

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 338 515**

21 Número de solicitud: 200803174

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **06.11.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2010**

Fecha de la concesión: **01.09.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **14.09.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.09.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 80 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) (Titular al 20 %)

72 Inventor/es: **Ojeda Fernández, María Luisa;**
Botella Cubells, Luisa María;
Barrios, Laura y
Bernabéu Quierante, Carmelo

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método de detección de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.**

57 Resumen:

Método de detección de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.

Método para la detección de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) que comprende el análisis *in vitro* de los productos de la expresión de los genes ENG o FLT1 y ENG o ANGPT2 en muestras biológicas de pacientes y que, además, permite sub-clasificar las variantes HHT1 y HHT2 de la enfermedad. En particular, la presente invención se refiere a un kit para la detección molecular de HHT capaz de llevar a cabo la detección mencionada anteriormente.

ES 2 338 515 B1

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

DESCRIPCIÓN

Método de detección de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.

5 La presente invención se refiere a un método para la detección de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) que comprende el análisis *in vitro* de los productos de la expresión de los genes *ENG* o *FLT1* y *ENG* o *ANGPT2* en muestras biológicas de pacientes y que, además, permite sub-clasificar las variantes HHT1 y HHT2 de la enfermedad. En particular, la presente invención se refiere a un kit para la detección molecular de HHT capaz de llevar a cabo la detección mencionada anteriormente.

10

Estado de la técnica anterior

15 La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT), también conocida como síndrome de Osler-Weber-Rendu es una enfermedad vascular autosómica dominante (Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM 187300), asociada con frecuentes epistaxis, hemorragias gastrointestinales y cerebrales, telangiectasias, y malformaciones arteriovenosas en pulmón, hígado y cerebro (Guttmacher y col., 1995; Shovlin y Letarte, 1999). La penetrancia de la enfermedad varía con la edad, aumentando los síntomas de displasia conforme aumenta la edad del enfermo, siendo aproximadamente del 90% a los 45 años. Las telangiectasias de los pacientes de HHT muestran un ensanchamiento de las vénulas postcapilares, desapareciendo eventualmente la red capilar, y estableciéndose, por tanto, una conexión directa entre arteriolas y vénulas. Los estudios más recientes indican que la prevalencia media de la HHT se halla en torno a 1/5.000-1/8.000, siendo mayor en ciertas regiones como la isla de Funen en Dinamarca, la región de Jura en Francia, o la isla de Bonaire en las Antillas holandesas (Kjeldsen y col., 1999; Plauchu y col., 1989; Shovlin y Letarte, 1999). Esta enfermedad se produce por mutaciones en heterocigosis en al menos 4 loci. Los primeros loci en ser identificados fueron *endogлина* (*ENG*), situado en el cromosoma 9 (McAllister y col., 1994) y *ALK1*, situado en el cromosoma 12 (Johnson y col., 1996), dando lugar a las HHT tipo 1 y 2 respectivamente. En torno a un 90% de los enfermos de HHT presentan una mutación en uno de estos dos genes. Los síntomas clínicos de las variantes HHT1 y HHT2 son muy parecidos, pero su correcto diagnóstico es importante en la elección del screening y seguimiento. La prevalencia de la HHT1 sobre la HHT2 es mayor en Canadá, USA y Norte de Europa; además, en esta variante la edad de comienzo de la enfermedad es más temprana y las malformaciones arteriovenosas en pulmón aparecen con mayor frecuencia que en la HHT2. En cambio, el sangrado gastrointestinal y la afectación hepática son más frecuentes en la variante HHT2 que en la HHT1 (Berg y col., 2003, Abdalla y Letarte, 2006; Letteboer y col. 2006). Además la HHT2 es más frecuente que la HHT1 en los países mediterráneos (España, Francia e Italia). Recientemente se han descrito un tercer y cuarto locus situados en los cromosomas 5 (Colé y col., 2005) y 7 (Bayrak-Toydemir y col., 2006) que serían responsables de la HHT3 y HHT4 respectivamente, aunque los genes afectados aún se desconocen.

40 Tanto *endogлина* como *ALK1* son proteínas que se expresan fundamentalmente en células endoteliales (Bourdeau y col., 1999; Oh y col., 2000) y su expresión se ha visto aumentada en estas células en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa (Duff y col., 2003, Fonsatti y col., 2003, Goumans y col., 2003). Debido a su implicación en el desarrollo cardiovascular, los ratones *knock out*, tanto de *Eng* como de *Alk1*, mueren en el proceso de gestación (Li y col., 1999, Oh y col., 2000). *Endogлина* y *ALK1* forman parte del complejo receptor de TGF-beta, que pertenece a una superfamilia de citoquinas relacionadas capaces de regular una multitud de procesos celulares como proliferación, diferenciación, motilidad, adhesión y muerte celular (Massagué, 1990; Shi y Massague, 2003). La familia de TGF-beta controla y regula la homeostasis, desarrollo y reparación de los distintos tejidos del organismo. Uno de los procesos fundamentales regulados por TGF-beta es la angiogénesis (Pepper, 1997). La angiogénesis supone la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Este proceso es fundamental en embriogénesis, cicatrización de heridas, crecimiento de tumores y patologías inflamatorias (Risau, 1997). *Endogлина* juega un importante papel en la angiogénesis (Duff y col., 2003; Jerkic y col., 2006a) y es precisamente en estos procesos fisiopatológicos donde se han detectado altos niveles de expresión de *endogлина* (Fonsatti y col., 2003; Duff y col., 2003). *Endogлина* también regula la homeostasis vascular (Jerkic y col., 2004; Toporsian y col., 2005; Jerkic y col., 2006b) y en este contexto, recientemente, se ha descrito un papel funcional para una forma soluble de *endogлина* (sEng) presente en pacientes embarazadas con preeclampsia (Levine y col., 2006, Luft, 2006, Venkatesha y col., 2006, Lopez-Novoa, 2007, Lim y col., 2008). Niveles elevados en suero del receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (VEGF-R1/sFlt1) y de sEng se han encontrado en mujeres con preeclampsia (Levine y col., 2006, Lim y col., 2008).

55

Angiopoiteina-2 (Ang-2) es otro factor soluble en el plasma implicado en angiogénesis y preeclampsia (Hirokoshi y col., 2007; Shim y col., 2007). El hecho de que los niveles de expresión de Ang-2 en pacientes con HHT se encuentren disminuidos aproximadamente a la mitad con respecto a los niveles en donantes sanos indica una potencial relevancia funcional de este factor en HHT (Fernandez-L, 2007).

60

65 Actualmente, para la detección de HHT se suele emplear un perfil clínico consensuado que se conoce como el criterio de Curaçao, desarrollado por el Comité consultivo científico de la Fundación de la HHT (Shovlin y col., 2000). Este criterio incluye cuatro rasgos: epistaxis (sangrados espontáneos de las fosas nasales); telangiectasias (en sitios característicos, tales como los labios, la cavidad bucal, los dedos, y la nariz); malformaciones arteriovenosas en órganos internos (AVMs) en pulmón, en cerebro, en hígado o en la médula espinal); y antecedentes familiares. La diagnosis de HHT se establece, si tres de estos criterios están presentes. Si se cumplen uno o dos criterios, se recomienda la determinación de la mutación genética. Sin embargo, la disposición de un servicio de diagnóstico basado en la secuenciación es controvertida por el predominio de mutaciones nuevas en individuos afectados (al menos en *ENG* y

ES 2 338 515 B1

ALK1) y de dificultades en la detección de mutaciones en heterocigosis, especialmente cuando un solo cambio en una base permite la detección de la enfermedad.

Explicación de la invención

5

La presente invención, basada en la detección de niveles de algunos componentes solubles en muestras de sangre es una herramienta útil para diagnosticar de manera sencilla, rápida y eficaz la HHT y discriminar entre sus formas HHT1 y HHT2.

10

Dicho método comprende la obtención de una muestra de sangre de sujetos susceptibles de padecer HHT, la detección de los componentes solubles del plasma sEng y sFlt1 o sEng y Ang-2 en dicha muestra, y la comparación de la cantidad detectada de dichos componentes solubles con una cantidad de referencia observada en un grupo control de individuos sanos.

15

Como consecuencia de este análisis, los investigadores pudieron determinar que los niveles de sEng, sFlt1 y Ang-2 se encuentran disminuidos significativamente en pacientes con HHT con respecto al grupo control. Además, los niveles de sEng y Ang-2 presentan diferencias significativas entre los pacientes con las formas de la enfermedad HHT1 y HHT2.

20

Mediante un análisis discriminante usando como variables sEng, sFlt1 y Ang-2, los investigadores fueron capaces de realizar una detección diagnóstica de HHT en sujetos donde la mutación en ENG o ALK1 había sido identificada, pudiendo analizar el comportamiento de sEng y Ang-2 en el plasma de ambos subtipos de HHT. En primer lugar, niveles reducidos de sEng y de sFlt1 permitieron establecer la condición “enfermo de HHT” con una probabilidad del 95%. Para distinguir entre las variantes HHT1 y HHT2, los investigadores consideraron en el análisis discriminante los niveles de expresión de sEng y Ang-2, pudiendo discriminar entre las condiciones “enfermo de HHT1” o “enfermo de HHT2” con una probabilidad del 80%.

25

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección de Telangiectasia Hereditaria Hemorrágica (HHT) que comprende:

30

a. obtención de una muestra biológica,

35

b. detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* o *ENG* y *ANGPT2* en la muestra obtenida en (a) y

c. comparación de la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

40

El método de la presente invención permite la detección y la sub-clasificación de la HHT. Preferiblemente, es un método “*in vitro*”. Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante este método. Preferiblemente, los pasos (b) y/o (c) del método pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (b).

45

El término “detección” según se utiliza en la presente invención se refiere a la capacidad de discriminar entre muestras HHT y no HHT (sanas) y/o entre muestras HHT1 y HHT2, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* o *ENG* y *ANGPT2* y en la comparación de la cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student, funciones discriminantes de Fisher, etc. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

50

El término “muestra biológica”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente, la muestra biológica es un fluido biológico, como por ejemplo, pero sin limitarse, sangre, plasma, orina, saliva, etc. De preferencia, el fluido biológico utilizado es plasma.

55

El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente humanos. Específicamente, el sujeto es sospechoso de sufrir HHT. Más específicamente, esta sospecha está basada en el cumplimiento de dos o más criterios de Curaçao.

ES 2 338 515 B1

El término “producto de la expresión”, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína). O a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o expresión. Preferiblemente, el producto de expresión de los genes es la proteína (endoglina, Flt1 o Ang-2). Más preferiblemente, la proteína está en su forma soluble (sEng, sFlt1 o Ang-2).

La detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes en la muestra obtenida, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de la expresión del gen basada en una señal que se obtiene directamente del producto de la expresión del gen y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de la expresión del gen presente en la muestra. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* o *ENG* y *ANGPT2* puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes. En una realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de ARNm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de mareaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

En una realización más preferida, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* o *ENG* y *ANGPT2* en la muestra obtenida se realiza determinando el nivel de las proteína codificada por los genes (endoglina, Flt1, Ang-2), las formas solubles de las proteínas (sEng, sFlt1, Ang-2) o fragmentos de las mismas, mediante la incubación con un anticuerpo específico, por ejemplo, mediante Western blot, geles de electroforesis, chips de proteína, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

El término “anticuerpo” tal y como se utiliza en la presente invención incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de la expresión del gen, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con la misma o que pueda derivarse de ésta. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión de los genes especificados obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de la expresión del gen de la muestra biológica a analizar con una cantidad de una fuente de referencia deseable descrita en otra parte de esta descripción. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad del producto de expresión que permite asignar las condiciones de individuo sano o individuo enfermo de HHT, HHT1 o HHT2. Preferiblemente, dicha cantidad de referencia define una cantidad umbral. Las cantidades de referencia o umbrales adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, la cantidad umbral puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad umbral fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media del producto de la expresión del gen encontrado en una población de sujetos control determinado mediante el método de la presente invención.

En una realización preferida la presente invención se refiere, pero no se limita, a la detección de la cantidad del producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* en muestras biológicas de pacientes sospechosos de sufrir HHT y en la comparación de la cantidad detectada en dichas muestras con una cantidad de referencia. Preferiblemente, una cantidad detectada de sEng y sFlt1 menor que la cantidad de referencia es indicativa de la condición de enfermo de

HHT. Más preferiblemente, las cantidades de referencia de sEng y sFlt1 vienen determinadas por las combinaciones lineales obtenidas en un análisis discriminante de Fisher. Más preferiblemente, la cantidad de referencia de sEng es igual o superior a 3.8 ng/ml y la cantidad de referencia de sFlt1 es superior a 60 pg/ml, permitiendo la detección de la enfermedad con una probabilidad del 95%. En cualquier caso, cantidades de referencia algo superiores a las citadas permitirían igualmente la detección con una probabilidad de acierto menor.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere, pero no se limita, a la detección de la cantidad del producto de la expresión de los genes *ENG* y *ANGPT2* en muestras biológicas de pacientes sospechosos de sufrir HHT y en la comparación de la cantidad detectada en dicha muestra con una cantidad de referencia. Preferiblemente, una variación de la expresión de sEng y Ang-2 con respecto a una cantidad de referencia permite discriminar entre HHT1 y HHT2. Más preferiblemente, la cantidad detectada de sEng en individuos HHT1 es menor que en individuos HHT2 y la cantidad detectada de Ang-2 en individuos HHT2 es menor que en individuos HHT1. Aún más preferiblemente, las cantidades de referencia de sEng y Ang-2 vienen determinadas por las combinaciones lineales obtenidas en un análisis discriminante de Fisher.

Otro aspecto de la presente invención es un kit o dispositivo adaptado para llevar a cabo el método de detección de HHT que comprende los elementos necesarios para:

- a. analizar el producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* y/o *ENG* y *ANGPT2* en la muestra obtenida; y
- b. comparar las cantidades detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Dicho kit puede comprender cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para analizar la variación en el nivel de expresión de los genes *ENG* y *FLT1* y/o *ENG* y *ANGPT2* por medio de cualquiera de los métodos descritos en anteriormente en este documento. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el Kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de detección de HHT.

Una realización preferida de la presente invención consiste en un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de ARNm mediante una técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: análisis Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa en tiempo real (RT-LCR), hibridación o microarrays.

Otra realización preferida de la invención lo constituye un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de ARNm que consiste, a título ilustrativo y sin que limite la invención, en un microarray de ADN, un gene-chip de ADN o un chip microelectrónico de ADN, que comprenda sondas génicas.

Otra realización preferida de la invención lo constituye un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de proteína mediante una técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: ELISA, Western blot y un dispositivo tipo biochip o microarray de proteínas que incluyan anticuerpos específicos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra los niveles de Ang-2 en plasma de individuos de referencia, pacientes diagnosticados como HHT 1 y pacientes diagnosticados como HHT2.

Figura 2. Muestra los niveles de sEng en plasma de individuos de referencia, pacientes diagnosticados como HHT 1 y pacientes diagnosticados como HHT 2. Los círculos indican individuos fuera de rango.

Figura 3. Muestra los niveles de sFlt1 en plasma de individuos de referencia, pacientes diagnosticados como HHT 1 y pacientes diagnosticados como HHT 2. El asterisco indica un individuo extremo.

Figura 4. Muestra el gráfico de dispersión del análisis discriminante usando la combinación de niveles en plasma de Ang-2 y sEng.

ES 2 338 515 B1

Figura 5. Muestra el gráfico *plot* de distribución de los niveles de sFlt1 en plasma de la población de referencia y la población HHT. La línea horizontal representa el umbral que diferencia ambos grupos.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Se evaluaron los niveles de Angiopietina 2 (Ang-2) y sEng en un total de 20 pacientes de HHT. Nueve de ellos eran HHT tipo 1 y los otros 11, HHT2. Para establecer los rangos normales en población no HHT, se analizaron también los niveles en plasma de sEng y Ang-2 en 14 voluntarios sanos. También se analizaron los niveles en plasma de sFlt1 en 8 pacientes de HHT (sin distinguir entre HHT1 y HHT2) y en 8 voluntarios sanos. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes en el estudio. El protocolo de análisis se aprobó por el comité de ética de nuestro instituto. Todos los pacientes que se incluyeron en el estudio estaban clínicamente diagnosticados de acuerdo a los criterios de Curaçao y la mutación genética se identificó por secuenciación. Los fumadores fueron excluidos del estudio.

25 Ejemplo 2

La descripción genética de todos los pacientes HHT que han participado en el análisis de sus niveles en plasma de Ang-2 y sEng soluble, se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Descripción genética de los pacientes de HHT cuyo plasma fue analizado para sEng y Angiopietina 2

Código	Tipo de HHT	Locus	Exón mutado	Mutación	Tipo de mutación
45,03,06	HHT1	ENG	Exón 10	c.1365C>A	Sin sentido
45,01,06	HHT1	ENG	Exón 10	c.1365C>A	Sin sentido
45,02,06	HHT1	ENG	Exón 10	c.1365C>A	Sin sentido
45,05,07	HHT1	ENG	Exón 10	c.1365C>A	Sin sentido
45,04,07	HHT1	ENG	Exón 10	c.1365C>A	Sin sentido
89,01,07	HHT1	ENG	Exón 5	c.659T>A	Sin sentido
49,02,07	HHT1	ENG	Exón 6	c.771dupC	Sin sentido
LSB	HHT1	ENG	Exón 3	c.277C>T	Sin sentido
AHF	HHT1	ENG	Exón 10	c.1360_1361 insT	Sin sentido
57,01,06	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1135G>A	Cambio de aminoácido
56,01,06	HHT2	ALK1	Exón 7	c.921_927dupATGCGGC	Cambio de aminoácido
46,02,06	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1232 G>A	Cambio de aminoácido
38,01,05	HHT2	ALK1	Exón 9	c.1261 T>G	Cambio de aminoácido
16,03,04	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1127 T>C	Cambio de aminoácido
16,04,04	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1127 T>C	Cambio de aminoácido
77,01,06	HHT2	ALK1	Exón 10	c.1436G>A	Cambio de aminoácido
62,01,06	HHT2	ALK1	Intrón 9	c.1378-1G>T	Cambio de aminoácido
62,02,06	HHT2	ALK1	Intrón 9	c.1378-1G>T	Cambio de aminoácido
48,03,07	HHT2	ALK1	Exón 3	c.101G>A	Cambio de aminoácido

ES 2 338 515 B1

La descripción genética de los pacientes de HHT que participaron en el análisis de niveles plasmáticos de sFlt-1 se muestra en la tabla 2.

TABLA 2

Descripción genética de los pacientes que fueron analizados para la determinación en plasma de niveles de sFlt1

Código	Tipo de HHT	Locus	Exón mutado	Mutación	Tipo de mutación
LSB	HHT1	ENG	Exón 3	c.277C>T	Sin sentido
49.02.07	HHT1	ENG	Exón 6	c.771dupC	Sin sentido
89.01.07	HHT1	ENG	Exón 5	c.659T>A	Desconocida
AHF	HHT1	ENG	Exón 10	c.1360_1361 insT	Sin sentido
16.02.04	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1127 T>C	Cambio de aminoácido
16.03.04	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1127 T>C	Cambio de aminoácido
16.01.04	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1127 T>C	Cambio de aminoácido
16.04.04	HHT2	ALK1	Exón 8	c.1127 T>C	Cambio de aminoácido

Ejemplo 3

Las muestras de sangre venosa se recogieron en presencia de EDTA como anticoagulante y se sometieron a centrifugación a 15000 g durante 15 minutos antes de ser almacenados los sobrenadantes a -80°C, hasta su análisis. Las muestras se procesaron antes de que pasara 24 horas desde el momento de la extracción.

Los niveles de estos tres componentes solubles en plasma se midieron usando la técnica cuantitativa Standard de ELISA, mediante kits comerciales Quantikine (R&D System, Minneapolis, MN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para Ang-2 está comprendida entre 1.20 y 21.3 pg/mL con un coeficiente de variación intraensayo de 5.9% e interensayo de 9.0%. La sensibilidad para el ELISA de sEng está comprendida entre 0.001 y 0.030 ng/mL con coeficientes de variación intra e interensayo de 3.0% y 6.5% respectivamente. La sensibilidad para el ELISA de sFlt1 está comprendida entre 1.5 y 13.3 pg/mL, con coeficientes de variación intra e interensayo de 2.6% y 9.8% respectivamente.

Se comprobó que los niveles de Ang-2 y de sEng seguían una distribución homogénea mediante test de Levene. Los datos distribuidos normalmente se expresan como media \pm desviación estándar y se comparan Mediante test ANOVA. El test de Bonferroni se ha usado como análisis *posthoc* para establecer las diferencias pareadas.

El análisis discriminante se realizó para Ang-2, sEng para determinar qué variables discriminan entre dos o más grupos para la HHT. La idea básica es saber si los grupos difieren entre sí, con respecto a la media de una serie de variables y luego encontrar un modelo que prediga la pertenencia a esos grupos.

Ejemplo 4

Los niveles en plasma de Ang-2 en los pacientes con HHT están disminuidos con respecto a los plasmas control. Los controles sanos (n=14) tienen una media de 3488.43 pg/ml, los pacientes de HHT1 (n=9) tienen una media de 2782.28 ng/ml y los pacientes HHT2 (n=11) tienen una media de 1817.23 ng/ml. Los niveles de Ang-2 están disminuidos en ambos tipos de HHT, pero las diferencias son significativas cuando consideramos los individuos control y los pacientes HHT2 (Fig 1. tablas 3 y 4).

En la figura 1 se muestra un gráfico de caja (Box-Whiskers). La línea horizontal en el centro de la caja representa el percentil 50°, los extremos los percentiles 25° y el 75°.

ES 2 338 515 B1

TABLA 3

Test de ANOVA para los niveles de Ang-2 en plasma para los distintos grupos considerados.
El efecto de grupo es significativo

	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	F	Sig.
Entre Grupos	17209982,8	2	8604991,4	4,709	,016
Dentro de grupos	56645932,7	31	1827288,2		
Total	73855915,4	33			

TABLA 4

Test de Bonferroni para Ang-2. El asterisco (*) marca una diferencia significativa a nivel de $p < 0.05$

Variable Dependiente	(I) grupo	(J) grupo	Diferencia promedio (I-J)	Error Estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
			Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior
Ang-2	0	1	706,15	577,54	,692	-755,56	2167,86
		2	(*)1671,20	544,65	,013	292,75	3049,66
	1	0	-706,15	577,54	,692	-2167,86	755,56
		2	965,05	607,58	,367	-572,68	2502,78
	2	0	(*)-1671,20	544,64	,013	-3049,66	-292,75
		1	-965,05	607,58	,367	-2502,78	572,68

Ejemplo 5

Los niveles en plasma de sEng en los pacientes con HHT están disminuidos con respecto a los plasmas control. Los controles sanos (n=14) tienen una media de 4.46 ng/ml, los pacientes de HHT1 (n=9) tienen una media de 1.81 ng/ml y los pacientes HHT2 (n=11) tienen una media de 2.94 ng/ml. Los niveles de sEng están disminuidos en ambos tipos de HHT, presentándose diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos; control, HHT1 y HHT2. (Fig. 2, tablas 5 y 6).

TABLA 5

ANOVA para los niveles de sEng, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos

	Suma de Cuadrados	df	Promedio de Cuadrados	F	Sig.
Entre Grupos	40,29	2	20,146	62,19	,000
Dentro de Grupos	10,04	31	,324		
Total	50,33	33			

ES 2 338 515 B1

TABLA 6

Test de Bonferroni para sEng. El asterisco () significa que hay diferencias significativas al nivel de 0.05*

Variable Dependiente	(I) grupo	(J) grupo	Diferencia Promedio (I-J)	Error Std.	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
			Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior
sEng	0	1	2,65(*)	,243	,000	2,04	3,27
		2	1,53(*)	,229	,000	0,95	2,11
	1	0	-2,65(*)	,243	,000	-3,27	-2,04
		2	-1,12(*)	,256	,000	-1,77	-0,48
	2	0	-1,53(*)	,229	,000	-2,11	-0,95
		1	-2,65(*)	,256	,000	-0,48	-1,77

En la figura 2 se muestra un gráfico de caja (Box-Whiskers). La línea horizontal en el centro de la caja representa el percentil 50°, los extremos los percentiles 25° y el 75°, respectivamente y los círculos cerrados indican a los individuos fuera de rango.

Ejemplo 6

Los niveles de sFlt1 en el plasma de los pacientes con HHT están disminuidos significativamente con respecto a los controles. Los plasmas controles (n=7) tienen una media de 88.31 pg/ml. Los pacientes de HHT (n=8) tienen una media de 51.02 pg/ml. (Figura 3, Tabla 7)

TABLA 7

Datos comparados por un test T de Student de los niveles de sFlt1 entre los controles sanos y los pacientes de HHT

Grupo	N	Promedio	Desviación Estándar	Error est. promedio	
sFlt1 (pg/mL)	0	7	70,08	14,92	5,64
	1	8	51,02	13,45	4,75

Ejemplo 7

La función discriminante lineal de Fisher se ha usado para realizar un análisis usando la combinación de dos componentes, sEng y Ang-2. Este análisis estadístico proporciona una función que se puede utilizar para distinguir entre afectados y no afectados por HHT (tabla 8). El componente principal que decide entre sano o HHT es sEng. Las funciones que describen este proceso son:

$$\text{Referencia} = 8,4 \times \text{sEng ng/ml} + 0,001 \times \text{Ang-2 pg/ml} - 21,7$$

$$\text{HHT} = 4,5 \times \text{sEng ng/ml} + 0,001 \times \text{Ang-2 pg/ml} - 7,2$$

ES 2 338 515 B1

TABLA 8

Análisis discriminante utilizando la función lineal significativa de Fisher

	Referencia_HHT	
	Referencia	HHT
sEng	8,440	4,547
Ang-2	,001	,001
(Constante)	-21,675	-7,185

El valor más alto de estas funciones determina el grupo al que pertenece un individuo en particular.

Como se ve en la Tabla 9, el 94.1% de los grupos originales están correctamente clasificados según la función discriminante.

Cuando introducimos la concentración de Ang-2, podemos distinguir entre los dos tipos principales de HHT. Los niveles plasmáticos de Ang-2 en individuos HHT2 están más disminuidos que los de HHT1 con respecto a los niveles de la población de referencia (tabla 10).

$$\text{Referencia} = 14.3 \times \text{sEng (ng/ml)} - 0.001 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 32.1$$

$$\text{HHT1} = 4.9 \times \text{sEng (ng/ml)} + 0.001 \text{ Ang-2 (pg/ml)} - 6.5$$

$$\text{HHT2} = 9.7 \times \text{sEng (ng/ml)} - 0.001 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 14.8$$

TABLA 9

Resultado de la clasificación del análisis discriminante de Fisher. Hay dos individuos mal clasificados en un total de 34 muestras. Por tanto un 94.1% de los casos originales están bien clasificados

Original	Recuento	Referencia_ HHT	Predicción del grupo de pertenencia		Total
			Referencia	HHT	
		Referencia	14	0	14
		HHT	2	18	20
	%	Referencia	100,0	,0	100,0
		HHT	10,0	90,0	100,0

TABLA 10

Coefficientes de clasificación de la función discriminante lineal de Fisher

	GRUPO		
	Referencia	HHT 1	HHT 2
sEng	14,300	4,944	9,711
Ang-2	-,001	,001	-,001
(Constante)	-32,084	-6,523	-14,756

ES 2 338 515 B1

Como vemos en la tabla 11, el 82.4% de los casos agrupados molecularmente como sujeto de referencia, HHT1 o HHT2, están correctamente clasificados. La dispersión de los datos se muestra en un gráfico de dispersión bivariente, con marcas para los tres grupos (Fig. 4).

5

TABLA 11

10 *Resultados de la clasificación del análisis discriminante de Fisher. Hay 3 individuos mal clasificados en una muestra total de 34 individuos. El 82.4% de los individuos se encuentra bien agrupado*

		GRUPO	Predicción del grupo de pertenencia			Total
			Referencia	HHT 1	HHT 2	Referencia
Original	Recuento	Referencia	12	0	2	14
		HHT 1	0	8	1	9
		HHT 2	1	2	8	11
%	%	Referencia	85,7	,0	14,3	100,0
		HHT 1	,0	88,9	11,1	100,0
		HHT 2	9,1	18,2	72,7	100,0

25

30 Cuando hacemos el análisis discriminante para sFlt1 se obtiene un punto de corte, equivalente en valor experimental a 59.2 pg/ml, siendo el valor teórico obtenido a partir de los valores del discriminante de 60.05 pg/ml. Los individuos con niveles de sFlt1 en plasma por encima del punto de corte serán sanos y los individuos con niveles más bajos serían pacientes de HHT, con una probabilidad mayor del 95% (Fig.5).

Referencias bibliográficas

35

- Abdalla SA, Letarte M (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 43:97-110.

40

- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderón F, Tuncali T, Tang W, Miller F, Mao R. (2006) A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am. J. Med. Genet. A.* 140: 2155-2162.

45

- J Berg, M Porteous, D Reinhardt, C Gallione, S Holloway, T Umasunthar, A Lux, W McKinnon, D Marchuk, A Guttmacher (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *Journal of Medical Genetics*; 40:585-590.

- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest.* 104: 1343-51.

50

- Cole, SG, Begbie, ME, Wallace, GM *et al.* (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*, 42: 577-582.

55

- Duff, S.E., Li, C., Garland, J.M., Kumar, S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17: 984-992.

- Fernandez-L A, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Pericacho M, Rodriguez-Barbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Düwell A, Vega MA, Bernabeu C, Botella LM. (2007) Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet.* 1; 16: 1515-33.

60

- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene.* 22: 6557-6563.

- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. (2003). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 301-307.

65

- Guttmacher, AE; Marchuk, DA and White RI (1995) Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *New Eng. J. Med.* 333: 918-924.

ES 2 338 515 B1

- Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carrón R, Sanz-Rodríguez F, Perez-Barriocanal F, Rodríguez-Barbero A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J*. 18: 609-611.
- 5 - Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y, Makino H. (2007) *Nephron Clin Pract.*; 106: c43-50. Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia.
- Jerkic M, Rodríguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, 10 Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Bernabeu C, Letarte M, Lopez-Novoa JM. 2006a. Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc. Res.* 69:845-854.
- Jerkic M, Rivas-Elena JV, Santibanez JF, Prieto M, Rodriguez-Barbero A, Perez-Barriocanal F, Pericacho 15 M, Arevalo M, Vary CP, Letarte M, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. 2006b. Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res.* 99: 248-256.
- Johnson, DW, Berg, JN; Baldwin, MA, *et al.* (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase I gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.* 13: 189-195.
- 20 - Kjeldsen, AD, Vase, P and Green, A (1999). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med*, 245: 31-39.
- Levine RJ, Lam C, Qian C *et al.* (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in pre-clampsia. *N Engl J Med.* 355: 992-1005. Erratum in: *N Engl J Med.* 355:1840.
- 25 - Letteboer TG, Mager JJ, Snijder RJ, Koeleman BP, Lindhout D, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ. (2006). Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet.* 43: 371-7.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. (1999) Detective 30 angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science.* 284: 1534-1537.
- Lim JH, Kim SY, Park SY, Yang JH, Kim MY, Ryu HM (2008). Effective Prediction of Preeclampsia by a Combined Ratio of Angiogenesis-Related Factors. *Obstetrics & Gynecology*; 111: 1403-1409
- 35 - Lopez-Novoa JM (2007). Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. *Nephrol Dial. Transplant.* 22: 712-4.
- Luft FC (2006). Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-clampsia molecule. *Nephrol Dial Transplant.* 21: 3052-4.
- 40 - Massagué J (1990). The transforming growth factor beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW *et al.* (1994) Endoglin a TGFbeta binding protein of endothelial cells is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type I. *Nature Genet.* 8: 345-351.
- 45 - Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2626-31.
- 50 - Pepper, MS (1997). Transforming growth factor beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 8: 21-43
- Plauchu, H, de Chadarevian J-P, Bideau A and Robert JM (1989). Age related profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J. Med. Genet.* 32: 291-297.
- 55 - Risau, W. (1997) Mechanism of angiogenesis. *Nature.* 386: 671-674.
- Shi Y and Massague J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113: 685-700.
- 60 - Shim WS, Ho IA, Wong PE. (2007) Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res.* Jul; 5:655-65.
- Shovlin, CL and Letarte, M (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous mal- 65 formations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 54: 714-729.

ES 2 338 515 B1

- **Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M, Letarte M.** (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ. Res.* 96:684-692.

5 - **Venkatesha S, Toporsian M, Lam C et al.** (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 12: 642-9. Erratum in: *Nat Med.* 2006 Jul; 12(7): 862.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 515 B1

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de Telangiectasia Hereditaria Hemorrágica (HHT) que comprende:

- a. obtención de una muestra biológica,
- b. detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* o *ENG* y *ANGPT2* en la muestra obtenida en (a) y
- c. comparación de la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

2. Método según la reivindicación 1 donde el producto de expresión de los genes es la proteína endoglina, Flt1 o Ang-2.

3. Método según la reivindicación 2 donde las proteínas están en su forma soluble sEng, sFlt1 o Ang-2.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la detección es de las proteínas sEng y sFlt1.

5. Método según la reivindicación 4 donde una cantidad detectada de sEng y sFlt1 menor que la cantidad de referencia es indicativa de la condición de enfermo de HHT.

6. Método según la reivindicación 5 donde las cantidades de referencia de sEng y sFlt1 vienen determinadas por un análisis ANOVA y un test T de Student, respectivamente.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 donde la cantidad de referencia de sEng es 3,8 ng/ml y la de sFlt1 es 60 pg/ml.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la detección es de las proteínas sEng y Ang-2.

9. Método según la reivindicación 8 donde una variación de la expresión de sEng y Ang-2 con respecto a una cantidad de referencia permite discriminar entre HHT1 y HHT2.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 donde la cantidad detectada de sEng en individuos HHT1 es menor que en individuos HHT2 y la cantidad detectada de de Ang-2 en individuos HHT2 es menor que en individuos HHT1.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 donde las cantidades de referencia de sEng y Ang-2 vienen determinadas por las combinaciones lineales obtenidas en un análisis discriminante de Fisher.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11 donde la detección de las proteínas se lleva a cabo mediante inmunoensayo.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la muestra biológica es un fluido biológico.

14. Método según la reivindicación 13 donde el fluido biológico es sangre.

15. Kit adaptado para llevar a cabo el método de detección de HHT según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende los elementos necesarios para:

- a. analizar el producto de la expresión de los genes *ENG* y *FLT1* y/o *ENG* y *ANGPT2* en la muestra obtenida;
- b. comparar las cantidades detectada en el paso (a) con una cantidad de referencia.

16. Kit según la reivindicación 15 que además comprende las instrucciones para llevar a cabo el método de detección de HHT según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

FIG. 1

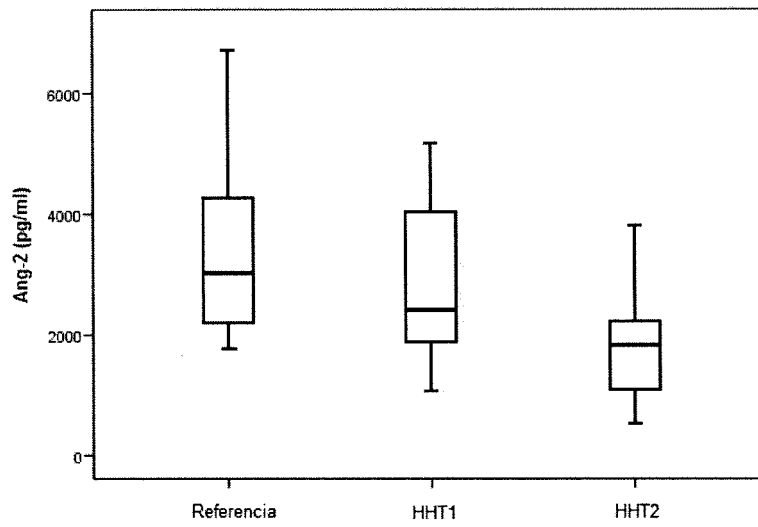


FIG. 2

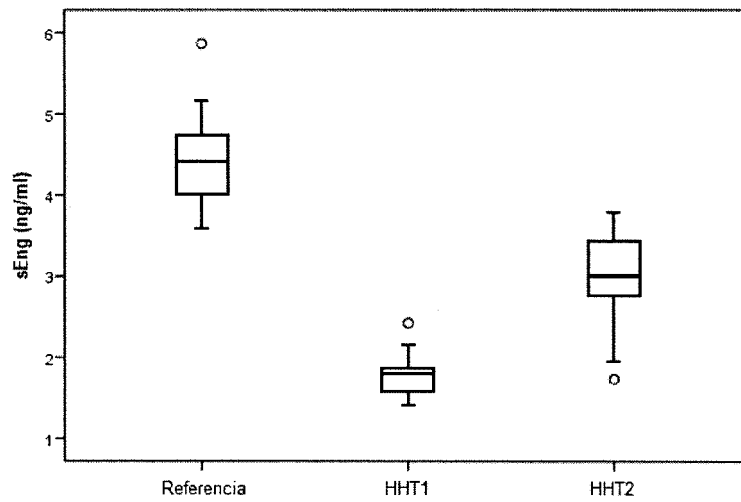


FIG. 3

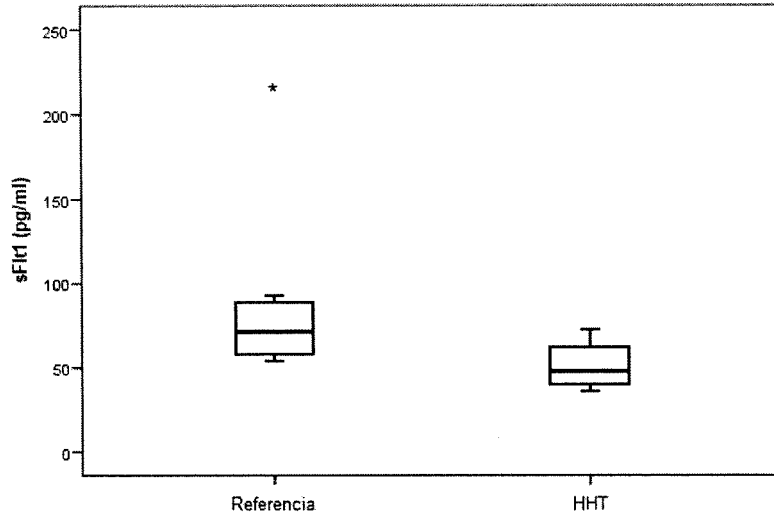


FIG. 4

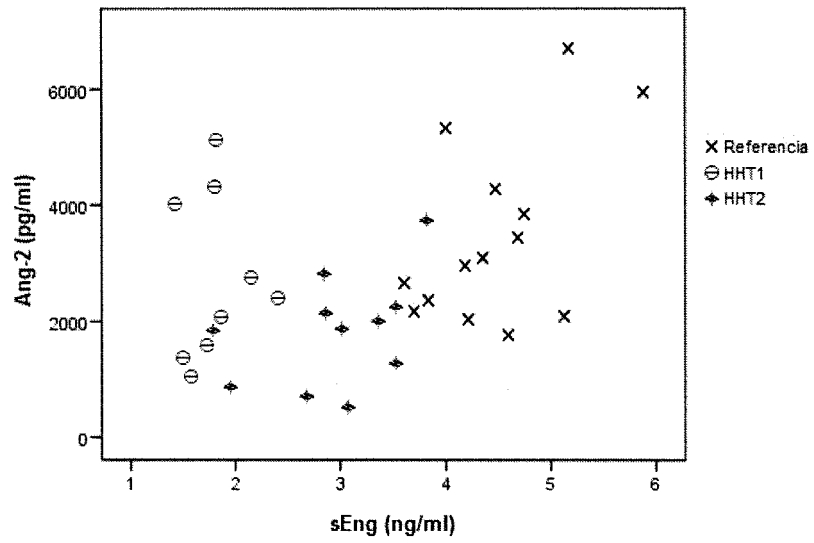
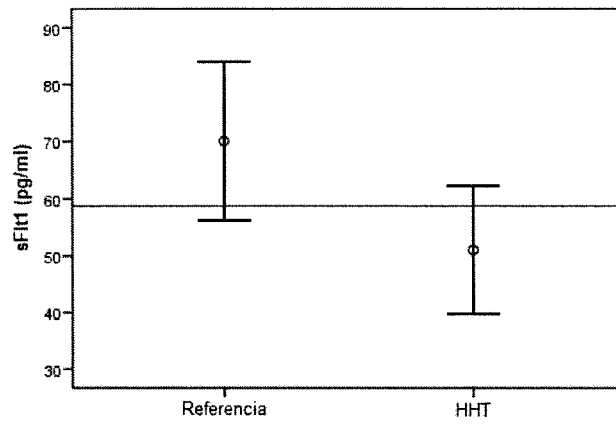


FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 515

② Nº de solicitud: 200803174

③ Fecha de presentación de la solicitud: 06.11.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	FERNÁNDEZ-LÓPEZ, et al. Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. Human Molecular Genetics 2007, vol 16, no 13, pag. 1515-1533, todo el documento.	1-15
Y	FERNÁNDEZ-LÓPEZ, et al. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vacular lesions. Cardiovascular Research 2005, vol 68, pag. 235-248, todo el documento.	1-15
A	HIRATSUKA S. et al. Involvement of Flt-1 Tyrosine Kinase (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) in Pathological Angiogenesis. Cancer Research 2001, vol 61, 1207-1213, todo el documento.	1-7
A	LUFT F.C. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule. Translational Nephrology, 2006, vol 21, pag 3052-3054, todo el documento.	1-7
A	US 6475753 B1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 05.11.2002	1-3,8

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

24.02.2010

Examinador

A. Santos Díaz

Página

1/4

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, DWPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, NLP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-7,9-11	SÍ
	Reivindicaciones 1,-3,8,12-16	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Fernández-López, et al. Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. Human Molecular Genetics 2007, vol 16, no 13 , pag. 1515-1533	09-04-2007
D02	Fernández-López, et al. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vacular lesions. Cardiovascular Research 2005, vol 68, pag. 235- 248	05-07-2005

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

La invención refiere a un método de diagnóstico de la Telangiectasia Hereditaria Hemorrágica mediante detección de la cantidad de producto de expresión de los genes ENG y ANGPT2 o de los genes ENG y FLT1 de una muestra biológica y comparación con una cantidad de referencia.

1.- Novedad (Art.6.1 LP)

A la vista de los documentos citados las reivindicaciones 1-16 se consideran nuevas

2.- Actividad Inventiva (Art. 8.1 LP)

El documento D01 se considera el estado de la técnica mas próximo a la invención y divulga el importante valor diagnóstico del factor soluble Ang-2 (página 1525, columna 2) que se encuentra en circulación en el plasma (página . 1529, columna 1) de individuos con HHT. Este factor se encuentra disminuido en un 50% en pacientes con HHT frente a individuos sanos. Asimismo en este estudio se describe que los niveles de ARNm de endogлина están disminuidos en células HHT1 y HHT2 (página. 1522 columna 1). La detección de la cantidad de Ang-2 se realiza con plasma procedente de pacientes con HHT y de individuos sanos mediante ELISA con un test comercial.

La diferencia principal entre la invención y D01 es que no se comenta el valor diagnóstico de la disminución de los valores de endogлина. Además no se efectúa ningún test de diagnóstico, sin embargo a la vista de las investigaciones realizadas en el documento D01 no se considera que se requiera ningún esfuerzo inventivo para que un experto en la materia desarrolle un procedimiento como el descrito en las reivindicaciones 1-3, 8, 12-16. Por consiguiente, se considera que la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-3, 8, 12-16 no implica actividad inventiva.

Las reivindicaciones 9-11 cumplirían con el requisito de actividad inventiva

El documento D02 se refiere a un estudio con células endoteliales de individuos sanos y enfermos en el que se observa la disminución de los niveles de endogлина en HHT2 y HHT1 mientras que los niveles de Flt-1 no se ven afectados.

Teniendo en cuenta este documento se considera que las reivindicaciones 4-7 cumplen el requisito de actividad inventiva puesto que las solución al problema planteado no se derivaría de las investigaciones descritas en D02.