

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de mayo de 2010 (14.05.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/052357 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2009/070483

(22) Fecha de presentación internacional:

6 de noviembre de 2009 (06.11.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200803174

6 de noviembre de 2008 (06.11.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER)** [ES/ES]; C/ Álvaro de Bazán, 10 Bajo, E-46010 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **OJEDA FERNÁNDEZ, María Luisa** [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **BOTELLA CUBELLS, Luisa María** [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **BARRIOS, Laura** [ES/ES]; CENTRO TÉCNICO DE INFORMÁTICA (CTI), C/ Pinar, 19, E-28006 Madrid (ES). **BERNABEU**

QUIERANTE, Carmelo [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING HEREDITARY HEMORRHAGIC TELANGIECTASIA

(54) Título : MÉTODO DE DETECCIÓN DE LA TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA

(57) Abstract: Method for detecting hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) comprising analysis in vitro of the products of the expression of genes ENG or FLT1 and ENG or ANGPT2 in biological samples from patients which moreover permits subclassifying variants HHT1 and HHT2 of the disorder. In particular the present invention relates to a kit for molecular detection of HHT capable of realising the aforementioned detection.

(57) Resumen: 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.



WO 2010/052357 A1

MÉTODO DE DETECCIÓN DE LA TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA.

La presente invención se refiere a un método para la detección de la
5 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 subclasificar las variantes HHT1 y HHT2 de la enfermedad. En particular, la presente invención se refiere a un kit para la detección molecular de HHT
10 capaz de llevar a cabo la detección mencionada anteriormente.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT), también conocida como
15 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
20 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
25 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
30 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 (Cole 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.

Tanto endoglina 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). Endoglina 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). Endoglina juega un importante papel en la angiogenesis (Duff y col., 2003; Jerkic y col., 2006a) y es precisamente en estos procesos fisiopatologicos donde se han detectado altos niveles de expresion de endoglina (Fonsatti y col., 2003; Duff y col., 2003). Endoglina
5 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 endoglina (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
10 elevados en suero del receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (VEGF-R1/sFlt1) y de sEng se han encontrado en mujeres con preclampsia (Levine y col., 2006, Lim y col., 2008).

Angiopoiteina-2 (Ang-2) es otro factor soluble en el plasma implicado en
15 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).

20

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
25 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
30 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 *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.

5 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

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
10 formas HHT1 y HHT2.

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
15 cantidad detectada de dichos componentes solubles con una cantidad de referencia observada en un grupo control de individuos sanos.

Como consecuencia de este análisis, los investigadores pudieron determinar que los niveles de sEng, sFlt1 y Ang-2 se encuentran disminuidos
20 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.

Mediante un análisis discriminante usando como variables sEng, sFlt1 y Ang-2,
25 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
30 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%.

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:

5

- 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.

10

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).

15

20

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

25

30

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.

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.

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.

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 marcaje; 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
5 (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.

10

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.

15

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
20 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 espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante
25 medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

30

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.

- 5 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.
- 10
- 15

- 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.
- 20
- 25
- 30

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 dichas 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 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.

10

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:

- 15 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.

20 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

25 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.

30 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.

5

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.

10

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.

15

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.

20

25

DESCRIPCION 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.

30

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.

5 **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.

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

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.

15

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos
20 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.

25 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
30 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.

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 Angiopoietina 2

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

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°.

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 $p < 0.05$.

			Diferencia promedio (I-J)	Error Estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
Variable Dependiente	(I) grupo	(J) grupo	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

5 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			

Tabla 6. Test de Bonferroni para sEng. El asterisco (*) significa que hay diferencias significativas al nivel de 0.05

			Diferencia Promedio (I-J)	Error Std.	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
Variable Dependiente	(I) grupo	(J) grupo	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

- 5 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.

10 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:

$$\begin{aligned} \text{Referencia} &= 8,4 \times \text{sEng ng/ml} + 0,001 \times \text{Ang-2 pg/ml} - 21,7 \\ \text{HHT} &= 4,5 \times \text{sEng ng/ml} + 0,001 \times \text{Ang-2 pg/ml} - 7,2 \end{aligned}$$

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).

$$\begin{aligned} \text{Referencia} &= 14.3 \times \text{sEng (ng/ml)} - 0.001 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 32.1 \\ \text{HHT1} &= 4.9 \times \text{sEng (ng/ml)} + 0.001 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 6.5 \\ \text{HHT2} &= 9.7 \times \text{sEng (ng/ml)} - 0.001 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 14.8 \end{aligned}$$

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

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

Tabla 10. Coeficientes 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

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 bivalente, con marcas para los tres grupos (Fig. 4).

Tabla 11. 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

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
5 individuos con niveles más bajos serían pacientes de HHT, con una probabilidad mayor del 95% (Fig.5).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 10 -Abdalla SA, Letarte M (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 43:97–110.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon 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.
- 15 -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.
- 20 -Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest.* 104: 1343-51.
- 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.
- 25 -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
30 hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet.* 1; 16: 1515-33.

- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic 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.
- Guttmacher, AE; Marchuk, DA and White RI (1995) Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *New Eng. J. Med*. 333: 918-924.
- Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM. 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J*. 18: 609-611.
- 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, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, 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 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.
- 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 preeclampsia. *N Engl J Med*. 355: 992-1005. Erratum in: *N Engl J Med*. 355:1840.

- 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) Defective 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
- 10 -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-eclampsia molecule. *Nephrol Dial Transplant.* 21: 3052-4.
- 15 -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 .
- 20 -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.
- Pepper, MS (1997). Transforming growth factor beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 8: 21-43
- 25 -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.
- Risau, W. (1997) Mechanism of angiogenesis. *Nature.* 386: 671-674.
- 30 -Shi Y and Massague J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113: 685-700.

- 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 malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 54: 714-729.
- 5 -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.
- 10 -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.

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 la 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.
- 5 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 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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:
- 30 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.

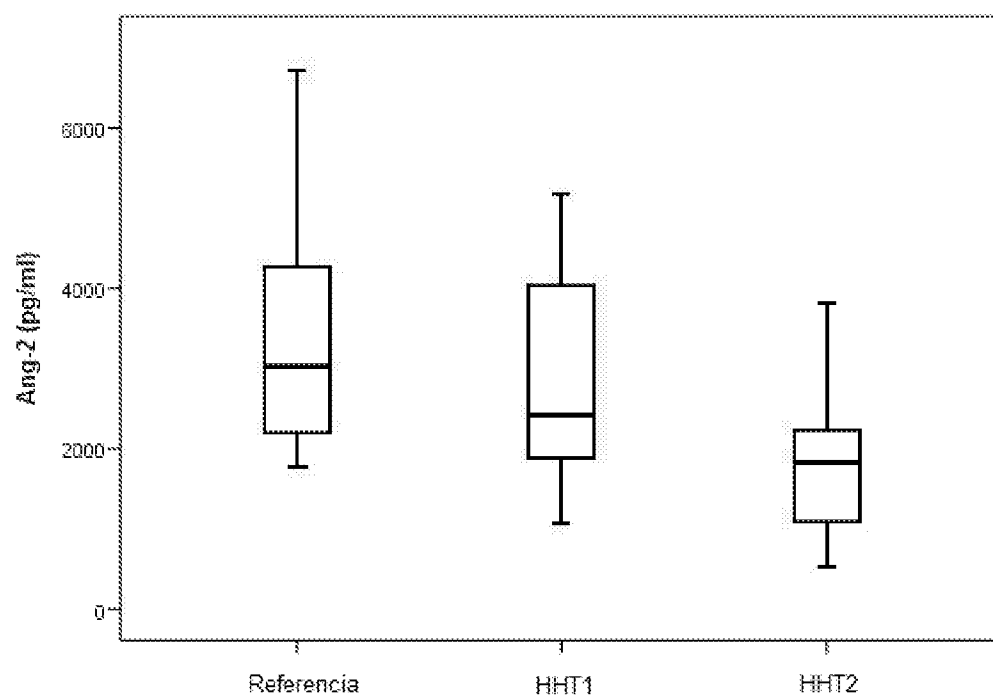
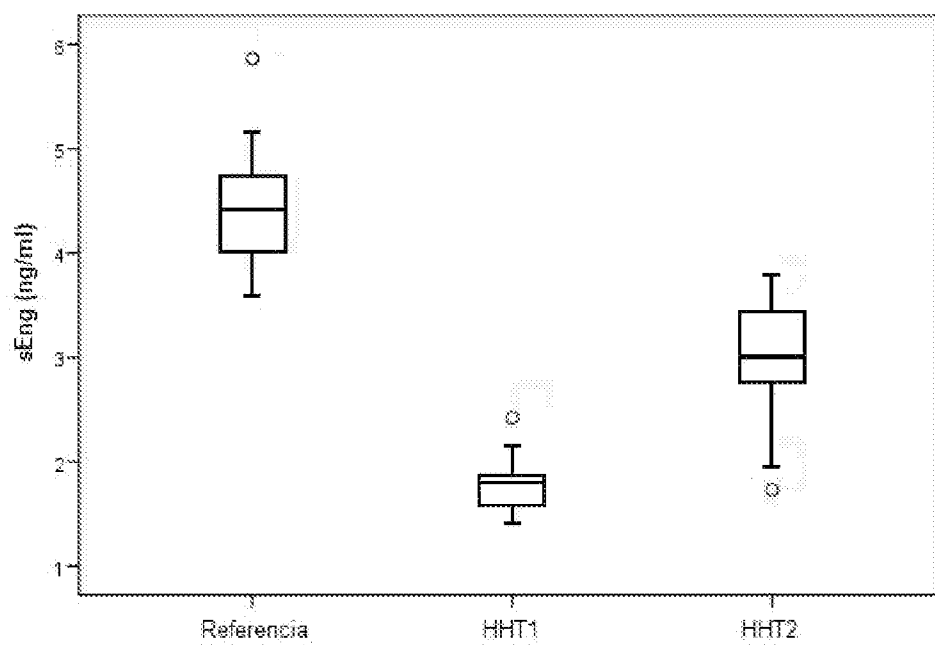
16. Kit según la reivindicación 15 que además comprende las instrucciones para llevar a cabo el método de detección de HHT según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

5

10

15

20

**FIG. 1****FIG. 2**

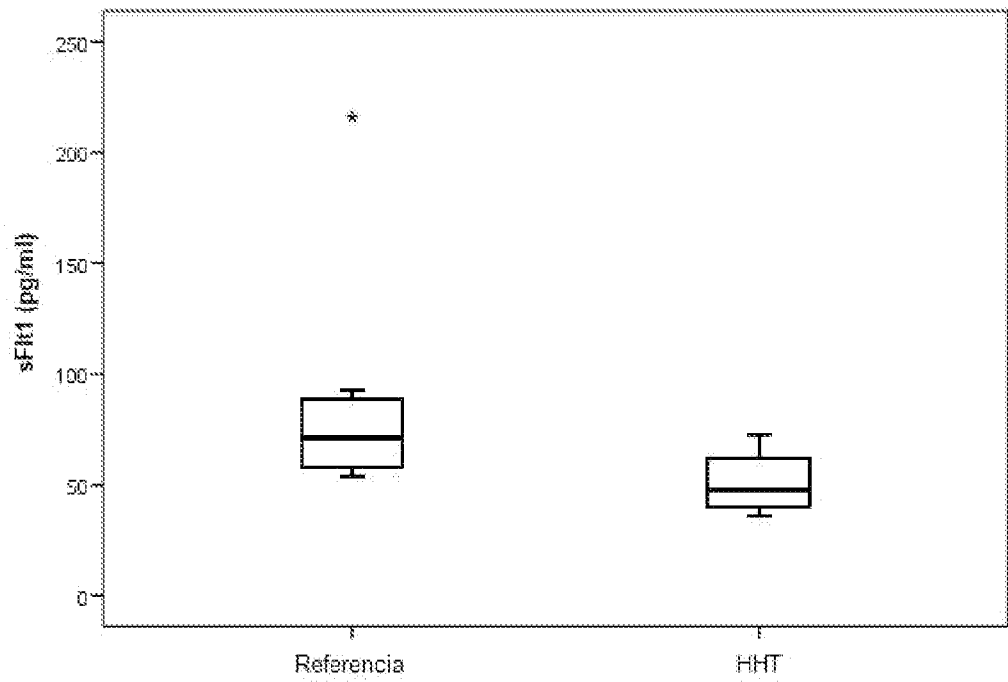


FIG. 3

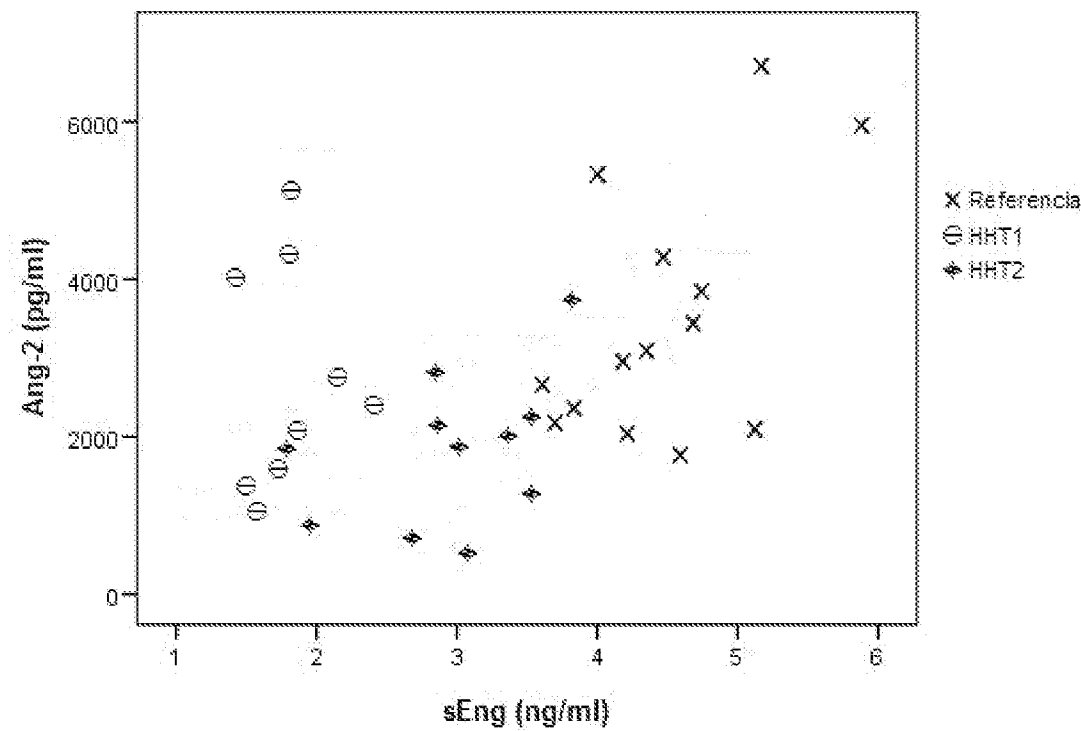


FIG. 4

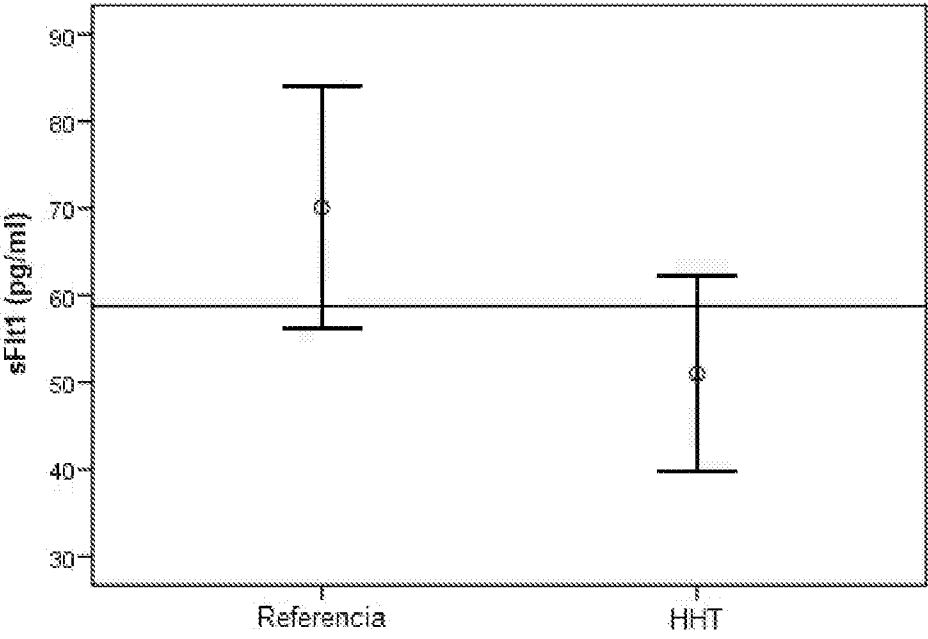


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Fernández-López, et al. Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. Human Molecular Genetics 2007, vol 16, no 13 , pag. 1515-1533 the whole document	1-3,8,12-16
A	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 the whole document	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 the whole document.	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 February 2010 (09.02.2010)

Date of mailing of the international search report

(16/02/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Santos Díaz

Telephone No. +34 91 349 5569

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070483

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Luft F.C. Soluble indoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule. Translational Nephrology, 2006, vol 21, pag 3052-3054 the whole document.	1-7
A	US 6475753 B1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 05.11.2002,	1-3, 8

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2009/070483

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

see additional sheet

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

Box III

The application does not meet the requirement of unity of invention, since it does not contain a single invention or group of inventions so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1). The Authority thus considers that the international application contains at least two inventions, each relating to a method, as follows:

1. Method for detecting hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) which involves detecting the expression products of the genes ENG and ANGPT2. Claims 1-3 (in part), 8-11 and 12-16 (in part).
2. Method for detecting hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) which involves detecting the expression products of the genes ENG and FLT1. Claims 1-3 (in part), 4-7 and 12-16 (in part).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070483

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6475753 B	05.11.2002	WO 9909155 A	25.02.1999
		CA 2301796 A	25.02.1999
		AU 8910998 A	08.03.1999
		CA 2331154 A	23.12.1999
		WO 9966041 A	23.12.1999
		AU 4682999 A	05.01.2000
		EP 1005544 A	07.06.2000
		EP 19980940950	18.08.1998
		EP 1088071 A	04.04.2001
		EP 19990930252	15.06.1999
		JP 2001514885 T	18.09.2001
		JP 2002518010 T	25.06.2002
		US 2003044851 A	06.03.2003
		US 6627741 B	30.09.2003
		US 2003065151 A	03.04.2003
		US 6774216 B	10.08.2004
		US 2003069405 A	10.04.2003
		US 2004014954 A	22.01.2004
		US 6881823 B	19.04.2005
		US 2003166906 A	04.09.2003
		US 2004002591 A	01.01.2004
		US 2004146930 A	29.07.2004
		US 2005095612 A	05.05.2005
		US 7217528 B	15.05.2007
		US 2005208622 A	22.09.2005
		US 7163797 B	16.01.2007
		US 2007020724 A	25.01.2007
		US 2007154910 A	05.07.2007
		US 7459531 B	02.12.2008
		US 7368531 B	06.05.2008
		US 2009247482 A	01.10.2009
		US 2009253626 A	08.10.2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070483

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	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	1-3,8,12-16
A	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

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

09 Febrero 2010 (09.02.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

16-FEBRERO-2010 (16/02/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Santos Díaz

N° de teléfono +34 91 349 5569

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070483

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
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

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070483

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver hoja adicional

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

La solicitud de patente no satisface la exigencia de unidad de invención, puesto que no está relacionada con una sola invención o grupo de invenciones vinculadas entre sí de tal manera que formen un solo concepto inventivo general según la regla 13. 1 del PCT. En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay al menos dos invenciones cada una de ellas referente a los siguientes métodos.

1.- Método para la detección de Telangiectasa Hereditaria Hemorrágica (HHT) que comprende la detección de los productos de expresión de los genes ENG y ANGPT2. Reivindicaciones 1-3 (parcialmente) 8-11, 12-16 (parcialmente)

2.- Método para la detección de Telangiectasa Hereditaria Hemorrágica (HHT) que comprende la detección de los productos de expresión de los genes ENG y FLT1. Reivindicaciones 1-3 (parcialmente), 4-7, 12-16 (parcialmente)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070483

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 6475753 B	05.11.2002	WO 9909155 A	25.02.1999
		CA 2301796 A	25.02.1999
		AU 8910998 A	08.03.1999
		CA 2331154 A	23.12.1999
		WO 9966041 A	23.12.1999
		AU 4682999 A	05.01.2000
		EP 1005544 A	07.06.2000
		EP 19980940950	18.08.1998
		EP 1088071 A	04.04.2001
		EP 19990930252	15.06.1999
		JP 2001514885 T	18.09.2001
		JP 2002518010 T	25.06.2002
		US 2003044851 A	06.03.2003
		US 6627741 B	30.09.2003
		US 2003065151 A	03.04.2003
		US 6774216 B	10.08.2004
		US 2003069405 A	10.04.2003
		US 2004014954 A	22.01.2004
		US 6881823 B	19.04.2005
		US 2003166906 A	04.09.2003
		US 2004002591 A	01.01.2004
		US 2004146930 A	29.07.2004
		US 2005095612 A	05.05.2005
		US 7217528 B	15.05.2007
		US 2005208622 A	22.09.2005
		US 7163797 B	16.01.2007
		US 2007020724 A	25.01.2007
		US 2007154910 A	05.07.2007
		US 7459531 B	02.12.2008
		US 7368531 B	06.05.2008
		US 2009247482 A	01.10.2009
		US 2009253626 A	08.10.2009