



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 341 419**

⑫ Número de solicitud: 200802442

⑮ Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**18.06.2010**

⑰ Solicitante/s:  
**Hospital Clínic i Provincial de Barcelona  
c/ Vilarroel, 170  
08036 Barcelona, ES  
Institut de Investigacions Biomèdiques August  
Pi i Sunyer**

⑰ Inventor/es: **Quintana Porras, Luis Fernando;  
Bañón-Maneus, Elisenda y  
Campistol Plana, Josep María**

⑰ Agente: **Carpintero López, Mario**

⑮ Título: **WNT1 como biomarcador de daño renal.**

⑮ Resumen:

WNT1 como biomarcador de daño renal.

La presente invención comprende el uso de WNT1 como biomarcador en la monitorización, pronóstico y/o en el diagnóstico de nefropatías crónicas. Aporta métodos de pronóstico y de diagnóstico *in Vitro* y kits para su ejecución. Así mismo la presente invención comprende el uso de WNT1 en la búsqueda de principios activos para la fabricación de un medicamento para terapias de nefropatías crónicas y método para realizar dicha búsqueda.

ES 2 341 419 A1

## DESCRIPCIÓN

WNT1 como biomarcador de daño renal.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el campo de las herramientas clínicas para la diagnosis y monitorización de la función renal de pacientes de insuficiencia renal crónica (Chronic Renal Failure, CRF). Especialmente aquellos que han sufrido terapia de trasplante.

## 10 Antecedentes de la invención

La insuficiencia renal crónica (CRF) consiste en una pérdida lenta y progresiva de la función renal, caracterizada por un bajo índice de Filtrado Glomerular (Glomerular Filtration Rate, GFR). Cuando la insuficiencia renal es muy grave (End Stage Renal Disease, ESRD), se requiere terapia de sustitución que puede consistir bien en diálisis, bien en trasplante, renal.

La terapia de trasplante renal es una alternativa de éxito que puede prolongar la vida del paciente hasta más de 15 años en algunos casos. Sin embargo, los riesgos y complicaciones son múltiples. A pesar de que las pruebas de compatibilidad de tejidos se han perfeccionado en los últimos años, es necesario desarrollar en paralelo una terapia inmunodepresiva continua con el objetivo de prevenir rechazos agudos o crónicos que puedan llevar al fallo de la función renal del órgano trasplantado. Tras un trasplante, niveles elevados de creatinina en suero son indicativos de fallo en la función del riñón trasplantado. Sin embargo, el método de la creatinina no es ni sensible ni específico. En consecuencia, el desarrollo de herramientas de monitorización de la función renal de los riñones trasplantados y de evaluación de la supervivencia del injerto se ha convertido en una necesidad clínica. La nefropatía crónica de trasplante (Chronic Allograft Nephropathy, CAN), caracterizada por fibrosis intersticial y atrofia tubular, es la mayor causa de pérdida del órgano trasplantado. La CAN tiene una etiología multifactorial donde se implican tanto factores inmunológicos (rechazo del aloinjerto) y factores no inmunológicos, especialmente la nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina. Hoy en día se dispone de diversas herramientas de monitorización en forma de kit de diagnóstico que permiten detectar el rechazo al órgano trasplantado en base a la actividad específica del sistema inmune del paciente. Por ejemplo, la solicitud WO 2004074815 A1 enseña un método para evaluar el riesgo de fallo funcional o rechazo de un órgano trasplantado a partir de una muestra de sangre o biopsia de tejido que consiste en determinar el nivel de expresión de uno o más genes que codifican para proteínas relacionadas con la inflamación. De manera similar, en la solicitud de patente WO 2006099421 A1 se describen métodos para evaluar la evolución del órgano trasplantado, identificar la presencia de daño funcional como por ejemplo la nefropatía crónica de trasplante e identificar la severidad y clase del rechazo agudo (Acute Rejection, AR). Los métodos descritos en ella comprenden la detección, a nivel de ácido nucleico o proteína en sangre o biopsia, de al menos un gen especificado en las tablas 1 y 2. En la tabla 2 se especifican los 30 genes predictivos para dichos métodos utilizando sangre o tejido procedente de biopsia renal. Notablemente todos estos genes están relacionados con la actividad del sistema inmune. Se corresponden bien con genes inducibles por citokinas o quimioquinas, bien con genes que forman parte del complejo MHC, genes del complemento, o inmunoglobulinas. Los 479 genes de la tabla 3 representan en conjunto un ejemplo de “Chip de trasplante” que incluye tanto los genes de las tablas 1 y 2 como otros genes característicos de las nefropatías de trasplantes (AR, CAN). También se incluyen entre ellos genes control y genes moduladores de la función normal del sistema inmune, identificadas en una revisión bibliográfica.

El tipo de herramientas clínicas citadas arriba requieren métodos invasivos de obtención de muestras que. Por ejemplo, biopsias que comportan una morbilidad asociada no despreciable además de suponer un coste económico importante. Una alternativa a las muestras de sangre o tejido, es la muestra de orina; sin embargo, no existen hoy por hoy herramientas clínicas fiables para diagnosticar el estado del órgano trasplantado a partir de muestras de orina. En el caso del riñón trasplantado, se han desarrollado técnicas sensibles para detectar la presencia en orina de proteínas relacionadas con el proceso de inflamación. El trabajo del equipo del Dr. Nickerson, en Canadá, ha adaptado la tecnología proteómica para detectar proteínas urinarias asociadas con AR (Schaub *et al.*, J Am Soc Nephrol. 2004 Jan; 15 (1): 219-27). Algunas empresas interesadas en la tecnología biomédica están invirtiendo esfuerzos también en esta dirección (WO 07121922 A2 y WO 07104537 A2, Am J Transplant. 2005 Oct; 5(10):2479-88; CA 2473814 A1). Estas solicitudes y estudios contemplan la posibilidad de detectar biomarcadores relativos a la función del sistema inmune en orina, sin embargo no existen métodos clínicos comerciales fiables que utilicen esta tecnología. Esto es debido a que, aunque la tecnología proteómica tiene el potencial de clarificar aspectos complejos de procesos patofisiológicos y de revelar nuevos biomarcadores, el estado actual del proteoma urinario de las patologías del trasplante renal está todavía lejos de conseguir tales objetivos (Schaub *et al.*, Contrib Nephrol. 2008; 160:65-75).

Como se ha mencionado más arriba, los signos característicos de CAN son fibrosis intersticial y atrofia tubular. Sabemos que la etiología de la CAN radica, en parte, el rechazo al trasplante. Pero no disponemos de herramientas directas que detecten daño temprano en el tejido injertado, especialmente mediante técnicas no invasivas como el análisis de orina. Uno de los problemas derivados de la utilización de biomarcadores relativos a la actividad del sistema inmune, es que no posibilitan la distinción entre una infección aguda y un rechazo. Además, estos métodos no reflejan directamente el estado de la función renal y no pueden aplicarse en la evaluación de pacientes que conserven su riñón nativo.

Así, en el día a día de la práctica clínica, el principal problema del profesional es no disponer de suficientes herramientas no invasivas de diagnóstico que revelen la existencia de daño renal. Existen, como hemos visto, herramientas que detectan rechazo en función de la actividad del sistema inmune, pero con técnicas invasivas

Sorprendentemente, los inventores de la presente solicitud han identificado en análisis de orina un marcador específico de fibrosis. El análisis de muestras de pacientes de trasplante de riñón mediante la técnica proteómica de 2D-DIGE ha revelado la presencia distintiva de la proteína WNT1 en la orina de aquellos pacientes que sufren una nefropatía crónica de trasplante. La proteína WNT1 no se expresa en el riñón adulto, pero durante el desarrollo induce al mesénquima. metanéfrico a diferenciarse en epitelio tubular y glomerular (Herzlinger *et al.*, 1994; Dev. Biol. 166:815-818) y podría estar implicado en procesos de fibrosis y atrofia tisular en pulmón (Königshoff *et al.*, PLoS ONE. 2008 May 14; 3(5):e2142).

La presente invención proporciona, por tanto, una nueva herramienta clínica no invasiva que permite una medida directa del daño tisular del riñón en una etapa temprana mediante el análisis de una muestra de orina del paciente.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: La Figura muestra el detalle de la detección mediante Western-blot, de la proteína wnt-1. Para la detección de la wnt-1 se han escogido dentro de los pacientes que cumplían los criterios de inclusión en el estudio dos muestras aleatorias de cada grupo. La figura a) corresponde al detalle de dos pacientes trasplantados renales sin NCT (NCT 0), b) corresponde al detalle de dos pacientes trasplantados renales con NCT incipiente (NCT I) y c) corresponde al detalle de dos pacientes trasplantados renales con NCT avanzada (NCT II-III). NCT: Nefropatía crónica del trasplante.

Figura 2: La figura muestra las imágenes proporcionadas por el software de análisis de imágenes DeCyder® (GE Healthcare). El área delimitada por la línea corresponde al punto de la proteína identificada como wnt-1. Puede observarse que la altura del área aumenta a medida que aumenta la severidad de la NCT, este aumento del área se corresponde con un aumento de la cantidad de la proteína en la orina. La figura a) corresponde al detalle de pacientes trasplantados renales sin NCT (NCT 0), b) corresponde al detalle de pacientes trasplantados renales con NCT incipiente (NCT I) y c) corresponde al detalle de pacientes trasplantados renales con NCT avanzada (NCT II-III). NCT: Nefropatía crónica del trasplante.

### Definiciones

En el contexto de la presente invención, el término WNT1 se refiere, a menos que se especifique otro expresamente, a cualquiera de las formas biológicas del gen wingless-related MMTV integration site 1 (locus genético 12q12-q13 en *Homo sapiens*) y combinaciones de estas. Dichas formas biológicas comprenden de manera no limitante el ADN, sus variantes y mutaciones, sus regiones de control tales como reguladores, moduladores, promotores y potenciadores; el ADNc y construcciones que lo comprendan; ARN en cualquiera de sus versiones incluyendo el ARNm y la proteína, sus versiones, mutaciones, modificaciones post-translacionales y fragmentos de ella. Así mismo, se entiende por biomarcador cualquier molécula de origen biológico que es distintiva de un proceso fisiopatológico. En el caso de la presente invención, dicho proceso se corresponde con la fibrosis intersticial y la atrofia tubular, que son características del deterioro de la función renal.

### Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es el uso de WNT1 como biomarcador en el pronóstico del deterioro de la función renal y/o en el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro. En realizaciones preferidas, la presente invención comprende este uso en pacientes de riñón trasplantado.

Otro aspecto de la presente invención es un método para el pronóstico del deterioro de la función renal y/o para el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende la determinación de la presencia o ausencia del biomarcador WNT1, o un fragmento del mismo, en una muestra biológica aislada de un paciente. En una realización preferida, la muestra biológica utilizada es orina, sangre, suero o biopsia de tejido y comprende la determinación de la presencia o ausencia de la proteína, el ARN o el ADN de WNT1 o un fragmento de los mismos.

En realizaciones preferentes, el método de la presente invención comprende una muestra biológica aislada de un paciente trasplantado renal. En realizaciones aún más preferentes, el método de la presente invención comprende la cuantificación de WNT1 en las muestras.

Un tercer aspecto de la presente invención comprende un método para el diagnóstico *in vitro* de una nefropatía crónica de trasplante, dicho método comprende:

- a) La cuantificación del WNT1 o un fragmento del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente.
- b) La comparación de la cantidad de WNT1 en la muestra del paso a) con la cantidad de WNT1 en muestras aisladas de individuos sanos.

En este método, la presencia o el aumento relativo de la cantidad de WNT1 son indicativos de deterioro en la función renal.

En realizaciones muy preferentes, este método se realiza utilizando muestras de orina del paciente. En otras realizaciones, se utilizan en el método muestras de sangre, suero o tejido procedente de biopsia.

Un aspecto adicional de la presente invención es un *Kit* para la monitorización, pronosis y/o el diagnóstico del deterioro de la función renal y nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende al menos una molécula o composición capaz de unirse y reconocer una secuencia que se corresponde con alguna de las formas biológicas de WNT1 y que se selecciona de entre SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, o un fragmento de las mismas; opcionalmente, dicha molécula está marcada para facilitar su detección.

Otro aspecto adicional de la presente invención es un *Kit* para la monitorización, pronosis y/o el diagnóstico del deterioro de la función renal o nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende el biomarcador WNT1 o un fragmento del mismo.

Una realización particular de la presente invención comprende el uso de dicho *kit* en la búsqueda de principios activos para la fabricación o el desarrollo de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades derivadas de procesos de fibrogénesis.

Un aspecto de la presente invención es también un método para la búsqueda de principios activos para la fabricación o el desarrollo de un medicamento que comprende un ensayo de unión de dicho principio activo a WNT1.

En realizaciones preferentes, los *Kit* de la presente invención se dirigen a la monitorización, pronosis y/o al diagnóstico o a la búsqueda de principios activos o fabricación de medicamentos para la terapia de las nefropatías de trasplante asociadas al deterioro de la función renal.

Un último aspecto de la presente invención es el uso de WNT1 o un fragmento del mismo en la búsqueda de principios activos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de nefropatías. En una realización preferente, dichas nefropatías son nefropatías crónicas de trasplante.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la inesperada observación por parte de los inventores, de la presencia de la proteína WNT1 en la orina de pacientes con CAN (Figura 1). La ausencia de WNT1 en la orina de pacientes que no sufren nefropatía crónica del trasplante o pacientes trasplantados renales sin nefropatía crónica del trasplante o población general trasplantada con normofunción renal convierte a WNT1 en un biomarcador con elevado valor diagnóstico y predictivo para dichos pacientes. Los inventores atribuyen la expresión de WNT1 a procesos regenerativos que, al frustrarse en el riñón adulto, derivan en fibrosis intersticial, atrofia tubular y en la formación de las lesiones escleróticas observadas en las biopsias. Tales procesos regenerativos comenzarían, en el riñón trasplantado, de manera inmediata con las primeras lesiones causadas por el rechazo agudo y/u otros insultos lesionales. Correspondiéndose con la proliferación de linfocitos, el engrosamiento de la capa íntima y la disrupción de la capa elástica. Así los inventores han observado que, a diferencia de otros marcadores utilizados en el campo de la técnica, atendiendo a la presencia o ausencia de WNT1 en muestras de pacientes puede derivarse una medida directa del daño y el atrofiamiento de las estructuras que llevan a cabo la función renal. Los inventores especulan que WNT1 podría estar participando en la formación de neo-media y neo-íntima observada en estadios muy tempranos del rechazo crónico.

Como la expresión de WNT1 no puede ser consecuencia de la mecánica quirúrgica del trasplante, si no que se corresponde con la fisiopatología intrínseca del riñón, estos hallazgos pueden extrapolarse y aplicarse también a pacientes que sufren deterioro de su riñón natural.

Sería muy deseable en la práctica clínica diaria, disponer de una herramienta analítica que pudiera obtenerse de una muestra aislada del paciente cuya recogida no influyera negativamente en la calidad de vida del paciente, comportara ninguna morbilidad para el paciente ni supusiese un coste económico elevado. Como por ejemplo, de muestras de orina. Ajustándose a estas mejoras deseables, un primer aspecto de la presente invención es el uso de WNT1 como biomarcador en el pronóstico del deterioro de la función renal y/o en el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro.

Según la presente invención, las nefropatías asociadas al deterioro de la función renal comprenden la Nefropatía Diabética, Nefroangioesclerosis, Nefropatía por IgA, Nefropatía Membranosa, Glomeruloesclerosis focal y segmentaria, Nefritis Lúpica (asociada a Lupus eritematoso sistémico), Glomerulonefritis extracapilar paucimmune ANCA positivo (asociada anticuerpos anti-citoplasma de los neutrófilos en plasma) y la nefropatía crónica del trasplante entre otras. Algunas de estas nefropatías pueden aparecer tanto en pacientes trasplantados como no trasplantados.

Algunos de los desórdenes que cursan con fibrosis intersticial y atrofia tubular comprenden además enfermedades infecciosas como el SIDA o enfermedades autoinmunes crónicas como el ya citado lupus eritematoso sistémico.

Sería también deseable en la práctica clínica diaria, disponer de una herramienta analítica que, siendo capaz de indicar un estadio temprano de CAN, no fuera una medida de la actividad del sistema inmune. Para poder distinguir así entre una infección aguda y un rechazo a injerto. De acuerdo con esta mejora, en algunas realizaciones la presente invención comprende el uso de WNT1 como biomarcador en el pronóstico del deterioro de la función del injerto renal y/o en el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro en pacientes de riñón trasplantado.

Según la presente invención, las nefropatías asociadas al deterioro de la función renal comprenden además de las ya citadas, cualquiera de los desórdenes que cursan con fibrosis intersticial y atrofia tubular.

Con el objetivo de ayudar a la apreciación, evaluación y determinación de los síntomas específicos del deterioro de la función renal, otro aspecto de la presente invención comprende un método para la monitorización, el pronóstico del deterioro de la función renal y/o para en el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende la determinación de la presencia o ausencia WNT1, o un fragmento del mismo, en una muestra biológica aislada de un paciente.

Cuando el método se aplica a la prognosis, la invención contempla la asistencia técnica en las valoraciones sobre el riesgo de que dicho paciente padezca una de las enfermedades o desordenes citados para esta invención mediante la aportación de datos específicos sobre la presencia o ausencia de alguna forma biológica de WNT1.

En una realización preferida, la muestra biológica es orina, sangre, suero o biopsia de tejido y comprende la determinación de la presencia o ausencia de la proteína, el ARN o el ADN de WNT1 o un fragmento de los mismos.

Las posibles realizaciones del método de la presente invención comprenden:

- a) La recogida de muestras del paciente. Las muestras serán utilizadas de inmediato o conservadas adecuadamente dependiendo de su naturaleza.

Por ejemplo, las muestras pueden ser procesadas inmediatamente o pueden ser envasadas al vacío, o congeladas a -80°C hasta su análisis para evitar la degradación de las formas biológicas de WNT1. El tratamiento de las muestras tras su recogida no es limitante en ningún caso para el objeto de la presente invención y se realizará de acuerdo con el mejor protocolo en conocimiento del experto en la materia en el momento de la ejecución del método de la presente invención.

- b) El aislamiento de la fracción de la muestra y la detección en ella de la forma biológica elegida de WNT1.

Si por ejemplo se elige analizar la presencia o ausencia de la proteína WNT1, la muestra se centrifugará y se someterá a protocolos de concentración de proteínas. Si la muestra es de sangre, será necesario eliminar la fracción celular con anterioridad a dicha concentración. En el caso de una biopsia de tejido renal, se seguirá el tratamiento específico que describen los protocolos de inmunohistoquímica o cualquier otra técnica de detección de proteínas en tejidos conocidas en el campo de la técnica. Para ello se utilizarán anticuerpos comerciales específicos contra WNT1. Estos anticuerpos pueden diluirse en soluciones para el tratamiento de dichas fracciones de las muestras junto a otros reactivos o pueden fijarse a soportes sólidos para facilitar la unión de la proteína a dicho soporte y su posterior revelado en, por ejemplo, un ensayo tipo ELISA o una inmunocromatografía de afinidad. Si, en cambio, se elige analizar la expresión genética de WNT1, se elegirán los protocolos adecuados para la extracción de ARNm que incluirán la adición a esta de algún potente inhibidor de ARNasas. Dichos protocolos se conocen en el campo de la técnica y pueden variar según la naturaleza de la muestra. Por ejemplo, en el caso de biopsia, requerirá la homogeneización del tejido, y un protocolo de RT-PCR que puede ser cuantitativo y para el cual se requerirán los cebadores adecuados que el experto en la materia elegirá según su mejor conocimiento.

- c) Opcionalmente, la cuantificación de la forma biológica elegida de WNT1 en la fracción aislada en el paso b).

Si bien, la mera presencia de ARNm o proteína WNT1 en la muestra es indicativa de deterioro en la función renal, sería deseable una herramienta que permita la cuantificación ya que ésta puede servir para determinar el grado de pérdida en la función renal. De acuerdo con esto, la presente invención comprende la cuantificación de WNT1 como herramienta clínica en la evaluación de los síntomas para el diagnóstico más apropiado en cada paciente.

En Nefrología clínica, el profesional responsable de la diagnosis de pacientes que sufren insuficiencia renal carece de suficientes herramientas que aporten datos técnicos objetivos sobre la degradación estructural del riñón. La presente invención ofrece la posibilidad de aplicar la detección y cuantificación de WNT1 para mejorar esta deficiencia clínica. Así, una realización de la presente invención comprende un método para diagnosticar *in vitro* una nefropatía crónica de trasplante que comprende:

- c) Cuantificación del WNT1 o un fragmento del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente.
- d) Comparación de la cantidad de WNT1 en la muestra del paso a) con la cantidad de WNT1 en muestras aisladas de individuos sanos.

Donde la presencia o el aumento relativo de la cantidad de WNT1 son indicativos de deterioro en la función renal.

Un ejemplo de esta cuantificación puede verse en la figura 2. Un aspecto particularmente enojoso para el paciente es la reducción en su calidad de vida al tener que someterse sistemáticamente a pruebas para la obtención de biopsias renales para aportar datos técnicos objetivos sobre el grado de degradación tisular de su riñón. La presente invención representa una mejora en este sentido al permitir la obtención de dichos datos a partir de una muestra de orina. En una realización muy preferente, el método de esta invención para diagnosticar *in vitro* una nefropatía crónica de trasplante, comprende la utilización de muestras de orina obtenidas del paciente.

Mediante la utilización de un conjunto de reactivos seleccionados se puede detectar rápida y específicamente la presencia de WNT1 en muestras de pacientes. Por ello, en otro aspecto, la presente invención comprende un conjunto de reactivos o *kit* para la obtención de datos moleculares que ayuden en la monitorización prognosis y/o el diagnóstico del deterioro de la función renal o nefropatías asociadas a dicho deterioro. Este conjunto de reactivos comprende al menos una molécula o composición capaz de unirse y reconocer una de las formas biológicas de WNT1, es decir, una secuencia seleccionada de entre SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, o un fragmento de las mismas. Opcionalmente, dicha molécula puede estar marcada para su detección.

Tradicionalmente, estos reactivos comprenden en el caso de los ácidos nucleicos, fragmentos de secuencias sintetizados artificialmente en los cuales se han incluido moléculas radiactivas o moléculas capaces de impresionar un film radiofotográfico. De manera equivalente, los reactivos empleados en la detección de proteínas son tradicionalmente los anticuerpos que pueden ir marcados con moléculas radiactivas, fluorescentes o luminiscentes. En la presente invención se contempla la fijación de estos anticuerpos a un soporte sólido para originar un *kit* utilizable en un ensayo tipo ELISA.

El kit descrito más arriba, es particularmente útil en la identificación de individuos en riesgo de desarrollar una nefropatía. Por ello, dicho kit puede servir de medio para detectar dichos individuos y desarrollar una estrategia de medidas preventivas o terapias de intervención adelantándose a la aparición de daño irreversible o al desarrollo de la enfermedad. De manera particular, el este kit sirve de ayuda al personal clínico en el seguimiento y monitorización de la progresión de la enfermedad, así como del éxito o ineffectividad de la terapia elegida.

Dado que la fibrosis intersticial y la atrofia tubular son causantes de la insuficiencia renal crónica, sería conveniente bloquear el agente que las causa. En este sentido, otra realización de la presente invención aporta un *kit* alternativo al descrito anteriormente que comprende entre sus reactivos al menos una forma biológica de WNT1. Este *kit* alternativo es útil en el desarrollo de ensayos de búsqueda ("screening") de por ejemplo, moléculas capaces de promover o inhibir la expresión genética por ejemplo mediante la unión al promotor del gen WNT1; moléculas capaces de impedir la traslación o transcripción del gen o de bloquear la secreción o la unión de la proteína WNT1 con su receptor. Este *kit* es útil además en la fabricación de nuevos medicamentos que tengan como diana terapéutica WNT1. Así mismo, este *kit* alternativo puede beneficiar tanto al clínico como al paciente aportando un medio para el desarrollo de ensayos para la detección temprana de daño renal o evolución de un riñón trasplantado. Así este *kit* comprende una matriz o soporte sólido al cual se uniría alguna de las formas biológicas de WNT1 y alternativamente otros biomarcadores conocidos. Por lo tanto, es otro aspecto de la presente invención, un método para la búsqueda de principios activos para la fabricación o el desarrollo de un medicamento que comprende un ensayo de unión de dicho principio activo a WNT1.

Gracias a la tecnología que aporta la presente invención, un paciente, por ejemplo de trasplante renal puede incorporarse a un programa de seguimiento de la evolución funcional de su riñón trasplantado que permitiría una pronta intervención en caso de rechazo o disfunción. De acuerdo con esto, realizaciones preferidas de la presente invención comprenden un *kit* orientado específicamente a la pronóstico y/o el diagnóstico de nefropatías de trasplante así como a la monitorización del órgano trasplantado.

Por todo ello, un aspecto final de la presente invención comprende la utilidad terapéutica en caso de que un paciente renal desarrolle una nefropatía crónica del trasplante. Según la presente invención, dicha utilidad terapéutica comprende el uso de WNT1 en la búsqueda de principios activos y/o en la fabricación y selección de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una nefropatía. Muy preferentemente, una realización de la presente invención comprende dicho uso cuando la nefropatía es nefropatía crónica de trasplante.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Detección de wnt-1 en orina de pacientes trasplantados afectos o no de NCT*

##### 1.1 Pacientes

Se recogió la segunda orina de la mañana de pacientes trasplantados renales en diferentes momentos post-trasplante. Los criterios de inclusión fueron: 1) género masculino, 2) función renal estable, 3) tiempo post-trasplante superior a 6 meses, 4) sedimento anodino y no hematuria, 5) tratamiento inmunosupresor con Tac+MMF±Pd y 6) biopsia renal reciente sin signos de rechazo agudo y la evaluación de las lesiones crónicas realizada acorde con la nueva clasificación

de Banff. Las muestras fueron recogidas de 8 pacientes trasplantados con CAN 0, 8 pacientes trasplantados con CAN I, 5 pacientes trasplantados con CAN II y 3 pacientes trasplantados con CAN III. Los pacientes se agruparon en tres grupos CAN 0 (n=8), CAN I (n=8) y CAN II-III (n=8).

- 5 El estudio fue aprobado y realizado de acuerdo con el comité ético del Hospital Clínic de Barcelona. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes.

### 1.2 Preparación de muestras humanas de orina

10

Se confirma la ausencia de infección y de hematuria mediante tiras reactivas (Combur-Test, Roche). Se recogieron los 100 ml de la segunda orina de la mañana de los pacientes con inhibidores de proteasas (Complete Mini and Pefabloc; Roche). Se filtró la orina con papel Whatman de 3mm (Whatman, Maidstone, UK) para eliminar los posibles solutos de la orina y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 1,000 g. El sobrenadante se conservó a -80°C en alícuotas de 40 ml hasta su uso.

15

### 1.3 Precipitado de proteínas

20

Las proteínas de la orina se precipitan con TCA (Fluka) a una concentración final del 10%. El precipitado de proteínas se lavó dos veces con acetona a -20°C, posteriormente se deja secar el precipitado a 4°C, entonces se disolvió en tampón de resuspensión que contiene urea 7 M (GE Healthcare), thiourea 2M (GE Healthcare), CHAPS 4% (GE Healthcare), DTT 0.1% (Sigma), y anfolitos 0.2% con un rango de pH 4 -7 (GE Healthcare). Se llevó el pH de las muestras a un pH de 8 - 8.5 con NaOH 1 M para optimizar el marcaje con los fluorocromos del ensayo DIGE. La concentración de proteínas se determinó con el Kit RcdC (BioRad, según protocolo de la casa comercial). Se realizaron alícuotas de 30 µl y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

25

### 1.4. Geles preparativos

30

#### - Isoelectroenfoque

Se rehidrataron pasivamente tiras de gel de poliacrilamida de 24 cm con un gradiente de pH lineal de 4 a 7 (IPG strips, GE Healthcare) con 450 µl de tampón de rehidratación que contiene CHAPS 2% (w/v) (GE Healthcare), Urea 7 M (GE Healthcare), Thiourea 2 M (GE Healthcare), anfolitos con un rango de pH de 4-7 0.5% (v/v) (GE Healthcare), 2 mg/ml dithiothreitol (Sigma) y trazas de azul de bromofenol (GE Healthcare). Se cargaron mediante la técnica de *cup-loading* (GE Healthcare) 250 µg de proteína. Las tiras IPG se isoelectroenfocan a 20°C en el Ettan IPGphor (GE Healthcare) utilizando el programa de isoelectroenfoque especificado en la Tabla 1. Inmediatamente después del isoelectroenfoque las tiras se congelan a -80°C hasta que se realice la segunda dimensión por SDS-PAGE.

40

TABLA 1

*Condiciones de isoelectroenfoque*

45

Paso	Voltage (V)	Duración (h:min)	Voltios-hora	Tipo de gradiente
1	0	6:00	---	---
2	50	6:00	---	Step-n-hold
3	500	1:00	---	Gradient
4	1000	1:00	---	Gradient
5	4000	1:00	---	Gradient
6	8000	1:00	---	Gradient
7	8000	---	80.000	Step-n-hold

50

55

60

#### - Segunda dimensión: SDS-PAGE

Previo a la separación en la segunda dimensión, para eliminar los puentes bisulfito, se incubaron las proteínas 15 minutos a temperatura ambiente en tampón de equilibrado con SDS (Tris-Cl pH 8.8 50 mM (GE Healthcare), urea 6 M (GE Healthcare), glicerol 30% (v/v) (GE Healthcare), SDS 2% (w/v) (Fluka), trazas de azul de bromofenol (GE Healthcare) 1-4 ditiotretitol (DTT) 0.5% (w/v) (GE Healthcare)). Las tiras IPG posteriormente se incuban 15 minutos con el tampón de equilibrado con iodoacetamida (el tampón es exactamente igual que el anterior pero con

65

## ES 2 341 419 A1

iodoacetamida al 2.5% (GE Healthcare) en lugar del DTT. La solución tampón II es idéntica a la solución tampón I solo que lleva iodoacetamida en vez de DTT. Las proteínas se separaron en la segunda dimensión a 20°C en geles de poliacrilamida al 12.5% a 2 W por gel en el sistema Ettan DALT (GE Healthcare) hasta que el frente de azul de bromofenol eluyó (10-14 horas).

### - Tinción con plata

Las proteínas separadas se visualizaron utilizando tinción de plata convencional. Brevemente, las proteínas se fijan al gel con la solución de fijación (etanol 40% (Merk) y ácido acético 10% (Panreac)) durante 30 minutos; se sensibilizó el gel con la solución de sensibilización (etanol 30%,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.2% w/v (Amersham Biosciences) y acetato de sodio 6.8% w/v (Amersham Biosciences) durante 30 minutos. Después de realizar tres lavados de 5 min. con agua mQ se impregnaron los geles con una solución de nitrato de plata al 2,5% w/v (Fluka) durante 20 min. Posteriormente se lavaron dos veces durante 1 min con agua mQ. La solución de revelado (Bicarbonato sódico 2.5% (Fluka) y 0.4 mL/L formaldehído (Sigma)) evidenciaron los puntos. La reacción se paró sustituyendo la solución de revelado por una solución de EDTA- $\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.4 6% w/v (Fluka) durante 10 min. Finalmente se realizaron tres lavados con agua desionizada de 5 minutos cada uno y se escanearon con Molecular Imager® GS-800™ Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

### 1.5 Análisis bidimensional DIGE del proteoma urinario en pacientes con CAN

#### - Marcage fluorescente

Se realizaron seis geles con la técnica DIGE, en cada gel se compara el proteoma del total de dos pacientes de un grupo con el total de dos pacientes de otro grupo, ver tabla 2. Cada muestra se marca con cada uno de los fluorocromos del DIGE, Cy2, Cy3, o Cy5 (GE Healthcare). Las proteínas se marcaron por incubación a 4°C y a oscuras con el fluorocromo asignado a una concentración final de 8 pmol fluorocromo por  $\mu\text{g}$  proteína). La reacción se paró con 25 mol de lisina por mol de fluorocromo. Con los fluorocromos Cy3 y Cy5 marcamos las muestras correspondientes a los diferentes grupos a analizar, con la finalidad de analizar los cambios de expresión en función del estadio de la enfermedad. El Fluorocromo Cy2 se reserva para marcar el control intergel. Para su constitución se mezclaron proporciones idénticas de todas las muestras del ensayo. En cada gel se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de este control intergel con dos propósitos. Primero como el control intergel contiene todas las proteínas tanto de los controles como de las condiciones experimentales nos produce un patrón de referencia comparar los patrones tanto de los geles analíticos como preparativos. Segundo, la intensidad de los puntos teñidos con Cy2 nos sirve para comparar las intensidades de las condiciones control y experimental. Antes de cargar los geles, las muestras teñidas con los tres fluorocromos se mezclaron tal y como está indicado en la Tabla 2.

TABLA 2

Marcaje de los totales y mezclas de los 6 geles realizados. NCT 0 a,b,c,d Representan los 4 totales de 2 pacientes/total de trasplantados renales sin NCT; NCT I a,b,c,d Representan 4 totales de 2 pacientes/total de pacientes trasplantados renales con NCT incipiente; NCT II-III Representan 4 totales de 2 pacientes/total de pacientes trasplantados renales con NCT avanzada. NCT: Nefropatía crónica del trasplante

	Cy 2	Cy 3	Cy 5
<b>Gel 1</b>	Standard	NCT 0 a	NCT II-III c
<b>Gel 2</b>	Standard	NCT 0 b	NCT II-III d
<b>Gel 3</b>	Standard	NCT I a	NCT 0 c
<b>Gel 4</b>	Standard	NCT I b	NCT 0 d
<b>Gel 5</b>	Standard	NCT II-III a	NCT I c
<b>Gel 6</b>	Standard	NCT II-III b	NCT I d



### - Isoelectroenfoque y SDS-PAGE

Se realizaron el isoelectroenfoque y la segunda dimensión tal y como se ha descrito anteriormente pero todos los procesos se realizaron a oscuras.

### - Análisis de imágenes

En cuanto acaba la segunda dimensión, se lavaron los geles con agua destilada y se escanearon utilizando el DIGE-enabled Typhoon Scanner (GE Healthcare). Las proteínas se visualizaron con el Typhoon Variable Mode Imager (GE Healthcare). El software DeCyder Differential In-gel Analysis (GE Healthcare) se utilizó para analizar la intensidad de los puntos. El alineamiento de los puntos de los diferentes geles se realizó utilizando el patrón interensayo marcado con Cy2. Específicamente, el análisis de expresión se realizó para cada uno de los geles en paralelo utilizando el módulo DIA del programa DeCyder utilizando un valor inicial de 1000 puntos presentes. El análisis DIA se utilizó para la comparativa directa de intensidades de puntos específicos entre diferentes muestras de un mismo gel. En este caso, las intensidades de las proteínas que se compararon son de los proteomas urinarios de los grupos con CAN I, CAN II-III y CAN 0. Estos análisis DIA posteriormente se analizaron con el módulo BVA del DeCyder que nos permite analizar globalmente los ratios de expresión entre las tres condiciones.

### - Identificación de las proteínas diferenciales: *Peptide mass fingerprinting* (PMF) mediante MALDI-TOF-MS

#### *In-Gel Digestión*

Con la ayuda de un spot picker manual de 1,5 mm de diámetro (Gel Company) se escindieron las proteínas de interés. Las proteínas se digirieron con tripsina (*Sequencing grade modified*, Promega). En el robot Investigator Pro-Gest (Genomic Solutions). Brevemente, los puntos escindidos se lavaron secuencialmente con bicarbonato amónico y acetonitrilo. Tras una incubación con DTT 10 mM durante 30 minutos, para la reducción de las proteínas, y otra con iodoacetamida 55 mM durante 30 minutos, las proteínas se sometieron a lavados secuenciales de tampón y acetonitrilo. Las proteínas se digirieron durante la noche a 37°C con 0.27 nmol de tripsina. Los péptidos obtenidos de la digestión triptica se extrajeron del gel con ácido fórmico al 10% y acetonitrilo, los extractos se juntaron y se secaron en una centrifuga de vacío.

#### *Adquisición de espectros*

Las proteínas escindidas de los geles bidimensionales se analizaron mediante ESI-MS-MS (Q-TOF Global, Micromass-Waters). Los péptidos derivados de la digestión triptica se analizaron mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (CapLC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). En este caso, las muestras se resuspendieron en 15 µL de ácido fórmico al 1% y se inyectaron 4 µL en el cromatógrafo para realizar una separación por fase reversa con C<sub>18</sub> (diámetro interno 75 µm y 15 cm de longitud, PepMap column, LC Packings). Los péptidos eluidos se ionizaron mediante nano agujas (PicoTip™, New Objective). Se aplicó un voltaje de 1800-2200 V al capilar junto a un voltaje del cono de 80 V. La colisión en el GID (collision-induced dissociation) es de 20-35 eV, el gas de colisión utilizado es el argón. Los datos generados tienen formato PKL, que permiten ser sometidos a una búsqueda en bases de datos utilizando herramientas de búsqueda como MASCOT o NCBI-Entrez.

### 1.6. Western blot de wnt-1

Se realizaron minigeles de acrilamida al 12% (Miniprotein, BioRad) y de 1,5 mm de grueso. Se cargaron 25 µg de los extractos proteicos de orina de pacientes con diferentes grados de CAN, y se hicieron correr durante 10 min a 60 V y posteriormente a 100 V. En cuanto el frente del azul de bromofenol eluyó, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Protan 45 µm de diámetro) mediante el trans-blot semidry (BioRad) durante 30 min a 10 V. a una membrana de nitrocelulosa (Protan 45 µm de diámetro) mediante el trans-blot semidry (BioRad) durante 30 min a 10 V.

Posteriormente se procedió al bloqueo de la membrana con una solución de leche en polvo desnatada al 4% en PBS durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la incubación del anticuerpo primario (human wnt-1 obtenido en conejo, Rockland) con una dilución 1:500 en una solución de leche en polvo desnatada al 1%, durante la noche (10 horas) a 4°C y en agitación suave. Tras tres lavados de 10 minutos, cada uno con una solución de leche en polvo desnatada al 1%, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (anti-rabbit, SIGMA) con una dilución 1:2000 en una solución de leche en polvo desnatada al 1%. Tras dos lavados de 10 minutos cada uno con una solución de leche en polvo desnatada al 1% en PBS, se realizó un último lavado en PBS. Para el revelado del mismo se utilizó el sistema ECL (GE Healthcare). Posteriormente se obtuvieron las imágenes en el sistema de adquisición de imágenes LARS.

El resultado de la identificación de la wnt-1 en dos pacientes con CAN0, CAN I y CAN II-III puede observarse en la Figura 1.

## ES 2 341 419 A1

### Ejemplo 2

#### *Detección inmunohistoquímica de wnt-1 en biopsias renales*

- 5 Se utiliza como anticuerpo primario el anticuerpo comercial de Roackland contra wnt-1 humana. Los cortes fueron montados en portaobjetos con carga positiva (Genex-brand®).

#### 2.1. *Desparafinado*

- 10 Se logró mediante el pase de los cortes por xileno (10 min), y graduaciones decrecientes de alcohol etílico (100° 10 min, 96° 5 min, y 70° 5 min).

#### 15 2.2. *Bloqueo de la actividad endógena de peroxidasa*

Incubación de los cortes en solución de peróxido de hidrógeno 3% en metanol por 15 min, e incubación en agua destilada por 10 min.

#### 20 2.3. *Recuperación antigénica*

- Se sumergen los cortes en solución buffer citrato 10 mM pH 6, y se calientan a 121°C, en autoclave durante 15 min. Se les dejó enfriar 5 min, y luego se llevaron a un baño de solución buffer TBST (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6) en el que permanecen 15 min.

#### 2.4. *Inmunomarcación*

- 30 Se incubaron los cortes de tejido con una solución de albúmina bovina sérica fracción V (SIGMA), 1% en buffer TBST por 5 min con la intención de bloquear sitios de unión inespecíficos. Luego se coloca el antisuero anti-wnt-1 con la dilución adecuada durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda.

#### 35 2.5. *Revelado de la reacción*

Se utiliza la técnica LSAB2®, de DAKO, con AEC como sustrato cromógeno.

#### 40 2.6. *Coloración de contraste*

Se sumergen los cortes en hematoxilina de Mayer durante 15 s; luego se colocaron bajo un flujo de agua corriente para el revelado.

#### 45 2.7. *Montaje*

Se realiza con medio de montaje acuoso (VectaMount™ AQ, Vector Lab Ind).

#### 50 2.8. *Lectura*

- La observación de las preparaciones se hace en un microscopio Leitz Dialux 20 EB. Las fotografías se toma con una cámara digital Olympus C4000, montada a este.

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Uso de WNT1 como biomarcador en el pronóstico del deterioro de la función renal y/o en el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro.

2. Uso según la reivindicación 1 donde la función renal o la nefropatía son de un riñón trasplantado.

3. Método para el pronóstico del deterioro de la función renal y/o para el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende la determinación de la presencia o ausencia del biomarcador WNT1 o un fragmento del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente.

4. Método según la reivindicación 3 donde la muestra biológica es orina, sangre, suero o biopsia de tejido y que comprende la determinación de la presencia o ausencia de la proteína, el ARN o el ADN de WNT1 o un fragmento de los mismos.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 donde el paciente ha sufrido terapia de trasplante renal.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5 que comprende la cuantificación del biomarcador WNT1.

7. Método para el diagnóstico *in vitro* una nefropatía crónica de trasplante que comprende:

a) Cuantificación de WNT1 o un fragmento del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente.

b) Comparación de la cantidad de WNT1 en la muestra del paso a) con la cantidad de WNT1 en muestras aisladas de individuos sanos.

Donde la presencia o el aumento relativo de la cantidad de WNT1 son indicativos de deterioro en la función renal.

8. Método según la reivindicación 7 donde la muestra biológica es una muestra de orina.

9. *Kit* para la monitorización prognosis y/o el diagnóstico del deterioro de la función renal o nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende al menos una molécula o composición capaz de unirse y reconocer una secuencia seleccionada de entre SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3 o un fragmento de las mismas, opcionalmente marcada para su detección.

10. *Kit* para la monitorización, prognosis y/o el diagnóstico del deterioro de la función renal o nefropatías asociadas a dicho deterioro que comprende el biomarcador WNT1 o un fragmento del mismo.

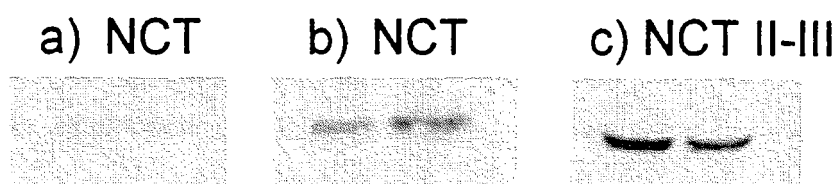
11. Uso del *kit* de la reivindicación 9 ó 10 en la búsqueda de principios activos para la fabricación o el desarrollo de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades derivadas de procesos de fibrogénesis,

12. Método para la búsqueda de principios activos para la fabricación o el desarrollo de medicamentos que comprende un ensayo de unión de dicho principio activo a WNT1.

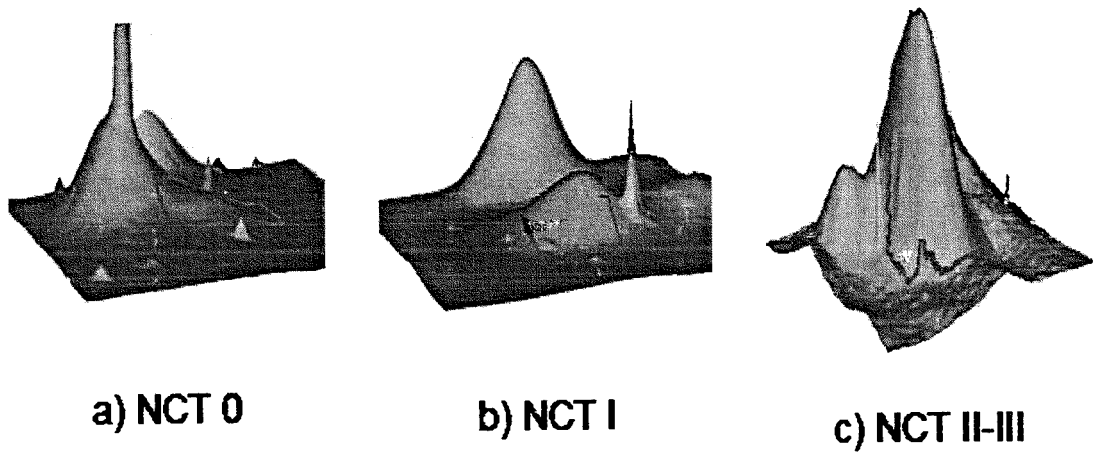
13. *Kit* según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde la nefropatía asociada al deterioro de la función renal es una nefropatía de trasplante.

14. Uso de WNT1 o un fragmento del mismo en la fabricación y/o selección de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una nefropatía.

15. Uso según la reivindicación 14 donde la nefropatía es una nefropatía crónica de trasplante.



**Figura 1**



**Figura 2**

# ES 2 341 419 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Hospital Clínic i Provincial de Barcelona Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer

5 <120> WNT1 como Biomarcador de Daño Renal

<130> 159/08

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 2368

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 1

gcggtgccgc ccgccgtggc cgctcagcc caccagccgg gaccgcgagc catgctgtcc  
60

25

gccgcccgcc ccaggggttg ttaaagccag actgcgaact ctgcgactg ccgccaccgc  
120

30

cgctccccgt ccaccgtcg cgggcaacaa ccaaagtcgc cgcaactgca gcacagagcg  
180

35

ggcaaagcca ggcaggccat ggggctctgg gcgctgttgc ctggctgggt ttctgctacg  
240

ctgctgctgg cgctggccgc tctgcccgca gccctggctg ccaacagcag tggccgatgg  
300

40

tgggggtattg tgaacgtagc ctctccacg aacctgctta cagactccaa gagtctgcaa  
360

45

ctggtactcg agcccagtct gcagctgttg agccgcaaac agcggcgtct gatacgccaa  
420

aatccgggga tcctgcacag cgtgagtggg gggctgcaga gtgccgtgcg cgagtgcag  
480

50

tggcagttcc ggaatgccg ctggaactgt cccactgctc cagggcccca cctcttcggc  
540

55

aagatcgtca accgaggctg tcgagaaacg gcgtttatct tcgctatcac ctccgccggg  
600

gtcaccatt cggtggcgcg ctctgctca gaaggttcca tcgaatcctg cacgtgtgac  
660

60

taccggcggc gcggccccgg gggccccgac tggcactggg ggggctgcag cgacaacatt  
720

65

gaattcggcc gcctcttcgg ccgggagttc gtggactccg gggagaaggg gcgggacctg  
780

# ES 2 341 419 A1

cgcttcctca tgaaccttca caacaacgag gcaggccgta cgaccgtatt ctccgagatg  
840

5 cgccaggagt gcaagtgcc a gggatgtcc ggctcatgca cggtgcgcac gtgctggatg  
900

10 cggctgcccc cgctgcgcgc cgtgggcat gtgctgogcg accgcttcga cggcgccctcg  
960

cgcgtcctgt acggcaaccg cggcagcaac cgcgcttcgc gagcggagct gctgcgcctg  
1020

15 gagccggaag acccggccca caaacgcgcc tccccccacg acctcgtcta ctccgagaaa  
1080

20 tcgccccact tctgcacgta cagcggacgc ctgggcacag caggcacggc agggcgcgcc  
1140

tgtaacagct cgtcgccgc gctggacggc tgogagctgc tctgctgcgg cagggggccac  
1200

25 cgcacgcgca cgcagcgcgt caccgagcgc tgcaactgca ccttcactg gtgctgccac  
1260

30 gtcagctgcc gcaactgcac gcacacgcgc gtactgcacg agtgtctgtg aggcgctgcg  
1320

cggactcgcc cccaggaaac gctctcctcg agccctcccc caaacagact cgctagcact  
1380

35 caagaccggt ttattcgccc acccgagtac ctccagtcac actccccgcg gttcatacgc  
1440

40 atcccatctc tcccacttcc tccatcctgg ggactcctca aaccacttgc ctggggcggc  
1500

atgaaccctc ttgccatcct gatggacctg ccccgacact acctccctcc ctctccgcgg  
1560

45 gagaccctt gttgactgc cccctgcttg gccaggaggt gagagaagga tgggtcccct  
1620

50 ccgcatggg gtgggtcct gatggtgtca ttctgcctgc tccatcgcg cagcgaccto  
1680

tctgcctctc ttcttccct ttgtcctgg tttctcctcg gtctcctaa gtcccttct  
1740

55 attctcctgc catgggtgca gacctgaac ccacacctgg gcatcagggc ctttctcctc  
1800

60 cccacctgta gctgaagcag gaggttacag ggcaaaaggg cagctgtgat gatgtggaaa  
1860

tgaggttggg ggaaccagca gaaatgcccc cattctccca gtctctgtcg tggagccatt  
1920

65 gaacagctgt gagccatgcc tccctgggac acctcctacc ccttctgtc ctgcctcctc  
1980

# ES 2 341 419 A1

atcagtgtgt aaataatttg cactgaaacg tggatacaga gccacgagtt tggatgttgt  
2040

5 aaataaaaact atttattgtg ctgggtccca gcctggtttg caaagaccac ctccaaccca  
2100

10 acccaatccc tctccactct tctctccttt ctccctgcag ccttttctgg tccctcttct  
2160

ctcctcagtt tctcaaagat gcgtttgcct cctggaatca gtatttcctt ccactgtagc  
2220

15 tattageggc tcctcgcccc caccagtgtg gcattcttct ctgcagaata aaatctctat  
2280

20 ttttatcgat gacttggtgg cttttccttg aatccagaac acaacottgt ttgtggtgtc  
2340

ccctatcctc cccttttacc actcccag  
2368

25 <210> 2  
<211> 2368  
<212> RNA  
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

35 gcggugccgc ccgcccuggc cgcucagcc caccagccgg gaccgcgagc caugcugucc  
60

gccgcccgc cccagggguug uaaaagccag acugcgaacu cucgccacug ccgccaccgc  
120

40 cgcgucccg cccaccgucg cgggcaacaa ccaaagucgc cgcaacugca gcacagagcg  
180

45 ggcaaagcca ggcaggccau ggggcucugg gcgcuguugc cuggcugggu uucugcuacg  
240

cugcugcugg cgcuggccgc ucugcccga gccucggcug ccaacagcag uggccgaugg  
300

50 ugggguaug ugaacguagc cuccuccacg aaccugcuua cagacuccaa gagucugcaa  
360

55 cugguacug agcccagucu gcagcuguug agccgcaaac agcggcgucu gauacgccaa  
420

aauccgggga uccugcacag cgugaguggg gggcugcaga gugccgugcg cgagugcaag  
480

60 uggcaguucc ggaaucgccg cuggaacugu cccacugcuc cagggcccca ccucuucggc  
540

65 aagaucguca accgaggcug ucgagaaacg gcguuuauu ucgcuaucac cuccgccggg  
600



## ES 2 341 419 A1

5      gucacccaau cgguggcgcg cuccugcuca gaagguucca ucgaauccug cacgugugac  
 660  
 10      uaccggcggc gcggccccgg gggccccgac uggcacuggg ggggcugcag cgacaacauu  
 720  
 15      gacuucggcc gccucuucgg ccgggaguuc guggacuccg gggagaagg gggggaccug  
 780  
 20      cgcuuccuca ugaaccuucc caacaacgag gcaggccgua cgaccguauu cuccgagaug  
 840  
 25      cgccaggagu gcaagugcca cgggaugucc ggcucaugca cggugcgcac gugcuggaug  
 900  
 30      cggcugccca cgcugcgcg cguggggcgau gugcugcgcg accgcuucga cggcgccucg  
 960  
 35      cgcguccugu acggcaaccg cggcagcaac cgcgcuucgc gagcggagcu gcugcgccug  
 1020  
 40      gagccggaag acccggccca caaacgccc uccccccag accucgucua cuucgagaaa  
 1080  
 45      ucgccaacu ucugcacgua cagcggacgc cugggcacag caggcacggc agggcgcgcc  
 1140  
 50      uguaacagcu cgucgcccgc gcuggacggc ugcgagcugc ucugcugcgg cagggggccac  
 1200  
 55      cgcacgcgca cgcagcgcg caccgagcgc ugcaacugca ccuuccacug gugcugccac  
 1260  
 60      gucagcugcc gcaacugcac gcacacgcgc guacugcacg agugucugug aggcgcugcg  
 1320  
 65      cggacucgcc cccaggaaac gcucuccucg agcccucccc caaacagacu cgcuagcacu  
 1380  
 70      caagaccggg uuauucgccc acccgaguac cuccagucac acuccccggg guucauacgc  
 1440  
 75      aucccaucuc ucccacuucc uccuaccugg ggacuccuca aaccacuugc cuggggcgggc  
 1500  
 80      augaaccuc uugccauccu gauggaccug ccccgaccu accuccucc cucucccgcg  
 1560  
 85      gagacccuu guugcacugc cccugcuug gccaggaggu gagagaagga ugggucccu  
 1620  
 90      ccgccauggg gucggcuucc gaugguguca uucugccugc uccaucgcg cagcgaccuc  
 1680  
 95      ucugccucuc uucuucccu uuguccugcg uuuucuccgg guccuccuaa gucccuuccu  
 1740  
 100      auucuccugc caugggugca gaccugaac ccacaccugg gcaucagggc cuuucuccuc  
 1800

# ES 2 341 419 A1

cccaccugua gcugaagcag gagguuacag ggcaaaaggg cagcugugau gauguggaaa  
 1860

5 ugagguuggg ggaaccagca gaaugcccc cauucucca gucucugucg uggagccauu  
 1920

10 gaacagcugu gagccaugcc ucccugggcc accuccuacc ccuuccuguc cugccuccuc  
 1980

aucagugugu aaauaaauug cacugaaacg uggauacaga gccacgaguu uggauguugu  
 2040

15 aaauaaaacu auuuauugug cuggguccca gccugguuug caaagaccac cuccaaccca  
 2100

20 acccaauccc ucuccacucu ucucuccuuu cuccugcag ccuuuucugg ucccucuucu  
 2160

cuccucaguu ucucaaagau gcguuugccu ccuggaauca guauuuccuu ccacuguagc  
 2220

25 uauuagcggc uccucgcccc caccagugua gcaucuuccu cugcagaaua aaucucuaau  
 2280

30 uuuuaucgau gacuuggugg cuuuuccuug aauccagaac acaaccuugu uugugguguc  
 2340

ccuauccuc ccuuuuuacc acucccag  
 2368

35 <210> 3  
 <211> 370  
 <212> PRT  
 40 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

45 Met Gly Leu Trp Ala Leu Leu Pro Gly Trp Val Ser Ala Thr Leu Leu  
 1 5 10 15

50 Leu Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Ala Asn Ser Ser Gly  
 20 25 30

55 Arg Trp Trp Gly Ile Val Asn Val Ala Ser Ser Thr Asn Leu Leu Thr  
 35 40 45

60 Asp Ser Lys Ser Leu Gln Leu Val Leu Glu Pro Ser Leu Gln Leu Leu  
 50 55 60

65 Ser Arg Lys Gln Arg Arg Leu Ile Arg Gln Asn Pro Gly Ile Leu His  
 65 70 75 80

# ES 2 341 419 A1

	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Leu	Gln	Ser	Ala	Val	Arg	Glu	Cys	Lys	Trp	Gln	
					85					90					95		
5																	
	Phe	Arg	Asn	Arg	Arg	Trp	Asn	Cys	Pro	Thr	Ala	Pro	Gly	Pro	His	Leu	
				100					105					110			
10																	
	Phe	Gly	Lys	Ile	Val	Asn	Arg	Gly	Cys	Arg	Glu	Thr	Ala	Phe	Ile	Phe	
			115					120					125				
15																	
	Ala	Ile	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Thr	His	Ser	Val	Ala	Arg	Ser	Cys	Ser	
		130					135					140					
20																	
	Glu	Gly	Ser	Ile	Glu	Ser	Cys	Thr	Cys	Asp	Tyr	Arg	Arg	Arg	Gly	Pro	
	145					150					155					160	
25																	
	Gly	Gly	Pro	Asp	Trp	His	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Asp	Asn	Ile	Asp	Phe	
					165					170					175		
30																	
	Gly	Arg	Leu	Phe	Gly	Arg	Glu	Phe	Val	Asp	Ser	Gly	Glu	Lys	Gly	Arg	
				180					185					190			
35																	
	Asp	Leu	Arg	Phe	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Thr	
			195					200					205				
40																	
	Thr	Val	Phe	Ser	Glu	Met	Arg	Gln	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Met	Ser	
		210					215					220					
45																	
	Gly	Ser	Cys	Thr	Val	Arg	Thr	Cys	Trp	Met	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	
	225					230					235					240	
50																	
	Ala	Val	Gly	Asp	Val	Leu	Arg	Asp	Arg	Phe	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	
					245					250					255		
55																	
	Leu	Tyr	Gly	Asn	Arg	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Arg	Ala	Glu	Leu	Leu	
				260					265					270			
60																	
	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Pro	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Ser	Pro	His	Asp	
			275					280					285				
65																	
	Leu	Val	Tyr	Phe	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Phe	Cys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Arg	
		290					295					300					
65																	
	Leu	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Ser	Ser	Ser	Pro	
	305					310					315					320	

ES 2 341 419 A1

Ala Leu Asp Gly Cys Glu Leu Leu Cys Cys Gly Arg Gly His Arg Thr  
325 330 335

5

Arg Thr Gln Arg Val Thr Glu Arg Cys Asn Cys Thr Phe His Trp Cys  
340 345 350

10

Cys His Val Ser Cys Arg Asn Cys Thr His Thr Arg Val Leu His Glu  
355 360 365

15

Cys Leu  
370

 $\langle 210 \rangle_4$ 

20  $\langle 211 \rangle$  18

<212> DNA

<213> synthetic

25  $\langle 400 \rangle$  4

cacctcctgg ccttctcc

18

30  $\langle 210 \rangle$  5

<211> 18

<212> DNA

35 <213> synthetic

<400> 5

40 ggggcaggta catggtgt

18

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 341 419

⑫ Nº de solicitud: 200802442

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.08.2008

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: G01N 33/68 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 01/54706 A2 (ROTHENPIELER) 02.08.2001. Reivindicaciones 1, 4 y 7.	12,14,15
X	WO 00/61630 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE)19.10.2000.Página 2. Reivindicaciones 1, 4, 9 y 18.	12,14,15
A	BIAO HE ET AL. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. 2004.Neoplasia. Vol.6 (1), páginas 7-14.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.06.2010

Examinador

I.Rueda Molins

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.06.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1 - 13	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	14, 15	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-11,13	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	12, 14, 15	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 01/54706 A2 (ROTHENPIELER).	02-08-2001
D02	WO 00/61630 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE).	19-10-2000

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud de patente, divulga el uso de Wnt-1 como biomarcador en el pronóstico del deterioro de la función renal y/o en el diagnóstico de nefropatías asociadas a dicho deterioro.

El documento D01, revela un método para el tratamiento de desórdenes renales.

El documento D02, divulga un modo de estimular la formación tubular en el riñón.

El documento D03, muestra como un anticuerpo monoclonal anti-Wnt-1 induce apoptosis en células cancerígenas en humanos.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)**

La reivindicación 12 de la solicitud de patente, reivindica un método para la búsqueda de principios activos, para la fabricación o el desarrollo de medicamentos, que comprende un ensayo de unión de dicho principio activo a Wnt-1. En la reivindicación 14, se reivindica el uso de Wnt-1 o de un fragmento del mismo, en la fabricación y/o selección de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una nefropatía. La reivindicación 15, hace referencia concreta a una nefropatía crónica de trasplante. Los documentos D01 (en las reivindicaciones 1, 4 y 7) y D02 (en la página 2 y en las reivindicaciones 1, 4, 9 y 18) revelan un método terapéutico o preventivo, para el tratamiento de desórdenes renales, tales como nefropatías crónicas, consistente en administrar Wnt-1. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 14 y 15 no presentan novedad según lo establecido en el Artículo 6 LP 11/1986. El desarrollo de un método para la búsqueda de principios activos para la fabricación de medicamentos, que comprendiera un ensayo de unión de dicho principio activo a Wnt -1, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia, a partir de la información contenida en el estado de la técnica, por tanto, la reivindicación 12, presenta novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en el Artículo 8 LP 11/1986.