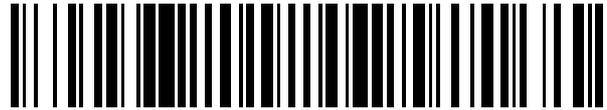


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 194**

21 Número de solicitud: 201330814

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.12.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA (15.6%)  
Centro de Patentes UB, Baldri i Reixac 4  
08028 Barcelona ES;  
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES  
AUGUST PI I SUNYER (67.6%) y  
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA (16.8%)**

72 Inventor/es:

**GOMIS BARBARÀ, Ramón y  
CANIVELL FUSTÉ, Silvia**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Métodos y kits para el diagnóstico de la diabetes tipo 2**

57 Resumen:

Métodos y kits para el diagnóstico de la diabetes tipo 2.

La invención se refiere a métodos para el diagnóstico de la diabetes tipo 2, así como los agentes antidiabéticos para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2. La invención se refiere también a kits y ácidos nucleicos para la realización de los métodos de diagnóstico.

**ES 2 524 194 A1**

## DESCRIPCIÓN

### MÉTODOS Y KITS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES TIPO 2

5

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona métodos y kits para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 mediante la determinación del patrón de metilación en el promotor del gen KCNJ11 en muestras de ADN de sangre periférica.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La diabetes tipo 2 es la forma más común de diabetes y actualmente se está convirtiendo en una pandemia de rápido crecimiento. La diabetes tipo 2 está influenciada por factores del estilo de vida, tales como la edad, la obesidad y el embarazo, pero también tiene un sólido componente genético (Ridderstrale M and L. Groop 2009. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 297:10-17). Además, estudios recientes proponen que los cambios específicos en el epigenoma se asocian con la aparición y progresión de diabetes (Pinney SE and RA Simmons. 2010. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21:223-229; Pirola L., *et al.* 2010. *Nature Reviews Endocrinology*, 6:665-675; Wren JD and Garner HR. 2005. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2005: 104-112; Slomko H., *et al.* 2012. *Endocrinology*, 153:1025-1030; Bouchard L., *et al.* 2010. *Diabetes Care*, 33:2436-2441).

25

La metilación del ADN y las modificaciones en las histonas son los principales eventos moleculares que inician y sostienen modificaciones epigenéticas. Sólo unos pocos estudios hasta la fecha han documentado alteraciones aberrantes de metilación del ADN en la diabetes tipo 2.

30

WO 2012/097903 A1 y Volkmar M., *et al.* (Volkmar M., *et al.* 2012. *EMBO J.*, 31 (6) :1405-1426) describen un método para predecir, pronosticar o diagnosticar la diabetes tipo 2 que comprende la medición del estado de metilación de uno o más sitios CpG de diferentes genes en una muestra. Dicho método revela 276 dinucleótidos CpG metilados diferencialmente en muestras de islotes pancreáticos de pacientes

35

diabéticos tipo 2 correspondientes a 254 genes. Sin embargo, dichas alteraciones no se detectan en muestras de sangre.

5 Salvo un error de laboratorio, estos pacientes son propensos a tener resultados analíticos cerca de las márgenes del umbral para el diagnóstico y permanecen sin un diagnóstico definido. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos alternativos y precisos para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 que no dependan del estado de ayuno del sujeto ni de inexactitudes de laboratorio.

## 10 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto que comprende:

15 (i) determinar el patrón de metilación en uno o más sitio(s) CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionado de aquellos sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2 en una muestra biológica de dicho sujeto que contiene material genético, y

(ii) comparar el patrón de metilación de dicho uno o más sitio(s) CpG obtenidos en la etapa (i) con el patrón de metilación de dichos sitio(s) CpG en una muestra de referencia,

20 donde

a) una disminución en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 1 en un sujeto con respecto a la muestra de referencia o

25 b) un aumento en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 2 en un sujeto con respecto a la muestra de referencia o

c) una combinación de a) y b)

es indicativo de que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de la diabetes tipo 2 en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un agente antidiabético en el que dicho sujeto muestra

a) una disminución en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 1 con respecto a la muestra de referencia,

35 b) un aumento en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 2 con respecto a la muestra de referencia,

c) una disminución en la media del nivel de metilación de los sitios CpG de la Tabla 3,

d) un aumento en la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 4,

5 e) un aumento en la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 5 o

f) una combinación de cualquiera de a), b), c), d) y e).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende al menos un  
10 oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionado de los sitio(s) CpG tal como se define en la Tabla 1 y 2 de una manera específica de metilación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que comprende al  
15 menos 9 nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11 y en el cual la secuencia de bases contigua comprende al menos un sitio CpG seleccionado entre aquellos sitios CpG tal como se define en las Tablas 1 y 2, un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11 en el cual la posición correspondiente a la C en al menos un sitio CpG es un uracilo o  
20 un polinucleótido que se hibrida específicamente a cualquiera de dichos ácidos nucleicos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la invención o del ácido nucleico de la invención para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Curva ROC de la condición de la diabetes tipo 2 según la metilación del ADN de 14-20 CpG en el promotor KCNJ11 en el ADN de sangre periférica.

**Figura 2.** Diagrama de cajas de valores de metilación de 11-28 CpG en el promotor  
30 KCNJ11 en controles con normopeso, controles con sobrepeso, sujetos con prediabetes, diabéticos tipo 1 (DM1) y pacientes con diabetes tipo 2 (DM2), en el ADN de sangre periférica.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

35

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un paciente basado en la determinación del patrón de metilación del ADN en la región promotora del gen KCNJ11 en una muestra de dicho paciente seguido de la comparación de dicho patrón de metilación con el patrón de metilación de una muestra de referencia. Este método tiene la ventaja de que es más sencillo y menos invasivo debido a que puede llevarse a cabo en sangre periférica en lugar de en una biopsia, y es independiente del estado de ayuno del paciente. Además, este método es más específico que los análisis basados en glucosa en plasma o sangre glicosilada, y es más cómodo para el paciente que una prueba de tolerancia a la glucosa oral.

Los autores de la presente invención han identificado un patrón de metilación específico relacionado con la diabetes tipo 2 en el promotor del gen KCNJ11 en sangre periférica. En concreto, 25 sitios CpG de los 27 analizados presentaron valores diferentes de metilación ( $p < 0,0001$ ) entre los pacientes con diabetes tipo 2 y los controles con sobrepeso. Además, el estudio de sujetos controles con normopeso, sujetos prediabéticos y pacientes diabéticos tipo 1 reveló que el patrón de metilación del promotor del gen KCNJ11 encontrado en pacientes diabéticos tipo 2 era exclusivo de la diabetes tipo 2. Así pues, este patrón diferencialmente metilado podría ser utilizado como un biomarcador potencial de la diabetes tipo 2. Por consiguiente, el método desarrollado por los autores de la presente invención permite un diagnóstico diferencial entre diabetes tipo 2 y diabetes tipo 1 o prediabetes.

*Método para el diagnóstico de la diabetes tipo 2.*

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto (en lo sucesivo denominado el "método de diagnóstico de la invención"), que comprende:

- (i) determinar el patrón de metilación en uno o más sitio(s) CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionados de aquellos sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2 en una muestra biológica de dicho sujeto que contiene material genético, y
- (ii) comparar el patrón de metilación de dichos uno o más sitio(s) CpG obtenido en la etapa (i) con el patrón de metilación de dichos sitio(s) CpG en una muestra de referencia,

donde

a) una disminución en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 1 en un sujeto con respecto a la muestra de referencia o

b) un aumento en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 2 en un sujeto con respecto a la muestra de referencia o

5 c) una combinación de a) y b)

es indicativo de que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

El término "determinar el diagnóstico", como se usa aquí, se refiere tanto al proceso de tratar de determinar y / o identificar una posible enfermedad en un sujeto, i.e. el  
 10 procedimiento de diagnóstico, como a la opinión alcanzada por este proceso, i.e. la opinión de diagnóstico. Como tal, también puede considerarse como un intento de clasificar la condición de un individuo en categorías separadas y distintas que permiten decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico a realizar. Como se entenderá por los expertos en la materia, el diagnóstico de la diabetes tipo 2, aunque preferible,  
 15 no tiene que ser correcta para el 100% de los sujetos a diagnosticar o evaluar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos sea identificada como que sufre de diabetes tipo 2. Se puede determinar que un sujeto es estadísticamente significativo sin más por la persona experta en la materia usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, p. ej.,  
 20 la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, prueba de la t de Student', prueba de Mann-Whitney, etc . Los detalles se encuentran en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983. Intervalos de confianza preferidos son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,05,  
 25 0,01, 0,005 o inferior.

El término "diabetes tipo 2" o "diabetes mellitus tipo 2" o "no insulino-dependiente diabetes mellitus (NIDDM)" o "diabetes del adulto", como se usa aquí, se refiere a una enfermedad caracterizada por un aumento inapropiado de los niveles de glucosa en  
 30 sangre, lo que genera complicaciones crónicas, ya que afecta a los vasos grandes y pequeños y nervios. El trastorno subyacente en esta enfermedad es la dificultad para que actúe la insulina (en forma de una pérdida de la sensibilidad de los tejidos a esta hormona), que se denomina resistencia a la insulina, y una secreción inadecuada de insulina por las células beta responsables de su producción, las células beta, en el  
 35 páncreas. Además de aumentar la concentración de glucosa, la insulina de acción

defectuosa con frecuencia se traduce en un aumento en los niveles de colesterol y / o triglicéridos.

Los criterios actuales para el diagnóstico de diabetes tipo 2 son:

- 5 - A1C  $\geq$  6.5%. La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método que es el Programa Nacional de Normalización de Glicohemoglobina ("National Glycohemoglobin Standardization Program", NGSP)-certificada y estandarizada para el ensayo DCCT ("Diabetes Control and Complications Trial"), o
- 10 - Glucosa plasmática en ayunas (GPA)  $\geq$  126 mg / dl (7,0 mmol / L). Ayuno se define como no ingesta calórica durante al menos 8 horas; o
- 15 - 2 h de glucosa en plasma (GP)  $\geq$  200mg/dL (11,1 mmol / L) durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (TGO). La prueba debe ser realizada como se describe por la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, o
- 15 - En un paciente con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglicémica, una glucosa plasmática al azar  $\geq$  200 mg / dL (11,1 mmol / L)

En ausencia de hiperglucemia inequívoca de acuerdo con los tres primeros criterios, los resultados deben ser confirmados por pruebas repetidas.

20 Sin embargo, en la práctica, una gran parte de la población diabética no es consciente de su condición. Por otro lado, puesto que hay una variabilidad preanalítica y analítica de todas las pruebas, también es posible que cuando se repite una prueba cuyo resultado sea superior al umbral de diagnóstico, el segundo valor esté por debajo del punto de corte de diagnóstico. Esto es menos probable para A1c (hemoglobina A1c),  
25 algo más probable paraGPA, y más probable para la glucosa en plasma 2 h. Salvo un error de laboratorio, estos pacientes son propensos a tener resultados de la prueba cerca de las márgenes del umbral para el diagnóstico y permanecer sin un diagnóstico definido.

30 El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a una persona, tal como un ser humano, un primate no humano (p. ej., chimpancés y otros simios y especies de monos), animales de granja, tales como aves, peces, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas. El término no  
35 denota una determinada edad o sexo. En una realización particular de la invención, el sujeto es un mamífero. En una realización preferida de la invención, el sujeto es un

humano. En otra realización, el sujeto no ha sido tratado antes de la determinación con ningún fármaco antidiabético.

5 En un primer paso, el primer método de la invención comprende la determinación del patrón de metilación en uno o más sitio(s) CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionados de aquellos sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2 en una muestra biológica de dicho sujeto que contiene material genético.

10 El término "metilación del ADN", como se usa aquí, se refiere a un proceso bioquímico que implica la adición de un grupo metilo a los nucleótidos de ADN citosina o adenina. Metilación del ADN en la posición 5 de la citosina tiene el efecto específico de reducción de la expresión de genes y se ha encontrado en todos los vertebrados examinados. En las células adultas no gametos, la metilación del ADN se produce normalmente en un sitio CpG.

15 El término "sitio CpG", como se usa aquí, se refiere a las regiones de ADN donde un nucleótido citosina se produce junto a un nucleótido guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de su longitud. "CpG" es la abreviatura de "C-fosfato-G", es decir, citosina y guanina separadas por sólo un fosfato; el fosfato enlaza dos nucleósidos cualesquiera juntos en el ADN. El término "CpG" se utiliza para distinguir esta  
20 secuencia lineal del apareamiento de bases CG de citosina y guanina. Citosinas en los dinucleótidos CpG pueden estar metiladas para formar 5-metilcitosina.

25 El término "patrón de metilación", como se usa aquí, se refiere a, pero no se limita a, la presencia o ausencia de metilación de uno o más nucleótidos. De esta manera dichos uno o más nucleótidos están comprendidos en una única molécula de ácido nucleico. Dichos uno o más nucleótidos tienen la capacidad de estar metilados o no. El término "estado de metilación" también se puede utilizar, cuando sólo se considera un único nucleótido. Un patrón de metilación se puede cuantificar, en el cual se considera más  
30 de una molécula de ácido nucleico.

El término gen "KCNJ11", como se utiliza aquí, se refiere al canal de potasio con rectificación hacia el interior, subfamilia J, gen miembro 11, con el número de acceso (ENST00000339994). El gen KCNJ11 también puede ser denominado como *BIR*,  
35 *HHF2*, *PHHI*, *IKATP*, *TNDM3* o *Kir6.2*. KCNJ11 codifica la subunidad Kir 6.2 del canal de potasio sensible a ATP, que junto con el receptor de sulfonilurea SUR1 forma un

complejo octamérico que regula la secreción de insulina estimulada por la glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas (Ridderstrale and Groop, 2009, Molecular and Cellular Endocrinology, 297:10-7 ).

5 El término "promotor", como se usa aquí, se refiere a una región de ADN que inicia la transcripción de un gen particular. Los promotores están situados cerca de los genes que se transcriben, en la misma cadena y aguas arriba en el ADN, y puede tener aproximadamente 100-1000 pares de bases de longitud. En el caso particular del promotor del gen KCNJ11, empieza en -2424 pb de la posición ATG del gen KCNJ11 y  
10 termina en -1720 pb. Tal como se define en la presente invención, la zona del promotor cubre un área de 1.000 pb antes del primer exón del gen humano KCNJ11.

El término "muestra" o "muestra biológica", como se usa aquí, se refiere a material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica contiene cualquier material  
15 biológico adecuado para detectar el patrón de metilación deseado en uno o más sitio(s) CpG y puede comprender células y / o material no celular del sujeto. En la presente invención, la muestra comprende material genético, p. ej., ADN, ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), ARN, ARN nuclear heterogéneo (ARNhn), ARNm, etc., del sujeto objeto de estudio. En una realización particular, el  
20 material genético es ADN. En una realización preferida, el ADN es ADN genómico. En otra realización preferida, el ADN es ADN circulante. La muestra se puede aislar de cualquier tejido o fluido biológico adecuado tal como, por ejemplo sangre, saliva, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), heces, un hisopo bucal o buco-faríngeo, una muestra quirúrgica, una muestra obtenida a partir de una biopsia, y una  
25 muestra de tejido incluido en parafina. Métodos para aislar células y muestras de tejidos son bien conocidos para los expertos en la materia. En una realización particular, la muestra se selecciona del grupo que consiste de sangre, orina, saliva, suero, plasma, un hisopo bucal o buco-faríngeo, cabello, una muestra quirúrgica, y una muestra obtenida a partir de una biopsia. En una realización preferida, la muestra se  
30 selecciona de sangre, suero, pelo, plasma, orina y saliva.

El término "determinación del patrón de metilación en un sitio CpG", como se usa aquí, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CpG particular. La determinación del patrón de metilación en un sitio CpG se puede realizar por múltiples  
35 procesos conocidos por la persona experta en la materia.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando la determinación del patrón de metilación de un sitio CpG particular, se lleva a cabo en una muestra de sangre entera, ésta se puede realizar directamente para la determinación de dicho sitio CpG particular. En otras realizaciones, el ácido nucleico se extrae de células que están presentes en un fluido biológico (p. ej., sangre entera, saliva, fluido sinovial, etc.) como etapa inicial y en tales casos, el ácido nucleico total extraído a partir de dichas muestras representa el material de trabajo adecuado para el análisis posterior. Aislar el ácido nucleico de la muestra puede realizarse por métodos convencionales conocidos por la persona experta en la materia. Dichos métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3 y en el protocolo comúnmente usado QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen. Después de aislar y amplificar (si es necesario) el ácido nucleico, el patrón de metilación de uno o más sitio(s) CpG es determinado. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que el análisis del patrón de metilación presente en uno o varios de los sitios CpG descritos aquí presentes en el ácido nucleico de un sujeto, se puede realizar mediante cualquier método o técnica capaz de medir el patrón de metilación presente en un sitio CpG. Por ejemplo, en el primer método de la invención se pueden detectar SNPs mediante la realización por un método seleccionado del grupo que consiste en PCR específica de metilación (MSP), un método basado en enriquecimiento (p. ej. MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y por un método basado en bisulfito (p. ej. RRBS, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethyLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), ensayo de CHIP-on-chip, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitio(s) CpG metilados del ADN.

Cuando se realiza secuenciación por bisulfito y el método basado en bisulfito, la muestra de ADN genómico se trata químicamente de tal manera que todas las bases de citosina no metiladas se modifican a bases de uracilo, u otra base que es diferente a la citosina en términos de comportamiento de emparejamiento de base, mientras las bases de 5-metilcitosina permanecen sin cambios. El término "modificar", como se usa aquí, significa la conversión de una citosina no metilada a otro nucleótido que distinguirá la citosina no metilada de la citosina metilada. La conversión de las bases de citosina no metiladas, pero no las metiladas, en la muestra de ADN se lleva a cabo con un agente de conversión. El término "agente de conversión" o "reactivo de conversión", como se usa aquí, se refiere a un reactivo capaz de convertir una citosina

no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. El agente de conversión es preferiblemente un bisulfito tal como bisulfito o sulfito de hidrógeno. Sin embargo, otros agentes que modifican de manera similar la citosina no metilada, pero no la citosina metilada también pueden ser utilizados en el método de la invención, tal como hidrógeno sulfito. La reacción se realiza de acuerdo con procedimientos estándar (Frommer et al., 1992, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89:1827-31; Olek, 1996, Nucleic Acids Res. 24:5064-6; EP 1394172). También es posible llevar a cabo la conversión enzimáticamente, p. ej. mediante el uso de citidina deaminasas de metilación específicas.

En una realización preferida del método de diagnóstico de la invención, la muestra ha sido tratada con un reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. En una realización más preferida, el agente utilizado para modificar la citosina no metilada es bisulfito de sodio.

Una vez que el ADN ha sido tratado con un bisulfito, la región que contiene uno o más sitio(s) CpG se amplifica usando cebadores que permiten distinguir la secuencia no metilada (en el que la citosina del sitio CpG se convierte en uracilo) de la secuencia metilada (en la que la citosina del sitio CpG sigue siendo citosina). Muchos métodos de amplificación se basan en una reacción en cadena enzimática tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), reacción en cadena de la ligasa polimerasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR y NASBA. Además, hay amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), y Q $\beta$ -amplificación, etc; esta lista es meramente ilustrativa y en modo alguno limitativa. Métodos de amplificación de ácido nucleico se describen en Sambrook et al., 2001 (citado at supra). Métodos de amplificación particularmente preferidos según la invención son el método de PCR específica de metilación (MSP), descrito en el documento US 5.786.146 que combina el tratamiento con bisulfito y PCR específica de alelo- (ver p. ej., los documentos US 5.137.806, US 5.595.890, US 5.639.611). El uracilo es reconocido como una timina por la Taq polimerasa y por consiguiente, tras la PCR, el producto resultante contiene citosina sólo en la posición donde existe 5-metilcitosina en el ADN molde de partida.

Detalles y particulares de los oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridarse específicamente a un polinucleótido tratados con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 se describen en el contexto del kit de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto del método de tratamiento de acuerdo con la invención.

Los productos de amplificación se detectan de acuerdo con procedimientos estándar en el estado de la técnica. El ácido nucleico amplificado se puede determinar mediante métodos analíticos estándar conocidos por la persona experta en la materia y se describen p. ej., en Sambrook et al., 2001 (citado et supra). Puede haber también etapas de purificación adicionales antes de que el ácido nucleico diana se detecte, por ejemplo una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir pero no se limitan a la unión o intercalado de colorantes específicos como el bromuro de etidio que se intercala en el ADN de doble cadena y cambia su fluorescencia después de eso. Los ácidos nucleicos purificados pueden también separarse mediante métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión de restricción y ser visualizados después. Hay también ensayos basados en sonda que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la posterior detección del híbrido. También es posible secuenciar el ácido nucleico diana después de más pasos conocidos por el experto en la materia. Otros métodos utilizan diversas secuencias de ácido nucleico a un chip de silicio al que están unidas sondas específicas y producen una señal cuando se unen a secuencias complementarias. En una realización particularmente preferida de la invención, el ácido nucleico amplificado se detecta usando la plataforma MassARRAY® (Sequenom, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) mediante una combinación de escisión de ARN específica de base (MassCLEAVE™) y espectrometría de masas MALDI-TOF. La escisión específica de base genera un patrón definido de señal de masa experimental de la muestra. Para el análisis, el modelo experimental posteriormente se compara con un patrón de señal de masa de referencia informático derivado de un individuo o un conjunto de secuencias de referencia. Las diferencias entre el patrón de señal de masa esperado y el observado se interpretan y permiten la identificación de variaciones de la secuencia.

En otra realización particular, la amplificación del ácido nucleico se lleva a cabo por PCR en tiempo real y sondas de tiempo real son utilizadas para detectar la presencia del producto de extensión. Varias versiones de sondas de tiempo real se conocen, p. ej., sondas LightCycler, Taqman, Escorpio, Sunrise, Molecular Beacon o Eclipse. Los

detalles relativos a la estructura o la detección de estas sondas son conocidos en el estado de la técnica.

5 Alternativamente, el patrón de metilación del ácido nucleico se puede confirmar mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de transferencia Southern. Ejemplos de endonucleasas de restricción sensibles a la metilación que pueden ser utilizadas para detectar la metilación CpG incluyen *SmaI*, *SacII*, *EagI*, *MspI*, *HpaII*, *BstUI* y *BssHIII*, por ejemplo.

10 En las siguientes Tablas 1 a 5, los sitios CpG se definen mediante la distancia en pares de bases desde el sitio CpG al inicio de la transcripción para el gen KCNJ11.

Sitio CpG	Posición (bp)
CpG 1	-2424
CpG 2	-2415
CpG 3	-2361
CpG 4	-2304
CpG 5	-2274
CpG 6	-2224
CpG 8	-2147
CpG 9	-2124
CpG 10	-2071
CpG 11	-1935
CpG 12	-1930
CpG 13	-1919
CpG 27	-1727

**Tabla 1:** Lista de los sitios CpG con hipometilación diferencial específica en muestras de ADN de sangre periférica.

15

Sitio CpG	Posición (bp)
CpG 7	-2174
CpG 14	-1898
CpG 15	-1895
CpG 16	-1885
CpG 17	-1873
CpG 18	-1853
CpG 19	-1851
CpG 20	-1847
CpG 21	-1840
CpG 23	-1789
CpG 24	-1781
CpG 25	-1778

**Tabla 2:** Lista de los sitios CpG con hipermetilación diferencial específica en muestras de ADN de sangre periférica.

Sitio CpG	Posición (bp)
CpG 1	-2424
CpG 2	-2415
CpG 3	-2361
CpG 4	-2304
CpG 5	-2274
CpG 6	-2224
CpG 8	-2147
CpG 9	-2124
CpG 10	-2071
CpG 11	-1935
CpG 12	-1930
CpG 13	-1919

**Tabla 3.** Lista de los sitios CpG cuya media está hipometilada en muestras de ADN de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 2.

Sitio CpG	Posición (bp)
-----------	---------------

CpG 7	-2174
CpG 14	-1898
CpG 15	-1895
CpG 16	-1885
CpG 17	-1873
CpG 18	-1853
CpG 19	-1851
CpG 20	-1847
CpG 21	-1840
CpG 23	-1789
CpG 24	-1781
CpG 25	-1778

**Tabla 4.** Lista de los sitios CpG cuya media está hipermetilada en muestras de ADN de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 2.

5

Sitio CpG	Posición (bp)
CpG 24	-1781
CpG 25	-1778

**Tabla 5.** Lista de los sitios CpG cuya media está hipermetilada en muestras de ADN de sangre periférica de pacientes diabéticos tipo 2.

10

En un segundo paso, el primer método de la invención comprende la comparación del patrón de metilación de dichos uno o más sitio(s) CpG obtenido en la etapa (i) con el patrón de metilación de dichos sitio(s) CpG en una muestra de referencia.

15

A este respecto, la invención proporciona algunos sitio(s) específicos CpG que están significativamente asociados con el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto. Por lo tanto,

a) una disminución en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 1 en un sujeto con respecto a la muestra de referencia o

20

b) un aumento en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 2 en un sujeto con respecto a la muestra de referencia o

- c) una combinación de a) y b)
- es indicativo de que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

En una realización particular, la determinación del patrón de metilación comprende la  
5 determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de las Tablas 1 y 2.

El término "muestra de referencia", como se usa aquí, significa una muestra obtenida a  
partir de un grupo de sujetos sanos que no tiene un estado de enfermedad o fenotipo  
particular. Por ejemplo, la muestra de referencia puede comprender muestras de tejido  
10 o de sangre (o lo correspondiente) de sujetos que no sufren diabetes tipo 2 o que no  
tienen una historia de diabetes tipo 2.

En una realización particular de la invención, la muestra de referencia es una muestra  
de sujetos emparejados por edad e índice de masa corporal para el sujeto analizado.  
15 En una realización preferida, el sujeto no ha recibido un tratamiento antidiabético  
previo a la obtención de la muestra. En otro ejemplo, la muestra de referencia es una  
muestra de un paciente diabético de tipo 1. En otra realización, la muestra de  
referencia es una muestra de sujetos prediabéticos.

20 En otra realización particular del método de diagnóstico de la invención, la  
determinación del patrón de metilación comprende la determinación del patrón de  
metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 3, en el que si la media del nivel de  
metilación de dichos sitios de CpG de la Tabla 3 está disminuida en un sujeto con  
respecto a la muestra de referencia indica que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

25 En otra realización particular del método de diagnóstico de la invención, la  
determinación del patrón de metilación comprende:

- a) la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla  
4,
  - 30 b) la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla  
5 o
  - c) una combinación de a) y b)
- en el cual si la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 4,  
Tabla 5 o combinación de los mismos está incrementada en un sujeto con respecto a  
35 la muestra de referencia indica que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

De acuerdo con la presente invención, el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG está incrementada cuando el nivel de metilación de dichos uno o más sitio(s) CpG en una muestra es mayor que en la muestra de referencia. El nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG se considera que es mayor que en la muestra de referencia cuando  
5 está al menos 1,5%, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% , al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65% , al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130% , al menos 140%, al menos  
10 150% o más elevado que en la muestra de referencia.

Del mismo modo, en el contexto de la presente invención, el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG está disminuido cuando el nivel de metilación de dicho uno o más sitio(s) CpG en una muestra es inferior a un valor de referencia. El nivel de metilación  
15 de uno o más sitio(s) CpG se considera que es menor que en la muestra de referencia cuando es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25% , al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75% , al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%,  
20 al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150% o más inferior a la de la muestra de referencia.

El término "la media del nivel de metilación", como se usa aquí para referirse a una región genética, se refiere al nivel medio o promedio de la metilación en dicha región,  
25 que se puede calcular como la suma de los niveles de metilación de todos los sitios CpG dentro de dicha región dividido por el número de sitios de CpG en la región. En el caso particular de las presentes realizaciones, la media del nivel de metilación se calcula para todos los sitios CpG de la Tabla 3, Tabla 4 o Tabla 5.

De acuerdo con la presente invención, la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 3, Tabla 4 o Tabla 5 está aumentada cuando la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG en una muestra es mayor que en la muestra de referencia. La media del nivel de metilación de todos los sitios CpG se considera que es mayor que en la muestra de referencia cuando es al menos 1,5%, al menos 2%, al  
30 menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20% , al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al

menos 60%, al menos 65%, al menos 70 %, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140 %, por lo menos 150% o más alto que en la muestra de referencia.

5

Del mismo modo, en el contexto de la presente invención, la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 3, Tabla 4 o Tabla 5 está disminuida cuando la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG en una muestra es inferior a un valor de referencia . La media del nivel de metilación de uno o más sitio(s)

10

CpG se considera que es menor que en la muestra de referencia cuando es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25 %, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75 %, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150 % o más inferior a la de la muestra de referencia.

15

*Agente antidiabético para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2.*

20

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un agente antidiabético para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 de un sujeto (en lo sucesivo referido como el "agente antidiabético de la invención"), en el que una muestra biológica de dicho sujeto muestra

25

a) una disminución en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 1 con respecto a la muestra de referencia,

b) un aumento en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 2 con respecto a la muestra de referencia,

c) una disminución en la media del nivel de metilación de los sitios CpG de la Tabla 3,

30

d) un aumento en la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 4,

e) un aumento en la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 5 o

f) una combinación de cualquiera de a), b), c), d) y e).

En una realización particular del método de tratamiento de la invención, dicho sujeto muestra una disminución en la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 3 con respecto a la muestra de referencia.

- 5 En otra realización particular, dicho sujeto muestra un aumento en la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 4 con respecto a la muestra de referencia, o un aumento en la media del nivel de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 5 con respecto a la muestra de referencia, o una combinación de los mismos.
- 10 Los términos "sujeto", "diabetes tipo 2", "metilación del ADN", "muestra biológica", y "sitio CpG", y sus detalles se han descrito en detalle en el contexto del método de diagnóstico de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto del método de tratamiento de acuerdo con la invención.
- 15 La persona experta en la materia comprenderá que el método de diagnóstico de la invención se puede aplicar en la presente memoria para determinar el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG del promotor del gen KCNJ11 con respecto a una muestra de referencia.
- 20 El término "antidiabético" o "agente antidiabético", como se usa aquí, se refiere a compuestos que muestran actividad antiglicémica o agentes que sensibilizan la actividad de la insulina. Estos compuestos incluyen, sin limitación, insulina y variantes funcionalmente equivalentes de la misma, secretagogos de insulina tales como las sulfonilureas (tolbutamida, clorpropamida, glipicida, glibenclamida, glicazida,
- 25 glipentide, glimepirida, glibenclamida, glipizida, gliquidona, glisentida, glimeprida y similares) y metiglinidas (repaglinida, nateglinida, mitiglinida y similares), agentes reductores de la producción hepática de glucosa (biguanidas y, en particular, metformina y buformina), agentes que causan la disminución de hidratos de carbono, tales como inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa (acarbose, miglitol o voglibosa), agentes
- 30 que aumentan el uso de la glucosa periférica, como las tiazolidinedionas (rosiglitazona, pioglitazona y similares), el GLP- o un mimético de GLP-1 (Byetta-Exanatide, Liraglutinida, CJC-1131 (ConjuChem, Exanatide-LAR (Amilina), BIM-51077, ZP-10, los compuestos descritos en el documento WO 00/07617 y similares), la exendina, secretina, inhibidores de DPP-IV (sitagliptina, saxagliptina, denagliptina, vildagliptina,
- 35 ALS-2-0426, ARI-2243, BI-A, BI-B, SYR-322, MP-513, DP-893, RO-0730699 y similares), inhibidores de SGLT-2(dapagliflozina y sergliflozin, AVE2268, T-1095 y

similares) y péptidos que provocan un aumento de la producción de glucosa (amlintide, pramlintide, exendin), compuestos con actividad GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón), inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B, inhibidores de la dipeptidil peptidasa, secretagogos de insulina; inhibidores de la oxidación de los ácidos grasos, los  
 5 antagonistas A2, inhibidores de la quinasa terminal c-jun, insulina; miméticos de insulina, inhibidores de la glucógeno fosforilasa, agonistas del receptor de VPAC2, inhibidores de la glucoquinasa, etc ).

"Variante funcionalmente equivalente de la insulina", como se usa en la presente  
 10 invención, se entiende como todos aquellos polipéptidos resultantes de la eliminación, inserción o modificación de al menos un aminoácido con respecto a la secuencia de la insulina y que mantiene sustancialmente las mismas propiedades que la insulina de la cual procede. Se puede determinar por métodos ampliamente conocidos por los expertos en la materia, tales como pinzamiento normoglucémico o la medición de las  
 15 proteínas glicosiladas en suero (Bunn et al., Diabetes, 1981, 30:613-617). Funcionalmente variantes equivalentes de insulina incluyen, sin limitación, la despentapéptido [(B26-B30)-Phe<sup>B25</sup>-α-carboxamida] insulina, insulina Asp<sup>B10</sup> (descrita en US4992417), insulina Lys<sup>B28</sup> Pro<sup>B29</sup> y las variantes hexaméricas de las mismas (descritas en US5474978 y US5514646), las formulaciones de insulina y protamina  
 20 (US5650486), insulina acilada Lys<sup>B28</sup> Pro<sup>B29</sup> (US5922675) y composiciones de insulina estabilizada, tales como las descritas en US5952297, US6034054 y US6211144, análogos superactivos de insulina, insulinas monoméricas, insulinas hepatoespecíficas, insulina lispro (Humalog®), insulina lispro formulada con insulina lispro protamina (comercializada como Humalog ®50/50<sup>TM</sup>, Humalog® 75/25<sup>TM</sup>), la  
 25 insulina NPH o insulina isofánica humana (comercializada como Humulin ®), insulina regular, insulina NPH combinada con insulina regular (US5547929), insulina zinc, insulina glargina, glulisina (APidra), insulina Aspart (Novomix), insulina detemir (Levemir), biota, LP-100, novarapid, suspensión de insulina zinc (lenta y ultralenta), GLP-I (1-36) amida, GLP-I (73-7) (insulintropina descrita en US5614492), LY-315902  
 30 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH<sub>2</sub>, AL-401 (Autoimmune), composiciones tales como las descritas en US4579730, US4849405, US4963526, US5642868, US5763396, US5824638, US5843866, US6153632, US6191105, y WO 85/05029.

El término "tratamiento" o "terapia" incluye cualquier proceso, acción, aplicación,  
 35 terapia o similares, en un sujeto, incluyendo un ser humano, que proporciona ayuda médica con el objeto de mejorar el estado del sujeto, directa o indirectamente, o

ralentización de la progresión de un estado o trastorno en el sujeto, o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno bajo tratamiento. En el caso particular del sujeto de la presente invención, un adecuado tratamiento de diabetes tipo 2 se basa en la terapia de un agente anti-diabético. Los términos "agente anti-diabético" y sus detalles se han descrito en detalle en el contexto del método de diagnóstico de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto del método de tratamiento de acuerdo con la invención.

La diabetes tipo 2 se trata inicialmente con aumento del ejercicio y modificación de la dieta para reducir los niveles de glucosa en sangre. Cuando ésto no se logra, los sujetos que sufren de diabetes tipo 2 se ponen en tratamiento antidiabético. El término "tratamiento antidiabético" o "tratamiento de la diabetes tipo 2", como se usa aquí, se refiere a un agente antidiabético que se usa para reducir los niveles de glucosa en sangre.

15

#### *Kits de la invención*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit (denominado en lo sucesivo el "kit de la invención"), que comprende al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar de manera específica de metilación a al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionado de los sitio(s) CpG tal como se define en la Tabla 1 y 2.

Los términos "sitio CpG", "gen KCNJ11", y "promotor", y sus detalles se han descrito en detalle en el contexto del método de diagnóstico de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto del kit según la invención.

Kits adecuados incluyen diversos reactivos para uso de acuerdo con la presente invención, en contenedores adecuados y materiales de embalaje, incluidos tubos, viales, y paquetes retractilados y moldeados por soplado. Además, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden estar en la forma de material impreso o en la forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de manera que puedan ser leídos por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares.

Adicionalmente o alternativamente, los medios pueden contener las direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

5 Materiales adecuados para su inclusión en un ejemplar de kit de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de los siguientes: al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio de CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionado de los sitio(s) CpG tal como se define en la Tabla 1 y 2 de una manera específica de metilación, reactivos capaces de amplificar una secuencia específica de un dominio ya sea ADN genómico o ADNc  
10 sin la necesidad de realizar la PCR; reactivos requeridos para discriminar entre los diversos alelos posibles en los dominios de secuencia amplificados por PCR o amplificación no-PCR (p. ej., endonucleasas de restricción, oligonucleótidos que hibridan preferentemente sitios CpG metilados o no metilados, incluyendo aquellos modificados para contener enzimas o grupos químicos fluorescentes que amplifican la  
15 señal del oligonucleótido y hacen que la discriminación entre sitios CpG metilados o no metilados sea más robusto); o reactivos requeridos para separar físicamente productos derivados de las diversas regiones amplificadas (por ejemplo, agarosa o poliacrilamida y un tampón para ser utilizado en electroforesis, columnas de HPLC, geles SSCP, geles de formamida o un soporte de matriz para MALDI-TOF ).

20

El término "oligonucleótido", como se usa aquí, se refiere a una molécula de ADN o ARN corta de cadena simple, con hasta 13 bases de longitud. Los oligonucleótidos de la invención son preferiblemente moléculas de ADN de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al  
25 menos 11, al menos 12, o 13 bases de longitud.

El término "polinucleótido", como se usa aquí, se refiere a moléculas de ADN o ARN de cadena simple, de más de 13 bases de longitud. Los polinucleótidos de la invención son preferiblemente moléculas de ADN de al menos 14, al menos 15, al menos 16, al  
30 menos 18, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más bases de longitud.

Tal como se usa en el kit de la invención, al menos un oligonucleótido o polinucleótido  
35 capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionado de los sitio(s) CpG tal como se define en la Tabla 1 y 2 de

manera específica de metilación se usa como un cebador para amplificar la región que contiene dichos sitio(s) CpG. Alternativamente, el oligonucleótido o polinucleótido también se puede utilizar como una sonda para detectar dichos sitio(s) CpG metilados o no metilados.

5

El término "capaz de hibridar" o "capaz de hibridar específicamente", como se usa aquí, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido de reconocer específicamente la secuencia de un sitio CpG. Como se usa aquí, "hibridación" es el proceso de combinar dos moléculas de ácido nucleico de cadena simple complementaria, o moléculas con un alto grado de similitud, y que les permite formar una sola molécula de doble cadena a través de apareamiento de bases. Normalmente, la hibridación ocurre bajo condiciones muy rigurosas o condiciones moderadamente rigurosas.

10

15

Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos moléculas de ácido nucleico se determina comparando la secuencia de nucleótidos de una molécula a la secuencia de nucleótidos de una segunda molécula. Las variantes de acuerdo con la presente invención incluyen secuencias de nucleótidos que son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% similares o idénticas a la secuencia del sitio CpG. El grado de identidad entre dos moléculas de ácido nucleico se determina utilizando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos por las personas expertas en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente mediante el algoritmo BLASTN (BLAST Manual, Altschul et al, 1990, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al, J. Mol Biol. 215.: 403-10).

20

25

"Rigurosidad" de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por un experto ordinario en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para una correcta hibridación, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse.

30

35

Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas no

tanto. Para detalles adicionales y una explicación de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

5 El término "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se usa en la presente memoria, típicamente: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo 0,015 M de cloruro de sodio/0,0015M de citrato sódico /0.1% dodecil sulfato de sodio a 50 ° C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v / v) formamida con  
10 0,1% de albúmina de suero bovino/0.1% Ficoll/0.1% polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro sódico, 75 mM citrato sódico a 42 ° C; o (3) emplean 50% de formamida, 5xSSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato sódico), 50 mM fosfato sódico (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 mg / ml), 0,1% de SDS, y  
15 10% de sulfato de dextrano a 42 ° C, con lavados a 42 ° C en 0,2 x SSC (cloruro sódico / citrato sódico) y formamida al 50%, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 xSSC que contiene EDTA a 55 ° C.

"Condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por  
20 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (p. ej., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante la noche a 37 ° C en una solución que comprende: 20% de  
25 formamida, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato sódico (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado, seguido por lavado de los filtros en 1xSSC a aproximadamente 37-50° C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. en caso necesario para adaptar factores  
30 tales como longitud de la sonda y similares.

En una realización particular, el kit comprende un primer oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con un polinucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen  
35 KCNJ11 cuando dicho sitio CpG está metilado, y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo polinucleótido tratado

con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 cuando dicho sitio CpG no está metilado.

5 Los oligonucleótidos o polinucleótidos, i.e., cebadores usados en la invención para la amplificación del ácido nucleico que contiene CpG en la muestra, después de la modificación con bisulfito para distinguir específicamente entre el ADN no tratado, ADN metilado y no metilado. Para la hibridación a un sitio CpG no metilado, los cebadores para el ADN no metilado tienen, preferiblemente, una T en el par CG en 3' para distinguirla de la C retenida en el ADN metilado, y el complemento está diseñado para el cebador antisentido. Los cebadores contienen por lo general relativamente pocas Cs o Gs en la secuencia ya que las Cs estarán ausentes en el cebador sentido y las Gs ausentes en el cebador antisentido (citosina se convierte en uracilo, que se amplifica como timidina en el producto de amplificación). En consecuencia, para la hibridación a un sitio CpG metilado, cebadores para el ADN metilado tienen  
10 preferiblemente una C en el extremo 3' del par CG.  
15

En una realización preferida, el kit comprende oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar con todos los sitios CpG del promotor del gen KCNJ11 tal como se definen en la Tabla 1 y 2 de una manera específica de metilación.  
20

En otra forma de realización preferida, el kit comprende al menos un oligonucleótido o polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de las secuencias de la SEQ ID NO: 1, SEC ID N °: 2, SEC ID N °: 3, SEC ID N °: 4, SEC ID N °: 5, la SEC ID N °: 6, SEC ID N °: 7 y SEQ ID NO: 8.  
25

En otra realización particular, el kit de la invención comprende además uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. En una realización preferida, el uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación es un bisulfito, preferiblemente bisulfito sódico. En otra realización, el reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación es metabisulfito, preferiblemente metabisulfito sódico.  
30  
35

El término "conversión de reactivo" y sus detalles se han descrito en detalle en el contexto del método de diagnóstico de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto del kit de acuerdo con la invención.

5 *Polinucleótidos de la invención*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (en lo sucesivo denominado como el "primer polinucleótido de la invención") que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11 y en el cual la  
10 secuencia de bases contigua comprende al menos uno sitio CpG seleccionado entre aquellos sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2.

En una realización particular, el primer polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos  
15 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (en lo sucesivo denominado como el "segundo polinucleótido de la invención"), que comprende al  
20 menos 9 nucleótidos contiguos de la región promotora del promotor del gen KCNJ11 en el que la posición correspondiente a la C en el al menos un sitio CpG seleccionado de los sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2 es un uracilo.

En una realización particular, el polinucleótido segundo de la invención comprende al  
25 menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (denominado en  
30 lo sucesivo el "tercer polinucleótido de la invención") que comprende un polinucleótido que se hibrida específicamente con cualquiera del primer y segundo ácido nucleico de la invención. En una realización particular, el tercer polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos.

35

Los términos y particulares de los ácidos nucleicos de la invención se han descrito en detalle en el contexto de los métodos y kits de la invención y se utilizan con el mismo significado en el contexto de los usos según la invención.

5 *Usos diagnósticos de la invención*

La persona experta en la materia entenderá que los kits y los ácidos nucleicos de la invención son particularmente útiles en el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto. Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización del kit de la  
10 invención (en lo sucesivo denominado como el "primer uso de la invención") para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto.

En una realización particular, el kit comprende un primer oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con un polinucleótido tratado con  
15 bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio de CpG del promotor del gen KCNJ11 cuando dicho sitio CpG está metilado, y al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo polinucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio de CpG del promotor del gen KCNJ11 cuando dicho sitio CpG no está metilado.

20

En una realización preferida, el kit comprende oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar con todos los sitios CpG del promotor del gen KCNJ11 tal como se definen en la Tabla 1 y 2 de una manera específica de metilación.

25 En otra forma de realización preferida, el kit comprende al menos un oligonucleótido o polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de las secuencias de la SEQ ID NO: 1, SEC ID N °: 2, SEC ID N °: 3, y SEQ ID NO: 4.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende además uno o más  
30 reactivos para convertir una citosina no metilada a uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. En una realización preferida, el uno o más reactivos para una citosina no metilada a uracilo o a otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación es un bisulfito, preferiblemente bisulfito sódico.

35

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del primer polinucleótido de la invención (en lo sucesivo denominado como el "segundo uso de la invención") para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto.

5 En una realización particular, el primer nucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del segundo polinucleótido de la invención (en lo sucesivo denominado como el "tercer uso de la invención"), para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto.

15 En una realización particular, el segundo nucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del tercer polinucleótido de la invención (en lo sucesivo denominado como el "cuarto uso de la invención"), para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto.

25 Los términos y detalles del primero, segundo, tercero y cuarto usos de la invención se han descrito en detalle en el contexto de los métodos, kits y nucleótidos de la invención y se utiliza con el mismo significado en el contexto de los usos de acuerdo con la invención.

\*\*\*

La invención se describe por medio de los siguientes ejemplos que se han de interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del alcance de la invención

30

### **EJEMPLO 1**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio y sujetos incluidos**

35

Se realizó un estudio de casos y controles para identificar las diferencias de metilación del ADN en el promotor KCNJ11 de ADN de sangre periférica. Los casos (n = 93) fueron definidos como pacientes que sufrían de diabetes tipo 2 sin ningún tratamiento farmacológico que fueron tratados sólo con dieta. Todos los casos fueron reclutados en el mismo centro de atención primaria de salud. Después del reclutamiento, se eligieron controles seleccionados al azar del Biobanco del Hospital Clínic-IDIBAPS; Barcelona, España ([http://www.clinicbiobanc.org/en\\_index.html](http://www.clinicbiobanc.org/en_index.html)). Los controles (n = 93) fueron emparejados por edad e índice de masa corporal (IMC) con los casos para el control de los factores (como la edad y el IMC) que podrían provocar posiblemente cambios en los patrones de metilación del ADN. Para cada caso, se buscó un control. Ninguno de los controles sufría de diabetes de tipo 2 o prediabetes. El diagnóstico de la diabetes tipo 2 y prediabetes se realizó siguiendo las recomendaciones de la Asociación Americana de Diabetes ("American Diabetes Association", ADA) (Standards of Medical Care in Diabetes – 2012. Diabetes Care 2011; 35 (Supplement\_1): S11-S63). La metilación del ADN de KCNJ11 en el ADN de sangre periférica se estudió para todos los sujetos (93 casos y 93 controles con sobrepeso). El perfil de metilación del promotor KCNJ11 se estudió más tarde en controles normopeso (n = 15), sujetos prediabéticos (n = 40), también emparejados por edad e IMC con los casos, y pacientes diabéticos tipo 1 (n = 21), que también fueron seleccionados del Biobanco. Este estudio fue aprobado por los comités de ética del Hospital Clínic y el Biobanco, y cumple con todas las leyes y normas internacionales de ética establecidos en la Declaración de Helsinki. Todos los seres humanos dieron, por escrito, el consentimiento informado.

## 25 **Análisis de la metilación del ADN**

La plataforma MassARRAY de Sequenom se utilizó para realizar el análisis cuantitativo de metilación del ADN (Ehrich M et al. 2005. Proc Natl Acad Sci USA, 102:15785-15790). Este sistema utiliza espectrometría de masas MALDI-TOF en combinación con la corte específica de bases de ARN (MassCLEAVE). A continuación se analiza un patrón detectable, para el grado de la metilación. Se diseñaron cebadores de PCR para la amplificación de los promotores del gen KCNJ11 utilizando Epidesigner (Sequenom). Cuando fue posible, se diseñaron amplicones para cubrir las islas CpG en la misma región que la 5' UTR. Para cada cebador inverso, se añadió una etiqueta del promotor T7 adicional para la transcripción in vivo con un inserto de 8 pb (para la prevención del ciclo abortivo y fragmento 5' constante para la reacción de RNasaA), así como una etiqueta 10-mero en el cebador directo para ajustar las

diferencias de temperatura de fusión. Los cebadores utilizados aparecen en la Tabla 6, en el que las letras mayúsculas indican la secuencia real de los cebadores.

	Secuencias de los cebadores con etiquetas adicionales	Secuencias de los cebadores sin etiquetas
<b>KCNJ11 CpGs 1-10 directo</b>	aggaagagagATGGTTAGGGGTTTTTTTTATAAGGAT (SEQ ID NO: 1)	ATGGTTAGGGGTTTTTTTTATAAGGAT (SEQ ID NO: 2)
<b>KCNJ11 CpGs 1-10 inverso</b>	cagtaatacgcactcactatagggagaaggctAAAAACTCAAACTCCC TCTCATTTAAA (SEQ ID NO: 3)	AAAAACTCAAACTCCCCTCATTTAAA (SEQ ID NO: 4)
<b>KCNJ11 CpGs 11- 28 directo</b>	aggaagagagGAGGGAGTTTGAGTTTTTTATTAGATTG (SEQ ID NO: 5)	GAGGGAGTTTGAGTTTTTTATTAGATTG (SEQ ID NO: 6)
<b>KCNJ11 CpGs 11- 28 inverso</b>	cagtaatacgcactcactatagggagaaggctAAACCCCAAAAATTCCT CCTACC (SEQ ID NO: 7)	AAACCCCAAAAATTCCTCCTACC (SEQ ID NO: 8)

**Tabla 6.** Cebadores utilizados en este estudio.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 5 µl de volumen total con 10 ng/ml de ADN tratado con bisulfito, 0,2 unidades de ADN Taq polimerasa (Sequenom), tampón de Taq suministrado 1x, y 200 mM de cebadores de PCR. La amplificación se realizó de la siguiente manera: preactivación de 95 ° C durante 15 min, 45 ciclos que consisten de 95 ° C durante 30 s, 56 ° C durante 30 s, y 72 ° C durante 30 s, terminando con una incubación de 72 °C durante 4 min. La defosforilación de dNTPs no incorporados se realizó mediante la adición de 1,7 ml de H<sub>2</sub>O y 0,3 unidades de fosfatasa alcalina de gamba (Sequenom), incubando a 37 ° C durante 40 min y después a 85 °C durante 10 min, para desactivar la enzima. La bioquímica MassCLEAVE se realizó como sigue: la transcripción in vivo y el corte del ARN se logró mediante la adición de 2 µl de producto de PCR a 5 µl de reacción de transcripción / corte e incubando a 37 ° C durante 3 h. La reacción de transcripción / corte contenía 27 unidades de ARN y ADN polimerasa de T7 (Sequenom), 0.64x de tampón R&DNA polimerasa de T7, 0,22 µl de la Mezcla de corte T (Sequenom), 3,14 mM de DTT, 3,21 µl de H<sub>2</sub>O y 0,09 mg / ml de RNasa A (Sequenom). Las reacciones se diluyeron adicionalmente con 20 ml de H<sub>2</sub>O y se condicionaron con 6 mg de resina CLEAN (Sequenom) para el análisis óptimo de espectros de masas.

## 20 **Hormonas y mediciones de citoquinas**

La adiponectina, la leptina y la insulina se cuantificaron a partir de muestras de suero por ELISA (Mercodia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las citoquinas se midieron a partir de muestras de suero utilizando el kit CBA Human Inflammatory Cytokines (BD Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Un análisis de citometría de flujo bicolor se realizó mediante el uso de LSRFortessa (BD Bioscience). Los datos se obtuvieron y analizaron mediante los programas de ordenador FACS Diva y FCAP Array 1.01.

## **Análisis estadístico**

30 Los datos descriptivos se presentan como la media y la desviación estándar (DE) para los resultados continuos, o el número y porcentaje (%) para los resultados por categorías. Los valores de metilación (en %), citoquinas, HOMA-IR, insulina, leptina y adiponectina se compararon mediante la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney, porque la normalidad y la igualdad de la varianza no se podían asumir. La prueba T de Student se usó para la comparación del resto de los resultados continuos y la prueba de Chi-cuadrado para los resultados por categorías. La correlación entre los valores de

metilación del ADN y las covariables que fueron significativamente diferentes entre los pacientes diabéticos tipo 2 y los controles con sobrepeso (glucosa en ayunas, HOMA-IR, la adiponectina en ayunas, colesterol total, IL-10 e IL-12) se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El ajuste por la enfermedad (es decir, por ser caso o control) se llevó a cabo. La corrección de Bonferroni se utilizó para comparaciones múltiples. Todas las pruebas de significación fueron bilaterales y los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa de ordenador estadístico Stata versión 11.

## 10 RESULTADOS

### **Características clínicas de los pacientes con diabetes tipo 2 y los controles emparejados por edad e IMC.**

15 El estudio del patrón de metilación del ADN de sangre periférica para el promotor de KCNJ11 se llevó a cabo en 186 sujetos, la mitad de ellos afectado por la diabetes tipo 2 (casos). Sus características basales se resumen en la Tabla 7. La mayoría de los pacientes (65%) tenían sobrepeso, el 31% eran obesos y el 4% (sólo casos) presentaron un peso normal. La edad media de los pacientes fue de 68 años y no  
 20 hubo diferencias significativas en cuanto al sexo (67% eran hombres en el grupo de casos vs 54% en el grupo de controles). El colesterol total y la adiponectina en ayunas fueron más bajos en los casos en comparación con los controles (valores medios del colesterol total de 4,77 mmol / L frente a 5,25 mmol / L, y valores medios de la adiponectina en ayunas de 7,0 g / mL frente a 10,0 g / mL,  $p < 0,0001$ ). Los estudios  
 25 epidemiológicos han demostrado que los niveles más altos de adiponectina en el suero están asociados con un menor riesgo de diabetes tipo 2 (Fagerberg B., et al. 2011. J Intern Med, 269:636-643). HOMA-IR fue mayor en los casos (2,6 frente a 1,8 en controles,  $p = 0,0001$ ). De las citoquinas analizadas, se encontraron diferencias significativas para IL 10 ( $4,1 \pm 3,0$  pg / mL en los casos vs  $5,2 \pm 3,7$  pg / mL en los  
 30 controles,  $p = 0,04$ ) e IL 12 ( $52,8 \pm 58,3$  pg / mL en los casos vs  $29,7 \pm 37,4$  pg / mL en los controles,  $p < 0,0001$ ).

Los niveles más bajos de la IL anti-inflamatoria 10 se encontraron en pacientes diabéticos tipo 2, lo cual es consistente con investigaciones anteriores que mostraron  
 35 que los niveles bajos de IL 10 se asocian con la diabetes de tipo 2 (Bluher M., et al.

2005. Exp. Clin Endocrinol Diabetes, 113:534-537; Charles BA, et al 2011 J Clin Endocrinol Metab, 96: E2018-2022).

5 Los niveles de IL-12 en suero fueron mayores en los pacientes con diabetes tipo 2 que en los controles. Un estudio reciente demostró que niveles elevados de IL-12 en suero estaban presentes en el inicio de la diabetes tipo 2, y que mayores aumentos de IL-12 se correlacionaron con la disfunción endotelial y la progresión de la enfermedad cardiovascular (Mishra M., et al. 2011. Diabetes Res Clin Pract , 94:255-261).

10 Los pacientes diabéticos tipo 2 tenían el control óptimo de la glucemia (media de hemoglobina glicosilada 5,8%).

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con diabetes tipo 2 (n=93)</b>	<b>Controles con sobrepeso (n=93)</b>	<b>P Valor</b>
<b>Características demográficas</b>			
Edad, años	69.1±9.2	66.6±11.7	variable coincidente
IMC, kg/m <sup>2</sup>	29.2±3.7	28.8±2.5	variable coincidente
Sexo masculino, (%)	66.7	53.8	0.07
Duración de la diabetes, años	6.3±5.9		
<b>Valores de laboratorio</b>			
Glucosa en ayunas, (mmol/L)	6.36±1.17	4.59±0.35	<b>&lt;0.0001</b>
Hemoglobina glicosilada, (%)	5.8±0.6		
Insulina en ayunas , (pmol/L)	55.61±28.59	52.43±21.05	0.39
HOMA-IR	2.6±1.5	1.8±0.7	<b>0.0001</b>
Leptina en ayunas, (ng/mL)	18.0±16.7	25.4±26.8	0.07
Adiponectina en ayunas, (µg/mL)	7.0±3.8	10.0±4.2	<b>&lt;0.0001</b>
Alanina aminotransferasa (ALT), (IU/litro)	13.5±7.9	14.6±7.3	0.49
Aspartato aminotransferase (AST), (IU/litro)	16.6±8.2	19.0±6.0	0.14
Colesterol Total (mmol/L)	4.77±1.03	5.25±1.08	<b>0.002</b>
Colesterol LDL (mmol/L)	2.84±0.85	2.87±0.76	0.78
Colesterol HDL (mmol/L)	1.31±0.33	1.36±0.35	0.26
Triglicéridos (mmol/L)	1.43±0.89	1.31±0.75	0.34

**Tabla 7.** Las características demográficas y clínicas de los pacientes con diabetes tipo 2 y los controles emparejados por edad e IMC. Los valores

mostrados son medias  $\pm$  DE, a menos que se indique lo contrario. Los valores de P se calcularon con la prueba t para las variables cuantitativas y la prueba Chi-cuadrado para las de categorías, excepto para HOMA-IR, insulina en ayunas, leptina en ayunas y adiponectina en ayunas, en el que se aplica el test no paramétrico de Mann-Whitney U. HOMA-IR se calculó como [Insulina mUI / l x Glucemia: (mmol / l) / 22.5].

**El análisis cuantitativo de metilación del ADN en sangre periférica identifica un patrón completamente distinto en el promotor KCNJ11 en pacientes diabéticos tipo 2 en comparación con los controles emparejados por edad e IMC.**

Los niveles de metilación en el ADN de la sangre total de 186 sujetos fueron obtenidos para 27 sitios CpG que cubren 1000 pb aguas arriba del primer exón del gen humano KCNJ11. El mapa de calor que muestra los valores de metilación (%) para cada sitio CpG analizado revela un patrón diferenciado único de metilación entre los pacientes diabéticos tipo 2 y los controles en el KCNJ11 promotor (datos no mostrados). Sorprendentemente, 25 sitios CpG de los 27 analizados (93%) presentaron valores significativamente diferentes de metilación ( $p < 0,0001$ ) entre los casos y los controles (Tabla 8).

Sitio CpG†	Posición (bp)‡	Pacientes con diabetes tipo 2 (n=93)	Controles con sobrepeso (n=93)
CpG 1***	-2424	3.3±2.0	48.3±9.8
CpG 2***	-2415	4.0±5.6	56.5±13.8
CpG 3***	-2361	1.0±1.0	46.7±14.4
CpG 4***	-2304	0.9±1.2	26.8±23.7
CpG 5***	-2274	3.8±2.0	39.9±12.7
CpG 6***	-2224	3.3±2.0	48.3±9.8
CpG 7***	-2174	20.0±3.7	10.3±2.6
CpG 8***	-2147	3.5±2.0	17.9±4.3
CpG 9***	-2124	3.0±5.6	26.9±9.8
CpG 10***	-2071	1.8±1.6	5.7±2.6
CpG 11***	-1935	0.3±0.9	0.8±2.2
CpG 12***	-1930	6.9±7.4	7.3±1.6
CpG 13***	-1919	0.6±1.4	3.2±2.0
CpG 14***	-1898	98.8±1.8	6.6±9.2
CpG 15***	-1895	98.8±1.8	6.6±9.2
CpG 16***	-1885	98.8±1.8	6.6±9.2
CpG 17***	-1873	98.8±1.8	6.6±9.2
CpG 18***	-1853	100±0	9.1±10.8
CpG 19***	-1851	100±0	9.1±10.8
CpG 20***	-1847	100±0	9.1±10.8
CpG 21***	-1840	1.7±1.7	0.3±0.6
CpG 23***	-1789	1.7±1.7	0.3±0.6
CpG 24***	-1781	94.5±4.1	11.0±9.8
CpG 25***	-1778	94.5±4.1	11.0±9.8
CpG 26	-1759	2.6±2.5	2.4±7.5
CpG 27***	-1727	4.3±2.1	5.5±2.4
CpG 28	-1720	3.9±5.5	3.0±2.4

**Tabla 8.** Valores de metilación del ADN en sangre periférica (en %) para cada sitio CpG analizado en el promotor KCNJ11 en pacientes diabéticos tipo 2 y los controles emparejados por edad e IMC. Los valores son medias  $\pm$  DE. Los valores de P se calcularon utilizando la prueba Mann-Whitney U. La significación estadística se fijó en  $p < (0.05/27 = 0.0018)$  con corrección de Bonferroni. \*\*\* Denota valor de P inferior a 0,0001. † dinucleótidos CpG se han numerado respecto al ATG. ‡ La posición del dinucleótido CpG ha sido determinada de acuerdo a la posición de ATG para el gen KCNJ11 (ENST00000339994).

5

Los primeros 13 CpGs están hipometilados en pacientes diabéticos tipo 2 (promedio metilación 4,0%, IC 95% 3.8 - 4.2) en comparación con los controles (promedio de metilación 26,0%, IC 95% 25,0-27,1,  $p < 0,0001$ ). Además, había un grado de metilación completo (100%) en la zona comprendida entre -1.898 y -1847 pb aguas

10

arriba de la posición del sitio de inicio de transcripción (“Transcription Start Site”, TSS) para el gen KCNJ11 en todos los pacientes diabéticos tipo 2. La zona comprendida entre -1781 y -1778 aguas arriba del TSS también estaba hipermetilada en todos los pacientes diabéticos tipo 2 (media de metilación del 94,5% en los casos vs 11,0% en los controles).

Para validar los resultados, se repitió el análisis de la metilación del ADN del promotor KCNJ11 en un subgrupo de 12 controles emparejados por edad e IMC, y los resultados fueron similares a los encontrados previamente en los controles (datos no presentados).

Por lo tanto, se determinó que los patrones de metilación del ADN en el promotor estudiado usando sangre periférica fueron diferentes en los pacientes diabéticos tipo 2, en comparación con los controles, y las diferencias fueron de especial relevancia en el caso del promotor KCNJ11. De hecho, el área bajo la curva para distinguir un paciente diabético tipo 2 a partir de un control emparejado por edad e IMC era igual a 100% si los valores de metilación de CpGs 14 a 20 eran iguales o superiores a 95,7% (Figura 1).

Los coeficientes de correlación de Spearman se calcularon usando los valores de metilación del ADN de las islas CpG del promotor y los factores significativamente diferentes entre los pacientes diabéticos tipo 2 y los controles (Tabla 9). La glucosa en ayunas, la adiponectina en ayunas, el colesterol total y los niveles séricos de IL 12 se asociaron significativamente con los valores de la metilación en el promotor KCNJ11. Al ajustar por la enfermedad (i.e., por ser caso o control), los únicos factores que se asociaron significativamente con los valores de la metilación en el promotor KCNJ11 eran adiponectina en los controles ( $r = 0,23$ ,  $p = 0,03$ , en CpGs 1-10) e IL 12 en los casos ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,049$ , en CpGs 11-28) (datos no mostrados).

		<b>Glucosa en ayunas</b>	<b>HOMA-IR</b>	<b>Adiponectina en ayunas</b>	<b>Colesterol total</b>	<b>IL 10</b>	<b>IL 12</b>
<b>KCNJ11 1 CpGs 1-10</b>	r	-0.72	-0.29	0.38	0.23	0.22	-0.27
	P valor	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	<b>0.0002</b>
<b>KCNJ11 1 CpGs 11-28</b>	r	0.63	0.21	-0.30	-0.21	-0.13	0.29
	P	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.005</b>	0.08	<b>0.000</b>

	valor						1
--	-------	--	--	--	--	--	---

**Tabla 9.** Coeficiente de correlación de Spearman entre la metilación del ADN y los valores de laboratorio de los pacientes diabéticos tipo 2 y los controles emparejados por edad e IMC.

**5 Análisis cuantitativo de metilación del ADN del promotor KCNJ11 en sangre periférica en los controles normopeso, sujetos con prediabetes y pacientes diabéticos tipo 1.**

A continuación, nos centramos en el estudio del promotor KCNJ11 en diferentes subgrupos de sujetos con el fin de detectar cómo y en qué dirección (hipo o hipermetilación) el patrón de metilación puede variar en relación con el fenotipo. Se estudiaron los controles normopeso de más de 50 años de edad, con el fin de determinar el patrón de metilación en los controles de peso saludable. También se investigaron los individuos prediabéticos emparejados por edad e IMC con los pacientes diabéticos tipo 2, para ver si el patrón de metilación asociado a diabetes tipo 2 aparecía gradualmente con el estado diabético. Por último, se analizaron pacientes diabéticos tipo 1 con más de 5 años de evolución para discernir si la marca epigenética encontrada dependía de un efecto crónico de la hiperglucemia. Sus características clínicas se muestran en las Tablas 10, 11 y 12.

20

<b>Sujetos prediabéticos (N= 40)</b>	<b>Glucosa en ayunas (mmol/L)</b>	<b>2 horas glucosa en plasma en el 75 gr- TTOG (mmol/L)</b>	<b>IMC</b>	<b>Edad</b>	<b>Género masculino (%)</b>
<b>IFG n= 10</b>	6.36 (0.23)	6.84 (1.06)	29.5 (0.93)	64.9 (4.36)	60%
<b>IFG +IGT n= 15</b>	5.98 (0.35)	9.12 (1.02)	28.9 (0.93)	67.1 (5.80)	87 %
<b>IGT n=15</b>	4.93 (0.37)	8.82 (0.61)	29.6 (1.29)	67.8 (5.42)	60 %

**Tabla 10.** Características clínicas de los sujetos con prediabetes. IFG denota alteración de la glucosa en ayunas. IGT denota intolerancia a la glucosa. Los valores se expresan como media (DE), a menos que se indique lo contrario.

25

<b>Diabéticos tipo 1 (N=21)</b>	<b>Glucosa en ayunas</b>	<b>Hb1c</b>	<b>Años de evolución de la</b>	<b>IMC</b>	<b>Edad, años</b>	<b>Género masculino, %</b>
---------------------------------	--------------------------	-------------	--------------------------------	------------	-------------------	----------------------------

	(mmol/L)		diabetes tipo 1 desde el diagnóstico.			
<b>Normopeso (n=11)</b>	11.41 (3.58)	10.1 (1.90)	13.6 (5.61)	21.3 (0.80)	26.0 (5.37)	36%
<b>Sobrepeso (n=10)</b>	10.52 (3.07)	8.7 (1.26)	18 (7.92)	27.8 (1.19)	30.0 (7.00)	50%

**Tabla 11.** Características clínicas de los pacientes con diabetes tipo 1. Los valores se expresan como media (DE), a menos que se indique lo contrario.

	IMC	Edad, años	Género masculino, %
<b>Control normopeso (N=15)</b>	23.1 (1.59)	66.3 (8.16)	27 %

**Tabla 12.** Características clínicas de los controles normopeso. Los valores se expresan como media (DE), a menos que se indique lo contrario.

5

En pocas palabras, los sujetos prediabéticos tenían 66,8 años de edad en promedio y tenían un IMC medio de 29,3, una media de glucemia en ayunas de 5,68 mmol / L y una media de glucosa tras TGO (prueba de tolerancia oral a la glucosa) de 8,44 mmol / L. Los pacientes diabéticos tipo 1 tenían una media de glucemia en ayunas de 10,99 mmol / L y una media de hemoglobina glicosilada de 9,4%. Sorprendentemente, el patrón encontrado en los pacientes diabéticos tipo 2 es único para pacientes diabéticos tipo 2 y no aparece gradualmente con el estado diabético, ya que está ausente en los sujetos prediabéticos. De hecho, los sujetos prediabéticos, los controles normopeso, los controles con sobrepeso y los pacientes con diabetes de tipo 1 tienen un patrón de metilación similar, especialmente en CpGs 11-28 (Figura 2). Los pacientes diabéticos tipo 2, sin embargo, presentaron una hipometilación de los CpGs 1-10 y una hipermetilación de los CpGs 14-20 y CpGs 24-25. Este patrón no parece ser secundario a los cambios en el peso o la edad. Por otra parte, un efecto crónico de la alteración en la homeostasis de la glucosa no es responsable de este patrón ya que los pacientes diabéticos de tipo 1 tampoco lo presentan.

25

## CONCLUSIONES

- Los autores han identificado un patrón de metilación específico de los pacientes con diabetes tipo 2 en el ADN extraído de sangre periférica. Dicho

patrón de metilación estaba presente en todos los pacientes con diabetes tipo 2 y no estaba presente en los pacientes con diabetes tipo 1, ni en los sujetos prediabéticos,

- 5 - Los antecedentes genéticos no fueron tampoco un factor determinante, ya que los pacientes estudiados no estaban relacionados. Los antecedentes familiares de diabetes estaban presentes en el 49% de los pacientes diabéticos tipo 2 y en el 31% de los controles, pero no tuvieron un impacto en las diferencias de metilación encontradas.
- 10 - Ninguno de los pacientes con diabetes tipo 2 estaba en tratamiento farmacológico contra la diabetes. Por lo tanto, no fue posible ningún efecto de confusión de medicamentos antidiabéticos o terapia de insulina.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diagnosticar diabetes tipo 2 en un sujeto que comprende:
- (i) determinar el patrón de metilación en uno o más sitio(s) CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionadode aquellos sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2 en una muestra biológica de dicho sujeto que contiene material genético, y
  - (ii) comparar el patrón de metilación de dichos uno o más sitio(s) CpG obtenido en la etapa (i) con el patrón de metilación de dichos sitio(s) CpG en una muestra de referencia,

donde

- a) una disminución en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 1 con respecto a la muestra de referencia o
- b) un aumento en el nivel de metilación de uno o más sitio(s) CpG seleccionados de la Tabla 2 con respecto a la muestra de referencia o
- c) una combinación de a) y b)

es indicativo de que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

2. El método según la reivindicación 1, en el cual la determinación del patrón de metilación comprende la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 3, en el cual una disminución en la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 3 con respecto a la muestra de referencia indica que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el cual la determinación del patrón de metilación comprende:

- a) la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 4,
- b) la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de la Tabla 5 o
- c) una combinación de a) y b).

y en el cual si la media del nivel de metilación de dichos sitios CpG de la Tabla 4, de la tabla 5 o la combinación de los mismos está incrementada con respecto a la muestra de referencia indica que el sujeto sufre de diabetes tipo 2.

4. El método según la reivindicación 1, en el cual la determinación del patrón de metilación comprende la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CpG de las Tablas 1 y 2.
- 5
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el patrón de metilación se mide por un método seleccionado del grupo que consiste en PCR específica de metilación ("Methylation-specific PCR", MSP), un método basado en enriquecimiento (p. ej., MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y el método basado en bisulfito (p. ej., RRBS, Infinium, GoldenGate, COBRA, MSP, MethyLight) y un método de restricción-digestión (p. ej., MRE-seq), o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitio(s) CpG metilados del ADN del promotor del gen KCNJ11 en una muestra biológica que contiene material genético en comparación con la muestra de referencia.
- 10
- 15
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual la muestra de referencia es una muestra de sujetos emparejados por edad e índice de masa corporal con el sujeto analizado.
- 20
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el sujeto no ha recibido un tratamiento antidiabético previo a la obtención de la muestra.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la muestra biológica que contiene material genético es sangre periférica, plasma o suero.
- 25
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual la muestra se ha tratado con un reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente de la citosina en términos de propiedades de hibridación.
- 30
10. Un kit que comprende al menos un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 seleccionado de aquellos sitio(s) CpG tal como se definen en la Tablas 1 y 2 de una manera específica de metilación.
- 35

11. Un kit según la reivindicación 10 que comprende un primer oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente a un polinucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 cuando dicho sitio CpG está metilado, y al menos un  
5 oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridar específicamente con el mismo polinucleótido tratado con bisulfito que comprende al menos una secuencia de un sitio CpG del promotor del gen KCNJ11 cuando dicho sitio CpG no está metilado.
- 10 12. Un kit de acuerdo con las reivindicaciones 10 o 11, que comprende oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de hibridar con todos los sitios CpG del promotor del gen KCNJ11 tal como se define en las Tablas 1 y 2 de una manera específica de metilación.
- 15 13. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente de la citosina en términos de propiedades de hibridación.
- 20 14. Un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en
- (i) Un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de la región promotora del gen KCNJ11 y en el cual la secuencia de bases contigua comprende al menos un sitio CpG seleccionado entre aquellos  
25 sitios CpG tal como se define en las Tablas 1 y 2,
  - (ii) un ácido nucleico que comprende al menos 9 nucleótidos contiguos de la región promotora del promotor del gen KCNJ11 en el cual la posición correspondiente a la C en al menos un sitio CpG seleccionado de aquellos  
sitios CpG tal como se definen en las Tablas 1 y 2 es un uracilo y
  - (iii) un polinucleótido se hibrida específicamente a cualquiera de dichos ácidos  
30 nucleicos.
15. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 o de un ácido nucleico según la reivindicación 14 para el diagnóstico de la diabetes tipo 2 en un sujeto.

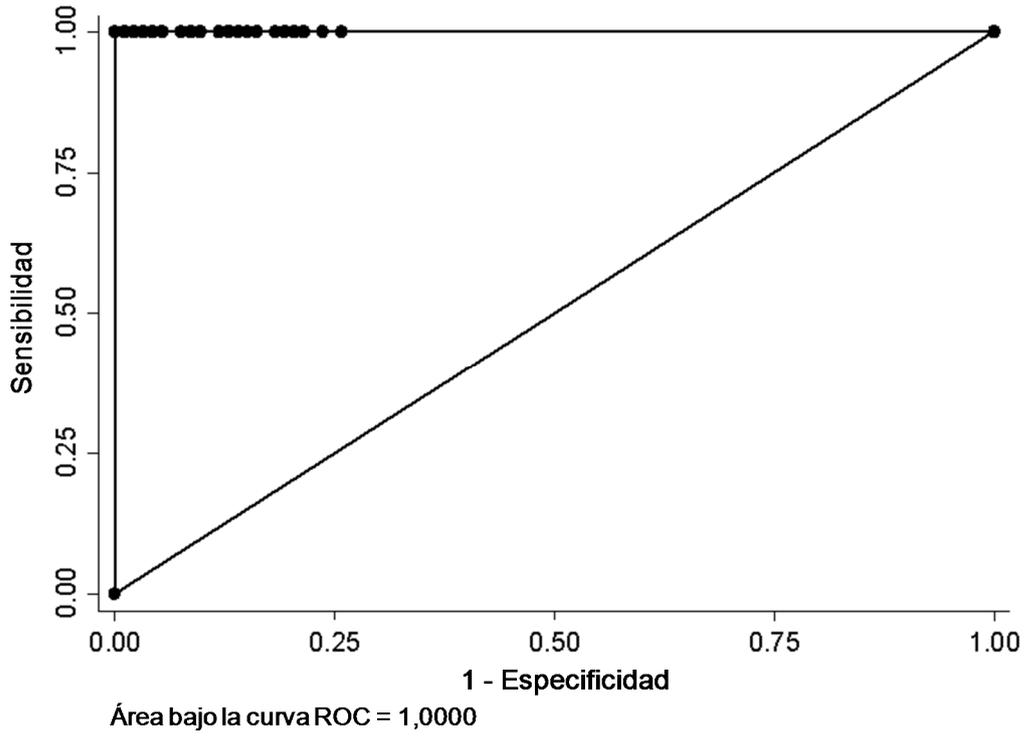


FIG. 1

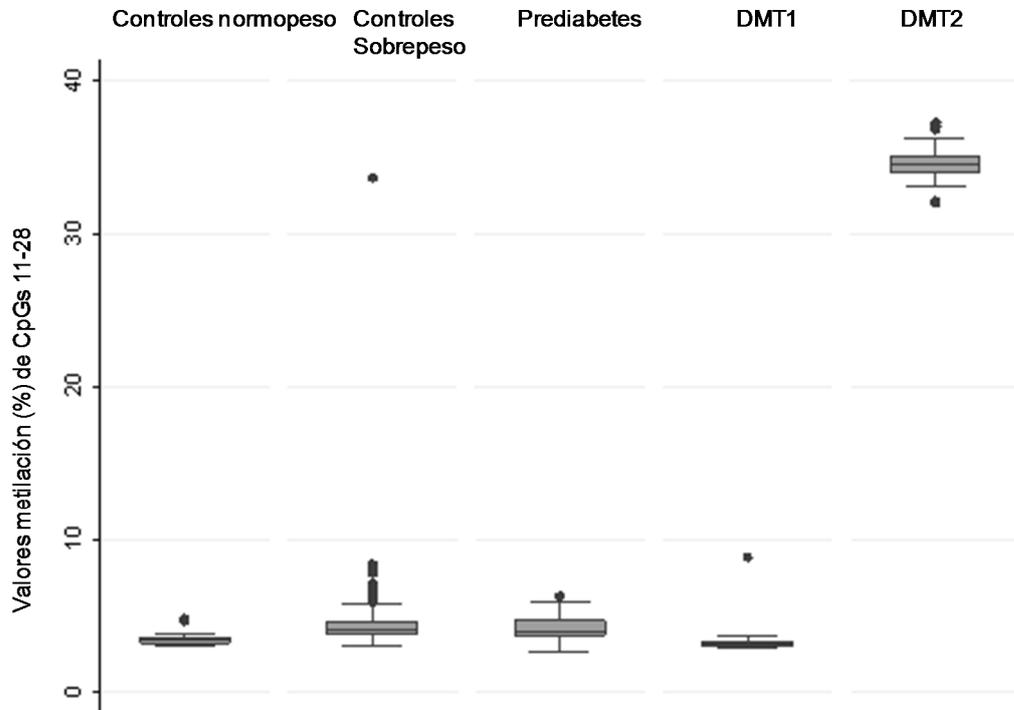


FIG. 2

# ES 2 524 194 A1

## SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITAT DE BARCELONA  
INSTITUT D'INVESTICACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER  
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA

<120> METODOS Y KITS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES TIPO 2

<130> P8995ES00

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 1-10 directo

<400> 1  
aggaagagag atggtaggg gttttttat aaggat 36

<210> 2  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 1-10 directo sin etiqueta

<400> 2  
atggtaggg gttttttat aaggat 26

<210> 3  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 1-10 inverso

<400> 3  
cagtaatagc actcactata gggagaaggc taaaaactca aactccctct cattaata 57

<210> 4  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 1-10 inverso sin etiqueta

<400> 4  
aaaaactcaa actccctctc attaaa 26

# ES 2 524 194 A1

<210> 5  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 11-28 directo

<400> 5  
aggaagagag gagggagttt gagtttttat tagattg 37

<210> 6  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 11-28 directo sin etiqueta

<400> 6  
gagggagttt gagtttttat tagattg 27

<210> 7  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 11-28 inverso

<400> 7  
cagtaatacg actcactata gggagaaggc taaacccaaa aattcctcct acc 53

<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador CpGs 11-28 inverso sin etiqueta

<400> 8  
aaacccaaaa attcctccta cc 22



- ②① N.º solicitud: 201330814  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.06.2013  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2012097903 A1 (UNIV. BRUXELLES) 26/07/2012, todo el documento.	1-15
A	VOLKMAR, M. et al., 'DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients', THE EMBO JOURNAL, 2012 Mar, Vol. 31; No. 6, Páginas 1405-1426, ISSN:1460-2075 (Electronic), doi: 10.1038/emboj.2011.503, todo el documento.	1-15
A	RIBEL-MADSEN, R. et al., 'Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes', PLOS ONE, 2012 Dic, Vol. 7, No. 12, Página e51302, ISSN:1932-6203(print), ISSN:1932-6203(electronic), doi: 10.1371/journal.pone.0051302, todo el documento.	1-15
A	BELL, C.G. et al., 'Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus', PLOS ONE, 2010 Nov, Vol. 5, No. 11, Página e14040, ISSN:1932-6203(print), ISSN:1932-6203(electronic), doi: 10.1371/journal.pone.0014040, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
09.07.2014

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/5



②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201330814

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.06.2013

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PINNEY, S.E. et al., 'Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes', TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, 2010 Apr, Vol. 21, No. 4, Páginas 223-229, ISSN:1043-2760, doi: 10.1016/j.tem.2009.10.002, todo el documento.	1-15
A	DAYEH, T. A. et al., 'Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets', DIABETOLOGIA, 2013 May, Vol. 56, No. 5, Páginas 1036-1046, ISSN:1432-0428 (Electronic), doi: 10.1007/s00125-012-2815-7, Epub.: 06/03/2013, todo el documento.	1-15
A	SIMMONS, R. A., 'Programming of DNA methylation in type 2 diabetes', DIABETOLOGIA, 2013 May, Vol. 56, No. 5, Páginas 947-948, ISSN:1432-0428 (Electronic), doi: 10.1007/s00125-013-2866-4, Epub.: 06/03/2013, todo el documento.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
09.07.2014

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/5

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.07.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2012097903 A1 (UNIV. BRUXELLES)	26.07.2012
D02	Volkmar, M. et al., <i>EMBO J.</i> , (2012 Mar), 31(6): 1405-26.	2012 Mar
D03	Ribel-Madsen, R. et al., <i>PLoS One</i> , (2012 Dic), 7(12): e51302.	2012 Dic
D04	Bell, C.G. et al., <i>PLoS One</i> , (2010 Nov), 5(11): e14040.	2010 Nov
D05	Pinney, S.E. et al., <i>Trends Endocrinol. Metab.</i> , (2010 Apr), 21(4): 223-9.	2010 Apr
D06	Dayeh, T. A. et al., <i>Diabetologia</i> , (2013 May), 56(5): 1036-46.	2013 May
D07	Simmons, R. A., <i>Diabetologia</i> , (2013 May), 56(5): 947-8.	2013 May

En D01-D07 se difunden procedimientos de diagnóstico de la diabetes tipo 2 basados en el análisis del patrón de metilación del ADN genómico.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicación independiente 1 y 10.

1.1.1. El objeto de las reivindicación independiente 1 consiste en un procedimiento para diagnosticar diabetes tipo 2 (T2D, 'Type 2 Diabetes') en un sujeto que comprende determinar el patrón de metilación en uno o más sitios CpG definidos en las tablas 1 y 2 del promotor del gen *KCNJ11*, y compararlo con el patrón de metilación de dichos sitios en una muestra de referencia, de manera que la disminución en el nivel de metilación de uno o más sitios seleccionados en la tabla 1, el aumento en el nivel de metilación de uno o más sitios seleccionados en la tabla 2 o una combinación de ambos es un resultado indicativo de que el sujeto sufre T2D. Además, según la reivindicación 2, la muestra biológica es sangre periférica, plasma o suero. El objeto de la reivindicación 10 es un kit que se caracteriza porque comprende oligonucleótidos capaces de hibridar con la secuencia de al menos uno de los sitios CpG referidos en el procedimiento de la reivindicación 1.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D10, se han divulgado procedimientos para el diagnóstico de T2D basados en el análisis de cambios epigenéticos en T2D, en particular, de cambios en el perfil de metilación diferencial de regiones de ADN en muestras de sujetos con T2D y sanos. Aunque dichos procedimientos implican el uso de microarrays en los que el gen *KCNJ11* está incluido, sin embargo, ninguno comparte las características técnicas del procedimiento reivindicado en la solicitud, pues no relacionan de manera específica los cambios en el perfil de metilación del promotor del gen *KCNJ11* con T2D. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando la información descrita previamente en este campo de la técnica. Por consiguiente, el método reivindicado en la solicitud de patente se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D07.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-15 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.