



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 296 465**

② Número de solicitud: 200502247

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/02** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12R 1/91** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.09.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

Fecha de la concesión: **23.02.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

⑲ Titular/es: **Universidad de Sevilla**  
**OTRI-Pabellón de Brasil**  
**Paseo de las Delicias, s/n**  
**41012 Sevilla, ES**

⑳ Inventor/es: **Navarro Antolín, Francisco Javier;**  
**Levitsky, Konstantin;**  
**López Barneo, José;**  
**Calderón Sánchez, Eva;**  
**Ordóñez Fernández, Antonio;**  
**Villar López, José;**  
**Carmona Bernal, Carmen y**  
**Capote Gil, Francisco**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Método y kit de diagnóstico para la determinación cuantitativa de la expresión del canal maxi-K.**

㉓ Resumen:

Método y kit de diagnóstico para la determinación cuantitativa de la expresión del canal maxi-K.

La presente invención se refiere a un método y kit de diagnóstico para la determinación cuantitativa en leucocitos de sangre periférica de una muestra de sangre total de la expresión de los genes KCNM implicados en la hipertensión arterial humana. En concreto de la expresión, de los niveles de ARNm y/o proteínas, de las subunidades alfa y beta1 del canal iónico maxi-K, es decir, de los genes KCNMA1 y KCNMB1.

ES 2 296 465 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

**DESCRIPCIÓN**

Método y kit de diagnóstico para la determinación cuantitativa de la expresión del canal maxi-K.

5 La presente invención se refiere a un método de análisis *in vitro* y kit de diagnóstico, para la determinación cuantitativa de la expresión de los genes KCNM o de sus productos de transcripción o expresión. En concreto, de los genes KCNMA1 y KCNMB1 que codifican las subunidades alfa y beta1 del canal iónico maxi-K implicados en la hipertensión arterial humana.

10 **Estado de la técnica anterior**

La hipertensión arterial es el aumento de forma crónica de la presión arterial. Se trata de una enfermedad que no da síntomas durante mucho tiempo y dejada a su evolución sin tratamiento puede ser que el primer síntoma que de ella se tenga sea una complicación severa como un infarto de miocardio, una de los principales riesgos, trombos o rupturas arteriales, pudiendo dar lugar a hemorragias, daño en las células nerviosas, pérdida de memoria, parálisis, etc. El riñón también sufre las consecuencias de la hipertensión arterial y entre los pacientes hipertensos se produce insuficiencia renal con más frecuencia que entre los pacientes normotensos. Los pequeños vasos del fondo del ojo (que se miran con el oftalmoscopio), también se ven amenazados por la hipertensión, su rotura produce hemorragia llegándose incluso a la pérdida de la visión. Todos estos riesgos se pueden evitar si se trata y controla la hipertensión adecuadamente.

20 Experimentalmente, se ha demostrado la relación existente entre la presión arterial y la apnea del sueño obstructiva (OSA), la hypoxia y de los trastornos en la respiración relativos al sueño (cf. Davies, C.W.H. *et al.*, *Thorax* 2000, vol. 55, pp. 736-740; Fletcher, E.C. *J. Appl. Physiol* 2001, vol. 90, pp. 1600-1605; Grote *et al.*, *J. Hypertens* 2000, vol. 18, pp. 679-685). Siendo este tipo de enfermedades un foco de información para problemas cardiovasculares y de hipertensión arterial.

30 Uno de los avances sobre la estructura y función de las proteínas que han surgido de la investigación en genética molecular son los canales iónicos. Estos canales pertenecen a una familia de proteínas que forman túneles macromoleculares a través de la membrana plasmática y que se encargan de controlar el flujo de iones hacia el exterior o interior de las células. Las observaciones previas que relacionan la subunidad beta-1 del canal iónico maxi-K (expresado por el gen KCNMB1) y la hipertensión se basa en cambios cualitativos, como es la no existencia del gen en el ratón, con un estado hipertensivo en el ratón knockout para la subunidad beta-1, o como es el cambio de un solo aminoácido motivado por una mutación puntual en humanos (protección frente a la hipertensión diastólica en sujetos portadores de dicha mutación) (cf. Fernández-Fernández, J.M. *et al.*, *J. Clin. Invest* 2004, vol. 113, pp. 1032-1039).

35 En la actualidad para hacer un estudio de las posibles modificaciones del nivel de expresión de genes de interés vascular, se hace de forma cruenta, por medio de una biopsia para obtener tejido de la pared arterial.

40 **Explicación de la invención**

La invención se enfrenta, en general, con el problema de encontrar un método de diagnóstico cuantitativo para la determinación y/o detección de la hipertensión arterial humana, en células cuyo proceso de extracción no sea agresivo para el paciente.

45 La solución proporcionada se basa en que los autores de la presente invención han descubierto, sorprendentemente, que la expresión de los genes KCNM, en particular de los genes KCNMA1 y KCNMB1, o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en leucocitos de sangre periférica (PBL), se puede cuantificar para la detección de la hipertensión arterial humana.

50 KCNMA1 y KCNMB1 son dos genes que codifican dos proteínas las cuales al ensamblarse forman el canal iónico maxi-K.

55 Entre las posibles aplicaciones derivadas de la presente invención se incluye el proporcionar un kit de diagnóstico de la hipertensión arterial humana en PBL, junto con el uso de los PBL para la cuantificación de los genes que codifican canales iónicos de importancia en la pared vascular y no propiamente del leucocito, permitiendo usar los PBL como testigos a distancia de la regulación de estos genes, que codifican canales iónicos vasculares.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de diagnóstico de la hipertensión arterial humana mediante la detección cuantitativa de los niveles de expresión de los genes KCNM en leucocitos de sangre periférica (PBL) de una muestra de sangre total. Los PBL son obtenidos mediante cualquier método tradicional, sobradamente conocido en el estado de la técnica, como una extracción de sangre.

60 El método proporcionado por esta invención, comprende la detección cuantitativa de los niveles de expresión de los genes KCNM, en particular los genes KCNMA1 y KCNMB1. Donde estos genes codifican proteínas para las unidades alfa y beta1 del canal iónico maxi-K.

El término "canal iónico maxi-K", tal y como se utiliza en esta descripción debe entender, en general, como un canal compuesto por un poro (proteína llamada subunidad alfa) y una subunidad reguladora (proteína llamada

## ES 2 296 465 B1

subunidad beta1), codificadas respectivamente por los genes KCNMA1 y KCNMB1, que permite el paso del ión potasio a través de la membrana plasmática de la célula.

5 “Leucocitos en sangre periférica” tal y como se utiliza en esta descripción debe entenderse, en general, por glóbulos blancos que circulan en la sangre, y que en su mayor parte son mononucleares del tipo de los linfocitos.

La expresión de los genes KCNMA1 y KCNMB1 puede ser evaluada por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, determinando el nivel de ARNm correspondiente a los genes KCNMA1 y KCNMB1 (ARNm de KCNMA1 y ARNm de KCNMB1).

10

En el sentido utilizado en esta descripción, “determinar el nivel de ARNm de KCNMA1 y el nivel de ARNm de KCNMB1” incluye cualquier método que permita medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de ARNm que se puede traducir en la proteína KCNMA1 y en la proteína KCNMB1 en células PBL. En este caso, el nivel de ARNm de KCNMA1 y de ARNm de KCNMB1 proporcionará información relativa al pronóstico de enfermedades vasculares como es la hipertensión arterial.

15

La determinación del nivel ARNm de KCNMA1 y ARNm de KCNMB1 puede determinarse mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante análisis Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), hibridación o microarrays.

20

En una realización del método, la expresión del ARNm de KCNMA1 y ARNm de KCNMB1 se evalúa mediante retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En una realización preferida, esta determinación se lleva a cabo usando cebadores (“primers”) de PCR que amplifican un fragmento de ADN del gen KCNMA1 seleccionados del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

25

Otra realización del método de diagnóstico comprende un par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN del gen KCNMB1, seleccionados del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

30

Otra realización más del método de diagnóstico comprende un par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN de la región reguladora del gen 28S del ARN ribosomal, seleccionados del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

35

El ARNm ribosomal de la subunidad 28S es un gen considerado “housekeeping”. Y este término “gen housekeeping” significa en esta descripción un gen cuyo nivel de expresión (en este caso el nivel de su ARNm) no varía de forma significativa para una misma persona a pesar de estar sometida a diferentes condiciones experimentales.

La invención también proporciona un método para evaluar la expresión de los genes KCNMA1 y KCNMB1 determinando el nivel de expresión de las proteínas correspondiente a dichos genes en PBL. Donde la expresión de las proteínas correspondientes a los genes KCNMA1 y KCNMB1 se realiza por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante técnicas basadas en el empleo de anticuerpos, técnicas basadas en el diagnóstico por imagen *in vivo*, citometría de flujo, proteómica, etc.

40

En realización preferida del método, la evaluación de la expresión de las proteínas se realiza mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos.

45

Un aspecto de la presente invención comprende un par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN de la región codificadora del gen KCNMA1, seleccionado del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

50

Otro aspecto de la presente invención comprende un par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN de la región codificadora del gen KCNMB1, seleccionado del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

55

Otro aspecto más de la presente invención proporciona un par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN de la región reguladora codificadora del gen 28S del ARN ribosomal, seleccionado del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

60

Aún otro aspecto más de la presente invención comprende un kit de diagnóstico de la hipertensión arterial humana en una muestra de sangre total, que comprende oligonucleótidos cebadores seleccionados del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

Otro aspecto más de la presente invención comprende el uso de los leucocitos de sangre periférica humana para evaluar el efecto de sustancias con potencial capacidad moduladora sobre la expresión de los genes que codifican canales iónicos de interés cardiovascular. El tipo de genes evaluados en el leucocito son canales iónicos de conocido interés en el área vascular y no propiamente del leucocito. Así, por ejemplo, cambios en moléculas que circulan por la sangre (como puede ser la disminución del oxígeno arterial) producen una disminución de un gen, como puede ser

65

## ES 2 296 465 B1

el KCNMB1, en las células de la capa muscular lisa vascular extraíbles por biopsia, que es idéntica al efecto que se produce sobre este mismo gen en células fácilmente extraíbles y analizables como son los PBL.

Una realización preferida de la presente invención es el uso de los PBL para cuantificar la expresión de los genes de interés cardiovascular detectados en el músculo liso vascular.

Otra realización de la presente invención es el uso de los PBL para cuantificar la expresión de genes (como por ejemplo los genes KCNM), mediante ARNm y/o proteínas, como marcadores pronósticos.

Otra realización más de la presente invención es el uso de los PBL para cuantificar la expresión de genes (como por ejemplo los genes KCNM), mediante ARNm y/o proteínas, como dianas terapéuticas.

A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones de la especificación, la palabra “comprende” y las variaciones de la misma, no pretenden excluir otros aspectos de la presente invención, que resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción.

La exposición detallada de los modos de realización y de las figuras que siguen se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

### 20 Descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra las rectas de regresión de la amplificación de los genes KCNM (KCNMA1 y KCNMB1) y 28S, a partir de las cuales se calcula la cantidad de expresión de cada gen en la muestra. Se construye con cantidades relativas de DNA complementario, por diluciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 (v/v) para los genes KCNM y diluciones 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160 para el gen 28S. c.u. es el ciclo umbral, es decir, el ciclo de la PCR cuantitativa a partir del cual empieza a detectarse el gen; y  $C_{DNA}$  es la cantidad de DNA complementario que sirve de molde en la reacción de la PCR cuantitativa.

La Fig. 2 muestra la banda de amplificación del gen KCNMB1, señalado como  $\beta 1$ , una vez amplificado por PCR cuantitativa en arteria mamaria humana (AM), en leucocitos humanos (PBL) y linfocitos humanos de una línea clónica tumoral (Jurkat).

La Fig. 3 muestra el nivel de expresión, medido por PCR cuantitativa, del gen KCNMB1 en los tipos celulares indicados (en PBL y Jurkat) tras incubación durante 24 horas en hipoxia del 1%. Al 100% de nivel de expresión de cada tipo celular tiene una normoxia del 21% de oxígeno. PBL son leucocitos en sangre periférica y Jurkat es una línea celular establecida de linfocitos humanos tumorales.

La Fig. 4 muestra el nivel de expresión, medido por PCR cuantitativa, del gen KCNMB1 en los tipos celulares indicados tras incubación durante 24 horas en hipoxia del 1%. Al 100% de nivel de expresión de cada tipo celular tiene una normoxia del 21% de oxígeno. M son miocitos arteriales, AOR-A7r5 es una línea celular establecida de aorta de rata A7r5, AOR-SMC es cultivo primario a partir de aorta de rata, ABR es cultivo primario a partir de arteria basilar de rata y AMH es cultivo primario a partir de arteria mamaria humana.

La Fig. 5 muestra correlaciones biparamétricas entre la presión arterial sistólica media (P) y la saturación arterial mínima de oxígeno ( $Sm O_2$ ), medidas en pacientes con SAOS.

La Fig. 6 muestra correlaciones biparamétricas entre el nivel del ARN mensajero (mRNA  $\beta 1$ ) del gen KCNMB1 y la saturación arterial mínima de oxígeno ( $Sm O_2$ ), medidas en pacientes con SAOS.

La Fig. 7 muestra correlaciones biparamétricas entre el nivel del ARN mensajero (mRNA  $\beta 1$ ) del gen KCNMB1 y la presión arterial sistólica media (P), medidas en pacientes con SAOS.

### Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante los siguientes ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de método y kit de diagnóstico para la hipertensión arterial humana.

#### Ejemplo 1

##### *Detección cuantitativa del ARNm de los genes KCNMA1 y KCNMB1 en PBL*

Se realizó el presente ejemplo en pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS), también llamado Síndrome de apnea/hipopnea del sueño (SAHS) o también, del inglés “obstructive sleep apnea syndrome” (OSAS).

De cada sujeto en estudio, y tras obtener el consentimiento informado, se extrajo mediante venopunción periférica 1 ml de sangre completa.

## ES 2 296 465 B1

El ARNm de los leucocitos humanos fue obtenido en la primera hora tras la extracción de la sangre mediante el kit comercial QIAamp® ARN Blood Mini kit(Qiagen) y 0,8 µg de ARN total se usó para la reacción de retrotranscripción (RT) en el volumen final de 60 µl , mediante Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La PCR cuantitativa se realizó con SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems) en una mezcla de reacción de 30 µl conteniendo: 1 x SYBR® Green PCR Master mix (que incluye ROX como fluorocromo de referencia pasiva), oligonucleótidos cebadores seleccionados de la tabla 1 (150-300 nM), y 2 µl de una dilución 1/8 (v/v) (o una dilución 1/80 (v/v) en el caso de la amplificación de 28S) del volumen final de la RT.

TABLA 1

*Oligonucleótidos cebadores (“primers”) para la amplificación por PCR*

Tipo	Nº acceso	SEQ ID NO:	Cebadores	Posición
αMaxiK	NM_002247	1	TCAGCAGATGCATGCCTGAT	1624-1643
αMaxiK	NM_002247	2	TCTCATGATATTCGAGGCATCCT	1679-1701
β1MaxiK	NM_004137	3	GTGTGCCGTCATCACCTACTACAT	475-498
β1MaxiK	NM_004137	4	CCTGGGTCCACACGCTTT	531-548
28S rARN	M11167	5	GTGACGCGCATGAATGGA	3733-3790
28S rARN	M11167	6	CCCTTGGCTGTGGTTTCG	3827-3844

Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un aparato Abiprism 7000 (Applied Biosystems) usando el siguiente programa:

- 10 min a 95°C, y a continuación 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

El ciclo de la PCR a tiempo real a partir del cual comienza el aumento de la señal fluorescente (ciclo umbral) correlaciona con la cantidad inicial de ARNm de la muestra. Así había una mayor expresión del gen cuanto más precoz es el ciclo umbral. La normalización de los valores se realizó mediante la amplificación simultánea en paralelo de un gen considerado “housekeeping” como es la subunidad 28S del ARN ribosomal.

Los productos amplificados por esta PCR se analizaron mediante el propio software del aparato Abiprism 7000. El análisis de las curvas de disociación para cada gen mostró un único pico con la temperatura de disociación esperada en todas las muestras. La cuantificación se realizó mediante la interpolación, usando una recta de regresión estándar de los valores de ciclo umbral obtenidos a partir de las diluciones seriadas 1/4, 1/8 y 1/16 (v/v) para los genes KCNMA1 y KCNMB1 (o 1/40, 1/80 y 1/160 (v/v) para el caso del gen normalizador 28S) a partir del volumen final de la RT (Fig. 1).

### Ejemplo 2

#### *Diseño del kit de diagnóstico para la hipertensión arterial humana*

En el kit diagnóstico se incluyó las parejas de oligonucleótidos cebadores, según la Tabla 1, para la amplificación de cada gen, KCNMA1 (α Maxi-K), KCNMB1 (β1 Maxi-K) y 28S del ARN ribosomal, mediante PCR cuantitativa en tiempo real, y se diseñaron con el programa Primer Express 2.0 de Applied Biosystems

## Ejemplo 3

*Regulación de la expresión de la subunidad beta1 por la tensión de O<sub>2</sub> en leucocitos humanos de sangre periférica y test beta1 en pacientes con SAHS*

Se investigó en un grupo de enfermos con SAHS, tras obtener el consentimiento informado, la correlación entre el nivel de expresión de la subunidad beta1 del canal maxi-K y la severidad de la enfermedad. Para determinar la expresión y regulación por hipoxia de la subunidad beta1 del canal maxi-K se usaron los PBL, dado que la realización de una biopsia para obtener músculo liso arterial es una técnica cruenta y no exenta de riesgos.

Los leucocitos en sangre periférica se obtuvieron sin complicaciones de sangre periférica de los sujetos estudiados, estos PBL están en contacto directo con la tensión de O<sub>2</sub> y contienen corrientes de potasio atribuibles a canales maxi-K (cf. Brink, P.R., *et al. Plugers Arch. Eur. J. Physiol* 1990, vol. 417, pp. 349-351; Ahluwalia, J *et al., Nature* 2004, vol. 427, pp. 853-856).

Tanto en PBL como en linfocitos de la línea clónica denominada Jurkat se amplificó el ARNm de la subunidad beta1 con un tamaño de banda adecuado identificado por RT-PCR (Fig. 2), que luego se confirmó mediante secuenciación de los fragmentos de la PCR.

La presencia de la proteína beta1 se confirmó mediante inmunocitoquímica usando un anticuerpo específico frente a la subunidad beta1. La exposición a hipoxia indujo en los dos tipos de leucocitos humanos un 50% de disminución de la expresión del ARNm de la subunidad beta1 (Fig. 3), un efecto similar al observado en células musculares lisas arteriales (Fig. 4).

Basándose en estos resultados, se determinó sistemáticamente el nivel de ARNm de beta1 en PBL de 10 pacientes con SAHS no tratado. Los pacientes fueron varones, con una media de edad de 45.2±2.9 años y con un índice de masa corporal de 32.8±1.3 kg/m<sup>2</sup>. Los índices de apnea-hipopnea y de desaturación fueron de 64.8±6.3 y 65±6.3, respectivamente.

Los valores medios del resto de variables medidas durante el estudio polisomnográfico individual y el estudio de registro durante 24 horas de la presión arterial se reflejan en la tabla 2. La presión arterial sistólica media de 24 horas (Fig. 5) y los niveles de ARNm de beta1 en PBL (Fig. 6, r=0.64, p<0.05) se correlacionaron, aunque en sentido opuesto, con el nivel mínimo de la saturación de O<sub>2</sub> arterial nocturna (Sm O<sub>2</sub>). Se detectó una fuerte correlación (r=0.80; p<0.01) entre los niveles de ARNm de beta1 y la presión arterial sistólica (Fig. 7).

Estos datos sugieren que la hipoxemia intermitente crónica induce una disminución de la expresión de la subunidad beta1 del canal maxi-K y este fenómeno puede conducir a hipertensión arterial.

TABLA 2

*Parámetros medidos en pacientes con SAOS durante el estudio polisomnográfico y el registro continuo durante 24 horas de la tensión arterial (media ± error estándar de la media, n=10)*

<u>Estudio del sueño</u>		<u>Monitorización de la presión sanguínea</u>	
SatO <sub>2</sub> Basal	92.8 ± 0.8	Presión sanguínea sistólica	124 ± 3.4
SatO <sub>2</sub> mín	65.9 ± 4.3	Presión sanguínea diastólica	79.1 ± 1.5
índice de desaturación	65.0 ± 6.3	Frecuencia cardíaca	78.3 ± 3.5
CT90	22.8 ± 7.4	% de lecturas sistólicas >135	21.6 ± 7.8
Índice de despertares	46.7 ± 4.7	% de lecturas diastólicas >85	31.4 ± 5.9
Índice Apnea-Hipopnea	64.8 ± 6.3		

La invención pone de manifiesto no sólo que un parámetro molecular (nivel de expresión de beta1) se correlaciona con un factor etiopatogénico (como es la hipoxia) y con una variable biológica de extrema importancia (la tensión arterial), sino que implica que cambios cuantitativos en el nivel de expresión de beta1 condicionarían las cifras de tensión arterial en humanos.

Establecer en humanos que una diferencia cuantitativa en la expresión de la subunidad beta1 del canal maxi-K se correlaciona con una diferente tensión arterial pone de manifiesto no sólo el valor como potencial marcador diagnóstico, sino el alto interés terapéutico que tendrán los fármacos que modulen al alza la expresión de dicho gen o que directamente activen la proteína que codifica.

# ES 2 296 465 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico de la hipertensión arterial humana, **caracterizado** por la detección cuantitativa de los niveles de expresión del gen KCNMB1 en leucocitos de sangre periférica de una muestra de sangre total.
2. Método según la reivindicación 1, donde la evaluación de la expresión del gen KCNMB1 se realiza determinado el nivel de ARNm correspondiente al gen KCNMB1 (ARNm de KCNMB1).
- 10 3. Método según la reivindicación 2, donde la determinación del nivel de ARNm de KCNMB1 se realiza mediante análisis Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), hibridación o microarrays.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, donde la determinación de ARNm de KCNMB1 se realiza mediante retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde se usan cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN del gen KCNMB1, seleccionados del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde se usan cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN del gen 28S del ARN ribosomal, seleccionados del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 25 7. Método según la reivindicación 1, donde la evaluación de la expresión del gen KCNMB1 se realiza determinado el nivel de expresión de las proteínas correspondiente a dicho gen.
8. Método según la reivindicación 7, donde la evaluación de la expresión de las proteínas se realiza mediante técnicas basadas en el empleo de anticuerpos, técnicas basadas en el diagnóstico por imagen *in vivo*, citometría de flujo o proteómica.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, donde la evaluación de la expresión de las proteínas se realiza mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos.
- 35 10. Par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN de la región reguladora del gen KCNMB1, seleccionado del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
11. Par de cebadores de PCR que amplifican un fragmento de ADN de la región reguladora del gen 28S del ARN ribosomal, seleccionado del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 40 12. Kit de diagnóstico cuantitativo de la hipertensión arterial humana, **caracterizado** porque comprende oligonucleótidos cebadores según las reivindicaciones 10 u 11.
- 45 13. Uso de los leucocitos de sangre periférica humana en la evaluación del efecto de sustancias con potencial capacidad moduladora sobre la expresión del gen KCNMB1.
14. Uso de leucocitos, de sangre periférica humana, para cuantificar la expresión del gen KCNMB1 y su extrapolación a lo que sucede en las células del músculo liso.
- 50 15. Uso de los leucocitos, según la reivindicación 14, para cuantificar la expresión de genes, mediante ARNm y/o proteínas, como marcadores pronósticos de la hipertensión arterial.
16. Uso de los leucocitos, según la reivindicación 14, para cuantificar la expresión de genes, mediante ARNm y/o proteínas, como dianas terapéuticas de la hipertensión arterial.
- 55
- 60
- 65

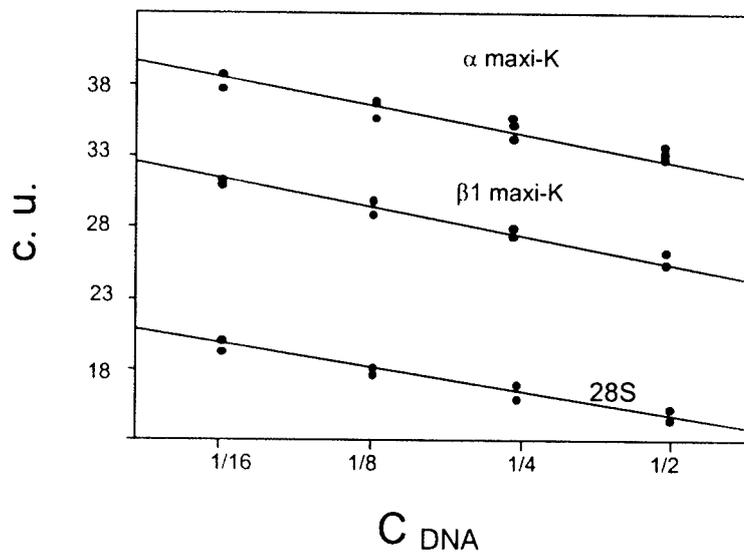


FIG. 1

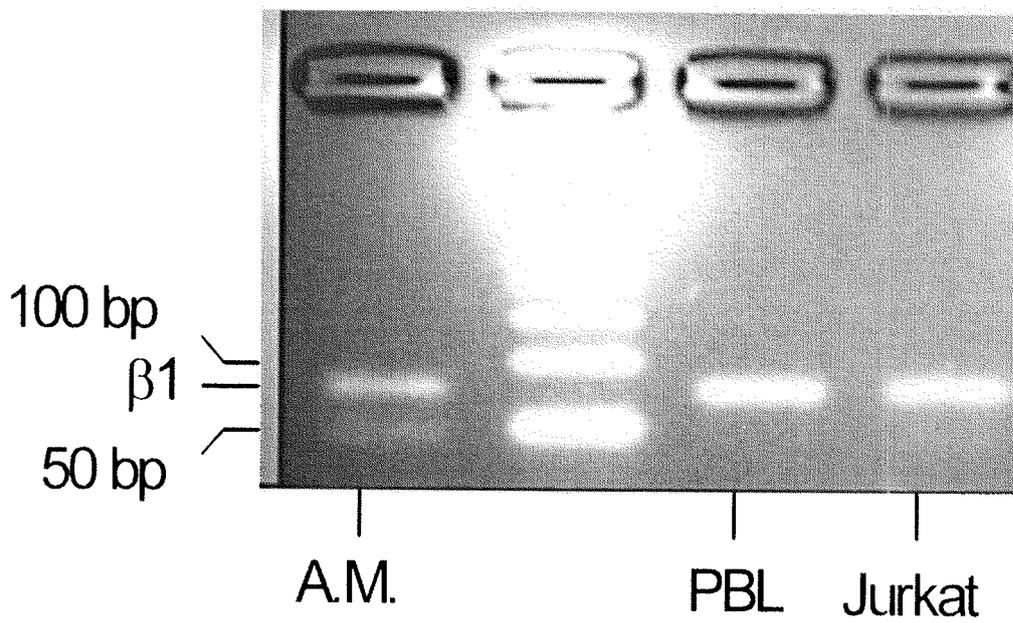


FIG. 2

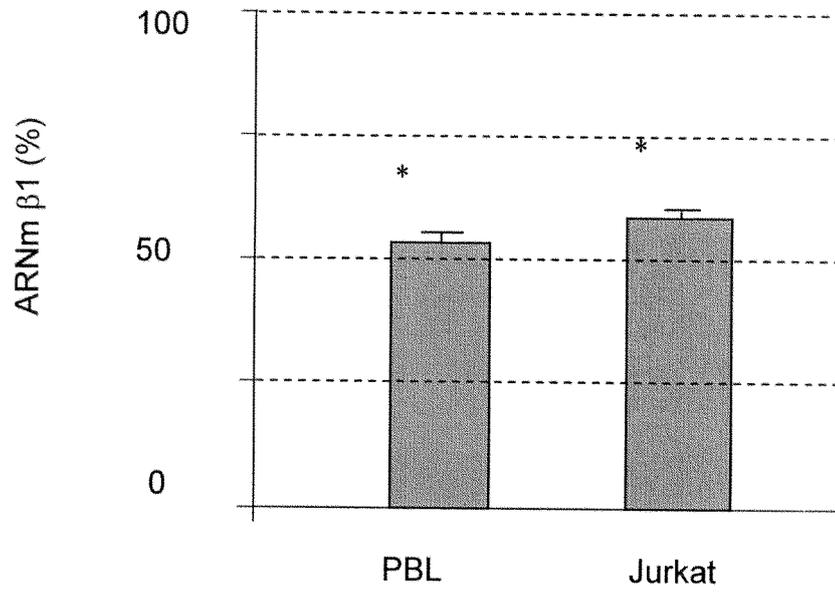


FIG. 3

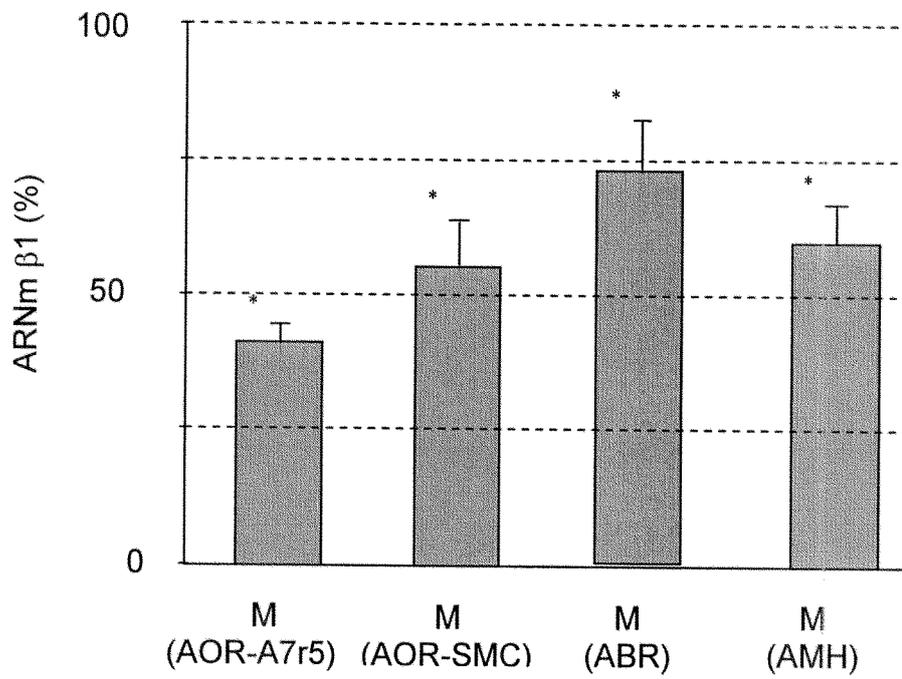


FIG. 4

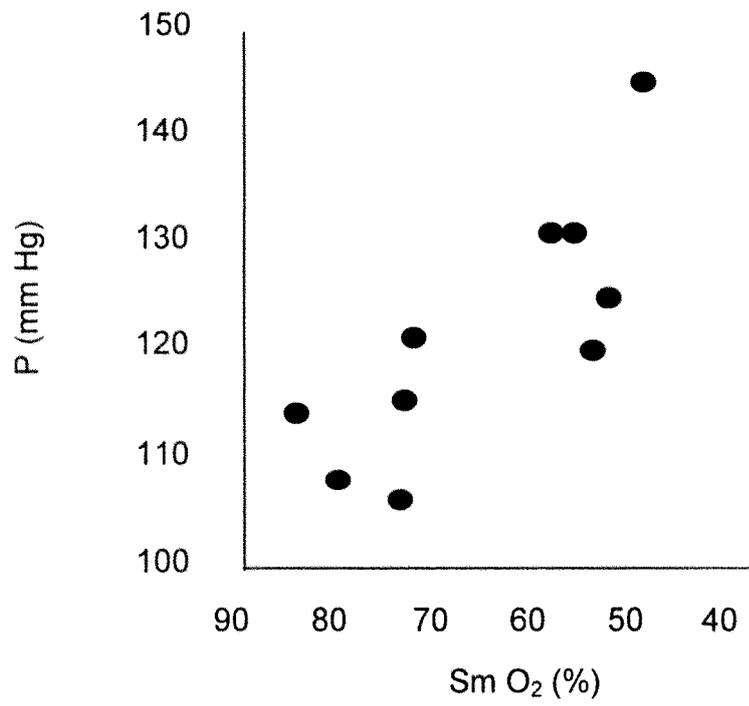


FIG. 5

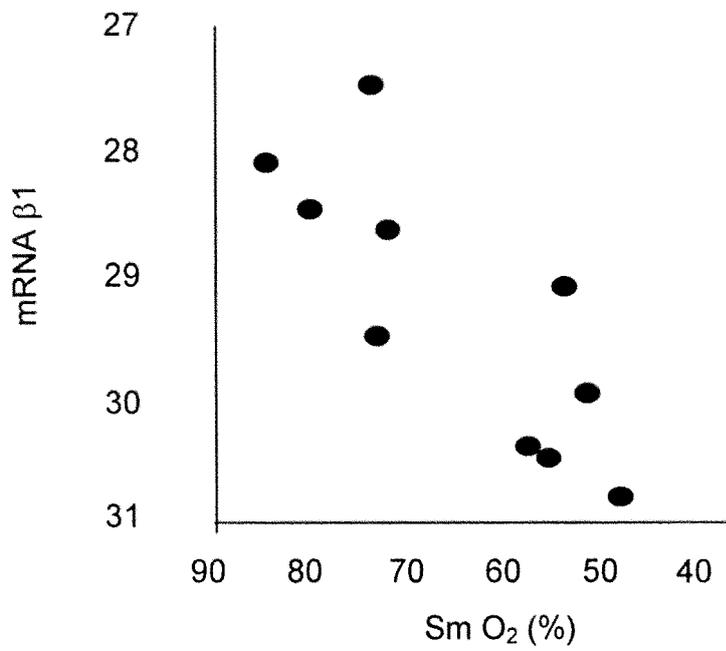


FIG. 6

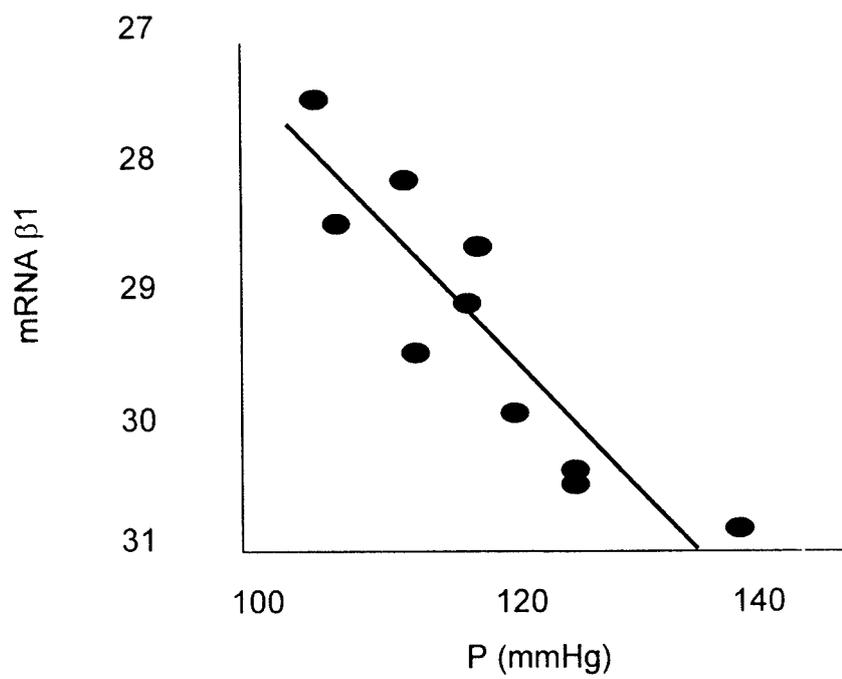


FIG. 7

# ES 2 296 465 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad de Sevilla	
5	<120> Método y kit de diagnóstico para la determinación cuantitativa de la expresión del canal maxi-K	
	<130> ES-UNIV.SEV.	
10	<160> 6	
	<170> PatentIn version 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 1	
	tcagcagatg catgcctgat	20
25	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> DNA	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
35	tctcatgata ttcaggcat cct	23
	<210> 3	
	<211> 24	
40	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
45	gtgtgccgtc atcacctact acat	24
	<210> 4	
50	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 4	
	cctgggtcca cacgcttt	18
60	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> DNA	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	

# ES 2 296 465 B1

<400> 5

gtgacgcgca tgaatgga

18

5

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

15

cccttgctg tggtttcg

18

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 296 465

② Nº de solicitud: 200502247

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	AMBERG, G. C., SANTANA, L. F. Downregulation of the BK channel b1 subunit in genetic hypertension. Circulation Research. Noviembre 2003, Vol. 93, Nº 10, páginas 965-971. ISSN 0009-7330.	10-12
A		1-9
X	HARTNESS, M. E., BRAZIER, S. P., PEERS, C. et al. Post-transcriptional control of human maxiK potassium channel activity and acute oxygen sensitivity by chronic hypoxia. The Journal of Biological Chemistry. Diciembre 2003, Vol. 278, Nº 51, páginas 51422-51432. ISSN 0021-9258.	10,11
A		1-9,12
X	TSENG-CRANK, J., GODINOT, N., JOHANSEN, T. E., et al. Cloning, expression, and distribution of a Ca <sup>2+</sup> -activated K <sup>+</sup> channel b-subunit from human brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. Agosto 1996, Vol. 93, Nº 17, páginas 9200-9205. ISSN 0027-8424.	10,11
A		12
A	FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. M., TOMÁS, M., VÁZQUEZ, E. et al. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. The Journal of Clinical Investigation. Abril 2004, Vol. 113, Nº 7, páginas 1032-1039. ISSN 0021-9738.	1-12
A	LEEuw, W. J. F., SLAGBOOM, P. E., VIJG, J. Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. 1989, Vol. 17, Nº 23, páginas 1037-1038. ISSN 0305-1048.	6,11,12

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.03.2008

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q 1/02** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12R 1/91** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)