

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 745**

21 Número de solicitud: 201231588

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.10.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.04.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO (50.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa (Bizkaia) ES y
ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI -
OSAKIDETZA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LARRINAGA ENBEITIA, Gorka;
LÓPEZ FERNÁNDEZ DE VILLAVERDE, José
Ignacio;
IRAZUSTA ASTIAZARAN, Jon;
GIL GOIKOURIA, Javier;
CASIS SÁENZ, Luis y
SANZ ECHEVARRÍA, Begoña**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Empleo del receptor de cannabinoides CB1 como marcador de carcinoma renal de células cromóforas (CRCCh) y oncocitoma renal (OR)**

57 Resumen:

Empleo del receptor de cannabinoides CB1 como marcador de carcinoma renal de células cromóforas (CRCCh) y oncocitoma renal (OR).

El receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) puede ser utilizado como marcador de carcinoma renal de células cromóforas (CRCCh) y oncocitoma renal (OR). La invención proporciona un método in vitro para diagnosticar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, que comprende detectar, en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto, la presencia del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), en donde la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicho sujeto padece una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, por ejemplo, CRCCh u OR. De aplicación en medicina, en diagnóstico anatomopatológico.

ES 2 455 745 A1

DESCRIPCIÓN

Empleo del receptor de cannabinoides CB1 como marcador de carcinoma renal de células cromóforas (CRCCH) y oncocitoma renal (OR).

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se relaciona, en general, con el área de las actividades sanitarias y el sector de diagnóstico anatomopatológico. En particular, la invención se relaciona con el diagnóstico de neoplasias renales y, en particular, con el diagnóstico de neoplasias originadas en células intercalares de la nefrona distal, tales como el carcinoma renal de células cromóforas (CRCCh) y el oncocitoma renal (OR), basado en el empleo del receptor de cannabinoides CB1 como marcador.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Aunque la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) vigente de los tumores renales en adultos reconoce una larga serie de tipos histológicos, el 95% de los mismos se encuadran en solo cuatro entidades: carcinoma renal de células claras (CRCC) (70%), carcinoma renal papilar (CRP) (15%), carcinoma renal de células cromóforas (CRCCh) (5%), y oncocitoma renal (OR) (5%). El resto de los tumores renales de la clasificación anteriormente referida son extraordinariamente infrecuentes y no suelen plantear problemas de diagnóstico diferencial. Las dificultades diagnósticas suelen aparecer entre estos grupos de tumores porque no siempre son fácilmente distinguibles entre sí en los estudios histológicos rutinarios (aunque el diagnóstico diferencial del carcinoma papilar normalmente no presenta dificultad desde el punto de vista histológico). Para su correcta identificación se usan técnicas inmunohistoquímicas frente a una larga batería de anticuerpos entre ellos citoqueratinas, claudina 7, claudina 8, vimentina, α -metilacil, coenzima A, racemasa, proteína S100A1, anhidrasa carbónica IX, CD10, CD82, CD117, PAX2, PAX8, TFE3, marcador de células renales, p63, trombosmodulina, E-cadherina, uroplaquina III, cadherina específica renal, proteína S100P y parvalbúmina (Truong LD et al., 2011 Arch Pathol Lab Med 135: 92-109).

La identificación correcta y precisa de estos cuatro tipos histológicos tiene connotaciones clínicas relevantes debido a las diferentes implicaciones pronósticas que conllevan. Esta identificación se realiza en la clínica mediante técnicas histopatológicas, inmunohistoquímicas y, en ocasiones, moleculares.

La histopatología clásica tiene limitaciones diagnósticas claras derivadas de su imposibilidad de ir más allá de la propia morfología y las herramientas moleculares están poco desarrolladas en su vertiente clínica, siendo de poca ayuda ante el dilema diagnóstico rutinario.

La inmunohistoquímica combina morfología y función, detectando proteínas u otras sustancias inmunohistoquímicas siendo una herramienta diagnóstica muy sensible y particularmente rentable debido a su alta fiabilidad y bajo coste; además, su utilización está generalizada en prácticamente todos los laboratorios de Anatomía Patológica del mundo. Asimismo, es una técnica perfectamente estandarizada, totalmente automatizada, y, por tanto, fácilmente reproducible. En la literatura especializada existe un gran número de artículos que intentan establecer un perfil inmunohistoquímico característico para cada uno de los subtipos histológicos de tumores renales más comunes (Zhou, 2005 Clin Lab Med 25: 247-257; Hammerich, 2008 Arch Pathol Lab Med 132: 432-440, Truong 2011 Arch Pathol Lab Med 135: 92-109). Sin embargo, la realidad es que el problema del diagnóstico diferencial dista mucho aún de estar resuelto en esta área concreta y con esta herramienta. Es cierto que determinados anticuerpos caracterizan a determinados tumores, pero también lo es que existen porcentajes significativos de excepciones a la regla. Lo anteriormente comentado hace de la inmunohistoquímica una herramienta muy útil por un lado, pero imperfecta por otro.

La limitación de la inmunohistoquímica como herramienta diagnóstica es bien conocida en el campo de la anatomía patológica oncológica, no sólo en relación con los tumores renales, sino en términos generales. Continuamente se publican nuevos estudios que propugnan la utilización de nuevos y prometedores anticuerpos.

El diagnóstico diferencial de las neoplasias renales es importante para un correcto tratamiento, sin embargo, no existe en la actualidad un método fácil y fiable que permita identificar una neoplasia renal concreta con seguridad.

Por tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de desarrollar un método para identificar y diferenciar, de forma sencilla y fiable, neoplasias renales, y, en particular, identificar y diferenciar de forma sencilla y fiable entre (i) las neoplasias renales originadas en células intercalares de la nefrona distal, tales como, entre las que se encuentran el carcinoma renal de células cromóforas (CRCCh) y el oncocitoma renal (OR) y (ii) las neoplasias renales que no son neoplasias originadas en células intercalares de la nefrona distal, tales como el carcinoma renal de células claras (CRCC) y el carcinoma renal papilar (CRP).

55

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal que comprende detectar en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto la presencia del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), en

- 5 - la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicho sujeto padece una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; o en donde
- la no detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que padece una neoplasia renal es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, que comprende detectar en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto la presencia de CB1, en donde

- la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; o en donde
- 15 - la no detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de CB1 como marcador de una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de CB1 como marcador para el diagnostico diferencial entre una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal y carcinoma renal de células claras (CRCC).

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo que reconoce el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) para identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, o para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que la padece es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende un anticuerpo que reconoce al receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), para identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, o para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que la padece es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Figura 1. Detalle microscópico de gran aumento de los ductos colectores renales (A), CRCCCh (C) y OR (E) mostrando su típica histología en cortes histológicos teñidos con hematoxilinaeosina (aumentos originales, x400) y su respectivo patrón de tinción inmunohistoquímica con CB1 de forma selectiva en las células intercalares del ducto colector (B) y de forma difusa en el CRCCCh (D) y en el OR (F) [aumentos originales, x400].

35 Figura 2. Fotografía inmunohistoquímica de una muestra que contiene carcinoma renal de células claras (CRCC), en donde se observa inmunotinción negativa para CB1 en CRCC (parte derecha), y tejido renal normal - nótese que el tejido renal normal (no tumoral) que rodea al CRCC muestra una inmunorreacción positiva en los túbulos proximales (parte izquierda). La tinción se realizó mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 1 [nº de aumentos: x100].

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

40 Definiciones

Un “carcinoma renal de células cromófobas” o “CRCCCh”, tal como aquí se define, es un carcinoma renal que cumple las siguientes características: tumor sólido de borde expansivo, a menudo con cápsula fibrosa, de color marrón oscuro, sin necrosis o hemorragias aparentes, con propensión a afectar la médula renal, compuesto por células de aspecto "vegetal", con membranas citoplásmicas nítidas y citoplasmas reticulados eosinófilicos, y núcleos cromáticos, con binucleación frecuente, halo perinuclear claro y escasas mitosis.

El término “diagnosticar” o “diagnóstico”, tal como aquí se usa se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto padece una determinada patología (en este caso, una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal). Como entenderán los expertos en la materia, tal evaluación puede no ser correcta para el 100% de los sujetos a diagnosticar, aunque se prefiere que lo sea. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos como que padece dicha patología (en este caso, una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal). El experto en la materia puede determinar si

una parte es estadísticamente significativa usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Pueden encontrarse información y detalles sobre dichas herramientas en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,001 o inferior.

La expresión “neoplasia originada en las células intercalares de la nefrona distal”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier alteración de los tejidos que produzca un aumento del volumen producido por un aumento en el número de células intercalares de la nefrona distal independientemente de que sean de carácter benigno o maligno. La nefrona distal consta del túbulo contorneado distal, el túbulo colector también denominado túbulo conector y el conducto colector. Las células intercalares son las encargadas de la secreción de protones (H^+) y reabsorción de bicarbonato (HCO_3^-). Las células intercalares tienen varias vesículas apicales, micropliegues sobre su plasmalema apical y abundancia de mitocondrias, y sus núcleos son redondos de localización central. Ejemplos ilustrativos de tumores de la nefrona distal incluyen el carcinoma renal de células cromóforas (CRCC) y el oncocitoma renal (OR).

Un “oncocitoma renal”, tal como aquí se define, es un tumor benigno derivado de las células del túbulo renal distal. El oncocitoma renal es un tumor bien circunscrito pero no encapsulado, normalmente de color marrón oscuro, que puede mostrar una cicatriz fibrosa central, así como focos de hemorragia y/o cambios quísticos. Histológicamente, el tumor está constituido por células poliédricas de pequeño tamaño, con citoplasmas eosinofílicos granulares y núcleos centrales cromáticos de contorno regular. Las células se disponen formando nidos sólidos pequeños de aspecto «organóide» en un estroma variablemente hialinizado o mixoide. Además de este patrón de crecimiento clásico, pueden observarse áreas quísticas, túbulo-quísticas, pseudo-glandulares, o sólidas. En las zonas con fibrosis estromal, o en vecindad de la cicatriz central si es que la hay, las células pueden mostrar un cierto aclaramiento del citoplasma haciéndolas en parte semejantes a las células del carcinoma renal de células claras. De manera dispersa pueden observarse, de forma suelta o en pequeños grupos, células de talla pequeña, con alta relación núcleo/citoplasma y núcleo hiper cromático denominadas por algunos autores “oncoblastos”. La tinción del hierro coloidal es típicamente negativa.

El término “receptor de cannabinoides de tipo 1” o “CB1”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un receptor de cannabinoides perteneciente a la superfamilia de receptores de cannabinoides acoplados a proteína G, caracterizados por tener 7 dominios transmembrana capaces de regular proteínas G monoméricas tales como Rap1 y Rho, o tirosina quinasas citosólicas tal como Src. Aunque existen al menos 5 receptores cannabinoides distintos, los 2 más extendidos son el CB1 y el receptor de cannabinoides de tipo 2 (CB2). La secuencia aminoacídica de CB1 (proteína), cuyo número de acceso en la base de datos NCBI de la variante humana es NP_001153698.1 (versión del 26 de junio de 2012) se muestra en la SEQ ID NO: 1:

```

1      mksildglad tfrtittld lyvgsndiqy edikgdmask lgyfpqkfpf tsfrgspfqe
61     kmtagdnppq lvpdqvnite fynkslssfk eneeniqcge nfmndiecfmv lnpsqqqlaia
121    vlstltgtft vlenllvcv ilhsrslrcr psyhfigsla vadllgsvif vysfidfhvf
181    hrkdsrnvfl fklggvtasf tasvgsifft aidryisihr playkrivtr pkavvafclm
241    wtiaivavl pllgwncekl qsvcsdifph idetylmfwi gvtsvllfi vyaymyilwk
301    ahshavrmq rgtqksiih tsedgkvqvt rpdqarmdir laktvlilv vliicwgpil
361    aimvydvfgk mnkiktva fcsmlcllns tvnpiiyalr skdlrhafrs mfpscegtaq
421    pldnsmgdsd clkhannaa svhraesci kstvkiaqvt msvstdtsae al

```

CB1 es un péptido de 472 aminoácidos que se localiza en el sistema nervioso central, principalmente en el cerebro, en el bazo y las amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosos simpáticos. Mediante diversos mecanismos de señalización participa en el control de la funcionalidad neuronal por cannabinoides, incluyendo la transmisión sináptica, la supervivencia, o la diferenciación y migración celular. CB1 es activado por numerosos componentes, tales como neurotransmisores endocannabinoides [e.g., anandamida y 2-araquidonoil glicérido (2-AG)], fitocannabinoides [e.g., tetrahidrocannabinol (THC)], y cannabinoides sintéticos [e.g., dronabinol]. CB1 tiene numerosas implicaciones, por ejemplo, en analgesia, disminución de ansiedad, e incremento de la lipogénesis y del apetito, entre otras. Su activación es responsable de los efectos psicoactivos del consumo de THC, principio activo de la planta de *Cannabis* y de la resina de hachís. El término “CB1”, tal y como se usa en la presente descripción, no se refiere únicamente a la proteína CB1 humana sino también a los ortólogos de otras especies.

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

Métodos de la invención

5 Los inventores han observado que el receptor de cannabinoide de tipo 1 (CB1) puede ser utilizado como un marcador de neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; en concreto, se ha observado que dicho receptor (CB1) permite identificar, mediante métodos inmunohitoquímicos, el carcinoma renal de células cromóforas (CRCC) y el oncocitoma renal (OR) frente a otros tumores renales más frecuentes y agresivos tales como, por ejemplo, el carcinoma renal de células claras (CRCC), por lo que dicho marcador
10 (CB1) permite establecer un diagnóstico diferencial entre las neoplasias renales originadas en células intercalares de la nefrona distal (CRCC y OR) que son CB1+ y el CRCC (CB1-), que es el cáncer renal más frecuente (70%). En el Ejemplo 1 se muestra, inequívocamente, la presencia de CB1 en neoplasias renales originadas en células intercalares de la nefrona distal tales como CRCC y OR pero no en otros tumores renales más frecuentes y agresivos como el CRCC. Por consiguiente, el empleo de CB1 como marcador de CRCC y OR contribuye a facilitar el diagnóstico diferencial de esta área de la Anatomía Patológica.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, en adelante “primer método de la invención”, que comprende detectar, en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto, la presencia del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), en donde

- 20 - la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicho sujeto padece una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; o en donde
- la no detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal.

25 El primer método de la invención comprende esencialmente los pasos mencionados anteriormente aunque también puede incluir pasos adicionales, y se lleva a cabo *in vitro*, es decir, no se practica en el cuerpo humano o del animal.

30 Para la puesta en práctica del primer método de la invención, se obtiene una muestra de la neoplasia renal del sujeto bajo estudio. En una realización particular, dicha muestra comprende tejido tumoral o células tumorales de la neoplasia renal de dicho sujeto cuyo origen o naturaleza se desea conocer. Dicha muestra puede obtenerse por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante biopsia, cistoscopia, resección quirúrgica, etc., utilizando métodos bien conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la muestra de neoplasia renal se obtiene mediante biopsia. A modo ilustrativo, la biopsia de neoplasia renal puede llevarse a cabo mediante la extracción de un fragmento o trozo de tejido tumoral con una aguja tras su localización mediante ecografía u otra técnica de imagen radiológica y la administración de anestesia local. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina, o, alternativamente, se pueden congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, por ejemplo, Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura), mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

40 La presencia de CB1 en la muestra a analizar puede ser detectada mediante cualquier método convencional que permita detectar la presencia de una proteína, en concreto CB1, en una muestra, en particular, en una muestra de tejido. Prácticamente cualquier método convencional para la detección de la presencia de una proteína en una muestra de tejido puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar la presencia de CB1. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos métodos incluyen métodos basados en el empleo de anticuerpos, técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligandos, etc.

45 En una realización particular, la detección de la presencia de CB1 se realiza mediante un inmunoensayo basado en la formación de un complejo de tipo antígeno-anticuerpo, mediante el empleo de uno (o más anticuerpos) que reconocen uno (o más) epítomos de CB1, y posterior visualización de los complejos formados por cualquier técnica apropiada, incluyendo tanto técnicas radiactivas como no radiactivas tales como, por ejemplo, técnicas colorimétricas, fluorimétricas, luminiscentes (e.g., bioluminiscentes, quimioluminiscentes, etc.), etc., utilizando para ello, en su caso, unos anticuerpos secundarios marcados con los marcadores apropiados.

50 Los anticuerpos a utilizar para la puesta en práctica de esta realización particular del primer método de la invención son anticuerpos frente a CB1, o frente a un fragmento antigénico de CB1, es decir, anticuerpos que reconocen un epítomo de CB1. Los anticuerpos que pueden utilizarse en este tipo de ensayos pueden ser sueros policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv (“single chain Fv”), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos humanizados, etc. capaces de reconocer y unirse a CB1, o a un fragmento antigénico de la misma. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de anticuerpos útiles para la puesta en práctica de la presente invención que reconocen la proteína CB1 humana incluyen el anticuerpo policlonal identificado como PA1-743 (ABR Affinity BioReagents, Estados Unidos), el anticuerpo

- 5 policlonal identificado con el nº de catálogo 216401 (Calbiochem), el anticuerpo monoclonal identificado con el nº de catálogo 101500 (Cayman Chemical), el anticuerpo policlonal identificado con el nº de catálogo sc-10066 (Santa Cruz) y el anticuerpo policlonal identificado con el nº de catálogo C1233 (Sigma). Los anticuerpos que reconocen a CB1 pueden estar, opcionalmente, conjugados a un portador; asimismo, dichos anticuerpos que reconocen a la proteína CB1 pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores que pueden ser utilizados incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc.
- 10 Existen una amplia variedad de ensayos bien conocidos por los técnicos en la materia que se pueden usar para la puesta en práctica de esta realización particular del primer método de la invención, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) que reconocen a CB1 y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); entre estas técnicas se incluyen Western-blot o inmunotransferencia, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA (inmunoensayo enzimático) competitivo, DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), ensayos inmunohistoquímicos, ensayos inmunofluorescentes, ensayos de inmunoprecipitación, etc.
- 15 En una realización preferida, la detección de la presencia de CB1 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica o "IHC" (del inglés, "immunohistochemistry"). En general, la IHC es un procedimiento histopatológico conocido que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, normalmente marcado con un marcador (por ejemplo, una enzima), que puede transformar un sustrato en un compuesto visible sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno (CB1 en este caso), aplicado a una muestra de tejido orgánico. Con la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa, antiperoxidasa, fluoresceína, etc.), el complejo antígeno-anticuerpo formado puede localizarse e identificarse en las muestras tisulares o citológicas a estudiar, con lo que se identifican los marcadores antigénicos característicos de distintas células y se puede determinar el tipo de célula involucrado en la muestra.
- 20 La muestra que comprende tejido de neoplasia renal a analizar con el fin de detectar la presencia de CB1 mediante IHC (o análisis inmunohistoquímico) puede ser una muestra fresca, una muestra congelada o una muestra embebida en parafina y fijada usando un agente protector del tipo de formalina o similar. En una realización particular, el análisis inmunohistoquímico se lleva a cabo tiñendo la muestra a analizar con un anticuerpo específico frente a CB1 y determinando la frecuencia de células que se han teñido y la intensidad de la tinción. Ventajosamente, la detección mediante IHC de la presencia de CB1 en la muestra a analizar se lleva a cabo en paralelo con muestras tisulares o citológicas que sirven como marcador positivo y como marcador negativo, y, si se desea, como referencia, se pueden usar tejidos sanos del mismo origen que el tumor que se está analizando. También es frecuente usar un control de fondo. Típicamente, se asigna a la muestra un valor indicativo de la expresión total que se calcula en función de la frecuencia de células teñidas y de la intensidad en cada una de las células teñidas. Los criterios típicos para asignar valores de expresión a las muestras han sido descritos en, por ejemplo, Handbook of Immunohistochemistry and In Situ Hybridization in Human Carcinomas, M. Hayat Ed., 2004, Academic Press.
- 25 La detección de la presencia de CB1 mediante IHC presenta diversas ventajas ya que se utiliza de forma generalizada en los Laboratorios de Anatomía Patológica, lo que posibilita la aplicabilidad inmediata del primer método de la invención mediante dicha técnica, y, además, se encuentra muy automatizada, lo que facilita que se realice bajo las mismas condiciones.
- 30 A partir de la detección de la presencia de CB1 en una muestra de neoplasia renal que comprende tejido tumoral, es posible relacionar la detección de la presencia (o ausencia) de CB1 con el origen o naturaleza de la neoplasia renal que padece el sujeto.
- 35 Así, en una etapa posterior, el primer método de la invención implica correlacionar la detección de la presencia (o ausencia) del CB1 con un diagnóstico sobre la naturaleza de la neoplasia renal que padece el sujeto bajo estudio. Esta correlación puede indicar que dicha neoplasia renal es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, por ejemplo, OR o CRCCh, cuando se detecta la presencia de CB1 en la muestra de neoplasia renal analizada; por tanto, en este caso, el sujeto bajo estudio padece una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, por ejemplo, OR o CRCCh. Alternativamente, esa correlación puede indicar que dicha neoplasia renal no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, cuando no se detecta la presencia de CB1 en la muestra de neoplasia renal analizada; en este caso, el sujeto bajo estudio padece una neoplasia renal que no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, por ejemplo, OR o CRCCh, sino una neoplasia renal de otro origen, por ejemplo, carcinoma renal de células claras (CRCC) o carcinoma renal papilar (CRP). Por tanto, la información proporcionada por el primer método de la invención puede ser utilizada eficientemente por el especialista para seleccionar la terapia a administrar al sujeto más apropiada en función del tipo de neoplasia renal que padece, optimizando de este modo la atención terapéutica a aplicar al sujeto y evitando los inconvenientes asociados con la aplicación de un tratamiento inapropiado.
- 40 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "detección de la presencia de CB1", o similar, se refiere a la capacidad de detectar CB1 en la muestra analizada utilizando alguno de los métodos a los que se ha hecho
- 45
- 50
- 55
- 60

referencia previamente. Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “no detección de la presencia de CB1”, o similar, se refiere a la incapacidad de detectar CB1 en la muestra analizada utilizando alguno de los métodos a los que se ha hecho referencia previamente.

5 En una realización particular, el método utilizado para detectar la presencia de CB1 comprende un inmunoensayo. En una realización más particular, dicho método comprende someter la muestra que comprende tejido de la neoplasia renal a analizar a un análisis inmunohistoquímico que comprende poner en contacto dicha muestra, previamente acondicionada, con un anticuerpo primario frente a CB1, tal como, por ejemplo, el anticuerpo policlonal PA1-743 (ABR Affinity BioReagents), a una dilución 1:1000, peróxido de hidrógeno y diaminobencidina (DAB), y contratinción con hematoxilina. En general, antes de poner la muestra en contacto con el anticuerpo frente a CB1 la muestra es acondicionada apropiadamente; para ello, la muestra puede ser sometida, en caso necesario, a un tratamiento que comprende fijar el tejido, obtener cortes de espesor adecuado, recuperar el antígeno, bloquear moléculas que puedan interferir en la reacción indirecta (por ejemplo, mediante tratamiento con reactivo bloqueante de peroxidasa), evitar uniones inespecíficas, incubar con reactivo bloqueante de avidina e incubar con reactivo bloqueante de biotina, todo ello acompañado, en su caso, de los correspondientes lavados. De este modo, determinando la frecuencia de células que se han teñido y la intensidad de la tinción es posible establecer si se detecta (o no) la presencia de CB1 en la muestra analizada. Ventajosamente, la detección de la presencia de CB1 se lleva a cabo en paralelo con muestras tisulares o citológicas que sirven como marcador positivo y como marcador negativo, y, si se desea, como referencia, se pueden usar tejidos sanos del mismo origen que el tumor que se está analizando, así como un control de fondo. Típicamente, se asigna a la muestra un valor indicativo de la expresión total que se calcula en función de la frecuencia de células teñidas y de la intensidad en cada una de las células teñidas.

En el Ejemplo 1 se describe de forma detallada un protocolo de un análisis inmunohistoquímico que permite la detección de la presencia de CB1 en muestras que comprenden tejido de neoplasia renal. La detección de la presencia de CB1 en tales muestras según el protocolo descrito en el Ejemplo 1 es indicativa de que dicha neoplasia renal es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, por ejemplo, OR o CRCh; por el contrario, la no detección de la presencia de CB1 en la muestra de neoplasia renal analizada según dicho protocolo descrito en el Ejemplo 1 es indicativa de que dicha neoplasia renal no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal sino que es una neoplasia renal de otro origen o naturaleza, por ejemplo, CRCC o CRP.

Por tanto, el primer método de la invención permite identificar si el sujeto bajo estudio padece una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, tal como CRCh u OR, o si, por el contrario, la neoplasia renal que padece no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal, por ejemplo CRCC. Efectivamente, el CB1 puede ser utilizado como marcador diferencial entre carcinomas renales que morfológicamente son similares, tales como el CRCh (CB1+) y el CRCC (CB1-), lo cual es muy importante porque el CRCC representa el 70% de los carcinomas renales.

La identificación correcta y precisa del tipo de neoplasia renal posibilita la aplicación al sujeto del tratamiento terapéutico apropiado según se trate de un tumor maligno o benigno.

Relacionado con este aspecto inventivo, el experto en la materia entenderá que la invención también proporciona un método *in vitro* para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que padece una neoplasia renal es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, en adelante “segundo método de la invención”, que comprende detectar en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto la presencia de CB1, en donde

- la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; o en donde
- la no detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal.

Dicho segundo método de la invención constituye, por tanto, un aspecto inventivo adicional de esta invención.

Las características de la muestra, sujeto, CB1 y forma de detectar la presencia de CB1 en la muestra del sujeto bajo estudio ya han sido mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

50 Usos de la invención

Los inventores de la presente invención han demostrado que CB1 puede ser identificado en neoplasias renales originadas en células intercalares de la nefrona distal, tales como CRCh y OR pero no en otros carcinomas renales tales como, por ejemplo, CRCC, el tipo de carcinoma renal más frecuente (70% aproximadamente) y agresivo; es decir, CB1 puede ser utilizado como marcador para el diagnóstico diferencial entre CRCC, CB1 negativo (CB1-), y tumores de la nefrona distal CB1 positivos (CB1+) tales como CRCh y OR.

5 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) como marcador de una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal. En una realización particular, dicha neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal se selecciona entre CRCCh y OR. En otra realización particular, dicho CB1 es identificado en una muestra que comprende tejido o células tumorales procedentes de una neoplasia renal mediante un análisis inmunohistoquímico.

10 Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) como marcador para el diagnóstico diferencial entre una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal y carcinoma renal de células claras (CRCC). En una realización particular, dicha neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal se selecciona entre CRCCh y OR. En otra realización particular, dicho diagnóstico diferencial comprende la realización de un análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia de CB1 en una muestra de neoplasia renal.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo que reconoce la proteína receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), para identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, o para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que la padece es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal. Dicho anticuerpo que reconoce la proteína CB1 puede ser utilizado en cualquier método convencional que permita detectar la presencia de CB1 en una muestra, tal como cualquiera de los inmunoensayos mencionados previamente en relación con el método de la invención. En una realización particular, dicho inmunoensayo es un análisis inmunohistoquímico.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende un anticuerpo que reconoce la proteína receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) para identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, o para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que la padece es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.

25 El término “kit”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un producto que contiene los distintos reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Materiales adecuados para el empaquetado de los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones. En una realización particular, dicho kit comprende los reactivos necesarios para realizar un inmunoensayo, preferentemente, un análisis inmunohistoquímico, para detectar la presencia de CB1; para ello, dicho kit incluirá un anticuerpo que reconoce a CB1.

35 La invención se ilustra a continuación en base al siguiente ejemplo, que se proporciona a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Identificación de CB1 en neoplasias originadas en células intercalares de la nefrona distal

Materiales y Métodos

40 Para la realización de este ensayo se utilizó un análisis inmunohistoquímico ya que esa técnica es la usada de forma generalizada en los Laboratorios de Anatomía Patológica y posibilita su aplicabilidad inmediata.

45 Como sustrato se utilizaron fragmentos de tejido renal humano procedente de tumores renales, en concreto, piezas renales extirpadas a pacientes con los tipos mayoritarios de carcinomas renales (CRCC y CRCCh) o con OR. Dichas muestras fueron enviadas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Cruces con fines diagnósticos.

50 El proceso de fijación del tejido tiene como objetivo aumentar la consistencia de un tejido mediante la desnaturalización de sus proteínas e impedir la difusión de las moléculas que se pretenden detectar. Las muestras objeto de estudio se fijaron con formol tamponado al 10% (v/v) durante 24-48 h. Posteriormente se realizó el tallado de la pieza, obteniéndose una muestra representativa. Antes de la inclusión en parafina se llevó a cabo la deshidratación del tejido, mediante 2 baños de etanol al 96%, 2 baños de etanol al 100% y 2 baños de xileno, cada uno de ellos de 1 h de duración. Finalmente, el tejido se incluyó en parafina líquida durante 2 h a una temperatura de 58-62°C, lo que posibilitaba el almacenamiento de las muestras a temperatura ambiente hasta su procesamiento posterior.

55 De los bloques anteriormente mencionados, se obtuvieron, mediante un microtomo (HM 340 E, Microm), cortes de 5 micrómetros (µm) de espesor que se colocaron en un baño de flotación con agua destilada a 50°C con el objetivo de conseguir el estiramiento óptimo de los mismos. A continuación, los cortes se recogieron sobre unos

portaobjetos polilisinados convenientemente etiquetados y se fijaron en una estufa (Memmert) durante 1 h a 60°C.

Para el desparafinado y la hidratación del tejido se realizaron 3 baños de xileno de 5 min cada uno, y, a continuación, 2 baños de alcohol al 100%, 2 baños de alcohol al 95% y 1 baño de agua destilada, cada baño de 1-2 min de duración. Los portaobjetos se mantuvieron en este último baño de agua destilada hasta el paso siguiente.

Tras el desparafinado e hidratación de la muestra, se procedió a la recuperación antigénica. Para ello, los portaobjetos se introdujeron en una cubeta con Tris-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y la cubeta se introdujo en una cámara de presión (Decloaking Chamber, Biocare Medical) con un programa en 2 pasos. En primer lugar, la temperatura fue subiendo hasta alcanzar 125°C, temperatura que se mantuvo durante 10 min, y, a continuación, se disminuyó la temperatura a 90°C, durante 10 s. Pasado este tiempo, los portaobjetos se dejaron enfriar a temperatura ambiente (20-22°C) durante 10 min.

La inmunotinción se realizó de manera automatizada en un autoteñidor Autostainer Plus (Dako) utilizando un sistema de visualización EnVision™ FLEX (Dako). Tras lavar los portaobjetos con PBS (tampón fosfato salino) se cubrió la muestra con un reactivo bloqueador de peroxidasa (Biocare Medical, Concorde, EEUU) durante 15 min, con el fin de bloquear moléculas del tejido que pudieran interferir en la reacción indirecta. A continuación, las muestras se lavaron con PBS y, posteriormente, con el reactivo bloqueador Background Sniper (Biocare Medical, Concorde, EEUU) durante 10 min, para evitar uniones inespecíficas; finalmente, los portaobjetos se lavaron de nuevo con PBS, se cubrieron con el reactivo bloqueante de avidina del kit Avidin-Biotin Blocking (Biocare Medical, Concorde, EEUU), se incubaron durante 10 minutos, y, tras otro lavado con PBS, se cubrieron con reactivo bloqueante de biotina del kit Avidin-Biotin Blocking (Biocare Medical, Concorde, EEUU), y se volvieron a incubar durante 10 minutos. Tras 3 lavados con PBS, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti-CB1 (ABR Affinity BioReagents, ref.: PA1-743, dilución 1:1000), cubriendo bien las secciones de tejido, durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron los portaobjetos en PBS durante 5 min y se aplicó el sistema de visualización EnVision™ FLEX (Dako), que comprende una solución de peróxido de hidrógeno, durante 20 min. Pasado ese tiempo se lavaron las secciones en PBS durante 5 min. Tras un lavado en PBS durante 5 min, se aplicó el sustrato diaminobencidina (DAB) (Biocare Medical, Concorde, EEUU) y se dejó incubar durante 5 min. Tras 2 lavados, el primero con PBS y el segundo con agua destilada, se realizó el contraste del tejido con un preparado de hematoxilina durante 5 min.

A continuación, se lavó el tejido con PBS y se procedió a su deshidratación gradual a través de alcoholes al 70, 80, 95 y 100%, durante 1 min cada uno. Finalmente, las secciones se bañaron en xileno, donde se mantuvieron hasta el siguiente paso.

Por último, los portaobjetos se secaron por su parte posterior, donde no se encontraba el tejido, manteniendo la humedad del tejido con xileno residual y se les aplicó unas gotas de medio de montaje Eukit (Labolan, Esparza del Galar, Navarra, España) directamente en la zona de tejido. Se colocó el cubreobjetos suavemente y se empujaron hacia afuera las burbujas que se formaron. Los controles positivo y negativo de inmunotinción de CB1 se realizaron de manera interna en el parénquima renal adyacente, el cual tiene un patrón de distribución de este receptor totalmente específico ya descrito por este grupo en artículos previamente publicados (Larrinaga G et al., Expression of cannabinoid receptors in human kidney. *Histol Histopathol.* 2010, 25(9):1133-8; Larrinaga G et al., Cannabinoid CB₁ receptor is downregulated in clear cell renal cell carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2010, 58(12):1129-34).

Resultados

Este proceso se realizó con un número significativo (n=20) de muestras de todos los tipos histológicos mayores de carcinomas renales (CRCC y CRCCh) y de OR para determinar si CB1 se expresaba en ellos o no, y si lo hacía en cuáles y de qué manera.

Tal y como se observa en la Figura 1, la tinción de CB1 era citoplásmica intensa en las células proliferantes de todos (100%) los CRCCh y OR testados. El riñón normal o sano (no-tumoral) expresa CB1 en todo el sistema tubular, con especial intensidad en las células intercalares de la nefrona distal, lugar de origen propuesto para los tumores CRCCh y OR, mientras que en las condiciones ensayadas no se detecta la presencia de CB1 en glomérulo (esas partes del riñón normal podrán servir, por tanto, como control negativo).

No se observó inmunotinción de CB1 en las células proliferantes de ninguno (0%) de los CRCC ensayados. La Figura 2 (Larrinaga G et al., Cannabinoid CB₁ receptor is downregulated in clear cell renal cell carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2010, 58(12):1129-34) pone de manifiesto la inmunotinción negativa para CB1 en CRCC (parte derecha); en dicha figura puede observarse que el tejido renal normal (no tumoral) que rodea al CRCC muestra una inmunorreacción positiva en los túbulos proximales (parte izquierda).

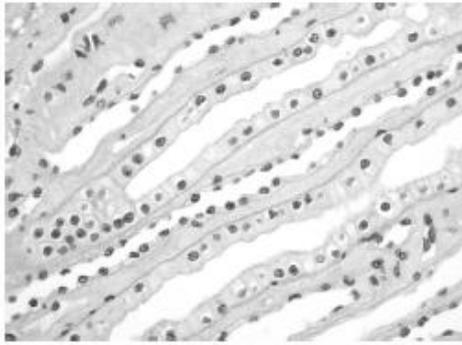
Los resultados obtenidos permiten concluir que:

5

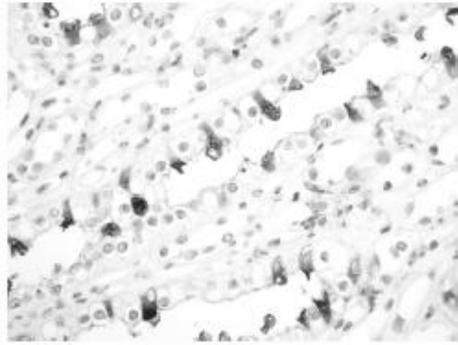
- CB1 es identificado por métodos inmunohistoquímicos en neoplasias renales originadas en células intercalares de la nefrona distal, tales como CRCCh y OR, pero no es identificado en CRCC, el tipo de carcinoma real más frecuente (70% aproximadamente) y agresivo;
- CB1 puede ser utilizado como marcador de neoplasias renales originadas en células intercalares de la nefrona distal, tales como CRCCh y OR; y
- CB1 puede ser utilizado como marcador para el diagnóstico diferencial entre CRCC (CB1-) y los tumores de la nefrona distal CRCCh y OR (CB1+).

REIVINDICACIONES

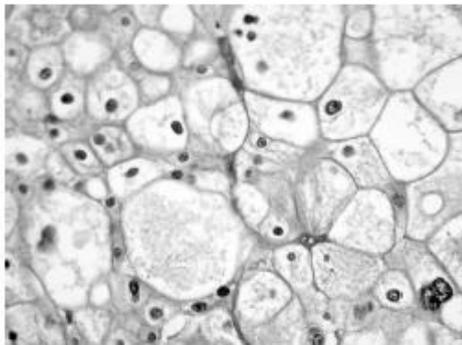
1. Un método *in vitro* para diagnosticar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, que comprende detectar, en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto, la presencia del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), en donde
 - 5 - la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicho sujeto padece una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; o en donde
 - la no detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal.
- 10 2. Un método *in vitro* para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que padece una neoplasia renal es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, que comprende detectar en una muestra de dicha neoplasia de dicho sujeto la presencia de CB1, en donde
 - la detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal; o en donde
 - 15 - la no detección de la presencia de CB1 en dicha muestra es indicativa de que dicha neoplasia no es una neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que dicha neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal se selecciona entre carcinoma renal de células cromóforas (CRCC) y oncocitoma renal (OR).
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra de neoplasia renal es una muestra obtenida mediante biopsia o resección quirúrgica.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección de la presencia de CB1 se lleva a cabo mediante un inmunoensayo.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la detección de la presencia de CB1 se lleva a cabo mediante un análisis inmunohistoquímico.
- 25 7. Uso del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) como marcador de una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que dicha neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal se selecciona entre carcinoma renal de células cromóforas (CRCC) y oncocitoma renal (OR).
- 30 9. Uso del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) como marcador para el diagnóstico diferencial entre una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal y carcinoma renal de células claras (CRCC).
10. Uso según la reivindicación 9, en el que dicha neoplasia renal originada en células intercalares de la nefrona distal se selecciona entre carcinoma renal de células cromóforas (CRCC) y oncocitoma renal (OR).
- 35 11. Uso según la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho diagnóstico diferencial comprende la realización de un análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia de CB1 en una muestra de neoplasia renal.
12. Uso de un anticuerpo que reconoce el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) para identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, o para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que la padece es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.
- 40 13. Uso de un kit que comprende un anticuerpo que reconoce al receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), para identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, o para identificar si una neoplasia renal en un sujeto que la padece es una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal.
- 45



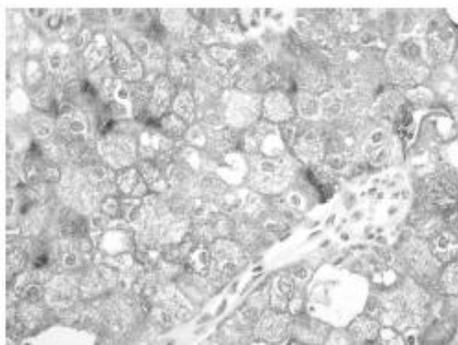
(A)



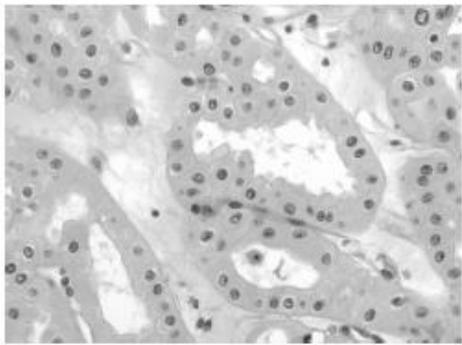
(B)



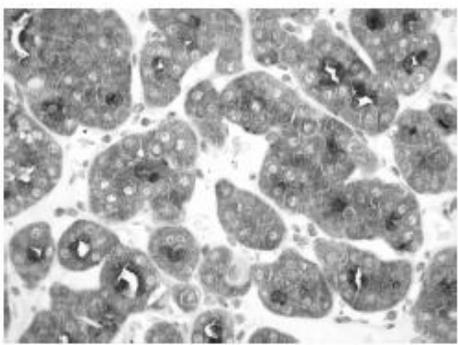
(C)



(D)



(E)



(F)

FIG. 1

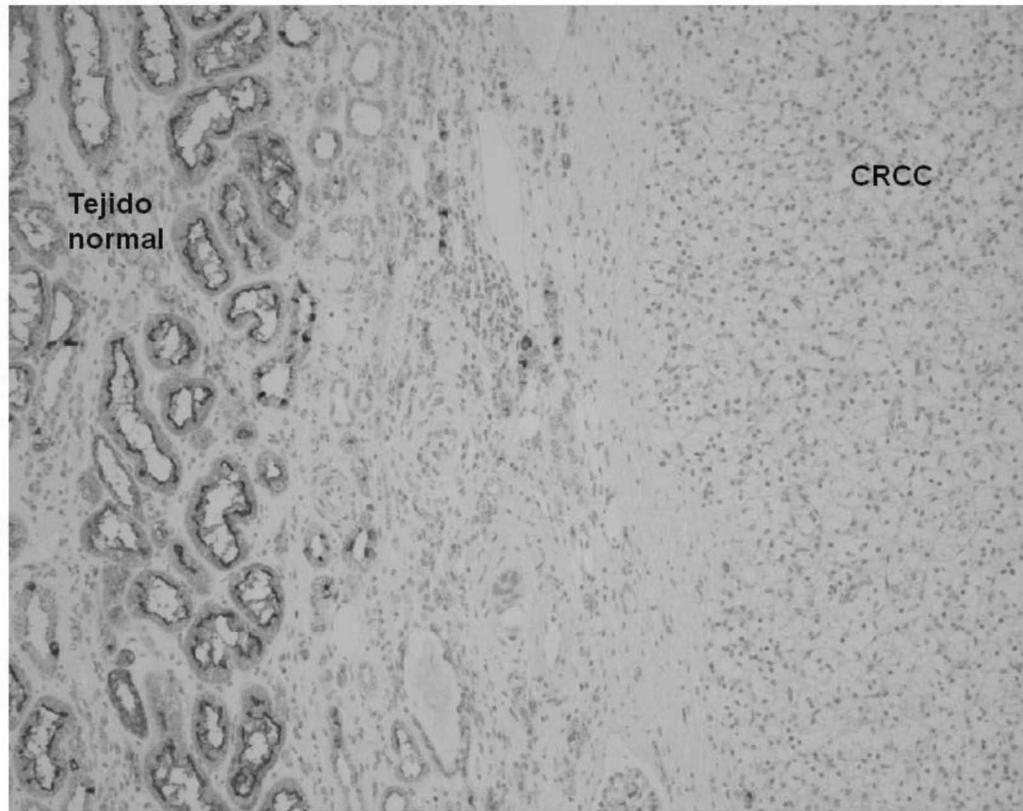


FIG. 2

ES 2 455 745 A1

Lista de secuencias

<110> UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO
ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI
- OSAKIDETZA

<120> EMPLEO DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES CB1 COMO MARCADOR DE
CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CROMÓFOBAS (CRCCh) Y ONCOCITOMA
RENAL (OR)

<130> P7811ES00

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Ser Ile Leu Asp Gly Leu Ala Asp Thr Thr Phe Arg Thr Ile
1 5 10 15

Thr Thr Asp Leu Leu Tyr Val Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Glu Asp
20 25 30

Ile Lys Gly Asp Met Ala Ser Lys Leu Gly Tyr Phe Pro Gln Lys Phe
35 40 45

Pro Leu Thr Ser Phe Arg Gly Ser Pro Phe Gln Glu Lys Met Thr Ala
50 55 60

Gly Asp Asn Pro Gln Leu Val Pro Ala Asp Gln Val Asn Ile Thr Glu
65 70 75 80

Phe Tyr Asn Lys Ser Leu Ser Ser Phe Lys Glu Asn Glu Glu Asn Ile
85 90 95

Gln Cys Gly Glu Asn Phe Met Asp Ile Glu Cys Phe Met Val Leu Asn
100 105 110

Pro Ser Gln Gln Leu Ala Ile Ala Val Leu Ser Leu Thr Leu Gly Thr
115 120 125

Phe Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Cys Val Ile Leu His Ser
130 135 140

Arg Ser Leu Arg Cys Arg Pro Ser Tyr His Phe Ile Gly Ser Leu Ala
145 150 155 160

ES 2 455 745 A1

Val Ala Asp Leu Leu Gly Ser Val Ile Phe Val Tyr Ser Phe Ile Asp
 165 170 175

Phe His Val Phe His Arg Lys Asp Ser Arg Asn Val Phe Leu Phe Lys
 180 185 190

Leu Gly Gly Val Thr Ala Ser Phe Thr Ala Ser Val Gly Ser Leu Phe
 195 200 205

Leu Thr Ala Ile Asp Arg Tyr Ile Ser Ile His Arg Pro Leu Ala Tyr
 210 215 220

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

Trp Thr Ile Ala Ile Val Ile Ala Val Leu Pro Leu Leu Gly Trp Asn
 245 250 255

Cys Glu Lys Leu Gln Ser Val Cys Ser Asp Ile Phe Pro His Ile Asp
 260 265 270

Glu Thr Tyr Leu Met Phe Trp Ile Gly Val Thr Ser Val Leu Leu Leu
 275 280 285

Phe Ile Val Tyr Ala Tyr Met Tyr Ile Leu Trp Lys Ala His Ser His
 290 295 300

Ala Val Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile Ile Ile His
 305 310 315 320

Thr Ser Glu Asp Gly Lys Val Gln Val Thr Arg Pro Asp Gln Ala Arg
 325 330 335

Met Asp Ile Arg Leu Ala Lys Thr Leu Val Leu Ile Leu Val Val Leu
 340 345 350

Ile Ile Cys Trp Gly Pro Leu Leu Ala Ile Met Val Tyr Asp Val Phe
 355 360 365

Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile Lys Thr Val Phe Ala Phe Cys Ser Met
 370 375 380

Leu Cys Leu Leu Asn Ser Thr Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Leu Arg
 385 390 395 400

ES 2 455 745 A1

Ser Lys Asp Leu Arg His Ala Phe Arg Ser Met Phe Pro Ser Cys Glu
405 410 415

Gly Thr Ala Gln Pro Leu Asp Asn Ser Met Gly Asp Ser Asp Cys Leu
420 425 430

His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala Ala Glu Ser
435 440 445

Cys Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile Ala Lys Val Thr Met Ser Val Ser
450 455 460

Thr Asp Thr Ser Ala Glu Ala Leu
465 470



- ②¹ N.º solicitud: 201231588
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 16.10.2012
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TRUONG LUAN D et al. "Immunohistochemical Diagnosis of Renal Neoplasms" Archives of Pathology & Laboratory Medicine ENERO 2011 01.2011 VOL: 135 No: 1 Págs: 92-109 ISSN 0003-9985(print) ISSN 1543-2165(electronic); todo el documento.	1-13
A	ZHOU M. et al. "The usefulness of immunohistochemical markers in the diferencial diagnosis of renal neoplasms" Clinics in Laboratory Medicine (2005) Vol. 25, N.º. 2, páginas 247-257; DOI: 10.1016/j.cl.2005.01.004; todo el documento.	1-13
A	LARRINAGA GORKA et al. Cannabinoid CB1 Receptor Is Downregulated in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Journal of Histochemistry & Cytochemistry DIC 2010 12.2010 VOL: 58 No: 12 Págs: 1129-1134 ISSN 0022-1554(print) ISSN 1551-5044(electronic) Doi: doi:10.1369/jhc.2010.957126; todo el documento.	1-13
A	BLANCO L. et al. "Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma" American Journal of Physiology: Renal Physiology (23 enero 2008) Vol. 294, páginas F850-F858; DOI: 10.1152/ajprenal.00469.2007; todo el documento.	1-13

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:

<p>Fecha de realización del informe 26.09.2013</p>	<p>Examinador M. Á. García Coca</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

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, bases de datos de texto completo TXT, NCBI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

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 se publica.

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	TRUONG LUAN D et al. "Immunohistochemical Diagnosis of Renal Neoplasms" Archives of Pathology & Laboratory Medicine ENERO 2011 01.2011 VOL: 135 No: 1 Págs: 92-109 ISSN 0003-9985(print) ISSN 1543-2165(electronic).	31.12.2010
D02	ZHOU M. et al. "The usefulness of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of renal neoplasms" Clinics in Laboratory Medicine (2005) Vol. 25, N°. 2, páginas 247-257; DOI: 10.1016/j.cll.2005.01.004.	01.01.2005
D03	LARRINAGA GORKA et al. Cannabinoid CB1 Receptor Is Downregulated in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Journal of Histochemistry & Cytochemistry DIC 2010 12.2010 VOL: 58 No: 12 Págs: 1129-1134 ISSN 0022-1554(print) ISSN 1551-5044(electronic) Doi: doi:10.1369/jhc.2010.957126.	30.11.2010
D04	BLANCO L. et al. "Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma" American Journal of Physiology: Renal Physiology (23 enero 2008) Vol. 294, páginas F850-F858; DOI: 10.1152/ajprenal.00469.2007.	23.01.2008

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-13, es un método *in vitro* para diagnosticar e identificar si un sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal (carcinoma renal de células cromóforas y oncocitoma renal). El método se basa en la detección de la presencia del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), de forma que la presencia de dicho receptor es indicativo de que el sujeto padece una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal (reiv. 1-6). Es también objeto de la invención el uso de CB1 como marcador de una neoplasia originada en células intercalares de la nefrona distal, y como marcador diferencial entre dicho tipo de neoplasia, y el carcinoma renal de células claras (reiv. 7-11). Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo que reconoce a CB1, y el uso de un kit que comprende dicho anticuerpo, para la realización del método de la invención (reiv. 12 y 13).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga distintos inmunomarcadores para las neoplasias renales. En este documento se indica que el carcinoma renal de células cromóforas (CRCh) y el carcinoma renal de células claras (CRCC) presentan un perfil inmunohistoquímico distinto. Los marcadores positivos específicos para CRCh, son cadherina específica de riñón, CD117 y CK7, mientras que los marcadores positivos específicos para CRCC son CD10, el marcador de carcinoma renal de células (RCC) y la anhidrasa carbónica IX. En este documento se indica, que incluso sería posible diferenciar entre CRCh y el oncocitoma renal en base a sus perfiles inmunohistoquímicos.

El documento D02 también divulga distintos inmunomarcadores para las neoplasias renales. En este documento se indica que los marcadores más útiles para el diagnóstico diferencial entre CRCh y CRCC, son CK7, CD10, vimentina, CD117, parvalbúmina y la cadherina E. Los marcadores positivos específicos para CRCh, son la cadherina E, parvalbúmina, CD117 y CK7, mientras que los marcadores positivos específicos para CRCC son CD10, el marcador de carcinoma renal de células (RCC) y vimentina.

El documento D03 divulga que el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1), que se expresa riñones adultos sanos, no se expresa en el carcinoma renal de células claras (CRCC), indicando que el CB1 puede ser un marcador diferencial para el diagnóstico de dicha enfermedad, la cual se cree que se origina en células intercalares de la nefrona proximal.

El documento D04 divulga los perfiles de expresión de distintas peptidasas en tres tipos de carcinomas renales: CRCh, CRCC y oncocitomas. La expresión de las distintas peptidasas se ve menos disminuida, respecto a su expresión en el tejido sano, cuanto peor es el pronóstico, de forma que para el caso de la aminopeptidasa APN (alanil aminopeptidasa de membrana o aminopeptidasa N) en los oncocitomas (tumores benignos) su expresión se ve disminuida unas 30 veces, en el CRCh (tumor maligno) se ve disminuida unas 17 veces, y en el caso de CRCC (tumor de peor pronóstico) se ve disminuida unas 5 veces (ver tabla 2).

En el estado de la técnica ya se encuentran divulgados distintos marcadores tanto para CRCCh/oncocitoma como para CRCC. Por lo tanto, el problema que resolvería la invención, sería la provisión de un marcador alternativo para dichas enfermedades, en concreto, para el diagnóstico de CRCCh, y para el diagnóstico diferencial entre CRCCh/oncocitoma y CRCC. Hay que tener en cuenta que el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1) se encuentra divulgado como marcador de CRCC (ver documento D03). Sin embargo, aunque en el estado de la técnica ya se conoce que este receptor no se expresa en CRCC, no resulta obvio que dicho receptor se sobre-exprese en CRCCh, ya que se conoce que existen marcadores de neoplasias renales que, en los perfiles inmunohistoquímicos, dan positivo (por ejemplo la queratina AE1/AE3, ver documento D01) o negativo (por ejemplo la citoqueratina de alto peso molecular, ver documento D02) en ambas patologías, por lo que no resultaría evidente para un experto en la materia la utilización del mismo para diagnosticar el CRCCh a partir de los documentos mencionados anteriormente.

En conclusión, ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-13. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones.

Por lo tanto, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-13 es nueva e implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.