

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 024**

21 Número de solicitud: 201900028

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 38/56 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.02.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.08.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)

Plaza de San Diego, s/n

28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

VÁSQUEZ VILLANUEVA, Romy Ángela;

ORELLANA MURIANA, José María;

MARINA ALEGRE, María Luisa y

GARCIA LÓPEZ, María Concepción

54 Título: **Uso de un extracto de semillas de melocotón para el tratamiento de la hipertensión arterial**

57 Resumen:

Uso de un extracto de semillas de melocotón para el tratamiento de la hipertensión arterial. La invención propone la aplicación de un subproducto de la industria del procesado del melocotón por su actividad antihipertensiva demostrada en ensayos in vivo. Se trata de la fracción de péptidos con pesos moleculares inferiores a 3 kDa (PM-3kDa) obtenida a partir de la hidrólisis de las proteínas de la semilla de melocotón con la enzima termolisina y de un péptido con secuencia isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina presente en esta fracción. Estos péptidos reducen de forma significativa la presión arterial sistólica (PAS) en ratas genéticamente hipertensas.

ES 2 781 024 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de un extracto de semillas de melocotón para el tratamiento de la hipertensión arterial

- 5 La presente invención se refiere a la utilización de un extracto obtenido a partir de semillas de melocotón por sus propiedades antihipertensivas demostradas en ensayos *in vivo* con ratas hipertensas SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*).

Sector de la técnica

- 10 Los principales sectores de la técnica son el sector farmacéutico y el sector de los productos nutraceuticos que podrían comercializar el extracto obtenido del hueso de melocotón con el reclamo de sus propiedades antihipertensivas, y el sector de la alimentación que podría utilizar este extracto para la preparación de alimentos funcionales con propiedades antihipertensivas.

Estado de la técnica

- 15 El sector de los transformados vegetales, en concreto, de las frutas de hueso, genera cantidades importantes de residuos y subproductos orgánicos que pueden constituir un problema medioambiental y económico [1]. La mayor parte de estos residuos van destinados al vertedero o son incinerados lo que supone un riesgo ambiental. El aprovechamiento de estos residuos es limitado y su rendimiento económico es escaso o nulo. En algunos casos, estos residuos se han empleado para la producción de alimentos para animales o para la alimentación de ganado. La utilización de estos subproductos en alimentación animal supone un coste económico adicional y una correcta planificación y requiere que existe una explotación ganadera cercana. Algunas alternativas de aprovechamiento de estos residuos también han sido la producción de abonos y combustibles (biomasa) [2]. En el caso de algunas frutas, se ha utilizado la piel y el hueso en la fabricación de productos para alimentación humana y en cosmética (mermeladas de cascara de mango, aceite de hueso de melocotón, etc.). Sin embargo, esta materia podría ser de utilidad para la obtención de sustancias con mayor valor añadido.

- 20 Concretamente, la semilla contenida en el hueso del melocotón presenta un alto contenido en proteínas, y de ella se pueden extraer moléculas con alto valor añadido, como péptidos bioactivos [3, 4]. Los péptidos bioactivos son fragmentos que se encuentran inactivos dentro de una proteína precursora, pero que pueden liberarse mediante la hidrólisis de la proteína y ejercer distintas funciones fisiológicas en el organismo. El aprovechamiento de este residuo para la obtención de péptidos bioactivos permitiría la obtención de un beneficio económico para la empresa productora además de que reduciría el impacto ambiental que supone la gestión de estos residuos.

- 25 La hipertensión arterial se puede definir como la permanencia de la presión sistólica y diastólica igual o superior a 140/90 mmHg, y actualmente supone un importante problema de salud a nivel global y constituye un importante factor de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [5]. A pesar de que existen en el mercado un gran número de antihipertensivos sintéticos para el tratamiento de esta enfermedad, en muchas ocasiones su utilización viene acompañada de desagradables efectos secundarios como tos, alteraciones del gusto o erupciones cutáneas, entre otros [6]. El principal mecanismo que regula la tensión arterial es el *sistema renina-angiotensina* [7]. Este mecanismo se basa en una reacción en la que el decapeptido, *angiotensina I*, se transforma en un octapeptido, *angiotensina II*, con una potente actividad vasoconstrictora, mediante la acción de la *enzima convertidora de*

angiotensina (ECA). Adicionalmente, la ECA inactiva a la *bradiquinina* que es un potente vasoconstrictor [8, 9].

5 Aunque existen extractos, muchos de ellos dentro del marco de la medicina tradicional China, que han sido patentados por sus propiedades cardiovasculares, ninguno de ellos coincide con el objeto de esta patente. Las patentes tituladas “*Medicinal composition for treating cardiovascular and cerebrovascular diseases and preparation method of medicinal composition*” (CN106729675 (A)), “*Oral liquid with lipid-decreasing and pressure-decreasing effects and preparation method thereof*” (CN105998639 (A)), “*Health-care food for patient with*
 10 *hyperlipidemia, hypertension and hypercholesterolemia*” (CN101828715 (A)), hacen referencia a mezclas de extractos de plantas y animales y de semillas y raíces con más de 15 ingredientes distintos entre los que se encuentra el hueso de melocotón. El efecto de estos extractos patentados se deriva del contenido en flavonoides, isoflavonas, saponinas, fosfolípidos, etc. pero, en ningún momento, este efecto es atribuido a péptidos del hueso de
 15 melocotón. De hecho, ni siquiera se puede asegurar que el extracto de hueso de melocotón utilizado contenga péptidos que se habrían obtenido mediante la hidrólisis previa de las proteínas. Además, el hueso de melocotón no es el componente mayoritario de la fórmula y constituye una pequeña parte de la misma. También, se han encontrado trabajos de investigación publicados en revistas de impacto internacional como “*Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (Prunus armeniaca L.) kernel protein hydrolysate*” y “*Antioxidant and Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory Properties of a Flaxseed Protein-Derived High Fischer Ratio Peptide Mixture*” que hacen referencia a la obtención de hidrolizados con actividad antihipertensiva a partir de
 25 semillas y huesos. Además de que las muestras utilizadas no son el hueso de melocotón, tampoco se emplea la enzima utilizada en esta patente para la obtención de los péptidos ni se hacen estudios *in vivo* sino que los resultados están basados en estudios *in vitro* que nos permiten asegurar que la ingesta de este hidrolizado para que tener algún efecto fisiológico. En el trabajo “*Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans*”, aunque si se hacen estudios *in vivo* para demostrar el efecto antihipertensivo, la muestra es el guisante que no mantiene ningún tipo de parecido con el hueso de melocotón.
 30 Por otro lado, aunque se han realizado estudios preliminares con los huesos de melocotón que describen la extracción de proteínas y la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva, los resultados que se muestran son derivados, exclusivamente, de estudios *in vitro* y no demuestran el efecto a nivel fisiológico. En efecto, si bien el ensayo *in vitro* de inhibición de la
 35 ECA puede resultar útil para evaluar inicialmente el potencial antihipertensivo de los péptidos, no es un método concluyente ya que no se tienen en consideración las transformaciones fisiológicas que ocurren en el organismo y que pueden determinar la efectividad de los péptidos.

40 En la presente invención se demuestra la actividad antihipertensiva de los péptidos del hueso de melocotón en ensayos *in vivo* y se propone su utilización en el tratamiento de la hipertensión arterial.

Descripción de la invención

45 El procedimiento que se describe demuestra que la aplicación *in vivo* de péptidos obtenidos a partir de semillas de melocotón permite la reducción de la tensión arterial.

50 El procedimiento requiere la extracción de las proteínas del hueso de melocotón, su hidrólisis enzimática con la enzima termolisina y su fraccionamiento por ultrafiltración, siguiendo un método descrito [3], La fracción de péptidos obtenida (PM-3 kDa) fue subfraccionada utilizando un método semipreparativo de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa que

permitió obtener 8 subfracciones de la fracción PM-3 kDa. Dos de las subfracciones (subfracciones F3 y F4) mostraron una actividad antihipertensiva significativa en los estudios *in vitro* con valores de IC₅₀ (concentración de péptido que permite la inhibición de la ECA al 50%) de $2.0 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ y $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

5 La utilización de la cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución permitió identificar la secuencia aminoacídica de los péptidos contenidos en estas fracciones. La Tabla I muestra la secuencia de los péptidos identificados en las fracciones con mayor actividad antihipertensiva *in vitro*. La síntesis de los péptidos
10 identificados y la evaluación mediante el método *in vitro* de la actividad antihipertensiva, permitió seleccionar el péptido con secuencia isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina por su potencial actividad antihipertensiva. La evaluación de la actividad antihipertensiva *in vivo* de la fracción PM-3 kDa y del péptido isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina se realizó utilizando
15 SHR que mostraron una reducción de su presión sistólica del 16 % tras la ingesta de los péptidos del hueso de melocotón.

Tabla I. Secuencia de los péptidos identificados para las fracciones F3 y F4.

F3	F4
LVLTE	EPFE
FEET	IYSPH
LDDLPR	MLPSLPK
LLVE	VAVNL
VEPET	VAIP
LLYTPH	VAVDL
LLYSPH	WDEDGD
WWPHN	EVLED
LLVR	PLLDDE
LVTTPH	PDEV
LYNPR	LLLR
FEPR	VLFSR
VLGA	PLLNDE
IYSPH	LVAY
IMAPH	ALPDEV
ILMH	
LMSPH	
IYTPH	
IFSPR	

20 A: Alanina, R: Arginina, N: Asparagina, D: Ácido aspártico, C: Cisteína, Q: Glutamina, E: Ácido glutámico, G: Glicina, H: Histidina, I: Isoleucina, L: Leucina, K: Lisina, M: Metionina, F: Fenilalanina, P: Prolina, S: Serina, T: Treonina, W: Triptófano, Y: Tirosina, V: Valina.

Descripción de las figuras

25 **Figura 1.** Porcentaje de viabilidad de células HT-29, HK-2 y HeLa expuestas a concentraciones comprendidas entre 100 y 950 $\mu\text{g/mL}$ de un extracto peptídico del hueso de melocotón que contiene péptidos con pesos moleculares inferiores 3 kDa, PM-3 kDa (A) y entre 50 y 500 μM del péptido con secuencia aminoacídica isoleucina- tirosina-serina-prolina-histidina (B).

Figura 2. Variación de la presión arterial sistólica (Δ PAS) medida en mm de mercurio (mmHg) obtenida a las 0, 1, 3, 6 y 24 h de la administración oral del fármaco Captopril (10 mg/kg, ●), el extracto peptídico PM-3 kDa (10 mg/kg, ■) y el péptido con secuencia isoleucina-tirosina-serina-fenilalanina-histidina (1,5 mg/kg, ▲) a ratas genéticamente hipertensas.

5

Modo de realización

Para demostrar la propiedad de los péptidos contenidos en la fracción PM-3 kDa y del péptido isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina, presentes en los huesos de melocotón, para el tratamiento de la hipertensión arterial a nivel fisiológico, se realizaron ensayos *in vivo* utilizando SHR. Previamente a la realización de los ensayos con animales, se evaluó la toxicidad de la fracción PM-3 kDa y del péptido isoleucina- tirosina-serina-prolina-histidina utilizando diferentes líneas celulares.

15 *Obtención de la fracción de péptidos de menos de 3 kDa del hueso de melocotón*

Para la obtención del aislado proteico de la semilla del melocotón se emplea un método optimizado previamente [3]. Se separa la semilla del hueso del melocotón mediante procedimientos mecánicos. A la semilla molida, seca y desgrasada se le añade un medio tamponado para la extracción de las proteínas que consiste en un tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) que contiene dodecilsulfato de sodio y ditiotreitól. Después de sonicar durante 1 minuto al 30 % de amplitud, la mezcla se centrifuga. Se recupera el sobrenadante y se le añade acetona previamente enfriada para precipitar las proteínas. El aislado proteico se recoge por centrifugación de la muestra y se deja secar a temperatura ambiente.

25 La hidrólisis del extracto proteico obtenido a partir de la semilla de melocotón se lleva a cabo empleando un método previamente optimizado [3]. El aislado proteico de la semilla de melocotón se disuelve en una disolución tamponada que consiste en un tampón fosfato 5 mM (pH 8.0) y una concentración de enzima termolisina de 0,1 g enzima/g proteína. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo a 50 °C durante 4 h. La reacción se finaliza por inactivación de la enzima por calentamiento de las muestras a una temperatura superior a 100 °C. A continuación, se centrifuga la muestra para separar las proteínas no hidrolizadas. Se recoge el sobrenadante y se hace pasar a través de un filtro de corte de 3 kDa para recoger la fracción de péptidos con pesos moleculares inferior a 3 kDa que se ha denominado PM-3 kDa.

35 *Evaluación de la citotoxicidad de los hidrolizados peptídicos a través del ensayo de Bromuro de 3 ((4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico) (MTT)*

El ensayo colorimétrico de MTT mide la proliferación y la supervivencia celular y permite evaluar la toxicidad de potenciales agentes citotóxicos. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del compuesto MTT por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, presente en las células, para dar un compuesto de la familia de los formazanos con intenso color azul, que es fácilmente detectable. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado. Este ensayo se utilizó para evaluar la toxicidad de los compuestos de interés a diferentes concentraciones (100-950 μ g/mL de la fracción de péptidos PM-3 kDa y 50-500 μ M de péptido antihipertensivo isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina). El procedimiento se realizó utilizando diferentes líneas celulares: HeLa, HT-29 (líneas celulares cancerígenas) y HK-2 (línea celular de células sanas). Para analizar la posible alteración en la viabilidad celular, se añadieron los compuestos a las líneas celulares a diferentes concentraciones y se incubaron durante 24 h.

50 Los resultados obtenidos mostraron la inocuidad de las muestras en los cultivos celulares utilizados (**Figura 1**). Se observó una viabilidad celular cercana al 100% cuando se utilizaban

concentraciones comprendidas entre 100-950 µg/mL de PM-3 kDa y entre 50-500 µM de péptido.

Evaluación de la capacidad antihipertensiva in vivo.

5 Con el fin de evaluar la capacidad de los péptidos seleccionados del hueso de melocotón para reducir la presión arterial sistólica (PAS) en organismos vivos y corroborar su efecto antihipertensivo *in vivo*, se utilizaron ratas macho espontáneamente hipertensas de la cepa SHR con edades comprendidas entre las 25 y 40 semanas de vida y pesos entre 382 ± 43 g. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 23 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h.
 10 Los animales bebieron agua corriente y se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar (Global diet 2014, Envigo, NJ, USA) durante los experimentos. Las dosis se administraron siempre por vía intragástrica, entre las 9 y 10 h de la mañana, disueltas en 1,5 mL de agua. Se hicieron 4 grupos constituidos por 5 ratas cada uno. Al grupo “*control positivo*” se le administró, a diario, el fármaco antihipertensivo Captopril a una concentración de 10 mg/kg rata/día (1,5 mL) y al grupo “*control negativo*” se le administró, a diario, 1,5 mL de agua. Los siguientes experimentos se realizaron con la fracción de péptidos PM-3 kDa (10 mg/kg/día) y el péptido con secuencia isoleucina-tirosina-serina-prolina- histidina (1,5 mg/kg/día).

Las medidas de la PAS se realizaron con un Pressure Meter LE 5001, PanLab Harvard Apparatus (Harvard, UK) utilizando el procedimiento del manguito cola (*tail-cuff*) [10]. Antes de las medidas, se mantenía a los animales a una temperatura de alrededor de 30°C durante 15 minutos para facilitar la dilatación de arteria caudal. Las medidas de PAS se realizaron antes de la administración de la dosis (tiempo cero) y para las siguientes 1, 3, 6 y 24 h después de la administración.

25 Los resultados se expresaron como la media de, al menos, 5-6 medidas homogéneas ± el error estándar de la media. Todas las medidas fueron tomadas por la misma persona, en el mismo entorno y en las mismas condiciones para minimizar el estrés inducido y evitar variaciones en la presión arterial del animal. Para comparar entre los diferentes tratamientos se utiliza la herramienta estadística ANOVA (Análisis de la Varianza de una cola) en cada tiempo de post-administración utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión versión XVII de Statpoint Technologies (Warrenton, EEUU). Se consideró que la diferencia entre dos valores era significativa cuando el p-valor obtenido en el ANOVA era < 0,05.

35 Los resultados obtenidos (**Figura 2**) demuestran que el hidrolizado PM-3kDa y el péptido isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina son capaces de reducir la PAS de las ratas en 30 mmHg, lo que se corresponde con un 16% de reducción del PAS de las ratas. El efecto de disminución de la PAS es máximo entre las 3 y 6 h después de la administración de las dosis. No se observaron diferencias significativas entre los valores de PAS obtenidos cuando se administraba a las ratas las muestras estudiadas (PM-3kDa y isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina) y el fármaco Captopril (p-valor > 0,05), a las 6 h después de la administración de las correspondientes dosis.

Aplicación industrial

45 La presente invención demuestra que la administración de determinados péptidos contenidos en los huesos de melocotón permite reducir la tensión arterial sistólica en ratas y, por tanto, tiene efecto *in vivo*. Este tipo de compuestos tienen doble interés a nivel industrial. Por una parte, la utilización de estos extractos permite la reutilización de un subproducto de la industria alimentaria y, consecuentemente, su revalorización. Por otro lado, estos extractos se pueden utilizar para la preparación de concentrados peptídicos, que podrían dispensarse como
 50 nutracéuticos, de utilidad para regular la tensión arterial. Adicionalmente, la industria

alimentaria también podría utilizar estos extractos para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales mediante la adición de estos péptidos a alimentos como los productos lácteos, zumos y otras bebidas.

- 5 Este trabajo está financiado gracias al Ministerio de Economía y Competitividad (ref. AGL2016-79010-R) y a la Comunidad de Madrid, el Fondo Social Europeo y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM).

BIBLIOGRAFÍA

- 10 [1] Plazzotta S.; Manzocco L.; Nicoli M. C.; *Trends in Food Science & Technology* **2017**, 63, 51-59.
- [2] Gomas, P.; Rudzińska, M.; *Industrial Crops & Production* **2016**, 83, 329-338.
- 15 [3] Vázquez-Villanueva, R.; Marina, M. L.; García M. C.; *Journal of Functional Foods* **2015**, 18, 137-146.
- [4] Vázquez-Villanueva, R.; Marina, M. L.; García M. C.; *Journal of Chromatography A* **2016**, 1428, 185-192.
- [5] Kearney, P. M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P. K.; He, J.; *Lancet* **2004**, 365, 217-2237.
- 20 [6] Sweeting, M. J.; Thompson, S. G.; Brown, L. C.; Greenhalgh, R. M., Powell, J. T.; *Journal of Vascular Surgery* **2012**, 52, 1-4.
- [7] T. Takano, Milk derived peptides and hypertension reduction, *International Dairy Journal* **1998**, 8, 375-381.
- [8] Struthers, A. D.; McDonald, T. M.; *Cardiovascular Research* **2004**, 21, 663-670.
- 25 [9] Mehta, P. K.; Griendling, K. K.; *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2007**, 292, 82-97.
- [10] Buñag, R.D.; *Journal of Applied Physiology* **1973**, 34, 279-282.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto de semillas de melocotón para el tratamiento de la hipertensión arterial cuyo procedimiento para la extracción de las proteínas del hueso de melocotón comprende:
5 a. Una subfracción de la fracción de péptidos obtenida (PM-3 kDa) utilizando un método semipreparativo de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa que permite obtener 8 subfracciones de la fracción PM-3 kDa.
- 10 2. Uso de un extracto de semillas de melocotón según la reivindicación 1, caracterizado por tener péptidos con pesos moleculares inferiores a 3 kDa y actividad antihipertensiva *in vivo*.
3. Uso de un péptido sintetizado con secuencia aminoacídica isoleucina-tirosina-serina-prolina-histidina, caracterizado porque se encuentra en el hueso de melocotón.
15 4. Uso de péptidos contenidos en el hueso de melocotón según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizados porque no presentan citotoxicidad.
- 20 5. Uso de péptidos contenidos en el hueso de melocotón según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizados por su uso en alimentos funcionales mediante la adicción de estos péptidos a alimentos como productos lácteos, zumos y otras bebidas.

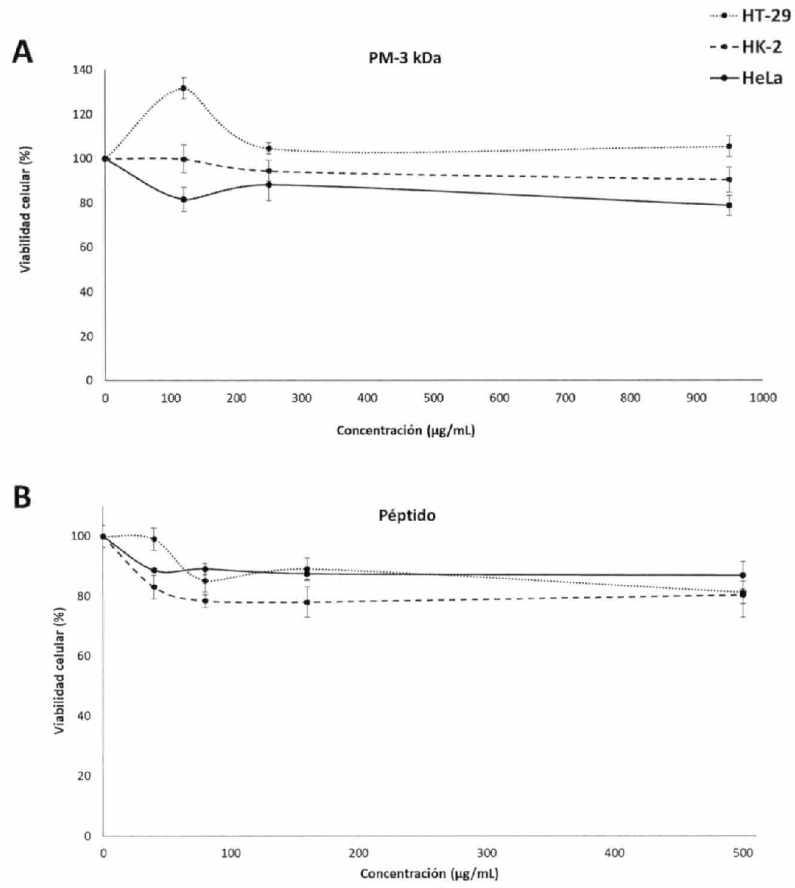


FIG. 1

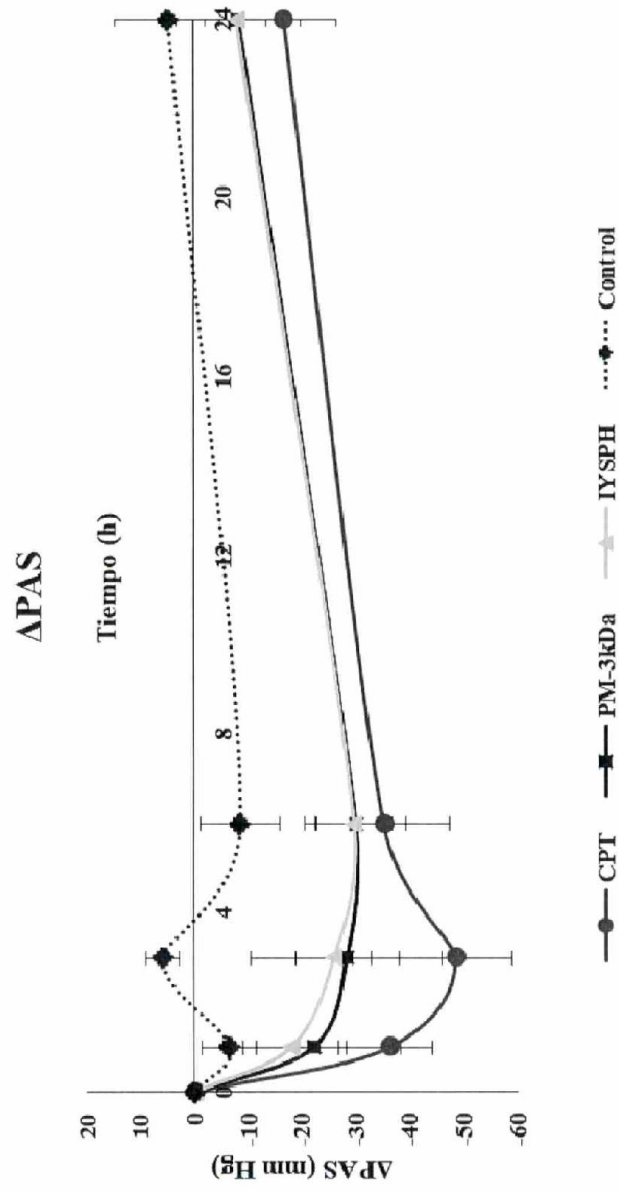


FIG. 2



- ②¹ N.º solicitud: 201900028
②² Fecha de presentación de la solicitud: 26.02.2019
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VASQUEZ-VILLANUEVA, R., et al., "Revalorization of a peach (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch) byproduct: Extraction and characterization of ACE-inhibitory peptides from peach stones." <i>Journal of Functional Foods</i> , (2015), Vol. 18, pp. 137-146. . <p> todo el documento. Citado en la solicitud</p>	1-5
X	ESTEFANÍA GONZÁLEZ-GARCÍA et al., "Identification of plum and peach seed proteins by nLC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries." <i>Journal of Proteomics</i> , (2016), 148 105–112. todo el documento, En particular, Tabla 2 pág. 110	1-5
X	ESTEFANÍA GONZÁLEZ-GARCÍA et al. ,"Capillary liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry methodology for the simultaneous quantification of four angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in <i>Prunus</i> seed hydrolysates.", <i>Journal of Chromatography A</i> , (2018) , 1540 (2018) 47–54. todo el documento. En particular, Tabla 2, pág. 53	1-5

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
12.12.2019

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/55 (2006.01)

A61K38/56 (2006.01)

A61P9/12 (2006.01)

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

A61K, A61P

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS