detección que comprende un marcador como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Preferiblemente un agente de detección secundario es capaz de unirse específicamente al agente de detección descrito anteriormente. En una realización particularmente preferida, un agente de detección secundario es un anticuerpo.

En una realización preferida, el agente de detección de (d) es específico para un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20 o la SEQ ID NO.: 21. En una realización preferida adicional, el agente de detección de (d) es específico para un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18. En otra realización preferida, el agente de detección de (d) es específico para un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 19. En otra realización preferida más, el agente de detección de (d) es específico para un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 20. En una realización preferida adicional, el agente de detección de (d) es específico para un polipéptido que comprende o

consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 21.

- 5 En la realización más preferida, el agente de detección de (d) es específico para un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18.

- 10 Preferiblemente dicho soporte sólido de (a) es una superficie de plástico o vidrio. Para poder inmovilizar una molécula de captura sobre el soporte sólido, en algunas realizaciones, el soporte sólido puede estar previamente recubierto con un reactivo que se selecciona del grupo que consiste en carbodiiminas, imidoésteres o ésteres de succinimidilo, ácido etanosulfónico, glutaraldehído y polilisina.

En una realización preferida, el método según la invención referido se realiza en una microplaca.

- 15 En otra realización preferida, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20 o la SEQ ID NO.: 21. En una realización preferida adicional, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18. En otra realización preferida, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 19. En otra realización preferida más, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 21.

- 35 En una realización particularmente preferida, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 %, de al menos el 98 % o del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19 o la SEQ ID NO.: 20 o la SEQ ID NO.: 21. En una realización particularmente preferida adicional, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 %, de al menos el 98 % o del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18. En otra realización particularmente preferida, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 %, de al menos el 98 % o del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 19. En otra realización particularmente preferida más, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 %, de al menos el 98 % o del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 20. En otra realización particularmente preferida más, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 95 %, de al menos el 98 % o del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 21.

- 45 En una realización particularmente preferida adicional, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 95 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18, la SEQ ID NO.: 19, la SEQ ID NO.: 20 o la SEQ ID NO.: 21.

- 50 En otra realización particularmente preferida más, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 95 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18. En la realización más preferida, el ligando según (c) es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 18.

El método según la invención referido se puede utilizar para cuantificar la cantidad total de polipéptido receptor CCR6 soluble presente en una muestra líquida de un sujeto o la cantidad de polipéptido receptor CCR6 soluble unido a la CCL18, la CCL20 y/o la beta-defensina presente en una muestra líquida de un sujeto.

- 55 Si se va a cuantificar la cantidad total de polipéptido receptor CCR6 soluble en la muestra líquida, es preferible añadir el ligando en la etapa (c) para saturar el polipéptido receptor CCR6 presente en la muestra con ligando. Si se va a cuantificar la cantidad de polipéptido receptor CCR6 soluble unido a la CCL18, la CCL20 y/o la beta defensina

en la muestra líquida del sujeto, es preferible no añadir el ligando en la etapa (c). Entonces el agente de detección de (d) solo detectará el polipéptido receptor CCR6 soluble unido al ligando presente en la muestra líquida.

5 La elección de un método adecuado para cuantificar la señal del agente de detección de la etapa (e) dependerá de la naturaleza del marcador del agente de detección. Los métodos adecuados para cuantificar la señal de un agente de detección marcado son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, si el marcador es una enzima (tal como, p. ej., fosfatasa alcalina), puede añadirse un sustrato incoloro (tal como, p. ej., *p*-nitrofenil fosfato) que la enzima convierte en un producto con color. Tras la adición de dicho sustrato, se puede medir la cantidad de producto con color generado por la enzima, p. ej., por espectrofotometría.

10 En otro ejemplo, si el marcador es un tinte fluorescente, la señal fluorescente puede cuantificarse, p. ej., usando un escáner láser.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un método para detectar y/o determinar el pronóstico de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto, en el que el método comprende la etapa de determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra de dicho sujeto.

Dicho método preferiblemente se realiza *in vitro*.

15 Un "polipéptido receptor CCR6 soluble" en el contexto del método según la invención referido es preferiblemente un polipéptido receptor CCR6 soluble que existe de manera natural.

En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:

20 (a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1; y

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);

en el que dicho polipéptido receptor CCR6 soluble aislado es capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20.

25 En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 % o incluso más preferiblemente al menos el 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1. En la realización más preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

30 En otra realización particularmente preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 1.

En una realización preferida adicional, el polipéptido receptor CCR6 soluble es un polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando. En este contexto la expresión "libre de ligando" quiere decir que el polipéptido receptor CCR6 soluble no está unido a un ligando, tal como, p. ej., CCL 18 o CCL20.

35 En una realización, se puede determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble poniendo en contacto la muestra del sujeto con un agente de detección específico para CCR6, preferiblemente con un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble. Un agente de detección es específico para el polipéptido receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble, si se une al polipéptido receptor CCR6 o al polipéptido receptor CCR6 soluble con una afinidad mayor que a cualquier otro compuesto presente en una muestra (es decir un compuesto no diana). Preferiblemente, un agente de detección es específico para el polipéptido receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble si solo se une al polipéptido receptor CCR6 o al polipéptido receptor CCR6 soluble y no se une en absoluto a un compuesto no diana. En una realización preferida, un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble se une al dominio extracelular de CCR6. En una realización particularmente preferida, un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble se une a la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

45 Un agente de detección preferido para detectar el polipéptido receptor CCR6 soluble es un anticuerpo o un aptámero. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el agente de detección también se puede seleccionar de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂. En una realización preferida, se pueden emplear anticuerpos específicos para el polipéptido receptor CCR6 o el polipéptido receptor CCR6 soluble.

50 Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden producirse según cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica. Los anticuerpos policlonales pueden producirse, p. ej., inmunizando a animales con el antígeno elegido, mientras que los anticuerpos monoclonales de especificidad definida pueden producirse, p. ej.,

usando la tecnología de hibridomas desarrollada por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, 1976, Eur. J. Immunol., 6:511-519).

5 En una realización preferida, un agente de detección como se ha descrito anteriormente en la presente memoria puede comprender un marcador detectable. Se puede emplear cualquier marcador adecuado que pueda unirse al agente de detección. En una realización preferida, el marcador detectable está unido de forma covalente o no covalente al agente de detección. Los ejemplos de marcadores que pueden unirse al agente de detección incluyen, p. ej., tintes fluorescentes tales como, p. ej., tintes de cianina, p. ej., Cyanine 3, Cyanine 5 o Cyanine 7, tintes Alexa Fluor, p. ej., Alexa 594, Alexa 488 o Alexa 532, tintes de la familia de la fluoresceína, R-ficoeritrina, Texas Red, rodamina e isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los agentes de detección también pueden marcarse con enzimas
10 tales como, p. ej., peróxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o beta-lactamasa, con radioisótopos tales como, p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S o ^{125}I , con metales tales como, p. ej., oro o con biotina. En otra realización preferida, el agente de detección también puede ser detectado por un agente de detección secundario que comprende un marcador según se ha descrito anteriormente.

15 Preferiblemente un agente de detección secundario es capaz de unirse específicamente al agente de detección descrito anteriormente. En una realización particularmente preferida, un agente de detección secundario es un anticuerpo.

20 Para determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra de un sujeto se puede emplear cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble presente en una muestra de un sujeto se puede detectar, p. ej., usando un inmunoensayo como, por ejemplo, ELISA, Western blot, inmunoprecipitación o radioinmunoensayo. El nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble presente en una muestra de un sujeto también se puede detectar usando el método descrito anteriormente para cuantificar la cantidad de un polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra líquida de un sujeto.

25 La expresión "detectar una enfermedad pulmonar intersticial" o "detectar un cáncer" como se emplea en la presente memoria quiere decir identificar la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de una enfermedad o trastorno canceroso en un sujeto o en una muestra de un sujeto. Preferiblemente, con anterioridad se desconoce que dicho sujeto padezca una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer respectivamente. En una realización preferida, se sospecha que el sujeto padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer.

30 Para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto, en algunas realizaciones se determinará el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble en la muestra del sujeto además de medir o determinar la cantidad de otros compuestos o factores compatibles con la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer respectivamente. Por ejemplo, se podrán detectar marcadores conocidos para la enfermedad pulmonar intersticial, tal como, p. ej., marcadores séricos, proteínas del surfactante (SP) A y D, o marcadores conocidos del cáncer en la misma muestra o en una muestra diferente del sujeto. Otros marcadores adecuados son conocidos por el experto en la técnica.

35 En una realización preferida, el método descrito anteriormente comprende además la etapa de comparar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble determinado en la muestra del sujeto y el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble determinado en un control en la que, cuando el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble determinado en la muestra del sujeto es menor que el nivel del control, indica la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en el sujeto.

40 En otra realización preferida, el método descrito anteriormente comprende además la etapa de comparar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando determinado en la muestra del sujeto y el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando en un control en la que, cuando el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando determinado en la muestra del sujeto es menor que el nivel del control, indica la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en el sujeto. En este contexto la expresión "libre de ligando" quiere decir que el polipéptido receptor CCR6 soluble no está unido a un ligando, tal como, p. ej., CCL 18 o CCL20.
45

Para determinar la cantidad de polipéptido receptor CCR6 soluble total o la cantidad de polipéptido receptor CCR6 soluble unido a ligando o libre de ligando en una muestra de un sujeto, el experto en la técnica puede emplear, p. ej., el método descrito anteriormente para cuantificar la cantidad de polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra líquida de un sujeto.

50 En una realización preferida, el control es una muestra de un sujeto sano. En una realización preferida, cuando el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble determinado en la muestra del sujeto es menor que el del control, indica la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en el sujeto. Preferiblemente, el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble determinado en la muestra del sujeto es al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces,
55 al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces o al menos 10000 veces menor que el del control. Lo más preferiblemente, el nivel de receptor CCR6 soluble determinado en la muestra del sujeto es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces menor

que el del control. En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble es un polipéptido receptor soluble libre de ligando.

5 En otra realización preferida, el control también puede ser una muestra obtenida de un sujeto que se sabe que padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer (sujeto de control), es decir un sujeto que ha sido diagnosticado de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer, en el que el cáncer es preferiblemente un adenocarcinoma, lo más preferiblemente un adenocarcinoma de pulmón. En estos casos, cuando el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble en la muestra del sujeto es menor que el del control, indica progresión de la enfermedad pulmonar intersticial o del cáncer en el sujeto del que se obtuvo la muestra con respecto al sujeto de control. En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble es el polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando.

10 En el contexto de la presente invención, el control preferiblemente está aislado del cuerpo del sujeto del que se obtiene.

15 La expresión "determinar el pronóstico de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer" como se emplea en la presente memoria se refiere a predecir la evolución o del desenlace de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer diagnosticado o detectado, p. ej., durante un periodo de tiempo concreto, p. ej., durante el tratamiento o después del tratamiento. La expresión también puede referirse a determinar la probabilidad de supervivencia o de recuperación de la enfermedad pulmonar intersticial o el cáncer, además de a predecir el tiempo de supervivencia previsto de un sujeto.

20 Por ejemplo, se puede determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble en una muestra de un sujeto en un tiempo dado y compararse con el nivel respectivo de polipéptido receptor CCR6 soluble determinado en una muestra del mismo sujeto en un tiempo posterior, donde el aumento o descenso del nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble indica mejoría o empeoramiento de la enfermedad. Este enfoque puede emplearse, p. ej., durante el tratamiento médico de un paciente que padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer.

25 Así, en una realización preferida, el método según la invención referido también puede usarse para controlar la eficacia del tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer *in vitro*. La eficacia del tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer puede controlarse, p. ej., detectando el nivel de polipéptido CCR6 soluble en distintas muestras de un sujeto obtenidas durante un periodo de tiempo dado mientras el sujeto del que se obtuvieron las muestras estaba siendo tratado de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer. El aumento o descenso del nivel de polipéptido CCR6 soluble presente en las muestras extraídas del sujeto durante un periodo de tiempo dado indicará entonces la eficacia del tratamiento. En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble es el polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando.

30 En una realización preferida, el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble presente en el control puede determinarse al mismo tiempo que el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble presente en la muestra del sujeto.

35 En otra realización preferida, el control puede ser un valor predeterminado. Este valor puede basarse, p. ej., en los resultados de los experimentos previos para determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble presente en una o más muestras de un sujeto sano o de un sujeto que se sabe que padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer. En algunas realizaciones puede derivarse un valor predeterminado de una base de datos.

En una realización preferida, el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble puede compararse con más de un control, p. ej., con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 controles.

40 Preferiblemente, la muestra del sujeto que se usa en los métodos según la invención está aislada del cuerpo del sujeto. La muestra es preferiblemente una muestra líquida. En una realización preferida, la muestra líquida se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva u orina. En una realización particularmente preferida, la muestra es suero. Preferiblemente, la muestra está libre de células y de membranas. Para eliminar las células y las membranas celulares de la muestra, el experto en la técnica puede, p. ej., centrifugar la muestra antes de determinar el nivel del polipéptido receptor CCR6 soluble.

45 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer que comprende un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble.

50 En una realización preferida, un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble se une específicamente al dominio extracelular de CCR6. En una realización particularmente preferida, un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble se une específicamente a la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.

En una realización preferida, dicho agente de detección es un anticuerpo o un aptámero.

55 Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el agente de detección también se puede seleccionar de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de

cadena sencilla, díacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂. En una realización preferida, se pueden emplear anticuerpos específicos para el polipéptido receptor CCR6 o el polipéptido receptor CCR6 soluble.

5 Un "aptámero" específico para el polipéptido receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble puede ser, p. ej., un aptámero de ADN, ARN o peptídico.

Un aptámero polinucleotídico tiene preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 10 y 60 nucleótidos de longitud.

10 Los aptámeros pueden prepararse por cualquier método conocido, por ejemplo por métodos de síntesis, recombinación o purificación y pueden usarse solos o combinados con otros aptámeros específicos para el polipéptido receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble.

En una realización preferida, el polipéptido receptor CCR6 soluble en el contexto del método descrito anteriormente de la invención es un polipéptido receptor CCR6 soluble libre de ligando.

15 En una realización preferida del método descrito anteriormente, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histiocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

20 En otra realización preferida del método descrito anteriormente, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

25 En una realización particularmente preferida del método descrito anteriormente, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. Lo más preferiblemente, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática.

En una realización preferida adicional, del método descrito anteriormente el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon.

30 En una realización particularmente preferida del método descrito anteriormente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Lo más preferiblemente, el cáncer es adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón.

35 La presente invención, en un aspecto adicional, también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20.

40 Una composición farmacéutica según la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos con recubrimiento pelicular, grageas, gránulos, cápsulas de gelatina duras y blandas, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones; o por vía rectal, por ejemplo en forma de supositorios. La administración también puede ser por vía parenteral, por ejemplo por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa en forma de soluciones para inyección o infusión. Otras formas de administración adecuadas son, por ejemplo, la administración percutánea o tópica, por ejemplo en forma de ungüentos, tinturas, pulverizadores o sistemas terapéuticos transdérmicos o la administración por inhalación en forma de pulverización nasal o mezclas en aerosol.

45 En una realización preferida, una composición farmacéutica según la invención se administra por vía parenteral, p. ej., en forma de soluciones para inyección o infusión, por vía oral, p. ej., en forma de comprimido, píldora, pastilla o cápsula o por inhalación.

50 Para la producción de las píldoras, comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina duras se puede emplear, por ejemplo, lactosa, almidón, por ejemplo almidón de maíz o derivados de almidón, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Los vehículos para las cápsulas de gelatina blandas y para los supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o hidrogenados, etc. Los vehículos adecuados para la preparación de soluciones, por ejemplo de soluciones inyectables o de emulsiones o jarabes son, por ejemplo, agua, solución de cloruro sódico fisiológica, alcoholes como etanol, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertida, glucosa, manitol, aceites vegetales, etc.

- 5 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas también contienen aditivos, como por ejemplo cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, humectantes, estabilizantes, emulsionantes, dispersantes, conservantes, edulcorantes, colorantes, aromas, espesantes, diluyentes, sustancias tamponadoras, disolventes, solubilizadores, agentes para conseguir un efecto retardado (depot), sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento o antioxidantes.
- Pueden encontrarse ejemplos de excipientes adecuados para las distintas formas de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, p. ej., en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller.
- 10 En una realización preferida, el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20 se selecciona del grupo que consiste en el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, una molécula pequeña capaz de unirse a la CCL18 o la CCL20, un aptámero específico para la CCL18 o la CCL20, un anticuerpo específico para la CCL18 o la CCL20, una molécula antisentido adecuada para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 y una molécula de ARNs adecuada para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20.
- 15 La expresión "molécula pequeña", como se emplea en la presente memoria, se refiere a compuestos orgánicos pequeños de bajo peso molecular.
- Un molécula pequeña puede ser un compuesto sintético que no existe de manera natural o un compuesto natural aislado o que se sabe que existe en fuentes naturales, tales como, p. ej., células, plantas, hongos, animales y similares. Un molécula pequeña en el contexto de la presente invención preferiblemente tiene un peso molecular de menos de 5000 Dalton, más preferiblemente de menos de 4000 Dalton, más preferiblemente de menos de 3000 Dalton, más preferiblemente de menos de 2000 Dalton o incluso más preferiblemente de menos de 1000 Dalton. En una realización particularmente preferida, una molécula pequeña en el contexto de la presente invención tiene un peso molecular de menos de 800 Dalton.
- 20 En otra realización preferida, una molécula pequeña en el contexto de la presente invención tiene un peso molecular de 50 a 3000 Dalton, preferiblemente de 100 a 2000 Dalton, más preferiblemente de 100 a 1500 Dalton e incluso más preferiblemente de 100 a 1000 Dalton. Lo más preferiblemente, una molécula pequeña en el contexto de la presente invención tiene un peso molecular de 100 a 800 Dalton.
- Las moléculas pequeñas capaces de unirse a la CCL18 o a la CCL20 pueden identificarse, p. ej., mediante búsquedas en bibliotecas de compuestos pequeños.
- Un "aptámero" puede ser un aptámero de ADN, ARN o peptídico específico para la CCL18 o para la CCL20.
- 30 Un aptámero polinucleotídico tiene preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 10 y 60 nucleótidos de longitud.
- Los aptámeros pueden prepararse mediante cualquier método conocido, por ejemplo métodos de síntesis, recombinación y purificación y pueden usarse solos o combinados con otros aptámeros específicos para la CCL18 o para la CCL20.
- 35 Un anticuerpo específico para la CCL 18 o para la CCL20 puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo también puede seleccionarse de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂ con la condición de que dichas variantes o fragmentos de anticuerpos sean específicos para la CCL18 o la CCL20.
- 40 La expresión "molécula antisentido adecuada para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20" se refiere a un polinucleótido que es complementario al ARNm de CCL18 o al ARNm de CCL20 respectivamente. Es preferible que dicha molécula antisentido sea adecuada para usar en una estrategia de molécula antisentido para inhibir la traducción del ARNm de CCL18 o del ARNm de CCL20 en una célula. Dicha molécula antisentido puede ser una molécula de ADN o ARN y puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización preferida, la molécula antisentido es una molécula de ADN monocatenario o una molécula de ARN monocatenario.
- 45 Una molécula antisentido preferiblemente tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nucleótidos, de aproximadamente 11 a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 13 a aproximadamente 75 nucleótidos o de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 16 a aproximadamente 30 nucleótidos o de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 nucleótidos.
- 50 Una molécula de ARNs adecuada para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 puede ser una molécula de ARNs monocatenaria o bicatenaria que sea capaz de hibridarse con el ARNm de CCL18 o el ARNm de

CCL20, induciendo así una interferencia en el ARN o cualquier otro mecanismo antisentido intracelular que consiga reducir o inhibir la expresión de la proteína CCL18 o la proteína CCL20.

Dicha molécula de ARNsi puede tener cualquier secuencia que permita que la molécula de ARNsi interfiera con el ARN y consiga reducir o inhibir la expresión de la proteína CCL18 o la proteína CCL20.

- 5 Preferiblemente, la molécula de ARNsi tiene una longitud de entre 10 y 100, entre 12 y 80, entre 14 y 60, entre 16 y 50, entre 17 y 40, más preferiblemente entre 18 y 30 nucleótidos y lo más preferiblemente entre 18 y 26 nucleótidos.

10 Un compuesto capaz o adecuado para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 puede reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un control. En algunas realizaciones preferidas, un compuesto capaz o adecuado para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 puede reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 un 100 %.

15 En otra realización preferida, una composición farmacéutica según la invención comprende otro compuesto activo adecuado para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

20 Los ejemplos de compuestos activos adicionales adecuados para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial son, p. ej., fármacos antiinflamatorios tales como, p. ej., prednisona u otros corticosteroides, azatioprina, metotrexato, micofenolato o ciclofosfamida, antioxidantes, tales como, p. ej., acetilcisteína, agentes antifibróticos, tales como, p. ej., bosentán o pirfenidona, minociclina, sildenafilo, talidomida, anticuerpos anti-TNF, tales como, p. ej., Infliximab; etanercept, interferón gamma, anticuerpos anti-IL-13, inhibidores de la endotelina, Zileuton, anticoagulantes, macrólidos, inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) 4, tales como, p. ej., roflumilast, Aviptadil, hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), inhibidores de la tirosina cinasa, tales como, p. ej., imatinib, dasatinib y nilotinib.

25 El compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento del cáncer es preferiblemente un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento del cáncer son conocidos por el experto en la técnica. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos son, p. ej., temozolomida, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, p. ej., paclitaxel, Taxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósida, daunorubicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas y agentes hormonales que regulan o inhiben la actividad de las hormonas sobre los tumores como tamoxifeno y onapristona.

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

40 En otras realizaciones preferidas, se puede administrar una o más composiciones distintas, que comprenden un compuesto activo adecuado para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un compuesto activo adecuado para tratar o prevenir un cáncer, a un sujeto, preferiblemente a un sujeto humano, combinadas con una composición farmacéutica según la invención que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20.

45 En una realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

50 En otra realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

55 En una realización particularmente preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. Lo más preferiblemente, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática.

En otra realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon.

- 5 En una realización particularmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Lo más preferiblemente, el cáncer es adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón.

Los autores de la presente invención sorprendentemente encontraron que el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención es adecuado para uso terapéutico.

- 10 Por tanto en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención para uso en tratamiento.

Se ha observado que varias enfermedades se caracterizan por un nivel sérico elevado de CCL18 o CCL20. Esto quiere decir que el nivel sérico de CCL18 o CCL20 de un paciente que padece la enfermedad es más alto que el nivel sérico de CCL18 o CCL20 de los controles sanos.

- 15 Así, la presente invención también se refiere al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad que se caracteriza por un nivel sérico elevado de CCL18 y/o CCL20. La expresión "nivel sérico elevado de CCL18 y/o CCL20" quiere decir que el nivel de CCL18 y/o CCL20 en suero de un paciente que padece la enfermedad es más alto que el nivel de CCL18 y/o CCL20 en suero de un control sano.

- 20 En otro aspecto la presente invención también se refiere al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad pulmonar intersticial, cáncer, enfermedad de Gaucher, talasemia, preferiblemente β -talasemia, artritis reumatoide, fibrosis retroperitoneal (enfermedad de Ormond) y/o enfermedad cutánea inflamatoria crónica, preferiblemente dermatitis atópica o penfigoide ampolloso.

- 25 En una realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histiocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

En otra realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

- 35 En una realización particularmente preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. Lo más preferiblemente, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática.

En una realización preferida adicional, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon.

- 40 En una realización particularmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Lo más preferiblemente, el cáncer es adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón.

- 45 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

Como se emplea en la presente memoria, el término "prevención" y sus equivalentes gramaticales se refieren a reducir la predisposición o el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

- 50 En otro aspecto la presente invención se refiere al uso del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención o a una composición farmacéutica según la invención para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

En otro aspecto la presente invención también se refiere a un agente de detección específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención.

En una realización preferida, el agente de detección es un anticuerpo o un aptámero.

5 Un "aptámero" puede ser un aptámero de ADN, ARN o peptídico. Un aptámero polinucleotídico tiene preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 10 y 60 nucleótidos de longitud. Los aptámeros pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica, como, p. ej., métodos de síntesis, recombinación y purificación.

10 Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el agente de detección también se puede seleccionar de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂. El agente de detección preferiblemente comprende un marcador detectable. Anteriormente en la presente memoria se han descrito marcadores adecuados.

15 Un agente de detección es específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, si se une al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención con una afinidad mayor que a cualquier otro compuesto presente en una muestra (es decir un compuesto no diana). Preferiblemente, un agente de detección es específico para el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención si se une solo al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención y no se une en absoluto a un compuesto no diana.

20 En una realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histiocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

En otra realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

25 En una realización particularmente preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. Lo más preferiblemente, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática.

30 En una realización preferida adicional, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon.

35 En una realización particularmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Lo más preferiblemente, el cáncer es adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un agente de detección específico para el receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención para uso en la detección de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en una muestra de un sujeto.

40 En una realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histiocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

45 En otra realización preferida, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

50 En una realización particularmente preferida, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. Lo más preferiblemente, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática.

En una realización preferida adicional, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon.

En una realización particularmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Lo más preferiblemente, el cáncer es adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón.

5 En otra realización preferida, el agente de detección es un anticuerpo o un aptámero.

Un "aptámero" puede ser un aptámero de ADN, ARN o peptídico. Un aptámero polinucleotídico tiene preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 10 y 60 nucleótidos de longitud. Los aptámeros pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica, como, p. ej., métodos de síntesis, recombinación y purificación.

10 Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el agente de detección también se puede seleccionar de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂. El agente de detección preferiblemente comprende un marcador detectable. Anteriormente en la presente memoria se han descrito marcadores adecuados.

15 Un agente de detección es específico para el receptor CCR6 o para el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, si se une al receptor CCR6 o al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención con una afinidad mayor que a cualquier otro compuesto presente en una muestra (es decir un compuesto no diana). Preferiblemente, un agente de detección es específico para el receptor CCR6 o el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención si se une solo al receptor CCR6 o al polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención y no se une en absoluto a un compuesto no diana.

20 En este contexto, la muestra de un sujeto puede ser una muestra líquida o una muestra sólida. En una realización preferida, la muestra de un sujeto se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva y orina. En una realización particularmente preferida, la muestra líquida de un sujeto es suero. En otra realización preferida, la muestra del sujeto es una muestra de tejido, preferiblemente una muestra de tejido pulmonar. Las muestras de tejido pueden ser, p. ej., muestras de tejido frescas o congeladas o fijadas e incluidas en parafina. En una realización preferida, la muestra puede ser una muestra de biopsia o de resección. En otra realización preferida, la muestra es una muestra de cepillado bronquial.

25 En una realización preferida del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso según la invención y/o del agente de detección según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histiocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

30 En una realización particularmente preferida del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso según la invención y/o del agente de detección según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

35 En otra realización preferida del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso según la invención y/o del agente de detección según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica.

40 En una realización particularmente preferida del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso según la invención y/o del agente de detección según la invención la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática. Para un resumen de la clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales, el experto en la técnica puede referirse, p. ej., al artículo American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, American Thoracic Society; European Respiratory Society, Am J Respir Crit Care Med. 15 de enero de 2002;165(2):277-304. En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar intersticial puede estar provocada por una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en manifestaciones pulmonares de la esclerodermia, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, artritis reumatoide, lupus eritematoso y asbestosis.

45 En otra realización preferida del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso

según la invención y/o del agente de detección según la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon.

5 En una realización preferida adicional del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso según la invención y/o del agente de detección según la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

10 En una realización particularmente preferida del método según la invención, del polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención, del uso según la invención y/o del agente de detección según la invención, el cáncer es cáncer de pulmón, lo más preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, o mesotelioma pleural. En la realización más preferida, el cáncer es adenocarcinoma de pulmón.

15 Los autores de la presente invención también encontraron sorprendentemente que los inhibidores de la actividad del receptor CCR6 pueden emplearse para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:

20 (a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 % y lo más preferiblemente el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22 o 23; y

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);

en el que dicho polipéptido aislado es capaz de unirse e inhibir la actividad del receptor CCR6.

25 preferiblemente dicho receptor CCR6 es el receptor CCR6 humano. En una realización preferida, dicho receptor CCR6 es un polipéptido codificado por la secuencia según la SEQ ID NO.: 3 o la SEQ ID NO.: 4. En otra realización preferida, dicho receptor CCR6 es un polipéptido según la SEQ ID NO.: 27.

30 En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 22 o la SEQ ID NO.: 23. En la realización más preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, la SEQ ID NO.: 22 o la SEQ ID NO.: 23.

35 En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9. En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) es una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 9.

40 En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 22. En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) es una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 22.

45 En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 23. En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) es una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 23.

En algunas realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos según (a) puede mostrar una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, más preferiblemente al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 96 %, más preferiblemente al menos el 97 %, más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9 y la SEQ ID NO.: 22.

En otra realización preferida, en la secuencia de aminoácidos según (a) no se han cambiado (es decir, eliminado, insertado, modificado y/o sustituido por otros aminoácidos) más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO.:9, la SEQ ID NO.: 22 o la SEQ ID NO.: 23.

En una realización preferida adicional, en la secuencia de aminoácidos según (a) no se han cambiado (es decir, eliminado, insertado, modificado y/o sustituido por otros aminoácidos) más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO.:9. En otra realización preferida, en la secuencia de aminoácidos según (a) no se han cambiado (es decir, eliminado, insertado, modificado y/o sustituido por otros aminoácidos) más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO.:22 . En otra realización preferida más, en la secuencia de aminoácidos según (a) no se han cambiado (es decir, eliminado, insertado, modificado y/o sustituido por otros aminoácidos) más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de la secuencia según la SEQ ID NO.:23.

Los aminoácidos del polipéptido soluble según la invención referido también pueden estar modificados, p. ej., químicamente modificados. Por ejemplo, la cadena lateral o el extremo amino o carboxi libre de un aminoácido de la proteína pueden estar modificados, p. ej., por glicosilación, amidación, fosforilación, ubiquitinación, etc.

En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22 o 23. Así, en una realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, más preferiblemente al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 96 %, más preferiblemente al menos el 97 %, más preferiblemente al menos el 98 %, más preferiblemente al menos el 99 % o lo más preferiblemente al menos el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22 o 23 y comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22, o 23. En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, más preferiblemente al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 96 %, más preferiblemente al menos el 97 %, más preferiblemente al menos el 98 %, más preferiblemente al menos el 99 %, incluso más preferiblemente al menos el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 22 y comprende al menos 8 o al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 9. En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, más preferiblemente al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 96 %, más preferiblemente al menos el 97 %, más preferiblemente al menos el 98 %, más preferiblemente al menos el 99 % o lo más preferiblemente el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 22 y comprende al menos 8 o al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 22. En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, más preferiblemente al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 96 %, más preferiblemente al menos el 97 %, más preferiblemente al menos el 98 %, más preferiblemente al menos el 99 %, incluso más preferiblemente al menos el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 23 y comprende al menos 8 o al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 23. En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 %, el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22 o 23 y comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22 o 23. En una realización más preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 %, el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, 22, o 23 y comprende al menos 8 o al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 9, la SEQ ID NO.: 22 o la SEQ ID NO.: 23.

En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 %, el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 9 y comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 9.

En otra realización preferida, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 %, el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 22 y comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al

menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 22.

5 En una realización preferida adicional, la secuencia de aminoácidos según (a) presenta una identidad de al menos el 95 %, el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 23 y comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 23.

10 En una realización preferida, el polipéptido soluble aislado según la invención tiene una longitud de menos de 3000 aminoácidos, preferiblemente menos de 2000 aminoácidos, más preferiblemente menos de 1000 aminoácidos, más preferiblemente menos de 500 aminoácidos, más preferiblemente menos de 300 aminoácidos, más preferiblemente menos de 200 aminoácidos, más preferiblemente menos de 100 aminoácidos o lo más preferiblemente menos de 50 aminoácidos.

15 En una realización preferida adicional, el polipéptido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 8 y al menos 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 8 y al menos 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y al menos 1000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y 500 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y 300 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 8 y 200 aminoácidos, e incluso más preferiblemente entre al menos 8 y 100 aminoácidos o entre al menos 8 y 50 aminoácidos.

Lo más preferiblemente, el polipéptido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 8, al menos 29 o al menos 31 aminoácidos.

20 En otra realización preferida, el polipéptido aislado según (a) tiene una longitud de entre al menos 29 y 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 29 y 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 29 y 1000 aminoácidos, entre al menos 29 y 500 aminoácidos, entre al menos 29 y 300 aminoácidos, entre al menos 29 y 200 aminoácidos, entre al menos 29 y 100 aminoácidos o entre al menos 29 y 50 aminoácidos.

25 En una realización preferida adicional, el polipéptido aislado según (a) tiene una longitud de entre al menos 31 y 3000 aminoácidos, preferiblemente entre al menos 31 y 2000 aminoácidos, más preferiblemente entre al menos 31 y 1000 aminoácidos, entre al menos 31 y 500 aminoácidos, entre al menos 31 y 300 aminoácidos, entre al menos 31 y 200 aminoácidos, entre al menos 31 y 100 aminoácidos o entre al menos 3 y 50 aminoácidos.

Un fragmento es habitualmente una porción de la secuencia de aminoácidos a la que se refiere.

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

35 En otra realización particularmente preferida, el polipéptido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 9, la SEQ ID NO.: 22 o la SEQ ID NO.: 23, en la que dicho polipéptido es capaz de unirse e inhibir la actividad del receptor CCR6. Lo más preferiblemente el polipéptido aislado según la invención referido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO.: 9, en el que dicho polipéptido es capaz de unirse e inhibir la actividad del receptor CCR6.

40 La capacidad de un polipéptido según la invención de unirse al receptor CCR6 puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, el experto en la técnica puede determinar si un polipéptido es capaz de unirse al receptor CCR6 usando un sistema de doble híbrido en levadura o un ensayo bioquímico tal como p.ej. un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de unión a radioligandos cuantitativo, un ensayo basado en la separación de células activada por fluorescencia (FACS), un ensayo de resonancia de plasmones o cualquier otro método conocido por el experto en la técnica. A la hora de utilizar ensayos de inmunoprecipitación o de resonancia de plasmones, es útil fusionar al menos una de las proteínas a un marcador de afinidad tag como His-Tag, GST-Tag u otro, como es conocido en la técnica de la bioquímica.

50 La expresión "inhibir la actividad del receptor CCR6" como se emplea en la presente memoria quiere decir que se reduce o anula la actividad del receptor CCR6 y/o que se inhibe la activación del receptor CCR6.

55 Por ejemplo, en una realización, un polipéptido aislado según la invención o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 descrito en la presente memoria puede bloquear estéricamente el receptor CCR6, de tal forma que un agonista del receptor CCR6 (p. ej. la CCL18 o la CCL20) no puedan activar el receptor. Así, la inhibición de la actividad del receptor CCR6 puede deberse, p. ej., a la inhibición de la interacción del receptor CCR6 con uno de sus ligandos, es decir la CCL18 y/o la CCL20, por un polipéptido o

cualquier otro compuesto que se une al receptor CCR6 pero que en sí mismo no actúa de mediador de un evento de señalización.

En otra realización, un polipéptido aislado según la invención, o cualquier otro compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6, puede reducir o anular la actividad previa del receptor CCR6.

5 La capacidad de un polipéptido aislado según la invención, o de cualquier otro compuesto a analizar, de inhibir la actividad del receptor CCR6 puede determinarse, p. ej., midiendo la expresión en la superficie celular del receptor CCR6 como se describe más adelante en la presente memoria en el ejemplo 6 y en las figuras 13 y 14, donde la inhibición de la internalización del receptor CCR6 en presencia de un agonista del receptor CCR6 (tal como, p. ej., CCL18) y el polipéptido aislado u otro compuesto a analizar, comparado con un control (p. ej. solo en presencia de un agonista del receptor CCR6) indica que el polipéptido aislado u otro compuesto es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6.

10 En otro ejemplo, el experto en la técnica también puede determinar la capacidad de un polipéptido aislado según la invención, o de cualquier otro compuesto a analizar, de inhibir la actividad del receptor CCR6 incubando las células que expresan CCR6 en presencia de un agonista del receptor CCR6, tal como, p. ej., la CCL18 o la CCL20, y en presencia o ausencia del polipéptido aislado u otro compuesto a analizar y posteriormente lisar las células y analizar por Western blot la fosforilación de la ERK, una molécula situada más abajo en la vía de señalización de CCR6. En este ejemplo, un nivel de fosforilación de la ERK en presencia del polipéptido u otro compuesto a analizar menor que el nivel de fosforilación de la ERK en ausencia del polipéptido aislado u otro compuesto a analizar indica que el polipéptido u otro compuesto es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6. Un método para determinar la fosforilación de la ERK por Western blot se describe, p.ej., en Lin et al. J Proteome Res. 2010 ene; 9(1):283-97. En un ejemplo análogo, se puede analizar la fosforilación de otros efectores situados más abajo en la vía del CCR6 tales como, p. ej., las cinasa Akt, SAPK/JNK, la fosfatidilinositol 3-cinasa o la fosfolipasa C para determinar si un polipéptido aislado según la invención o cualquier otro compuesto a analizar es capaz de inhibir actividad del receptor CCR6.

15 La capacidad de un polipéptido aislado según la invención, o de cualquier otro compuesto a analizar, de inhibir la actividad del receptor CCR6 también puede determinarse, p. ej., midiendo la liberación de FGF2 estimulada por la CCL18 o la inducción de colágeno y/o α -SMA mediada por la CCL18 en presencia de dicho polipéptido u otro compuesto, p. ej., como se describe más adelante en la presente memoria en el ejemplo 4 y las figuras 4 y 5. En este ejemplo, una inhibición del aumento del FGF2 inducido por la CCL18 y/o una inhibición de la inducción de la expresión de colágeno y/o de α -SMA mediada por la CCL18 en presencia del polipéptido o de otro compuesto a analizar relativas a un control, al que no se ha añadido el polipéptido u otro compuesto, indica que el polipéptido aislado u otro compuesto es capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6. Además, para determinar la capacidad de un polipéptido aislado según la invención, o de cualquier otro compuesto a analizar, de inhibir la actividad del receptor CCR6, el experto en la técnica también puede determinar si reduce o anula la inducción de la transición epitelio-mesénquima (TEM) por la CCL18.

20 Como alternativa, o además, se puede emplear cualquier otro método que sea adecuado para determinar la actividad del receptor CCR6 y que esté comprendido en la técnica y sea conocido por las personas de experiencia ordinaria en la técnica.

25 Un polipéptido aislado según la invención o cualquier otro compuesto que sea capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, puede inhibir la actividad del receptor CCR6 al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a un control. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido según la invención, o cualquier otro compuesto descrito en la presente memoria que sea capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, puede inhibir la actividad del receptor CCR6 un 100 %.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado según la invención.

35 En una realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de menos de 6000 nucleótidos, menos de 5000 nucleótidos, menos de 4000 nucleótidos, menos de 3000 nucleótidos, menos de 2000 nucleótidos, menos de 1000 nucleótidos o menos de 500 nucleótidos.

40 En una realización preferida adicional, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 24 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 24 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 24 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 24 y 500

nucleótidos. En otra realización preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 24, al menos 87 o al menos 93 nucleótidos.

5 En otra realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 87 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 87 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 87 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 87 y 500 nucleótidos.

10 En otra realización preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 87 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos el 800 nucleótidos, al menos 1000 nucleótidos, al menos 1500 nucleótidos, al menos 2000 nucleótidos, al menos 2500 nucleótidos, al menos 3000 nucleótidos o al menos 3500 nucleótidos. En una realización particularmente preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 87 nucleótidos o al menos 100 nucleótidos.

15 En otra realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de entre al menos 93 y 9000 nucleótidos, preferiblemente entre al menos 93 y 8000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 7000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 6000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 5000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 4000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 3000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 2000 nucleótidos, más preferiblemente entre al menos 93 y 1000 nucleótidos o incluso más preferiblemente entre al menos 93 y 500 nucleótidos.

20 En otra realización preferida, un polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 87 nucleótidos, al menos 93 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, al menos 1000 nucleótidos, al menos 1500 nucleótidos, al menos 2000 nucleótidos, al menos 2500 nucleótidos, al menos 3000 nucleótidos o al menos 3500 nucleótidos. En una realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención tiene una longitud de al menos 24, al menos 87 o al menos 93 nucleótidos.

Resultará evidente para el experto en la técnica que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido según la invención dado, puede ser codificado por distintas secuencias de nucleótidos.

30 En una realización preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25 o la SEQ ID NO.: 26.

35 En una realización preferida adicional, el polinucleótido según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25 o la SEQ ID NO.: 26. En una realización particularmente preferida, el polinucleótido según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 % o incluso más preferiblemente al menos el 98 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25 o la SEQ ID NO.: 26.

40 En otra realización preferida, el polinucleótido según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 %, al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 24. En otra realización preferida, el polinucleótido según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 %, al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 25. En una realización preferida adicional, el polinucleótido según la invención comprende o consiste en una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80 %, al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, incluso más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 93 %, incluso más preferiblemente al menos el 94 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, incluso más

preferiblemente al menos el 98 % o incluso más preferiblemente al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 26.

5 En una realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia que muestra una identidad del 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25 o la SEQ ID NO.: 26. En otra realización particularmente preferida, el polinucleótido aislado según la invención comprende o consiste en una secuencia según la SEQ ID NO.: 24, la SEQ ID NO.: 25 o la SEQ ID NO.: 26.

Un polinucleótido aislado según la invención puede ser una molécula de ARN o ADN monocatenario o bicatenario.

10 En algunas realizaciones el polinucleótido aislado según la invención puede estar insertado en un vector de expresión. El vector de expresión puede ser un vector de expresión procariota o eucariota tal como, p. ej., un plásmido, un minicromosoma, un cósmido, un bacteriófago, un vector retroviral o cualquier otro vector conocido por el experto en la técnica. El experto en la técnica sabrá cómo seleccionar un vector adecuado según la necesidad específica.

La presente invención, por tanto, también se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido según la invención.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, en el que el método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un receptor CCR6 con un compuesto experimental;

20 (b) añadir un agonista del receptor CCR6, en el que dicho agonista es un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 5 o la SEQ ID NO.: 18;

(c) determinar la actividad de dicho receptor CCR6; y

(d) seleccionar dicho compuesto experimental como el compuesto capaz de inhibir la actividad del receptor CCR6, si la actividad del receptor CCR6 determinada en (c) es inferior a la actividad del receptor CCR6 determinada en un control.

25 En una realización preferida del método anterior, las etapas (a), (b), (c), (d) se realizan en ese orden.

30 En una realización preferida, el receptor CCR6 de (a) es expresado por una célula, preferiblemente en la superficie de una célula. En otra realización preferida, el receptor CCR6 de (a) es el receptor CCR6 recombinante, preferiblemente el receptor CCR6 recombinante purificado. Si una célula expresa el receptor CCR6 de (a), preferiblemente en la superficie de la célula, dicha célula, p. ej., puede estar comprendida en un sistema de reacción celular. En una realización preferida, dicha célula se selecciona del grupo que consiste en un fibroblasto, una célula epitelial alveolar, un linfocito y una célula pulmonar. En una realización preferida adicional, dicha célula se selecciona del grupo que consiste en un fibroblasto, una célula epitelial alveolar, un linfocito y una célula pulmonar, en la que la célula proviene de un paciente que padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer. En una realización preferida, dicha enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática y dicho cáncer es un adenocarcinoma, preferiblemente un adenocarcinoma de pulmón.

Si el receptor CCR6 de (a) es un receptor CCR6 recombinante, preferiblemente un receptor CCR6 recombinante purificado, el receptor CCR6 puede estar comprendido en un sistema de reacción acelular. Posteriormente puede añadirse el agonista del receptor CCR6 de (b) al sistema de reacción celular o acelular.

40 La expresión "sistema de reacción" en este contexto se refiere a un marco experimental en el que las células que expresan el receptor CCR6 o el receptor CCR6 recombinante se introducen en un tubo de cultivo celular, un tubo de cultivo tisular, un tubo Eppendorf, una cámara de reacción u otro receptáculo que contenga los tampones y/u otros reactivos necesarios pertinentes para realizar el método referido y en el que el método se realiza en dicho tubo de cultivo celular, tubo de cultivo celular, tubo Eppendorf, cámara de reacción u otro receptáculo. Así, en algunas realizaciones, el método referido puede comprender además la etapa de proporcionar un sistema de reacción celular o acelular que comprenda el receptor CCR6. Si el método comprende dicha etapa, se prefiere que dicha etapa sea la etapa (a), es decir, la primera etapa del método.

Preferiblemente, el receptor CCR6 es el receptor CCR6 humano. En una realización preferida, dicho receptor CCR6 es un polipéptido codificado por la secuencia según la SEQ ID NO.: 3 o la SEQ ID NO.: 4. En otra realización preferida, dicho receptor CCR6 es un polipéptido según la SEQ ID NO.: 27.

50 En una realización preferida, dicho compuesto experimental es un anticuerpo, una molécula pequeña o un péptido. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo también puede seleccionarse de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂.

- En otra realización preferida, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 5. En una realización particularmente preferida, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 95 %, al menos el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 5.
- En una realización preferida adicional, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18. En una realización particularmente preferida, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 95 %, al menos el 98 % o el 100 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18.
- En una realización preferida adicional, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 30, 50, o 60 aminoácidos contiguos de la secuencia según la SEQ ID NO.:5.
- En una realización preferida adicional, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 30, 50, o 60 aminoácidos contiguos de la secuencia según la SEQ ID NO.:18.
- En otra realización preferida, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 5 y que comprende al menos 30 o al menos 50 aminoácidos contiguos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 5
- En otra realización preferida más, el polipéptido según (b) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 18 y que comprende al menos 30 o al menos 50 aminoácidos contiguos de la secuencia según la SEQ ID NO.:18. En una realización particularmente preferida, el polipéptido según (b) es un polipéptido según la SEQ ID NO.:18.
- La actividad del receptor CCR6 puede determinarse, p. ej., mediante cualquiera de los métodos para determinar actividad del receptor CCR6 descritos anteriormente en la presente memoria.
- La elección de un control adecuado depende del método que se use para determinar la actividad del receptor CCR6. El experto en la técnica sabrá cómo seleccionar un control adecuado. Algunos ejemplos adecuados para determinar la actividad del receptor CCR6 y los controles adecuados se describen más adelante en la presente memoria en la sección de los ejemplos.
- Un control puede ser, p. ej., una muestra en la que la actividad del receptor CCR6 solo se ha determinado en presencia del agonista del receptor CCR6 y en ausencia del compuesto experimental.
- En una realización preferida, la actividad del receptor CCR6 determinada en (c) es al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % inferior a la actividad del receptor CCR6 determinada en el control.
- En una realización particularmente preferida, la actividad del receptor CCR6 determinada en (c) es al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % inferior a la actividad del receptor CCR6 determinada en el control.
- En otra realización preferida, la actividad del receptor CCR6 determinada en (c) es un 100 % inferior a la actividad del receptor CCR6 determinada en el control.
- En una realización preferida adicional, la actividad del receptor CCR6 determinada en (c) es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1 000 veces o al menos 10 000 veces inferior a la actividad del receptor CCR6 determinada en el control.

La presente invención también proporciona un método para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de determinar el nivel de expresión del gen CCR6 en una muestra de dicho sujeto.

Dicho método preferiblemente se realiza *in vitro*.

- 5 Preferiblemente, el receptor CCR6 es el receptor CCR6 humano. En una realización preferida, dicho receptor CCR6 es un polipéptido codificado por la secuencia según la SEQ ID NO.: 3 o la SEQ ID NO.: 4. En otra realización preferida, dicho receptor CCR6 es un polipéptido según la SEQ ID NO.: 27.

10 En una realización, la determinación del nivel de expresión del receptor CCR6 se puede lograr poniendo en contacto la muestra del sujeto con un agente de detección específico para el CCR6. Un agente de detección es específico para un receptor CCR6, si se une al CCR6 con una afinidad mayor que a cualquier otro compuesto presente en una muestra (es decir un compuesto no diana). Preferiblemente, un agente de detección es específico para el CCR6 si se une solo a CCR6 y no se une en absoluto a un compuesto no diana.

La presente invención también proporciona un método para detectar o estadificar un cáncer en un sujeto que comprende la etapa de determinar el nivel expresión del gen CCL18 en una muestra de dicho sujeto.

15 La expresión "estadificar un cáncer" como se emplea en la presente memoria se refiere a clasificar el cáncer determinando algunas características del cáncer, tal como, p. ej., su agresividad y su pronóstico. En una realización preferida, la "estadificación de un cáncer", preferiblemente de un adenocarcinoma, puede realizarse correlacionando la cantidad de CCL18 determinada en la muestra del sujeto con el estadio del cáncer, preferiblemente con el estadio de un adenocarcinoma, lo más preferiblemente con el estadio de un adenocarcinoma de pulmón.

20 En una realización, la determinación del nivel de expresión del gen CCL18 se puede lograr poniendo en contacto la muestra del sujeto con un agente de detección específico para el gen CCL18. Un agente de detección es específico para el gen CCL18, si se une al gen CCL18 con una afinidad mayor que a cualquier otro compuesto presente en una muestra (es decir un compuesto no diana). Preferiblemente, un agente de detección es específico para el gen CCL18 si se une solo al gen CCL18 y no se une en absoluto a un compuesto no diana.

25 "Determinar el nivel de expresión del gen CCR6" quiere decir que puede determinarse el nivel o la cantidad de ARNm y/o proteína del CCR6. En algunas realizaciones, se puede determinar la expresión del receptor CCR6 en la superficie celular. "Determinar el nivel de expresión del gen CCL18" quiere decir que puede determinarse el nivel o la cantidad de ARNm y/o proteína de la CCL18. En una realización preferida, dicha CCL18 es un polipéptido según la SEQ ID NO.: 18.

30 La expresión del ARNm del CCR6 o la expresión del ARNm de la CCL18 puede determinarse, p. ej., por hibridación *in situ*, northern blot, ensayos de protección contra ARNasas o métodos basados en la PCR, tales como, p. ej., PCR por transcripción inversa o PCR cuantitativa en tiempo real. El experto en la técnica sabrá cómo realizar estos métodos.

35 En algunas realizaciones, puede aislarse el ARN total de la muestra del sujeto antes de determinar la cantidad de ARNm.

40 Los agentes de detección adecuados que pueden emplearse para determinar el nivel de expresión del ARNm del CCR6 son, p. ej., sondas de oligonucleótidos antisentido específicas para el ARNm del CCR6. Los agentes de detección adecuados que pueden emplearse para determinar el nivel de expresión del ARNm de la CCL18 son, p. ej., sondas de oligonucleótidos antisentido específicas para el ARNm de la CCL18. Las sondas de oligonucleótido antisentido pueden ser sondas de oligonucleótidos de ARN o ADN. En una realización preferida, la sonda de oligonucleótido es una molécula de ARN monocatenario.

La sonda de oligonucleótido es específica para el ARNm del CCR6 si es capaz de hibridarse al ARNm del CCR6 en condiciones muy restrictivas. La sonda de oligonucleótido es específica para el ARNm de la CCL18 si es capaz de hibridarse al ARNm de la CCL18 en condiciones muy restrictivas.

45 Como se emplea en la presente memoria el término "hibridar" o "hibridarse" se refiere a la hibridación entre un primer polinucleótido y un segundo. Para determinar si dos polinucleótidos se hibridan entre sí, el experto en la técnica preferiblemente realizará experimentos de hibridación *in vitro* en condiciones de hibridación moderadas o restrictivas. Los ensayos y las condiciones de hibridación son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y., 6,3,1-6,3,6, 1991.
50 Las condiciones restrictivas pueden ser, p. ej., condiciones en las que la hibridación tiene lugar en 6 X cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a 45 °C, seguido de un lavado 0,2 X SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C.

55 Un agente de detección preferido para detectar la proteína CCR6 o la proteína CCL18 es un anticuerpo o un aptámero. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el agente de detección también se puede seleccionar de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos

sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂. En una realización preferida, pueden emplearse anticuerpos específicos para el CCR6 o la CCL18 disponibles comercialmente. Un ejemplo de un anticuerpo disponible comercialmente es el mAb anti-CCR6 humano descrito más adelante en la presente memoria en el ejemplo 1.

5 En una realización preferida, un agente de detección como se ha descrito anteriormente en la presente memoria puede comprender un marcador detectable. Se puede emplear cualquier marcador adecuado que pueda unirse al agente de detección. En una realización preferida, el marcador detectable está unido de forma covalente o no covalente al agente de detección. Los ejemplos de marcadores que pueden unirse al agente de detección incluyen, p. ej., tintes fluorescentes tales como, p. ej., tintes de cianina, p. ej., Cyanine 3, Cyanine 5 o Cyanine 7, tintes Alexa Fluor, p. ej., Alexa 594, Alexa 488 o Alexa 532, tintes de la familia de la fluoresceína, R-ficoeritrina, Texas Red, rodamina e isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los agentes de detección también pueden marcarse con enzimas tales como, p. ej., peróxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o beta-lactamasa, con radioisótopos tales como, p. ej., ³H, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S o ¹²⁵I, con metales tales como, p. ej., oro o con biotina. En otra realización preferida, el agente de detección también puede ser detectado por un agente de detección secundario que comprende un marcador según se ha descrito anteriormente.

15 Preferiblemente un agente de detección secundario es capaz de unirse específicamente al agente de detección descrito anteriormente. En una realización particularmente preferida, un agente de detección secundario es un anticuerpo.

20 En algunas realizaciones, el nivel de expresión del CCR6 o la CCL18 puede detectarse, p. ej., con métodos que utilicen procedimientos de histología o de biología celular. En algunas realizaciones, pueden emplearse técnicas visuales, como microscopia óptica, microscopia por inmunofluorescencia o microscopia electrónica, o citometría de flujo o luminometría. En una realización preferida, el nivel de expresión del CCR6 o la CCL18 se detecta por inmunohistoquímica.

25 La expresión "detectar una enfermedad pulmonar intersticial" o "detectar un cáncer" como se emplea en la presente memoria quiere decir identificar la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de una enfermedad o trastorno canceroso en un sujeto o en una muestra de un sujeto. Preferiblemente, con anterioridad se desconoce que dicho sujeto padezca una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer respectivamente. En una realización preferida, se sospecha que el sujeto padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer.

30 Para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en un sujeto, en algunas realizaciones se determinará el nivel de expresión del gen CCR6 presente en la muestra del sujeto además de medir o determinar la cantidad de otros compuestos o factores compatibles con la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer respectivamente. Por ejemplo, se podrán detectar marcadores conocidos para la enfermedad pulmonar intersticial, tal como, p. ej., marcadores séricos, proteínas del surfactante (SP) A y D, o marcadores conocidos del cáncer en la misma muestra o en una muestra diferente del sujeto. Otros marcadores adecuados son conocidos por el experto en la técnica. En algunas realizaciones, el experto en la técnica, además de determinar el nivel de expresión del gen CCR6 en la muestra del sujeto, también puede examinar el patrón histológico de la muestra para determinar si el sujeto padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer.

35 Para detectar un cáncer en un sujeto, en algunas realizaciones se determinará el nivel de expresión del gen CCL18 presente en la muestra del sujeto además de medir o determinar la cantidad de otros compuestos o factores compatibles con la presencia de un cáncer. Por ejemplo, pueden detectarse marcadores conocidos del cáncer en la misma muestra o en una muestra diferente del sujeto. Otros marcadores adecuados son conocidos por el experto en la técnica. En algunas realizaciones, el experto en la técnica, además de determinar el nivel de expresión del gen CCL18 en la muestra del sujeto, también puede examinar el patrón histológico de la muestra para determinar si el sujeto padece un cáncer.

40 En una realización preferida, el método descrito anteriormente comprende además la etapa de comparar el nivel de expresión del gen CCR6 determinado en la muestra del sujeto y el nivel de expresión del gen CCR6 determinado en un control en el que, cuando el nivel de expresión del gen CCR6 determinado en la muestra del sujeto es mayor que el nivel del control, indica la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en el sujeto.

45 En otra realización preferida, el método descrito anteriormente comprende además la etapa de comparar el nivel de expresión del gen CCL18 determinado en la muestra del sujeto y el nivel de expresión del gen CCL18 determinado en un control en el que, cuando el nivel de expresión del gen CCL18 determinado en la muestra del sujeto es mayor que el nivel del control, indica la presencia de un cáncer en el sujeto.

50 En una realización preferida, el control es una muestra de un sujeto sano. En una realización preferida, cuando el nivel de expresión del CCR6 determinado en la muestra del sujeto es menor que el del control indica la presencia de una enfermedad pulmonar intersticial o de un cáncer en el sujeto. En otra realización preferida, cuando el nivel de expresión de la CCL18 determinado en la muestra del sujeto es mayor que el determinado en el control indica la presencia de cáncer en el sujeto. La expresión "nivel mayor" quiere decir que el nivel de expresión del CCR6 o de la CCL18 determinado en la muestra del sujeto es al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos

50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1 000 veces o al menos 10 000 veces mayor que el del control. Lo más preferiblemente, el nivel de expresión del CCR6 o la CCL18 determinado en la muestra del sujeto es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o al menos 1 000 veces mayor que en el control.

5 En otra realización preferida, el control también puede ser una muestra obtenida de un sujeto que se sabe que padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer (sujeto de control), es decir un sujeto que ha sido diagnosticado de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer, en el que el cáncer es preferiblemente un adenocarcinoma, lo más preferiblemente un adenocarcinoma de pulmón. En estos casos, un nivel de expresión del gen CCR6 o del gen CCL18 determinado en la muestra del sujeto más alto que el determinado en el control, indica
10 progresión de la enfermedad pulmonar intersticial o del cáncer en el sujeto del que se obtuvo la muestra con respecto al sujeto de control.

En una realización preferida adicional, el control también puede ser tejido sano obtenido de un órgano afectado de un sujeto que se ha confirmado o se sospecha que padece una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer, en el que el cáncer es preferiblemente un adenocarcinoma, lo más preferiblemente un adenocarcinoma de pulmón. En
15 estos casos, se prefiere que la muestra a analizar (es decir la muestra del sujeto) provenga de una parte afectada (es decir enferma) de dicho órgano o una parte de dicho órgano que se sospecha que está afectada y que el control se obtenga de una parte sana del mismo órgano. La expresión "órgano afectado" en este contexto significa un órgano que está afectado por la enfermedad, es decir por una enfermedad pulmonar intersticial o por un cáncer.

En el contexto de la presente invención, el control preferiblemente está aislado del cuerpo del sujeto del que se
20 obtiene.

En algunas realizaciones preferidas, el método según la invención referido también puede usarse para controlar la eficacia del tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer *in vitro*. La eficacia del tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer puede controlarse, p. ej., detectando el nivel de expresión del gen CCR6 en distintas muestras de un sujeto obtenidas durante un periodo de tiempo dado mientras el sujeto del que
25 provienen las muestras estaba siendo tratado de una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer. El aumento o descenso del nivel de la expresión del gen CCR6 presente en las muestras extraídas del sujeto durante un periodo de tiempo dado indicará entonces la eficacia del tratamiento.

La eficacia del tratamiento de un cáncer también puede controlarse, p. ej., detectando el nivel de expresión del gen CCL18 en distintas muestras de un sujeto obtenidas durante un periodo de tiempo dado mientras el sujeto del que
30 provienen las muestras estaba siendo tratado de un cáncer. El aumento o descenso del nivel de la expresión del gen CCL18 presente en las muestras extraídas del sujeto durante un periodo de tiempo dado indicará entonces la eficacia del tratamiento.

En una realización preferida, puede determinarse el nivel de expresión del gen CCR6 en el control al mismo tiempo que el nivel de expresión del gen CCR6 en la muestra del sujeto. En una realización preferida adicional, puede
35 determinarse el nivel de expresión del gen CCL18 en el control al mismo tiempo que el nivel de expresión del gen CCL18 en la muestra del sujeto.

En otra realización preferida, el control puede ser un valor predeterminado. Este valor puede basarse, p. ej., en los resultados de los experimentos previos para determinar el nivel de expresión del gen CCR6 o el nivel de expresión del gen CCL18 presente en una o más muestras de un sujeto sano o de un sujeto que se sabe que padece una
40 enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer. En algunas realizaciones puede derivarse un valor predeterminado de una base de datos.

En una realización preferida, el nivel de expresión del gen CCR6 puede compararse con un control o más de un control, p. ej., con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 controles. En otra
45 realización preferida, el nivel de expresión del gen CCL18 puede compararse con un control o más de un control, p. ej., con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 controles. Preferiblemente, la muestra del sujeto que se usa en los métodos según la invención está aislada del cuerpo del sujeto. La muestra es preferiblemente una muestra sólida. En una realización preferida, la muestra del sujeto es una muestra de tejido, preferiblemente una muestra de tejido pulmonar. Las muestras de tejido pueden ser, p. ej., muestras de tejido frescas o congeladas o fijadas e incluidas en parafina. En una realización preferida, la muestra puede ser una
50 muestra de biopsia o de resección. En otra realización preferida, la muestra es una línea celular de fibroblasto establecida a partir de material quirúrgico o de material obtenido del pulmón fibrótico, p. ej., como se describe más adelante en la presente memoria en el ejemplo 1. En otra realización preferida, la muestra es una muestra de cepillado bronquial.

En algunas realizaciones, la muestra del sujeto es un líquido, preferiblemente un fluido corporal.

55 En una realización preferida, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma, lavado broncoalveolar, derrame pleural, esputo, saliva, suero u orina.

En algunas realizaciones, una muestra líquida puede enriquecerse en las células de interés, p. ej., en fibrocitos o linfocitos T de la circulación si la muestra se emplea para examinar si el sujeto padece una enfermedad pulmonar intersticial o en células cancerosas si la muestra se emplea para analizar si el sujeto padece un cáncer.

El enriquecimiento puede realizarse por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

- 5 El enriquecimiento se puede lograr, p. ej., usando un soporte sólido, p. ej., una columna recubierta con un anticuerpo específico, tal como, p. ej., un anticuerpo específico para linfocitos T cuando se quiere enriquecer en linfocitos T o un anticuerpo específico para un antígeno de cáncer de pulmón si se quiere enriquecer para las células pulmonares. Como alternativa, el enriquecimiento también puede lograrse, p. ej., usando métodos de filtración, tales como, p. ej., filtrando con una gasa de malla o inmovilizando aptámeros específicos sobre un canal microfluidico y bombeando la muestra líquida a través del aparato.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer que comprende un agente de detección específico para un polinucleótido CCR6 o un polipéptido CCR6.

Preferiblemente, dicho polinucleótido CCR6 es ARNm del CCR6.

- 15 En una realización preferida, dicho agente de detección es un anticuerpo, un aptámero o un sonda de oligonucleótido.

Los anticuerpos y las sondas de oligonucleótidos adecuadas para detectar un polinucleótido CCR6, en particular ARNm del CCR6, y un polipéptido CCR6 se han descrito anteriormente en la presente memoria.

- 20 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar un cáncer que comprende un agente de detección específico para un polinucleótido CCL18 o un polipéptido CCL18.

Preferiblemente, dicho polinucleótido CCL18 es ARNm del CCL18.

En una realización preferida, dicho agente de detección es un anticuerpo, un aptámero o un sonda de oligonucleótido.

- 25 Los anticuerpos y las sondas de oligonucleótidos adecuadas para la detección de un polinucleótido CCL18, en particular ARNm de la CCL18, y un polipéptido CCL18 se han descrito anteriormente en la presente memoria.

En una realización preferida, el kit de diagnóstico comprende además otros componentes o reactivos que son adecuados para realizar los métodos según la invención, tal como, p. ej., tampones o controles. En otra realización preferida, los componentes contenidos en el kit de diagnóstico están incluidos en uno o más envases. El kit de diagnóstico según la presente invención también puede comprender un folleto con instrucciones en el que se indique cómo utilizar el kit de diagnóstico y sus componentes.

- 30 La presente invención en un aspecto adicional también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6.

Una composición farmacéutica según la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos con recubrimiento pelicular, grageas, gránulos, cápsulas de gelatina duras y blandas, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones; o por vía rectal, por ejemplo en forma de supositorios. La administración también puede ser por vía parenteral, por ejemplo por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa en forma de soluciones para inyección o infusión. Otras formas de administración adecuadas son, por ejemplo, la administración percutánea o tópica, por ejemplo en forma de ungüentos, tinturas, pulverizadores o sistemas terapéuticos transdérmicos o la administración por inhalación en forma de pulverización nasal o mezclas en aerosol.

- 40 En una realización preferida, una composición farmacéutica según la invención se administra por vía parenteral, p. ej., en forma de soluciones para inyección o infusión, por vía oral, p. ej., en forma de comprimido, píldora, pastilla o cápsula o por inhalación.

Para la producción de las píldoras, comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura se puede emplear, por ejemplo, lactosa, almidón, por ejemplo almidón de maíz o derivados de almidón, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Los vehículos para las cápsulas de gelatina blandas y para los supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o hidrogenados, etc. Los vehículos adecuados para la preparación de soluciones, por ejemplo de soluciones inyectables o de emulsiones o jarabes son, por ejemplo, agua, solución de cloruro sódico fisiológica, alcoholes como etanol, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertida, glucosa, manitol, aceites vegetales, etc.

- 50 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas también contienen aditivos, como por ejemplo cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, humectantes, estabilizantes, emulsionantes, dispersantes, conservantes, edulcorantes, colorantes, aromas, espesantes, diluyentes, sustancias tamponadoras, disolventes, solubilizadores,

agentes para conseguir un efecto retardado (depot), sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento o antioxidantes.

5 Pueden encontrarse ejemplos de excipientes adecuados para las distintas formas de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, p. ej., en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller.

10 En una realización preferida, el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido según la invención, una molécula pequeña capaz de unirse al receptor CCR6, el polinucleótido aislado según la invención, un aptámero específico para el receptor CCR6, un anticuerpo específico para el receptor CCR6, un molécula antisentido adecuada para reducir o inhibir la expresión del receptor CCR6 y un molécula de ARNsi adecuada para reducir o inhibir la expresión del receptor CCR6.

Las moléculas pequeñas capaces de unirse al receptor CCR6 pueden identificarse, p. ej., mediante búsquedas en bibliotecas de compuestos pequeños.

15 La capacidad de una molécula pequeña de unirse al receptor CCR6 puede determinarse, p. ej., mediante los mismos métodos descritos anteriormente en la presente memoria. También pueden emplearse métodos análogos, p. ej., para determinar si una molécula pequeña es capaz de unirse a la CCL18 o la CCL20.

El término "aptámero" como se emplea en la presente memoria se refiere a un aptámero de ADN, ARN o peptídico específico para el receptor CCR6, para la CCL18 o para la CCL20 respectivamente.

20 Un aptámero polinucleotídico tiene preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente un aptámero tiene entre aproximadamente 10 y 60 nucleótidos de longitud.

Los aptámeros pueden prepararse mediante cualquier método conocido, por ejemplo métodos de síntesis, recombinación y purificación y pueden usarse solos o combinados con otros aptámeros específicos para el CCR6, la CCL18 o la CCL20.

25 Un anticuerpo específico para el receptor CCR6 puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo también puede seleccionarse de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂ con la condición de que dichas variantes o fragmentos de anticuerpos sean específicos para el receptor CCR6.

30 La expresión "molécula antisentido adecuada para reducir o inhibir la expresión del receptor CCR6" se refiere a un polinucleótido que es complementario al ARNm del CCR6. Es preferible que dicha molécula antisentido sea adecuada para el uso en una estrategia de molécula antisentido para inhibir la traducción del ARNm del CCR6 en una célula. Dicha molécula antisentido puede ser una molécula de ADN o ARN y puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización preferida, la molécula antisentido es una molécula de ADN monocatenario o una molécula de ARN monocatenario.

35 Una molécula antisentido preferiblemente tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nucleótidos, de aproximadamente 11 a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 13 a aproximadamente 75 nucleótidos o de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 16 a aproximadamente 30 nucleótidos o de aproximadamente 17 a
40 aproximadamente 25 nucleótidos.

Una molécula de ARNsi adecuada para reducir o inhibir la expresión del receptor CCR6 puede ser una molécula de ARNsi monocatenaria o bicatenaria que sea capaz de hibridarse con el ARNm del CCR6, induciendo así una interferencia en el ARN o cualquier otro mecanismo antisentido intracelular que consiga reducir o inhibir la expresión de la proteína CCR6.

45 La molécula de ARNsi puede ser de cualquier secuencia que permita que la molécula de ARNsi interfiera con el ARN y consiga reducir o inhibir la expresión de la proteína CCR6.

Preferiblemente, la molécula de ARNsi tiene una longitud de entre 10 y 100, entre 12 y 80, entre 14 y 60, entre 16 y 50, entre 17 y 40, más preferiblemente entre 18 y 30 nucleótidos y lo más preferiblemente entre 18 y 26 nucleótidos.

50 En otra realización preferida, una composición farmacéutica según la invención comprende otro compuesto activo adecuado para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

Los ejemplos de compuestos activos adicionales adecuados para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial son, p. ej., fármacos antiinflamatorios tales como, p. ej., prednisona u otros corticosteroides, azatioprina, metotrexato, micofenolato o ciclofosfamida, antioxidantes, tales como, p. ej., acetilcisteína, agentes antifibróticos, tales como, p. ej., bosentán o pirfenidona, minociclina, sildenafil, talidomida, anticuerpos anti-TNF, tales como, p. ej.,

Infliximab; etanercept, interferón gamma, anticuerpos anti-IL-13, inhibidores de la endotelina, Zileuton, anticoagulantes, macrólidos, inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) 4, tales como, p. ej., roflumilast, Aviptadil, hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), inhibidores de la tirosina cinasa, tales como, p. ej., imatinib, dasatinib y nilotinib.

5 El compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento del cáncer es preferiblemente un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento del cáncer son conocidos por el experto en la técnica. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos son, p. ej., temozolomida, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, p. ej., paclitaxel, Taxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, 10 ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósida, daunorubicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas y agentes hormonales que regulan o inhiben la actividad de las hormonas sobre los tumores como tamoxifeno y onapristona.

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

20 En otras realizaciones preferidas, se puede administrar una o más composiciones distintas, que comprenden un compuesto activo adecuado para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un compuesto activo adecuado para prevenir un cáncer, a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, combinadas con una composición farmacéutica según la invención que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6.

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

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o expresión del receptor CCR6 o de una composición farmacéutica según la invención para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

30 En una realización preferida del uso según la invención, el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 se selecciona del grupo que consiste en el polipéptido aislado según la invención, una molécula pequeña capaz de unirse al receptor CCR6, un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado según la invención, un aptámero específico para el receptor CCR6, un anticuerpo específico para el receptor CCR6, un molécula antisentido adecuada para reducir o inhibir la expresión del receptor CCR6 y una molécula de ARNs 35 adecuada para reducir o inhibir la expresión del receptor CCR6. Dichos compuestos capaces de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 se han descrito anteriormente en la presente memoria. En una realización particularmente preferida del uso según la invención, el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión del receptor CCR6 se selecciona del grupo que consiste en el polipéptido aislado según la invención y un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado según la invención.

40 La presente invención también se refiere al uso de un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20 para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.

45 En una realización preferida del uso según la invención referido, el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña capaz de unirse a la CCL18 o la CCL20, un aptámero específico para la CCL18 o la CCL20, un anticuerpo específico para la CCL18 o la CCL20, un molécula antisentido adecuada para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20 y un molécula de ARNs adecuada para reducir o inhibir la expresión de la CCL18 o la CCL20.

La presente invención también se refiere al uso de un agente de detección que se selecciona del grupo que consiste en:

- 50
- (a) un agente de detección específico para un polinucleótido que codifica el receptor CCR6;
 - (b) un agente de detección específico para el receptor CCR6;
 - (c) un agente de detección específico para un polinucleótido que codifica la CCL18;
 - (d) un agente de detección específico para la proteína CCL18;
 - (e) un agente de detección específico para un polinucleótido que codifica la CCL20; y

(f) un agente de detección específico para la proteína CCL20

para detectar una enfermedad pulmonar intersticial o un cáncer en una muestra de un sujeto.

Preferiblemente, dicho polinucleótido de (a), (c) y/o (e) es un ARNm. Los agentes de detección adecuados para detectar el ARNm del CCR6, el ARNm de la CCL18 o el ARNm de la CCL20 son, p. ej., sondas de oligonucleótidos antisentido específicas para el ARNm del CCR6, el ARNm de la CCL18 o el ARNm de la CCL20. Un agente de detección preferido para detectar el receptor CCR6, la proteína CCL18 o la proteína CCL20 es un anticuerpo o un aptámero. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el agente de detección también puede seleccionarse de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minianticuerpos, fragmentos Fv de cadena sencilla (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂. Un ejemplo de un anticuerpo específico para CCR6 disponible comercialmente es el mAb anti-CCR6 humano descrito más adelante en la presente memoria en el ejemplo 1. El agente de detección preferiblemente comprende un marcador detectable.

En una realización preferida del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa de causa conocida (preferiblemente colagenosis vascular o enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa por exposición ambiental o por toxicidad por fármacos), enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa granulomatosa (preferiblemente sarcoidosis) y otras formas de enfermedad parenquimatosa pulmonar difusa (preferiblemente linfangioleiomiomatosis (LAM), histiocitosis de células de Langerhans/histiocitosis X (HX) o neumonía eosinófila).

En una realización particularmente preferida del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial es una neumonía intersticial idiopática.

En una realización preferida adicional del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica. En una realización particularmente preferida del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, la enfermedad pulmonar intersticial es fibrosis pulmonar idiopática. Para un resumen de la clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales, el experto en la técnica puede referirse, p. ej., al artículo American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, American Thoracic Society; European Respiratory Society, Am J Respir Crit Care Med. 15 de enero de 2002;165(2):277-304.

En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar intersticial puede estar provocada por una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en manifestaciones pulmonares de la esclerodermia, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, artritis reumatoide, lupus eritematoso y asbestosis.

En otra realización preferida del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, neuroblastoma, melanoma, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer hematológico y cáncer de colon. En una realización preferida adicional del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

En una realización particularmente preferida del método según la invención, del kit de diagnóstico según la invención, de la composición farmacéutica según la invención y/o del uso según la invención, el cáncer es cáncer de pulmón, lo más preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, o mesotelioma pleural. En la realización más preferida, el cáncer es adenocarcinoma de pulmón.

Ahora la presente invención se describirá haciendo referencia a algunos de sus ejemplos específicos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y métodos

Biblioteca de expresión en fago

Para identificar un motivo de unión a la CCL18 se empleó una biblioteca de expresión en fago establecida (1).

Células y líneas celulares

Se establecieron líneas de fibroblastos procedentes de material quirúrgico de neumonectomías o lobectomías de pacientes que presentaban distintos tumores o del material sobrante obtenido en videotorascopias (VTC) de pulmón fibrótico. Los pacientes padecían adenocarcinoma de pulmón, carcinoma no microcítico o carcinoma escamoso. La fibrosis se debía a fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial idiopática, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, pneumoconiosis o escleroderma sistémico. El tejido se cortó en secciones pequeñas (aprox. 0,5 cm de longitud de arista) y se introdujo en placas de 6 pocillos que contenían 1 ml de Quantum 333 (PAA, Pasching, Austria) con penicilina/estreptomicina al 1 %. Los fibroblastos en expansión se recogían cuando alcanzaban una confluencia de aproximadamente el 80 % por tripsinación, se cultivaban en matraces de cultivo celular de 75cm² (NUNC Thermo Fisher, Roskilde, Dinamarca) en Quantum 333 y posteriormente se fraccionaban (1:3 a 1:5). En los estudios se utilizaron las líneas establecidas de los pases 3 a 8.

Salvo que se indique lo contrario, las células mencionadas se estimularon con 10 ng/ml de CCL18 humana recombinante, 2,5 ng/ml de TGFβ con o sin 1 ng/ml de TNFα. Se aislaron AECII como se ha descrito anteriormente (2). En resumen, primero se cortaron secciones de tejido pulmonar no tumoral en el examen macroscópico y se lavaron tres veces a 4°C en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se digirieron en solución estéril de dispasa [2,5 mg de dispasa II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) y 50 µg/ml de ADNsa I (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)] a 37 °C durante 60 minutos. Después de la digestión en dispasa, las secciones se pipetearon abundantemente durante varios minutos con una pipeta de 10 ml de boca ancha. Las suspensiones de tejido crudo y células se filtraron con una gasa de nylon de 50 y 20 µm de malla. Después la suspensión celular se extendió sobre una solución de gradiente de densidad (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania) y se centrifugó a 800×g durante 20 min.

Las células de la interfase se lavaron e incubaron en placas de Petri de 100 mm (max. 6 x 10⁷ células/placa) en RPMI (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) con 10 % de suero fetal bovino (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Alemania) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Biochrom AG, Berlin, Alemania) a 37 °C en una incubadora humidificada (5 % de CO₂, 37 °C) durante 15, 20 y, de ser posible, 30 minutos para separar las células adherentes (principalmente macrófagos alveolares, monocitos y fibroblastos) de las no adherentes.

Las células de adenocarcinoma pulmonar y de mesotelioma pleural fueron una generosa donación del Prof. HH Fiebig de Oncotest (Friburgo). Las células se cultivaron en RPMI1640 que contenía 10 % de FCS y 100 U/ml de estreptomicina y penicilina. Los cultivos se fraccionaron 1:3 cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 90 %.

30 Citometría de flujo

Se estimó la expresión del receptor CCR6 en la superficie de líneas de fibroblastos y de células tumorales así como en las células RLE-6TN usando un anticuerpo anti-CCR6 humano marcado con FITC (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) y se analizó usando un FACSCalibur (BD, Heidelberg, Alemania). Las células tripsinadas deben incubarse durante 3 h en medio a 37 °C para dar tiempo a la re-expresión de las moléculas en la superficie. Para inhibir la adherencia de las células, esta incubación se realizó en tubos de polipropileno.

La expresión del CCR6 en las células RLE-6TN también se analizó usando un anticuerpo policlonal de cabra anti-CCR6 (CKR6/C20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo de ratón contra cabra marcado con FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

La expresión superficial del CCR6 en las líneas celulares tumorales también se estimó usando un anticuerpo anti-CCR6 humano marcado con PE (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se midió con un FACSCalibur (Beckton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Análisis de la expresión del CCR6 en el carcinoma de pulmón humano

Se cortó el tejido tumoral de adenocarcinoma de pulmón recién aislado en secciones de no más de 1 x 1 x 0,5 cm de longitud de arista. El tejido se estableció usando solución estabilizante HOPE (DCS, Hamburgo, Alemania) a 4 °C y se incluyó en parafina. Los cortes de tejido se desparafinaron y se tiñeron para determinar la expresión del CCR6 por la técnica del peróxido (5) usando un anticuerpo disponible comercialmente (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania).

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó como se ha descrito anteriormente (3,4) usando un mAb anti-CCR6 humano (clon 53103, isotipo IgG2b murino; R&D Systems Europe, Reino Unido) y una técnica de estreptavidina-biotina marcada con peroxidasa (DAKO LSAB2 System; Dakocytomation, Alemania). La tinción de contraste se realizó con hemalum de Mayer. En cada serie de tinción se incluyeron cortes teñidos sin el anticuerpo primario como control negativo.

ELISA para el FGF2

Para estimar la liberación de FGF2 inducida por la CCL18, se recolectaron fibroblastos, se contaron y se sembraron 300.000 células por pocillo en una placa de cultivo celular de 6 pocillos en Quantum 333. Se dejó que las células se adhirieran toda la noche y el medio se sustituyó por 1 ml de DMEM con 10 % de FCS. Las células no recibieron estimulación o se estimularon con 10 ng/ml de CCL18 humana recombinante. Para bloquear la interacción de CCR6/CCL18 se añadió un anticuerpo de bloqueo contra el CCR6 (R&D systems, Wiesbaden, Alemania) o un anticuerpo irrelevante (murino contra IgG humana, R&D Systems) hasta una concentración final de 20 µg/ml en cultivos paralelos. Después de 24 h de cultivo, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta la cuantificación del FGF2.

Las concentraciones de FGF2 se midieron usando un kit de ELISA (R&D) según las instrucciones del proveedor.

10 PCR en tiempo real

Después del periodo de cultivo indicado, se extrajo el ARN total usando el reactivo TRIzol según el protocolo del fabricante (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Se hizo una transcripción inversa del ARN total con StrataScript RT (Stratagene, Santa Clara, CA) usando el cebador oligo (dT)12-18 para obtener el ADNc según el protocolo del fabricante. Se diseñaron cebadores específicos para el CCR6 humano, el colágeno tipo I, la actina α de músculo liso y la GAPDH usando el programa Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, EE. UU.; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), el programa Amplify 1,2 (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; <http://engels.genetics.wisc.edu/amplify>) usando las bases de datos LocusLink y GenBank (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/index.html>). En la figura 17 se incluye el número de código de acceso de las secuencias de nucleótidos que se usaron para generar los cebadores respectivos además de las secuencias de los cebadores.

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

Western blot

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

Todas las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12 %, se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Después de bloquear durante 2 h en solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 5 % de leche en polvo desnatada, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario [(de conejo anti-colágeno I (Rockland, Gilbertsville PA, EE. UU.); anti-αSMA (de conejo anti-αSMA (Abcam, Cambridge, MA); anti-vimentina (Santa Cruz); anti-CCR6: CKR6/C20, Santa Cruz)] diluido 1:700 con TBS a 4 °C toda la noche. La visualización se realizó usando anticuerpos secundarios apropiados marcados con IRDye 800CW o IRDye 700CW (Li-COR Bioscience, Bad Homburg, Alemania) diluidos 1:10 000-1:20000 durante 2 h y se escaneó usando el sistema Odyssey (Li-COR Bioscience) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de la expresión del CCR6 en PBMC en presencia o ausencia de PHA

Centrifugando en gradiente de densidad se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre extraída por venopunción, se lavaron y se contaron. Las células se ajustaron a 1×10^6 células por ml en medio de cultivo completo (RPMI1640 con 10 % de suero fetal bovino y 100 U de penicilina/estreptomicina) y se cultivaron durante 24 h en ausencia o en presencia de 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). Se midió el porcentaje de células CCR6 positivas usando anticuerpos anti-CCR6 marcados con FITC (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) y se contaron en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Inhibición de la disminución del CCR6

Se incubaron células mononucleares recién aisladas durante 20 minutos con 10 ng/ml de CCL18, 100 ng/ml del péptido inhibidor PS-AU-105 (polipéptido según la SEQ ID NO.: 9), una combinación de ambos o se dejaron sin tratamiento. La incubación se realizó en RPMI1640 con 10 % de suero fetal bovino y 100 U/ml de estreptomicina/penicilina a 37 °C. Después de la incubación, se centrifugaron las células y se descartó el sobrenadante. Las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído durante 5 minutos sobre hielo y se lavaron dos veces en PBS con 1 % de FCS. Después de fijar, las células se tiñeron usando un anticuerpo anti-CCR6 conjugado con fluoresceína (R&D systems, Wiesbaden, Alemania) y se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur y Quantiquest; ambos de Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE. UU.).

Estadísticas (figuras 1 a 16)

5 Todas las estadísticas se calcularon utilizando estadísticos no paramétricos. El análisis pareado del aumento o la inhibición se realizó usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon; los grupos no pareados se analizaron usando el test U de Mann-Whitney. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$. Los datos se presentan usando diagramas de cajas. En este caso, la mediana se representa con una línea incluida en un rectángulo que indica el percentil 25 y el 75. Los percentiles 5 y el 95 se indican mediante líneas por encima o por debajo del rectángulo, los valores fuera del intervalo de los percentiles 5 y 95 se ilustran en forma de puntos.

Pacientes

10 Se extrajo suero de voluntarios sanos ($n = 6$), de pacientes con NII ($n = 6$) y NIU ($n = 13$) por venopunción. Después de coagular durante una hora, la sangre se centrifugó durante 15 minutos, se tomaron alícuotas de las muestras de suero y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes del ELISA.

Análisis por Western blot del suero (Ejemplo 8)

15 El suero se diluyó 1:10 con tampón para Western blot y se hirvió a $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos en volúmenes iguales de tampón de carga (Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, 2 % de SDS, 0,05 % de azul de bromofenol, 20 % de 2-mercaptoetanol, 10 % de glicerol).

20 Todas las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12 %, se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Después de bloquear durante 2 h en solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 5 % de leche en polvo desnatada, las membranas se incubaron con anticuerpo primario anti-CCR6 (CKR6/C20, Santa Cruz), se diluyeron 1:700 con TBS a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la mañana siguiente. La visualización se realizó usando un anticuerpo secundario marcado con IRDye 800CW (Li-COR Bioscience, Bad Homburg, Alemania) diluido 1:10 000-1:20000 durante 2 h. Después las transferencias se escanearon y analizaron usando el sistema y el programa Odyssey (Li-COR Bioscience) según las instrucciones del fabricante.

ELISA para el CCR6

25 El Elisa se realizó como indicaba el proveedor (Uscn Life Science Inc. Wuhan, China).

Bloqueo del CCR6 soluble libre

El suero se diluyó con un volumen igual de PBS/BSA (1 % de albúmina de suero bovino, Sigma, Deisenhofen, Alemania) sin aditivos o con CCL18 o CCL20 (ambas de PeproTech, Hamburgo, Alemania; 100 ng/ml cada una). El suero diluido después se incubó durante 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se midió por ELISA.

30 Lavado broncoalveolar

La broncoscopia, el lavado broncoalveolar y el cultivo celular del lavado broncoalveolar se realizaron usando técnicas estándar descritas anteriormente (8, 9). Al final del periodo de cultivo, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se analizó para determinar la concentración de CCL18. Se determinó la viabilidad de las células mediante exclusión por Trypan blue y siempre superó el 95 %.

35 Recuento celular diferencial del lavado broncoalveolar

El diferencial celular se determinó contando al menos 200 células de un frotis celular con tinción de May-Grunwald.

40 Para la tinción con inmunoperoxidasa, las células se fijaron en portas recubiertos de poli-L-lisina (Bio-Rad, Munich, Alemania) y se revelaron con una técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), usando anticuerpos monoclonales contra CD4, CD8, IL-2R (Ortho Diagnostic Systems; Neckargemünd, Alemania) y antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR) (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Se contaron al menos 200 células y las positivas se expresan en términos de porcentaje de todos los linfocitos.

Estadísticas (figuras 18 a 22)

45 Los datos se representan en términos de media \pm DT. La comparación de los datos nominales se realizó usando la prueba de ji cuadrado. Los datos continuos se analizaron usando la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Todas las estadísticas se calcularon utilizando el programa StatView.

Materiales y métodos para los ejemplos 11 a 17 y las figuras 23 a 32:

Características de los pacientes con CPNM y de los controles sanos:

50 En este estudio participaron 170 pacientes diagnosticados de CPNM (estadio I a estadio IV de la UICC, 6ª Edición) y un grupo de control de 31 voluntarios sanos. La edad media de los pacientes fue de 64 ± 10 años, 125 hombres y 45 mujeres. Setenta pacientes habían sido diagnosticados de adenocarcinoma, 54 pacientes de carcinoma escamoso y

5 en 46 casos el patólogo describió una histología mixta. Utilizando la clasificación del estadio de la UICC (6ª Edición), los autores clasificaron a 22 pacientes en estadio IA, a 19 en estadio IB, a 5 en estadio IIB, a 29 en IIIA, a 25 en IIIB y a 69 en estadio IV. En un caso, no se determinó el estadio de la UICC porque los datos, que describían únicamente el estado ganglionar, eran insuficientes. El grupo de control estaba formado por 10 mujeres y 22 hombres con una edad media de 32 ± 11 años.

10 Todos los procedimientos para el consentimiento informado, la obtención de datos y la protección de la privacidad fueron aprobados por los Comités Éticos del Centro Médico Universitario de Friburgo. Los datos clínicos se extrajeron de la base de datos de historias clínicas del Centro Médico Universitario de Friburgo. Las muestras de suero de cada persona se tomaron en el diagnóstico, durante las pruebas clínicas antes de iniciar el tratamiento terapéutico. El suero se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se realizaron los análisis. El diagnóstico de CPNM se confirmó por histología o citología. El tipo histológico se determinó según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Todos los tumores se clasificaron según la 6ª edición de la UICC.

Inmunodetección de la CCL18 en suero

15 Utilizando un procedimiento de rutina se tomaron muestras de sangre venosa que se dejaron reposar 20 minutos antes de centrifugar. Después de centrifugar, las muestras de suero se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se almacenaron. La CCL18 se cuantificó usando el kit DuoSet ELISA Development System (R&D Systems Europe, Wiesbaden, Alemania). El límite de detección para la CCL18 en el ELISA fue de 7 pg/ml. Todas las muestras se midieron por duplicado. Para las muestras duplicadas, se aceptó un coeficiente de variación intraensayo del 10 % y un coeficiente de variación entre ensayos del 20 %.

20 Inducción de la TEM por la CCL18

Se sembraron células de la línea celular de adenocarcinoma A549 en placas de 6 pocillos y se dejaron adherir hasta la mañana siguiente. Después de la adherencia, se estimuló a las células con la cantidad indicada de CCL18. Como control positivo se usó TGF β . Las células se recolectaron después de 72 h y se analizaron por PCR o por Western blot.

25 Aislamiento de líneas de fibroblastos

30 Se establecieron líneas de fibroblastos procedentes de material quirúrgico de neumonectomías o lobectomías de pacientes que presentaban distintos tumores. El tejido se cortó en secciones pequeñas (aprox. 0,5 cm de longitud de arista) y se introdujo en placas de 6 pocillos que contenían 1 ml de Quantum 333 (PAA, Pasching, Austria) con penicilina/estreptomina al 1 %. Los fibroblastos en expansión se recogían cuando alcanzaban una confluencia de aproximadamente el 80 % por tripsinación, se cultivaban en matraces de cultivo celular de 75cm² (NUNC Thermo Fisher, Roskilde, Dinamarca) en Quantum 333 y posteriormente se fraccionaban (1:3 a 1:5).

Citometría de flujo

35 La expresión del CCR6 en la superficie de las líneas de fibroblastos se estimó usando un anticuerpo anti-CCR6 humano marcado con FITC (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se midió por citometría (FACScalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes).

Estadísticas

40 Las concentraciones se expresan en términos de mediana (intervalo). El análisis estadístico se realizó usando el programa StatView 5.0 (SAS Institute, NC). Los datos se presentan en términos de media y su desviación típica y se muestran en un diagrama de cajas. La comparación entre los grupos de pacientes se realizó usando pruebas ANOVA y de Bonferroni-Dunn para comparaciones múltiples. Las variables relacionadas como la producción de citocinas en cultivos celulares idénticos después de distintas estimulaciones se compararon por la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. El análisis ROC y el "valor de las gráficas en función del criterio" se realizaron usando el programa MedCalc (MedCalc Software bvba, Mariakerke, Bélgica).

45 En las comparaciones únicas, el valor de la probabilidad se consideraba significativo si era inferior a 0,05. En las comparaciones múltiples el nivel de p se ajustaba dependiendo del número de comparaciones (Bonferroni).

Ejemplo 2 - Identificación de un péptido que se une a CCL18 usando la expresión en fago

50 Después de 3 ciclos de unir los fagos de la biblioteca de fagos (como se ha descrito en el ejemplo 1), a CCL18 unida a una placa, se plaquearon E. coli infectados con fagos en agar y se eligieron 20 colonias, se expandieron y se aisló su ADN para secuenciarlo. Algunas de las secuencias eran no codificantes o codificaban dianas de genes no humanos, sin embargo, se identificó una secuencia claramente relacionada con el receptor de quimiocina CC 6 (CCR6).

Ejemplo 3 - Análisis de la expresión del CCR6 en una línea de fibroblastos humanos primarios

PCR

Los estudios de expresión usando cebadores para CCR6 revelaron una gran variabilidad en la expresión del ARNm del CCR6. La expresión más elevada se encontró en las líneas de fibroblastos procedentes del pulmón de los pacientes con neumonía intersticial usual (NIU). Las líneas procedentes de pacientes con neumonía intersticial idiopática (NII) y carcinoma escamoso expresaban un nivel muy bajo de ARNm del CCR6 (Fig. 1).

5 FACS

En el análisis por citometría de flujo de las líneas de fibroblastos establecidas se observó una expresión detectable de CCR6 solo en las líneas de fibroblastos procedentes de pacientes con NIU. Las líneas procedentes de los pacientes con carcinoma escamoso o NII no expresan un nivel detectable de CCR6 en la superficie (Fig. 2). La expresión elevada del CCR6 en los fibroblastos del pulmón fibrótico se mantuvo elevada en todos los pases (no se muestran datos).

Inmunohistoquímica

Los estudios inmunohistoquímicos de secciones tisulares procedentes del pulmón de pacientes con FPI/NIU no revelaron expresión del CCR6 en el tejido pulmonar normal (Fig. 3A). En el pulmón fibrótico se detectó expresión del CCR6 en la superficie apical de las células epiteliales alveolares (Fig. 3B) y en los fibroblastos (Fig. 3C).

15 Ejemplo 4 - Análisis funcional del CCR6

Expresión del FGF2

Los fibroblastos procedentes de pulmones no fibróticos liberan un nivel muy bajo de FGF2. La CCL18 estimula una liberación muy escasa de FGF2 en estas células. Por el contrario, sin estimulación, los fibroblastos procedentes del pulmón fibrótico liberan una gran cantidad de FGF2 ($p < 0,005$ frente a los controles) que aumenta todavía más cuando son estimulados por la CCL18 ($p < 0,05$, Fig. 4).

El bloqueo del CCR6 por un anticuerpo bloqueante no produce ningún efecto en la liberación del FGF2 estimulada por la CCL18 en las líneas de fibroblastos de pulmón no fibrótico. En los fibroblastos procedentes de pulmón fibrótico, el bloqueo del CCR6 redujo significativamente el aumento del nivel de FGF2 inducido por la CCL18 ($p < 0,05$).

Expresión de colágeno

Se ha publicado que la CCL18 induce la expresión de colágeno y de α SMA (7, 18). Por eso se analizó si la inducción de estas moléculas es también dependiente del CCR6. Como se muestra en la Fig. 5 (gráfica superior), la CCL18 aumenta la expresión del colágeno I en tres de las cuatro líneas celulares analizadas. Esta inducción fue inhibida en las tres líneas celulares que reaccionaban a CCL18 cuando se bloqueó el CCR6 mediante un anticuerpo bloqueante. El mismo resultado se obtuvo para el aumento de la expresión de α SMA inducido por la CCL18. La línea celular que no mostró aumento de la expresión de colágeno I al ser estimulada por la CCL18, tampoco reaccionó en el caso de la α SMA (Fig. 5, gráfica inferior).

Ejemplo 5 - La inducción de la transición epitelio-mesénquima (TEM) de los miofibroblastos por la CCL18 es dependiente de CCR6

TEM de la línea celular de epitelio alveolar de rata RLE-6TN

La línea celular de epitelio alveolar de rata RLE-6TN presenta la típica forma de célula cuboide de la célula epitelial (Fig. 6 arriba). El cultivo de estas células durante seis días en presencia de CCL18 induce la diferenciación a células fibroblastoides de forma ahusada (Fig. 6 centro, véanse las flechas) en algunas zonas. La diferenciación es más pronunciada en presencia de TGF β (Fig. 6 abajo, véanse las flechas) ya que casi todas las células presentan un fenotipo fibroblastoide con forma ahusada. Estos resultados indican que la CCL18 induce la TEM, al menos parcialmente, en las células RLE-6TN.

Los análisis por Western blot de las RLE-6TN después de la TEM inducida por la CCL18 o el TGF β revelaron la expresión de vimentina después del cultivo en presencia de CCL18, que aumenta con el TNF α (Figura 7). En ambas condiciones solo se observó una tenue expresión de α SMA. El TGF β indujo una potente expresión de α SMA pero no pudo inducir la expresión de vimentina.

La microscopia de fluorescencia demostró que la estimulación con TGF β sí induce la expresión de α SMA en las células RLE-6TN (Fig. 8B) mientras que la CCL18 sola o la CCL18 con TNF α no (Fig. 8C y D). Por el contrario, todas las estimulaciones indujeron la expresión del CD90 (Fig. 9B y C), aunque la expresión del CD90 fue más intensa cuando se utilizó la CCL18. La PCR cuantitativa en tiempo real de las RLE-6TN reveló una expresión tenue del CCR6 de rata. No obstante, en el análisis de la proteína CCR6 mediante Western blot o citometría de flujo no se pudo demostrar la expresión del CCR6 en las células RLE-6TN (no se muestran datos). Por tanto, las células fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido disponible comercialmente que contenía una secuencia de ADN que codifica el CCR6 humano. Después de la transfección, la estimulación con CCL18 indujo la expresión de la α SMA en las células transfectadas con el CCR6, pero no en las células con transfección simulada. Por el contrario, el TGF β indujo la expresión de α SMA en ambos tipos de células (Figura 10).

TEM de células epiteliales alveolares primarias humanas

La estimulación de células epiteliales alveolares primarias humanas de tipo II aisladas con TGFβ+TNFα o CCL18 con o sin TNFα también induce la TEM como se demostró por la mayor expresión de vimentina y αSMA y la menor expresión de citoqueratina (Fig. 11).

5 Ejemplo 6 - Inhibición de la reducción de la expresión del CCR6 inducida por la CCL18 en las PBMC

Se agruparon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas aisladas según el porcentaje basal de células CCR6⁺. Cuando las PBMC se cultivan sin ninguna activación no se altera el porcentaje de células CCR6⁺. Por el contrario, la activación con PHA aumenta el porcentaje de las células CCR6⁺ en las preparaciones con una proporción inicial baja de CCR6⁺ (Fig. 12, barras sombreadas), pero disminuye en las preparaciones con una proporción alta de CCR6⁺ (Fig. 12 barras blancas).

La incubación con CCL18 de las PBMC aisladas con una alta proporción de células CCR6⁺ durante 20 minutos provocó un descenso en el porcentaje de células CCR6⁺ (Fig. 13) posiblemente por la internalización del receptor CCR6. Este descenso en la expresión del CCR6 inducido por la CCL18 es menos acusado en presencia del péptido inhibidor PS-AU-105 (polipéptido según la SEQ ID NO.: 9). La Fig. 14 demuestra una clara subpoblación de células CCR6⁺ en el cultivo no estimulado (control pos.). La estimulación con CCL18 reduce esta subpoblación como demuestra el segundo pico de menor tamaño (Solo CCL18). La estimulación con CCL18 en presencia del péptido inhibidor PS-AU-105 (polipéptido según la SEQ ID NO.: 9) no consigue reducir la subpoblación CCR6⁺. El inhibidor solo no produce ningún efecto (Solo inhibidor).

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

20 Inmunohistoquímica

En el análisis del pulmón de control no se observó tinción de los CCR6 (Fig. 15A). Por el contrario, en las células tumorales se observó una clara expresión de los CCR6 (Fig. 15 B y C, flechas). Además, en algunos fibroblastos también se observó una tenue expresión de CCR6 (Fig. 15 C, puntas de flecha).

FACS

25 En el análisis por FACS se observó una marcada expresión del CCR6 en dos de las tres líneas celulares de adenocarcinoma (Fig. 16 gráficas superiores) y en todas las líneas celulares de mesotelioma pleural (Fig. 16 gráficas inferiores). La línea celular de adenocarcinoma de pulmón LxFA 526L presenta una expresión muy leve de CCR6.

30 Ejemplo 8 - Detección del CCR6 soluble (sCCR6) en el suero de los pacientes con fibrosis pulmonar y de los controles sanos

Análisis por Western blot

En el análisis por Western blot se observó la presencia del sCCR6 en el suero de los voluntarios sanos y en los pacientes con NIU (Fig. 18A). En el análisis cuantitativo de las Western blots se observó que la intensidad del pico era ligera pero significativamente menor entre los pacientes fibróticos que entre los controles (Fig. 18B).

35 ELISA

Para evaluar las diferencias observadas en el análisis por Western blot con mayor precisión, se midió la concentración del sCCR6 usando un ELISA para el CCR6 disponible comercialmente. En 15 de las 19 muestras de los pacientes con fibrosis (NII: n = 6, NIU: n = 13) no fue posible detectar el sCCR6, pero solo 2 de las 9 muestras de suero de los voluntarios sanos fueron negativas (p < 0,005). Incluso en las dos muestras positivas por Western blot (carriles 4 y 6 de la Figura 18 A) no fue posible detectar el sCCR6 en el ELISA. En el suero de los pacientes con fibrosis pulmonar, la concentración de sCCR6 fue significativamente menor que en los controles (18 ± 11 versus 216 ± 95 pg/ml; p < 0,001; Fig. 19). El análisis posterior de las enfermedades fibróticas subyacentes no reveló diferencias en la concentración de sCCR6 entre los pacientes con NIU y con NII.

Ejemplo 9 - Las moléculas de sCCR6 presentes en el suero de los pacientes fibróticos están unidas a ligandos

45 En el ELISA del sCCR6 descrito en el ejemplo 8 se emplea un anticuerpo monoclonal anti-CCR6 como anticuerpo de captura unido a la placas y un anticuerpo policlonal anti-CCR6 conjugado con biotina como anticuerpo de detección. La mayor parte de los anticuerpos monoclonales anti CCR6 están dirigidos contra el extremo N del receptor que porta el sitio de unión al ligando. Para analizar si el sitio de reconocimiento del anticuerpo de la molécula del sCCR6 presente en el suero de los pacientes fibróticos podría estar cubierto con el ligando por la gran abundancia de CCL18 en este suero [6, 7], se incubó el suero de voluntarios sanos con 100 ng/ml de CCL18 o CCL20, respectivamente y se cuantificó por ELISA el sCCR6 presente en el suero bloqueado y no bloqueado. La adición de estos ligandos de CCR6 provoca una notable reducción de la señal del sCCR6 (Fig. 20). La adición de 100 ng de CCL18 o CCL20 prácticamente anula la detección del CCR6 en el suero con una concentración baja y media de

sCCR6. En un suero que tenía una concentración alta de sCCR6 solo se observó una reducción de la concentración del 36 % en el caso de la CCL18 y del 14 % en el caso de la CCL20.

Por tanto, el sCCR6 unido a sus ligandos, la CCL18 y la CCL20, deja de ser detectable en el ELISA.

5 Estos resultados indican que las moléculas de sCCR6 presentes en el suero de los pacientes fibróticos están unidas a ligandos, de forma que la concentración de sCCR6 que se detecta en el suero de dichos pacientes mediante un ELISA es más baja (ejemplo 8). Los datos también indican que la CCL18 ha perdido la capacidad bloqueante en los pacientes negativos para sCCR6 no unidos a ligandos en suero.

Ejemplo 10 - Los pacientes con fibrosis y positivos para sCCR6 en suero presentan un mayor porcentaje de linfocitos en el lavado broncoalveolar (BAL) que los pacientes negativos para sCCR6

10 Se ha comprobado que la CCL18, identificada por los autores de la presente invención como ligando del receptor CCR6, induce la quimiotaxis de los linfocitos T. Por eso se estudió la posible influencia de los sCCR6 sobre la población celular presente en el lavado broncoalveolar. De hecho, los pacientes con fibrosis (NII: n = 6, NIU: n = 13) positivos para sCCR6 no unidos a ligandos en suero presentan un porcentaje de linfocitos en el lavado broncoalveolar significativamente mayor que los pacientes negativos para sCCR6 no unidos a ligandos (35,5 % versus 17,8 %, $p < 0,05$). Esta diferencia no se ha observado en los controles (Fig. 21).

Estos datos indican que los sCCR6 reducen la biodisponibilidad de la CCL18 en suero, aumentando así el gradiente de concentración de la CCL18 entre el pulmón y la periferia y forzando la quimiotaxis de las células inmunitarias a los alvéolos del pulmón. Esta función se ha perdido en los pacientes negativos para sCCR6 no unidos a ligandos, lo que provoca una acumulación de CCL18 y reduce el gradiente de concentración funcional de la CCL18.

20 En general, la fibrosis pulmonar entre los pacientes con mayor porcentaje de linfocitos es menos grave que entre los pacientes con un menor porcentaje de linfocitos en el lavado broncoalveolar. El análisis de las subpoblaciones de linfocitos reveló un aumento leve, pero significativo, de los linfocitos T CD3⁺ en los pacientes positivos para sCCR6 en suero ($91,0 \pm 1,4$ % versus $95,7 \pm 1,2$ %; $p < 0,05$). Por el contrario, el porcentaje de linfocitos HLA-DR⁺ fue menor entre los pacientes positivos para sCCR6 que entre los negativos para sCCR6 ($32,3 \pm 14,4$ % versus $7,0 \pm 7,8$ %; $p < 0,05$). Los pacientes positivos para sCCR6 también presentaban un mayor porcentaje de células NK (CD57⁺) y células CD1a⁺ ($33,0 \pm 9,6$ % versus $14,5 \pm 5,6$ % y $1,0 \pm 1,0$ % versus $0,1 \pm 0,3$ %, respectivamente; $p < 0,05$ en ambos casos) (Fig. 22).

Ejemplo 11 - Nivel sérico de CCL18 en los pacientes con CPNM y correlación con los parámetros clínico-patológicos

30 Se observó una diferencia significativa entre todos los grupos de pacientes y los controles ($p < 0,0001$; Fig. 23). El nivel sérico de CCL18 entre los pacientes con carcinoma de células escamosas fue mayor que el de los pacientes con adenocarcinoma (172 ± 95 ng/ml, 207 ± 139 ng/ml; respectivamente; $p < 0,02$). El nivel sérico de CCL18 aumentó gradual y significativamente con el estadio T (Fig. 24). Comparando con los controles, el nivel sérico de CCL18 fue significativamente mayor entre los pacientes en estadio I (134 ± 74 ng/ml, $n = 39$, $p = 0,0002$) y aún más entre los de estadio II (176 ± 99 ng/ml, $n = 61$, $p < 0,0001$), III (215 ± 106 ng/ml, $n = 26$, $p < 0,0001$) y IV (219 ± 177 ng/ml, $n = 28$, $p < 0,0001$). Al comparar los pacientes con tumores se observó que el nivel en el estadio I era significativamente menor que en el estadio III (215 ± 106 ng/ml, $n = 26$, $p < 0,005$) y en el estadio IV (219 ± 177 ng/ml, $n = 28$, $p = 0,002$). El nivel de CCL18 en los estadios III y IV también fue significativamente diferente del de los controles ($p < 0,0001$).

Ejemplo 12 - Determinación del punto de corte del nivel sérico de CCL18

40 El análisis de la característica operativa del receptor (ROC) reveló un punto de corte de 83 ng/ml (área bajo la curva (AUC): 0,968; $p < 0,0001$, Fig. 25 izquierda) que permite discriminar entre los controles sanos y los pacientes con CPNM. El análisis ROC para discriminar entre las muertes relacionadas con el cáncer y las no relacionadas con el cáncer no produjo una AUC válida. Para estratificar a los pacientes con tumores, se representó un diagrama de valor de criterio usando el criterio de muerte durante el periodo de observación. Este análisis reveló un punto de igual sensibilidad y especificidad (54 %) de 162 ng/ml (Fig. 25 derecha).

Ejemplo 13 - Nivel sérico de CCL18 y supervivencia en los pacientes con CPNM

50 El tiempo medio de supervivencia de los pacientes con CPNM y un nivel sérico de CCL18 por encima de 160 ng/ml fue de 623 días, mientras que entre los pacientes con CPNM y un nivel sérico entre 160 ng/ml y 80 ng/ml el tiempo medio de supervivencia fue de 984 días. Entre los pacientes con un nivel de CCL18 inferior a 80 ng/ml el tiempo medio de supervivencia fue de 841 días ($p < 0,004$, Fig. 26).

Ejemplo 14 - Nivel sérico de CCL18 y supervivencia por subgrupo histológico

El tiempo medio de supervivencia entre los pacientes con adenocarcinoma de pulmón fue de 388 días en el grupo con mayor nivel de CCL18. En el grupo con un nivel de CCL18 entre 160 y 80 ng/ml, el tiempo medio de

supervivencia fue de 788 días y en el grupo con nivel normal de CCL18, el tiempo medio de supervivencia fue de 1152 días ($p < 0,002$).

Ejemplo 15 - Nivel sérico de CCL18 y estadios tumorales en los subgrupos histológicos

5 Respecto al subgrupo de los pacientes con adenocarcinoma, el estadio N medio en el grupo con una concentración sérica de CCL18 superior a 160 ng/ml fue significativamente mayor ($1,7 \pm 1,1$) que en el subgrupo con un nivel sérico de CCL18 normal ($0,5 \pm 1$; $p < 0,005$, Fig. 28). Entre estos pacientes con adenocarcinoma, también se observó que la frecuencia de metástasis en el subgrupo con CCL18 sérica por encima de 160 ng (58 %) tendía a ser mayor que en los otros grupos (<160 ng/ml: 42 %; normal: 25 %).

Ejemplo 16 - La CCL18 induce la TEM en las células de adenocarcinoma

10 La estimulación de las células de adenocarcinoma con CCL18 durante 72 h induce un aumento marcado y dependiente de la dosis de la expresión del ARNm del marcador de fibroblastos FSP1. El aumento de la expresión inducido por la CCL18 fue mayor que el inducido por el TGF β (Fig. 29). Además, la CCL18 también induce una expresión dependiente de la dosis del factor de transcripción asociado a los fibroblastos snail. Aquí también, la estimulación de la CCL18 fue más eficaz que la del TGF β (Fig. 30). Al contrario de lo que sucedía con los marcadores anteriores, el marcador epitelial E-cadherina sufrió una brusca reducción después de 24 h de estimulación con la CCL18 (Fig. 31).

Ejemplo 17 - Expresión del CCR6 en líneas de fibroblastos de subgrupos histológicos

20 Los fibroblastos aislados de los pulmones de pacientes que padecen adenocarcinoma presentan un mayor porcentaje de células CCR6 positivas (30 ± 22 %, $n = 4$; Fig. 32) que las líneas de fibroblastos procedentes de carcinoma escamoso o de pulmones con histología mixta (2 ± 1 %, $n = 8$ y 2 ± 2 %, $n = 6$, respectivamente).

25 Los resultados descritos en los Ejemplos 11 a 17 proceden del primer estudio en el que se investigó el nivel sérico de CCL18 en pacientes con cáncer de pulmón. Se observó que el nivel sérico medio de CCL18 entre los pacientes con cáncer de pulmón es más de cuatro veces superior al de los controles sanos. Los datos obtenidos demuestran que el nivel sérico de CCL18 aumenta con el estadio T. Por el contrario, el estadio N y M no muestra correlación con el nivel sérico de CCL18. Además, el nivel sérico de CCL18 difirió dependiendo de la histología del cáncer de pulmón.

Los macrófagos asociados a tumores (MAT) se asemejan a los macrófagos activados por otras vías, también en la producción de CCL18.

30 El punto de corte para discriminar entre los sujetos sanos y los pacientes con CPNM es de 83 ng/ml y es similar al punto de corte determinado por los autores para discriminar entre los pacientes con fibrosis y los controles sanos. No fue posible utilizar el análisis ROC para predecir la muerte relacionada con el cáncer según el nivel sérico de CCL18. Por eso, para definir un valor de corte para estratificar a los pacientes se creó un diagrama de valor del criterio para la supervivencia. Este diagrama de valor del criterio para la CCL18 reveló un punto de corte de la concentración de 160 ng/ml. Este punto de corte de 160 ng/ml es un potente factor de predicción del tiempo de supervivencia entre los pacientes con CPNM. El tiempo de supervivencia medio de los pacientes con una concentración sérica de CCL18 de 160 ng/ml o superior fue un tercio menor que el de los pacientes con una concentración de CCL18 inferior a 160 ng/ml. Este efecto es más característico en el subgrupo de pacientes con adenocarcinoma. La CCL18 es un producto típico de los macrófagos activados de formas alternativas y es un posible marcador de los MAT. Dado que los MAT se localizan dentro del tumor, su número debería aumentar con la masa del tumor. Por eso se estudió la correlación entre el nivel sérico de CCL18 y el estadio T como marcador alternativo del tamaño del tumor. Esto es aplicable especialmente a los estadios T inferiores y, de hecho, el nivel sérico de CCL18 aumenta con el estadio T de T1 a T3. La principal diferencia entre el estadio T3 y T4 es la infiltración de importantes estructuras mediastínicas pero no refleja necesariamente un tamaño mayor. No se encontraron diferencias significativas en el nivel sérico de CCL18 de los pacientes en los estadios T3 y T4.

45 Los estadios N y M son marcadores alternativos de la metástasis hemática y linfática. El aumento del estadio N y el hecho de que la frecuencia de las metástasis tiende a ser mayor entre los pacientes con un nivel sérico de CCL18 alto indican, una vez más, que la CCL18 es un marcador de la progresión de la enfermedad en el adenocarcinoma.

50 De forma similar a los resultados obtenidos en las células epiteliales, la CCL18 induce la transición epitelio-mesénquima también en las células de adenocarcinoma. Se cree que la TEM es un evento importante en los procesos de metástasis. La capacidad migratoria de las células cancerosas es limitada. Durante la TEM las células cancerosas pierden el contacto con el tejido circundante y adquieren funciones que les permiten migrar. El aumento de los marcadores mesenquimales FSP1 y snail y el descenso del nivel de E-cadherina indican que la CCL18 induce la TEM en las células de adenocarcinoma. Por tanto, la pérdida de la molécula de adhesión E-cadherina, permite a la célula escapar del tejido tumoral. Se cree que la FSP1 está relacionada con la metástasis y la invasión tumoral. El factor de transcripción snail regula la expresión del colágeno, de algunas metaloproteinasas de la matriz y de la actina α de músculo liso, que es importante para la motilidad de las células.

Por tanto, la CCL18 es un biomarcador que permite estratificar a los pacientes de adenocarcinoma de alto riesgo. Los datos también indican que la CCL18 fomenta la metástasis tumoral al inducir la TEM.

Bibliografía

- 5 1. Trepel, M., Arap, W. y Pasqualini, R. 2002. In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr Opin Chem Biol* 6:399-404.
2. Pechkovsky, D.V., Zissel, G., Ziegenhagen, M.W., Einhaus, M., Taube, C., Rabe, K.F., Magnussen, H., Papadopoulos, T., Schlaak, M. y Muller-Quernheim, J. 2000. Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur Cytokine Netw* 11:618-625.
- 10 3. Goldmann, T., Wiedorn, K.H., Kuhl, H., Olert, J., Branscheid, D., Pechkovsky, D., Zissel, G., Galle, J., Muller-Quernheim, J. y Vollmer, E. 2002. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 198:91-95.
- 15 4. Pechkovsky, D.V., Zissel, G., Goldmann, T., Einhaus, M., Taube, C., Magnussen, H., Schlaak, M. y Muller-Quernheim, J. 2002. Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L684-692.
5. Droemann, D., D. Albrecht, J. Gerdes, A.J. Ulmer, D. Branscheid, E. Vollmer, K. Dalhoff, P. Zabel y T. Goldmann, Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*, 2005. 6(1): p. 1.
- 20 6. Prasse, A., D.V. Pechkovsky, G.B. Toews, M. Schafer, S. Eggeling, C. Ludwig, M. Germann, F. Kollert, G. Zissel y J. Muller-Quernheim, CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic Interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(5): p. 1685-93.
7. Prasse, A., C. Probst, E. Bargagli, G. Zissel, G.B. Toews, K.R. Flaherty, M. Olschewski, P. Rottoli y J. Muller-Quernheim, Serum CC-Chemokine Ligand 18 Concentration Predicts Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 179(8): p. 717-723.
- 25 8. Ziegenhagen MW, Zabel P, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Serum level of interleukin 8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:762-768.
9. Prasse A, Georges CG, Biller H, Hamm H, Matthys H, Luttmann W, Virchow JC Jr. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2000;122:241-8.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universitätsklinikum Freiburg
- 5 <120> Bloqueo de la señalización de la CCL18 a través del CCR6 como opción terapéutica en las enfermedades fibróticas y el cáncer
- <130> U7282/DB
- 10 <150> EP10167496.8
<151> 2010-06-28
- <150> EP11169326.3
<151> 2011-06-09
- 15 <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 48
<212> PRT
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> dominio N-terminal del receptor CCR6 humano
- <400> 1
Met Ser Gly Glu Ser Met Asn Phe Ser Asp Val Phe Asp Ser Ser Glu
1 5 10 15
Asp Tyr Phe Val Ser Val Asn Thr Ser Tyr Tyr Ser Val Asp Ser Glu
20 25 30
Met Leu Leu Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Gln Phe Ser Arg Leu Phe
35 40 45
- 30 <210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> primer bucle extracelular del receptor CCR6 humano
- <400> 2
Ser His Ala Thr Gly Ala Trp Val Phe Ser Asn Ala Thr Cys Lys Leu
1 5 10 15
- 40 Leu Lys Gly
- <210> 3
<211> 3216
<212> DNA
- 45 <213> Homo sapiens
- <400> 3

ES 2 604 108 T3

agtgtatggg tgaaggaggc agcagtgagg ccggagagga gagctgggct gggagcacag 60
 gaaggcccc aggactctgt ggtcatcagt aagagagggc ccacgtgtat atgctgggta 120
 acagaaatgt caaccttttc aaagtctgac atttaagaga aaaaactgtg gctgttggtt 180
 tgtggaacag acagctcctt ctttattgag tcacctctac tttcctgcta ccgctgcctg 240
 tgagctgaag gggctgaacc atacactcct ttttctacaa ccagcttgca ttttttctgc 300
 ccacaatgag cggggaatca atgaatttca gcgatgtttt cgactccagt gaagattatt 360
 ttgtgtcagt caaacttca tattactcag ttgattctga gatgttactg tgctccttgc 420
 aggaggtcag gcagttctcc aggctatttg taccgattgc ctactccttg atctgtgtct 480
 ttggcctcct ggggaatatt ctgggtggta tcacctttgc tttttataag aaggccagg 540
 ctatgacaga cgtctatctc ttgaacatgg ccattgcaga catcctcttt gttcttactc 600
 tcccattctg ggcagtgagt catgccaccg gtgctggggt tttcagcaat gccacgtgca 660
 agttgctaaa aggcattctat gccatcaact ttaactgagg gatgctgctc ctgacttgca 720
 ttagcatgga ccggtacatc gccattgtac aggcgactaa gtcattccgg ctccgatoca 780
 gaacactacc gcgcagcaaa atcatctgcc ttggtgtgtg ggggctgtca gtcattctct 840
 ccagctcaac ttttgtcttc aacaaaaaat acaacaccca aggcagcgat gtctgtgaac 900
 ccaagtacca gactgtctcg gagccatca ggtggaagct gctgatgttg gggcttgagc 960
 tactctttgg tttctttatc cctttgatgt tcatgatatt ttgttacacg ttcattgtca 1020
 aaaccttggg gcaagctcag aattctaaaa ggcacaaagc catccgtgta atcatagctg 1080
 tggtgcttgt gttctotggct tgcagattc ctcataacat ggtcctgctt gtgacggctg 1140
 caaatttggg taaaatgaac cgatcctgcc agagcgaaaa gctaattggc tatacgaaaa 1200
 ctgtcacaga agtctggct ttctctgact gctgcctgaa ccctgtgctc tacgctttta 1260
 ttgggcagaa gttcagaaac tactttctga agatcttgaa ggacctgtgg tgtgtgagaa 1320
 ggaagtacaa gtcctcaggc ttctcctgtg ccgggaggta ctcagaaaaac atttctcggc 1380
 agaccagtga gaccgcagat aacgacaatg cgtcgtcctt cactatgtga tagaaagctg 1440
 agtctcccta aggcattgtg gaaacatact catagatgtt atgcaaaaaa aagtctatgg 1500
 ccaggatgac atggaaaatg tgggaattaa gcaaaatcaa gcaagcctct ctctgcggg 1560
 acttaacgtg ctcatgggct gtgtgatctc ttcagggtgg ggtggtctct gataggtagc 1620
 atttccagc actttgcaag gaatgttttg tagctctagg gtatatatcc gcctggcatt 1680
 tcacaaaaa gcctttggga aatgctgaat taaagtgaat tgttgacaaa tgtaaacatt 1740
 ttcagaaata ttcattgaag ggtcacagat cacagtgctt tttggttaca gcacaaaatg 1800
 atggcagtgg tttgaaaaac taaaacagaa aaaaaaatgg aagccaacac atcactcatt 1860
 ttaggcaaat gtttaacat ttttatctat cagaatgtt attggtgctg gttataagca 1920
 gcaggattgg ccggctagtg tttcctctca tttcccttg atacagtcaa caagcctgac 1980

ES 2 604 108 T3

cctgtaaaat ggaggtggaa agacaagctc aagtgttcac aacctggaag tgcttcggga 2040
 agaaggggac aatggcagaa caggtgttgg tgacaattgt caccaattgg ataaagcagc 2100
 tcagttgta gtgggccatt aggaaactgt cggtttgctt tgatttcctt gggagctggt 2160
 ctctgtcgtg agtgtctctt gtctaaacgt ccattaagct gagagtgcta tgaagacagg 2220
 atctagaata atcttgctca cagctgtgct ctgagtgctt agcggagttc cagcaaacia 2280
 aatggactca agagagattt gattaatgaa tcgtaatgaa gttgggggtt attgtacagt 2340
 ttaaaatgtt agatgttttt aattttttaa ataaatggaa tacttttttt ttttttttaa 2400
 agaaaagcaac tttactgaga caatgtagaa agaagttttg ttccgtttct ttaatgtggt 2460
 tgaagagcaa tgtgtggctg aagacttttg ttatgaggag ctgcagatta gctaggggac 2520
 agctggaatt atgctggctt ctgataatta ttttaaaggg gtctgaaatt tgtgatggaa 2580
 tcagatttta acagctctct tcaatgacat agaaagttca tggaaactcat gtttttaag 2640
 ggctatgtaa atatatgaac attagaaaaa tagcaacttg tgttacaaaa atacaaacac 2700
 atgttaggaa ggtactgtca tgggctaggg atggtggctc acacctgtaa tcccagcatt 2760
 ttgggaagct aagatgggtg gatcacttga ggtcaggagt ttgagaccag cctggccaac 2820
 atggcgaaac ccctctctac taaaaataca aaaatttgcc aggcgtggtg gcgggtgcct 2880
 gtaatcccag ctacttggga ggctgaggca agagaatcgc ttgaaccag gaggcagagg 2940
 ttgcagtgag ccgagatcgt gccattgcac tccagcctgg gtgacaaagc gagactccat 3000
 ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaggaaag aactgtcatg taaacatacc aacatgttta 3060
 aacctgacaa tgggtgttatt tgaaacttta tattgttctt gtaagcttta actatatctc 3120
 tctttaaaat gcaaaataat gtcttaagat tcaaagtctg tatttttaaa gcatggcttt 3180
 ggctttgcaa aataaaaaat gtgttttgta catgaa 3216

<210> 4
 <211> 3479
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4
 aactcacacg gcctcttgca aacgttccca aatcttccca gtgggcttgc agagactcct 60
 tgctcccagg agataaccag gtaaaggagt atgaaagttt ggttacaac tcattgctgc 120
 aaattgaaaa ccatgcaaag gctgtcttcc tctggggagt tcaatgcctc tctttttctt 180
 atcactttac cattggttgg actttgatc cagggatcct acgattactc aataccctac 240
 aggatataca tggttaacca tttgcatttg ggcaaatagg cgttactttt caataggaag 300
 tggcaatoca gaacttgctt ttgggcaatt ctagtagctc accgcttttt tcttaatgac 360
 tgctagaagc tgcatcttat tgacagatgg tcatcacatt ggtgagctgg agtcatcaga 420
 ttgtggggcc cggagtgagg ctgaaggagg tggatcagag cactgcctga gagtcacctc 480

10

ES 2 604 108 T3

tactttcctg ctaccgctgc ctgtgagctg aaggggctga accatacaact cctttttcta 540
caaccagctt gcattttttc tgcccacaat gagcggggaa tcaatgaatt tcagcgatgt 600
tttcgactcc agtgaagatt attttgtgtc agtcaatact tcatattact cagttgatcc 660
tgagatgtta ctgtgctcct tgcaggaggt caggcagttc tccaggctat ttgtaccgat 720
tgctactcc ttgatctgtg tctttggcct cctggggaat attctggtgg tgatcacctt 780
tgctttttat aagaaggcca ggtctatgac agacgtctat ctcttgaaca tggccattgc 840
agacatcctc tttgttctta ctctcccatt ctgggcagtg agtcatgccca ccggtgctg 900
ggttttcagc aatgccacgt gcaagttgct aaaaggcacc tatgccatca actttaactg 960
cgggatgctg ctctgactt gcattagcat ggaccggtac atcgccattg tacaggcgac 1020
taagtcatc cggctccgat ccagaacact accgcgcagc aaaatcatct gccttgttgt 1080
gtgggggctg tcagtcacca tctccagctc aacttttgtc ttcaacccaa aatacaacac 1140
ccaaggcagc gatgtctgtg aacccaagta ccagactgtc tcggagccca tcaggtggaa 1200
gctgctgatg ttggggcttg agctactctt tggtttcttt atcccttga tgttcatgat 1260
attttgttac acgttcattg tcaaacctt ggtgcaagct cagaattcta aaaggcacia 1320
agccatccgt gtaatcatag ctgtggtgct tgtgtttctg gcttgtcaga ttctcataa 1380
catggtcctg cttgtgacgg ctgcaaat tggtaaaatg aaccgatcct gccagagcga 1440
aaagctaatt ggctatacga aaactgtcac agaagtctg gctttcctgc actgctgcct 1500
gaaccctgtg ctctacgctt ttattgggca gaagttcaga aactacttcc tgaagatctt 1560
gaaggacctg tgggtgtgtg gaaggaagta caagtcctca ggcttctcct gtgccgggag 1620
gtactcagaa aacatttctc ggccagaccag tgagaccgca gataacgaca atgcgtcgtc 1680
cttactatg tgatagaaag ctgagtctcc ctaaggcatg tgtgaaacat actcatagat 1740
gttatgcaaa aaaaagtcta tggccaggta tgcattgaaa atgtgggaat taagcaaaat 1800
caagcaagcc tctctcctgc gggacttaac gtgctcatgg gctgtgtgat ctcttcaggg 1860
tggggtggtc tctgataggt agcattttcc agcactttgc aaggaatgtt ttgtagctct 1920
agggtatata tccgcctggc atttcacaaa acagcctttg ggaaatgctg aattaaagtg 1980
aattgttgac aaatgtaaac attttcagaa atattcatga agcggtcaca gatcacagtg 2040
tcttttggtt acagcacaaa atgatggcag tggtttgaaa aactaaaaca gaaaaaaaaa 2100
tggaagccaa cacatcactc attttaggca aatgtttaaa catttttatc tatcagaatg 2160
tttattgttg ctggttataa gcagcaggat tggccggcta gtgtttcctc tcatttcctt 2220
ttgatacagt caacaagcct gaccctgtaa aatggaggty gaaagacaag ctcaagtgtt 2280
cacaacctgg aagtgtctcg ggaagaaggg gacaatggca gaacaggtgt tggtgacaat 2340
tgtcaccaat tggataaagc agctcagggt gtagtgggcc attaggaaac tgtcggtttg 2400

ES 2 604 108 T3

ctttgatttc cctgggagct gttctctgtc gtgagtgtct cttgtctaaa cgtccattaa 2460
gctgagagtg ctatgaagac aggatctaga ataatcttgc tcacagctgt gctctgagtg 2520
cctagcggag ttccagcaaa caaaatggac tcaagagaga tttgattaat gaatcgtaat 2580
gaagtggggg tttattgtac agtttaaaat gttagatggt ttttaattttt taaataaatg 2640
gaatactttt tttttttttt taaagaaagc aactttactg agacaatgta gaaagaagtt 2700
ttgttccggt tctttaatgt ggttgaagag caatgtgtgg ctgaagactt ttgttatgag 2760
gagctgcaga ttagctaggg gacagctgga attatgctgg cttctgataa ttatttttaa 2820
ggggtctgaa atttgtgatg gaatcagatt ttaacagctc tcttcaatga catagaaagt 2880
tcatggaact catgttttta aagggtatg taaatatatg aacattagaa aaatagcaac 2940
ttgtgttaca aaaatacaaa cacatgtag gaaggtactg tcatgggcta ggcatggagg 3000
ctcacacctg taatcccagc attttgggaa gctaagatgg gtggatcact tgaggtcagg 3060
agtttgagac cagcctggcc aacatggcga aacctctc tactaaaaat acaaaaattt 3120
gccagggctg gtggggggtg cctgtaatcc cagctacttg ggaggctgag gcaagagaat 3180
cgcttgaacc caggaggcag aggttgcaat gagccgagat cgtgccattg cactccagcc 3240
tgggtgacaa agcgagactc catctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagga aagaactgtc 3300
atgtaaacat accaacatgt ttaaacctga caatggtggt atttgaaact ttatattggt 3360
cttghtaagct ttaactatat ctctcttaa aatgcaaaat aatgtcttaa gattcaaagt 3420
ctgtattttt aaagcatggc tttggctttg caaaataaaa aatgtgtttt gtacatgaa 3479

<210> 5
<211> 793
5 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
aggagtgtgt agtttccaag ccccagctca ctctgaccac ttctctgcct gccagcatc 60
atgaagggcc ttgcagctgc cctccttgtc ctctgtctgca ccatggccct ctgctcctgt 120
gcacaagttg gtaccaacaa agagctctgc tgctctgtct atacctctg gcagattcca 180
caaaagttca tagttgacta ttctgaaacc agccccagc gccccaagcc aggtgtcatc 240
ctcctaacca agagagggcg gcagatctgt gctgaccca ataagaagtg ggtccagaaa 300
tacatcagcg acctgaagct gaatgcctga ggggcctgga agctgcgagg gccagtgaa 360
cttgggtggc ccaggaggga acaggagcct gagccagggc aatggccctg ccaccctgga 420
ggccacctct tctaagagtc ccatctgcta tgcccagcca cattaactaa ctttaactct 480
agtttatgca tcatatttca ttttgaaatt gatttctatt gttgagctgc attatgaaat 540
tagtattttc tctgacatct catgacattg tctttatcat cctttcccct tcccttcaa 600
ctcttcgtac attcaatgca tggatcaatc agtgtgatta gctttctcag cagacattgt 660
10 gccatagtga tcaaatgaca aatctttatt gaatggtttt gctcagcacc accttttaat 720
atattggcag tacttattat ataaaaggta aaccagcatt ctcactgtga aaaaaaaaaa 780
aaaaaaaaaa aaa 793

ES 2 604 108 T3

<210> 6
 <211> 851
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6
 agaataaac agcactccca aagaactggg tactcaacac tgagcagatc tgttctttga 60
 gctaaaaacc atgtgctgta ccaagagttt gtcctggct gctttgatgt cagtgctgct 120
 actccacctc tgcggcgaat cagaagcagc aagcaacttt gactgctgtc ttggatacac 180
 agaccgtatt cttcatceta aatttattgt gggcttcaca cggcagctgg ccaatgaagg 240
 ctgtgacatc aatgctatca tctttcacac aaagaaaaag ttgtctgtgt gcgcaaatcc 300
 aaaacagact tgggtgaaat atattgtgcg tctcctcagt aaaaagtca agaacatgta 360
 aaaactgtgg cttttctgga atggaattgg acatagccca agaacagaaa gaaccttgct 420
 ggggttgag gtttcacttg cacatcatgg agggtttagt gcttatctaa tttgtgcctc 480
 actggacttg tccaattaat gaagttgatt catattgcat catagtttgc tttgtttaag 540
 catcacatta aagttaaact gtattttatg ttatttatag ctgtaggttt tctgtgttta 600
 gctatttaat actaattttc cataagctat tttggtttag tgcaaagtat aaaattatat 660
 ttggggggga ataagattat atggactttc ttgcaagcaa caagctattt tttaaaaaaa 720
 actatttaac attcttttgt ttatattggt ttgtctccta aattgttgta attgcattat 780
 aaaataagaa aatatattaat aagacaaata ttgaaaataa agaacaacaaa agttcttctg 840
 ttaaaaaaaaa a 851

10

<210> 7
 <211> 848
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 agaataaac agcactccca aagaactggg tactcaacac tgagcagatc tgttctttga 60
 gctaaaaacc atgtgctgta ccaagagttt gtcctggct gctttgatgt cagtgctgct 120
 actccacctc tgcggcgaat cagaagcaag caactttgac tgctgtcttg gatacacaga 180
 ccgtattctt catcctaaat ttattgtggg cttcacacgg cagctggcca atgaaggctg 240
 tgacatcaat gctatcatct ttcacacaaa gaaaaagttg tctgtgtgcy caaatccaaa 300
 acagacttgg gtgaaatata ttgtgcgtct cctcagtaaa aaagtcaaga acatgtaaaa 360
 actgtggcct ttctggaatg gaattggaca tagcccaaga acagaaagaa ccttgcctggg 420
 gttggagggt tcacttgcac atcatggagg gtttagtgct tatctaattt gtgcctcact 480
 ggactgtcc aattaatgaa gttgatcat attgcatcat agtttgcttt gtttaagcat 540
 cacattaaag ttaaactgta ttttatgtta tttatagctg taggttttct gtgtttagct 600
 atttaatact aattttccat aagctatttt ggtttagtgc aaagtataaa attatatttg 660
 ggggggaata agattatatg gactttcttg caagcaacaa gctatttttt aaaaaaact 720
 atttaacatt cttttgttta tattgttttg tctcctaaat tgttgtaatt gcattataaa 780
 ataagaaaaa tattaataag acaaatattg aaaataaaga aacaaaaagt tcttctgtta 840
 aaaaaaaaa 848

15

ES 2 604 108 T3

<210> 8
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido según la SEQ ID NO.:1
 <400> 8
 atgagcgggg aatcaatgaa tttcagcgat gttttcgact ccagtgaaga ttattttgtg 60
 tcagtcaata cttcatatta ctcagttgat tctgagatgt tactgtgctc cttgcaggag 120
 10 gtcaggcagt tctccaggct attt 144
 <210> 9
 <211> 29
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido inhibidor de CCR6
 20 <400> 9
 Glu Asp Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp Gln Ile His Pro Lys Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro Gln Cys Pro Lys
 20 25
 <210> 10
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo GAPDH
 30 <400> 10
 caccagggt gctttaact 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador inverso GAPDH
 <400> 11
 gatctcgctc ctggaagatg 20
 45 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador directo CCR6
 <400> 12
 gcacaaaatg atggcagtgg 20
 55 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso CCR6
 5 <400> 13
 ccgaagcact tccaggttgt 20
 <210> 14
 10 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador directo colágeno tipo I
 <400> 14
 ccctgtctgc ttctgtaaa ct 22
 <210> 15
 20 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> cebador inverso colágeno tipo I
 <400> 15
 30 catgttcggt tggtaaaga ta 22
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador directo alphaSMA
 <400> 16
 40 catcatgcgt ctggatctgg 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso alphaSMA
 <400> 17
 50 ggacaatctc acgctcagca 20
 <210> 18
 <211> 69
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

ES 2 604 108 T3

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

Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro
20 25 30

Gln Cys Pro Lys Pro Gly Val Ile Leu Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln
35 40 45

Ile Cys Ala Asp Pro Asn Lys Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Asp
50 55 60

Leu Lys Leu Asn Ala
65

<210> 19

<211> 70

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His
1 5 10 15

Pro Lys Phe Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys
20 25 30

Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys
35 40 45

Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
50 55 60

10

Lys Lys Val Lys Asn Met
65 70

<210> 20

<211> 68

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Arg Thr Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Thr Leu Cys Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Glu Met Ala Ser Gly Gly Asn Phe Leu Thr Gly Leu Gly His Arg Ser
20 25 30

Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
35 40 45

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
50 55 60

Lys Cys Cys Lys
65

20

ES 2 604 108 T3

<210> 21
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 21
 Met Arg Val Leu Tyr Leu Leu Phe Ser Phe Leu Phe Ile Phe Leu Met
 1 5 10 15

 Pro Leu Pro Gly Val Phe Gly Gly Ile Gly Asp Pro Val Thr Cys Leu
 20 25 30

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

 Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro
 50 55 60
 10
 <210> 22
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> péptido inhibidor de CCR6

 <400> 22
 Glu Leu Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe
 1 5 10 15

 Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro Gln Cys Pro Lys
 20 25
 20
 <210> 23
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25
 <220>
 <223> péptido inhibidor de CCR6

 <400> 23
 Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His Pro Lys Phe
 1 5 10 15

 Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys Asp Ile
 20 25 30
 30
 <210> 24
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido según la SEQ ID NO.: 9

 <400> 24
 gaggactgct gcctcgtcta tacctcctgg cagattcacc caaagttcat agttgactat 60
 40 tctgaaacca gccccagtg cccaag 87

ES 2 604 108 T3

<210> 25
<211> 87
<212> DNA
5 <213> Artificial

<220>
<223> secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido según la SEQ ID NO.:22

10 <400> 25
gagctctgct gcctcgtcta tacctcctgg cagattccac aaaagttcat agttgactat 60
tctgaaacca gccccagtg cccaag 87

<210> 26
<211> 93
15 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido según la SEQ ID NO.:23

20 <400> 26
tttgactgct gtcttgata cacagaccgt attcttcac ctaaatttat tgtgggcttc 60
acacggcagc tggccaatga aggctgtgac atc 93

25 <210> 27
<211> 374
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 604 108 T3

Met Ser Gly Glu Ser Met Asn Phe Ser Asp Val Phe Asp Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Asp Tyr Phe Val Ser Val Asn Thr Ser Tyr Tyr Ser Val Asp Ser Glu
 20 25 30

Met Leu Leu Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Gln Phe Ser Arg Leu Phe
 35 40 45

Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn
 50 55 60

Ile Leu Val Val Ile Thr Phe Ala Phe Tyr Lys Lys Ala Arg Ser Met
 65 70 75 80

Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met Ala Ile Ala Asp Ile Leu Phe Val
 85 90 95

Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Ser His Ala Thr Gly Ala Trp Val
 100 105 110

Phe Ser Asn Ala Thr Cys Lys Leu Leu Lys Gly Ile Tyr Ala Ile Asn
 115 120 125

Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu Thr Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr
 130 135 140

Ile Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys Ser Phe Arg Leu Arg Ser Arg Thr
 145 150 155 160

Leu Pro Arg Ser Lys Ile Ile Cys Leu Val Val Trp Gly Leu Ser Val
 165 170 175

Ile Ile Ser Ser Ser Thr Phe Val Phe Asn Gln Lys Tyr Asn Thr Gln
 180 185 190

Gly Ser Asp Val Cys Glu Pro Lys Tyr Gln Thr Val Ser Glu Pro Ile
 195 200 205

ES 2 604 108 T3

Arg Trp Lys Leu Leu Met Leu Gly Leu Glu Leu Leu Phe Gly Phe Phe
 210 215 220

Ile Pro Leu Met Phe Met Ile Phe Cys Tyr Thr Phe Ile Val Lys Thr
 225 230 235 240

Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg His Lys Ala Ile Arg Val Ile
 245 250 255

Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala Cys Gln Ile Pro His Asn Met
 260 265 270

Val Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Leu Gly Lys Met Asn Arg Ser Cys
 275 280 285

Gln Ser Glu Lys Leu Ile Gly Tyr Thr Lys Thr Val Thr Glu Val Leu
 290 295 300

Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly
 305 310 315 320

Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Leu Lys Ile Leu Lys Asp Leu Trp Cys
 325 330 335

Val Arg Arg Lys Tyr Lys Ser Ser Gly Phe Ser Cys Ala Gly Arg Tyr
 340 345 350

Ser Glu Asn Ile Ser Arg Gln Thr Ser Glu Thr Ala Asp Asn Asp Asn
 355 360 365

Ala Ser Ser Phe Thr Met
 370

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20 para uso en tratamiento, en la que el compuesto capaz de inhibir la actividad y/o la expresión de la CCL18 o la CCL20 se selecciona del grupo que consiste en
- (1) un polipéptido receptor CCR6 soluble aislado que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80 % con la secuencia según la SEQ ID NO.: 1; y
- 10 (b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos según (a);
- en el que dicho polipéptido receptor CCR6 soluble aislado es capaz de unirse a la CCL18 y/o la CCL20 y en el que dicho polipéptido receptor CCR6 soluble aislado no comprende un dominio transmembrana;
- (2) el polipéptido receptor CCR6 soluble aislado según (1), en el que la secuencia de aminoácidos según (a) comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia según la SEQ ID NO.: 1.
- 15 2. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en la que la composición comprende otro compuesto activo adecuado para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer, en la que dicho compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en un fármaco antiinflamatorio, un antioxidante, un agente antifibrótico, minociclina, sildenafil, talidomida, un anticuerpo anti-TNF, etanercept, interferón gamma, un anticuerpo anti-IL-13,
- 20 un inhibidor de la endotelina, Zileuton, un anticoagulante, un macrólido, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4, Aviptadil, una hormona estimulante de melanocitos alfa y un inhibidor de la tirosina cinasa asociada a hormonas y en la que dicho compuesto activo adicional adecuado para el tratamiento de cáncer es un agente quimioterapéutico.
3. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha composición es para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad pulmonar intersticial y/o un cáncer.
- 25 4. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 3, en la que la enfermedad pulmonar intersticial se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, neumonía organizada criptogénica, bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda y neumonía intersticial linfocítica.
- 30 5. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 3, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, preferiblemente adenocarcinoma de pulmón, mesotelioma pleural, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

Figura 1

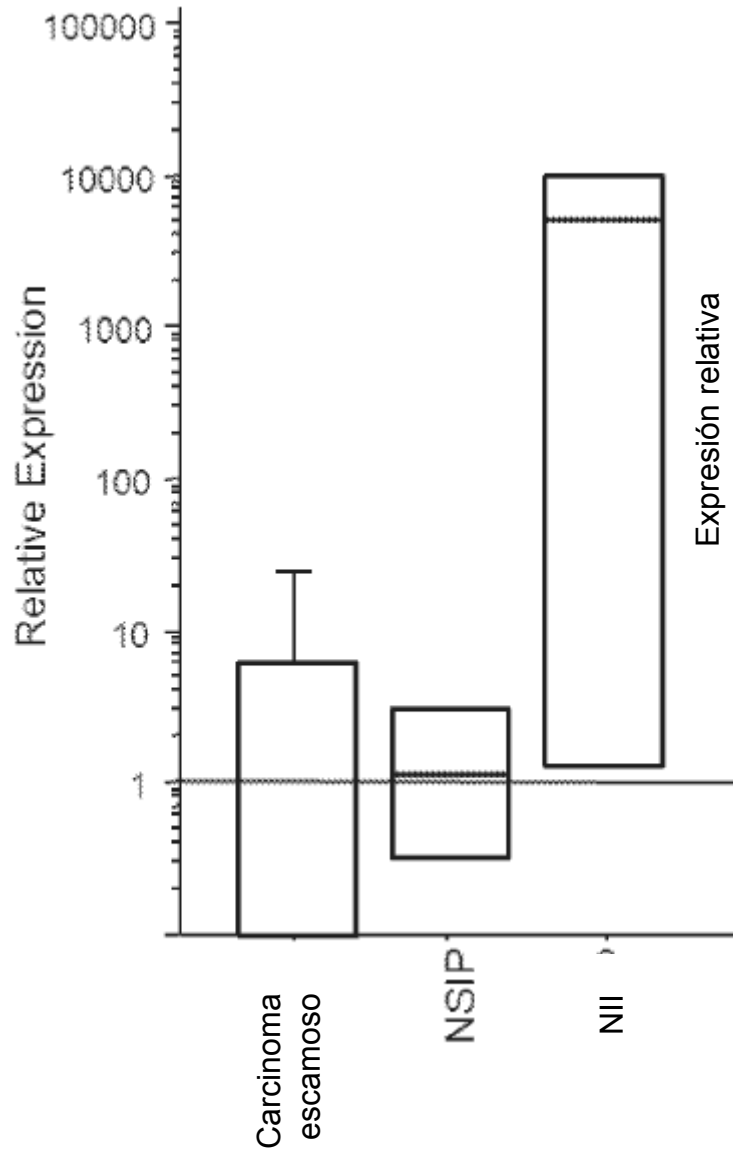


Figura 2

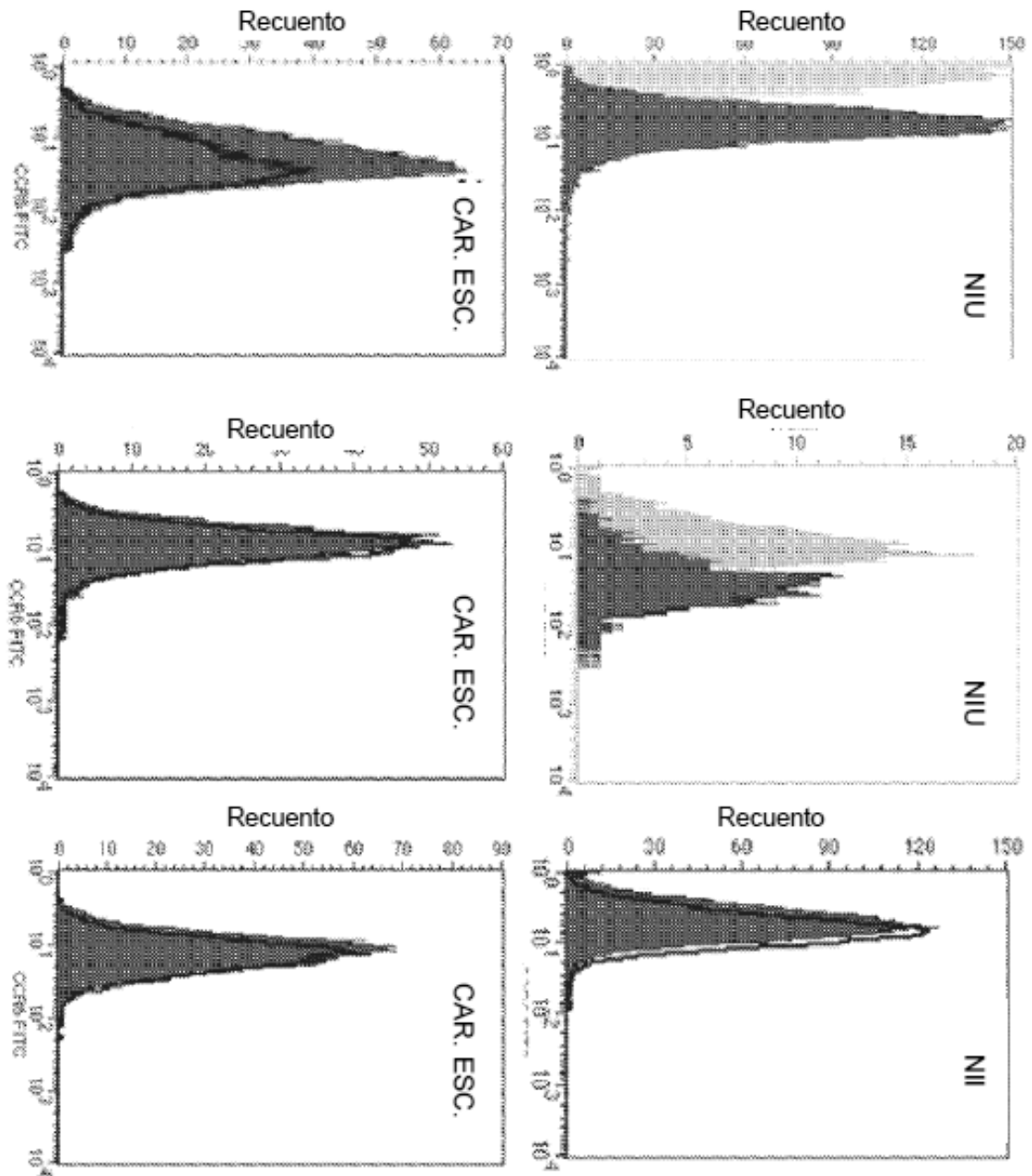


Figura 3

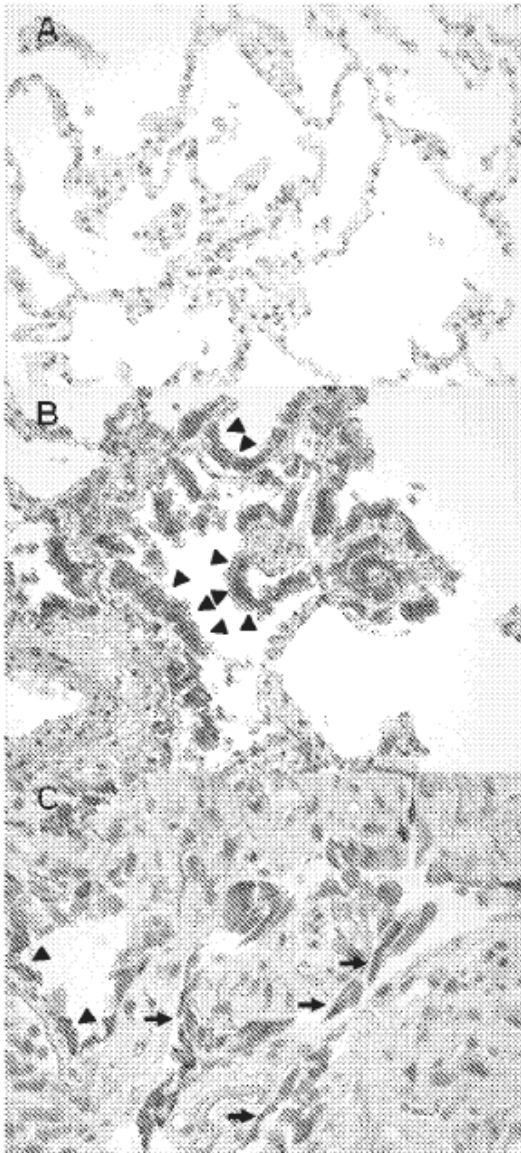


Figura 4

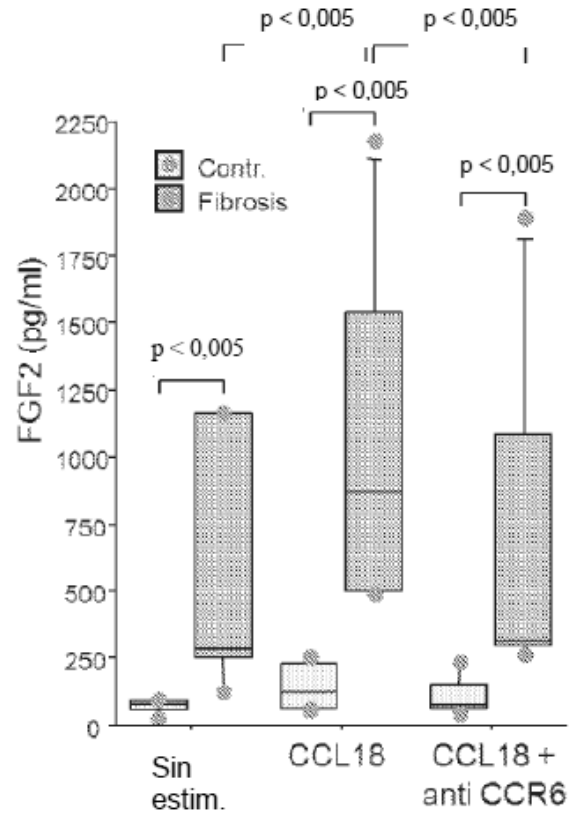


Figura 5

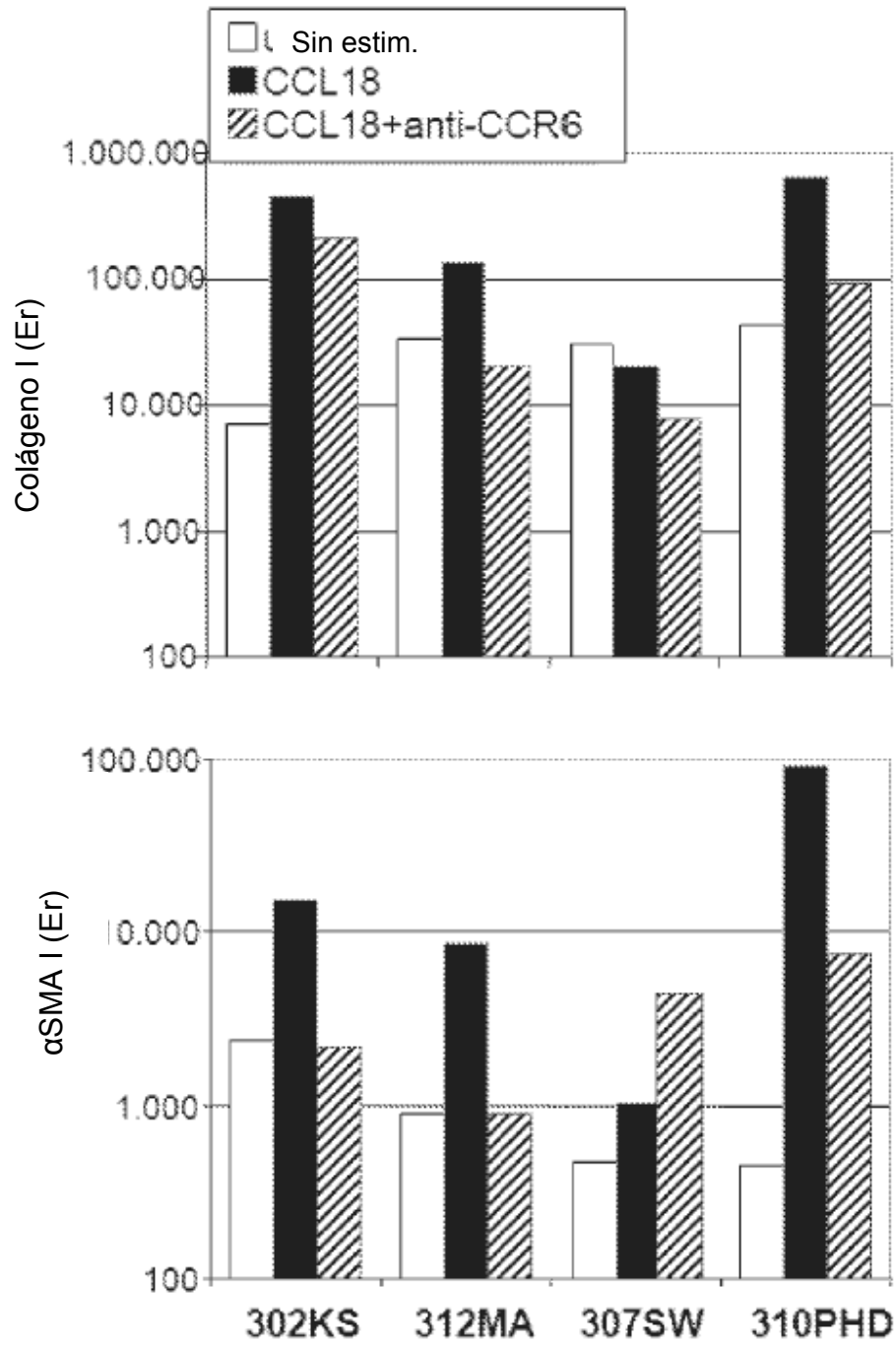


Figura 6

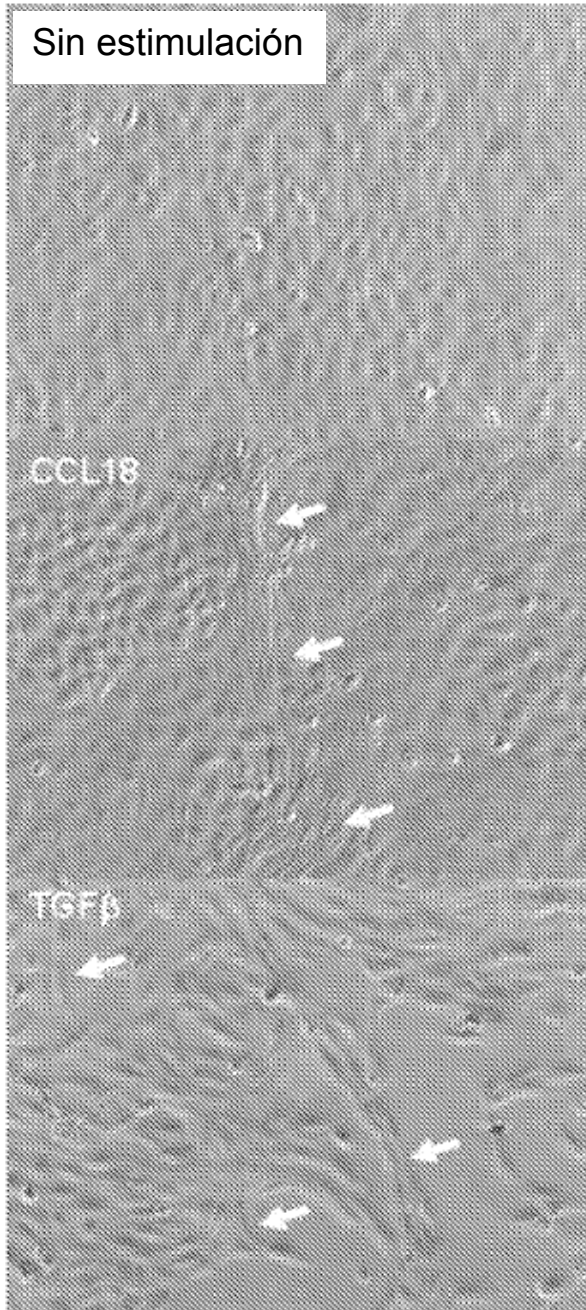


Figura 7

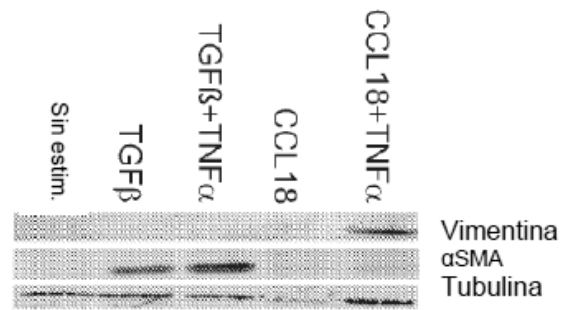


Figura 8

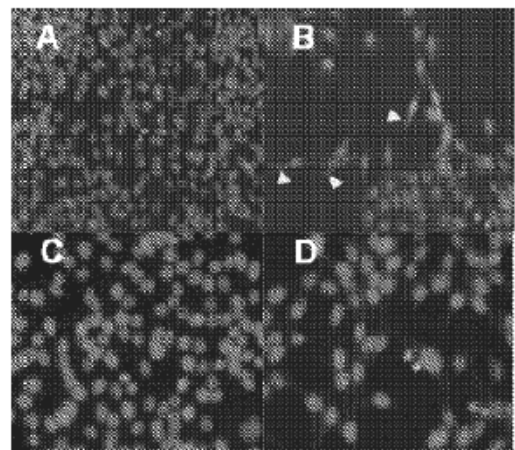


Figura 9

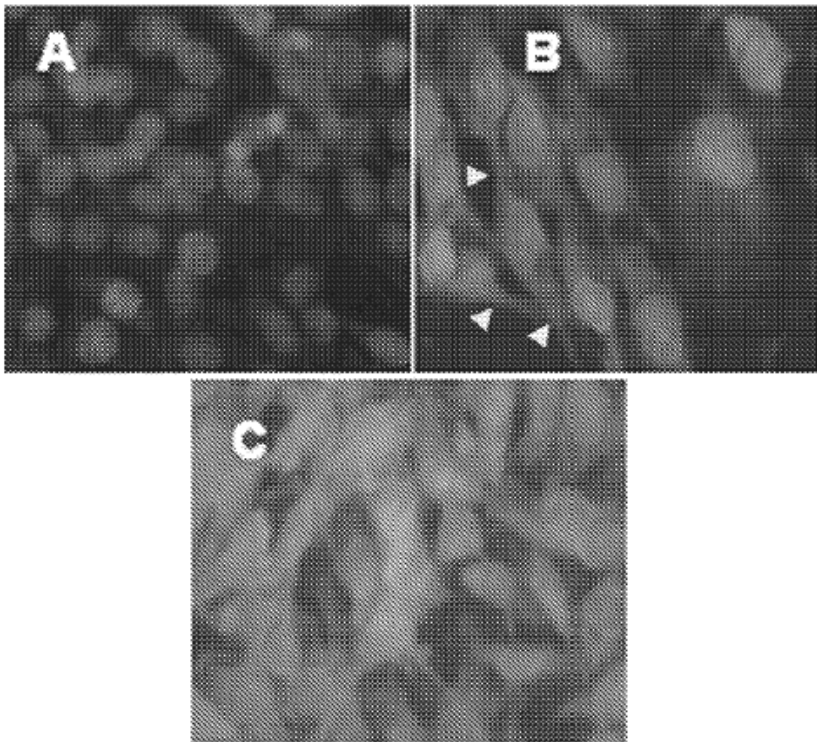


Figura 10

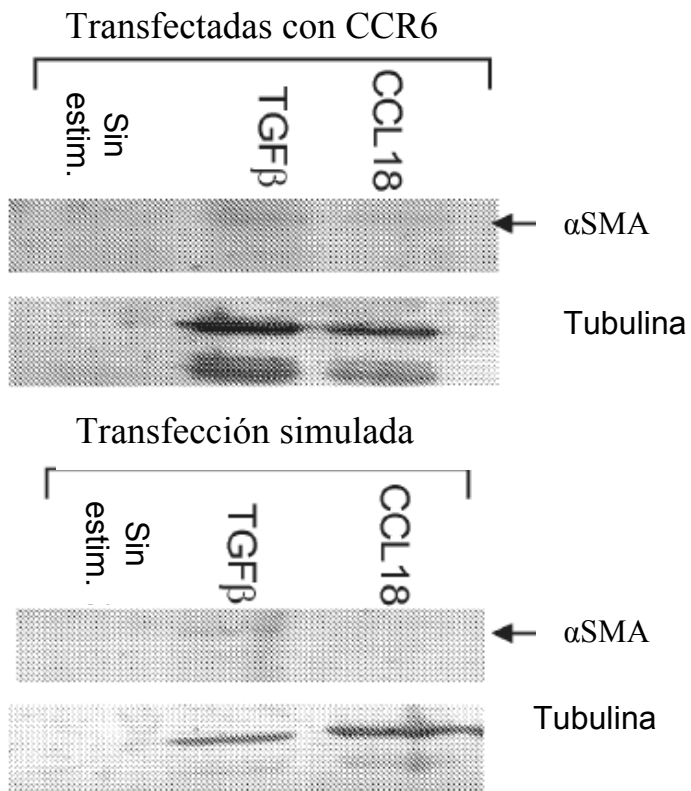


Figura 11

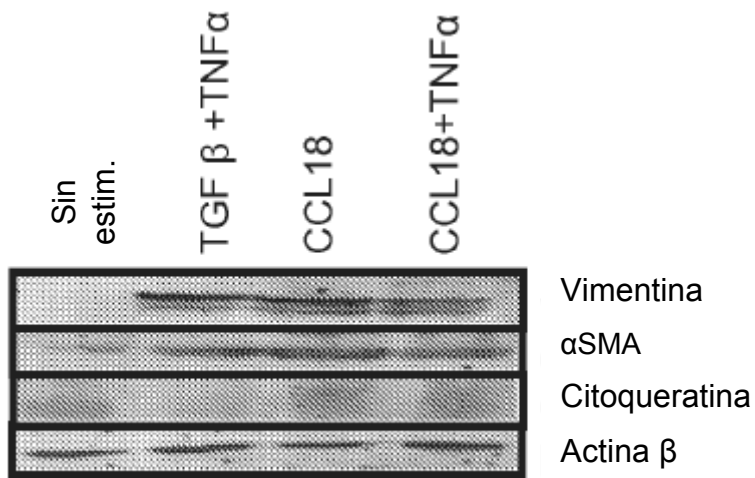


Figura 12

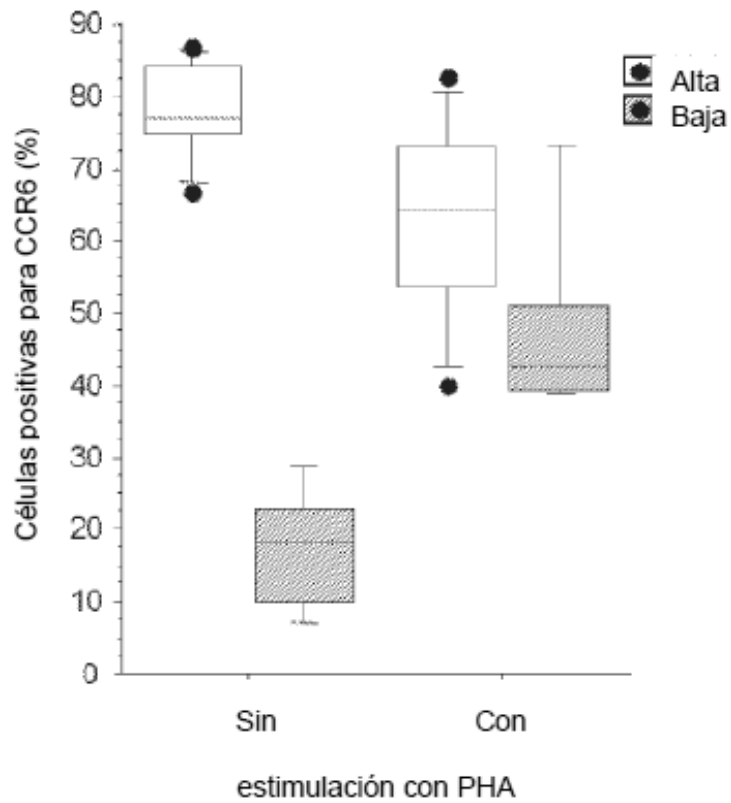


Figura 13

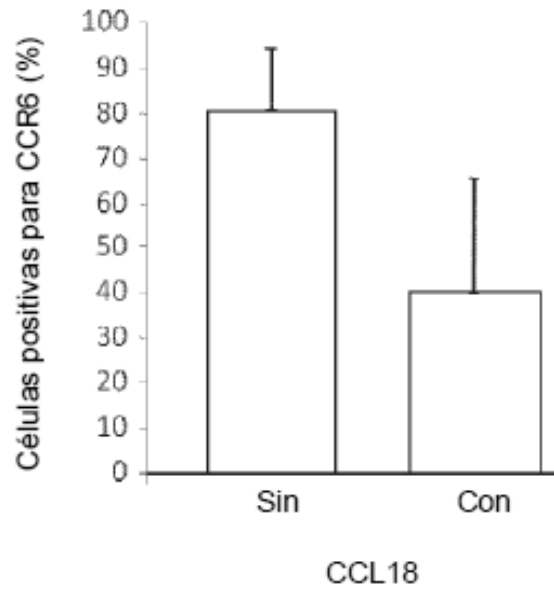


Figura 14

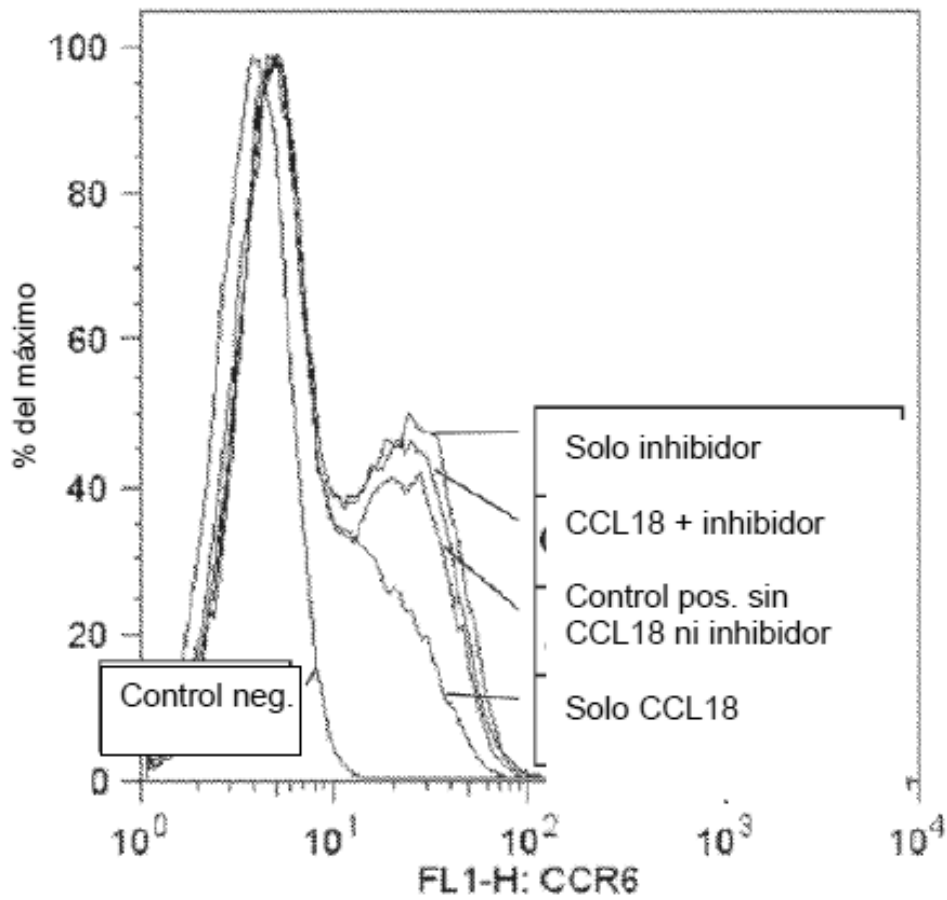


Figura 15

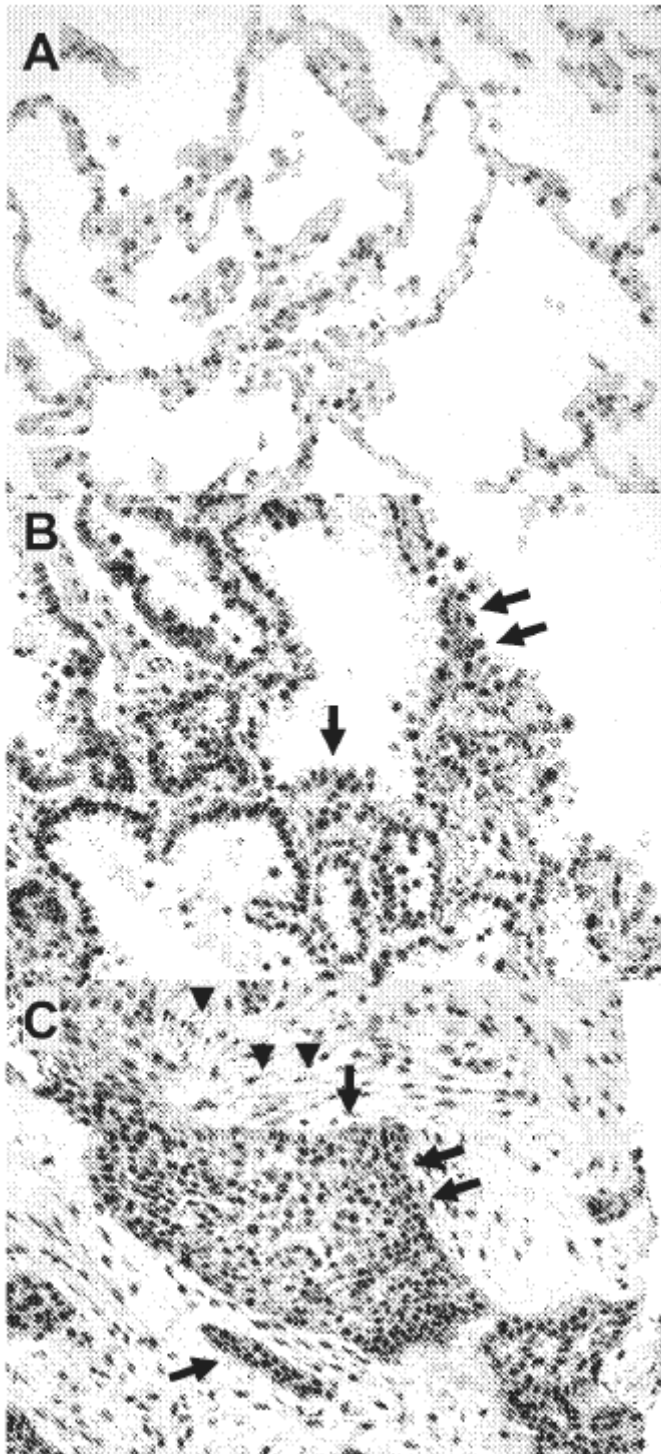


Figura 16

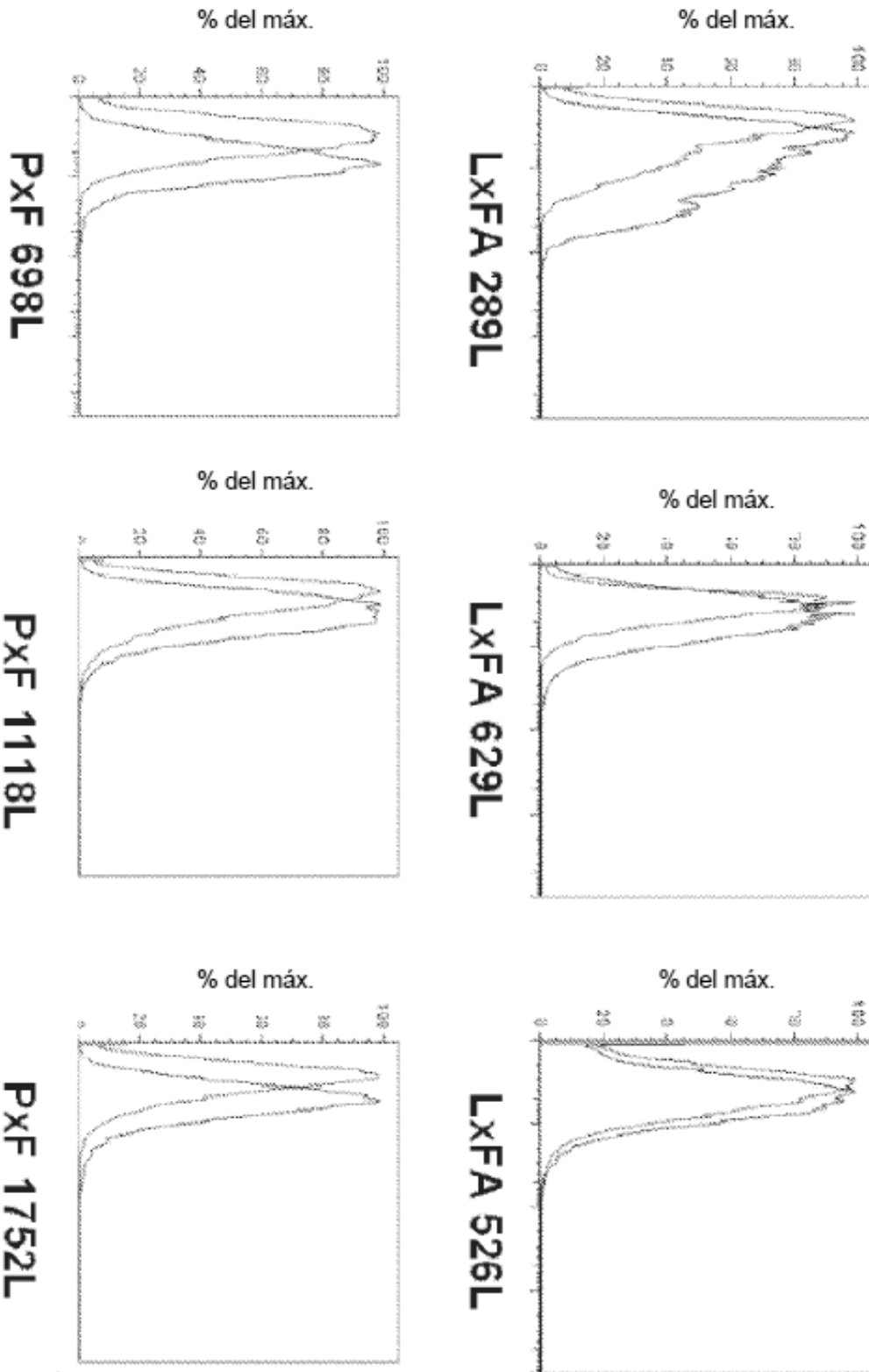


Figura 17

Gen	N.º de acceso	Cebador directo	Cebador inverso
GAPDH	NM_002046.3	CACCAGGGCTGCTTTTAA CT (SEQ ID NO.: 10)	GATCTCGCTCCTGGAA GATG (SEQ ID NO.: 11)
CCR6	NM_004367.5 NM_031409.3	GCACAAAATGATGGCAG TGG (SEQ ID NO.: 12)	CCGAAGCACTTCCAGG TTGT (SEQ ID NO.: 13)
colágeno tipo I	NM_000088.3	CCCTGTCTGCTTCCTGTA AACT (SEQ ID NO.: 14)	CATGTTCCGGTTGGTCA AAGATA (SEQ ID NO.: 15)
α SMA	NM_00114194 5.1	CATCATGCGTCTGGATCT GG (SEQ ID NO.: 16)	GGACAATCTCACGCTC AGCA (SEQ ID NO.: 17)

Figura 18

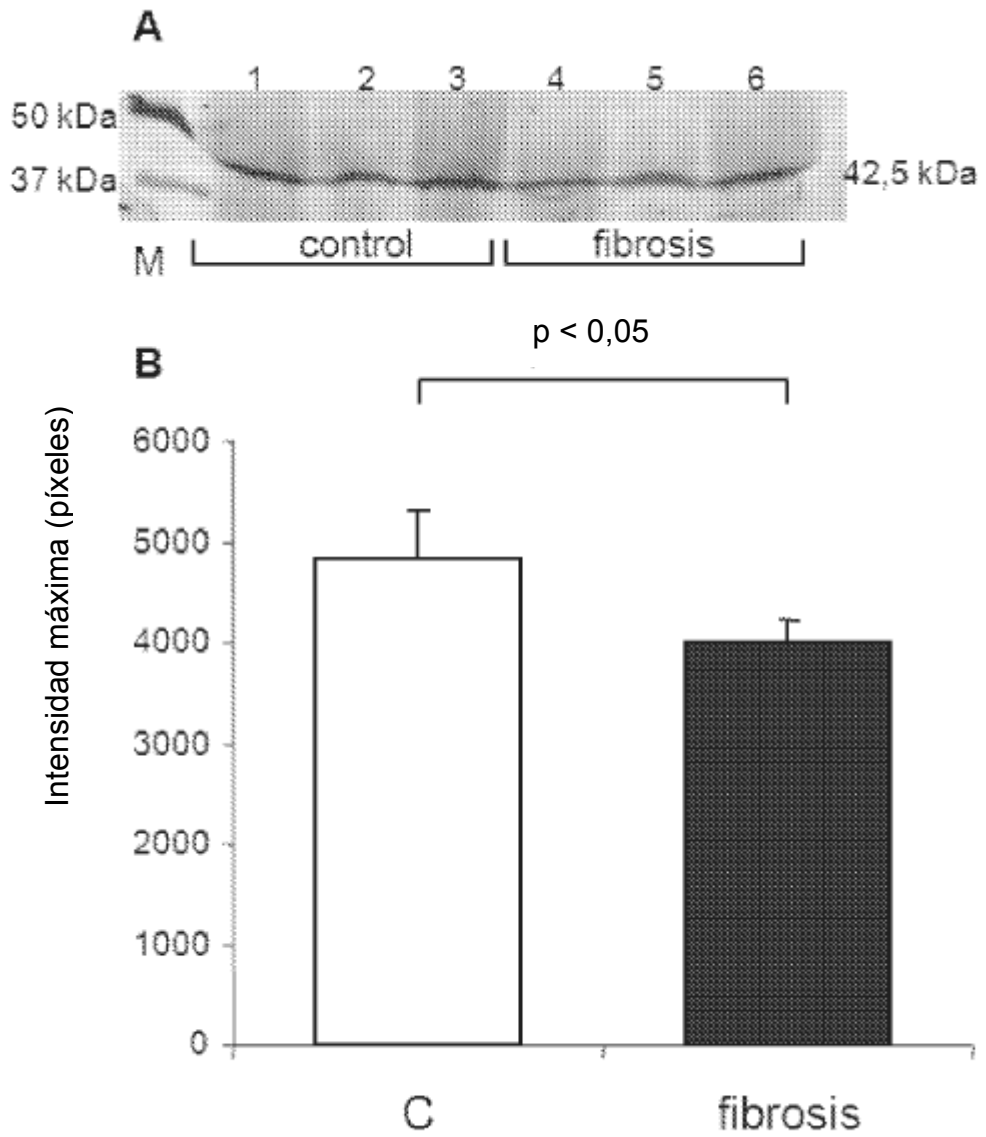


Figura 19

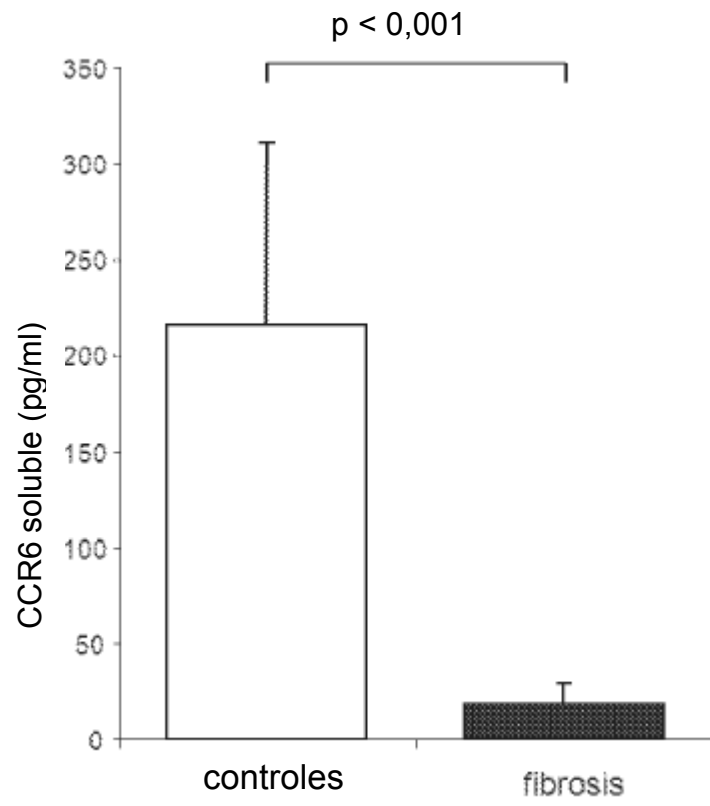


Figura 20

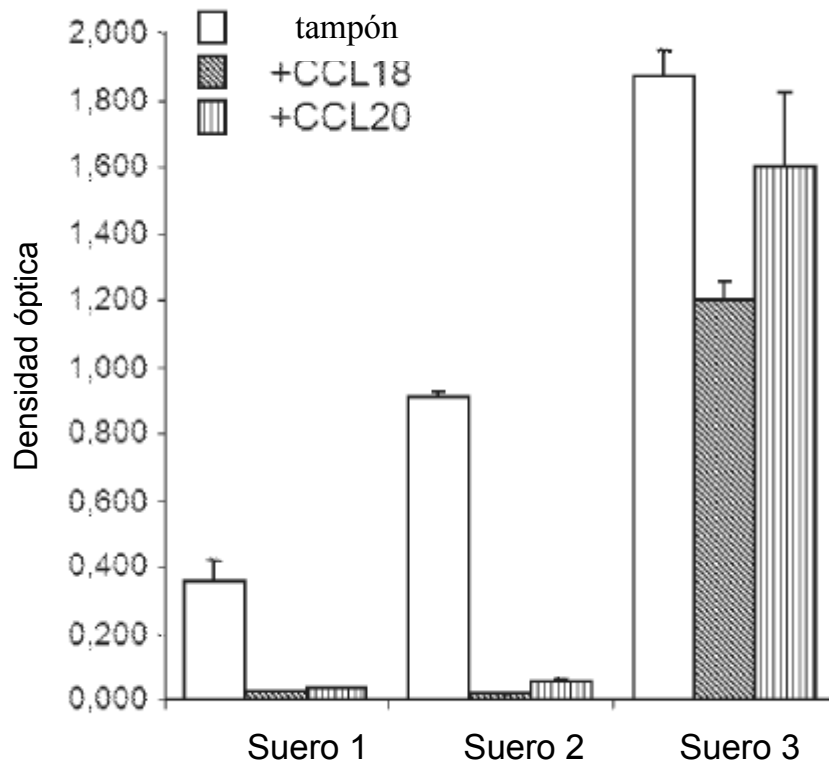


Figura 21

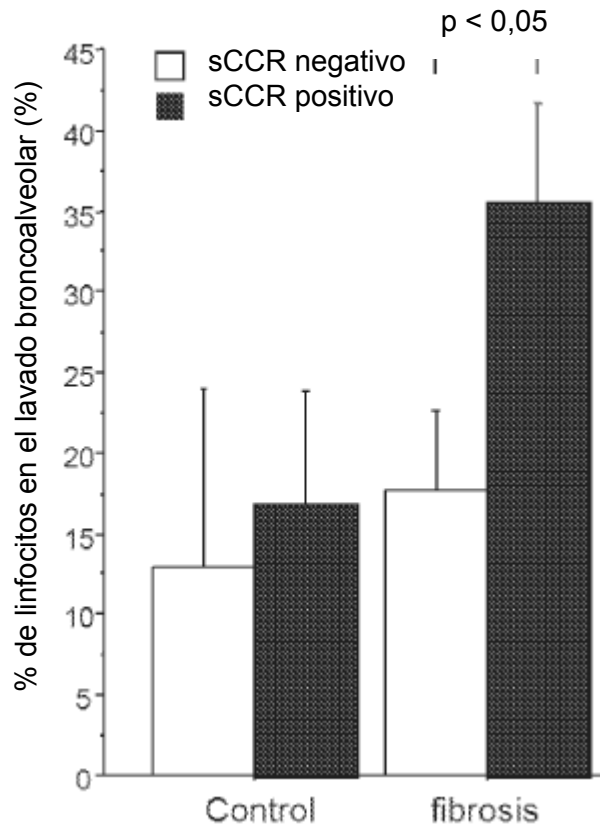


Figura 22

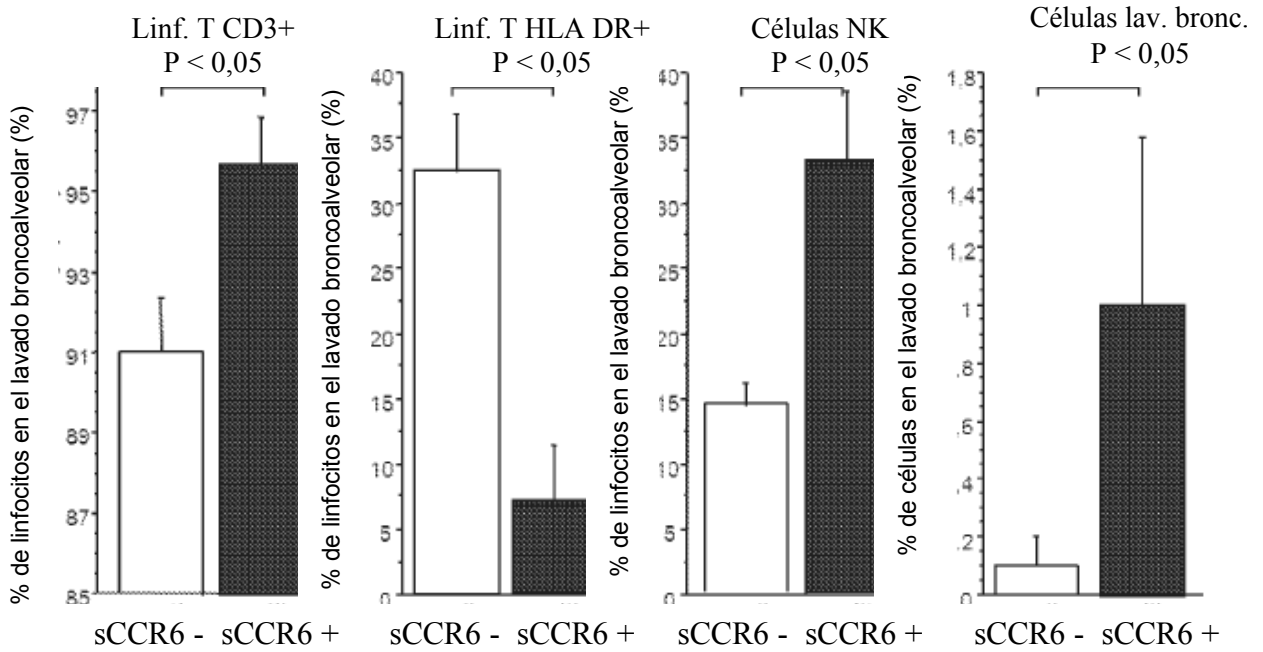


Figura 23

Liberación de CCL18 en distintas células

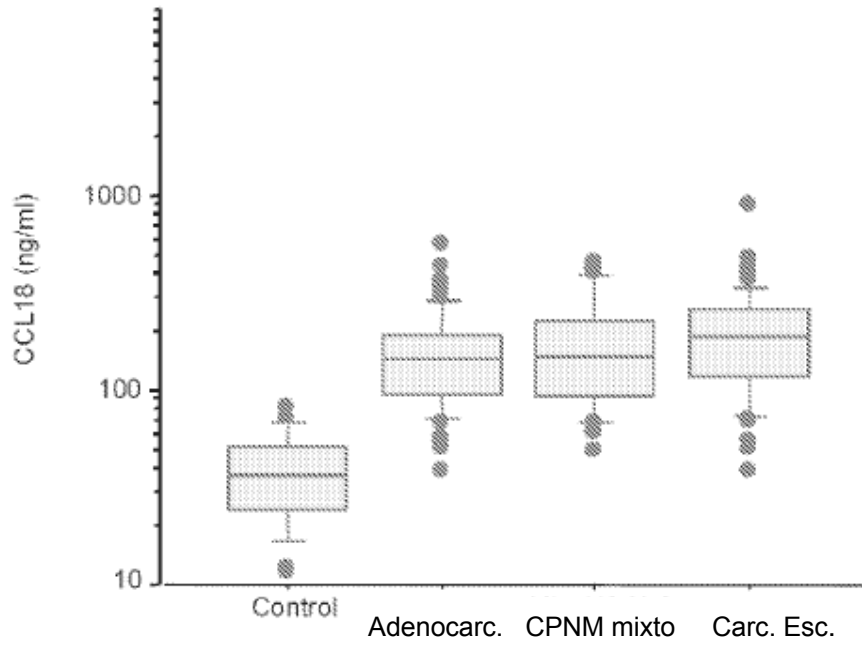


Figura 24

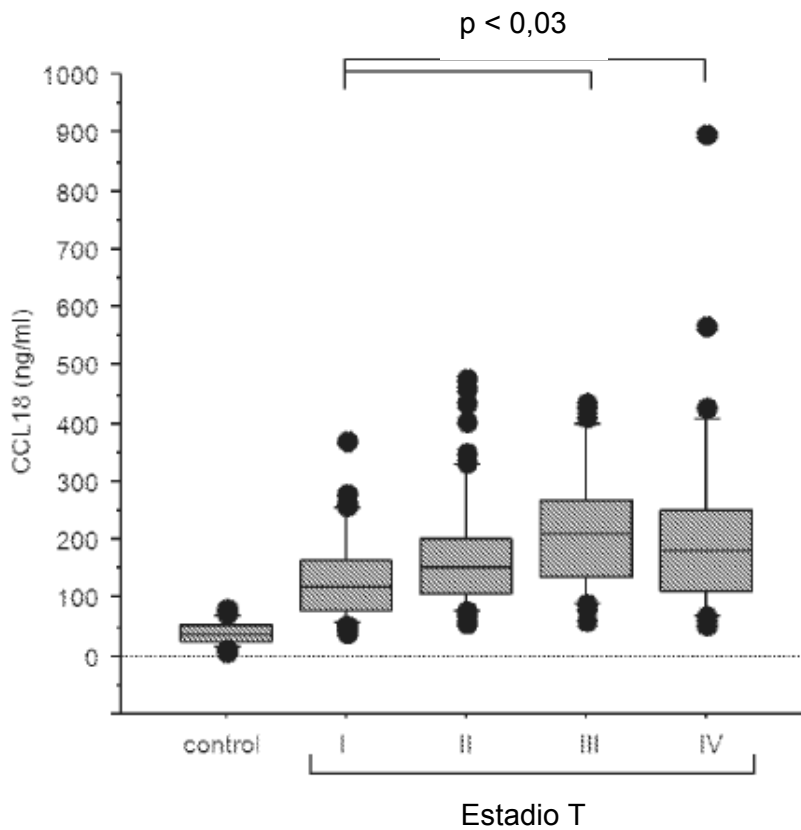


Figura 25

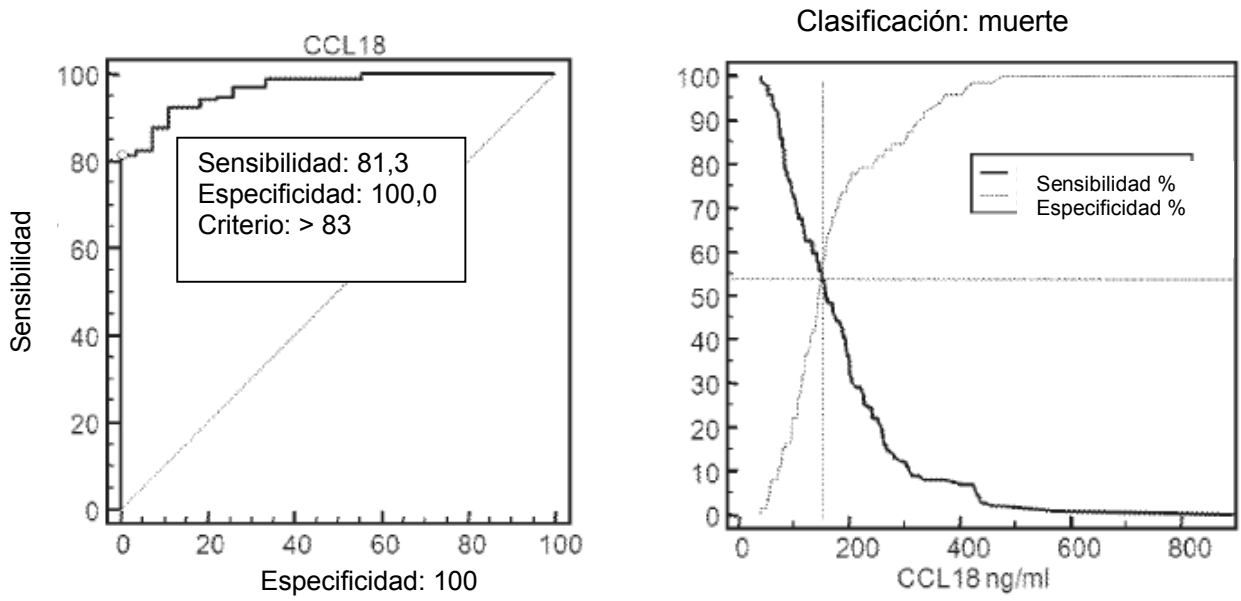


Figura 26

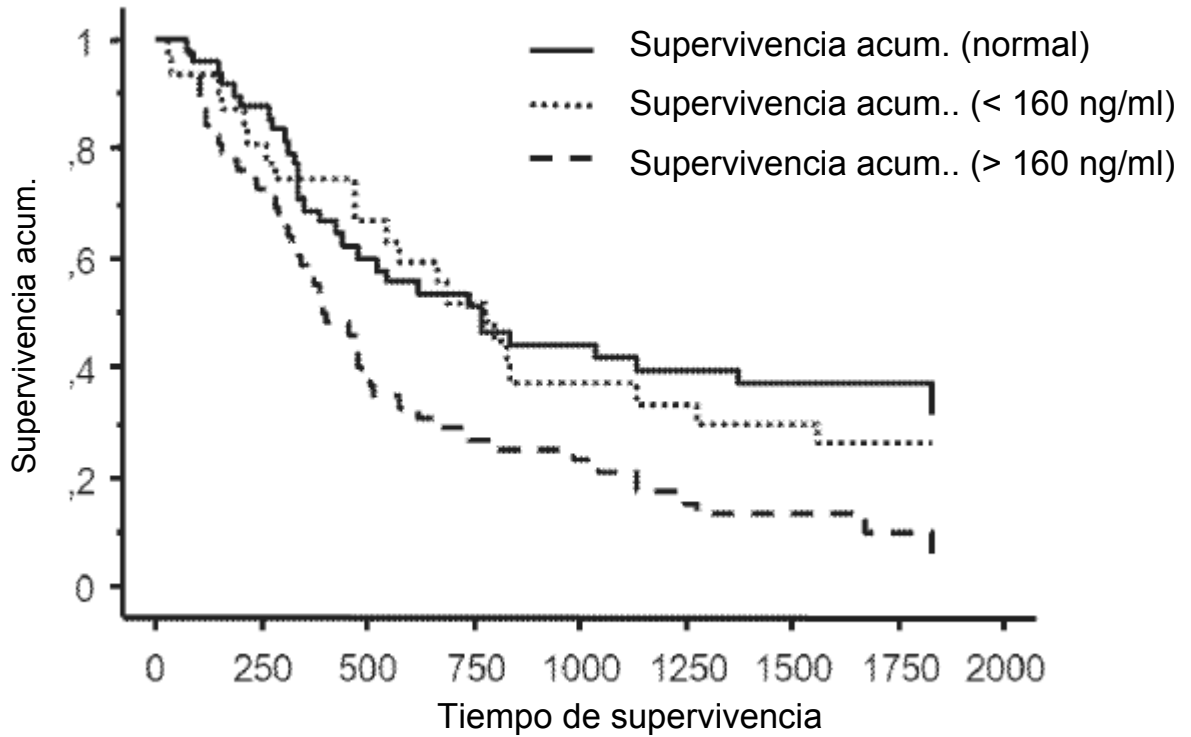


Figura 27

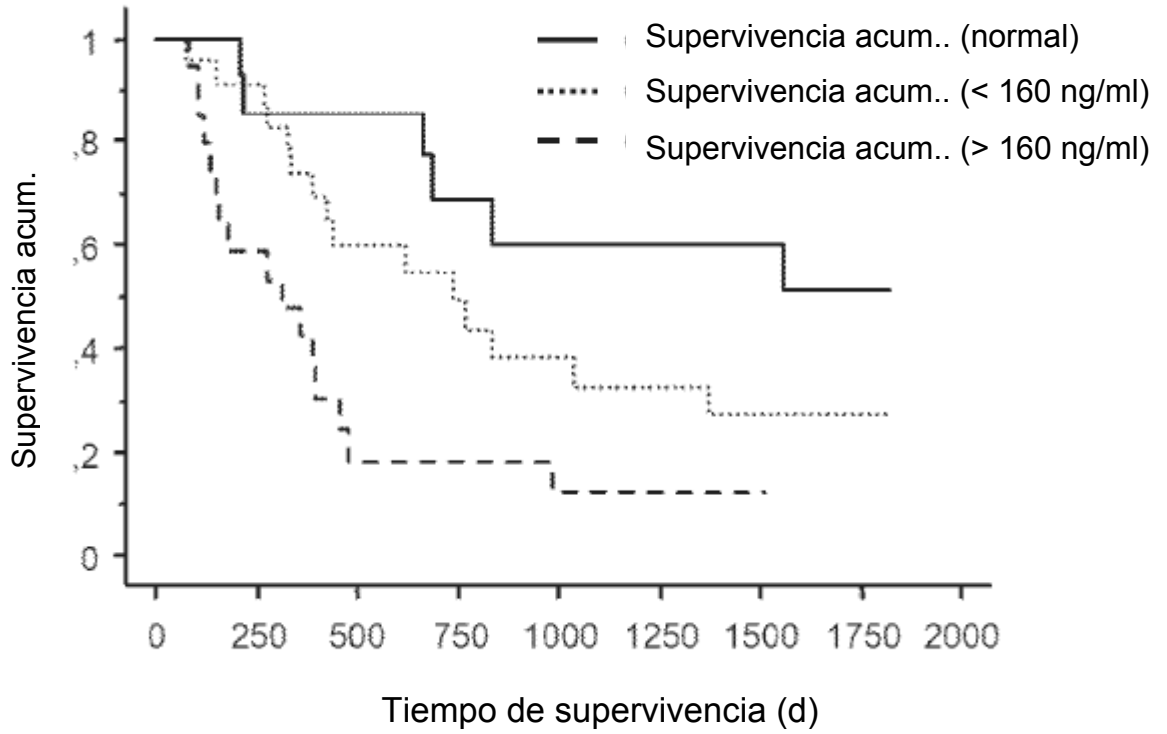


Figura 28

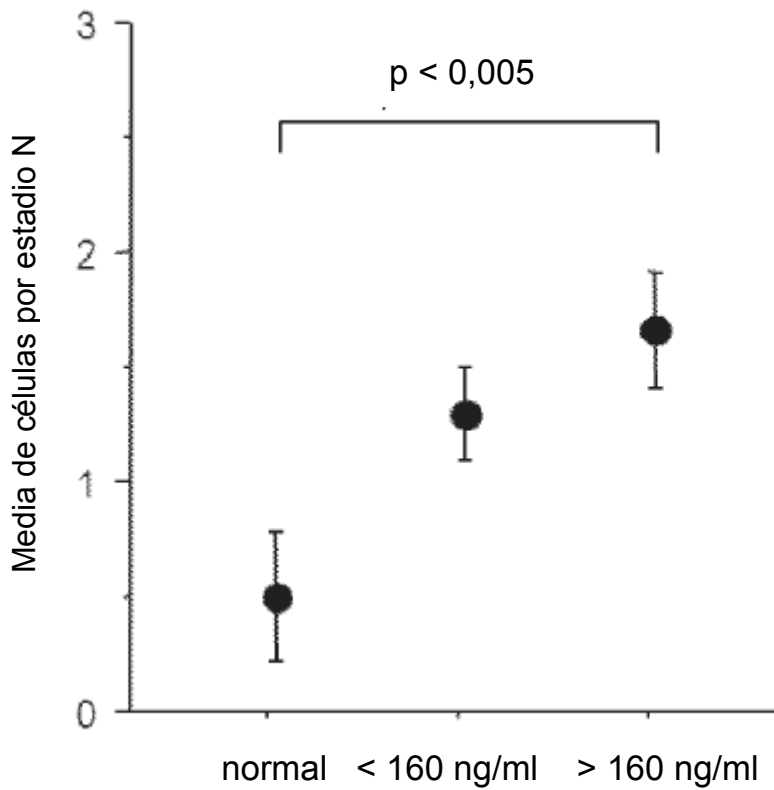


Figura 29

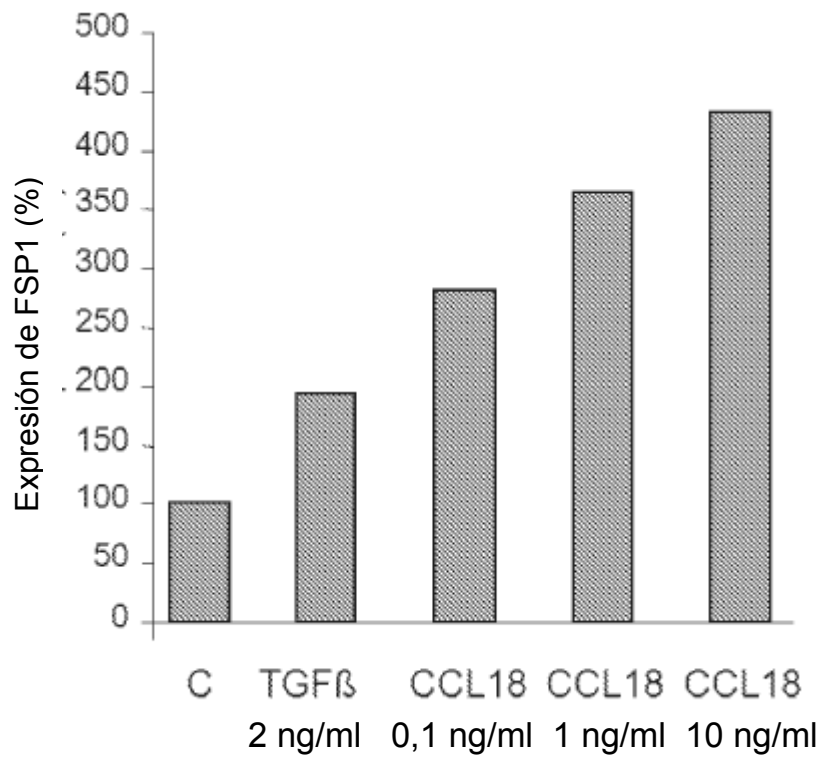


Figura 30

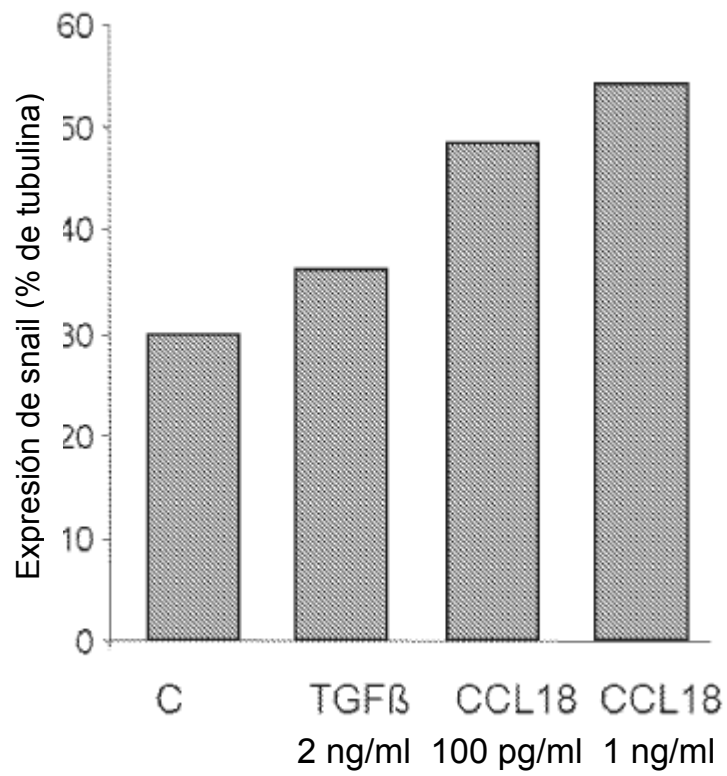


Figura 31

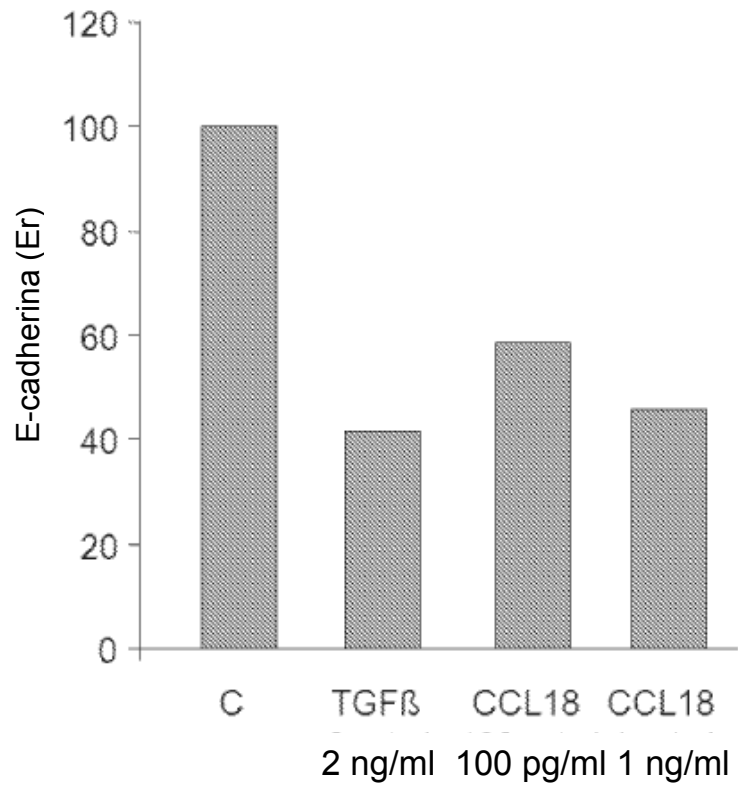


Figura 32

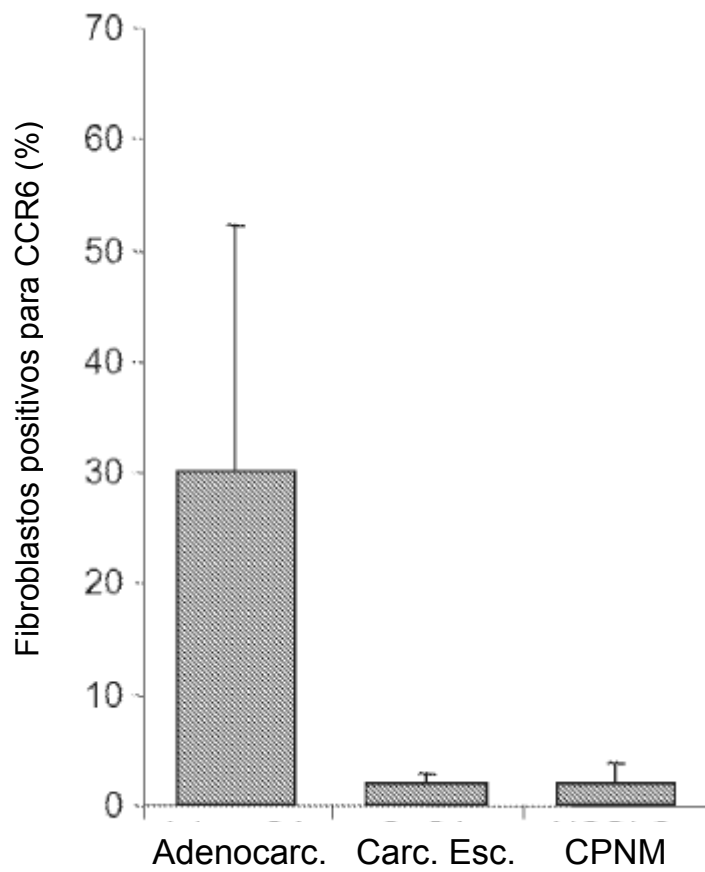


Figura 33

SEQ ID NO.: 1	MSGESMNFSDVFDSSSEDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEVQRQFSRLF
SEQ ID NO.: 2	SHATGAWVFSNATCKLLKG
SEQ ID NO.: 3	{ Secuencia de CCR6 según el n.º de acceso del NCBI NM_004367.5 }
SEQ ID NO.: 4	{ Secuencia de CCR6 según el n.º de acceso del NCBI NM_031409.3 }
SEQ ID NO.: 5	{ Secuencia de CCL18 según el n.º de acceso del NCBI NM_002988.2 }
SEQ ID NO.: 6	{ Secuencia de CCL20 según el n.º de acceso del NCBI NM_004591.2 }
SEQ ID NO.: 7	{ Secuencia de CCL20 según el n.º de acceso del NCBI NM_001130046.1 }
SEQ ID NO.: 8	ATGAGCGGGGAATCAATGAATTCAGCGATGTTTTCGACTCCAGTGA AGATTATTTTGTGTCAGTCAATACTTCATATTACTCAGTTGATTCTGA GATGTTACTGTGCTCCTTGCAGGAGGTCAGGCAGTTCTCCAGGCTATT T
SEQ ID NO.: 9	EDCCLVYTSWQIHPKFIVDYSETSPQCPK (PS-AU-1015)
SEQ ID NO.: 18	AQVGTNKECCLVYTSWQIPQKFIVDYSETSPQCPKPGVILLTKRGRQIC ADPNKKWVQKYISDLKLNA
SEQ ID NO.: 19	ASNFDCCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCANP KQTWVKYIVRLLSKKVKNM
SEQ ID NO.: 20	MRTSYLLLFTLCLLSEMASGGNFLTGLGHRSDHYNCVSSGGQCLYSAC PIFTKIQGTCYRGKAKCCK
SEQ ID NO.: 21	MRVLYLLFSFLFIFLMPLPGVFGGIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIG TCGLPGTKCCKP
SEQ ID NO.:22	ELCCLVYTSWQIPQKFIVDYSETSPQCPK
SEQ ID NO.:23	FDCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDI
SEQ ID NO.:24	GAGGACTGCTGCCTCGTCTATACCTCCTGGCAGATTCACCCAAAGTTC ATAGTTGACTATTCTGAAACCAGCCCCAGTGCCCCAAG

SEQ ID NO.:25	GAGCTCTGCTGCCTCGTCTATACCTCCTGGCAGATTCCACA AAAGTTCATAGTTGACTATTCTGAAACCAGCCCCCAGTGCCCCAAG
SEQ ID NO.:26	TTTGACTGCTGTCTTGGATACACAGACCGTATTCTTCATCCTAAATT ATTGTGGGCTTCACACGGCAGCTGGCCAATGAAGGCTGTGACATC
SEQ ID NO.:27	MSGESMNFSDVFDSSDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEVQRQFSRLFV PIAYSLICVFGLLGNILVVITFAFYKKARSMTDVYLLNMAIADILFVLTLP FWAVSHATGAWVFSNATCKLLKGIYAINFCGMLLLCISMDRYIAIVQ ATKSFRLRSRTLPRSKIICLVVWGLSVIISSTPFVFNQKYNTQGSDVCEPK YQTVSEPIRWKLLMLGLELLFGFFIPLMFMIFCYTFIVKTLVQAQNSKRH KAIRVIIAVVLVFLACQIPHNMVLLVTAANLGKMNRSCQSEKLIGYTKT VTEVLAFLHCCLNPVLYAFIQKFRNYFLKILKDLWCVRRKYKSSGFSC AGRYSENISRQTSETADNDNASSFTM