

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 375**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2004 E 04740556 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 1642133**

54 Título: **Procedimientos in vitro para detectar cáncer renal**

30 Prioridad:

**30.06.2003 ES 200301518**

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

**14.07.2014**

73 Titular/es:

**ONCOMATRYX BIOPHARMA, S.L. (100.0%)  
Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 801-B  
2[deg] planta  
48160 Derio (Vizcaya), ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ ROMÁN, JOSÉ JAVIER;  
SÁENZ JIMÉNEZ, MARIA PILAR;  
OCHOA GARAY, JORGE;  
DEL AMO IRIBARREN, JOKIN;  
SANZ IBAYONDO, CRISTINA;  
JUNQUERA SANCHEZ-VALLEJO, CORINA;  
SIMÓN BUELA, LAUREANO;  
MARTÍNEZ MARTÍNEZ, ANTONIO;  
ARGÜELLES SÁNCHEZ, MARIA ELADIA;  
VAL BERNAL, JOSÉ FERNANDO y  
CUEVAS GONZÁLEZ, JORGE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 476 375 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos *in vitro* para detectar cáncer renal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio, la malignidad o la gravedad de dicho carcinoma en el individuo o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que tiene dicho cáncer; para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia para dicho cáncer en un intento de desarrollar nuevos fármacos; así como a agentes inductores de la expresión y/o la actividad de la proteína plexina-B1 o a agentes inhibidores de los efectos de la represión de la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1.

**10 Antecedentes de la invención**

A pesar de todos los avances que se han realizado en los últimos años, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Más de 5 millones de nuevos casos de cáncer se diagnostican cada año en el mundo y más de 3,5 millones de muertes están causadas por los distintos tipos de cáncer, según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, GLOBOCAN, del año 2000.

15 Las neoplasias renales son tumores frecuentes en las sociedades occidentales; representan el 2% de todos los casos de cáncer. Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, GLOBOCAN, del año 2000, cada año se diagnostican más de 90.000 nuevos casos en Europa, 9.000 en Japón y 30.000 en América del Norte; más de 39.000, 4.000 y 12.000 muertes son causadas por el carcinoma renal cada año en Europa, Japón y América del Norte, respectivamente; y la mortalidad a escala mundial causada por el carcinoma renal supera los 100.000 casos anuales.

20 Avances en el conocimiento de la Genética del cáncer han permitido la clasificación de distintos tipos de tumores renales. El subtipo más común es el carcinoma convencional de células renales, que es diferente de los subtipos papilar, cromóforo o ductal colector. El oncocitoma renal es una neoplasia benigna, indistinguible en ocasiones del carcinoma renal, que es una neoplasia maligna. Estudios previos han demostrado que todos estos subtipos histológicos son distintos genética y biológicamente, y que tanto su morfología como comportamiento están determinados por factores moleculares distintivos (Kovacs G., *y col.*, J. Pathol., 1997, 183:131-133).

25 En la actualidad, los sistemas de diagnóstico del cáncer renal están basados en la identificación de síntomas clínicos y en técnicas radiológicas. Los síntomas más comunes son hematuria (en el 50-60% de los pacientes), dolor abdominal (en el 40% de los pacientes) y una masa palpable en el flanco del abdomen (en el 30-40% de los pacientes) (Ritchie A.W.S. y Chisholm G.D., Semin. Oncol., 1983, 10:390-400). La combinación simultánea de estos síntomas ("triada clásica") se produce en menos del 10% de los pacientes. Tumores pequeños, localizados, raramente producen síntomas, retrasando el diagnóstico a estadios avanzados. El 25% de los tumores se diagnostican por tomografía computerizada y ultrasonografía (Porena M., *y col.*, J. Clin. Ultrasound, 1992, 20:395-400; Konnack J.W. y Grossman H.B., J. Urol., 1985, 134:1094-1096; Thompson I.M. y Peek M., J. Urol., 1988, 140:487-490); los tumores diagnosticados con estas técnicas son normalmente más pequeños que los que producen síntomas y son más fácilmente resecables para conseguir la curación (Konnack J.W. y Grossman H.B., J. Urol., 1985, 134:1094-1096; Thompson I.M. y Peek M., J. Urol., 1988, 140:487-490; Smith S.J., *y col.*, Radiology, 1989, 170:699-703).

30 La alteración de los niveles de expresión génica está estrechamente relacionada con el crecimiento celular descontrolado y con procesos de desdiferenciación, hechos comunes a todos los tipos de cáncer. Los niveles de expresión de los denominados "genes supresores de tumores", que actúan para evitar el crecimiento celular maligno, están reprimidos en las células tumorales; y los niveles de expresión de los denominados "oncogenes", que actúan para inducir el crecimiento maligno, están aumentados en las células tumorales.

35 Se han asociado muchos genes al desarrollo del cáncer renal, como el gen de von Hippel-Lindau (Seizinger B.R., *y col.*, Nature, 1988, 332:268-269), el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Ishikawa J., *y col.*, Int. J. Cancer, 1990, 45:1018-1021), el gen de transformación del factor de crecimiento alfa (Lager D.J., *y col.*, Mod. Pathol., 1994, 7:544), el oncogén c-myc (Yao M., *y col.*, Cancer Res., 1988, 48:6753-6757), genes del metabolismo retinoide (Guo X., *y col.*, Cancer Res., 2001, 61:2774-2781), o genes de factores de adhesión celular (Kuroiwa, K., *y col.*, J. Surg. Oncol., 2001, 77:123-131). Sin embargo, muchos de los genes implicados en el inicio y la progresión de los tumores renales son todavía desconocidos.

40 Actualmente no existe ningún procedimiento no invasivo *in vitro* que detecte, con niveles aceptables de sensibilidad y especificidad, los tumores renales; un procedimiento no invasivo con alta sensibilidad y especificidad permitiría la realización rutinaria de análisis clínicos para la detección de estos tumores. La identificación de genes expresados diferencialmente en carcinomas renales, podría permitir la identificación de marcadores biológicos, que podrían tener un alto valor para el diagnóstico *in vitro*, el pronóstico *in vitro* y el tratamiento de esta enfermedad (Boer J.M., *y col.*, Genome Res., 2001, 11:1861-1870). La detección de cambios en el nivel de expresión génica o en la concentración

de las proteínas codificadas, en fluidos corporales, podría ser la base de procedimientos no invasivos de diagnóstico *in vitro* del cáncer renal.

Una vez que al paciente se le ha diagnosticado un cáncer renal, la resección quirúrgica es el tratamiento de elección. La nefrectomía radical, que incluye resección del riñón, grasa perirenal y la glándula suprarrenal ipsilateral, ha sido generalmente realizada desde los años 60 (Robson C.J., y col., J. Urol, 1969, 101:297-301). La cirugía que conserva la nefrona se ha utilizado para tratar tumores pequeños localizados (Herr H.W., Cancer, 1994, 73:160-162). El parámetro más importante para predecir la supervivencia es la extensión anatómica del tumor. Los pacientes con tumores pequeños, localizados, que son reseçados completamente, tienen unos índices de supervivencia mayores que aquellos con afectación nodal o con metástasis distal. El 20-30% de los pacientes con tumores localizados se curan tras la nefrectomía radical; menos de un 5% sufren recidivas locales y un 50-60% de los pacientes desarrollan metástasis a distancia (Rabinovitch R.A., y col., J. Clin. Oncol., 1994, 12:206-212; Sandock, D.S., y col., J. Urol, 1995, 154:28-31). Una vez que la metástasis se desarrolla, el pronóstico de supervivencia a largo plazo empeora significativamente; actualmente el 30% de los pacientes que se diagnostican ya se encuentran en un estadio IV, es decir, han desarrollado metástasis a distancia.

El tratamiento del carcinoma renal es extremadamente difícil por su capacidad de extenderse sin producir síntomas, por su inherente resistencia a la quimioterapia sistémica convencional y por la incapacidad de la radioterapia para reducir los niveles de recaída tras la nefrectomía, incluso en pacientes con afectación de los ganglios o tumores no reseçados completamente (Kjaer M., y col., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1987, 13:665-672). Casi el 50% de los pacientes, y el 90-95% de los pacientes con metástasis a distancia, mueren durante los 5 años posteriores al diagnóstico. Frente a esta realidad, estudios de Genética Molecular están facilitando el conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad y pueden proporcionar nuevas dianas contra las que desarrollar nuevos agentes terapéuticos que sean más eficaces que los disponibles en la actualidad.

La familia de proteínas denominadas plexinas está compuesta por varias proteínas con dominios transmembrana citoplasmática celular; las Plexinas actúan como receptores de las proteínas de la familia de las semaforinas, aunque también se han encontrado expresadas en tejidos extraneuronales con otras funciones moleculares. La Plexina-B1 actúa como receptor de la semaforina III, que es una proteína que causa el colapso del crecimiento conal de las neuronas y la repulsión química de los axones (Driessens M.H., Olivo C., Nagata K., Inagaki, M., Collard J.G., FEBS Lett., 2002, 529:168-172). A día de hoy, no se ha demostrado que las Plexinas jueguen un papel en el proceso de carcinogénesis; sin embargo se ha demostrado que existe un patrón complejo y dinámico de interacción entre Plexinas y pequeñas proteínas rho guanosin trifosfatasa (Castellani V., y col., Curr. Opin. Neurobiol., 2002, 12:532). Estas Rho-GTPasas tienen una función en el reordenamiento del citoesqueleto y están implicadas en procesos de adhesión y migración celular; de hecho, la activación de la proteína Rac, uno de los miembros de esta familia, se ha asociado con procesos de inducción de la migración celular y el desarrollo de un fenotipo de invasión tumoral (Keely, y col., 1997. Nature 390, 632-637; Sander, y col., J. Cell Biol., 1998, 143:1385-1398). Por otro lado la cinasa activada por la proteína p21 (PAK) es el factor activador de Rac y compite con la Plexina-B1 por unirse a Rac; esta interacción es bidireccional, ya que la interacción Plexina-B1 - Rac inhibe la activación de PAK (Vikis H.G., Li W., y Guan K.L. Genes Dev., 2002, 16:836-845; Vikis H.G., Li W., y Guan K.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99:12085-12090). En el documento WO 2004/050914 se identifican mutaciones del gen plexina B1 asociadas con el cáncer que pueden ser útiles en la detección y el diagnóstico del cáncer y como dianas de fármacos en el desarrollo de terapias contra el cáncer; se divulga también la terapia génica del cáncer mediante la administración de ácidos nucleicos capaces de expresar la forma de tipo salvaje de la plexina B-1 y kits diagnósticos que comprenden un par de cebadores y/o sondas para la amplificación del ácido nucleico de la plexina B1; sin embargo dicho documento carece de una divulgación fundamentada en relación con el cáncer renal. Se ha descrito también, utilizando chips de ADN, que el gen *plexina-B1* era uno de los 213 genes que presentaban una expresión reducida en muestras de carcinomas de células renales, al compararlas con muestras de riñón sano (Gieseg M.A., Cody T., Man M.Z., Madore S.J., Rubin M.A., y Kalfjian E.P., BMC Bioinformatics, 2002, 3:26); sin embargo, los autores de este trabajo no demostraban que los niveles diferenciales de expresión génica de la Plexina-B1 se mantuviesen al analizar las muestras por procedimientos más sensibles, específicos y fiables que los chips de ADN, como por ejemplo RT-PCR cuantitativa; ni demostraban que los niveles diferenciales de expresión génica se tradujesen en niveles diferenciales de expresión proteica.

En concordancia con esta hipotética función de la Plexina-B1, los autores de la presente invención han descubierto, tras laboriosa investigación y empleando diferentes técnicas (chips de ADN y PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión génica y transferencia western para medir los niveles de expresión proteica), que sorprendentemente la expresión del gen *plexina-B1* se ve reducida en carcinomas de riñón, siendo la reducción proporcional a la malignidad y a la invasividad. Asimismo, los autores de la presente invención han descubierto que también la concentración de la proteína Plexina-B1 se ve disminuida en carcinomas de riñón. Por último, y sin embargo todavía más interesante, los autores de la presente invención han descubierto que la sobreexpresión de Plexina-B1 causa una disminución en la proliferación celular de las células de carcinoma renal.

La presente invención proporciona, por tanto, un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, basado en la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del ARNm del gen *plexina-B1* o el correspondiente ADNc en una muestra

de dicho individuo. La presente invención proporciona también un procedimiento para tratar el cáncer renal que comprende la administración de la proteína plexina B1.

### Sumario de la invención

5 Un primer aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de dicho cáncer en el individuo o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo con este cáncer.

Un segundo aspecto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para detectar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de compuestos para tratar el cáncer renal.

10 Un aspecto adicional de la invención reside en el uso de secuencias derivadas del gen *plexina-B1* en procedimientos para establecer el diagnóstico y el pronóstico *in vitro* del cáncer renal, y para la identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para el tratamiento de cáncer renal.

Un aspecto adicional de la presente invención consiste en proporcionar agentes que inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, o que inhiban los efectos carcinogénicos de la represión de la expresión de la proteína Plexina-B1, para el tratamiento del cáncer renal.

15 Otro aspecto de la presente invención consiste en una composición farmacéutica que comprenda uno o varios agentes terapéuticos junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del cáncer renal. Uno de estos agentes es la proteína Plexina-B1.

Un aspecto final de la presente invención consiste en un kit para llevar a cabo la presente invención.

### Descripción de los dibujos

20 La **Figura 1** muestra los niveles diferenciales de expresión del gen plexina-B1, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, en muestras procedentes de biopsias de riñón de individuos afectados por distintos tipos de carcinomas renales. Las barras representan el nivel de expresión del gen *plexina-B1* frente al nivel de expresión del gen *gadh* (gen de referencia) en cada una de las muestras tumorales y no tumorales.

25 La **Figura 2** muestra que la tasa de crecimiento de los clones que expresan plexina-B1 (AP2-AP12) es más lenta que el crecimiento del clon de control (AM2) o la de las células parenterales ACHN. La tasa de crecimiento está representado por  $B$  en  $y = A \cdot e^{Bx}$ , la ecuación que describe la curva de regresión de cultivos de crecimiento exponencial.

### Descripción detallada de la invención

30 Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, se explicará el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención a continuación:

Los términos "sujeto" o "individuo" se refieren a miembros de especies de animales mamíferos, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad o raza.

35 El término "cáncer o carcinoma" se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.

El término "cáncer renal" se refiere a cualquier trastorno proliferativo maligno de células del riñón.

El término "tumor" se refiere a cualquier masa anormal de tejido que resulta de un (canceroso) proceso neoplásico benigno (no canceroso) o maligno.

El término "gen" se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos que codifica una proteína.

40 El término "ADN" se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de ADN es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

El término "ADNc" se refiere a una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia de ARNm.

El término "ARN" se refiere a ácido ribonucleico. Una secuencia de ARN es una secuencia de ribonucleótidos.

45 El término "ARNm" se refiere a ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción de ARN total que se traduce en proteínas.

La frase "ARNm transcrito a partir de" se refiere a la transcripción del gen (ADN) en ARNm, como primera etapa para que el gen se exprese y traduzca a proteína.

La expresión "secuencia de nucleótidos" o "secuencia nucleotídica" se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (ARN) o de desoxirribonucleótidos (ADN).

El término "proteína" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos con actividad biológica.

5 El gen "plexina-B1" corresponde al gen denominado "plexin-B1" en inglés y presenta el número de código de GeneBank ACCB007867

Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a un fragmento proteico. Los términos "proteína" y "péptido", se usan indistintamente.

La frase "expresión reducida" significa que los niveles medidos del gen o de la proteína en pacientes de cáncer, son inferiores a los niveles medidos en una población control de sujetos sin historial de cáncer.

10 El término "sensibilidad" se refiere a la detección de falsos negativos (diagnóstico negativo de cáncer, cuando el paciente está afectado de cáncer); una sensibilidad del 100% significa que no hay falsos negativos.

El término "especificidad" se refiere a la detección de falsos positivos (diagnóstico positivo de cáncer, cuando el paciente no está afectado de cáncer); una especificidad del 100% significa que no hay falsos positivos.

15 El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina "antígeno". El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos o bien fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidas contra un único sitio o "determinante" antigénico. Los "anticuerpos policlonales" incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

20 El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

25 El término "fase sólida", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos de materiales para fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos, por ejemplo agarosa, poliacrilamida, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Ejemplos de formas de fase sólida son el pocillo de una placa de ensayo o una columna de purificación.

La expresión "cebador oligonucleotídico", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica, que es complementaria de una secuencia nucleotídica del gen *plexina-B1*. Cada cebador hibrida con su secuencia nucleotídica diana y actúa como un sitio de inicio para la polimerización del ADN.

30 El término "sonda", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica derivada del gen *plexina-B1*, que se puede utilizar para detectar esa secuencia nucleotídica derivada del gen *plexina-B1*.

La expresión "diana terapéutica" se refiere a secuencias nucleotídicas o peptídicas, contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un fármaco o compuesto terapéutico.

35 El término "agonista" se refiere a cualquier molécula que imita la actividad biológica de la molécula agonizada. Ejemplos de moléculas agonistas incluyen, entre otras, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos naturales y pequeñas moléculas orgánicas (de peso molecular inferior a 500 Dalton).

La expresión "vector de expresión recombinante" se refiere a un replicón al que está ligada otra secuencia de nucleótidos, para que esta otra secuencia pueda ser transportada, introducida y expresada en el interior de las células.

40 El término "replicón" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es capaz de autorreplicarse en el interior de las células.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que tanto la expresión génica del gen *plexina-B1*, como la concentración de la proteína Plexina-B1 se ven reprimidas con el de los cánceres renales.

En este sentido, la presente invención proporciona, en primer lugar, un procedimiento *in vitro* que comprende:

45 a) la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del ARNm del gen *plexina-B1* o el correspondiente ADNc en una muestra de un individuo, y

b) la comparación de la cantidad de proteína Plexina-B1, de la cantidad de ARNm del gen *plexina-B1* o de la cantidad del correspondiente ADNc detectada en una muestra de un individuo con sus valores normales de referencia.

Dicho procedimiento *in vitro* se usa para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de dicho cáncer en un individuo o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo con este cáncer.

5 El procedimiento proporcionado por la presente invención es de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de cáncer, en particular de cáncer de riñón, presentan niveles bajos de ARNm transcrito del gen *plexina-B1*, niveles reducidos de expresión del gen *plexina-B1*, o concentraciones reducidas de la proteína codificada por el gen *plexina-B1* (proteína Plexina-B1), en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de cáncer, como por ejemplo cáncer de riñón.

10 El presente procedimiento comprende una etapa de obtención de la muestra del individuo. Se puede trabajar con distintas muestras de fluidos como, por ejemplo, orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, bilis, semen o líquido cefalorraquídeo. La muestra también puede ser un tejido, como por ejemplo tejido de riñón, que se puede obtener por cualquier procedimiento convencional, preferentemente nefrectomía. Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de cáncer renal o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra el cáncer renal.

15 El presente procedimiento comprende además una etapa de extracción de la muestra, ya sea para obtener el extracto de proteínas de ésta, o bien para obtener el extracto de ARN total. Uno de estos dos extractos representa el material de trabajo para la siguiente fase. Los protocolos de extracción de la proteína total o del ARN total son bien conocidos por el experto en la técnica (Chomczynski P. y col., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). Cualquier ensayo convencional se puede utilizar en el marco de la invención para  
20 detectar cáncer renal, siempre que midan *in vitro* los niveles de ARNm transcrito del gen *plexina-B1* o su ADNc complementario, o la concentración de proteína Plexina-B1, en muestras recogidas de los individuos a analizar y de individuos control.

25 Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de este cáncer en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presenta este tipo de cáncer, ya sea basado en la medición de los niveles de la proteína Plexina-B o en la medición del nivel de expresión de la gen *plexina-B1*.

30 En el caso de que lo que se pretenda detectar sea la proteína, concretamente la proteína Plexina-B1, el procedimiento de la invención comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína Plexina- B1, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y la proteína Plexina-B1.

35 Existe una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo; numerosos ensayos de unión de proteínas, competitivos y no competitivos, han sido previamente descritos, y un gran número de estos ensayos está disponible comercialmente. Así, la proteína Plexina-B1 se puede cuantificar con anticuerpos como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, intactos o bien fragmentos recombinantes de los mismos, anticuerpos combinados y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína Plexina-B1; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano. Existen anticuerpos que se unen específicamente a la proteína Plexina-B1, que están disponibles comercialmente. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o  
40 no; los anticuerpos no marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos. Las moléculas marcadoras que se pueden utilizar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleótidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados. Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo  
45 primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen la transferencia western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras  
50 maneras para detectar y cuantificar la proteína Plexina-B1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina. El inmunoensayo preferido en el procedimiento de la invención es un ensayo ELISA de tipo sándwich con doble anticuerpo. En este inmunoensayo se puede utilizar cualquier anticuerpo o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítomos de la proteína Plexina-B1. Como ejemplo de uno de los muchos posibles formatos de este ensayo, un anticuerpo, monoclonal o policlonal, o un  
55 fragmento de este anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que recubren una fase sólida, se ponen en contacto con la muestra a analizar, y se incuban durante un tiempo y en condiciones apropiados para formar los complejos antígeno-anticuerpo. Un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos anticuerpos, unidos a un compuesto generador de señal se incuba con los complejos antígeno-anticuerpo durante un tiempo adecuado y en las condiciones adecuadas  
60 después del lavado en condiciones adecuadas para la eliminación de los complejos no específicos. La presencia de

la proteína Plexina-B1 en la muestra a analizar, se detecta y cuantifica, en caso de que exista, midiendo la señal generada. La cantidad de proteína Plexina-B1 presente en la muestra analizar es proporcional a esa señal.

En el caso de que se pretenda detectar el ARNm o el ADNc correspondiente al gen *plexina-B1*, y no la proteína, el procedimiento de la invención presenta etapas diferentes. Así, una vez obtenida la muestra y extraído el ARN total, el procedimiento de la invención, la detección del ARNm o del correspondiente ADNc del gen *plexina-B1*, comprende una primera etapa de amplificación del extracto de ARN total o del correspondiente ADNc sintetizado por transcripción inversa a partir del ARNm, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del ARNm o del ADNc del gen *plexina-B1*. Un ejemplo de amplificación del ARNm, consiste en retrotranscribir (RT) el ARNm en ADNc, seguido de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores oligonucleotídicos, siendo las secuencias de los cebadores utilizados la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. La PCR es una técnica de amplificación de una determinada secuencia nucleotídica (diana) contenida en una mezcla de secuencias nucleotídicas. En la PCR, se utiliza un exceso de una pareja de oligonucleótidos cebadores, que hibridan con las hebras complementarias de la secuencia nucleotídica diana. A continuación, una enzima con actividad polimerasa (DNA Taq Polimerasa) extiende cada cebador, utilizando como molde la secuencia nucleotídica diana. Los productos de la extensión se convierten entonces en secuencias dianas, tras la disociación de la hebra diana original. Nuevas moléculas de cebador se hibridan y la polimerasa las extiende; el ciclo se repite para aumentar exponencialmente el número de secuencias diana. Esta técnica está descrita en las patentes US 4.683.195 y US 4.683.202. Previamente se han divulgado muchos procedimientos para detectar y cuantificar los productos de la amplificación por PCR, de los que cualquiera puede usarse en esta invención. En un procedimiento preferido de la invención, el producto amplificado se detecta por electroforesis en gel de agarosa, de la manera siguiente: cinco microlitros del producto de la amplificación se someten a una separación por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 2%, en un tampón TBE 0,5x a 100 vdc, durante una hora. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio y el producto de la amplificación se visualiza al iluminar el gel con luz ultravioleta (UV); como alternativa a la tinción, y realización preferida, se puede transferir el producto amplificado a una membrana de nailon por técnicas de transferencia de tipo Southern, para detectar con una sonda específica del ADNc del gen *plexina-B1*, convenientemente marcada. En otro ejemplo la detección del ARNm se realiza transfiriendo el ARNm a una membrana de nailon, mediante técnicas de transferencia, como por ejemplo transferencia de tipo Northern, y detectándolo con sondas específicas del ARNm o del correspondiente ADNc del gen *plexina-B1*. En una realización particular la amplificación y cuantificación del ARNm correspondiente al gen *plexina-B1* se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

La última etapa del procedimiento de la invención consiste en comparar la cantidad de proteína Plexina-B1, la cantidad del ARNm del gen *plexina-B1* o la cantidad del correspondiente ADNc detectada en una muestra de un individuo; con la cantidad de proteína Plexina-B1, la cantidad del ARNm del gen *plexina-B1* o la cantidad del correspondiente ADNc detectada en las muestras de sujetos control o en muestras anteriores del mismo individuo, o con los valores normales de referencia.

El procedimiento también proporciona un procedimiento *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de agentes terapéuticos para terapia del cáncer renal, que comprende

- a) poner en contacto un cultivo de células renales inmortalizadas con el agente candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o la proteína Plexina-B1, y
- c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células renales inmortalizadas sin tratar con el compuesto candidato.

La cuantificación de los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o la proteína Plexina-B1 se realizan de modo semejante a como se indica en el procedimiento de la invención para detectar *in vitro* la presencia del cáncer de riñón en un individuo.

Cuando un agente aumenta los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o revierte los efectos de la expresión reducida de dicho gen, preferiblemente disminuyendo los niveles de proliferación celular, este agente se convierte en candidato para la terapia del cáncer y, especialmente del carcinoma de riñón.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1* para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para la terapia de cáncer renal. Es de destacar, la reciente importancia que se da a los procedimientos de detección basados en la unión competitiva o no competitiva de la molécula terapéutica potencial a la diana terapéutica.

La solicitud también describe agentes que inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1 o que inhiben los efectos de la represión de la expresión de la proteína Plexina-B1. Estos agentes, que se pueden identificar y evaluar según la presente invención, pueden seleccionarse del grupo formado por:

- a) vectores de expresión recombinantes que expresan la proteína Plexina-B1. El vector puede ser introducido *in vivo* en las células del individuo diagnosticado de cáncer; el vector de expresión también puede introducirse en

las células *ex vivo*, dando las células transformadas que posteriormente se introducen en el individuo. Ejemplos de vectores de expresión recombinantes son virus quiméricos; ejemplos de vectores víricos útiles para terapia génica incluyen vectores derivados de adenovirus, virus del herpes, vaccinia, o cualquier virus cuyo material genético sea ARN, como los retrovirus de aves o de murinos. En estos vectores, el gen *plexina-B1* puede estar unido a un promotor de expresión génica específico del tejido afectado por el cáncer, por ejemplo riñón, de manera que se evite la expresión del vector en otros tejidos donde no es necesaria. Otros ejemplos de sistemas para introducir el gen *plexina-B1* en el interior de las células tumorales por medio de un vehículo son los sistemas de dispersión coloidal; ejemplos de sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microsferas, perlas y sistemas lipídicos como emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.

b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimioterapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben los efectos carcinogénicos de la represión de la expresión y/o de la actividad de la proteína Plexina-B1, y

c) compuestos agonistas de la proteína Plexina-B1, que inducen, imitan o reemplazan una o más de las funciones de la proteína Plexina-B1.

Un aspecto adicional de la invención está constituido por el uso de los agentes caracterizados porque inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, así como el uso de la propia proteína Plexina-B1, en el tratamiento del cáncer renal. Un agente preferido es la propia proteína Plexina-B1. Estos agentes, en particular la proteína Plexina-B1, se pueden usar en forma de sales, derivados o profármacos farmacéuticamente aceptables. Estos términos se refieren a cualquier sal, éster, solvato, hidrato o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable que, después de la administración al receptor es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto como se ha descrito en el presente documento. Sin embargo, debe apreciarse que las sales que no son farmacéuticamente aceptables también quedan dentro del alcance de la invención, puesto que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, profármacos y derivados puede realizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

También constituye un aspecto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la propia proteína Plexina B1 junto con uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dicha composición puede contener cualquier otro ingrediente activo que induzca, imite o reemplace una o más de las funciones de la proteína Plexina-B1. Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéutica y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan combinarse con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis únicas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con procedimientos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas de y características para el gen *plexina-B1*, como dianas o herramientas para el desarrollo de fármacos para tratar el cáncer renal en un individuo.

Un aspecto final de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo la presente invención. Por lo tanto, se describe un kit que comprende un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína Plexina-B1 y un vehículo en un envase adecuado. En otra realización, el kit de la invención comprende un par cebador diseñado para amplificar específicamente un ácido nucleico que tiene una secuencia que es específica del gen *plexina-B1*. La secuencia de dicho par de cebadores se selecciona de entre la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. Estos kits se pueden usar para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de dicho cáncer en un individuo o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo con este cáncer.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

#### **Ejemplo 1.- Análisis diferencial de expresión del gen *plexina-B1* en muestras de tejido renal, utilizando las micromatrices de matrices de ADN de *Human Genome U95*.**

##### **1.1. Materiales y procedimientos**

**Micromatrices.** Se utilizaron las micromatrices *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten analizar la calidad del ARN, previamente al análisis de expresión con la matriz *GeneChip Human Genome U95A* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 12.000 secuencias completas de genes registrados; el gen *plexina-B1* (*plexin B1*) está representado en la micromatriz por el conjunto de sondas 33783\_at de Affymetrix, que son oligonucleótidos *sentido* de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.200480 de Unigene, o AB007867 de GeneBank (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las sondas correspondientes al conjunto de sondas 33783\_at

Orden consecutivo de las sondas	Zona de la secuencia de referencia investigada	Secuencia de la sonda (5'→3')	Posición de la sonda en la secuencia del ARNm
1	6720	SEC ID N°3	6508
2	6757	SEC ID N°4	6545
3	6775	SEC ID N°5	6563
4	6777	SEC ID N°6	6565
5	6863	SEC ID N°7	6651
6	6871	SEC ID N°8	6659
7	6882	SEC ID N°9	6670
8	6916	SEC ID N°10	6704
9	6918	SEC ID N°11	6706
10	7021	SEC ID N°12	6809
11	7024	SEC ID N°13	6812
12	7055	SEC ID N°14	6843
13	7057	SEC ID N°15	6845
14	7210	SEC ID N°16	6997
15	7222	SEC ID N°17	7009
16	7274	SEC ID N°18	7061

**Muestras.** Las muestras de riñón estudiadas procedían de biopsias obtenidas por resección quirúrgica, de 7 individuos afectados de oncocitoma renal (n=3), carcinoma renal convencional (n=3), carcinoma renal cromóforo (n=1). De cada individuo, se recogió tejido neoplásico y, como control negativo, tejido no neoplásico. Todas las muestras se clasificaron histológicamente en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, el mismo hospital donde las muestras se habían recogido, siguiendo los preceptos de la Declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

#### Análisis de la expresión génica *Genechip*

- El análisis se llevó a cabo con ARN total procedente de mezclas equimolares (conjuntos) de ARN total procedentes de 3 muestras de tejido neoplásico de riñón de 3 individuos afectados de carcinoma renal convencional (conjunto 1), mezclas equimolares de ARN total procedente de un grupo de 3 muestras de tejido neoplásico de riñón de 3 individuos afectados de carcinoma renal convencional (conjunto 2), ARN total de 1 muestra de tejido neoplásico de 1 individuo con carcinoma de riñón cromóforo (Muestra nº 1), y, como control negativo, con mezclas equimolares de ARN total procedentes de un conjunto (n= 5) de muestras de tejido no neoplásico de riñón de individuos afectados de oncocitoma renal, carcinoma renal convencional y carcinoma renal cromóforo (Conjunto 3) (Tabla 2).

Tabla 2 Descripción de las muestras de tejido de riñón analizadas

	Oncocitoma renal	Carcinoma renal convencional	Carcinoma renal cromóforo
Muestras de tejido neoplásico	Conjunto 1 (n=3)	Conjunto 2 (n=3)	Nº 1 (n=1)
Muestras de tejido no neoplásico	Pool 3 (n=5)		

#### Síntesis de ARNc

- El ARN total de cada una de las biopsias se obtuvo homogeneizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El ARN total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. y col., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). Se usaron 10 µg de cada preparación de ARN total como material de partida para la síntesis de la primera hebra de

ADNc con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNasa (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. La segunda hebra de ADNc se sintetizó utilizando las enzimas ADN polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), ADN ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), ARnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies) y ADN polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El ARNc marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

Hibridación y escaneado de la matriz

Se fragmentaron 15 µg de cada ARNc biotinilado a 94 °C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía Tris-Acetato 40 mM (pH 8.1), KOAc 100 mM y MgOAc 30 mM. El ARNc fragmentado se mezcló con tampón de hibridación (MES 100 mM, NaCl 1M, EDTA 20 mM, 0.01% de Tween 20) y se calentó a 99° durante 5 minutos y posteriormente a 45° durante 5 minutos, para a continuación cargarse en la matriz Affymetrix. La primera matriz en la que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Esta matriz permite analizar la calidad del ARN previo al análisis de expresión en el Affymetrix® GeneChip® *Human Genome* 95 A (HG-U95A).

Para la hibridación, las matrices se incubaron en un horno rotatorio a 45° durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm.

El lavado y la tinción de cada matriz se llevó a cabo en la Affymetrix® Fluid Station. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (NaCl 0,9 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 6 mM, 0,01% de Tween 20) a 25°.

- 4x15 ciclos con MES 0,1 mM, NaCl 0,1M, 0,01% de Tween 20 a 50°

- Tinción del ARNc biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/m IMolecular Probes)

- 10x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 25°

- Tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina durante 10 minutos

- Tinción un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1 mg/ml, Molecular Probes) durante 10 minutos

- 15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°

Las matrices se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de las matrices, se escalaron a una intensidad total de 100.

## 1.2. Resultados.

El análisis diferencial de la expresión del gen *plexina-B1* en los tejidos neoplásicos frente a los tejidos control, no neoplásicos, se realizó a partir de los datos de comparación de matrices obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron: i) Detección. Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M), ii) Cambio: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC), Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD), iii) proporción log de la señal (SLR): Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra de ensayo. Este cambio se expresa como el log<sub>2</sub> de la proporción (cambio en veces o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra de ensayo tumoral frente a la muestra control sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un cambio por 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y se considera significativo un valor de SLR de -1 para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

El análisis diferencial de la expresión del gen *plexina-B1* en los estadios tumorales con respecto al control demostró que los niveles de expresión del gen *plexina-B1* estaban reprimidos en el tejido neoplásico de riñón, respecto al tejido no neoplásico, y que esa represión era mayor, cuanto mayor era la malignidad del tumor analizado: el nivel de represión era mayor de 2 veces (SLR<-1) en biopsias de oncocitomas renales, (benignos), mayor de 4 veces (SLR<-2) en biopsias de carcinomas renales convencionales (malignos) y mayor de 8 veces (SLR<-3) en biopsias de carcinoma renales cromóforos (mayor grado de malignidad) (Tabla 3).

Tabla 3 Resultados obtenidos para Plexina B1. N. Ac. AB007867

Oncocitoma frente a control				
Sec. Affy.	Conjunto de detección 3	Conjunto de detección 1	Conjunto SLR 1 frente al conjunto 3	Conjunto de CAMBIO 1 frente al conjunto 3
33783_at	P	A	-1,2	D
<b>Carcinoma convencional vs. Control</b>				
Sec. Affy,	Conjunto de detección 3	Conjunto de detección 2	Conjunto SLR 2 frente al conjunto 3	Conjunto CAMBIO 2 frente al conjunto 3
33783_at	P	A	-2,4	D
<b>Carcinoma cromóforo vs. Control</b>				
Sec. Affy,	Conjunto de detección 3	Muestras de detección nº 1	SLR Nº 1 frente al conjunto 3	CAMBIO Nº 1 frente al conjunto 3
33783_at	P	A	-3,6	D

**Ejemplo 2. Análisis diferencial de expresión del gen *plexina-B1* en muestras de tejido renal, utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real.**

**2.1. Materiales y procedimientos**

5 Para determinar los niveles de expresión del gen *plexina-B1* se realizó una RT-PCR cuantitativa a tiempo real en un 7000 *Sequence Detection System* utilizando una mezcla *SYBR green PCR master mix* (Applied-Biosystems, Foster City, EE.UU.). El ARN total se extrajo de biopsias individuales usando el reactivo *Trizol™ Reagent* (Life Technologies, EE.UU.), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante; este ARN total se purificó a continuación con el kit *Qiagen Mini Kit spin columns* (Qiagen, EE.UU.). La integridad del ARN se confirmó por electroforesis en un gel de agarosa 1% y el ARN se cuantificó espectrofotométricamente. A continuación, se digirieron 5 µg de ARN total con DNasa I (1,2 uu/µg de ARN) y se procedió a la síntesis del ADNc siguiendo el siguiente protocolo: Un µg de ARN tratado con DNasa se mezcló, en un volumen total de 20 µl, con la transcriptasa reversa *SuperScript™ Rnase H-Reverse Transcriptase* (Invitrogen, EE.UU.) (400 unidades/µg de ARN) y con 100 pmoles de oligodT. El ADNc sintetizado se amplificó utilizando cebadores específicos del gen humano *plexina-B1* (SEC ID Nº 1 y la SEC ID Nº: 2) -, y cebadores específicos del gen humano gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (*gapdh*). A continuación, se calculó, como medida relativa de la expresión génica, la relación entre la abundancia de los ARNm transcritos de *plexina-B1* y la abundancia de transcritos de *gapdh*:  $2^n$ , donde n es el valor.  $C_t$  (*ciclo umbral*) de *gapdh* menos el valor  $C_t$  de *plexina-B1*, y se normalizó el dato de la relación, en base al valor de la muestra con el nivel más bajo de expresión de *plexina-B1*. La especificidad de los productos de PCR se determinó por análisis de curvas de desnaturalización. Se construyó una curva patrón realizada con diluciones seriadas de ADNc; a las concentraciones de ADNc molde para las reacciones en la curva patrón se les dieron valores arbitrarios 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625; 0,3125 y 0,15625 para las reacciones en la curva patrón. Las reacciones de PCR en tiempo real se prepararon utilizando el kit *LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green I kit* (Roche, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación consistía en 1 ciclo de 95°C durante 1 min (inicio en caliente) seguido de 45 ciclos de 95°C (desnaturalización) durante 10 segundos, 60°C (hibridación) durante 5 segundos, 72°C (amplificación y adquisición) durante 10 segundos. El programa de análisis de curvas de desnaturalización consistía en un ciclo de un pulso de 95°C, 65°C durante 15 s, y un pulso de 95°C durante la etapa de amplificación y adquisición.

La eficiencia de amplificación se calculó para cada reacción de PCR a partir de los datos de la curva patrón, utilizando la ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}} \quad [1]$$

donde E es la eficiencia de amplificación.

La relación de los valores de expresión génica se determinó por la ecuación:

$$\text{Relación} = \frac{E_{\text{diana}}^{-(Cp \text{ control diana} - Cp \text{ muestra diana})}}{E_{\text{referencia}}^{-(Cp \text{ control de referencia} - Cp \text{ muestra de referencia})}} \quad [2]$$

5 en la que  $E$  es la eficiencia de amplificación,  $Cp$  es el punto de cruce,  $diana$  es *plexina-B1*,  $referencia$  es GAPDH,  $control$  es la muestra sana y  $muestra$  es la muestra tumoral.

## 2.2. Resultados

10 Se construyeron las curvas de amplificación y desnaturalización de los genes *diana* (*plexina-B1*) y de referencia (*gadh*); en la curva de desnaturalización se veía un único pico definido a la temperatura correspondiente a la temperatura de desnaturalización de cada producto, lo que indicaba que las reacciones eran específicas (datos no mostrados). Cada muestra se analizó por triplicado para calcular el cambio relativo en los niveles de expresión génica utilizando las ecuaciones [1] y [2] descritas en el apartado anterior. Los cambios en los niveles de expresión del gen *plexina-B1* se muestran en la figura 1. De las muestras neoplásicas analizadas, solo una mostró niveles de expresión génica superiores a los niveles en las muestras no neoplásicas; en los demás casos, que incluían muestras de carcinoma renal convencional, papilar y cromóforo (tabla 4), los niveles de expresión estaban claramente reprimidos respecto a las muestras procedentes de tejido no neoplásico (Figura 1).

Tabla 4. Datos clinicopatológicos de las neoplasias renales analizadas

Caso	Edad	Sexo	Diagnóstico histológico	Estadio	Evolución
1	58	Varón	CR Convencional	II	V Y S (28 meses)
2	80	Varón	CR Convencional	II	V Y S (16 meses)
3	78	Varón	CR Convencional	II	V Y S (20 meses)
4	38	Varón	CR Convencional	II	V Y S (24 meses)
5	68	Varón	CR Convencional	II	V Y S (24 meses)
6	76	Mujer	CR Convencional	II	V Y S (22 meses)
7	51	Varón	CR Convencional	III	MPE (15 meses)
8	45	Varón	CR Convencional	III	MPE (11 meses)
9	57	Varón	CR cromóforo	II	V Y S (25 meses)
10	55	Varón	CR papilar (grado bajo)	II	V Y S (24 meses)
11	69	Varón	CR papilar (grado bajo)	III	V Y S (18 meses)
12	79	Varón	Oncocitoma renal	II	V Y S (26 meses)

CR: carcinoma renal

V y S (n meses): Vivo y sano, n meses después del diagnóstico.

MPE (n meses): Muerte por enfermedad, n meses después del diagnóstico.

### Ejemplo 3. Ensayos de proliferación en la línea celular de adenocarcinoma renal humano ACHN parental y transfectada

#### 3.1. Materiales y procedimientos

##### 20 Transfección y clonación celular

25 Las células de adenocarcinoma renal humano ACHN se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ACACC N° 88100508) y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FCS, glutamina 2 mM y antibióticos (todos de Gibco/BRL, Paisley, Reino Unido). Para la transfección se sembraron  $10^5$  células en placas de cultivo tisular de 10 cm (Corning, Corning, EE.UU.) y se transfectaron 24 horas después con 10  $\mu$ g de ADN plasmídico mediante el procedimiento con fosfato cálcico. El vector de expresión eucariota pCEFL/plexinB1 que contiene un casete de expresión de resistencia a neomicina se usó para dirigir la expresión de la *plexina B1* de longitud completa a partir del promotor EF1. Como control se usó el vector pMEX (Katzav S, Martin-Zanca D, Barbacid M, 1989 EMBO J, vol 8, pp. 2283-2290), que también contiene el casete de resistencia a neomicina. 48 horas después de la transfección, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos (Corning) y se añadió 1 mg/ml de Geneticina (Gibco/BRL) al medio de cultivo para seleccionar los clones transfectados de forma estable. Tras la expansión en matraces de 75 cm<sup>2</sup> (Corning), la expresión de *plexina B1* en clones resistentes a geneticina se verificó mediante procedimientos de RT-PCR estándar con cebadores localizados en el extremo 3' de la secuencia de codificación (SEC ID N° 19 [directo] y SEC ID N° 20 [inverso]). Como control se realizó una RT-PCR en un gen rib doméstico 110 (SEC ID N° 21 [directo] y SEC ID N° 22 [inverso]).

**Ensayo MTT (de proliferación celular)**

500 células de ACHN parentales, ACHN/pMEX (AM) o ACHN/plexinaB1 (AP) se sembraron por pocillo en 200 µl de medio de cultivo en placas de 96 pocillos (Corning) y en duplicados de 8. Tras la incubación durante 24, 48, 72 o 96 h, se añadieron 20 µl de una solución madre de MTT (Sigma, Steinheim, Alemania) a los cultivos para una concentración final de 50 µg/ml. Tras una incubación durante 2 horas a 37 °C, el medio se decantó y a cada pocillo se añadieron 200 µl de DMSO. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, para permitir la disolución de los cristales de MTT. Las lecturas de densidad óptica (DO) se tomaron en un lector de placas Multiscan RC de Labsystems (Ashford, Reino Unido) equipado con filtros de 570 nm y 650 nm. La absorbancia se determinó mediante el promedio de la diferencia entre las lecturas de DO<sub>570</sub> y DO<sub>650</sub>. Las curvas de regresión para los datos de proliferación celular se calcularon y representaron gráficamente con el software de Microsoft Excel 2000

**3.2 Resultados**

Todos los clones que expresan plexina B1 (AP2-AP12) proliferan más lentamente que el clon control (AM2) o las células ACHN parentales (Tabla 5 y Figura 2) en ambos experimentos.

Tabla 5. Valores para la tasa de crecimiento en 2 determinaciones independientes

	Exp. N°1	Exp. N° 2
ACHN	-	0,7019
AM2	0,5346	0,6366
AP2	0,3632	0,5581
AP3	0,3664	0,5876
AP4	0,3678	0,5407
AP5	0,3179	0,4007
AP7	0,3430	0,5509
AP8	0,3484	0,4802
AP9	0,2817	0,4400
AP10	0,3475	0,5169
AP11	0,2998	0,5821
AP12	0,3047	-

**3.3 Discusión**

Los ensayos MTT (proliferación celular) han demostrado que la tasa de proliferación de las células de adenocarcinoma renal humano ACHN es significativamente menor cuando las células están expresando Plexina B1. Estos resultados sugieren que la expresión de Plexina B1 causa una disminución en la proliferación celular. Estos datos funcionales, en conjunto con los datos de expresión a nivel molecular, a partir de micromatrices de ADN, Q-PCR e Inmunohistoquímica, sugieren un papel antiproliferativo para la Plexina-B 1 en los carcinomas renales.

**Ejemplo 4. Análisis de la expresión de proteínas en muestras de tejido usando matrices tisulares****4.1. Materiales y procedimientos**

Muestras de tumores incluidas en parafina fijas de los archivos de Patología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla se seccionaron y se dispusieron en portaobjetos de vidrio. En total, 51 casos de adultos de carcinoma de células renales [26 casos de carcinoma de células renales de células claras (convencional) y 25 casos de carcinoma papilar de células renales] a partir de muestras de nefrectomía y 6 muestras de riñón sanos se analizaron mediante tinción inmunohistoquímica. Todos los bloques de tejido de donantes incluidos en parafina se muestrearon con punzones de 1,00 mm utilizando un instrumento Beecher de micromatriz tisular (Beecher Instruments Inc. Sun Prairie, WI, EE.UU.). Bloques de la matriz tisular en parafina que contienen cilindros de núcleo dispuestos se sometieron a tinción de rutina con hematoxilina y eosina seguida de tinción inmunohistoquímica para la Plexina B1. En resumen, la recuperación de antígenos se realizó llevando a ebullición las secciones en tampón de ácido cítrico en una olla a presión durante 180 segundos. Después, una dilución 1:100 de un suero policlonal de conejo generado contra un conjugado de KLH-plexina B1 péptido (SEC ID N° 23, residuos 1113 a 1127) se incubó con la muestra. A esto le siguió la visualización con el sistema Dako Envision™ + (Dako, Glostrup, Dinamarca), basado en el uso de un anticuerpo de cabra anti-conejo secundario conjugado a un polímero ligado a peroxidasa, seguido de un sustrato cromógeno (diaminobencidina). El proceso de inmunotinción se realizó en un immunostainer Techmate 500-220 automatizado (Biotek, Santa Barbara, CA, EE.UU.).

5 Para reducir la variabilidad entre observadores en la evaluación histopatológica de las muestras teñidas con anticuerpos, tres patólogos independientes del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marques de Valdecilla evaluaron los patrones de tinción y se acordaron los criterios de puntuación. La tinción positiva de Plexina B1 se definió como una reactividad de membrana citoplasmática gruesa. La inmunohistoquímica se consideró negativa en los casos en los que la tinción estaba ausente o que mostraron tinción débil (< 5% de las células en una sección dada).

**4.2. Resultados**

10 La especificidad de la tinción inmunohistoquímica se apoya en los siguientes hallazgos: (1) La tinción es específica de tejido, es decir, presente en el tejido sano, pero ausente en una parte significativa de los tejidos tumorales, de acuerdo con los datos de las micromatrices y Q-PCR. (2) La tinción es positiva para células de los túbulos renales, células en las que los tumores se originan en estudio, pero no para otros tipos de células tales como las células vasculares, células mesenquimales o el infiltrado inflamatorio.(3) La tinción está presente en la membrana celular y el citoplasma, sin ningún tipo de precipitados, pero está ausente del núcleo.(4) La tinción se bloqueó mediante la adición del péptido inmunizante.

15 De las secciones de carcinoma de células renales adultas que se analizaron inmunohistoquímicamente una reacción positiva con el anticuerpo específico para Plexina B1 fue positiva en el 19% de las secciones de carcinoma de células renales claras (convencional), el 40% de carcinoma papilar de células renales en comparación con el 83% de la muestra positiva sana (tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la tinción inmunohistoquímica

	Nº total de muestras	Casos positivos	Casos negativos	% de casos positivos*
<b>Carcinoma de células renales de células claras (convencional)</b>	26	5	21	<b>19%</b>
<b>Carcinoma de células renales papilares</b>	25	10	15	<b>40%</b>
<b>Muestras de riñón sano</b>	6	5	1	<b>83%</b>
* Positiva / (Positiva + Negativa) x 100				

20 **4.3. Discusión**

25 Consistente con los datos de expresión del gen de la Plexina B1 en los carcinomas de células renales frente a riñón sano, las secciones clasificadas como carcinomas mostraron un menor porcentaje de tinción positiva con el anticuerpo marcado frente a la Plexina B1 (19% y 40%) que las secciones correspondientes a riñón sano (83%). Estos resultados muestran que la proteína Plexina B1 no se expresa en un alto porcentaje de carcinomas de células renales.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> PROGENIKA BIOPHARMA S.A.  
 <120> Procedimientos *in vitro* para la detección de cáncer renal
- 5 <160> 23  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético  
 <223> cebador directo diseñado para amplificar, en combinación con la SEC ID N° 2, ADNc del gen de la plexina-B1  
 <400> 1  
 acagtgtgac aggcaaggcc 20
- 15 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético
- 20 <223> cebador inverso diseñado para amplificar, en combinación con la SEC ID N° 1, ADNc del gen de la plexina-B1  
 <400> 2  
 cacagccaat agtgcattca agg 23  
 <210> 3  
 <211> 25
- 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético  
 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6508
- 30 <400> 3  
 ttcagcctgg cctgggcagc cctgg 25  
 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético

## ES 2 476 375 T3

- <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6545
- <400> 4
- gaggccacct tcttaggtgc ctgta 5
- 5 <210> 5
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- 10 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6563
- <400> 5
- gcctgtagtg actgacaagc agagt 25
- <210> 6
- 15 <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- 20 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6565
- <400> 6
- ctgtagtgac tgacaagcag agtta 25
- <210> 7
- <211> 25
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6651
- 30 <400> 7
- agaccgggg cctcaaggct catgg 25
- <210> 8
- <211> 25
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6659
- <400> 8

ES 2 476 375 T3

ggcctcaagg ctcattgggt agtac 25  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético  
 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6670  
 <400> 9  
 10 tcatggggta gtaccagcc tgctc 25  
 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220> ADN sintético  
 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6704  
 <400> 10  
 agcgaccctg tgacaccggt ctgca 25  
 20 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético  
 25 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6706  
 <400> 11  
 cgaccctgtg acaccggtct gcagg 25  
 <210> 12  
 30 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220> ADN sintético  
 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6809  
 35 <400> 12  
 ctggccttgg ccacactggg attcg 25  
 <210> 13

# ES 2 476 375 T3

<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220> ADN sintético

5 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6812  
<400> 13  
gccttgcca cactgggatt cggag 25  
<210> 14

10 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220> ADN sintético

15 <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6843  
<400> 14  
gaggagagcc ccatgcttc tgtct 25  
<210> 15  
<211> 25

20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220> ADN sintético

<223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6845

25 <400> 15  
ggagagcccc atgcttcctg tctgc 25  
<210> 16  
<211> 25  
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial  
<220> ADN sintético

<223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 6997

<400> 16

35 acagggctgc cctgcctcat aggta 25  
<210> 17  
<211> 25  
<212> ADN

## ES 2 476 375 T3

- <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 7009
- 5 <400> 17
- tgcctcatag gtagccatgg tgagg 25
- <210> 1
- <211> 25
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- <223> secuencia de la sonda del33783\_at de Affymetrix, siendo la posición de dicha sonda en la secuencia del ARNm del gen de la plexina-B1 7061
- <400> 18
- 15 agagtgggta ctccattgac ccagc 25
- <210> 19
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220> ADN sintético
- <223> cebador directo diseñado para amplificar, en combinación con la SEC ID N° 20, un fragmento de la plexina-B1 humana localizado en el extremo 3' de la secuencia de codificación
- <400> 19
- tcaacgcgga cagttcaagt a 21
- 25 <210> 20
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- 30 <223> cebador inverso diseñado para amplificar, en combinación con la SEC ID N° 19, un fragmento de la plexina-B1 humana localizado en el extremo 3' de la secuencia de codificación
- <400> 20
- cacggacgca tatctcacgt 20
- <210> 21
- 35 <211> 17
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético

# ES 2 476 375 T3

<223> cebador directo diseñado para amplificar, en combinación con la SEC ID N° 22, un fragmento del gen rib I10 usado como control en la reacción de RT-PCR

<400> 21

tgcgatggct gcacaca 17

5 <210> 22

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

10 <223> cebador inverso diseñado para amplificar, en combinación con la SEC ID N° 21, un fragmento del gen rib I10 usado como control en la reacción de RT-PCR

<400> 22

tccttagag caaccatac aac 23

<210> 23

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Péptido que contiene los residuos 1113-1127 de la plexina-B1 humana

<400> 23

20 Cys Ala Val Asp Ala Gln Glu Tyr Glu Val Ser Ser Ser Leu Val  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de este cáncer en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo con este cáncer, que comprende.
- 5 a) la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del ARNm del gen *plexina-B1* o el correspondiente ADNc en una muestra de un individuo, y
- b) la comparación de la cantidad de proteína Plexina-B1, de la cantidad de ARNm del gen *plexina-B1* o de la cantidad del correspondiente ADNc detectada en una muestra de un individuo con sus valores normales de referencia.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de tejido renal.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha muestra de tejido renal a analizar se obtiene por cualquier procedimiento convencional, preferentemente nefrectomía.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, bilis, semen, jugo gástrico o líquido cefalorraquídeo.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que no se le ha diagnosticado previamente cáncer renal.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que se le ha diagnosticado previamente cáncer renal.
- 20 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo en tratamiento, o que ha sido tratado previamente, contra cáncer renal.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la extracción de la muestra, bien para obtener un extracto de proteínas o bien para obtener un extracto de ARN total.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1 comprende una primera etapa en la que el extracto de proteínas de la muestra se pone en contacto con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína Plexina-B1, y una segunda etapa en la que los complejos formados por los anticuerpos y la proteína Plexina-B1 se cuantifican.
- 25 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, intactos o bien fragmentos recombinantes de los mismos, anticuerpos combinados y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína Plexina-B1; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, caracterizado por que la detección y/o cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína plexina B1, las técnicas usadas se seleccionan del grupo formado por: transferencia western, ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA Competitivo (Inmunoensayo Enzimático Competitivo), DAS-ELISA (ensayo ELISA de tipo sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, ensayos basados en precipitación con oro coloidal en formatos tales como tiras reactivas, o mediante técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.
- 35 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la detección y/o cuantificación del ARNm o del correspondiente ADNc del gen *plexina-B1* comprende una primera etapa de amplificación del ARNm, que está presente en el extracto de ARN total, o del correspondiente ADNc sintetizado por retrotranscripción del ARNm; y una segunda etapa de cuantificación del producto de amplificación del ARNm o del ADNc del gen *plexina-B1*.
- 40 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que la amplificación se realiza de manera cualitativa o cuantitativa mediante RT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos, en el que las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar la secuencia del gen *plexina-B1* son las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2.
- 45 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la detección y/o cuantificación se realiza con sondas específicas del ARNm o del correspondiente ADNc del gen *plexina-B1* mediante técnicas tales como transferencia de tipo Northern o transferencia Northern.
- 50 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la detección del ARNm se efectúa mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

16. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1* para detectar *in vitro* la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar *in vitro* el estadio o la gravedad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un individuo que presenta dicho cáncer.
- 5 17. Procedimiento *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de compuestos para terapia del cáncer renal, que comprende:
- a) poner en contacto un cultivo de células renales inmortalizadas con el agente candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o la proteína Plexina-B1, y
- 10 c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células renales inmortalizadas sin tratar con el compuesto candidato.
18. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1*, en procedimientos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del cáncer renal, en el que dicho uso no es un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia o un procedimiento diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.
- 15 19. Un vector de expresión recombinante que expresa la proteína Plexina-B1 para tratar el cáncer renal.
20. Uso de un vector de expresión recombinante que expresa la proteína Plexina-B1 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer renal.
21. Uso de la proteína Plexina-B1 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer renal.
22. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína plexina B1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 23. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado por que contiene otra sustancia farmacológica, preferentemente una inductora de la función de la proteína plexina B1.
24. Uso de un kit que comprende un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína plexina B1 y un vehículo en un envase adecuado para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de este cáncer en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada al individuo con este cáncer, en el que dicho uso no es un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia o un procedimiento diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.
- 25 25. Un kit que comprende un par de cebadores diseñado para amplificar específicamente un ácido nucleico que tiene una secuencia que es específica para el gen *plexina-B1*, en el que la secuencia del par de cebadores se selecciona de la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2.
- 30 26. Uso de un kit que comprende un par de cebadores diseñado específicamente para amplificar un ácido nucleico que tiene una secuencia que es específica para el gen *plexina-B1*, para detectar la presencia de cáncer renal en un individuo, para determinar el estadio o la gravedad de dicho cáncer en un individuo o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo con este cáncer.
- 35 27. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la secuencia del par de cebadores se selecciona de la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2.

**FIGURA 1**

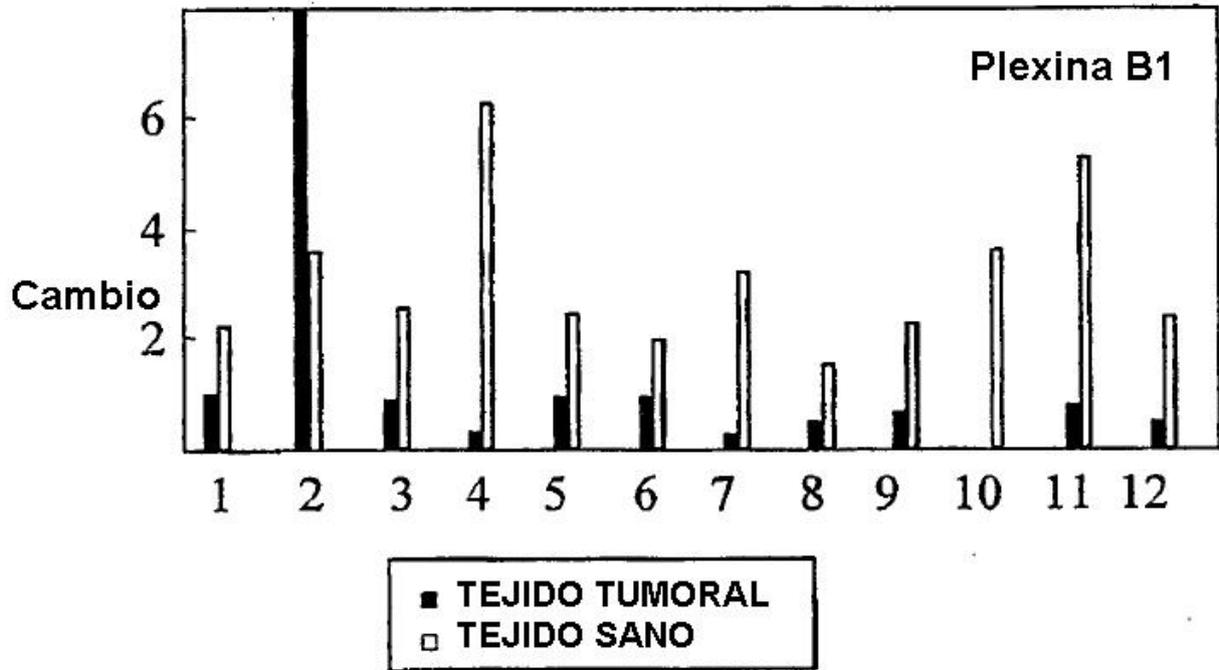


FIGURA 2

