



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 609**

51 Int. Cl.:
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06837479 .2**
96 Fecha de presentación : **14.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1952156**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Método de diagnóstico para preeclampsia.**

30 Prioridad: **14.11.2005 US 736659 P**
03.03.2006 US 367126

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.08.2011

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Department D377/Ap6a-1 100
Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6008, US

72 Inventor/es: **Sogin, David, C.;**
Laird, Donald, M.;
Yu, Zhiguang y
Doss, Robert, C.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 363 609 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico para preeclampsia

5 **Campo técnico de la invención**

El campo de la invención se refiere a la detección de factor de crecimiento placentario (PIGF), tirosina quinasa tipo fms soluble (sFlt-1) y moléculas relacionadas en muestras biológicas que se obtienen preferentemente de pacientes.

10 **Antecedentes de la invención**

El inmunodiagnóstico permite la detección, diagnóstico y pronóstico de enfermedades, disfunciones y otras afecciones que afligen o afectan a animales, incluyendo seres humanos. Se ha vuelto altamente deseable realizar ensayos de inmunodiagnóstico con la ayuda de un equipo de ensayo automático, que minimice el tiempo de manipulación de muestras y datos por parte del investigador. El rápido desarrollo comercial del inmunodiagnóstico desde 1980 ha sido posible en parte por tecnología que permite el aislamiento rápido y eficaz de anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo que se unen con una especificidad suficiente a marcadores que se encuentran en muestras biológicas, de modo que pueda reconocerse el marcador. Ha sido incluso más deseable para algunos ensayos de inmunodiagnóstico el uso de anticuerpos monoclonales, que en muchos casos permite al experto en la materia adaptar cuidadosamente el rendimiento, la especificidad y la sensibilidad de un ensayo a las necesidades particulares. Los anticuerpos también tienden a ser moléculas predecibles que son algo susceptibles de mejora por regeneración por ingeniería genética. Por lo tanto, se han convertido en elementos esenciales de los agentes de inmunodiagnóstico modernos.

Están disponibles otros reactivos para la detección de marcadores en muestras biológicas, pero la necesidad de caracterizar cuidadosamente estos agentes y de desarrollar técnicas únicas para su uso en inmunoensayos ha disuadido algo de su uso en el inmunodiagnóstico moderno. Esto es particularmente cierto cuando el reactivo distinto de anticuerpo es un polipéptido o proteína.

El VEGF y el P1GF pertenecen a una familia de péptidos reguladores que pueden controlar la formación de vasos sanguíneos y la permeabilidad vascular. Se cree que estas proteínas interactúan con Flt-1 y KDF1/FLK1 para conseguir esta función (Mattei et al., *Genomics*, 32, 168-169, (1996)). Actualmente hay 3 supuestas isoformas de PIGF identificadas: PIGF1, PIGF2 y P1GF3. El P1GF2 puede unirse con heparina. Se cree que el PIGF2 es capaz de unirse a neuropilina-1 en células endoteliales de la vena umbilical humana de una forma dependiente de heparina. También se cree que la neuropilina-1 es capaz de unirse con P1GF1 con menor afinidad (Migdal et al., *J Biol Chem*, 273, 22272-22278(1998)).

Se cree que el P1GF es capaz de estimular la angiogénesis y el crecimiento colateral en el corazón y miembro isquémico con buena eficacia (Luttun et al., *Nature Med* 8, 831-840 (2002)). La activación de Flt-1 por P1GF puede causar angiogénesis. Tanto VEGF como PIGF se unen a Flt-1, sin embargo, se cree que la unión de P1GF con Flt-1 causa efectos biológicos diferentes que la unión de VEGF a Flt-1.

En mujeres gestantes que padecen preeclampsia, un aumento de la Flt-1 soluble (sFlt-1) puede causar una disminución de los niveles circulantes de VEGF libre y, especialmente, de P1GF, dando como resultado una disfunción de células endoteliales que podría aliviarse mediante VEGF y P1GF exógenos (Maynard et al., *J Clin Invest*, 111, 649-658 (2003)). Los niveles séricos de P1GF eran significativamente menores en mujeres que posteriormente tuvieron preeclampsia, que en mujeres que posteriormente no desarrollaron preeclampsia, en un estudio descrito por Levine et al. (*New Eng J Med*, 350, 672-683 (2004)). El estudio sugería que la diferencia podría ser perceptible hacia las aproximadamente 13 a aproximadamente 16 semanas de gestación, y la mayor diferencia en los niveles de P1GF era evidente más próxima al inicio de la preeclampsia. Levine et al. también sugirieron que el aumento en el nivel de sFlt-1 total en la sangre también era más pronunciado en las mujeres preeclámpsicas. Levine et al. sugirieron por lo tanto que niveles aumentados de sFlt-1 total y niveles inferiores de P1GF podían predecir el posterior desarrollo de preeclampsia.

Se cree que la sFlt-1 es una forma de corte y empalme alternativo de flt-1 que da como resultado una variante soluble de la proteína Flt-1 y que puede unirse tanto al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con gran afinidad (Kendall et al., *Biophys Res Commun*, 226, 324-328 (1996)) como al PIGF. Estudios de delección de dominios de la sFlt-1 han demostrado que los dominios 2 y 3 de la (s)Flt-1 permiten la unión a VEGF con casi la misma afinidad que la sFlt-1, y que el dominio 2 solo se une solamente 60 veces menos fuertemente que la sFlt-1 de longitud completa.

El documento WO2005/077007 menciona una medición de PIGF libre y sFlt-1 en forma unida, total o libre y VEGF (pág. 25, párrafo 2), pero no se describen herramientas para medir la sFlt-1 libre. Se propone el cálculo de la relación de sFlt-1 respecto a VEGF y PIGF (véase también del último párrafo de la pág. 24 al párrafo 1 de la página 25).

Sumario de la invención

La invención en su forma más amplia se define en las reivindicaciones independientes 1 y 2. Se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones 3-29.

Las reivindicaciones 1 y 2 dicen lo siguiente:

1. Un método para predecir un menor riesgo de preeclampsia, que comprende: medir la cantidad de sFlt-1 libre en una muestra biológica obtenida de una mujer gestante, midiendo la cantidad de PIGF libre en la muestra biológica y comparando la relación observada con un valor o intervalo de valores predeterminado.

2. Un método para predecir un menor riesgo de preeclampsia, que comprende: medir las cantidades de sFlt-1 total y sFlt-1 unida en una muestra biológica obtenida de una mujer gestante, midiendo la cantidad de PIGF libre en la muestra biológica y comparando la relación observada con un valor o intervalo de valores predeterminado.

La descripción implica el uso de un compañero de unión proteico distinto de una porción de un anticuerpo, usado para detectar la cantidad o la concentración de un segundo compañero de unión distinto de una porción de un anticuerpo, en una muestra biológica. Sólo se usa preferentemente un anticuerpo o porción del mismo en el método de la invención. Los compañeros de unión de la invención incluyen factor de crecimiento placentario (P1GF) y tirosina quinasa tipo fms soluble (sFlt-1), que es una porción de Flt-1 generada por corte y empalme alternativo del producto génico de Flt-1 y que es capaz de unirse con PIGF.

La descripción también proporciona un método de determinación de la cantidad de sFlt-1 que no está unida a P1GF ("sFlt-1 libre") y un método de determinación de la cantidad de P1GF que no está unido a sFlt-1 ("PIGF libre").

Además, la descripción proporciona un método de determinación de la relación de sFlt-1 libre respecto a PIGF libre.

En otra realización, la relación de sFlt-1 libre respecto a PIGF libre se usa para diagnosticar, predecir, controlar o terapia de control de la preeclampsia.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la capacidad de sFlt-1 para interactuar con P1GF. Aunque la unión de dos moléculas de sFlt-1 con un homodímero de PIGF se ha sugerido por observaciones de sistemas experimentales, los inventores reconocen que este estado puede no existir *in vivo* o puede existir a niveles insignificantes, pero se presenta en la Fig. 1 porque el método de la invención es útil para la detección de dichos complejos si existen.

La Figura 2 representa un histograma de los niveles de PIGF observados mediante un inmunoensayo que emplea un anticuerpo monoclonal usado para capturar P1GF libre y un anticuerpo policlonal usado para detectar PIGF en un pequeño número de muestras humanas recogidas e investigadas en condiciones éticamente apropiadas. La Figura 2 demuestra que bajos niveles de PIGF están asociados con gestaciones preeclámpsicas (PE) y también que la capacidad de separar gestaciones no preeclámpsicas (normales) de gestaciones preeclámpsicas usando dos anticuerpos contra P1GF está en necesidad de mejora.

La Figura 3 representa un histograma de los datos recogidos usando un anticuerpo monoclonal como primer sbp para sFlt-1 y un anticuerpo policlonal como segundo sbp para sFlt-1. Estos datos muestran que hay una superposición significativa en el intervalo de valores de sFlt-1 total para mujeres gestantes no preeclámpsicas (normales) con el intervalo de valores de sFlt-1 total para mujeres gestantes preeclámpsicas (PE). De acuerdo con estos datos, existiría la necesidad de mejorar la capacidad de discriminar entre gestaciones normales y preeclámpsicas basándose en la inspección de los niveles de sFlt-1 observados mediante un inmunoensayo usando dos anticuerpos contra sFlt-1 en muestras de diagnóstico obtenidas de mujeres gestantes.

La Figura 4 representa los datos obtenidos de una forma similar a la de los datos representados en la Figura 3, excepto por que se usaron dos anticuerpos monoclonales contra sFlt-1 en lugar de una combinación de un anticuerpo policlonal y uno monoclonal. Los datos presentados en las Figuras 3 y 4 indican que un inmunoensayo para sFlt-1 que comprende un anticuerpo policlonal y monoclonal para sFlt-1 da mejores resultados que un inmunoensayo similar que comprende dos anticuerpo monoclonales. Aun cuando basándose en los principios generales se esperaría que este ensayo proporcionaría una mejor cuantificación que el ensayo de la Figura 3, sorprendentemente proporciona menos capacidad para discriminar especímenes no preeclámpsicos de especímenes preeclámpsicos.

La Figura 5 representa un histograma de los datos recogidos usando una realización preferida de la invención. Estos datos se recogen con un inmunoensayo que comprende un anticuerpo monoclonal marcado con una micropartícula contra sFlt-1, de modo que la sFlt-1 total en la muestra estaría unida a la micropartícula. La sFlt-1 unida se detectó mediante la porción de unión a sFlt-1 de P1GF marcada con acridinio. Este ensayo determina la cantidad de sFlt-1 libre en el espécimen. Estos datos demuestran que hay una reducción significativa en la superposición de los valores de sFlt-1 libre para mujeres gestantes no preeclámpsicas (normales) con el intervalo de valores de la sFlt-1 libre para mujeres preeclámpsicas (PE). De acuerdo con estos datos, el uso de una porción de P1GF como sbp para la sFlt-1 libre mejora significativamente la capacidad para discriminar entre gestaciones normales y preeclámpsicas, basándose en la inspección de los niveles de sFlt-1 en muestras de

diagnóstico obtenidas de mujeres gestantes.

La Figura 6 recoge los datos descritos anteriormente y los presenta en una sola representación gráfica.

La Figura 7 normaliza los datos presentados en la Figura 6 respecto a una sola muestra no preeclámpsica.

La Figura 8 compara los datos recogidos de la mujer preeclámpsica "más normal" en el estudio ("mP-20") con los datos recogidos de las muestras de mujeres no preeclámpsicas. Las mediciones de sFlt-1 son de sFlt-1 total para el formato de anticuerpo monoclonal + policlonal de este ensayo, y para el formato monoclonal + monoclonal de este ensayo, mientras que para los datos de "Recpt libre", se usó una porción de unión a sFlt-1 de P1GF como un sbp en un inmunoensayo tipo sándwich y, por lo tanto, se unía solo a sFlt-1 libre. Estos datos muestran que, de acuerdo con aspectos de la presente invención, la relación de sFlt-1 libre respecto a P1GF libre (que varía de aproximadamente 0 a aproximadamente 1,0) es un mejor predictor de menor riesgo (es decir, gestaciones normales) que la relación de P1GF respecto a sFlt-1 total en la muestra.

La Figura 9 representa en forma de tabla la capacidad aumentada de la presente invención para discriminar muestras no preeclámpsicas de muestras preeclámpsicas. Estos datos demuestran que para especímenes no preeclámpsicos determinados con un inmunoensayo basado en dos anticuerpos, se observa que la relación de sFlt-1 libre respecto a P1GF libre es superior que cuando se usan realizaciones de la invención. Por consiguiente, estos datos demuestran que la invención proporciona una discriminación superior de especímenes no preeclámpsicos de muestras preeclámpsicas.

Descripción detallada de la invención

Al describir la invención, se usarán los siguientes términos y abreviaturas.

Abreviaturas usadas para describir la invención

La abreviatura "sbp" se refiere a un "compañero de unión específico". Todos los materiales biológicos tienen alguna afinidad entre sí, sin embargo, los compañeros de unión específicos son los que se unen entre sí de una forma específica para realizar una función biológica. Por ejemplo, la sFlt-1 se une a P1GF con una afinidad biológicamente significativa y, al hacerlo, es capaz de modular la actividad biológica de P1GF. Por consiguiente, sFlt-1 y P1GF son compañeros de unión específicos. De forma similar, el homólogo a sFlt-1 unido a membrana, es decir, Flt-1, es también un sbp de P1GF. Además, el VEGF también es un sbp con Flt-1. Otro tipo de sbp que es útil en el contexto de la invención es un anticuerpo y la molécula que comprende el epítipo al que se une. Aunque este tipo de sbp es esencial para la función de algunas de las realizaciones de la presente invención, la mayoría de las realizaciones de la invención se refieren a determinar la presencia o la cantidad de un compañero de unión específico por detección en condiciones de ensayo de la unión al otro sbp, en la que ni el primero ni el segundo sbp son un anticuerpo o porción de un anticuerpo.

El término "proteico" se usa en la presente memoria para describir polipéptidos, fragmentos proteicos y proteínas que son lo bastante grandes para formar al menos una hélice, lámina u otra estructura secundaria significativa (polipeptídico). El término proteico incluye tanto polipéptidos modificados como no modificados, tales como polipéptidos y proteínas glicosiladas, proteolíticamente escindidas, preniladas y dimerizadas. Cada compañero de unión proteico comprende preferentemente al menos un elemento de estructura secundaria, tal como una estructura helicoidal o de lámina (por ejemplo, a modo de ejemplo, una hélice α o lámina β). Por consiguiente, cada compañero de unión proteico comprende preferentemente al menos 8 restos aminoacídicos, más preferentemente al menos 50 restos aminoacídicos y, aún más preferentemente, al menos 100 restos aminoacídicos. Un compañero de unión proteico también puede comprender múltiples cadenas polipeptídicas plegadas entre sí para formar una proteína compleja.

Las expresiones "especimen biológico" o "muestra biológica" se usan indistintamente (a menos que se indique expresamente lo contrario) y se refieren a cualquier material originario de un ser humano u otro animal que contiene moléculas proteicas. El método de la invención puede realizarse provechosamente sobre cualquier muestra adecuada, incluyendo, sin limitación, aguas residuales, ropa, tapizado, condensados respiratorios y biopsias tisulares. Las "muestras biológicas" preferidas de la presente invención incluyen sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, heces, linfa y saliva. Cuando se usan muestras biológicas sustancialmente sólidas, será más comúnmente preferible extraer o solubilizar una porción de la muestra antes de realizar o continuar con el método de la invención.

El término "P1GF" se refiere a factor de crecimiento placentario y a veces se denomina PGF. En la actualidad se cree que el gen que codifica el P1GF mapea en el locus génico 14q24-q31. El P1GF incluye las tres isoformas actualmente conocidas en la técnica y cualquier otra que no esté bien caracterizada en la actualidad en la medida en que se unan con el sbp P1GF usado en cualquier realización particular de la invención.

El término "marcador" o "marcador detectable" significa cualquier molécula adecuada que permita la medición cuantitativa o relativa directa o indirecta de la molécula a la que esté unido. Los marcadores adecuados útiles en el contexto de la invención incluyen sólidos, enzimas, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, coenzimas, precursores enzimáticos, apoenzimas, sustancias fluorescentes, pigmentos, compuestos quimioluminiscentes, sustancias luminiscentes, sustancias colorantes, sustancias magnéticas, partículas de metal tales como coloides de

oro, sustancias radiactivas y similares. Los marcadores enzimáticos útiles incluyen, sin limitación, deshidrogenasas, oxidorreductasas tales como reductasas y oxidasas; transferasas que catalizan la transferencia de grupos funcionales, tales como grupos amino, carboxilo, metilo, acilo y fosfato; hidrolasas que hidrolizan enlaces tales como enlaces tipo éster, glucosídico, éter y peptídicos; liasas; isomerasas; ligasas; y similares. También pueden usarse múltiples enzimas en una forma conjugada para la detección.

Los marcadores sólidos útiles incluyen, pero sin limitación, placas de microtitulación, partículas, micropartículas y portaobjetos de microscopio.

Cuando el marcador detectable es una enzima, la detección de la molécula marcada también puede facilitarse mediante ciclado enzimático. Por ejemplo, cuando el marcador detectable es fosfatasa alcalina, pueden realizarse mediciones observando la fluorescencia o luminiscencia generada a partir de un sustrato adecuado, tal como un derivado de umbeliferona. Los derivados de umbeliferona útiles incluyen, sin limitación, fosfato de 4-metilumbeliferilo.

Otros marcadores útiles incluyen derivados de fenol fosforilados tales como fosfato de nitrofenilo, derivados de luciferina, derivados de dioxetano.

Los marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes preferidos útiles en el contexto de la invención incluyen isotiocianato de fluoresceína; derivados de rodamina tales como isotiocianato de rodamina B e isotiocianato de tetrametil rodamina; cloruro de dancilo (cloruro de 5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo), fluoruro de dancilo, fluorescamina (4-fenilspiro[furan-2(3H),1'-(3'H)-isobenzofuran]-3,3'-diona); ficobiliproteínas tales como ficocianina y ficoeritrina; sales de acridinio; compuestos de luminol tales como lumiferina, luciferasa y aecuatorina; imidazoles; ésteres del ácido oxálico; compuestos quelados de elementos de tierras raras tales como europio (Eu), terbio (Tb) y samario (Sm); y derivados de cumarina tales como 7-amino-4-metilcumarina.

Por consiguiente, se apreciará que están disponibles una amplia diversidad de marcadores detectables útiles en el contexto de la presente invención. También se apreciará que puede usarse cualquier medio de detección adecuado para cuantificar la cantidad de una molécula unida a un marcador detectable, tal como, pero sin limitación, el uso de electrodos, medición espectrométrica del color, la luz o la absorbancia e inspección visual.

Realizaciones específicas de la invención

La presente descripción proporciona un método de determinación de la concentración o cantidad de una pareja de unión específica proteica presente en un espécimen biológico. La pareja de unión comprende dos restos proteicos (es decir, un primer resto proteico y un segundo resto proteico) que preferentemente se unen directamente entre sí y ningún compañero de unión proteico es un anticuerpo (o fragmento de un anticuerpo). Cualquier compañero de unión proteico adecuado, incluyendo polipéptidos y proteínas, puede usarse en el método de la invención. Pueden usarse anticuerpos y porciones de anticuerpos en el método de la invención, pero preferentemente se usan menos de dos anticuerpos o porciones de los mismos.

Como alternativa, cuando se usan más de dos anticuerpos, uno de los dos compañeros de unión específicos proteicos del método se marca con el marcador detectable que se observa en el método. Por ejemplo, cuando se usa la absorbancia a una longitud de onda particular, el cromóforo se une al primer o segundo sbp de otro modo distinto a mediante el uso de un anticuerpo o porción del mismo. De forma similar, si se usa un contador de centelleo o Geiger para detectar un marcador radiactivo (por ejemplo, ^{125}I), el sbp está indirectamente, o más preferentemente directamente, unido directamente al segundo sbp. Cuando el primer o segundo sbp está marcado indirectamente a través de un medio distinto de un primer o segundo anticuerpo, o porción de un anticuerpo, entonces el resto directamente marcado es preferentemente uno que tiene una afinidad bioespecífica por el primer o segundo sbp (es decir, un tercer sbp) o es uno que tiene una afinidad rigurosa por un componente del primer o segundo sbp. Un ejemplo de un sistema marcador indirecto que tiene una afinidad rigurosa incluye biotina y avidina. En este ejemplo no limitante, el segundo sbp puede marcarse con biotina y un resto de tipo avidina (por ejemplo, avidina, estreptavidina, extravidina) puede marcarse directamente (con, por ejemplo, un éster de acridinio u otro derivado de acridinio quimioluminiscente).

En una primera realización del método de la invención, el primer compañero de unión específico proteico está marcado con un marcador detectable, que de este modo forma un resto marcado. El resto marcado se pone en contacto con el espécimen biológico y se determina el grado de unión entre el resto marcado y el componente del espécimen biológico que es el segundo compañero de unión. El grado de unión indica la concentración o la cantidad del primer compañero de unión o del segundo compañero de unión presente en el espécimen. La determinación del grado de unión puede ser un valor relativo, pero es preferentemente cuantitativo. Este grado de unión puede determinarse por cualquier medio adecuado, tal como provocando que la pareja unida se aglutine, se una a un soporte sólido o migre a una velocidad diferencial a través de un medio líquido. Preferentemente, el grado de unión se determina provocando que la pareja unida se adhiera a un soporte sólido, separando el resto marcado no unido del resto marcado unido y determinando la fracción unida o no unida (o ambas) del resto marcado.

La pareja de unión usada en la invención preferentemente no es una pareja de proteínas que interaccionan en el sistema inmune de mamífero tales como el receptor de células T y el complejo mayor de histocompatibilidad, CD40 y CD40L, o un anticuerpo y su diana.

5 El método puede realizarse opcionalmente con un cartucho, tira de ensayo o en un envase unitario adaptado para usarse mediante un inmunoanálisis semiautomático o totalmente automático. Los ensayos de diagnóstico
 10 automáticos en el contexto de la invención se realizan preferentemente en un sistema que administre muestras y reactivos a un recipiente de reacción, que realice incubaciones y, opcionalmente, lavados del resto marcado no unido del resto marcado unido, sin intervención del usuario, una vez que la muestra y los reactivos se insertan en el sistema. Dicho sistema puede distinguirse opcionalmente de sistemas manuales o semiautomáticos por la capacidad del sistema para realizar al menos ocho ensayos, preferentemente al menos 16 ensayos, más preferentemente al menos 64 ensayos y, más preferentemente, al menos 128 ensayos en un periodo de 48 horas sin la intervención del usuario después de insertar la muestra y los reactivos en el sistema. El sistema también es preferentemente capaz de calcular la concentración o la cantidad de la proteína diana de la pareja de unión automáticamente, es decir, sin
 15 la necesidad de cálculos o aportaciones humanas una vez que las muestras están cargadas en el sistema.

El método también puede realizarse en un formato de cartucho o en un ensayo de tira de ensayo. En un ensayo de este tipo, los reactivos de ensayo se proporcionan preferentemente como una dosis unitaria que puede cargarse en un instrumento desechable y la dosis unitaria contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo del
 20 método. Dicho instrumento de dosis unitaria puede comprender, por ejemplo, un alojamiento de plástico que comprende una estructura de tipo membrana desechable de nylon, nitrocelulosa u otro material adecuado. La muestra puede preprocesarse o cargarse directamente sobre una zona de carga. Después, la muestra puede opcionalmente fluir a través de la estructura de tipo membrana a través de una pluralidad de zonas contenidas en la membrana. La estructura de tipo membrana contiene opcionalmente además un detergente o fluidificante lateral, y
 25 también contiene opcionalmente un absorbente para recoger el exceso de líquido y/o favorecer el flujo lateral a través de la membrana. Además, el método de la invención puede realizarse con sistemas multienvase en los que cada envase comprende reactivos suficientes para realizar 2, 4, 8, 10 o 12 ensayos, o preferentemente un ensayo.

El método también puede realizarse en un dispositivo microfluído diseñado para analizar muestras en el intervalo de microlitros (por ejemplo, menos de 50 μL , preferentemente menos de 12 μl y, opcionalmente, menos de 4 μl de líquido). Dichos dispositivos microfluidos pueden contener opcionalmente fluidificantes, dispositivos de propulsión (incluyendo, pero sin limitación, geles, ceras y gases de expansión), nanoválvulas y similares para facilitar el transporte del fluido biológico o de los reactivos de ensayo, o de ambos, a través del dispositivo microfluído.

35 El método puede configurarse opcionalmente como un ensayo tipo sándwich. Los ensayos tipo sándwich comprenden la unión del resto marcado con el otro compañero de unión específico de la pareja de unión y otro reactivo de marcaje específico. Se incluyen dentro del alcance de la invención múltiples ensayos tipo sándwich. Principalmente con fines ilustrativos y por la facilidad de comprensión, pero sin limitación, se ilustran los siguientes ensayos tipo sándwich mediante el uso de P1GF como el primer compañero de unión y sFit-1 como el segundo
 40 compañero de unión. Sin embargo, cualquier pareja de compañeros de unión específicos proteicos adecuada puede sustituir al P1GF y/o a la sFit-1 en las ilustraciones siguientes.

En un primer ensayo tipo sándwich dentro del alcance de la invención, un anticuerpo contra P1GF (α -P1GF) se une a una placa de microtitulación, uniéndose previamente o posteriormente dicho anticuerpo a P1GF o un fragmento de unión a sFit-1 del mismo. En el contexto de la invención, el P1GF está por lo tanto marcado con un sustrato sólido y es un resto marcado. La placa de microtitulación puede lavarse opcionalmente para asegurar que no haya sustancialmente P1GF libre en la placa de microtitulación. Una muestra se pone en contacto con la placa, sabiéndose que dicha muestra contiene, o es sospechosa de contener, sFit-1. Por lo tanto, el uso de la unión de P1GF:sFit-1 se usa en el ensayo. Después del lavado, la cantidad de sFit-1 en la muestra puede detectarse por
 45 contacto de la placa con un anticuerpo marcado. El anticuerpo puede estar marcado con cualquier marcador detectable adecuado.

En un segundo ensayo tipo sándwich dentro del alcance de la invención, la placa de microtitulación del primer ensayo tipo sándwich se sustituye por una micropartícula. Las micropartículas preferidas incluyen, pero sin limitación, micropartículas magnéticas, particularmente las que tienen un promedio de entre 0,2 y 7,0 micrómetros de tamaño, micropartículas hapténadas, micropartículas impregnadas mediante uno o preferentemente al menos dos colorantes fluorescentes (particularmente los que pueden identificarse después del aislamiento individual en una celda de flujo y de la excitación mediante un láser), ferrofluidos (es decir, partículas magnéticas de menos de aproximadamente 0.1 μm de tamaño) y otras micropartículas que puedan retirarse por recolección o que puedan retirarse por filtración.
 55 60

En un tercer y cuarto ensayo tipo sándwich dentro del alcance de la invención, el P1GF se conjuga directamente con la placa de microtitulación o con la micropartícula, respectivamente.

65 En un quinto y un sexto ensayos tipo sándwich, el P1GF está biotinilado o marcado con un hapteno adecuado, tal como, por ejemplo, adamantina, isotiocianato de fluoresceína o carbazol. Esto permite la formación de agregados

cuando se pone en contacto con un anticuerpo multivalente o resto que contiene (estrept)avidina o, como alternativa, permite una unión fácil del P1GF a un sustrato sólido tal como una placa de microtitulación, portaobjetos de microscopio o micropartícula. En realizaciones que emplean agregación, puede usarse cualquier medio de separación o detección adecuado, tal como precipitación o filtración de los agregados o cromatografía líquida de los agregados.

De forma similar, el método de la invención comprende ensayos de inhibición competitiva. Un ensayo de inhibición competitiva puede configurarse con un solo compañero de unión específico o también como un ensayo tipo sándwich. Los ensayos de inhibición competitiva útiles incluyen aquellos en los que un segundo compañero de unión específico marcado (o fragmento del mismo) ("2º sbp marcado") se sintetiza o aísla a partir de una fuente distinta de la muestra biológica a ensayar y se marca con un marcador directo o indirecto. La cantidad del 2º sbp en la muestra biológica ensayada se determina después midiendo el grado en el que se impide la unión del 2º sbp marcado al primer sbp. A modo de ilustración, y no como limitación, y usando la convención ilustrativa usada anteriormente, la sFlt-1, o un fragmento de unión a P1GF de la misma, puede marcarse con cualquier marcador detectable adecuado, incluyendo, sin limitación, los analizados anteriormente. Cuando el P1GF inmovilizado se pone en contacto con una muestra biológica, la sFlt-1 en la muestra biológica competirá con la sFlt-1 marcada por la unión al P1GF. La reducción en la unión de marcador al P1GF inmovilizado indica entonces la cantidad de sFlt-1 en la muestra biológica que se sabe que contiene, o es sospechosa de contener, s-Flt-1.

El experto en la materia apreciará, por lo tanto, que la descripción proporciona muchas realizaciones en las que la interacción de unión de un primer polipéptido o proteína con un segundo polipéptido o proteína se usa para medir la cantidad o la concentración del segundo polipéptido o proteína. Los compañeros de unión específicos usados para ilustrar realizaciones de la invención anterior son P1GF y sFlt-1. Las realizaciones preferidas adicionales incluyen otros factores de crecimiento angiogénico y sus receptores, tales como, sin limitación, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VPF y similares. De forma similar, las variantes biológicamente significativas de los factores de crecimiento, tales como, sin limitación, VEGF-A₂₀₆, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₄₅ y VEGF-A₁₂₁ son compañeros de unión específicos preferidos de la invención. De forma similar, los receptores para estas moléculas, tales como KDR, o Flk-1 (tirosina quinasa tipo fms 1) (también VEGFR o VEGFR2) son primeros o segundos compañeros de unión preferidos de la presente invención.

Se apreciará fácilmente que el primer compañero de unión específico o el segundo compañero de unión específico puede ser una quimera o fusión que comprenda restos aminoacídicos de otros polipéptidos. De forma similar, los compañeros de unión específicos pueden ser de longitud completa o estar truncados. Son truncamientos particularmente preferidos útiles en el contexto de la invención los que escinden una región transmembrana de un dominio extracelular soluble de la proteína, aunque el método también puede realizarse usando compañeros de unión que pueden unirse o que están unidos a membrana. Cuando un compañero de unión específico está unido a membrana, la membrana puede ser opcionalmente parte de una estructura celular, sintética o retirada de un contexto celular (por ejemplo, en una vesícula, liposoma o emulsión). Este dominio extracelular puede ser de por sí de "longitud completa", estar truncado en el extremo N-terminal o C-terminal, o en ambos, y puede estar fusionado a polipéptidos exógenos.

La invención también proporciona un método de determinación de la concentración de sFlt-1 que no tiene un compañero de unión específico unido al sitio de unión a P1GF de sFlt-1. El método incluye poner en contacto una muestra que se sabe que contiene o que es sospechosa de contener sFlt-1, que no tiene un compañero de unión específico unido al sitio de unión a P1GF de sFlt-1, con un primer compañero de unión específico (sbp) de sFlt-1 capaz de formar un complejo de sbp:sFlt-1, y con un segundo sbp, en el que el segundo sbp está específicamente marcado con un marcador detectable o una estructura sólida. El primer o segundo sbp es P1GF o un fragmento de unión a sFlt-1 de P1GF. El primer sbp, el segundo sbp y la sFlt-1, si están presentes, forman entonces un complejo ternario que se detecta como un indicio de la cantidad de sFlt-1 en la muestra.

En una realización preferida, la sFlt-1 total en la muestra biológica se captura con un anticuerpo de unión a Flt-1 y la porción de sFlt-1 en la muestra que no está unida a P1GF o a un compañero de unión similar que se une al sitio de unión a P1GF de sFlt-1 se detecta con un fragmento marcado de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los miembros adecuados de la superfamilia del EGF incluyen, pero sin limitación, cualquier porción adecuada de P1GF o VEGF. En realizaciones aún más preferidas, ese miembro de la superfamilia del EGF está marcado con un luminóforo o una enzima capaz de producir un producto detectable, tal como, sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fluoresceína o acridinilo.

Otra realización preferida comprende fijar el P1GF en una superficie sólida, tal como, sin limitación, una micropartícula. Este reactivo capturará solamente la sFlt-1 libre. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la sFlt-1 en la muestra biológica ensayada no se une al P1GF unido a sólido porque el sitio de unión entre P1GF y sFlt-1 ya está unido en la sFlt-1 no libre. Después, el complejo puede detectarse de cualquier forma adecuada. Los reactivos de detección directa e indirecta adecuados incluyen un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o aptámero contra la sFlt-1.

Cualquiera de los reactivos en las realizaciones anteriores puede biotinilarse fácilmente por métodos de la técnica

anterior. Por consiguiente, el P1GF puede biotinilarse, lo que facilitará su fijación a una fase sólida u otra molécula detectable, y el reactivo de detección puede biotinilarse de modo que sea detectable con un compañero de unión específico para biotina. Los compañeros de unión específicos preferidos para biotina en el contexto de la invención incluyen anticuerpos y aptámeros contra biotina, avidina y estreptavidina.

La estructura de sFlt-1 es bien conocida en la técnica (véase, Wiesmann et al., Cell, 91, 695-704 (1997); Davis-Smyth et al., EMBO J, 15, 4919-4927 (1996); Barleon et al., J Biol Chem, 272,10382-10388 (1997); Cunningham et al., Biochem Biophys Res Commun, 231, 596-599 (1997); Fuh et al. (citado dentro de Wiesmann et al.)). Un compañero de unión específico de sFlt-1 preferido es cualquier fragmento de unión a sFlt-1 adecuado contra P1GF. Son fragmentos de unión a sFlt-1 preferidos de polipéptidos que comprenden al menos aproximadamente el 90% del segundo y tercer dominios de sFlt-1. También se prefieren polipéptidos truncados de P1GF, tales como del 21^{er} aminoácido de P1GF al dominio 3 de P1GF. Cualquiera o ambos del P1GF y el fragmento de unión a sFlt-1 de P1GF pueden marcarse como se describe en otra parte en la presente memoria.

Para facilitar la detección de la interacción de la captura de P1GF o del reactivo de detección y la sFlt-1 que estaba libre en la muestra biológica ensayada, puede añadirse un reactivo adicional que esté marcado por unión a una superficie sólida o un marcador detectable. Los anticuerpos marcados están entre los reactivos adicionales preferidos.

La invención también proporciona un inmunoensayo basado en la inhibición competitiva de un resto sFlt-1 marcado por la cantidad de sFlt-1 en la muestra biológica ensayada que no tiene P1GF unido a la sFlt-1 ("sFlt-1 libre"). El método comprende poner en contacto una muestra que contiene sFlt-1 libre con un primer sbp, en el que el primer sbp contiene un fragmento de unión a sFlt-1 de P1GF y un segundo sbp, en el que el segundo sbp contiene un fragmento de sFlt-1 que es capaz de unirse al fragmento de unión a sFlt-1 de P1GF, en el que al menos el primer sbp o el segundo sbp está marcado. La concentración de sFlt-1 presente en la muestra se determina después por medición de la disminución en la unión entre el primer sbp y el segundo sbp causada por la muestra.

La invención también proporciona un método de determinación de la relación de sFlt-1 libre respecto a la sFlt-1 total en una muestra. El método comprende (i) determinar la cantidad de sFlt-1 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, (ii) determinar la cantidad total de sFlt-1 en la muestra y comparar el resultado de la parte (i) respecto a la parte (ii). Puede usarse cualquier método adecuado para determinar la cantidad total de sFlt-1 en la muestra. Los métodos adecuados para llevar a cabo esta etapa incluyen, pero sin limitación, inmunoensayos de tipo sándwich y ensayos de inhibición competitiva. Si al menos un anticuerpo usado en un inmunoensayo para determinar la sFlt-1 total presente en el ensayo se une al sitio de unión de P1GF u otro factor presente o posiblemente presente en la muestra biológica (por ejemplo, un anticuerpo antiidiotípico específico por el sitio activo del primer o segundo sbp), entonces una porción de la muestra puede opcionalmente desnaturizarse para alterar la unión de la sFlt-1 a otras proteínas en la muestra biológica. En este caso, puede usarse cualquier técnica adecuada para desnaturizar la sFlt-1, de modo que se liberan proteínas que bloquearían la unión del anticuerpo al sitio activo de sFlt-1. Las técnicas adecuadas incluyen la adición de ácido, base, sal, detergentes o tensioactivos, bases orgánicas o una combinación de los anteriores, y se incluyen en la especialidad en la técnica. Para facilitar la unión de un anticuerpo a otro sbp usado como reactivo de diagnóstico, el agente desnaturizante usado para alterar la unión de sFlt-1 al sbp en la muestra preferentemente se neutraliza o elimina fácilmente de la muestra. Preferentemente, sin embargo, el uno o más anticuerpos usados en un inmunoensayo para determinar la sFlt-1 total no se unen al sitio de unión a P1GF de sFlt-1. El experto en la materia apreciará que están fácilmente disponibles otros métodos más de medición de la sFlt-1 total en la muestra y se incluyen en el alcance de la presente invención. Por consiguiente, la invención permite la determinación tanto directa como indirecta de cada uno de (i) sFlt-1 libre, (ii) sFlt-1 unida y (iii) sFlt-1 total. Cualquiera de estos valores de sFlt-1 puede compararse opcionalmente además con la concentración de un miembro de la superfamilia del EGF, incluyendo, sin limitación VEGF y, preferentemente, P1GF.

En una realización particularmente preferida, un inmunorreactivo anti-sFlt se une a una micropartícula magnética y el espécimen biológico se pone en contacto con la micropartícula unida a anti-sFlt-1, de modo que la sFlt-1 en la muestra se une a la micropartícula magnética. Después, el complejo puede opcionalmente lavarse en una solución o tampón adecuado una o más veces para eliminar las moléculas no unidas que pudieran interferir con el ensayo. Después, el P1GF marcado se pone en contacto con el complejo que contiene la micropartícula y el P1GF marcado no unido se retira o se elimina por lavado de la micropartícula magnética. La cantidad de P1GF marcado unido a la micropartícula magnética sirve después como indicio de la cantidad de sFlt-1 libre en el espécimen biológico porque la sFlt-1 unida por un sbp (uniéndose dicho sbp al sitio de unión a P1GF de sFlt-1) no puede unirse eficazmente al P1GF marcado.

En otra realización de la invención reivindicada, se mide la sFlt-1 total y la porción de la sFlt-1 unida a P1GF. Puede usarse cualquier método adecuado para determinar la cantidad de sFlt-1 total y unida a P1GF ("sFlt-1 unida") presente en la muestra. Un método adecuado para determinar la cantidad de sFlt-1 unida en la muestra es detectar la formación de un complejo que tiene al menos tres componente incluyendo un anticuerpo anti-P1GF, la sFlt-1 unida (que de por sí comprende al menos sFlt-1 y P1GF) y un anticuerpo anti-sFlt-1. Es decir, emplear un ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos en el que un anticuerpo es específico para P1GF y al menos un anticuerpo es

específico para sFlt-1. De acuerdo con otras realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos se marcan cada uno preferentemente con marcadores detectables. En una realización aún más preferida de esta realización, un anticuerpo se marca por unión a un sustrato sólido y al menos un anticuerpo se marca por conjugación con otro marcador mencionado en la presente memoria.

5 En otra realización, la detección de sFlt-1 libre se realiza con un anticuerpo que se une a un epítipo que no está accesible (es decir, oculto) cuando el PIGF está unido a la sFlt-1. A este respecto, el ensayo de la invención es cualquier inmunoensayo de tipo sándwich tradicional, de inhibición competitiva u otro inmunoensayo convencional (para sFlt-1), excepto por que sólo mide la sFlt-1 libre. Esto permite la comparación de la cantidad de sFlt-1 libre con la cantidad de PIGF total o, más preferentemente, con la cantidad de PIGF libre. En aspectos adicionales de esta realización, un anticuerpo contra el sitio de unión a sFlt-1 de PIGF puede sustituir a la porción de la sFlt-1 usada en otras realizaciones de esta invención.

15 Las mediciones de PIGF y sFlt-1, incluyendo, sin limitación, las mediciones de los estados unido y libre de estas moléculas, pueden usarse con cualquier fin adecuado. Por ejemplo, la medición de estos marcadores puede usarse para predecir el curso de la angina después de un acontecimiento cardiovascular mayor, tal como un infarto de miocardio no letal. De forma similar, la capacidad para medir estos marcadores puede usarse para comprender mejor el modo de acción de las medicinas del corazón. Además, la medición exacta de estos marcadores permite investigaciones más detalladas de los mecanismos de reestenosis y neovascularización. La medición de P1GF y sFlt-1 podría encontrar la mayor significación en la demostración de un menor riesgo de preeclampsia en mujeres gestantes.

20 La preeclampsia afecta a aproximadamente el 5% de todas las mujeres gestantes y, en algunos grupos étnicos, afecta a tantas como a aproximadamente el 10% de todas las mujeres gestantes. Los efectos de la preeclampsia pueden ser graves y a veces incluyen la muerte. Por consiguiente, existe la necesidad de separar mejor las gestaciones normales de las gestaciones en mayor riesgo de preeclampsia.

25 Los presentes inventores han descubierto que la relación de sFlt-1 libre respecto a PIGF libre es un mejor predictor del riesgo de preeclampsia que la relación de sFlt-1 total respecto a PIGF libre. Debido a que la cantidad de sFlt-1 libre está matemáticamente relacionada con la cantidad de sFlt-1 total y de sFlt-1 unida, estos valores pueden usarse como un sustituto para la cantidad de sFlt-1 libre y pueden compararse con la cantidad de P1GF en una muestra biológica dentro del alcance de la presente invención.

30 Muchas proteínas de interés para el diagnóstico médico están presentes en bajas concentraciones, por ejemplo, a de menos de 1 pg/ml a 0,1 mg/ml. Algunas de estas proteínas se unirán a un receptor de proteína con afinidades similares a las observadas para las interacciones de antígeno-anticuerpo. De una forma análoga a la actividad enzimática, es posible medir la cantidad de una proteína libre o la cantidad que está unida a su receptor nativo.

35 La preeclampsia es una enfermedad de la gestación tardía que se diagnostica actualmente basándose en síntomas clínicos de hipertensión arterial y proteína en la orina. La bibliografía reciente ha propuesto que el acontecimiento precipitante de la enfermedad es una disminución en los niveles circulantes de las proteínas angiogénicas Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Placentario (PIGF). Se sugiere entonces que la ausencia de vascularización para las interacciones de antígeno-anticuerpo. De una forma análoga a la actividad enzimática, es posible medir la cantidad de una proteína libre o la cantidad que está unida a su receptor nativo.

40 La preeclampsia es una enfermedad de la gestación tardía que se diagnostica actualmente basándose en síntomas clínicos de hipertensión arterial y proteína en la orina. La bibliografía reciente ha propuesto que el acontecimiento precipitante de la enfermedad es una disminución en los niveles circulantes de las proteínas angiogénicas Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Placentario (PIGF). Se sugiere entonces que la ausencia de vascularización para las interacciones de antígeno-anticuerpo. De una forma análoga a la actividad enzimática, es posible medir la cantidad de una proteína libre o la cantidad que está unida a su receptor nativo.

45 La preeclampsia es una enfermedad de la gestación tardía que se diagnostica actualmente basándose en síntomas clínicos de hipertensión arterial y proteína en la orina. La bibliografía reciente ha propuesto que el acontecimiento precipitante de la enfermedad es una disminución en los niveles circulantes de las proteínas angiogénicas Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Placentario (PIGF). Se sugiere entonces que la ausencia de vascularización para las interacciones de antígeno-anticuerpo. De una forma análoga a la actividad enzimática, es posible medir la cantidad de una proteína libre o la cantidad que está unida a su receptor nativo.

50 La preeclampsia es una enfermedad de la gestación tardía que se diagnostica actualmente basándose en síntomas clínicos de hipertensión arterial y proteína en la orina. La bibliografía reciente ha propuesto que el acontecimiento precipitante de la enfermedad es una disminución en los niveles circulantes de las proteínas angiogénicas Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Placentario (PIGF). Se sugiere entonces que la ausencia de vascularización para las interacciones de antígeno-anticuerpo. De una forma análoga a la actividad enzimática, es posible medir la cantidad de una proteína libre o la cantidad que está unida a su receptor nativo.

55 En la realización preferida, se usa un anticuerpo para unirse a toda la sFlt-1 circulante (unida o no unida a P1GF). Después, se deja que un conjugado de un resto generador de señal y el PIGF interaccionen con la sFlt-1 unida a la fase sólida. En este ejemplo, sólo la sFlt-1 libre de PIGF se uniría al P1GF conjugado. El P1GF no unido se elimina después por lavado y se toman las etapas necesarias para poner de manifiesto la concentración de conjugado con PIGF.

60 El formato anterior también podría construirse usando VEGF, de la misma forma que el P1GF, como conjugado. Además, sería posible usar también el heterodímero de VEGF y P1GF.

Otra forma del ensayo sería usar P1GF unido a una fase sólida y después capturar cualquier PIGF libre que puede detectarse después con un anticuerpo conjugado que se una a sFlt-1. El mismo formato puede usar VEGF en la fase sólida.

65 Otra forma del ensayo sería medir el P1GF o VEGF libre uniendo la sFlt-1 a una fase sólida y capturando después cualquier factor de crecimiento libre que no esté unido a un receptor soluble. La detección puede realizarse de nuevo

con un anticuerpo conjugado que se una al factor de crecimiento. Esta forma del ensayo sería específica para la forma biológicamente activa de los factores de crecimiento. En este formato no se detectaría ningún factor de crecimiento degradado, mejorando la especificidad del ensayo hacia el acontecimiento biológico que causa la preeclampsia.

Quando la cuestión biológica relevante es la cantidad de P1GF unido a receptor, también es posible usar una fase sólida que capturaría la sFlt-1 como en el primer ejemplo, y después usar un anticuerpo conjugado contra P1GF o VEGF para medir la cantidad de factor de crecimiento unido. La utilidad de la estrategia dependería de la correlación con éxito de la patología con la especie medida.

Otra forma del ensayo es usar receptor inmovilizado en un formato competitivo, en el que el ligando libre en la muestra compite con el ligando marcado. Por ejemplo, usarse sFlt-1 en una fase sólida para capturar el P1GF en la muestra en un formato competitivo con el P1GF marcado. Esta forma del ensayo eliminaría la necesidad de un anticuerpo en el ensayo.

La inversa del ejemplo anterior sería inmovilizar con P1GF o VEGF y añadir muestra y sFlt-1 conjugada. En este formato, la sFlt-1 libre competiría por sitios en la fase sólida.

Las fuentes de la proteína usada en el ensayo podrían proceder de muestras de pacientes, sin embargo, el uso de proteínas recombinantes expresadas en cultivo celular o en bacterias sería una estrategia más práctica.

La estrategia descrita en la presente memoria podría usarse para interrogar a las muestras con respecto a la actividad del receptor o del ligando asociado, siempre que la afinidad entre el ligando y el receptor sea suficientemente elevada para permitir el uso de etapas de lavado sin dicha pérdida del material unido en una medida tal que no pudiera detectarse en la generación de señal del protocolo de ensayo.

Los ensayos que dependen de la actividad de unión biológica intrínseca de las proteínas diana pueden proporcionar una información superior para evaluar la situación clínica de un paciente. Cuando una enfermedad o afección médica implica un receptor de proteína, puede esperarse que los ensayos que miden la cantidad relativa de esa actividad biológica conduzcan a una imagen clínica más precisa en comparación con conocer solamente la masa de la proteína.

De acuerdo con los métodos anteriores, la presente invención también proporciona un inmunoensayo que comprende dos compañeros de unión específicos proteicos, en el que al menos un sbp está marcado de forma detectable.

Además, de acuerdo con lo anterior, la descripción proporciona una composición de materia para determinar la relación de sFlt-1 libre respecto a P1GF libre, así como composiciones de materia para determinar la (i) sFlt-1 total y sFlt-1 unida o (ii) el P1GF total y el P1GF unido, o tanto (i) como (ii).

Ejemplos

La invención se ilustra con datos obtenidos de diversos inmunoensayos para P1GF total, P1GF libre, sFlt-1 total y sFlt-1 libre. En los dibujos adjuntos se presenta una selección de estos datos que se considera que son los más ilustrativos de la invención y de conceptos de la invención, y se analizan brevemente en la Breve descripción de los dibujos. Como se desprende de la totalidad de esta descripción de la invención, los ejemplos pretenden ilustrar la invención reivindicada más que limitar su alcance.

Ejemplos adicionales

Los ejemplos adicionales siguientes proporcionan más detalles respecto a dos realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el método de la invención en un ensayo usado para detectar la sFlt-1 libre en una muestra biológica usando una porción de P1GF como sbp para sFlt-1.

Un anticuerpo monoclonal contra sFlt-1 se recubrió sobre micropartículas magnéticas de carboxilo-látex (4,7 micrómetros) a una concentración de proteína de 0,1 mg/ml de micropartículas a una concentración del 1% en peso en MES sódico (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) 50 mM a pH 6,0. Después de 10 minutos, se añadió EDAC, (etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y se dejó que reaccionara durante una hora antes de lavar las partículas con solución salina tamponada con fosfato. Después, las partículas se diluyeron al 0,1% en un tampón para su uso en un analizador inmunoquímico automático.

Se preparó P1GF acridinilado por disolución de P1GF en solución salina tamponada con fosfato e incubación con un

éster de acridinio a una relación de masa de PIGF respecto a acridinio de 15000/1. Después, el conjugado se purificó mediante cromatografía de HPLC y se diluyó a una concentración de aproximadamente 75 ng/ml.

5 Después se realizó la siguiente serie de etapas. Se añade una alícuota de 0,05 ml de muestra a un recipiente de reacción al que se añaden 0,05 ml de las micropartículas marcadas al 0,1%. La mezcla de reacción se incuba durante 18 minutos a 37 grados centígrados. Un imán sujeta a las partículas mientras se elimina la solución de reacción. Después de lavarse las partículas, se añade una alícuota de 0,05 ml de solución de conjugado. Después de una incubación durante 4 minutos, las partículas se sujetan de nuevo a un imán y la solución de conjugado se elimina del sedimento de micropartículas, seguido de lavado de las partículas una vez más. Se provoca que el marcador de acridinio restante emita luz después de la adición de hidróxido sódico y peróxido de hidrógeno. Los fotones liberados se miden y se relaciona linealmente con el procesamiento de calibradores de una forma idéntica.

15 Se recogieron datos sobre muestras de ensayo y se compararon con los resultados obtenidos con inmunoensayos convencionales. Los datos sugerían que el método de la invención discriminaba mejor muestras no preeclámpicas de muestras preeclámpicas, particularmente cuando se observa la relación de las concentraciones de sFlt-1 libre respecto a PLGF libre.

Ejemplo 2

20 Este ejemplo ilustra el método de la invención en un ensayo usado para detectar PIGF libre en una muestra biológica usando una porción de sFlt-1 como sbp para P1GF.

25 Micropartículas paramagnéticas de látex (4,7 micrómetros), derivatizadas con grupos funcionales carboxilo, se recubrieron con anticuerpo anti-sFlt-1 (que contenía los dominios 1-3 de la tirosina quinasa tipo fms 1) a una concentración de proteína que se ha demostrado que es suficiente para maximizar la cantidad de proteína absorbida en el área superficial de las micropartículas (2% de sólidos en peso) en MES 50 mM, pH 5,5. En otra realización, la sFlt-1 podía unirse directamente a un sustrato sólido. Después de 10 minutos, la sFlt-1 no absorbida se eliminó por lavado de las partículas múltiples veces con tampón MES. Después de lavar las partículas, se añadió EDAC y se dejó que reaccionara formando un acoplamiento covalente de las moléculas de sFlt-1 con las partículas. Después, las partículas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato para detener la reacción y eliminar la EDAC que no hubiera reaccionado. Las partículas se diluyen después al 0,1 % en tampón para su uso en un analizador inmunoquímico automático.

35 Se preparó anticuerpo anti-P1GF marcado con acridinio por incubación de un anticuerpo policlonal (como alternativa podía usarse un anticuerpo monoclonal) con un éster de acridinio a una relación molar de acridinio respecto a anticuerpo que variaba de 1 a 100. Después, se separó el acridinio no conjugado del conjugado de anticuerpo marcado con acridinio por cromatografía de exclusión por tamaño. El conjugado purificado se diluyó después en tampón a una concentración que producía la máxima relación de señal respecto a interferencia en el ensayo.

40 Después se realizó la siguiente serie de etapas. Se añadió una alícuota de 0,1 ml de muestra a un recipiente de reacción al que se añadieron 0,05 ml de las micropartículas marcadas al 0,1%. La mezcla de reacción se incubó durante 18 minutos a 37 grados centígrados. Utilizando la propiedad paramagnética de las partículas, un imán atrae y sujeta a las partículas contra el lateral del recipiente de reacción mientras se elimina la solución de reacción. Después de lavarse las partículas, se dispensa tampón; se añade una alícuota de 0,05 ml de solución de conjugado; se retira el imán y la mezcla se agita vorticialmente. Después de una incubación de 4 minutos, se eliminó el exceso de conjugado por atracción de las partículas hacia un imán, lavado y resuspensión. Las partículas, que contienen ahora el sándwich de sFlt-1/PIGF/anticuerpo anti-PIGF (marcado con acridinio), se expusieron después a reactivos provocando que el acridinio emitiera luz. La quimioluminiscencia, medida mediante el instrumento, es directamente proporcional a la cantidad de P1GF (libre) en la muestra.

50 Se recogieron datos sobre muestras de ensayo y se compararon con los resultados obtenidos con inmunoensayos convencionales. Los datos sugerían que el método de la invención distinguía mejor el estado preeclámpico del estado no preeclámpico por medición de la actividad biológica del agente biológico profiláctico o causal en lugar de usar anticuerpos contra el agente que no distinguirían necesariamente entre las formas activa e inactiva de la proteína.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir un menor riesgo de preeclampsia, que comprende: medir la cantidad de sFlt-1 libre en una muestra biológica obtenida de una mujer gestante, medir la cantidad de P1GF libre en la muestra biológica, y comparar la relación observada con un valor o intervalo de valores predeterminado.
- 10 2. Un método para predecir un menor riesgo de preeclampsia, que comprende: medir las cantidades de sFlt-1 total y sFlt-1 unida en una muestra biológica obtenida de una mujer gestante, medir la cantidad de P1GF libre en la muestra biológica, y comparar la relación observada con un valor o intervalo de valores predeterminado.
- 15 3. Un método de diagnóstico de la preeclampsia que comprende:
 (a) determinar la cantidad de sFlt-1 libre en una muestra,
 (b) determinar la cantidad de P1GF libre en una muestra, y
 (c) dividir el valor de la etapa (a) por el valor de la etapa (b),
 en el que cuando el resultado de la etapa (c) supera un valor predeterminado, entonces es diagnóstico de preeclampsia.
- 20 4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la cantidad de P1GF libre se determina mediante las etapas de:
 (a) proporcionar un resto marcado, en el que el resto marcado es un fragmento de PIGF o fragmento de sFlt-1,
 (b) poner en contacto el resto marcado con el espécimen biológico,
 (c) cuando el resto marcado comprende P1GF, determinar el grado de unión entre el resto marcado y la sFlt-1,
 o
 (c') cuando el resto marcado comprende sFlt-1, determinar el grado de unión entre el resto marcado y el P1GF y
 (d) determinar la concentración o cantidad de PIGF libre presente en la muestra.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que el método es un ensayo de diagnóstico automático, en el que el ensayo automático se realiza en un sistema que administra muestras y reactivos a un recipiente de reacción, realiza incubaciones (opcionalmente lavados) sin intervención del usuario una vez que la muestra y los reactivos se insertan en el sistema.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el que el sistema puede realizar al menos ocho ensayos en un periodo de 48 horas, sin intervención del usuario después de insertar la muestra y los reactivos en el sistema.
- 35 7. El método de la reivindicación 5 ó 6, en el que el sistema calcula la concentración o cantidad de la proteína de la pareja de unión, y en el que el usuario no se considera parte del sistema.
- 40 8. El método de la reivindicación 3, en el que el método es un ensayo tipo sándwich.
9. El método de la reivindicación 3, en el que el método es un ensayo de inhibición competitiva.
- 45 10. El método de la reivindicación 1 ó 2 en el que la cantidad de P1GF libre en la muestra biológica, en el que el P1GF libre no tiene un compañero de unión específico unido al sitio de unión a Flt-I de PIGF, se determina mediante las etapas de:
 (a) proporcionar una muestra que contiene o es sospechosa de contener PIGF libre,
 (b) poner la muestra en contacto con un primer compañero de unión específico (sbp) de P1GF capaz de formar un complejo de sbp:PIGF,
 (c) poner la muestra en contacto con un segundo sbp, en el que el segundo sbp está marcado específicamente, en el que el primer sbp o segundo sbp es Flt-I o sFlt-1 o un fragmento de unión a PIGF de sFlt-1, en el que el primer sbp, el segundo sbp y el P1GF libre son capaces de formar un complejo ternario,
 (d) determinar la cantidad de complejo ternario formado como medida de la cantidad de PIGF libre en la muestra.
- 50 55 11. El método de la reivindicación 2, en el que la cantidad de sFlt-1 total se determina mediante las etapas de:
 (a) marcar un compañero de unión con un marcador detectable para formar un resto marcado,
 (b) poner en contacto el resto marcado con el espécimen biológico, y
 (c) determinar el grado de unión entre el resto marcado y un componente del espécimen biológico como indicio de la cantidad de sFlt-1 presente en el espécimen.
- 60 12. El método de la reivindicación 11,
 en el que el método se realiza en un formato de cartucho o como una tira de ensayo, o
 en el que los reactivos de ensayo se proporcionan como un instrumento desechable de dosis unitaria,
- 65

y en el que la dosis unitaria contiene todos los reactivos necesarios para la realización del ensayo del método.

- 5 13. El método de la reivindicación 11 ó 12, en el que el método es un ensayo de diagnóstico automático, en el que el ensayo se realiza en un sistema que administra muestras y reactivos a un recipiente de reacción, realiza incubaciones (y opcionalmente lavados) sin intervención del usuario una vez que la muestra y los reactivos se insertan en el sistema.
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en el que el sistema puede realizar al menos ocho ensayos en un periodo de 48 horas, sin intervención del usuario después de insertar la muestra y los reactivos en el sistema.
- 15 15. El método de la reivindicación 13 ó 14, en el que el sistema calcula la concentración o la cantidad de sFlt-1.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que el método es un ensayo tipo sándwich.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que el método es un ensayo de inhibición competitiva.
- 20 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que el método emplea menos de dos anticuerpos o porciones de anticuerpos.
- 25 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-18, en el que el P1GF está unido a células.
20. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de sFlt-1 libre en la muestra biológica se determina mediante las etapas de:
- 30 (a) proporcionar una muestra que contiene o es sospechosa de contener sFlt-1 libre,
 (b) poner la muestra en contacto con un primer compañero de unión específico (sbp) de sFlt-1 capaz de formar un complejo de sbp:sFlt-1,
 (c) poner la muestra en contacto con un segundo sbp, en el que el segundo sbp está marcado de forma detectable, en el que el primer sbp o segundo sbp es P1GF, VEGF o un fragmento de unión a sFlt-1 de P1GF o VEGF,
 en el que el primer sbp, el segundo sbp y la sFlt-1 son capaces de formar un complejo ternario,
 (d) determinar la cantidad de complejo ternario formado como medida de la cantidad de sFlt-1 en la muestra.
- 35 21. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de sFlt-1 libre en la muestra biológica se determina mediante las etapas de:
- 40 (a) proporcionar una muestra que contiene o es sospechosa de contener sFlt-1 libre,
 (b) poner la muestra en contacto con un anticuerpo unido a fase sólida que se une específicamente a sFlt-1, por lo que toda la sFlt-1 en la muestra biológica se captura en el sólido,
 (c) poner la muestra en contacto con una porción marcada de forma detectable de un miembro de la familia de P1GF/VEGF, y
 (d) determinar la cantidad de complejo ternario formado como medida de la cantidad de sFlt-1 en la muestra.
- 45 22. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de sFlt-1 libre en la muestra biológica se determina mediante las etapas de:
- 50 (a) proporcionar una muestra que contiene o es sospechosa de contener sFlt-1 libre,
 (b) poner la muestra en contacto con una porción de P1GF o VEGF inmovilizado sobre una superficie sólida,
 (c) poner la muestra en contacto con un anticuerpo marcado de forma detectable que se une específicamente a sFlt-1, en el que la sFlt-1, el anticuerpo marcado de forma detectable y P1GF o VEGF son capaces de formar un complejo ternario, y
 (d) determinar la cantidad de complejo ternario formado como medida de la cantidad de sFlt-1 en la muestra.
- 55 23. El método de la reivindicación 22, en el que la porción de P1GF o VEGF es una porción de P1GF, y la porción de unión a sFlt-1 de P1GF carece de los primeros 21 aminoácidos del P1GF.
- 60 24. El método de la reivindicación 23, en el que la porción de P1GF comprende además todo el dominio 1 aparte de aproximadamente los primeros 20 restos aminoácidos del dominio 1.
- 65 25. El método de la reivindicación 20, en el que el P1GF o el fragmento de unión a sFlt-1 de P1GF está marcado de forma detectable mediante un marcador distinto de una superficie sólida.
26. El método de la reivindicación 25, en el que el marcador es un derivado de acridinio.
27. El método de la reivindicación 20, en el que el primer sbp o segundo sbp es un anticuerpo contra sFlt-1.

28. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de sFlt-1 libre en la muestra biológica se determina mediante las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una muestra que contiene o es sospechosa de contener sFlt-1 libre que no tiene PIGF unido a la sFlt-1,
(b) poner la muestra en contacto con
un primer sbp que comprende una porción de unión a sFlt-1 de PIGF o VEGF, y
10 un segundo sbp que comprende una porción de sFlt-1 que es capaz de unirse al fragmento de unión a sFlt-1 de PIGF o VEGF,
en el que al menos el primer sbp o el segundo sbp está marcado,
(c) determinar la concentración de sFlt-1 presente en la muestra por determinación de la disminución de la unión, o de la inhibición de la unión, entre el primer sbp y el segundo sbp causada por la muestra respecto al
15 nivel de unión entre el primer sbp y el segundo sbp cuando se ponen en contacto con una muestra que carece de sFlt-1 libre.

29. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de sFlt-1 libre en la muestra biológica se determina mediante las etapas de:

- 20 (a) proporcionar una muestra que contiene o es sospechosa de contener sFlt-1 libre,
(b) proporcionar un primer compañero de unión específico (sbp) de sFlt-1 capaz de formar un primer complejo de sbp:sFlt-1, en el que el primer sbp está unido a una micropartícula magnética,
(c) poner la muestra en contacto con la micropartícula unida al primer sbp,
(d) opcionalmente lavar la micropartícula magnética para separar las porciones no unidas de la muestra de la
25 micropartícula,
(e) poner la muestra en contacto con un segundo sbp,
en el que el segundo sbp es PIGF marcado de forma detectable,
en el que el primer sbp, el segundo sbp y la sFlt-1 son capaces de formar un complejo ternario,
(f) eliminar por lavado el PIGF marcado no unido de la micropartícula magnética, y
30 (g) determinar la cantidad de complejo ternario formado por detección de la cantidad de PIGF marcado unido a la micropartícula magnética como un indicio de la cantidad de sFlt-1 libre en el espécimen biológico.

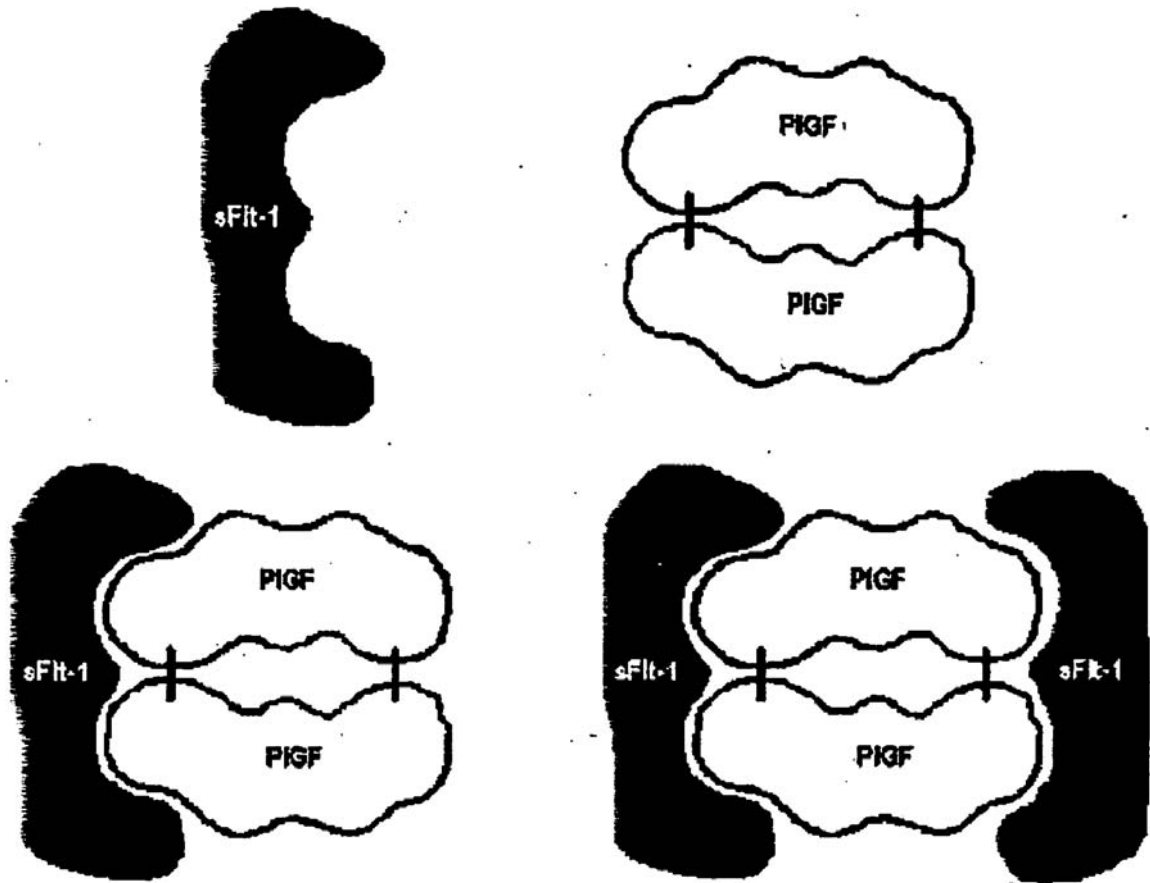


FIG. 1

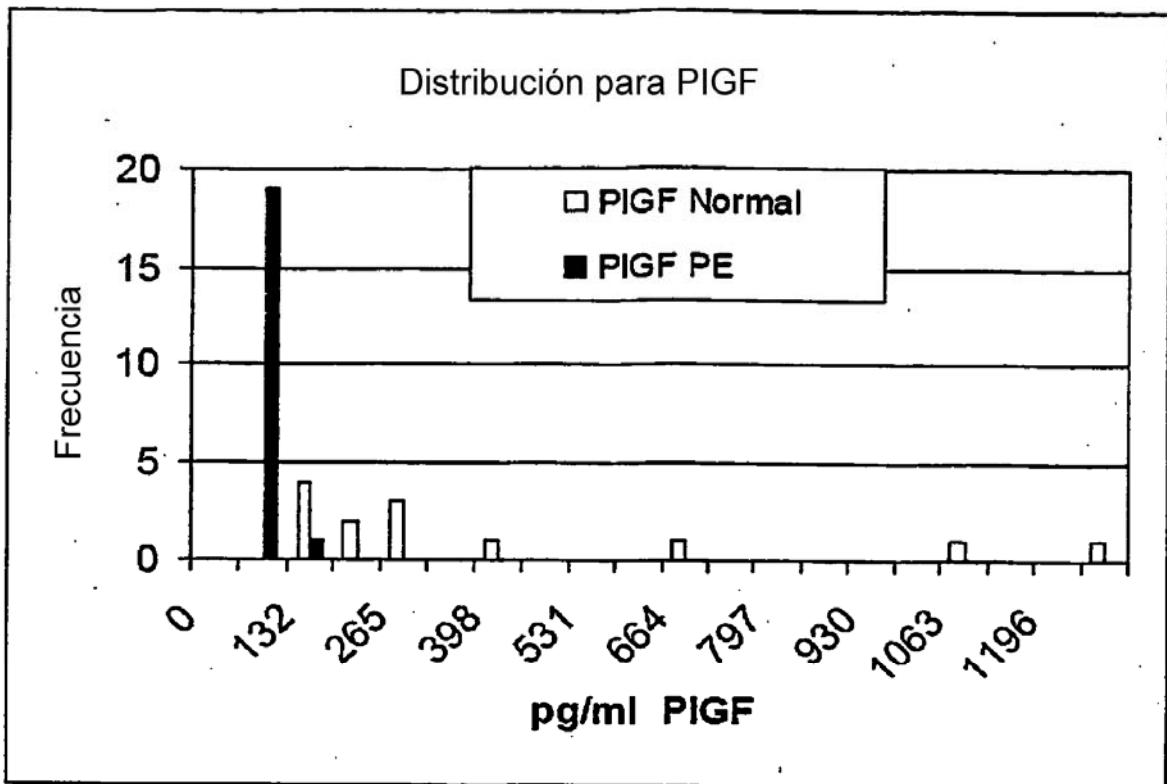


FIG. 2

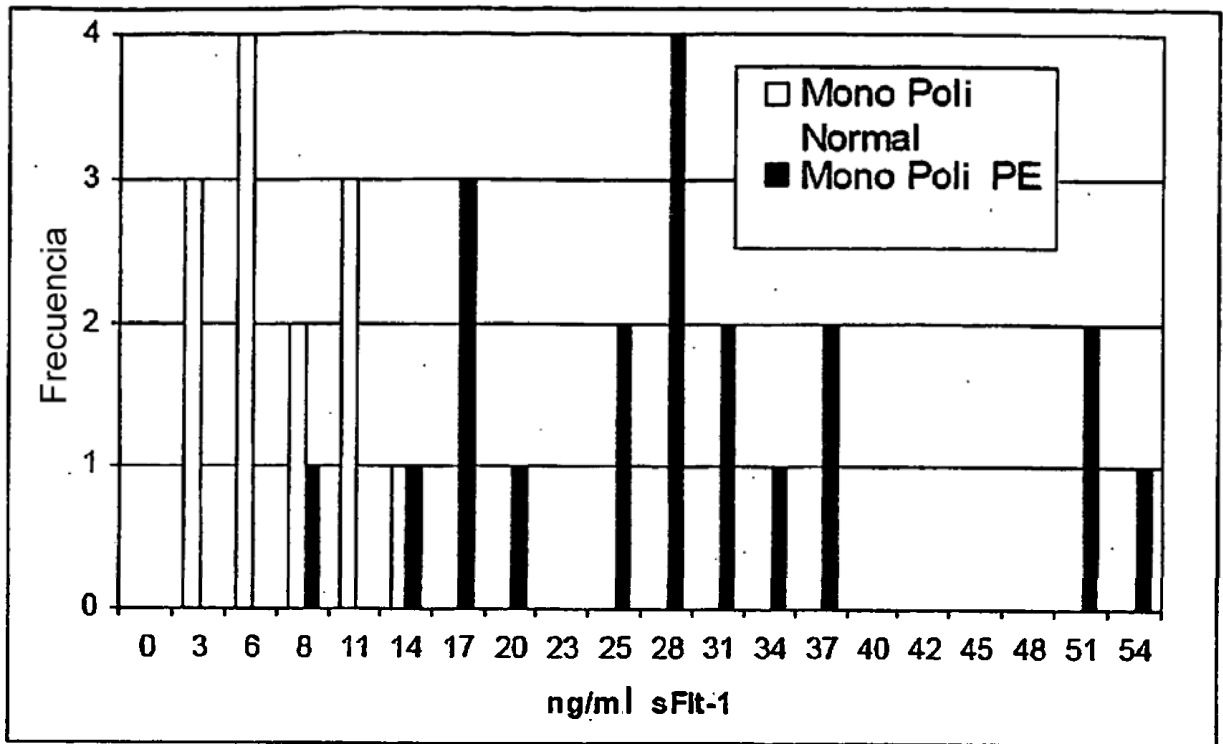


FIG. 3

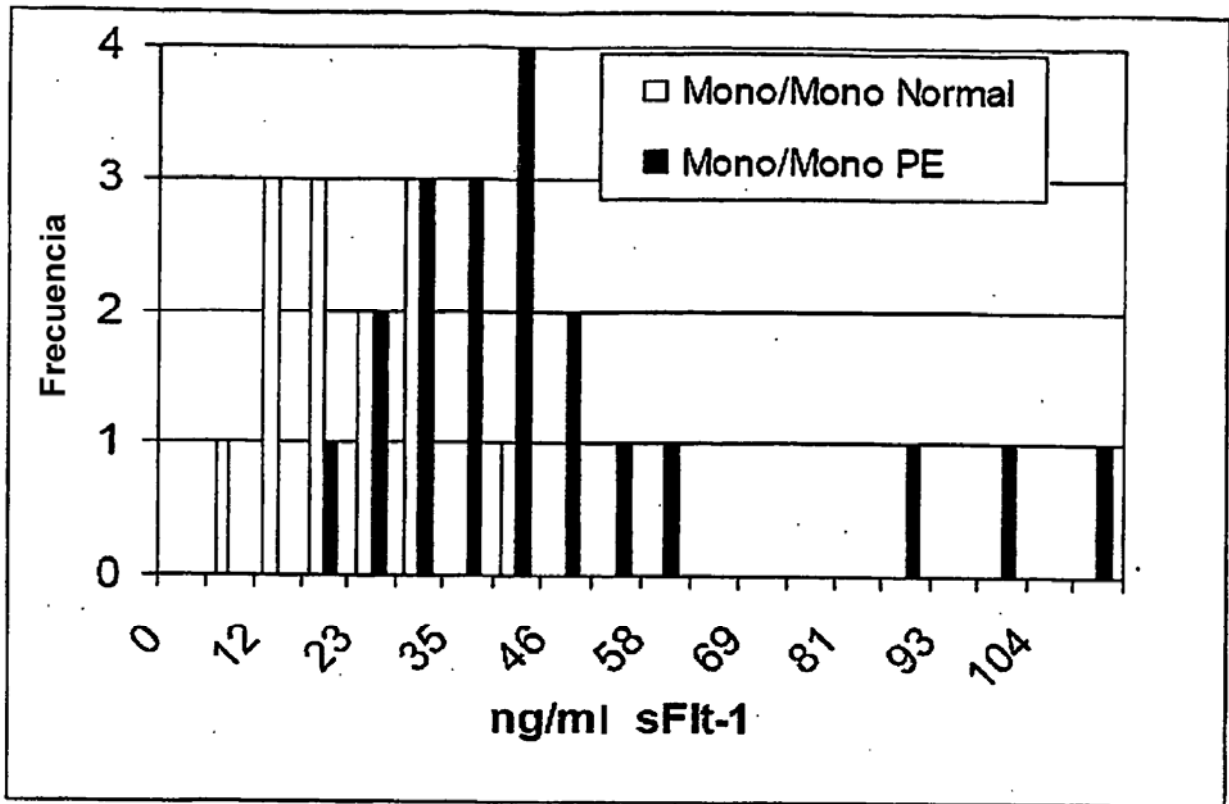


FIG. 4

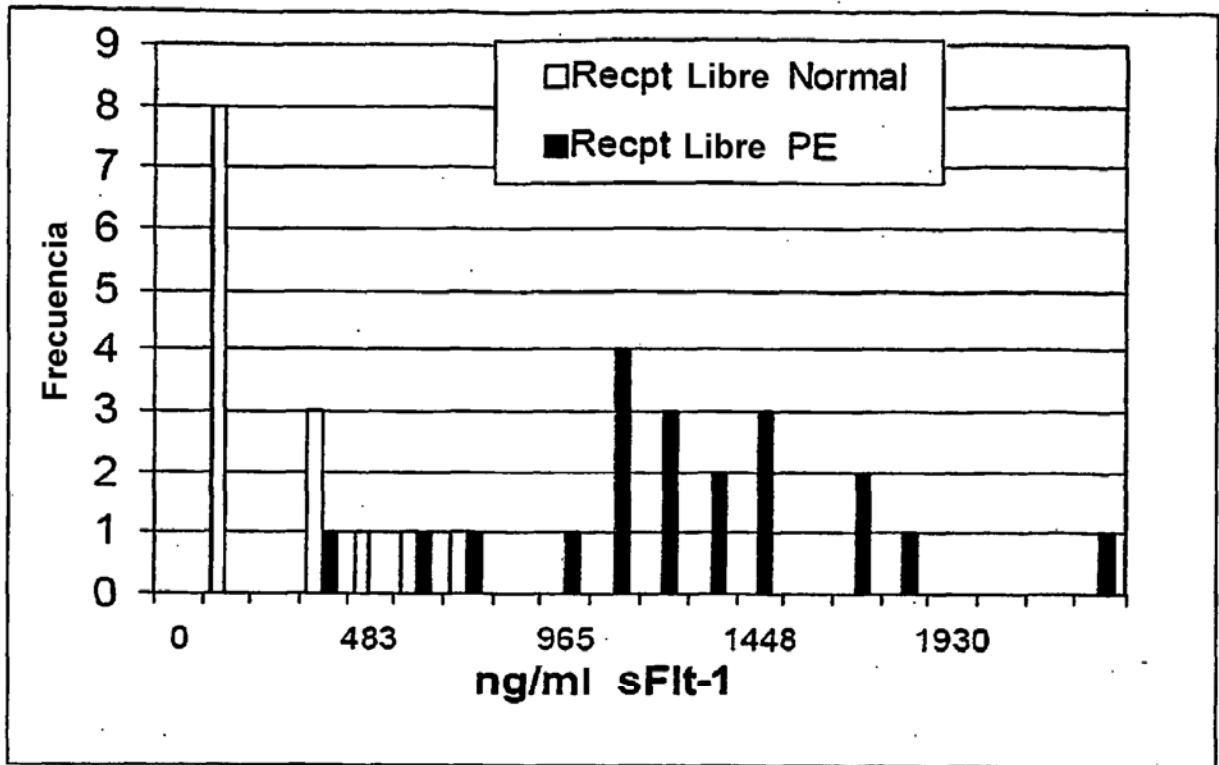


FIG. 5

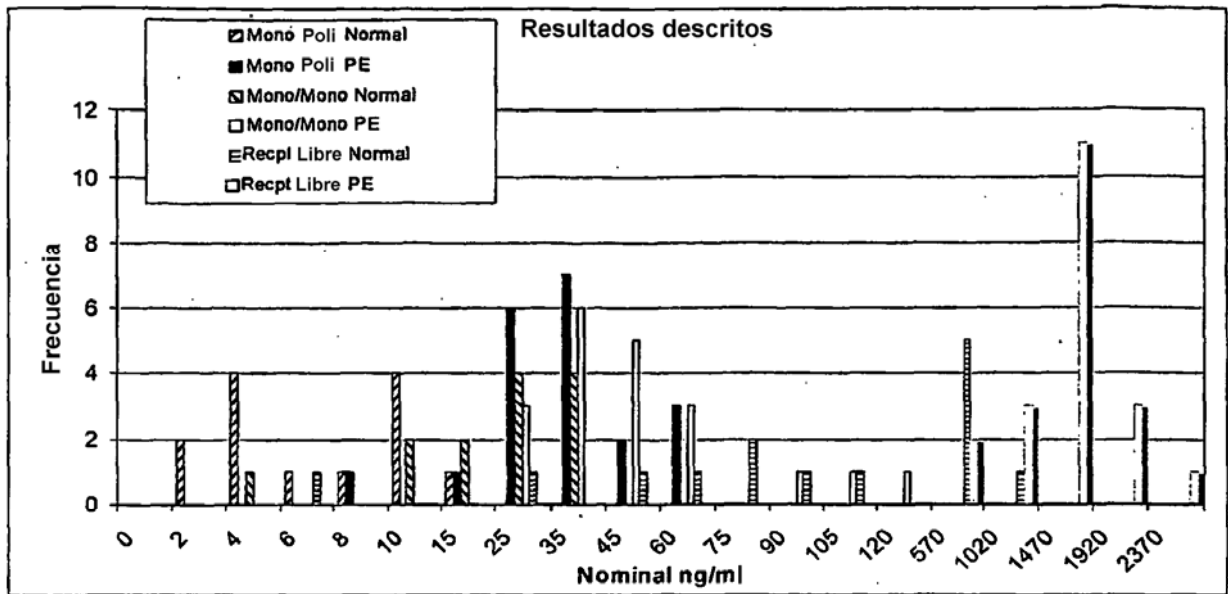


FIG. 6

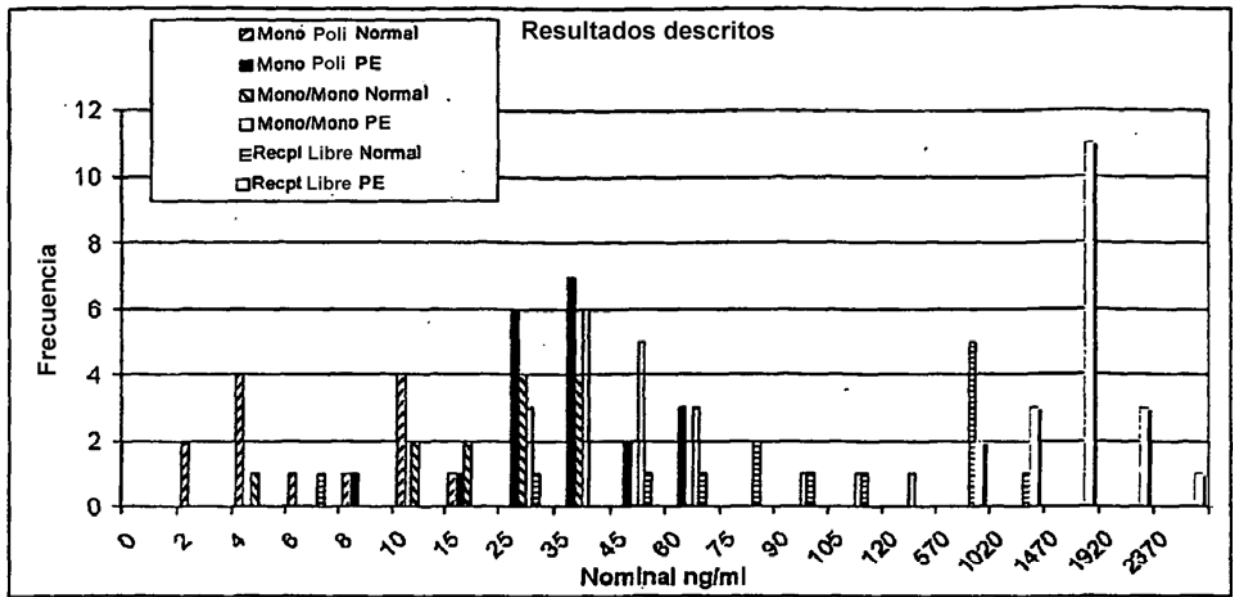


FIG. 7

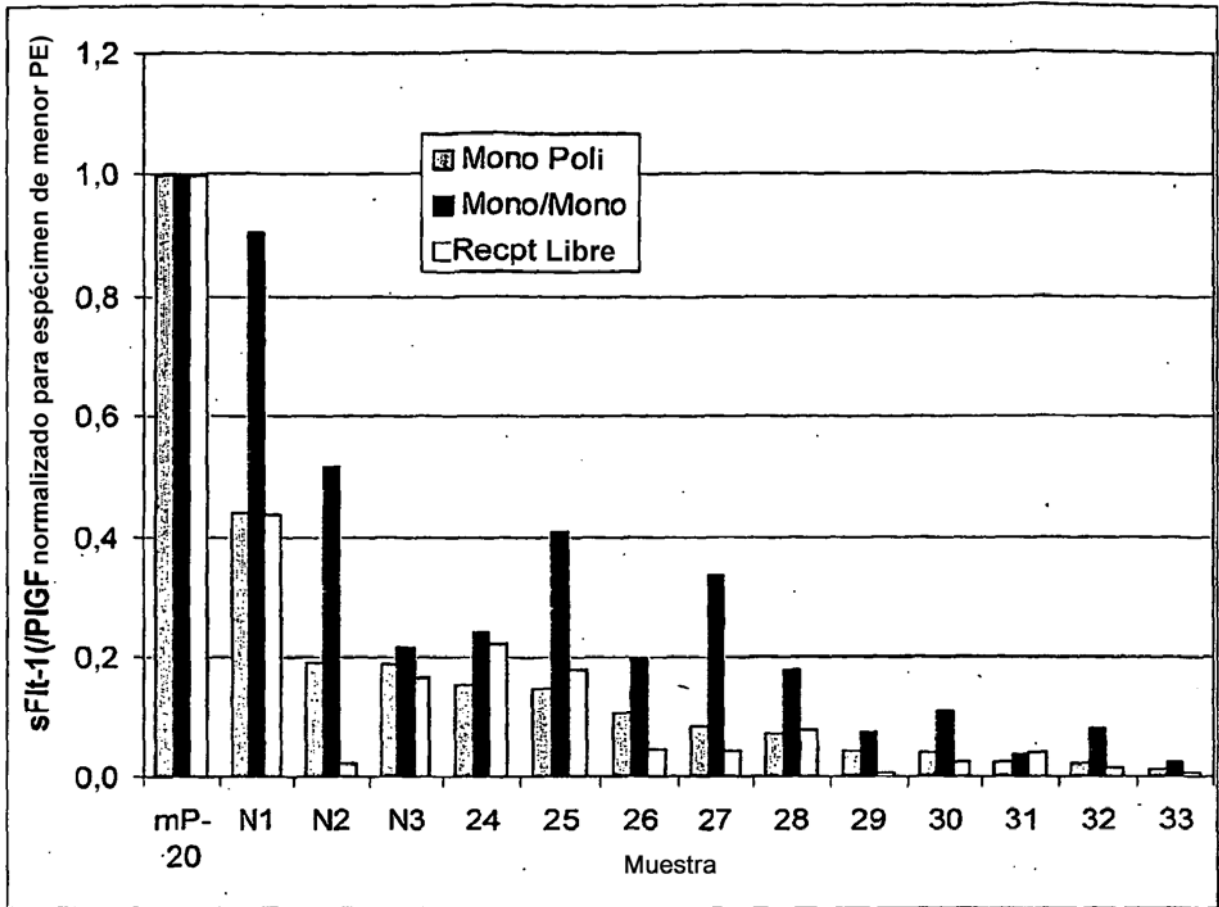


FIG. 8

Mono/Poli	Mono/Mono	Recpt Libre
Promedio normales (usar muestra de PE más grave)		
0,0010	0,0036	0,0005
Promedio PE (usar muestra de PE más grave)		
0,0975	0,1962	0,1228
Promedio normales (usar muestra de PE reducido)		
0,0476	0,1000	0,0220
Promedio PE (usar muestra de PE menos grave)		
4,7	5,4	5,4
Promedio normales (usar muestra más normal)		
0,108	0,110	0,050
Promedio normales (usar muestra normal más próxima a PE)		
3,8	4,0	3,5

FIG. 9