

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 725**

21 Número de solicitud: 201930342

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.04.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.10.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N
18071 GRANADA ES;
FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD (40.0%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (10.0%)**

72 Inventor/es:

**BLANCO LÓPEZ, Francisco Javier;
CARMONA SÁEZ, Pedro y
BOTELLA CUBELLS, Luisa María**

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA DIAGNOSTICAR TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para diagnosticar telangiectasia hemorrágica hereditaria.

La presente invención se refiere al uso de un conjunto de miRNAs transportados en exosomas plasmáticos en la obtención de datos útiles para diagnosticar telangiectasia hemorrágica hereditaria, así como para su clasificación en HHT de tipo 1 o HHT de tipo 2. También se describe un kit para llevar a cabo un método de diagnóstico in vitro que emplea los datos obtenidos.

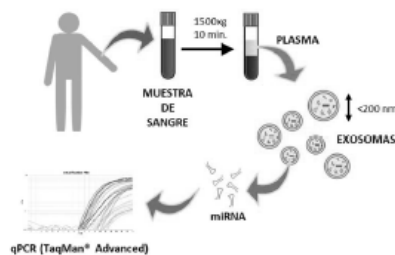


Figura 2

DESCRIPCIÓN

**MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA DIAGNOSTICAR
TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA**

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina Clínica. Específicamente, se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la telangiectasia hemorrágica hereditaria.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT)

La telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), o síndrome de Rendu-Osler-Weber (ORPHA:774), es una displasia vascular con transmisión autosómica dominante con una prevalencia aproximada de 1/8000, por lo que se considera como enfermedad rara, minoritaria o poco frecuente. La gran mayoría de enfermos de HHT (~85%) presenta mutaciones en heterocigosis bien en el gen de endogлина (*ENG*), o bien en el de *ALK1* (*ACVRL1*), dando lugar a los tipos HHT1 (OMIM: #187300) y HHT2 (#600376), respectivamente. Hasta el momento, se han descrito hasta 507 mutaciones distintas a lo largo de todo el gen de endogлина y hasta 571 en el caso del gen de *ALK1* (<http://www.arup.utah.edu/database/HHT/>). Existe además un pequeño porcentaje de enfermos que no presenta mutaciones en ninguno de estos genes si bien se han identificado 2 loci en los cromosomas 5 y 7 que dan lugar a la HHT3 (5q31.3-q32; OMIM: #601101) y HHT4 (7p14; OMIM: #610655), respectivamente. Por último, recientes estudios han identificado mutaciones en el gen de *BMP9* (*GDF2*) como un quinto tipo de HHT (HHT5; OMIM: #615506) [A. Macri, R. Bermudez, Osler-Weber-Rendu Disease (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, HHT), StatPearls [Internet], StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2018].

Generalmente, para el diagnóstico de HHT se emplea un perfil clínico consensuado que se conoce como los criterios de Curaçao [C.L. Shovlin, A.E. Guttmacher, E. Buscarini, M.E. Faughnan, R.H. Hyland, C.J. Westermann, A.D. Kjeldsen, H. Plauchu, Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome), *Am J Med Genet* 91(1) (2000) 66-7], e incluyen los siguientes cuatro rasgos: 1) Epistaxis

recurrentes; 2) Telangiectasias en piel y/o mucosas; 3) Malformaciones arteriovenosas en órganos internos; y 4) 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 y por dificultades en la detección de mutaciones en heterocigosis, especialmente cuando se deben al cambio en una sola base de la secuencia de DNA asociada a la enfermedad.

Uso de exosomas como marcadores diagnósticos

10 Los exosomas son unas microvesículas de <200 nm de diámetro presentes en todos los fluidos biológicos que transportan moléculas de diversa naturaleza desde el tejido donde son producidos hasta otro receptor donde dicha carga ejerce su función. Los exosomas circulantes en sangre presentan por tanto una alta biodisponibilidad y son relativamente fáciles de obtener. De este modo, del análisis de su contenido se pueden establecer
15 nuevos biomarcadores asociados a una determinada patología como lo es la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), o síndrome de Rendu-Osler-Weber (ORPHA:774).

En la actualidad, existen numerosos estudios en los que se emplea el contenido de estos exosomas como biomarcadores de una determinada patología, como en distintos tipos
20 de cáncer [F. Lousada-Fernandez, O. Rapado-Gonzalez, J.L. Lopez-Cedrun, R. Lopez-Lopez, L. Muinelo-Romay, M.M. Suarez-Cunqueiro, Liquid Biopsy in Oral Cancer, Int J Mol Sci 19(6) (2018) E1704.], [H. Huang, X. Zheng, C. Cai, Z. Yao, S. Lu, X. Meng, Y. Miao, Z. He, F. Zou, Exosomes derived from breast cancer lung metastasis subpopulations promote tumor self-seeding, Biochem Biophys Res Commun (2018) S0006-291X(18)31321-4], [Y. Toiyama, Y. Okugawa, J. Fleshman, C. Richard Boland, A. Goel, MicroRNAs as potential liquid biopsy biomarkers in colorectal Cancer: A systematic review, Biochim Biophys Acta (2018) S0304-419X(18)30067-2],
25 enfermedades autoinmunes [Y. Ishibe, M. Kusaoi, G. Murayama, T. Nemoto, T. Kon, M. Ogasawara, K. Kempe, K. Yamaji, N. Tamura, Changes in the Expression of Circulating microRNAs in Systemic Lupus Erythematosus Patient Blood Plasma After Passing Through a Plasma Adsorption Membrane, Ther Apher Dial 22(3) (2018) 278-289], [I. Manna, E. Iaccino, V. Dattilo, S. Barone, E. Vecchio, S. Mimmi, E. Filippelli, G. Demonte, S. Polidoro, A. Granata, S. Scannapieco, I. Quinto, P. Valentino, A. Quattrone, Exosomeassociated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring
30 in multiple sclerosis patients, FASEB J (2018)2018) fj201701533R], neurológicas [T.T.

Yang, C.G. Liu, S.C. Gao, Y. Zhang, P.C. Wang, The Serum Exosome Derived MicroRNA- 135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers, Biomed Environ Sci 31(2) (2018) 87-96], [X.Y. Cao, J.M. Lu, Z.Q. Zhao, M.C. Li, T. Lu, X.S. An, L.J. Xue, MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like
 5 microvesicles, Neurosci Lett 644 (2017) 94-99] o cardiovasculares [F. Jansen, Q. Li, Exosomes as Diagnostic Biomarkers in Cardiovascular Diseases, Adv Exp Med Biol 998 (2017) 61-70],[M. Lu, S. Yuan, S. Li, L. Li, M. Liu, S. Wan, The Exosome-Derived Biomarker in Atherosclerosis and Its Clinical Application, J Cardiovasc Transl Res (2018)], [T. Wu, Y. Chen, Y. Du, J. Tao, Z. Zhou, Z. Yang, Serum Exosomal MiR-92b-5p
 10 as a Potential Biomarker for Acute Heart Failure Caused by Dilated Cardiomyopathy, Cell Physiol Biochem 46(5) (2018) 1939-1950]. De hecho, muchos de estos estudios han contribuido al registro de patentes dirigidas al diagnóstico molecular de dicha enfermedad.

También se pueden encontrar descritas aplicaciones de exosomas para diagnóstico en
 15 [WO/2017/181183] para el linfoma, [WO/2016/148313] para distintos tipos de cáncer, [WO/2012/126531] para el síndrome coronario agudo, o bien [WO/2016/08227] para la enfermedad de Kawasaki, entre otras.

La caracterización de estos biomarcadores en exosomas se encuadra dentro de lo que se denomina biopsia líquida, término acuñado originalmente por su gran potencial en el
 20 diagnóstico del cáncer. Una biopsia líquida consiste, básicamente, en extraer un pequeño volumen de sangre (o cualquier otro fluido biológico), aislar los exosomas del suero o plasma y analizar su contenido molecular, principalmente proteínas y/o ácidos nucleicos (DNA, mRNA, microRNA)

OBJETO DE LA INVENCION

25 Los autores de la presente invención han podido obtener mediante la técnica de NGS (*Next Generation Sequencing*) RNA-seq por primera vez el patrón de expresión diferencial de microRNAs (miRNAs) transportados en exosomas plasmáticos característico de HHT (n=30) en comparación con individuos no afectados (n=10). Además, han establecido un grupo de hasta 66 miRNAs diferencialmente expresados
 30 que caracterizan la HHT. También han podido diferenciar entre los tipos HHT1 y HHT2 (Figura 1) en base a los perfiles globales de expresión de miRNAs, y en función de sus estudios se han seleccionado 8 miRNAs por tener un claro valor diagnóstico, tal y como muestra el análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Este grupo de 8 miRNAs permite hacer un diagnóstico rápido y fiable de la HHT (figura 3). De este
 35 modo, este nuevo método de diagnóstico molecular recogido en la presente invención

representa un gran avance que confirmaría a nivel molecular el diagnóstico por los criterios clínicos de Curaçao de los pacientes de HHT.

5 Por lo tanto, un primer aspecto de esta invención se refiere al uso de un conjunto de miRNAs transportados en exosomas plasmáticos en la obtención de datos útiles para diagnosticar HHT.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la HHT, en un individuo, que comprende la detección, en una muestra de dicho individuo, de los niveles de expresión relativa de uno de estos miRNAs. Un tercer aspecto de la invención se refiere a un kit o dispositivo que
10 comprende al menos un oligonucleótido(s) capaz de hibridar con uno cualquiera o más de los miRNAs mencionados.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención.

15 Actualmente, la confirmación del diagnóstico de HHT por los criterios clínicos de Curaçao se realiza mediante la secuenciación de los genes diana responsables de la HHT, dirigida a la identificación de la mutación causante. La principal ventaja de la presente invención es pues, que el diagnóstico genético se realiza mediante la determinación de la expresión relativa de un conjunto de miRNAs exosomales
20 plasmáticos.

El hecho de que la presente invención use miRNAs (es decir, ARN muy cortos y bien definidos) como factores indicativos viene con la ventaja de una detección fácil y confiable en contra de algunos métodos conocidos, como el uso de ARN mensajeros (ARNm). Las moléculas de ARNm tienen típicamente varios cientos o incluso varios
25 miles de bases de tamaño; moléculas tan grandes y, al mismo tiempo, delicadas, por lo que son generalmente proclives a la degradación, y su detección depende de la elección (a menudo de prueba y error) de la sonda apropiada, lo que hace que tales pruebas sean, en principio, menos confiables que los métodos de la presente invención.

Además, se puede emplear PCR en tiempo real, que es un técnica muy popular hoy en
30 día que ha evolucionado enormemente y cuyos costes en consecuencia se han ido reduciendo notablemente, sobre todo los del instrumental requerido.

La optimización de las sondas TaqMan® Advanced para miRNAs ha permitido aumentar aún más el límite de detección (~10 copias/reacción) y eliminar falsos positivos

proporcionando una mayor especificidad con respecto al método clásico basado en la química SYBR. Por lo tanto, la presente invención constituye un método de diagnóstico mucho más eficiente y eficaz que el actual.

También existen otra serie de ventajas. La sintomatología de la HHT suele aparecer durante la adolescencia sobre los 12 años y no es hasta los 50 años cuando presenta una penetrancia completa. Debido a esta aparición gradual de la sintomatología, uno de los principales problemas a los que se enfrenta un paciente de HHT es que desde que aparece la sintomatología y acude por primera vez al médico hasta que se le hace un diagnóstico definitivo suelen transcurrir de media ~7 años, incluso más de 10 años para el 20% de los afectados. Esto implica un peregrinaje hospitalario por parte de los pacientes que han de pasar por la consulta de diversos especialistas frecuentemente en distintas localidades y provincias o incluso comunidades autónomas, con la consecuente insatisfacción de estos pacientes con el sistema sanitario y un gasto elevado relacionado con la atención de la enfermedad que concluye en una percepción de discriminación y discapacidad por parte de los enfermos. De este modo, esta invención pretende reemplazar el actual método de diagnóstico genético y reducir así el tiempo necesario para la determinación de la HHT.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. A. Resultados de RNAseq que muestran que un conjunto de miRNAs exosomales diferencialmente expresados en HHT permiten discriminar pacientes de donantes sanos e incluso el tipo de HHT (*heatmaps*). Se analizaron los grupos control (n=8), HHT1 (n=13) y HHT2 (n=7), integrados por donantes independientes sin relación familiar. Algunas muestras fueron eliminadas del análisis por criterios de coherencia de la señal detectada. **B.** Análisis PCA. Cada punto representa una muestra: Control (verde), HHT1 (azul) y HHT2 (rojo). Las muestras se agrupan de acuerdo a su origen sano o patológico.

Figura 2. Esquema del flujo de trabajo. Se extraen 5 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos con citrato sódico como anticoagulante. Se separa el plasma por centrifugación (1500xg, 10 min.). Se aíslan los exosomas del plasma y de ahí el contenido en RNA total. Los miRNAs se detectan mediante PCR en tiempo real (qPCR) con sondas TaqMan® Advanced específicas.

Figura 3. Perfil de expresión relativa de los miRNAs transportados en exosomas plasmáticos. La comparación respecto al grupo control se hizo mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección de Bonferroni (n=10, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$)

5

Figura 4.- Curvas ROC para determinar la exactitud diagnóstica del test. Se representa la sensibilidad, especificidad y el área bajo la curva (AUC, %). Se consideran biomarcadores buenos ($90%<75%$, amarillo) y excelentes ($>90%$, verde) con una significación estadística con valor $p<0,005$.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A lo largo de este documento se empleará la abreviatura "HHT" para referirnos a la telangiectasia hemorrágica hereditaria, también denominada Síndrome de Rendu-Osler-Weber o Enfermedad de Rendu-Osler-Weber.

15

En su patogénesis están implicados dos genes, los cuales determinan dos formas diferentes de una misma enfermedad "HHT1" y "HHT2". En la HHT1, el gen afectado (*ENG*) se localiza en el cromosoma 9 y codifica una proteína transmembrana denominada endoglin. En la HHT2 la alteración afecta al gen *ACVRL1* se sitúa en el cromosoma 12, que codifica el receptor con actividad kinasa similar al receptor tipo II de activina A (ALK1, del inglés *activin A receptor type II-like kinase 1*), y que forma parte del complejo receptor TGF- β .

20

Un microRNA (abreviado como "*miRNA*") es una pequeña molécula de ARN no codificante que se encuentra tanto en plantas como en animales, y que frecuentemente ejercen una función relacionada con la regulación post-transcripcional de la expresión génica.

25

Los microRNAs contienen aproximadamente 22 nucleótidos (aprox. 18-25 nucleótidos), son ARNs monocatenarios con cierta estructura secundaria y regulan negativamente (inhiben) la expresión génica a través de la inhibición de la traducción o la escisión del ARNm. Por lo tanto, los miRNAs son reguladores postranscripcionales que se unen a secuencias complementarias en los transcritos de ARN mensajeros (ARNm), que generalmente resultan en la represión de la traducción o la degradación del objetivo y el silenciamiento de genes. En un aspecto particular de la invención, comprender los detalles moleculares de la acción de los miRNAs de la invención no es crítico, ya que

30

los niveles detectados de los miRNAs indicativos permiten realizar los métodos de la invención.

Bajo un sistema de nomenclatura estándar, los nombres se asignan a los miRNAs confirmados experimentalmente de la siguiente manera: el prefijo "mir" es seguido (por un guión y) un número, por lo que este último puede indicar el orden de los nombres. El "mir-" sin capitalizar se refiere al pre-miRNA, mientras que un "miR-" en mayúscula se refiere a la forma madura. Los miRNAs con secuencias casi idénticas, excepto uno o dos nucleótidos, se anotan con una letra minúscula adicional, por ejemplo miR-99a. Los pre-miRNAs que conducen a un 100% de miRNAs maduros idénticos pero que están ubicados en diferentes lugares en el genoma se indican con un sufijo adicional de número de guión. Las especies de origen pueden designarse con un prefijo de tres letras, por ejemplo, hsa-miR-223 es un miRNA humano (Homo sapiens). Dado que en el contexto de este documento, todos los miRNAs individualizados son miRNAs humanos, el prefijo "hsa-" a veces se omite. Cuando dos miRNAs maduros se originan en brazos opuestos del mismo pre-miRNA, se denotan con un sufijo -3p o -5p, como por ejemplo miR-142-3p. Cuando se conocen los niveles de expresión relativos, un asterisco después del nombre indica un miRNA expresado en niveles bajos en relación con el miRNA en el brazo opuesto de una horquilla. La mayoría de los genes miRNA conocidos se encuentran en regiones intergénicas u orientadas de forma antisentido a los genes vecinos y, por lo tanto, se cree que se transcriben como unidades independientes. Sus genes generalmente se transcriben mediante la ARN polimerasa II, y las transcripciones se procesan, se exportan desde el núcleo y se procesan posteriormente mediante mecanismos específicos, como es bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, He et al., Nat. Rev. Genet. 2004 Jul; 5 (7): 522-31). Se puede acceder a las secuencias de miRNA en <http://www.mirbase.org>.

Así, se empleará el término "*miRNA de la invención*" para referirnos a cualquier miRNA seleccionado del grupo formado por miR-142, miR-150, miR-486, miR-106b, miR-183, miR-654, miR-9 y miR-29c (Tabla 1).

Nombre	Seq ID nº	Secuencia (5'→ 3')	Longitud
hsa-miR-142-3p	1	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	23
hsa-miR-150-5p	2	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	22
hsa-miR-486-5p	3	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	22
hsa-miR-106b-3p	4	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC	22

hsa-miR-183-5p	5	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	22
hsa-miR-654-3p	6	UAUGUCUGCUGACCAUCACCUU	22
hsa-miR-9-5p	7	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
hsa-miR-29c-3p	8	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	22

Tabla1. Secuencias de miRNAs

Se denominará “*grupo HC*” al grupo formado por los miRNAs miR-142, miR-150 y miR-486.

Se denominará “*grupo H1*” al grupo formado por los miRNAs miR-106b, miR-183 y miR-5654.

Se denominará “*grupo H2*” al grupo formado por los miRNAs miR-9 y miR-29c.

El término “*miRNA control*” se refiere a un miRNA exosomal plasmático cuyo nivel de expresión permanece invariable en individuos sanos e individuos que padecen HHT

En una realización particular, el miRNA control será el miRNA con Seq ID nº 9, denominado “hsa-miR-103a-3p”:

Nombre	Seq ID nº	Secuencia (5' → 3')	Longitud
hsa-miR-103a-3p	9	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	23

El término “*identidad*”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, Nucleic Acids Research 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

Una “*muestra biológica aislada*” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es sangre venosa periférica.

El término “*individuo*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. Los términos “*individuo*” “*sujeto humano*” y “*sujeto*” se usan indistintamente en esta memoria y son sinónimos de

“*paciente*”, y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

Los términos “*uno o más*” o “*al menos un*” o “*varios*”, tal y como se usan en este documento, incluyen uno y la especificación individualizada de cualquier número que sea más de uno, como dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc.”

El término “*comprende*” también podrá interpretarse, en una realización particular, como “*consiste en*”. El término “*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.

Marcadores de la invención

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de miR-142, miR-150, miR-486, miR-106b, miR-183, miR-654, miR-9, miR-29c, o cualquiera de sus combinaciones, en la obtención de datos útiles para diagnosticar HHT.

En una realización particular de este aspecto de la invención, se emplean al menos dos marcadores del grupo HC, preferentemente los tres marcadores del grupo HC, de forma simultánea.

En una realización aún más preferente de este aspecto de la invención, se emplean de forma simultánea todos los marcadores de la invención (miR-142, miR-150, miR-486, miR-106b, miR-183, miR-654, miR-9 y miR-29c).

Métodos de la invención

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles, de ahora en adelante “*primer método de la invención*”, para el diagnóstico de la HHT, en un individuo, que comprende la detección, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, de los niveles de expresión de uno o más miRNAs de la invención, en particular un miRNA que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1 (miR-142); SEQ ID NO: 2 (miR-150); SEQ ID NO: 3 (miR-486); SEQ ID NO: 4 (miR-106b); SEQ ID NO: 5 (miR-183); SEQ ID NO: 6 (miR-654); SEQ ID NO: 7 (miR-9) y SEQ ID

NO: 8 (miR-29c). Los inventores han demostrado que los niveles de uno o más de estos miRNAs en un individuo pueden ser indicativos de que dicho individuo padece HHT.

5 Preferiblemente, la muestra es de sangre venosa periférica o de plasma procedente de una muestra de sangre venosa periférica.

De forma preferente, el primer método de la invención comprende la detección de los niveles de expresión de al menos 2 marcadores del grupo HC, más preferentemente de los 3 marcadores del grupo HC.

10 En una realización particular, el primer método de la invención incluye al individuo en el grupo de individuos con HHT cuando presenta una disminución del nivel de expresión de miR-142, una disminución del nivel de expresión de miR-150 o un aumento del nivel de expresión de miR-486, o cualquiera de sus combinaciones.

15 De forma preferente, el primer método de la invención incluye al individuo en el grupo de individuos con HHT cuando presenta una disminución del nivel de expresión de miR-142, una disminución del nivel de expresión de miR-150 y un aumento del nivel de expresión de miR-486.

20 El primer método de la invención implica la comparación de dichos niveles de miRNA con los niveles de dichos miRNAs de una muestra de referencia o con un valor mediano. En el contexto de la presente invención, se entiende por "muestra de referencia" la muestra de referencia que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de los genes de miRNA de la presente invención. En una realización, el valor de referencia se obtiene de la señal provista utilizando una muestra obtenida de un individuo que no tiene la enfermedad (es decir, que no padece de HHT).

25 Preferiblemente, se toman muestras (de referencia) de varios individuos que no tienen la enfermedad y se combinan, de modo que el valor de referencia refleje el valor medio de dichas moléculas en la población de individuos que no padecen HHT. "*Valor de referencia*" es el nivel de expresión de un miRNA de la invención en una muestra de referencia

30 En una realización preferente, los niveles de expresión se normalizan respecto al miRNA control, con el fin de paliar las variaciones de expresión de origen no biológico.

En una realización más preferente, el miRNA control es el denominado "hsa-miR-103a-3p" (SEQ ID nº 9).

En la invención, el método para determinar el resultado, es decir, el nivel de expresión del miRNA no necesita estar particularmente limitado, y puede seleccionarse mediante un método de perfilado de genes, como una micromatriz, y/o un método que comprende PCR, tal como tiempo de PCR; y/o Northern Blot. La PCR cuantitativa en tiempo real (generalmente abreviada como RQ-PCR, RT-qPCR, rt-PCR o qPCR) es una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible que se puede usar particularmente para perfilar la expresión de miARN en células y tejidos. Se puede utilizar cualquier método para evaluar los resultados de la RT-PCR, y se puede preferir el método $\Delta\Delta Ct$. El método $\Delta\Delta Ct$ se describe en detalle por Livak et al. (Methods 2001, 25: 402-408). (Ct = Valores umbral de ciclo). Al poner en práctica la presente invención, el método $\Delta\Delta Ct$ descrito por Livak et al. (Métodos 2001, 25: 402-408) se utilizarán preferentemente. El $\Delta\Delta Ct$ -method incluirá una 'muestra de control' y una 'muestra de sujeto'. La 'muestra de sujeto' es una muestra del sujeto a analizar. Para cada muestra, se incluyen un gen diana (aquí: miRNA de interés) y un gen de control endógeno (como se describe a continuación) para la amplificación por PCR a partir de alícuotas (típicamente en serie). Típicamente, se utilizan varias réplicas para cada concentración diluida para derivar la eficiencia de amplificación. La eficiencia de la amplificación por PCR se puede definir como porcentaje de amplificación (de 0 a 1). Durante la reacción de qPCR, un software mide típicamente para cada muestra el número de ciclo en el que la fluorescencia (indicador de amplificación por PCR) cruza una línea arbitraria, el umbral. Este punto de cruce es el valor Ct.

Una micromatriz es una matriz sobre un sustrato sólido (generalmente una lámina de vidrio o una célula de película delgada de silicio) que analiza grandes cantidades de material biológico, en el presente caso una gran cantidad de diferentes miRNA o, preferiblemente, sus transcritos de ADN inversos, que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre el sustrato sólido.

Una transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y detección posterior con una sonda de hibridación complementaria a (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

El método de la presente invención se puede aplicar con muestras de individuos de cualquier sexo, es decir, hombres o mujeres, y a cualquier edad.

En el método de la presente invención, la expresión del miRNA puede normalizarse, preferiblemente en relación con la expresión de otra molécula de ARN. Existen métodos de normalización bien conocidos en el estado de la técnica.

En otro aspecto, la invención también proporciona un método para asignar a un sujeto humano en uno de los dos grupos, en adelante “segundo método de la invención”, en el que el grupo 1 comprende sujetos identificables por el método de la invención; y en donde el grupo 2 representa los sujetos restantes.

- 5 Es posible proporcionar una terapia personalizada a un individuo, dependiendo de si el individuo está asignado al grupo 1 o al grupo 2. El grupo 1 comprende sujetos identificables por el método de la invención como individuos que padecen HHT; y en donde el grupo 2 representa los sujetos restantes.

10 En otro aspecto, la invención también proporciona un método para obtener datos útiles que permitan determinar si un individuo padece HHT de tipo 1, en adelante “tercer método de la invención” que comprende llevar a cabo el primer método de la invención y que además comprende la detección de un aumento del nivel de expresión de al menos un miRNA del grupo H1, preferentemente un aumento de nivel de expresión de los tres miRNA del grupo H1.

15 En otro aspecto, invención también proporciona un método para obtener datos útiles que permitan determinar si un individuo padece HHT de tipo 2, en adelante “cuarto método de la invención” que comprende llevar a cabo el primer método de la invención y que además comprende la detección una variación del nivel de expresión de miRNAs del grupo H2, particularmente una disminución del nivel de expresión de miR-9 o un
20 aumento del nivel de expresión de miR-29c, preferentemente la detección de ambas variaciones.

Kit o dispositivo de la invención

La presente invención también proporciona un kit o dispositivo, de ahora en adelante “kit de la invención o “dispositivo de la invención”, que comprende al menos un
25 oligonucleótido(s) capaz de hibridar con uno cualquiera o más, preferiblemente dos o más, y lo más preferiblemente todos, los miRNA establecidos como SEQ ID NOs: 1 a 8. Se prefiere que dicho oligonucleótido (s) sea capaz de hacerlo en condiciones de astringencia. En una realización preferida, uno o más de dichos uno o más oligonucleótidos (preferiblemente ADN) se definen adicionalmente mediante las
30 siguientes secuencias de TaqMan®

Nombre	Referencia
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-106b-3p	477866_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-486-5p	478128_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-183-5p	477937_mir

TaqMan Advanced Assay hsa-miR-143-3p	477912_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-9-5p	478214_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-654-3p	479135_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-142-3p	477910_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-150-5p	477918_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-29c-3p	479229_mir
TaqMan Advanced Assay hsa-miR-103a-3p	478253_mir
TaqMan Advanced Assay cel-miR39-3p	478293_mir

Tabla 2: Secuencias de TaqMan® empleadas

La astringencia es un término usado en experimentos de hibridación. La astringencia refleja el grado de complementariedad entre el oligonucleótido y el ácido nucleico (que en este caso es el miRNA a detectar); cuanto mayor sea la astringencia, mayor porcentaje de homología entre la sonda y el ácido nucleico unido al filtro. El experto en la materia sabe bien que la temperatura y las concentraciones de sal tienen un efecto directo sobre los resultados que se obtienen. Se reconoce que los resultados de la hibridación están relacionados con el número de grados por debajo de la T_m (temperatura de fusión) del ADN en el que se realiza el experimento. A menudo, las condiciones rigurosas se definen como un lavado con 0.1X SSC (solución salina-citrato de sodio (SSC) tampón a 65 °C. (SSC se proporciona generalmente como una solución madre 20X, que consiste en cloruro de sodio 3 M y citrato de trisodio 300 mM (ajustado a pH 7,0 con HCl)).

En realizaciones particulares, el kit se selecciona de (a) un kit adecuado para PCR, (b) un kit adecuado para Northern Blot y (c) un kit adecuado para análisis de micromatrices. También se pueden combinar dos o más de estas realizaciones, de modo que el kit pueda comprender, por ejemplo, tanto (a) como (c).

En el caso de (a) un kit adecuado para la PCR, esta PCR es típicamente una PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR), una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible. En este caso, se desea que el kit comprenda adicionalmente un cebador de oligonucleótido poliT además del oligonucleótido (s) del kit. El cebador oligonucleotídico poliT se puede usar junto con el oligonucleótido (s) de la invención para la PCR de cebado, después de la poliadenilación de los miRNA aislados mediante métodos conocidos por los expertos, como el uso de poli-(A) polimerasa y ATP. Estos reactivos pueden estar incluidos opcionalmente en el kit.

Una transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y detección posterior con un oligonucleótido (s) (sonda de hibridación) complementaria a (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

También es posible que el oligonucleótido (s) esté inmovilizado en manchas en una superficie (preferiblemente sólida). En una realización del mismo, el kit comprende una micromatriz. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (generalmente un portaobjetos de vidrio o una célula de película delgada de silicio) que
5 analiza grandes cantidades de diferentes ARN (en este caso miRNA), que se pueden detectar mediante sondas específicas inmovilizadas en puntos del sustrato sólido. Cada punto contiene una secuencia específica de ácido nucleico, típicamente una secuencia de ADN, conocida como sondas (o informadores). Si bien el número de manchas no está limitado, existe una realización preferida en la que la micromatriz se adapta a los
10 métodos de la invención. En una realización, una micromatriz personalizada de este tipo comprende cincuenta puntos o menos, tales como treinta puntos o menos, incluyendo veinte puntos o menos.

El kit o dispositivo de la invención puede usarse y el uso no está particularmente limitado, aunque se prefiere el uso en el método de la invención en cualquiera de sus
15 realizaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos, cebadores, sondas o anticuerpos están modificados o marcados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico. Así, preferiblemente, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por
20 ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente ^{32}P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

El kit o dispositivo de la invención puede comprender controles, instrucciones de programa e información necesaria para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la
25 invención.

Automatización de los métodos de la invención

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la
30 invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

30 MODOS DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Para llevar a cabo esta nueva metodología se extraen muestras de 5 ml de sangre periférica del individuo a diagnosticar en tubos BD Vacutainer® con citrato sódico 0,129M mediante punción venosa y se separa el plasma mediante centrifugación siguiendo el protocolo estándar (1500xg, 10 minutos). Después, se aíslan los exosomas a partir de una cantidad mínima de 500 µl de plasma mediante el kit denominado Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen; Vilnius, Lituania) y a continuación se extrae el RNA total presente en los exosomas con el kit Total Exosome RNA & Protein Isolation kit (Invitrogen), siempre siguiendo las instrucciones de fabricante. El RNA total aislado se resuspende en 100 µl de agua libre de nucleasas. Finalmente, la detección de los miRNAs se realiza mediante PCR en tiempo real (qPCR), previo paso de retrotranscripción con el TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), empleando los ensayos comerciales específicos de cada miRNA denominados TaqMan® Advanced Assay (Applied Biosystems) con el reactivo TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems), siempre siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 2).

Este sistema es el más sensible y específico de su categoría, superando a la tecnología basada en fluoróforos como el SYBR Green [M. Soltany-Rezaee-Rad, Z. Sepehrzadeh, N. Mottaghi-Dastjerdi, M.T. Yazdi, N. Seyatesh, Comparison of SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods for quantitative detection of residual CHO host-cell DNA in biopharmaceuticals, *Biologicals* 43(2) (2015) 130-5].

La expresión relativa de estos 8 miRNAs se calcula respecto a la expresión de miR-103a, un miRNA que gracias al análisis de RNA-seq previo observamos que estaba presente simultáneamente en los exosomas de plasma y cuyo nivel de expresión permanece invariable en todos los grupos, condición que deben cumplir los miRNAs utilizados como endógenos para llevar a cabo la normalización.

Por lo tanto, su nivel de expresión se emplea como referencia interna con el fin de paliar las variaciones de expresión de origen no biológico.

De este modo, aplicando la nueva metodología descrita en esta invención, el diagnóstico de la HHT se realizaría por la expresión diferencial de los miRNAs del grupo HC.

Al mismo tiempo, la expresión diferencial del grupo H1 o H2 nos indicaría el tipo de HHT del paciente (figuras 3 y 4).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico *in vitro* de la HHT en un individuo, que comprende detectar los niveles de expresión de SEQ ID NO: 1 (miR-142) en una muestra biológica aislada de dicho individuo.
- 5 2.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico *in vitro* de la HHT en un individuo según reivindicación anterior, que además comprende la detección de los niveles de expresión de SEQ ID NO: 2 (miR-150)
- 3.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico *in vitro* de la HHT en un individuo según reivindicaciones 1 o 2 que además comprende la detección de los
10 niveles de expresión de SEQ ID NO: 3 (miR-486)
- 3.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico *in vitro* de la HHT en un individuo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la detección de los niveles de expresión de SEQ ID NO: 4 (miR-106b); SEQ ID NO: 5 (miR-183); SEQ ID NO: 6 (miR-654); SEQ ID NO: 7 (miR-9) y SEQ ID NO: 8 (miR-29c)
- 15 4.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la muestra biológica aislada es sangre venosa periférica o plasma obtenido de la sangre venosa periférica.
- 5.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la HHT, que comprende la obtención de datos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y además comprende:
- 20 a) comparar los niveles obtenidos en el paso anterior con los valores de referencia, estándar y/o obtenidos de una muestra de referencia.
- 6.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la HHT, según reivindicación anterior caracterizado porque la comparación se realiza tras la normalización de los niveles de expresión de los miRNAs respecto a un miRNA control.
- 25 7.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la HHT, según reivindicación anterior caracterizado el miRNA control es "hsa-miR-103a-3p" (SEQ ID nº 9).
- 8.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la HHT, que comprende los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y además comprende:
- 30 b1) incluir al individuo en el grupo de individuos con HHT cuando presenta una disminución de miR-142, de miR-150 o/y un aumento de miR-486, o cualquiera de sus combinaciones.

9.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la HHT, que comprende los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y además comprende:

- 5 b2) incluir al individuo en el grupo de individuos con HHT de tipo 1 cuando presenta un aumento de miR-106b, de miR-183 o/y miR-654, o cualquiera de sus combinaciones.

10.- Un método de diagnóstico *in vitro* de la HHT, que comprende los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, y además comprende:

- b2) incluir al individuo en el grupo de individuos con HHT de tipo 2 cuando presenta una disminución de miR-9 y/o un aumento de miR-29c.

10 11.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde la detección de los niveles de expresión se realiza mediante:

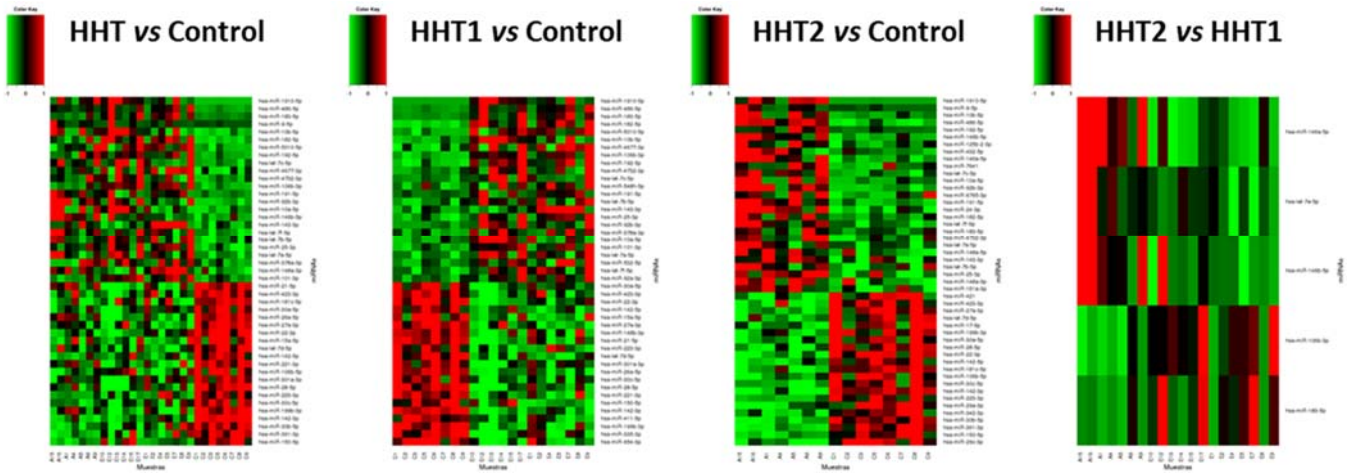
- (i) un método de perfilado genético, como una micromatriz, y/o
 (ii) un método que comprende PCR, tal como PCR en tiempo real; y/o
 (iii) Northern Blot.

15 12.- El método según la reivindicación anterior, done la detección de los niveles de expresión se realiza mediante RT-PCR y/o PCR cuantitativa (qPCR).

13.- Un kit o dispositivo que comprende al menos un oligonucleótido(s) capaz de hibridarse con algún miRNA con alguna de las SEQ ID NOs: 1 a 8 en condiciones de astringencia.

20 14. Uso del kit o dispositivo según la reivindicación anterior en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

A



B.

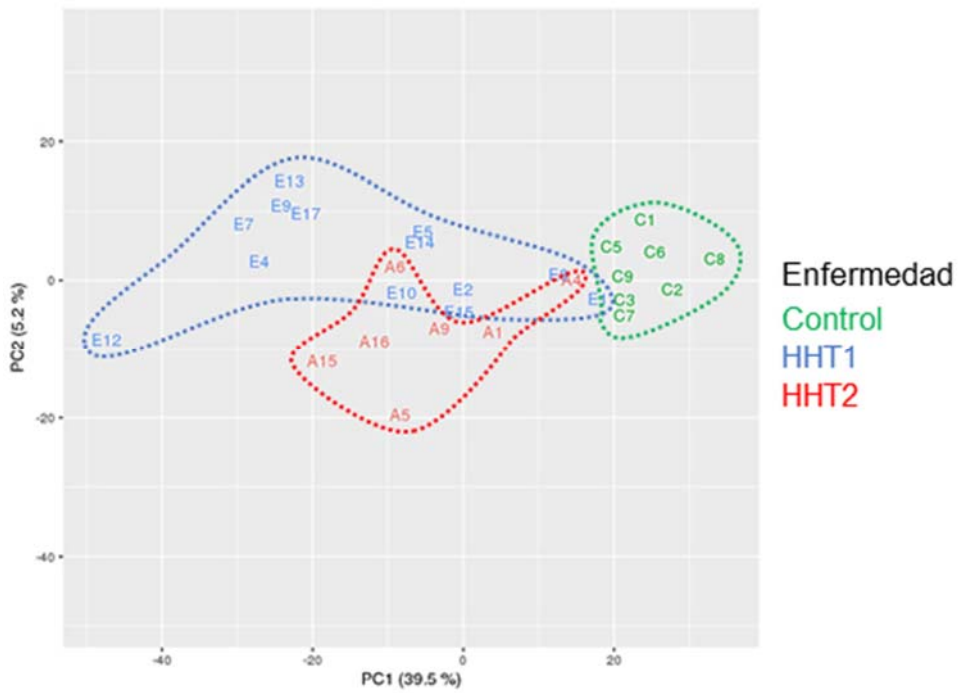


Figura 1

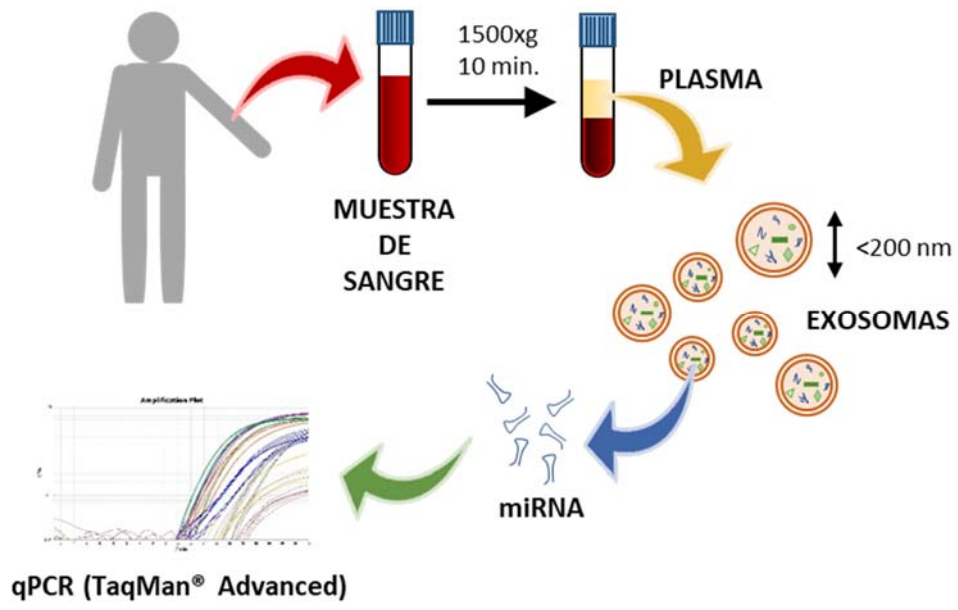


Figura 2

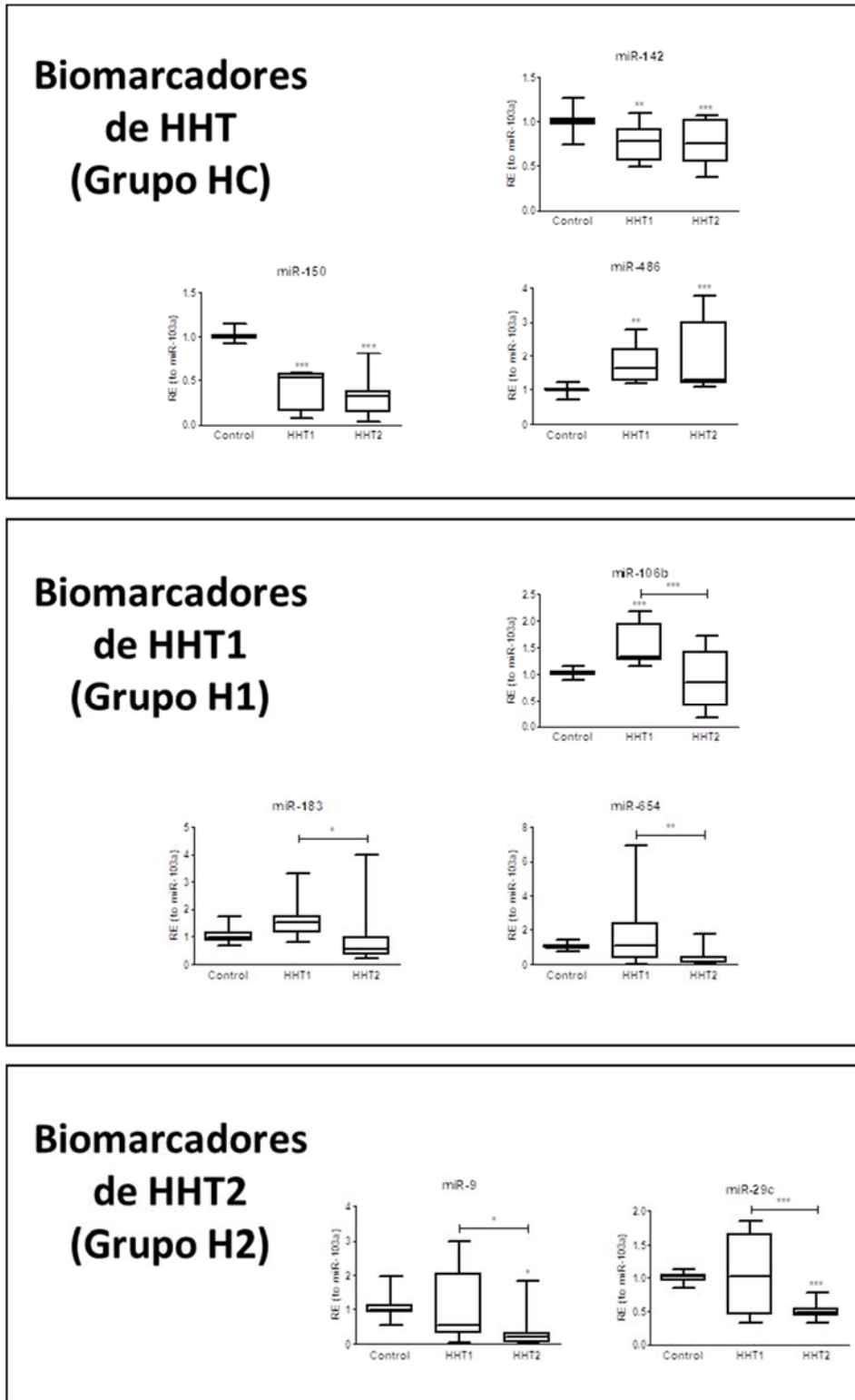


Figura 3

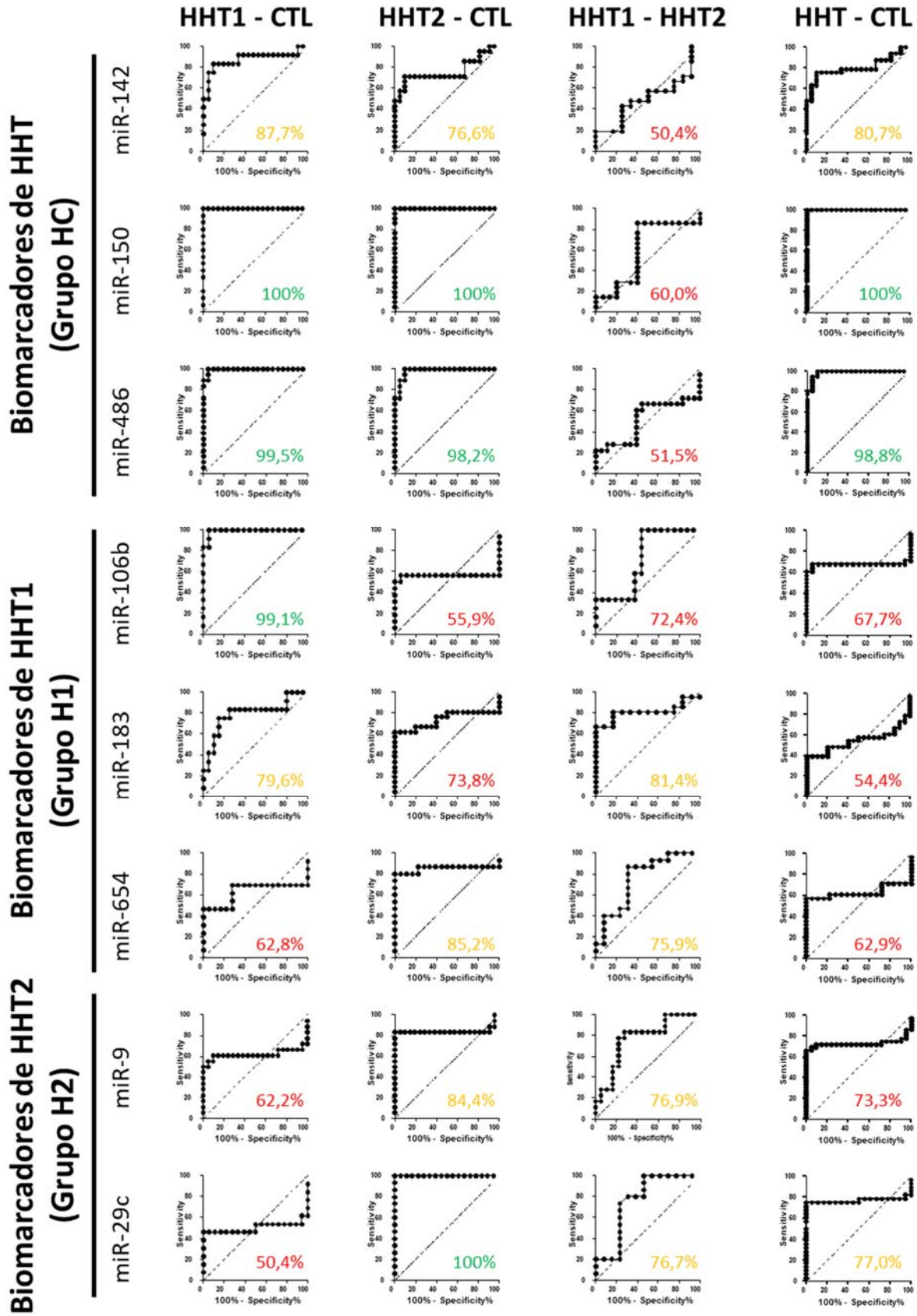


Figura 4



② N.º solicitud: 201930342

② Fecha de presentación de la solicitud: 15.04.2019

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q1/6883** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2014111561 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 24/07/2014, Ejemplo 5, reivindicación 23	13
X	WO 2018044979 A1 (UNIV YALE) 08/03/2018, pág. 59, línea 15 – pág. 60, línea 20, reivindicación 102	13
X	WO 2018032062 A1 (UNIV OF TECHNOLOGY SYDNEY) 22/02/2018, Párrafos [0095]-[0097], reivindicación 13	13
A	PLUMITALLO S et al. Circulating microRNAs in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Preliminary results identify significant differences among patients. <i>Angiogenesis</i> 2018 Springer Netherlands nld. , 30/11/2017, Vol. 21, Nº 1, Páginas 154, ISSN 1573-7209 (print), <DOI: doi:10.1007/s10456-017-9584-3>. todo el documento.	1-14
A	CANNAVICCI A et al. MicroRNA dysregulation in peripheral blood mononuclear cells and early endothelial progenitor cells from HHT patients. <i>Angiogenesis</i> 2018 Springer Netherlands nld. , 30/11/2017, Vol. 21, Nº 1, Páginas 152, ISSN 1573-7209 (print), <DOI: doi:10.1007/s10456-017-9584-3>. todo el documento.	1-14
A	TABRUYN SEBASTIEN P et al. MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF-beta signaling pathways in endothelial cells. <i>Angiogenesis</i> OCT 2013. , 30/09/2013, Vol. 16, Nº 4, Páginas 877-887, ISSN 0969-6970(print) ISSN 1573-7209(electronic), <DOI: doi:10.1007/s10456-013-9362-9>. <p> todo el documento.</p>	1-14
A	ZHANG QIUWANG et al. Elevated circulating microRNA-210 levels in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: a potential new biomarker. <i>Biomarkers</i> FEB 2013. , 31/01/2013, Vol. 18, Nº 1, Páginas 23-29, ISSN 1354-750X(print) ISSN 1366-5804(electronic), <DOI: doi:10.3109/1354750X.2012.728624>. todo el documento.	1-14
A	BOTELLA LUISA-MARIA et al. Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. <i>Frontiers in Genetics</i> MAR 31 2015. , 31/03/2015, Vol. 6, Páginas Article No.: 115, ISSN 1664-8021(electronic), <DOI: doi:10.3389/fgene.2015.00115>. todo el documento.	1-14

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
18.02.2020

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201930342

22 Fecha de presentación de la solicitud: 15.04.2019

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/6883** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KRITHARIS ATHENA et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: diagnosis and management from the hematologist's perspective. Haematologica AUG 31 2018. , 31/08/2018, Vol. 103, N° 9, Páginas 1433-1443, ISSN 0390-6078, <DOI: doi:10.3324/haematol.2018.193003>. todo el documento.	1-14

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
18.02.2020

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/3

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, INSPEC, NPL, INTERNET