

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 295**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2005** **E 09014672 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013** **EP 2172220**

54 Título: **Método para diagnosticar y tratar preeclampsia o eclampsia**

30 Prioridad:

04.02.2004 US 771518
21.12.2004 US 19559

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2013

73 Titular/es:

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER
(100.0%)
330 BROOKLINE AVENUE
BOSTON, MA 02215, US

72 Inventor/es:

KARUMANCHI, ANANTH S.;
MAYNARD, SHARON y
SUKHATME, VIKAS P.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 404 295 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 para diagnosticar y tratar preeclampsia o eclampsia

Campo de la invención

En general, esta invención se refiere a la detección y el tratamiento de sujetos que tienen preeclampsia o eclampsia.

5 **Antecedentes de la invención**

La preeclampsia es un síndrome de hipertensión, edema y proteinuria que afecta al 5-10% de los embarazos y tiene como resultado una morbilidad y mortalidad fetal y materna sustancial. La preeclampsia es la responsable de al menos 200 000 muertes maternas en todo el mundo al año. Los síntomas de la preeclampsia típicamente aparecen después de la vigésima semana de embarazo y normalmente se detectan por un control rutinario de la presión sanguínea y la orina de la madre. Sin embargo, estos métodos de control son poco eficaces para diagnosticar el síndrome en una fase precoz, lo cual podría reducir el riesgo del sujeto o del feto en desarrollo, si estuviera disponible un tratamiento eficaz.

Actualmente no se conoce ninguna cura para la preeclampsia. La preeclampsia puede variar en gravedad de leve a potencialmente mortal. Una forma leve de preeclampsia puede tratarse con reposo en cama y un control frecuente. Para los casos de moderados a graves, se recomienda hospitalización y se receta una medicación para tratar la presión sanguínea o medicaciones anticonvulsivas para prevenir ataques. Si la afección se transforma en potencialmente mortal para la madre o el bebé, se interrumpe el embarazo y el bebé nace prematuro.

El desarrollo apropiado del feto y la placenta está mediado por varios factores de crecimiento. Uno de estos factores de crecimiento es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es un mitógeno específico de las células endoteliales, un inductor angiogénico y un mediador de la permeabilidad vascular. También se ha demostrado que el VEGF es importante para la reparación de capilares glomerulares. El VEGF se une como un homodímero a uno de dos receptores tirosina quinasa homólogos transmembrana, el receptor tirosina quinasa de tipo fms (Flt-1) y el receptor de dominio quinasa (KDR), que se expresan diferencialmente en células endoteliales obtenidas a partir de muchos tejidos diferentes. El Flt-1 pero no el KDR, presenta una alta expresión en células del trofoblasto que contribuyen a la formación de la placenta. El factor de crecimiento placentario (PIGF) es un miembro de la familia del VEGF que también está implicado en el desarrollo de la placenta. El PIGF se expresa por los citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos y es capaz de inducir la proliferación, migración y activación de células endoteliales. El PIGF se une como un homodímero al receptor Flt-1, pero no al receptor KDR. Tanto el PIGF como el VEGF contribuyen a la actividad mitogénica y a la angiogénesis que son críticas para el desarrollo de la placenta.

Recientemente se identificó una forma soluble del receptor Flt-1 (sFlt-1) en un medio de cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana y posteriormente se demostró la expresión *in vivo* en tejido placentario. El sFlt-1 es una variante de ajuste del receptor Flt-1 que carece de los dominios transmembrana y citoplásmico. El sFlt-1 se une al VEGF con alta afinidad, pero no estimula la mitogénesis de las células endoteliales. Se cree que el sFlt-1 actúa como una "fosa fisiológica" para regular negativamente la vía de señalización del VEGF. Por lo tanto, la regulación de los niveles del sFlt-1 actúan modulando el VEGF y las vías de señalización del VEGF. La regulación cuidadosa de las vías de señalización del VEGF y el PIGF es crítica para mantener una proliferación, migración y angiogénesis apropiadas por medio de las células del trofoblasto en la placenta en desarrollo. Existe la necesidad de métodos para diagnosticar de forma precisa a sujetos con riesgo de padecer o que tienen preeclampsia, particularmente antes del inicio de los síntomas más graves. También se necesita un tratamiento.

40 EP 1 664 797 A1 describe la detección de la preeclampsia.

WO 2004/008946 A describe métodos para diagnosticar y tratar la preeclampsia o la eclampsia.

VUORELA P. y *colaboradores* describen "Amniotic Fluid-Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Preeclampsia", *Obstetrics and Gynecology*, vol. 95, n.º 3., marzo de 2000, páginas 353-357.

45 MAYNARD SHARON E. y *colaboradores* describen "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia". *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, vol. 111., n.º 5, marzo de 2003, páginas 649-658.

HORNIG C. y *colaboradores* describen "release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids", *LABORATORY INVESTIGATION, UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY*, vol. 80, n.º 4, abril de 2000, páginas 443-454.

50 TSATSARIS VASSILIS y *colaboradores* describen "Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: Pathophysiological consequences", *JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM*, vol 88, n.º 11, noviembre de 2003, páginas 5555-5563.

ZHOU Y. y colaboradores describen "Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 160, n.º 4, abril de 2002, páginas 1405-1423.

WO 02/37120 A describe el diagnóstico de la preeclampsia.

5 **Compendio de la Invención**

Se ha descubierto un medio para diagnosticar y tratar de forma eficaz la preeclampsia y la eclampsia.

10 Usando análisis de expresión de genes, hemos descubierto que los niveles del sFlt-1 están notablemente elevados en muestras de tejido placentario de mujeres embarazadas que padecen preeclampsia. Se sabe que el sFlt-1 antagoniza el VEGF y el PlGF actuando como una "fosa fisiológica" y, en mujeres preeclámpicas o eclámpicas, el sFlt-1 puede reducir en la placenta las cantidades necesarias de estos factores angiogénicos y mitogénicos esenciales. Un exceso de sFlt-1 también puede producir eclampsia rompiendo las células endoteliales que mantienen la barrera hematoencefálica y/o las células endoteliales que revisten el plexo coroideo del cerebro, conduciendo de esta manera a un edema cerebral y a los ataques observados en la eclampsia.

15 También hemos descubierto que los niveles del PlGF en orina pueden utilizarse como herramienta diagnóstica para detectar la preeclampsia y la eclampsia, o bien la predisposición a padecerlas. La forma libre del PlGF tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa y es lo suficientemente pequeña como para ser filtrada por el riñón y eliminada a través de la orina. El PlGF, cuando se une al sFlt-1, tiene un peso molecular notablemente mayor y, por lo tanto, no se elimina a través de la orina. Cuando los niveles del sFlt-1 aumentan, sFlt-1 puede unirse al PlGF, y de esta forma reducir los niveles de PlGF libre que se elimina por la orina. Por consiguiente, pueden utilizarse
20 análisis de orina para detectar los niveles del PlGF libre a fin de diagnosticar la preeclampsia o la eclampsia o identificar si un paciente es propenso a padecerlas.

Los valores normales de concentración de PlGF en orina oscilan aproximadamente entre 400 y 800 pg/ml en la mitad del embarazo.

Por consiguiente, la invención proporciona:

- 25 (1) Un método para diagnosticar, en una persona embarazada, preeclampsia o eclampsia, o la propensión a desarrollarlas, comprendiendo dicho método medir el nivel del receptor Flt-1 soluble (sFlt-1) y el factor de crecimiento placentario libre (PlGF) en una muestra de suero de dicha persona embarazada que también comprende calcular la relación entre dicho nivel de sFlt-1 y PlGF libre utilizando una medición, donde dicha medición es sFlt-1/PlGF, donde:
- 30 (a) dicha preeclampsia o eclampsia es preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término; o
(b) dicha persona tiene un embarazo de 21-32 semanas o está en el tercer trimestre de embarazo; o
(c) dicho método comprende además medir los niveles de PlGF libre en una muestra de orina de dicha persona embarazada.
- 35 (2) El método de (1), donde dicho valor de medición de sFlt-1/PlGF de dicha persona se compara con el valor de una referencia normal, y donde un aumento de dicho valor en dicha persona en comparación con dicho valor de dicha referencia normal arroja el diagnóstico para esa persona de sufrir preeclampsia o eclampsia, o bien preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término, o la propensión a desarrollar estas afecciones.
- 40 (3) El método de (1), donde una relación de sFlt-1/PlGF de al menos 5 arroja el diagnóstico para esa persona de sufrir preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término.
- (4) El método de (1), donde dicho método comprende medir el nivel de PlGF libre en una muestra de orina de dicha persona embarazada.
- (5) El método de (4), donde dicha medición de PlGF libre de dicha muestra de orina se realiza antes que dicha medición de sFlt-1 y PlGF libre de dicha muestra de suero.
- 45 (6) El método de cualquiera de (1)-(5), donde dicha preeclampsia es preeclampsia antes de llegar a término.
(7) El método de cualquiera de (1)-(6), donde dicha persona tiene un embarazo de 21-32 semanas.
(8) El método de cualquiera de (1)-(6), donde la persona se encuentra en el tercer trimestre de embarazo.
(9) El método de cualquiera de (1)-(5), donde dicho PlGF es una isoforma de PlGF derivada de un empalme alternativo.

(10) El método de cualquiera de (1)-(5), donde dicho sFlt-1 es el nivel de sFlt-1 libre, unido o total.

(11) El método de cualquiera de (1)-(5), donde dicho sFlt-1 es una isoforma de sFlt-1 derivada de un empalme alternativo.

5 (12) El método de cualquiera de (1)-(5), donde dicho nivel de sFlt-1 es el nivel de un subproducto polipeptídico de un polipéptido sFlt-1 que ha sido degradado o escindido enzimáticamente.

(13) El método de cualquiera de (2), (6), (9) o (10), donde dicha referencia es una muestra o nivel anterior de dicha persona.

10 (14) El método de cualquiera de (2), (6), (9) o (10), donde dicha referencia es una muestra tomada de una persona normal que está embarazada, pero que no tiene preeclampsia ni eclampsia ni es propensa a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

(15) El método de cualquiera de (1), (2), (4), (5) o (6), donde dicha medición se realiza en dos o más ocasiones y una alteración en dicho valor de medición o dichos niveles de PIGF libre en orina entre mediciones es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.

15 (16) El método de (1), donde dicha preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término ocurre antes de la semana 37 de embarazo.

En una forma de realización, la muestra de referencia es una muestra de PIGF con una concentración conocida normal, y una disminución en el PIGF libre en la muestra del sujeto en comparación con la muestra de referencia diagnóstica preeclampsia o eclampsia, o bien una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

20 En formas de realización preferidas de los métodos de la invención, los niveles de PIGF se detectan utilizando una enzima acoplada a un agente de unión a PIGF. El complejo enzima-sustrato se detecta de forma visual mediante espectrofotometría o quimioluminiscencia. En formas de realización preferidas adicionales, la enzima es una peroxidasa de rábano, β -galactosidasa o fosfatasa alcalina, y el sustrato es TMB (tetrametilbencidina), Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosida) o 1,2 dioxetano.

25 En formas de realización preferidas del método de la invención, el agente de unión a PIGF es un anticuerpo purificado contra PIGF, o un fragmento de este o un péptido. De manera ideal, el anticuerpo contra PIGF purificado, o el fragmento de este, se une específicamente al PIGF libre.

En formas de realización preferidas del método de la invención, el soporte sólido es una membrana que puede apoyarse en una estructura de varilla o en un formato de flujo lateral, ejemplos de estos se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 6 660 534.

30 En formas de realización adicionales preferidas, los métodos para detectar los niveles de PIGF en una muestra de orina de un sujeto pueden combinarse con cualesquiera métodos diagnósticos que se utilizan para medir el nivel de polipéptidos o ácidos nucleicos sFlt-1, PIGF o VEGF.

35 Cualquiera de los métodos y kits descritos en la presente puede utilizarse para diagnosticar preeclampsia o eclampsia o para predecir una preeclampsia posterior en una mujer que estuvo embarazada o en una mujer con antecedentes de preeclampsia.

40 Cualquiera de los métodos de diagnóstico descritos en la presente también puede utilizarse para controlar la preeclampsia o la eclampsia en el sujeto. En formas de realización preferidas, los métodos de diagnóstico se utilizan para controlar al sujeto durante el tratamiento o para determinar las dosis terapéuticas eficaces. En una forma de realización, una disminución en el nivel del polipéptido o ácidos nucleicos sFlt-1 medido durante la administración del tratamiento o posteriormente en relación con el valor anterior al tratamiento, indica una mejoría en la preeclampsia o eclampsia. En una forma de realización preferida, un nivel de polipéptido sFlt-1 menor de 2 ng/ml indica una mejoría en la preeclampsia o eclampsia. En otra forma de realización, un compuesto terapéutico se administra en una dosis de forma tal que el nivel de polipéptido sFlt-1 sea menor de 2 ng/ml. En otra forma de realización, un aumento en el nivel de polipéptido y ácidos nucleicos VEGF o PIGF medido durante la administración del tratamiento o posteriormente en relación con el valor anterior al tratamiento indica una mejoría en la preeclampsia o eclampsia. En otra forma de realización más, una disminución en el valor de PAAI de un sujeto indica una mejoría en la preeclampsia o eclampsia. En formas de realización preferidas, el PAAI es menor de 20, con mayor preferencia menor de 10. Una disminución en el PAAI también puede indicar una dosis eficaz de un compuesto terapéutico. En un ejemplo, un compuesto terapéutico se administra en una dosis de forma tal que el PAAI sea menor de 20. En otro ejemplo, un compuesto terapéutico se administra en una dosis tal que el PAAI sea menor de 10. En formas de realización preferidas, la medición de los niveles de sFlt-1, PIGF o VEGF se realiza dos veces o más, y una alteración en los niveles entre las mediciones se utiliza para controlar el tratamiento o para determinar las dosis terapéuticas de un compuesto.

Los métodos de diagnóstico descritos anteriormente que incluyen la medición del PIGF libre en una muestra de orina pueden utilizarse para controlar al sujeto durante el tratamiento o para determinar dosis terapéuticas eficaces. Por ejemplo, una prueba de orina para determinar los niveles de PIGF como se describe anteriormente puede utilizarse de forma periódica (por ejemplo, mensualmente, semanalmente, en días alternos, a diario o cada hora) durante la duración del tratamiento para controlar al sujeto. En una forma de realización, el compuesto terapéutico se administra en una dosis de forma tal que la concentración de PIGF sea mayor de 200 pg/ml, 300 pg/ml, 400 pg/ml, 500 pg/ml, 600 pg/ml, 700 pg/ml u 800 pg/ml. Para los ensayos de control utilizando PIGF, la muestra de referencia será una concentración de PIGF indicativa de la preeclampsia (menor de 400 pg/ml) y un aumento en la concentración de PIGF en comparación con la muestra de referencia indicará una dosis eficaz del compuesto terapéutico.

Para los fines de la presente invención, a continuación se definen las siguientes abreviaturas y términos.

Por "alteración" se entiende un cambio (aumento o reducción) en los niveles de expresión de un gen o un polipéptido según se detecta por métodos conocidos en la materia convencionales tales como los descritos anteriormente. Como se usa en este documento, una alteración incluye un cambio del 10% de los niveles de expresión, preferiblemente un cambio del 25%, más preferiblemente un cambio del 40% y aún más preferiblemente un cambio del 50% o mayor en los niveles de expresión. "Alteración" también puede indicar un cambio (aumento o reducción) en la actividad biológica de cualquiera de los polipéptidos de la invención (por ejemplo, sFlt-1, VEGF o PIGF). Los ejemplos de actividad biológica del PIGF o el VEGF incluyen la unión a receptores como se mide por inmunoensayos, ensayos de unión a ligandos o análisis de gráficos de Scatchard, e inducción de la proliferación celular o migración como se mide por marcaje con BrdU, experimentos de recuento de células o ensayos cuantitativos para la síntesis de ADN tales como la incorporación de ³H-timidina. Los ejemplos de actividad biológica para el sFlt-1 incluyen la unión al PIGF y al VEGF medida por inmunoensayos, ensayos de unión a ligando o análisis de gráficos de Scatchard. En este documento se describen otros ejemplos de ensayos para determinar la actividad biológica para cada uno de los polipéptidos. Como se usa en este documento, una alteración incluye un cambio del 10% en la actividad biológica, preferiblemente un cambio del 25%, más preferiblemente un cambio del 40% y aún más preferiblemente un cambio del 50% o mayor en la actividad biológica.

Por "oligómero de nucleobases antisentido" se entiende un oligómero de nucleobases, independientemente de la longitud, que es complementario a la hebra codificante o ARNm de un gen de sFlt-1. Por "oligómero de nucleobases" se entiende un compuesto que incluye una cadena de al menos ocho nucleobases, preferiblemente al menos doce y aún más preferible al menos dieciséis bases, unidas entre sí por grupos de enlace. En esta definición se incluyen oligonucleótidos naturales y no naturales, tanto modificados como no modificados, así como miméticos de oligonucleótidos tales como ácidos nucleicos de proteína, ácidos nucleicos bloqueados y ácidos arabinonucleicos. En los oligómeros de nucleobases de la invención pueden emplearse numerosas nucleobases y grupos de enlace, incluyendo los descritos en las solicitudes de patente de EE. UU. 20030114412 y 20030114407, incorporadas en este documento por referencia. El oligómero de nucleobases también puede dirigirse a sitios de inicio y de detención de la traducción. Preferiblemente, el oligómero de nucleobases antisentido comprende de aproximadamente 8 a 30 nucleótidos. El oligómero de nucleobases antisentido también puede contener al menos 40, 60, 85, 120 o más nucleótidos consecutivos que son complementarios al ARNm o ADN del sFlt-1, y pueden ser tan largos como el ARNm o el gen de longitud completa.

Por "índice de masa corporal" se entiende un número derivado mediante la utilización de las mediciones de la estatura y el peso que proporciona una indicación general de si el peso está comprendido dentro del rango saludable o no. La fórmula que normalmente se utiliza para determinar el índice de masa corporal es el peso de una persona en kilogramos dividido por la estatura de la persona en metros al cuadrado, o bien $\text{peso (kg)/(\text{altura (m)})}^2$.

Por "afección cardiovascular" se entiende un episodio o trastorno del sistema cardiovascular. Los ejemplos no limitantes de afecciones cardiovasculares incluyen la aterosclerosis, el infarto primario de miocardio, el infarto secundario de miocardio, la angina de pecho (incluida la angina estable e inestable), la insuficiencia cardíaca congestiva, la muerte súbita cardíaca, el infarto cerebral, la reestenosis, el síncope, la isquemia, el daño miocárdico por reperfusión, la oclusión vascular, la afección obstructiva de la carótida, el accidente isquémico transitorio y similares.

Por "compuesto" se entiende cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o fragmentos de los mismos.

Por "anticuerpo quimérico" se entiende un polipéptido que comprende al menos la porción de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo unida a al menos parte de otra proteína (típicamente un dominio constante de inmunoglobulina).

Por "ARN bicatenario (ARNbc)" se entiende una molécula de ácido ribonucleico compuesta tanto por una cadena con sentido como por una cadena antisentido. Los ARNbc típicamente se usan para mediar la interferencia con ARN.

Por "expresión" se entiende la detección de un gen o polipéptido por métodos convencionales conocidos en la materia. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido a menudo se detecta por transferencia Western, la expresión de ADN a menudo se detecta por transferencia Southern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la expresión de ARN a menudo se detecta por transferencia Northern, PCR o ensayos de protección de ARNasa.

5 Por "fragmento" se entiende una porción de una molécula de polipéptido o de ácido nucleico. Esta porción preferiblemente contiene al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la longitud entera de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

10 Por "edad gestacional" se entiende una referencia a la edad del feto desde el primer día del último período menstrual de la madre al que normalmente se hace referencia en semanas.

Por "antecedentes de preeclampsia o eclampsia" se entiende un diagnóstico previo de preeclampsia o eclampsia o hipertensión inducida por el embarazo en el mismo sujeto o alguno de sus familiares.

15 Por "homólogo" se entiende cualquier gen o secuencia de proteínas que lleva al menos una homología del 30%, más preferiblemente una homología del 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y aún más preferiblemente una homología del 90% o mayor con un gen o secuencia de proteínas conocidos en toda la longitud de la secuencia de comparación. Una proteína "homóloga" también puede tener al menos una actividad biológica de la proteína de comparación. En el caso de los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación generalmente será de al menos 16 aminoácidos, preferiblemente de al menos 20 aminoácidos, más preferiblemente de al menos 25 aminoácidos y aún más preferiblemente de 35 aminoácidos o mayor. En el caso de los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación generalmente será de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 60 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 75 nucleótidos y aún más preferiblemente de al menos 110 nucleótidos. "Homología" también puede hacer referencia a una analogía sustancial entre un epítipo usado para generar anticuerpos y la proteína o fragmento del mismo al que se dirigen los anticuerpos. En este caso, la homología se refiere a una similitud suficiente como para inducir la producción de anticuerpos que pueden reconocer específicamente la proteína en cuestión.

20 Por "anticuerpo humanizado" se entiende una variante de una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o fragmento de la misma que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado. Habitualmente el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 o CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado comprende una región flanqueante (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana (las secuencias de "importación").

30 Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácidos introducidos procedentes de una fuente que no es humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

40 Por "región determinante de la complementariedad (CDR)" se entienden las tres secuencias hipervariables en las regiones variables dentro de cada una de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina.

Por "región flanqueante (FR)" se entienden las secuencias de aminoácidos localizadas en cualquier lado de las tres secuencias hipervariables (CDR) de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina.

45 Las regiones FR y CDR del anticuerpo humanizado no necesitan corresponder de manera precisa a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR de importación o la FR de consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o eliminación de al menos un resto, de forma que el resto de CDR o FR en ese sitio no corresponda al consenso o al anticuerpo de importación. Sin embargo, tales mutaciones no serán extensivas. Normalmente, al menos un 75%, preferiblemente un 90% y aún más preferiblemente al menos un 95% de los restos de anticuerpo humanizados corresponderá a los de las secuencias de FR y CDR parentales.

50 Por "hibridar" se entiende formar pares de bases con una molécula bicatenaria entre secuencias polinucleotídicas complementarias, o porciones de las mismas, en diversas condiciones rigurosas. (Véase, por ejemplo, Wahl and Berger (1987) *Methods Enzymol.*152: 399; Kimmel, *Methods Enzymol.* 152: 507, 1987). Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa normalmente será menor de, aproximadamente, NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM y aún más preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Puede obtenerse una hibridación de baja rigurosidad en ausencia de un disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse una

hibridación de alta rigurosidad en presencia de formamida al menos al 35%, y más preferiblemente de formamida al menos aproximadamente al 50%. Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37°C y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C. Los parámetros adicionales variables, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN transportador, son bien conocidos para los especialistas en la materia. Se consiguen diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una forma de realización preferida, la hibridación se realizará a 30°C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS al 1%. En una forma de realización más preferida, la hibridación se realizará a 37°C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS al 1%, formamida al 35% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNes) a 100 µg/ml. En una forma de realización más preferida, la hibridación se realizará a 42°C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y ADNes a 200 µg/ml. Para los especialistas en la materia serán evidentes variaciones útiles de estas condiciones.

Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad de lavado pueden definirse por la concentración de sal y por la temperatura. Como se ha indicado anteriormente, la rigurosidad de lavado puede aumentarse reduciendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado preferiblemente será menor de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM, y aún más preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado normalmente incluirán una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En una forma de realización preferida, las etapas de lavado se realizarán a 25°C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS al 0,1%. En una forma de realización más preferida, las etapas de lavado se realizarán a 42°C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y SDS al 0,1%. En una forma de realización más preferida, las etapas de lavado se realizarán a 68°C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y SDS al 0,1%. Para los especialistas en la materia serán evidentes otras variaciones de estas condiciones. Las técnicas de hibridación son bien conocidas para los especialistas en la materia y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (*Science* 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, Estados Unidos 72: 3961, 1975); Ausubel y colaboradores (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Por "retraso del crecimiento intrauterino (IUGR)" se entiende un síndrome que tiene como resultado un peso en el nacimiento que es menor que el 10 por ciento del peso fetal previsto para la edad gestacional del feto. El criterio actual de la Organización Mundial de la Salud para un peso bajo en el nacimiento es un peso menor de 2500 g (5 lbs, 8 oz) o por debajo del percentil del 10 por ciento para la edad gestacional de acuerdo con las tablas de Estados Unidos de peso en el nacimiento para la edad gestacional por raza, paridad, y sexo del niño (Zhang y Bowes, *Obstet. Gynecol.* 86:200-208, 1995). Estos bebés con bajo peso en el nacimiento también se denominan "pequeños para la edad gestacional (SGA)". La preeclampsia es una afección que se sabe que está asociada con IURG o SGA.

Por "sistema de medición" se entiende una medición. Puede usarse un sistema de medición, por ejemplo, para comparar los niveles de una molécula de polipéptido o de ácido nucleico de interés. Los ejemplos de sistemas de medición adecuados incluyen, pero sin limitación, fórmulas matemáticas o algoritmos, tales como relaciones. El sistema de medición a usar es el que discrimine mejor entre los niveles del sFlt-1, VEGF o PIGF en un sujeto que tiene preeclampsia o eclampsia y un sujeto de control normal. Dependiendo del sistema de medición que se use, el indicador de diagnóstico de eclampsia o preeclampsia puede estar significativamente por encima o por debajo de un valor de referencia (por ejemplo, de un sujeto de control que no tenga preeclampsia o eclampsia).

El nivel del sFlt-1 se mide midiendo la cantidad de sFlt-1 libre, unido (es decir, unido al factor de crecimiento) o total (unido + libre). Los niveles del VEGF o PIGF se determinan midiendo la cantidad de PIGF libre o VEGF libre (es decir, no unidos al sFlt-1). Un sistema de medición ilustrativo es [sFlt-1/(VEGF + PIGF)], también denominado índice antiangiogénico de preeclampsia (PAAI).

Por "operativamente enlazado" se entiende que un gen y una o más secuencias reguladoras se conectan de tal manera que se permite la expresión del gen cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo proteínas activadoras de la transcripción) se unen a las secuencias reguladoras.

Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo que es fisiológicamente aceptable para el animal tratado mientras que mantiene las propiedades terapéuticas del compuesto con el que se administra. Un vehículo farmacéuticamente aceptable ilustrativo es solución fisiológica salina. Otros vehículos fisiológicamente aceptables y sus formulaciones son conocidos para el especialista en la materia y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (20.^a edición), A. Gennaro, editor, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos.

Por "factor de crecimiento placentario (PIGF)" se entiende un factor de crecimiento de mamífero que es homólogo a la proteína definida por el número de acceso del GenBank P49763 y que tiene actividad biológica de PIGF. El PIGF es un homodímero glicosilado que pertenece a la familia del VEGF y puede encontrarse en dos isoformas distintas por medio de mecanismos de ajuste alternativos. El PIGF se expresa por cito- y sincitiotrofoblastos de la placenta y las actividades biológicas del PIGF incluyen inducción de la proliferación, migración y activación de células endoteliales, particularmente células del trofoblasto.

Por "polimorfismo" se entiende una variación, mutación, eliminación o adición genética en una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, PIGF o VEGF que indica una predisposición a desarrollar las afecciones. Los especialistas en la técnica están familiarizados con tales polimorfismos y se describen en Parry y colaboradores (*Eur. J Immunogenet.* 26:321-3, 1999). Un polimorfismo puede estar presente en la secuencia promotora, un marco abierto de lectura, una secuencia intrónica o una región 3' no traducida de un gen sFlt-1.

Por "preeclampsia" se entiende el trastorno multisistémico que se caracteriza por hipertensión con proteinuria o edema, o ambos, disfunción glomerular, edema cerebral, edema hepático o anomalías de la coagulación debidas al embarazo o a la influencia de un embarazo reciente. La preeclampsia generalmente se produce después de la vigésima semana de gestación. La preeclampsia generalmente se define como alguna combinación de los siguientes síntomas: (1) una presión sanguínea sistólica (PS) > 140 mmHg y una PS diastólica > 90 mmHg después de 20 semanas de gestación (medidas generalmente en dos ocasiones, separadas por un periodo de 4-168 horas), (2) proteinuria de nuevo inicio (1 + por tiras reactivas en urinalisis, > 300 mg de proteína en orina recogida durante 24 horas, o una sola muestra de orina aleatoria que tiene una relación de proteína/creatinina > 0.3), y (3) resolución de hipertensión y proteinuria a las 12 semanas después del parto. La preeclampsia grave generalmente se define como (1) una PS diastólica > 110 mmHg (medida generalmente en dos ocasiones, separadas por un periodo de 4-168 horas) o (2) proteinuria caracterizada por una medida de 3.5 g o más de proteína en orina recogida durante 24 horas o dos muestras de orina aleatorias con un nivel de proteína de al menos 3 + medido por tiras reactivas. En la preeclampsia, la hipertensión y la proteinuria generalmente aparecen dentro de un intervalo de siete días. En la preeclampsia grave, la hipertensión grave, la proteinuria grave y el síndrome de HELLP (hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y bajos niveles de plaquetas) o la eclampsia pueden aparecer simultáneamente o solo un síntoma por vez. Ocasionalmente, la preeclampsia grave puede conducir al desarrollo de convulsiones. Esta forma grave del síndrome se denomina "eclampsia". La eclampsia también puede incluir disfunción o lesiones en varios órganos o tejidos tales como el hígado (por ejemplo, lesión hepatocelular, necrosis periportal) y el sistema nervioso central (por ejemplo, edema cerebral y hemorragia cerebral). Se cree que la etiología de las convulsiones es secundaria al desarrollo de edema cerebral y espasmo focal de vasos sanguíneos pequeños del riñón.

Por "índice antiangiogénesis de preeclampsia (PAAI)" se entiende la relación de sFlt-1/VEGF + PIGF usada como indicador de la actividad antiangiogénica. Un PAAI mayor de 10, más preferiblemente mayor de 20, se considera indicativo de preeclampsia o con riesgo de padecer preeclampsia.

Por "proteína" o "polipéptido" o "fragmento polipeptídico" se entiende cualquier cadena de más de dos aminoácidos, independientemente de la modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), que constituye todo o parte de un polipéptido o péptido natural, o que constituye un polipéptido o péptido no natural.

Por "se reduce o inhibe" se entiende la capacidad de producir una reducción total preferiblemente del 20% o más, más preferiblemente del 50% o más y aún más preferiblemente del 75% o más del nivel de proteína o ácido nucleico, detectado por los ensayos mencionados anteriormente (véase "expresión"). En formas de realización que se relacionan con el uso de oligómeros de nucleobases antisentido o interferencia de ARN para reducir o inhibir los niveles de proteína o ácido nucleico, el porcentaje de reducción o inhibición se determina comparando los niveles en la muestra tratada con los niveles en una muestra no tratada con oligómeros de nucleobases antisentido o ARNbc.

Por "muestra de referencia" se entiende una muestra tomada de un sujeto antes del momento de retirar la muestra del ensayo, una persona embarazada que no tiene preeclampsia ni eclampsia, una persona embarazada pero cuya muestra se tomó al inicio del embarazo (por ejemplo, en el primer o segundo trimestre o antes de que se detectara preeclampsia o eclampsia), una persona embarazada pero que no tiene preeclampsia ni eclampsia ni antecedentes de haber padecido preeclampsia o eclampsia, o una persona que no está embarazada. Una muestra de referencia también puede ser un polipéptido purificado (por ejemplo, PIGF, VEGF o sFlt-1) con una concentración conocida como normal y que no se corresponde con el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. Por ejemplo, las concentraciones del PIGF en orina durante un embarazo normal pueden oscilar entre 400 y 800 pg/ml, mientras que en aquellas personas que presentan una preeclampsia activa pueden estar por debajo de 200 pg/ml a la mitad de la gestación. Un nivel de PIGF en orina por debajo de 400 pg/ml o de 200 pg/ml es indicativo de preeclampsia o propensión a desarrollarla. Una "muestra de referencia" también puede ser un estándar o nivel de referencia. Por "estándar o nivel de referencia" se entiende un valor o número derivado de una muestra de referencia. El estándar o nivel de referencia también puede ser un valor o número derivado de un sujeto normal que coincide con el sujeto de muestra en al menos uno de los siguientes criterios: edad gestacional del feto, edad de la madre, presión sanguínea de la madre antes del embarazo, presión sanguínea de la madre durante el embarazo, IMC de la madre, peso del feto, diagnóstico previo de preeclampsia o eclampsia y antecedentes familiares de preeclampsia o eclampsia.

También puede utilizarse un valor de referencia que se determina en función de los valores de un polipéptido particular en una muestra de referencia.

Por "ARN de interferencia pequeños (ARNip)" se entiende una molécula de ARNbc aislada, preferiblemente con una longitud mayor de 10 nucleótidos, más preferiblemente con una longitud mayor de 15 nucleótidos y aún más preferiblemente con una longitud mayor de 19 nucleótidos que se usa para identificar el gen diana o ARNm por degradar. Un intervalo de 19-25 nucleótidos es el tamaño más preferido para los ARNip. Los ARNip también pueden incluir ARN de horquilla cortos en los que se incluyen las dos cadenas de un dúplex de ARNip dentro de una sola molécula de ARN. El ARNip incluye cualquier forma de ARNbc (productos escindidos proteolíticamente de un ARNbc de mayor tamaño, ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético y ARN producido de manera recombinante) así como ARN alterado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de un material no nucleotídico, tal como los extremos del ARN de 21 a 23 nt o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). En una forma de realización preferida, las moléculas de ARN contienen un grupo 3' hidroxilo. Los nucleótidos en las moléculas de ARN de la presente invención también pueden comprender nucleótidos no convencionales, incluyendo nucleótidos o desoxirribonucleótidos no naturales. Colectivamente, todos estos ARN alterados se denominan análogos de ARN. Los ARNip de la presente invención solo necesitan ser suficientemente similares al ARN natural como para que tengan la capacidad de mediar la interferencia del ARN (ARNi). Como se usa en este documento, ARNi se refiere a la escisión dirigida dependiente de ATP y la degradación de una molécula de ARNm específica por medio de la introducción de ARN de interferencia pequeños o ARNbc en una célula o un organismo. Como se usa en este documento "ARNi mediado" se refiere a la capacidad de distinguir o identificar el ARN que se va degradar.

Por "Flt-1 soluble (sFlt-1)" (también conocido como sVEGF-R1) se entiende la forma soluble del receptor Flt-1, que es homólogo a la proteína definida por el número de acceso del GenBank U01134, y que tiene actividad biológica de sFlt-1. La actividad biológica de un polipéptido sFlt-1 puede ensayarse usando cualquier método convencional, por ejemplo, ensayando la unión de sFlt-1 a VEGF. El sFlt-1 carece del dominio transmembrana y del dominio tirosina quinasa citoplásmico del receptor Flt-1. El sFlt-1 puede unirse a VEGF y PlGF con alta afinidad, pero no puede inducir la proliferación o angiogénesis y por lo tanto es funcionalmente diferente a los receptores Flt-1 y KDR. El sFlt-1 se purificó inicialmente a partir de células endoteliales umbilicales humanas y posteriormente se demostró que se producía por células del trofoblasto *in vivo*. Como se usa en este documento, el sFlt-1 incluye cualquier miembro o isoforma de la familia del sFlt-1. En formas de realización adicionales, el sFlt-1 puede también referirse a productos de la degradación o fragmentos que resultan de la escisión enzimática del receptor Flt-1 y que conservan la actividad biológica de sFlt-1. En un ejemplo, metaloproteinasas específicas secretadas por la placenta pueden escindir el dominio extracelular del receptor Flt-1 para liberar la porción del extremo N-terminal del Flt-1 en circulación.

Por "se une específicamente" se entiende un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido de la invención, pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de manera natural un polipéptido de la invención. En un ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al sFlt-1 no se une al Flt-1.

Por "sujeto" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un ser humano o un mamífero no humano tal como una vaca, caballo, perro, oveja o gato. En esta definición se incluyen mamíferos preñados, después del parto y no preñados.

Por "sustancialmente idéntico" se entiende una secuencia de aminoácidos que difiere solo por sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, sustitución de un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo, glicina por valina, lisina por arginina, etc.) o por una o más sustituciones no conservativas, eliminaciones o inserciones localizadas en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no destruyen la función de la proteína. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene una homología de al menos un 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 80% y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente un 90%, con otra secuencia de aminoácidos. Los métodos para determinar la identidad están disponibles en programas informáticos disponibles para el público. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux y colaboradores, *Nucleic Acids Research* 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad. El programa BLAST está disponible para el público en NCBI y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul y colaboradores, NCBI NLM NIH, Bethesda, Maryland 20894, Estados Unidos; BLAST 2.0 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Estos programas de software comparan secuencias similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones. Las sustituciones conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

Por "síntomas de preeclampsia" se entiende cualquiera de los siguientes: (1) una presión sanguínea sistólica (PS) > 140 mmHg y una PS diastólica > 90 mmHg después de 20 semanas de gestación, (2) proteinuria de nuevo inicio (1

+ por tira reactiva en urinalisis, > 300 mg de proteína en orina recogida durante 24 horas, o una relación de proteína/creatinina en orina aleatoria > 0.3) y (3) resolución de hipertensión y proteinuria a las 12 semanas después del parto. Los síntomas de preeclampsia también pueden incluir disfunción renal y endoteliosis o hipertrofia glomerular. Por "síntomas de eclampsia" se entiende el desarrollo de cualquiera de los siguientes síntomas debido al embarazo o la influencia de un embarazo reciente: convulsiones, coma, trombocitopenia, edema hepático, edema pulmonar y edema cerebral.

Por "cantidad terapéutica" se entiende una cantidad que cuando se administra a un paciente que padece preeclampsia o eclampsia es suficiente para causar una reducción cualitativa o cuantitativa en los síntomas de preeclampsia o eclampsia como se ha descrito en este documento. Una "cantidad terapéutica" también puede significar una cantidad que cuando se administra a un paciente que padece preeclampsia o eclampsia es suficiente para producir una reducción en los niveles de expresión del sFlt-1 o un aumento en los niveles de expresión del VEGF o PlGF como se mide en los ensayos descritos en este documento.

Por "tratamiento" se entiende la administración de un compuesto o una composición farmacéutica con fines profilácticos y/o terapéuticos. Para "tratar una afección" o el uso para "el tratamiento terapéutico" se refiere a la administración de un tratamiento a un sujeto que ya padece una afección para mejorar el estado del sujeto. Preferiblemente, al sujeto se le ha diagnosticado preeclampsia o eclampsia basándose en la identificación de cualquiera de los síntomas característicos descritos más adelante o por medio del uso de los métodos de diagnóstico descritos en este documento. Para "prevenir la afección" se refiere a un tratamiento profiláctico de un sujeto que aún no está enfermo, pero que es propenso o que corre el riesgo de desarrollar una afección particular. Preferiblemente, se determina que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia o eclampsia usando los métodos de diagnóstico descritos en este documento. De esta manera, en la reivindicaciones y formas de realización, el tratamiento es la administración a un mamífero para fines terapéuticos o profilácticos.

Por "trofoblasto" se entiende la capa de células mesoectodérmicas que cubren el blastocisto que erosiona la mucosa uterina y a través de la cual el embrión recibe la nutrición desde la madre; las células contribuyen a la formación de la placenta.

Por "factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)" se entiende un factor de crecimiento de mamífero que es homólogo al factor de crecimiento definido en las patentes de EE. UU. 5.332.671; 5.240.848; 5.194.596; y Charnock-Jones y colaboradores (*Biol. Reproduction*, 48: 1120-1128, 1993) y tiene actividad biológica de VEGF. El VEGF existe como un homodímero glicosilado e incluye al menos cuatro isoformas empalmadas de forma alternativa diferentes. La actividad biológica del VEGF nativo incluye la promoción del crecimiento selectivo de células del endotelio vascular o de células del endotelio de la vena umbilical y la inducción de la angiogénesis. Como se usa en este documento, el VEGF incluye cualquier miembro o isoforma de la familia del VEGF (por ejemplo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF189, VEGF165, o VEGF 121). Preferiblemente, el VEGF es la isoforma VEGF121 o VEGF165 (Tischer y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954, 1991; Neufed y colaboradores *Cancer Metastasis* 15:153-158, 1996), que se describe en las patentes de EE. UU. 6.447.768; 5.219.739; y 5.194.596, incorporadas en este documento por referencia. También se incluyen formas mutantes del VEGF tales como el VEGF con selectividad de KDR y el VEGF con selectividad de Flt descritos en Gille y colaboradores (*J. Biol. Chem.* 276:3222-3230, 2001). Como se utiliza en la presente, el VEGF también incluye cualesquiera formas modificadas del VEGF como las descritas en LeCouter y colaboradores (*Science* 299:890-895, 2003). Aunque se prefiere el VEGF humano, la invención no se limita a formas humanas y puede incluir otras formas animales del VEGF (por ejemplo, ratón, perro o pollo).

Por "vector" se entiende una molécula de ADN, normalmente derivada de un plásmido o bacteriófago, en la que pueden insertarse o clonarse fragmentos de ADN. Un vector recombinante contendrá uno o más sitios de restricción únicos, y puede ser capaz de replicarse de manera autónoma en un huésped definido u organismo de vehículo de tal forma que la secuencia clonada sea reproducible. Un vector contiene un promotor operativamente enlazado a un gen o región codificante de tal forma que, tras la transfección en una célula receptora, se exprese un ARN.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes tras la siguiente descripción de las formas de realización preferidas, y de las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un autorradiograma que muestra el ARNm y el nivel de expresión de proteínas de sFlt-1 en la preeclampsia. La Figura 1A muestra la expresión de ARNm de sFlt-1 placentario de tres pacientes con preeclampsia (P1, P2, P3) y tres embarazos a término con presión normal (N1, N2, N3) según se determina por análisis de transferencia Northern. La banda mayor (7.5 kb) es el ARNm de Flt-1 de longitud completa y la banda menor y más abundante (3.4 kb) es el ARNm de sFlt-1 unido de forma alternativa. GAPDH se incluye como control y la punta de flecha indica ARN 28S. Los pacientes P1 y P2 tenían una preeclampsia grave mientras que el paciente P3 tenía una preeclampsia leve. La Figura 1B es un gráfico que muestra los niveles de sFlt-1 en el suero de pacientes con preeclampsia leve (PE leve), pacientes con preeclampsia grave (PE grave), y mujeres embarazadas normotensas a

término (normal). Los niveles de sFlt-1 se midieron por un ELISA realizado para sFlt-1 usando un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos). Como controles adicionales se incluyeron pacientes con partos antes de término por otras razones (antes de llegar a término) para descartar los cambios específicos de la edad gestacional. El número de pacientes ensayados se muestra entre paréntesis en el eje X. Se recogieron muestras antes del parto ($t = 0$) y 48 horas después del parto ($t = 48$). La Figura 1C es un gráfico que muestra las relaciones de índices antiangiogénesis ($PAAI = sFlt-1/(VEGF + PIGF)$) en el momento del parto ($t = 0$), determinadas por ELISA para todos los pacientes descritos en la Figura 1B.

Las Figuras 2A-2F son fotomicrografías que muestran el efecto antiangiogénico del exceso de sFlt-1 en la preeclampsia. Se realizaron ensayos del tubo endotelial usando suero de cuatro mujeres de control embarazadas normales y de cuatro pacientes con preeclampsia. Se muestra un experimento representativo de un control normal y un paciente con preeclampsia. Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran ensayos realizados usando suero de un paciente normal, mientras que las Figuras 2D, 2E y 2F muestran ensayos realizados usando suero de un paciente con preeclampsia. En la Figura 2A, $t = 0$, (10% de suero de una mujer embarazada normal a término); en la Figura 2B, $t = 48$ (10% de suero de una mujer embarazada normal 48 horas después del parto); en la Figura 2C, $t = 0 + sFlt-1$ exógeno (10 ng/ml); en la Figura 2D, $t = 0$ (10% de suero de una mujer preecláptica antes del parto); en la Figura 2E, $t = 48$ (10% de suero de una mujer preecláptica 48 horas después del parto), y en la Figura 2F, $t = 0 + VEGF$ exógeno (10 ng/ml) + PIGF (10 ng/ml). El ensayo del tubo se cuantificó y la longitud media del tubo \pm SEM se muestra en píxeles en la parte inferior de cada panel.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos que demuestran que la inhibición de VEGF y PIGF indujo la vasodilatación de microvasos renales por sFlt-1. La Figura 3A demuestra que el aumento en las respuestas de relajación de arteriolas renales de rata a sFlt-1 (S), VEGF (V), PIGF (P) se midió con tres dosis diferentes. V+ y P+ representan respuestas vasodilatadoras de los reactivos individuales en presencia de sFlt-1 a 100 ng/ml. Todos los experimentos se realizaron en 6 microvasos renales de rata diseccionados diferentes y los datos se muestran como media \pm SEM. El * representa el significado estadístico con $p < 0.01$ en comparación con los reactivos individuales solos. La Figura 3B muestra el aumento en las respuestas de relajación a dosis fisiológicas: VEGF 100 pg/ml (V), PIGF 500 pg/ml (P), sFlt-1 10 ng/ml (S), VEGF (100 pg/ml) + PIGF 500 pg/ml (V + P) o VEGF (100 pg/ml) + PIGF 500 pg/ml + sFlt-1 10 ng/ml (V + P + S). Todos los experimentos se realizaron en 6 microvasos renales de rata diseccionados diferentes y los datos se muestran como media \pm SEM. El * representa el significado estadístico con $p < 0.05$ en comparación con V + P.

Las Figuras 4A y 4B son imágenes que muestran la inducción por parte de sFlt-1 de endoteliosis glomerular. La Figura 4A es una fotomicrografía que muestra tinción con hematoxilina y eosina (H & E) en una oclusión capilar en animales tratados con sFlt-1 con glomérulos agrandados y citoplasma hinchado en comparación con los controles. En los animales tratados con sFlt-1 tras la tinción de Schiff con ácido peryódico (PAS) se observa "endoteliosis glomerular" con citoplasma con burbujas. Todas las fotografías de microscopia óptica se realizaron a 60 aumentos, con la ampliación original. La Figura 4B es una micrografía electrónica de glomérulos tratados con sFlt-1 que confirma la inflamación citoplásmica de las células endocapilares. La inmunofluorescencia (IF) para las fotografías de fibrina se tomaron a 40 aumentos y las fotografías de EM se tomaron a 2400 aumentos, de ampliación original. Todas las figuras se reprodujeron con la misma ampliación.

Las Figuras 5A-5C son gráficos que muestran los niveles de sFlt-1 medidos antes y después del inicio de la preeclampsia por edad gestacional. La Figura 5A es un gráfico que muestra las concentraciones medias en suero en pg/ml para controles normotensos (línea más clara con triángulos blancos), los casos antes de la preeclampsia (círculos rellenos) y los casos después de la preeclampsia - muestras de criterio de valoración - (cuadrados rellenos) dentro de ventanas de 4-5 semanas de edad gestacional antes del inicio del parto. Los paréntesis indican el error estándar de la media. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto a las muestras de control dentro de la misma ventana de edad gestacional después de la transformación logarítmica: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La Figura 5B es un gráfico que muestra las concentraciones medias en suero de sFlt-1 en pg/ml para los casos antes y después del inicio de la preeclampsia en intervalos de semanas antes de la preeclampsia. PE indica la media aritmética de 43 muestras de criterio de valoración (obtenidas durante o después del inicio de la preeclampsia). La edad gestacional media (días) está indicada entre paréntesis por debajo de cada intervalo de tiempo. La línea horizontal indica el nivel en las muestras del criterio de valoración. Las líneas verticales marcan el periodo de ≤ 5 semanas antes de la preeclampsia. La Figura 5C es un gráfico que muestra las concentraciones medias en suero de sFlt-1 en pg/ml por ventana de edad gestacional para controles normotensos y casos antes de la preeclampsia, después de excluir las muestras obtenidas en el transcurso de las 5 semanas posteriores al inicio de la preeclampsia. No hay diferencias significativas.

Las Figuras 6A-6C son gráficos que muestran los niveles de PIGF antes y después de la preeclampsia por edad gestacional. La Figura 6A es un gráfico que muestra los niveles de PIGF en todas las muestras obtenidas antes del trabajo de parto y alumbramiento. Los paréntesis indican el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las muestras de control dentro del mismo intervalo después de la transformación logarítmica: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La Figura 6B es un gráfico que muestra las concentraciones medias en suero de PIGF en pg/ml para los casos antes y después del inicio de la preeclampsia dentro de intervalos

de semanas antes de la preeclampsia. PE indica la media aritmética de 43 muestras de criterio de valoración (obtenidas durante o después del inicio de la preeclampsia). La edad gestacional media (días) está indicada entre paréntesis debajo de cada intervalo de tiempo. La línea horizontal indica el nivel en las muestras del criterio de valoración. Las líneas verticales marcan el periodo de ≤ 5 semanas antes de la preeclampsia. La Figura 6C es un gráfico que muestra las concentraciones medias en suero de PIGF en pg/ml por ventana de edad gestacional para los controles normotensos y los casos de inicio de preeclampsia.

Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran los niveles de sFlt-1 y PIGF por estado y gravedad de la preeclampsia. La Figura 7A es un gráfico que muestra las concentraciones en suero medias aritméticas de sFlt-1 (barras negras) y PIGF (barras blancas) a las 23-32 semanas de gestación en los controles y los casos (antes del inicio de la afección clínica) con preeclampsia leve, preeclampsia grave, preeclampsia con inicio <37 semanas, preeclampsia con un bebé pequeño para la edad gestacional (SGA), y preeclampsia con inicio <34 semanas. Los números de las muestras se registran por debajo de cada par de columnas. El ajuste por edad gestacional e índice de masa corporal tuvo como resultado cambios minoritarios sin afectar el nivel de significado. La Figura 7B es un gráfico que muestra las concentraciones en suero medias aritméticas de sFlt-1 (barras negras) y PIGF (barras blancas) a las 33-41 semanas de gestación en los controles y casos (antes del inicio de la afección clínica) con preeclampsia leve, preeclampsia grave, preeclampsia con inicio <37 semanas y preeclampsia con un bebé SGA. Los números de las muestras se registran por debajo de cada par de columnas. El ajuste por edad gestacional e índice de masa corporal tuvo como resultado cambios minoritarios sin afectar el nivel de significado.

La Figura 8 es un autorradiograma que muestra la expresión de flt, sFlt-1 y variantes relacionadas o fragmentos en PBMC aisladas de pacientes normales y preeclámpticos. El producto de la lisis de proteínas se analizó mediante transferencia de tipo Western utilizando un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la proteína Flt-1

Las Figuras 9A a 9D son gráficos que muestran la concentración de PIGF en orina por intervalos de edad gestacional. La Figura 9A es un gráfico que muestra las concentraciones de PIGF medias antes y después del inicio de la preeclampsia clínica de acuerdo con la edad gestacional. Las barras de error representan los errores estándar. La figura 9B es un gráfico que muestra la PIGF media expresada como los pg de creatinina por mg antes y después del inicio de la preeclampsia clínica. Las barras de error representan los errores estándar. La figura 9C es un gráfico que muestra las concentraciones de PIGF medias antes y después del inicio de la preeclampsia clínica, utilizando muestras de orina de primera hora de la mañana únicamente. Las barras de error representan los errores estándar. La figura 9D es un gráfico que muestra las concentraciones de PIGF medias antes y después del inicio de la preeclampsia clínica, utilizando muestras de orina aleatorias únicamente. Las barras de error representan los errores estándar.

La Figura 10 es un gráfico que muestra las concentraciones de PIGF medias de acuerdo con el estado y la gravedad de la preeclampsia antes y después de la normalización de la creatinina. Las concentraciones de PIGF y pg de creatinina por mg se muestran en las semanas 21-32 de gestación en los controles y en las mujeres que tuvieron posteriormente preeclampsia (PE) clínica en función de si tuvieron preeclampsia leve, preeclampsia grave, preeclampsia con un inicio antes de la semana 37 de gestación, preeclampsia y un bebé pequeño para la edad gestacional (SGA), o preeclampsia con un inicio antes de la semana 34 de gestación. Las muestras de mujeres que padecieron preeclampsia se obtuvieron antes del inicio de la afección clínica. Los valores P que se proporcionan son para comparar con las muestras de los controles. Las barras de error representan los errores estándar.

La Figura 11 es un gráfico que muestra un plano longitudinal de las concentraciones de factor de crecimiento placentario entre distintas mujeres según la edad gestacional.

Las Figuras 12A y 12B son gráficos que muestran planos esparcidos de las concentraciones de PIGF en orina y las relaciones de sFlt-1 respecto de PIGF en el suero entre las semanas 21 y 32 según los días de gestación. Los valores se obtuvieron de pares de muestras de orina y suero de 20 mujeres antes de desarrollar preeclampsia antes de la semana 37 de gestación y de 69 controles normotensos. La figura 12A muestra concentraciones de PIGF en orina. La figura 12B muestra las proporciones en suero de sFlt-1 respecto de PIGF.

La Figura 13 es un gráfico que muestra las concentraciones medias en orina de factor de crecimiento placentario (PIGF) en mujeres normotensas que tuvieron bebés que no fueron pequeños para su edad gestacional (SGA), mujeres normotensas que tuvieron bebés pequeños para su edad gestacional, mujeres con hipertensión gestacional y mujeres que desarrollaron preeclampsia antes de la semana 37 de gestación. Las concentraciones de PIGF en orina en pg/ml y en pg de creatinina por mg se muestran entre las semanas 21 y 32 de gestación en mujeres normotensas que tuvieron bebés que no fueron pequeños para su edad gestacional (NT-SGA), mujeres normotensas que tuvieron bebés pequeños para su edad gestacional (NT+SGA), mujeres que posteriormente desarrollaron hipertensión gestacional (GH) y mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia antes de la semana 37 de gestación (PE <37 semanas). Las muestras de las mujeres que desarrollaron hipertensión gestacional o preeclampsia se tomaron antes del inicio de la afección clínica. La edad gestacional media al recolectar las muestras fue similar en todos los grupos. N indica el número de muestras. Los valores P que se proporcionan son

para las comparaciones con las muestras de los controles (NT-SGA). Las barras de error representan los errores estándar.

Descripción Detallada

- 5 Se ha descubierto que los niveles de sFlt-1 son elevados en muestras de suero sanguíneo extraídas de mujeres preeclámplicas. sFlt-1 se une a VEGF y a PIGF con alta afinidad y bloquea la actividad mitogénica y angiogénica de estos factores de crecimiento. De esta manera, sFlt-1 es un excelente marcador de diagnóstico para la preeclampsia y VEGF y PIGF pueden usarse para tratar la preeclampsia. También hemos descubierto que los niveles del PIGF en la orina pueden utilizarse como herramienta diagnóstica para detectar la preeclampsia y la eclampsia, o bien la predisposición a padecerlas. La forma libre del PIGF tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa y es lo suficientemente pequeña como para ser filtrada por el riñón y eliminada a través de la orina. El PIGF, cuando se une al sFlt-1, tiene un peso molecular notablemente mayor y, por lo tanto, no se elimina a través de la orina. Cuando los niveles del sFlt-1 aumentan, sFlt-1 puede unirse al PIGF, y de esta forma reducir los niveles de PIGF libre que se elimina por la orina. Por consiguiente, pueden utilizarse análisis de orina para detectar los niveles del PIGF libre a fin de diagnosticar la preeclampsia o la eclampsia o identificar si un paciente es propenso a padecerlas.
- 10
- 15 Aunque la descripción detallada presentada en este documento se refiere específicamente a sFlt-1, VEGF o PIGF será evidente para un especialista en la materia que la descripción detallada también puede aplicarse a sFlt-1, VEGF o miembros de la familia PIGF, isoformas y/o variantes, y a factores de crecimiento que se ha demostrado que se unen a sFlt-1. Los siguientes ejemplos son para ilustrar la invención y no deben considerarse limitantes.

Ejemplo 1. Aumento de los Niveles de ARNm de sFlt-1 y Proteína en Mujeres Embarazadas con Preeclampsia

- 20 En un intento de identificar nuevos factores secretados que jueguen un papel patológico en la preeclampsia, se ha realizado un perfil de la expresión génica de tejido placentario de mujeres con y sin preeclampsia usando chips de microarreglo Affymetrix U95A. Se ha descubierto que el gen para sFlt-1 estaba regulado positivamente en mujeres con preeclampsia.

- 25 Para confirmar la regulación positiva de sFlt-1 en la preeclampsia, se han realizado transferencias Northern para analizar los niveles de ARNm de sFlt-1 placentario (Figura 1A) y ensayos ELISA para medir los niveles de proteína en suero de sFlt-1 (Figura 1B) en mujeres embarazadas preeclámplicas en comparación con mujeres embarazadas normotensas. La preeclampsia se definió como (1) una presión sanguínea sistólica (PS) > 140 mmHg y una PS diastólica > 90 mmHg después de 20 semanas de gestación, (2) proteinuria de nuevo inicio (1 + por tiras reactivas en urinalisis, >300 mg de proteína en orina recogida durante 24 horas, o una relación de proteína/creatinina en orina aleatoria >0.3), y (3) resolución de hipertensión y proteinuria a las doce semanas después del parto. Se excluyeron las pacientes con hipertensión, proteinuria o afección renal subyacente. Las pacientes se dividieron en preeclampsia leve y grave basándose en la presencia o ausencia de proteinuria de intervalo nefrítico (> 3 g de proteína en orina recogida durante 24 horas o una relación de proteína/creatinina en orina mayor de 3.0). Las relaciones medias de proteína/creatinina en orina en el grupo de preeclampsia leve fueron de 0.94 +/- 0.2 y en el grupo de preeclampsia grave fueron de 7.8 +/- 2.1. Las edades gestacionales medias de los diversos grupos fueron las siguientes: normal 38.8 +/- 0.2 semanas, preeclampsia leve 34 +/- 1.2 semanas, preeclampsia grave 31.3 +/- 0.6 semanas, y pre-término 29.5 +/- 2.0 semanas. Se obtuvieron muestras placentarias inmediatamente después del parto. Se tomaron cuatro muestras aleatorias de cada placenta, se pusieron en solución de estabilización de ARN (Ambion, Austin, Texas, Estados Unidos) y se almacenaron a -70°C. El aislamiento de ARN se realizó usando un kit Qiagen RNAeasy Maxi (Qiagen, Valencia, California, Estados Unidos).
- 30
- 35
- 40

- Se detectó un aumento tanto en el ARNm de sFlt-1 placentario como en la proteína sFlt-1 en suero materno en mujeres embarazadas preeclámplicas en comparación con mujeres embarazadas normotensas. El nivel medio en suero de sFlt-1 fue casi cuatro veces mayor en los pacientes con preeclampsia grave en comparación con las mujeres embarazadas de control normales. Para excluir la posibilidad de que este efecto se debiera a la anterior edad gestacional de los casos pre-eclámplicos, también se midieron los niveles de sFlt-1 en mujeres normotensas con edad gestacional similar y con un parto prematuro por otras razones (edades gestacionales de 23-36 semanas) y no se encontraron diferencias significativas en este grupo en comparación con los embarazos normotensos a término. Las sondas usadas para las transferencias Northern se obtuvieron por PCR e incluían un fragmento de 500 pb en la región codificante de ADNc de Flt-1 humano de pUC118, y un ADNc de GAPDH que se usó como control de normalización.
- 45
- 50

- En un embarazo normal hay un equilibrio entre los factores pro- y antiangiogénicos secretados por la placenta que es necesario para un desarrollo placentario adecuado. Se hipotetizó que en la preeclampsia, el aumento de la producción de sFlt-1 y la reducción de la producción de VEGF y PIGF desplaza el equilibrio a favor o en contra de la angiogénesis. Para tratar la actividad antiangiogénica neta se midieron los niveles en suero de VEGF y PIGF y se descubrió que los niveles en suero de PIGF y VEGF eran menores en pacientes con preeclampsia en comparación con los pacientes de control normales (PIGF media, 235.3 +/- 45.3 pg/ml frente a 464 +/- 116.6 pg/ml) como se ha descrito (Tidwell y colaboradores, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 184:1267-1272, 2001). Cuando se incorporó sFlt-1, los
- 55

niveles de VEGF y PIGF en un índice antiangiogénico, o PAAI, como un indicador de la actividad antiangiogénica neta, se descubrió que se podrían separar claramente los pacientes pre-eclámpticos de los pacientes normales y que el PAAI parecía correlacionarse con la gravedad de la preeclampsia (Figura 1C). Este PAAI puede usarse como herramienta de diagnóstico para la detección de la preeclampsia en mujeres embarazadas.

5 **Ejemplo 2. El Suero de Mujeres con Preeclampsia Inhibe la Angiogénesis en un Ensayo de Tubo Endotelial *In Vitro***

Se hipotetizó que el exceso de sFlt-1 circulante en pacientes con preeclampsia produce una disfunción endotelial y conduce a un estado antiangiogénico. Para solucionar esto, se usó un ensayo de tubo endotelial como un modelo *in vitro* de angiogénesis. Se puso factor de crecimiento reducido Matrigel (7 mg/ml, Collaborative Biomedical Products, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos) en pocillos (100 ml/pocillo) de una placa de cultivo de células de 48 pocillos enfriada previamente y se incubó a 37°C durante 25-30 minutos para permitir la polimerización. Se trataron células endoteliales de vena umbilical humana (30 000 + 300 ml de medio basal endotelial sin suero, Clonetics, Walkersville, Maryland, Estados Unidos) en los pases 3-5 con suero del paciente al 10%, se colocaron en los pocillos recubiertos con Matrigel y se incubaron a 37°C durante 12-16 horas. Después se evaluó la formación del tubo por medio de un microscopio de contraste de fase invertido a 4 aumentos (Nikon Corporation, Tokio, Japón) y se analizó cuantitativamente (área del tubo y longitud total) usando el software de análisis de imágenes simple PCI.

Las condiciones del ensayo de formación del tubo se ajustaron de tal forma que las células endoteliales de vena umbilical humana normales solo formaran tubos en presencia de factores de crecimiento exógenos tales como VEGF. En estas condiciones, se descubrió que aunque el suero de mujeres normotensas inducía a que las células endoteliales formaran estructuras de tipo tubo simétricas, el suero de las mujeres con preeclampsia inhibía la formación del tubo (Figura 2). Notablemente, a las 48 horas después del parto este efecto antiangiogénico había desaparecido, lo que sugiere que la inhibición de los tubos detectada con el suero de pacientes con preeclampsia probablemente se debía a un factor circulante liberado por la placenta. Cuando se añadió sFlt-1 a suero normotenso en dosis similares a las encontradas en pacientes con preeclampsia, no se produjo la formación del tubo, imitando los efectos observados con el suero de mujeres preeclámpticas. Cuando se añadieron VEGF y PIGF exógenos al ensayo usando suero pre-eclámptico, se restauró la formación del tubo (Figura 2). Para estos ensayos se usaron VEGF humano recombinante, PIGF humano y Flt-1Fc humano. Estos resultados sugerían que las propiedades antiangiogénicas de suero pre-eclámptico se debían al antagonismo de VEGF y PIGF por sFlt-1 endógeno. Estos resultados también sugerían que la adición de VEGF purificado y/o PIGF puede invertir o mitigar el estado pre-eclámptico y puede usarse terapéuticamente.

20 **Ejemplo 3. sFlt-1 Inhibe la Vasodilatación Inducida por VEGF y PIGF de Microvasos Renales**

El papel causante de sFlt-1 en la vasoconstricción se determinó usando un experimento de reactividad microvascular *in vitro*. Los experimentos de reactividad microvascular se realizaron como se ha descrito previamente usando microvasos renales de rata (Sato y colaboradores, *J. Surg. Res.*, 90:138-143, 2000). Se diseccionaron microvasos de arterias renales (70-170 µm de diámetro interno) a partir de riñones de rata usando un microscopio de disección de 10 aumentos a 60 aumentos (Olympus Optical, Tokio, Japón). Los microvasos se pusieron en una cámara de microvasos aislada, se canularon con micropipetas de vidrio dobles que medían de 30-60 µm de diámetro y se fijaron con una sutura de mono-filamento de nylon 10-0 (Ethicon, Somerville, New Jersey). Se hizo circular de forma continua solución tampón de Krebs oxigenada (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono) calentada a 37°C a través de la cámara del vaso y un depósito que contenía un total de 100 ml de la solución. Los vasos se presurizaron a 40 mmHg en un estado sin flujo usando un manómetro de bureta relleno con solución tampón de Krebs. Con un microscopio invertido (40 x a 200 x; Olympus CK2, Olympus Optical) conectado a una videocámara, se proyectó la imagen del vaso sobre un monitor de televisión blanco y negro. Se usó un analizador de dimensiones electrónico (Living System Instrumentation, Burlington, Vermont, Estados Unidos) para medir el diámetro interno del lumen. Las mediciones se registraron con un registrador con gráfico impreso (Graphtec, Irvine, California, Estados Unidos). Los vasos se dejaron bañar en la cámara de microvasos durante al menos 30 minutos antes de cualquier intervención. En todos los grupos experimentales, se examinaron las respuestas de relajación de los microvasos renales después de la pre-contracción de los microvasos con U46619 (agonista de tromboxano) al 40-60% de su diámetro inicial a una presión de distensión de 40 mmHg. Una vez que se alcanzó el tono en estado estacionario, se examinaron las respuestas a diversos reactivos tales como VEGF, PIGF y sFlt-1. Para estos ensayos se usaron VEGF de rata recombinante, PIGF de ratón y Flt-1Fc de ratón. Todos los fármacos se aplicaron extraluminamente. Las mediciones se realizaron cuando la respuesta se había estabilizado (normalmente 2-3 minutos después de administrar el fármaco). En cada vaso se realizaron de una a cuatro intervenciones. Los vasos se lavaron con una solución tampón de Krebs y se dejaron equilibrar en una solución tampón de Krebs sin fármaco durante 20-30 minutos entre las intervenciones.

Se descubrió que sFlt-1 solo no producía una vasoconstricción significativa, sin embargo bloqueaba el aumento de respuesta a la dosis en la vasodilatación inducida por VEGF o PIGF (Figura 3A). Además, se descubrió que VEGF y PIGF, a los niveles fisiológicos observados en el embarazo, inducía una relajación arteriolar dependiente de la dosis significativa, y que este efecto se bloqueaba por la adición de 10 ng/ml de sFlt-1, una concentración observada en

mujeres con preeclampsia grave (Figura 3B). Este resultado sugería que el sFlt-1 circulante en pacientes con preeclampsia puede oponerse a la vasorrelajación, contribuyendo de esta manera a la hipertensión. Estos resultados confirman la conclusión de que sFlt-1 es responsable de muchos de los síntomas clínicos y patológicos de la preeclampsia, incluyendo la hipertensión. La inhibición de sFlt-1, por medio del uso de anticuerpos dirigidos, por ejemplo, podría invertir los efectos de la proteína en mujeres preeclámplicas y tales inhibidores de sFlt-1 podrían usarse potencialmente como agentes terapéuticos.

Ejemplo 4. Efectos de sFlt-1 en un Modelo Animal de Preeclampsia

Basándose en los resultados anteriores, se hipotetizó que la adición de sFlt-1 exógeno produciría hipertensión y proteinuria en un modelo animal. Se ha demostrado que los adenovirus que expresan sFlt-1 producen niveles sistémicos sostenidos de sFlt-1 asociados con una actividad antitumoral significativa (Kuo y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 98:4605-4610, 2001). Este adenovirus recombinante que codifica sFlt-1 murino se inyectó en la vena de la cola de ratas Sprague-Dawley preñadas en el día 8-9 de embarazo. Como controles se usaron adenovirus que codificaban Fc murino y sFlk1-Fc (proteína de fusión del electrodominio Flk1 del receptor 1 de VEGF de ratón y proteína Fc) en dosis equivalentes. Se ha demostrado que Flk1 se une a VEGF, pero no a PlGF. Por lo tanto, se eligió sFlk1-Fc como control para ayudar a distinguir entre la actividad anti-VEGF y la actividad anti-PlGF de sFlt-1.

Se inyectaron 1×10^9 pfu de Ad Fc, Ad sFlt-1, o Ad sFlk1-Fc en ratas Sprague-Dawley preñadas y no preñadas por medio de inyecciones en la vena de la cola. Estos adenovirus se han descrito previamente (Kuo y colaboradores, *supra*) y se generaron en el Harvard Vector Core Laboratory. En las ratas preñadas se inyectaron los adenovirus en el día 8-9 de embarazo (en la primera parte del segundo trimestre) y se midió la presión sanguínea en el día 16-17 de embarazo (en la primera parte del tercer trimestre). En los animales no preñados, la PS se midió en el día 8 después de la inyección de los adenovirus. Las PS se midieron en las ratas después de la anestesia con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.). La arteria carótida se aisló y se canuló con un catéter de micropunta de alta fidelidad 3-Fr conectado a un transductor de presión (Millar Instruments, Houston, Texas, Estados Unidos). El catéter Millar Mikro-Tip se hizo avanzar en el interior de la arteria para registrar la presión sanguínea. La presión sanguínea y el ritmo cardíaco se registraron en un registrador con gráfico impreso (modelo 56-1X 40-006158, Gould Instrument Systems, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) y se calculó un promedio de un periodo de 10 minutos. Después se obtuvieron muestras de sangre, tejido y orina antes de sacrificar las ratas. La albúmina en orina se midió por una tira de ensayo convencional y se cuantificó por un inmunoensayo competitivo de enzimas ligadas (ELISA) como se ha descrito en otras partes de este documento (Cohen y colaboradores, *Kidney Intl.*, 45: 1673-1679, 1994). La creatinina en orina se midió por un kit de procedimiento colorimétrico de ácido pícrico (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Se midieron las presiones sanguíneas intraarteriales en la primera parte del tercer trimestre del embarazo para imitar la patología natural de la preeclampsia. Estos experimentos también se realizaron en ratas Sprague-Dawley hembra no preñadas para determinar si los efectos de sFlt-1 son directos o indirectos por medio de sus efectos sobre la placenta. Se confirmó por medio de análisis de transferencia Western que los niveles sistémicos de sFlt-1 el día de la medición de la presión sanguínea estaban dentro del intervalo de 25-350 ng/ml en los diversos animales tratados con sFlt-1 el día de la medición de la PS. En la Tabla 1 se muestra la presión sanguínea y la proteinuria en los diferentes grupos experimentales.

Tabla 1. Presión sanguínea y proteinuria en ratas

	N	MAP (mmHg)	Relación U alb:cr
Fc (P)	5	75.6 ± 11.1	62 ± 21
sFlt-1 (P)	4	109.0 ± 19.3*	6923 ± 658*
sFlk1-Fc (P)	4	72.8 ± 14.7	50 ± 32
Fc (NP)	5	89.3 ± 5.7	138 ± 78
sFlt-1 (NP)	6	117.9 ± 129*	12947 ± 2776*
sFlk1-Fc (NP)	4	137.3 ± 2.3*	2269 ± 669*

A ratas preñadas (P) y no preñadas (NP) se les administraron adenovirus que expresaban Fc (control), sFlt-1 o proteína sFlk1-Fc. Presión sanguínea arterial media (MAP = diastólica + 1/3 presión del pulso en mmHg) ± S.E.M y la relación de albúmina: Cr en orina (mg de albúmina por gramo de creatinina) ± S.E.M se midieron ocho días después, que corresponde a la primera parte del tercer trimestre en las ratas preñadas. N = el número de animales de cada grupo experimental. El * representa significancia estadística con $p < 0.01$ en comparación con el grupo de control (Fc).

Las ratas preñadas tratadas con sFlt-1 tuvieron una hipertensión significativa y una albuminuria de intervalo nefrótico significativa en comparación con los controles de Fc. Las ratas no preñadas a las que se administró sFlt-1 también desarrollaron hipertensión y proteinuria. Notablemente, las ratas no preñadas tratadas con sFlk1-Fc desarrollaron hipertensión y proteinuria, mientras que las ratas preñadas tratadas con sFlk1-Fc no lo hicieron. Por lo tanto, en el embarazo, el antagonismo de VEGF solo es suficiente para producir preeclampsia, posiblemente debido a la

presencia de altos niveles de PIGF. En el estado no preñado, en el que está prácticamente ausente PIGF, el antagonismo de VEGF solo es suficiente para romper el equilibrio pro/antiangiogénico y producir patologías renales similares a las asociadas con la preeclampsia. Se usaron diversas técnicas de tinción para examinar la lesión renal que se observaba en todas las ratas tratadas con sFlt-1 (Figura 4). Se fijaron riñones recogidos de las ratas en solución de Bouin, se cortaron en secciones y se tiñeron con tintes H&E y PAS. Para la microscopía electrónica, el tejido renal se fijo en glutaraldehído, se incluyó en una mezcla de araldite-epon y se cortaron secciones renales ultrafinas (1 μ m), se tiñeron con azul de tolúeno y se evaluaron usando Zeiss EM 10 con diversos aumentos. La inmunofluorescencia para los depósitos de fibrina dentro de los glomérulos se realizó usando anticuerpo policlonal antifibrina (ICN, Suiza). La endoteliosis glomerular global y difusa fue la lesión renal observada universalmente en las ratas tratadas con sFlt-1. Se detectó un aumento glomerular con oclusión de los bucles capilares por hinchazón e hipertrofia de las células endocapilares. En las células epiteliales glomerulares se observaron numerosas gotitas de resorción de proteína aparentes. No se observó ninguna glomeruloesclerosis segmental. Se vieron “dobles contornos” aislados y una deposición focal de fibrina dentro de los glomérulos. Este hallazgo de la deposición de fibrina en ausencia de una interposición mesangial significativa es similar a la que se ha descrito como típica de la fase preparto de la afección humana (Kincaid-Smith, *Am. J. Kidney Dis.*, 17:144-148, 1991). La inmunofluorescencia para la fibrina mostró focos de deposición de fibrina dentro de los glomérulos de los animales tratados con sFlt-1, pero no de los animales tratados con Fc. Las ratas no preñadas tratadas con sFlk1 desarrollaron la misma lesión. De hecho, cuando se usó sFlk1 con los mismos niveles que sFlt-1, la lesión renal fue más grave en las ratas no preñadas, ya que hay menos moléculas proangiogénicas circulantes para antagonizar sFlt-1. Estos resultados sugerían que los niveles elevados de sFlt-1 pueden ser responsables de la endoteliosis glomerular asociada con la preeclampsia, pero que este efecto era independiente de la placenta, ya que se detectaron cambios glomerulares en ratas no preñadas así como en ratas preñadas. Estos resultados también sugerían que el antagonismo de VEGF y PIGF es importante en la patología de la preeclampsia ya que se producían hipertensión y proteinuria en los ratones no preñados tratados con sFlk-1 pero no en los ratones preñados tratados con sFlk-1 donde los niveles de PIGF son elevados.

El modelo animal creado en este documento puede usarse como modelo experimental para ensayar nuevos compuestos terapéuticos. Usando este modelo animal pueden estudiarse tanto la eficacia de los compuestos terapéuticos potenciales como la farmacología y toxicidad.

Ejemplo 5. Efectos de sFlt-1 en un Modelo Animal de Eclampsia

En ratas preñadas en la primera parte de su segundo trimestre de embarazo se inyecta sFlt-1 exógeno. Después las ratas se controlan y se ensayan durante la primera parte de su tercer trimestre para detectar el desarrollo de eclampsia. Los ensayos usados para la detección de eclampsia puede incluir MRI de los cerebros de las ratas para el desarrollo de edema, EEG del cerebro de la rata para el desarrollo de convulsiones e histología de los cerebros de la rata para determinar si se ha producido lesión endotelial a lo largo de la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo usando marcadores endoteliales específicos.

El modelo animal creado en este documento puede usarse como modelo experimental para ensayar nuevos compuestos terapéuticos. Usando este modelo animal pueden estudiarse tanto la eficacia de compuestos terapéuticos potenciales como la farmacología y toxicidad.

Ejemplo 6: La Relación de PIGF/Creatinina en Orina Sirve Como Diagnóstico de la Preeclampsia

Se obtuvieron muestras de orina de 10 mujeres a las 16 semanas de gestación (cinco normales, cuatro con preeclampsia leve y una con preeclampsia grave). A estas muestras las proporcionó el Dr. Ravi Thadhani del Hospital General de Massachusetts. Las relaciones medias de PIGF libre/creatinina en orina (pg de PIGF por mg de creatinina) para las mujeres embarazadas normales fueron de 78 +/- 10.7 y para las cuatro mujeres con preeclampsia leve fueron de 33 +/- 5.0 y para la paciente con preeclampsia grave fue de 17. De esta manera, una alteración en la relación entre PIGF y creatinina en orina es útil como indicador diagnóstico de preeclampsia en un paciente.

Ejemplo 7: Niveles de PIGF en Orina en Mujeres Embarazadas de Control y Preeclámpticas

Se midió el PIGF en orina en mujeres embarazadas de control y preeclámpticas usando muestras de orina guardadas del ensayo CPEP (ver ejemplo 8) en colaboración con el Dr. Richard Levine en el NIH (Tabla 2). La tabla a continuación muestra reducciones significativas de PIGF en orina en pacientes que posteriormente presentaron preeclampsia durante la mitad del embarazo (22-33 semanas) y al final del embarazo (\geq 30 semanas), pero no al principio del embarazo (<20 semanas). Todas las muestras de orina se obtuvieron antes de la aparición de los síntomas clínicos de la preeclampsia.

Tabla 2. Niveles de PIGF en orina en pg/ml en pacientes embarazadas preeclámpticas frente a controles

	Control (n=118)	PE (n=120)
Principio del embarazo	39.80	42.28
Mitad del embarazo	193.11	98.66 (p<0.0001)
Final del embarazo	107.82	62.05 (p=0.0213)

Ejemplo 8: Niveles de Proteína sFlt-1 y PIGF como Indicador de Diagnóstico de Preeclampsia y Eclampsia en mujeres

5 Para este estudio se usaron muestras archivadas del ensayo de calcio para la prevención de la preeclampsia para analizar los modelos gestacionales de sFlt-1, PIGF libre y VEGF libre circulantes en embarazos normotensos y preeclámpticos en colaboración con el Dr. Richard Levine en el NIH. El ensayo de calcio para la prevención de la preeclampsia, o CPEP, fue un ensayo clínico doble ciego aleatorizado realizado durante 1992-1995 para evaluar los efectos del suplemento diario de 2 g de calcio elemental o placebo sobre la incidencia y gravedad de la preeclampsia (Levine y colaboradores, *N. Engl. J. Med.* 337:69-76, 1997; Levine y colaboradores, *Control Clin. Trials* 17:442-469, 1996). Se incluyeron mujeres nulíparas sanas con embarazos simples con entre 13 y 21 semanas de gestación en 5 centros médicos de Estados Unidos participantes y se siguieron hasta 24 horas después del parto usando un protocolo común y formularios de recogida de datos idénticos. En el momento de la inclusión, todas las participantes del CPEP tenían una presión sanguínea < 135/85 mmHg, y ninguna tenía disfunción renal o proteinuria. La edad gestacional se determinó por examen de ultrasonido. Se obtuvieron muestras de suero de las participantes antes de la inclusión en el ensayo (13-21 semanas), a las 26-29 semanas, a las 36 semanas si aún estaban embarazadas, y cuando se detectó hipertensión o proteinuria. Las "muestras de criterio de valoración" (PE activa) fueron muestras obtenidas durante o después del inicio de los síntomas y signos de la preeclampsia, pero antes de los trabajos de parto y el alumbramiento como se ha descrito en otra parte de este documento (Levine y colaboradores, 1996, *supra*). Las muestras de sangre conseguidas del ensayo CPEP se obtuvieron gracias a la colaboración del Dr. Richard Levine en el NIH.

Participantes

Se seleccionaron sujetos con una información completa de los resultados, de los que se habían obtenido muestras de suero a < 22 semanas y que tuvieron un varón que nació vivo. De las 4589 participantes del CPEP, se excluyeron 253 que perdieron el seguimiento, 21 cuyo embarazo terminó antes de 20 semanas, 13 ausencias de datos de resultados maternos o perinatales, 4 sin historia de hábito de fumar, 9 con hipertensión no verificada por los grupos de revisión, y otras 32 con niños nacidos muertos, quedando 4257 mujeres con información adecuada y nacimientos vivos. Entre estas, 2156 tuvieron bebés varones. Después de excluir una mujer cuyo bebé tenía una anomalía cromosómica, 381 con hipertensión gestacional y 43 sin una muestra de suero inicial, quedaron 1731 mujeres. De estas, 175 desarrollaron preeclampsia y 1556 permanecieron normotensas a lo largo de todo el embarazo.

Como el suplemento de calcio no tuvo ningún efecto sobre el riesgo y gravedad de la preeclampsia y no estuvo relacionado con las concentraciones de moléculas pro- y antiangiogénicas, se eligieron casos y controles sin tener en cuenta el tratamiento en el CPEP. Para cada caso de preeclampsia se seleccionó un control normotenso, equivalente en todos los sitios de inclusión en cuanto a la edad gestacional en la recolección de la primera muestra de suero (antes de una semana) y el tiempo de almacenamiento en congelador a -70°C (dentro de 12 meses). Se eligieron aleatoriamente 120 parejas equivalentes ("casos" y "controles") para el análisis de las 657 muestras de suero obtenidas antes del parto (Tabla 3, presentada a continuación). La edad gestacional media en la recogida de la primera muestra de suero fue de 112.8 y 113.6 días en los casos y los controles respectivamente; la duración media del almacenamiento en el congelador fue de 9.35 y 9.39 años.

TABLA 3: Características de casos y controles en la inclusión en el CPEP y de sus bebés recién nacidos

Características	Casos (n=120)	Controles (n=118)
Edad (años)	20.8 ± 4.5	20.0 ± 3.4
Índice de masa corporal	27.3 ± 6.8	25.0 ± 6.1**
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	109.0 ± 9.0	106.0 ± 9.0†
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	62.0 ± 8.0	59.0 ± 7.0‡
Edad gestacional en el alumbramiento [semanas]	38.1 ± 2.6	38.9 ± 2.5*
Fumador actual [n (%)]	9 (7.5)	13 (11.0)

Casada [n (%)]	25 (20.8)	22(18.6)
Raza/etnia		
Blanca, no hispana [n (%)]	24 (20.0)	33 (28.0)
Blanca hispana [n (%)]	21 (17.5)	14 (11.9)
Afroamericana [n (%)]	69 (57.5)	68 (57.6)
Otra, desconocida [n (%)]	6 (5.0)	3 (2.5)
Peso en el nacimiento (g)	3100 ± 796	3247 596
Parto <37 semanas [n (%)]	26 (21.7)	9 (7.6)&
Pequeño para la edad gestacional (< décimo percentil) [n (%)]	18 (15.0)	4 (3.4)&

Media ± desviación estándar a menos que se indique
 p=0.03 ** P=0.007 †P=0.001 ‡P=0.006 &P=0.002
 Las pacientes indicaron su raza o grupo étnico.

5 Para este estudio, la hipertensión se definió como una presión sanguínea diastólica de al menos 90 mmHg en dos ocasiones separadas por un periodo de 4-168 horas. La hipertensión grave se definió como una presión sanguínea diastólica de al menos 110 mmHg en dos ocasiones separadas por un periodo de 4-168 horas, o una ocasión si la mujer había recibido una terapia antihipertensiva. La proteinuria se definió como 300 mg o más de proteína en una recogida de orina de 24 horas, dos muestras de orina aleatorias separadas por un periodo de 4-168 horas que contenían al menos 1+ proteína por medio de una tira reactiva, una sola muestra de orina con una relación de proteína/creatinina de al menos 0.35, o una sola muestra de orina aleatoria que contenía al menos 2+ proteína por tira reactiva. La proteinuria grave se diagnosticó por una muestra de recogida de orina de 24 horas que contenía al menos 3.5 g de proteína o por dos muestras de orina aleatorias con al menos 3+ proteína por medio de una tira reactiva. La preeclampsia se definió como hipertensión y proteinuria que se producía con una diferencia menor de 7 días; la preeclampsia grave se definió como una preeclampsia con hipertensión grave, proteinuria grave, síndrome de HELLP (hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y baja concentración de plaquetas) o eclampsia. El inicio de la preeclampsia fue el momento de la detección de la primera elevación de la presión sanguínea o proteinuria en la muestra de orina que conducía al diagnóstico de preeclampsia.

15 El pequeño tamaño para la edad gestacional (SGA) se definió como un peso en el nacimiento menor del percentil del 10% para la edad gestacional de acuerdo con las tablas de Estados Unidos del peso en el nacimiento para la edad gestacional por raza, paridad y sexo del bebé (Zhang y Bowes 1995, *supra*).

20 *Procedimientos*

Los ensayos se realizaron en el Beth Israel Deaconess Medical Center por el personal de laboratorio que desconocía el diagnóstico de las pacientes y otra información clínica relevante. Las muestras se ordenaron aleatoriamente para el análisis. Se realizaron ensayos inmunoabsorbentes de enzimas ligadas (ELISA) para sFlt-1 humano, PIGF libre y VEGF libre de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando kits adquiridos de R&D Systems (Minneapolis, Mineápolis, Estados Unidos). Se descongelaron a temperatura ambiente alícuotas de muestras de suero que se habían almacenado a -70C°, se diluyeron con BSA/solución salina tamponada con Tris y se incubaron durante 2 horas en una placa de 96 pocillos recubierta previamente con anticuerpo de captura dirigido contra sFlt-1, PIGF o VEGF. Los pocillos después se lavaron tres veces, se incubaron 20 minutos con una solución de sustrato que contenía peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina y la reacción se inactivó con ácido sulfúrico 2N. La densidad óptica se determinó a 450 nm (corrección de longitud de onda a 550 nm). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones de proteína se calcularon usando una curva patrón derivada de concentraciones conocidas de la proteínas recombinantes respectivas. Si la diferencia entre los duplicados excedía del 25%, el ensayo se repitió y se desecharon los resultados iniciales. Los ensayos tuvieron sensibilidades de 5, 7 y 5 pg/ml para sFlt-1, PIGF y VEGF, respectivamente, con coeficientes de variación inter- e intraensayo del 7.6% y 3.3% para sFlt-1, del 11.2% y 5.4% para PIGF, y del 7.3% y 5.4% para VEGF.

35 *Análisis Estadístico*

En los análisis de las características maternas o del niño para comparar las variables categóricas o continuas se usaron respectivamente ensayos Chi cuadrado y ensayos t. Aunque en el texto y en las figuras se proporcionan los valores de media aritmética de las concentraciones, el ensayo estadístico se realizó después de una transformación logarítmica, a menos que se indique otra cosa. El ajuste se realizó usando reversión logística en concentraciones transformadas logarítmicamente.

Resultados

De los 120 casos, 80 desarrollaron preeclampsia y 40 desarrollaron preeclampsia grave, incluyendo 3 con el síndrome HELLP y 3 con eclampsia. Las pacientes del grupo de casos eran más bajas que las pacientes de control, tenían un mayor índice de masa corporal y tenían una mayor presión sanguínea inicial (Tabla 2). Además, mayores proporciones de las pacientes del grupo de casos tenían embarazos complicados, ya sea parto prematuro o niños pequeños para la edad gestacional (SGA). Las pacientes de casos contribuyeron con un promedio de 2.9 muestras de suero al estudio; los controles con 2.6 muestras.

En primer lugar se confirmó que en las pacientes con preeclampsia estaban alterados los niveles de sFlt-1, PIGF y VEGF en el momento de la afección activa en comparación con los controles con una edad gestacional similar de este grupo de estudio de CPEP. Las muestras extraídas en el momento de la preeclampsia clínica establecida (muestra de criterio de valoración) tenían niveles de sFlt-1 aumentados en gran medida, niveles de PIGF reducidos y niveles de VEGF reducidos en comparación con los controles con edades gestacionales (4382 frente a 1643 pg/ml sFlt-1, $p < 0.0001$; 137 frente a 669 pg/ml PIGF, $p < 0.0001$; y 6.41 frente a 13.86 pg/ml VEGF, $p = 0.06$) para los casos y controles, respectivamente, en 23 pares de edad gestacional similar) similares a los informes publicados previamente (Maynard y colaboradores, *J. Clin. Invest.* 111:649-658, 2003).

Para evaluar el modelo gestacional de los niveles de sFlt-1, PIGF y VEGF, se midieron las concentraciones circulantes de sFlt-1, PIGF y VEGF de muestras de suero obtenidas a partir de pacientes de casos y pacientes de control dentro de diversas ventanas de edad gestacional. El modelo gestacional de la proteína sFlt-1 para 120 mujeres preeclámplicas y 120 mujeres de control se muestra en la Figura 5A. Los niveles de sFlt-1 en los pacientes de control permanecieron constantes hasta las 33-36 semanas, momento en el que se elevaron aproximadamente 145 pg/ml por semana hasta el trabajo de parto y el alumbramiento. Entre los pacientes de los casos antes de los síntomas clínicos, sFlt-1 parecía comenzar a elevarse a las 21-24 semanas, con una elevación por pasos y una diferencia estadísticamente significativa respecto de los controles a las 29-32 semanas (figura 5A). En general, las diferencias entre los pacientes de casos y de controles medidas antes del inicio de los síntomas clínicos eran del 17% ($p < 0.05$) en la mitad de la gestación. Las muestras de criterio de valoración fueron significativamente elevadas en comparación con las muestras extraídas antes de la afección. Para evaluar los mecanismos de la elevación de sFlt-1 antes del inicio de la afección clínica, representamos las concentraciones de sFlt-1 en todas las mujeres preeclámplicas por semanas antes del inicio de la preeclampsia (Figura 5B). Las concentraciones medias de sFlt-1 en muestras de pacientes de casos se representaron por semanas completas antes del inicio de la preeclampsia. Empezando 5 semanas antes de la preeclampsia, las concentraciones de sFlt-1 se elevaron sustancialmente hasta una semana antes del inicio de la afección, momento en el que alcanzaron las concentraciones observadas en las muestras del criterio de valoración. Los aumentos en sFlt-1 4, 3, 2 y 1 semana antes de la preeclampsia se produjeron con pocos cambios en la edad gestacional media y no pueden explicarse por un aumento en la última parte del tercer trimestre al avanzar la edad gestacional. De 8-6 a 5 semanas antes de la preeclampsia, el nivel de sFlt-1 aumentó a 962 pg/ml, mientras que la edad gestacional media se elevó 31 días. Aproximadamente un tercio de este aumento en sFlt-1 no puede atribuirse al avance de la gestación. Cuando se representó el nivel de sFlt-1 por edad gestacional en controles y en casos después de retirar las muestras obtenidas ≤ 5 semanas antes del inicio de la preeclampsia, no se observaron diferencias sustanciales (Figura 5C). Estos datos sugieren que la mayor concentración de sFlt-1 en los pacientes de casos antes del inicio de la preeclampsia se debe a elevaciones agudas en sFlt-1 en las 5 semanas previas al inicio de la afección clínica.

Después se representó el modelo gestacional de la proteína PIGF en el mismo grupo de pacientes que se ha mostrado en la Figura 6A. Las concentraciones de proteína PIGF de control se elevaron durante los dos primeros trimestres, alcanzaron un pico máximo a las 29-32 semanas y se redujeron durante la última parte de la gestación. Entre los pacientes de casos, antes de la preeclampsia, las concentraciones de la proteína PIGF siguieron un modelo gestacional similar, pero fueron significativamente menores que los controles de la semana 13 a la 16. En general, las diferencias en PIGF entre los pacientes de casos y los controles medidas antes del inicio de los síntomas clínicos fueron del 35% ($p < 0.0001$) en la mitad de la gestación. Los niveles de PIGF en los casos antes del inicio de la preeclampsia se representan por semanas antes de la preeclampsia (Figura 6B) y por edad gestacional después de extraer muestras < 5 semanas antes de la preeclampsia (Figura 6C). Una semana antes del inicio de la preeclampsia, las concentraciones se aproximaron a las observadas después del inicio de la preeclampsia (Figura 6B). En comparación con los controles, los niveles de PIGF de pacientes de casos se redujeron moderadamente desde el parto, con más reducciones sustanciales a las 5 y 3 semanas antes del parto. Las concentraciones de los pacientes de control permanecieron elevadas desde 17-15 hasta 3 semanas antes del parto, y después se redujeron sustancialmente. El gráfico que muestra los niveles de PIGF excluyendo las muestras obtenidas ≤ 5 semanas antes de la preeclampsia indica una menor reducción en los casos con respecto a los controles a las 29-32 semanas de gestación y ninguno en las muestras obtenidas a partir de los pacientes de casos a las 33-36 semanas (Figura 6C). Esto sugiere que la reducción de las concentraciones de PIGF en las semanas previas a la afección era responsable de los niveles considerablemente bajos de PIGF detectados al principio de la afección (o las muestras de criterio de valoración mostradas en la Figura 6A).

Las concentraciones de VEGF a lo largo de todo el embarazo fueron muy bajas y similares en los controles y en los casos antes de la preeclampsia, con la excepción de una reducción significativa en las pacientes de casos a las 37-41 semanas. Las concentraciones medias de VEGF a las 23-32 semanas en los casos excluyendo las muestras obtenidas 5 semanas antes de la preeclampsia no diferían significativamente de los controles (11.6 frente a 12.8 pg/ml), mientras que las concentraciones en los casos incluyendo las muestras ≤ 5 semanas antes del parto sí que lo hicieron (5.1 frente a 12.8 pg/ml, $p < 0.01$). A las 33-41 semanas las concentraciones de VEGF de casos > 5 o ≤ 5 semanas antes de la preeclampsia fueron mayores y menores que los controles respectivamente (11.2 pg/ml y 8.3 frente a 9.7 pg/ml), aunque estas diferencias no fueron significativas.

La Figura 7 representa sFlt-1 y PIGF a las 23-32 semanas (Figura 7A) y 33-41 semanas (Figura 7B) por estado de preeclampsia y gravedad. Los gráficos demuestran que los aumentos de sFlt-1 y las reducciones de PIGF antes del inicio de la preeclampsia estaban asociados con la gravedad de la afección, el momento de inicio y la presencia de un niño SGA. A las 23-32 semanas, los niveles de sFlt-1 y PIGF en los pacientes de casos con un niño SGA antes del inicio de la preeclampsia fueron significativamente mayores o menores, respectivamente, que las concentraciones correspondientes en las pacientes de control con un niño SGA. Además, en comparación con las pacientes de control con parto prematuro, las pacientes de casos con parto prematuro tuvieron un nivel de sFlt-1 mayor y un nivel de PIGF significativamente menor. Para determinar si las concentraciones de sFlt-1 o PIGF antes de los signos clínicos de la preeclampsia estaban relacionados con el riesgo de padecer esta afección, calculamos razones de probabilidades de padecer preeclampsia para cada cuartil de valores de control de sFlt-1 y PIGF, en comparación con el cuartil menor y mayor, respectivamente (Tabla 4). También examinamos el riesgo de padecer preeclampsia de los cuartiles extremos con respecto al resto de los cuartiles como se muestra a continuación. Para las muestras obtenidas en el segundo trimestre y principios del tercer trimestre, el cuartil menor de PIGF se asoció con un mayor riesgo de padecer preeclampsia antes de llegar a término (< 37 semanas de gestación) (P 7.4, IC del 95% 1.8 a 30.2 para las muestras de la semana 13-20; P 7.9, IC del 95% 2.9 a 21.5 para las muestras de la semana 21-32). Un nivel de PIGF en el cuartil menor, sin embargo, no fue un indicador significativo de preeclampsia a término (≥ 37 semanas). Para sFlt-1, solo se observaron conexiones con la preeclampsia cerca del inicio de la afección. Un nivel de sFlt-1 en el cuartil mayor entre las semanas 21 y 32 de gestación (pero no antes) predecía preeclampsia antes de llegar a término (P 5.1, IC del 95% 2.0 a 13.0), y un nivel en el cuartil mayor entre 33 y 41 semanas (pero no antes) predecía preeclampsia a término. (P 6.0, IC del 95% 2.9 a 12.5). Esto coincide con la Figura 5B, que muestra que la elevación de sFlt-1 ocurre en gran medida en el transcurso de 5 semanas a partir del inicio de la afección clínica. El cuartil menor de VEGF no fue indicador de la preeclampsia.

Tabla 4. Razones de Probabilidad (RP) para la Preeclampsia en las semanas <37 y ≥37 antes de la Aparición de Signos Clínicos por Cuartiles de sFlt-1 Total y PIGF Libre en Controles a las Semanas 13-20, 21-32 y 33-41 de Gestación

sFlt-1 (pg/ml)	Controles N		PE <37 Semanas		PE ≥37 Semanas		PIGF (pg/ml)		Controles		PE <37 Semanas		PE ≥37 Semanas	
	N	RP*	N	RP*	N	RP*	N	RP*	N	RP*	N	RP*	N	RP*
13-20 semanas														
<u>C4:>1047</u>	25	6	1.3 (0.4 – 5.0)	20	1.5 (0.6 – 3.7)	<u>C4:>307</u>	25	4	1.0 referente	4	1.0 referente	4	1.0 referente	
C3:>698 - 1047	25	8	2.2 (0.6 – 7.8)	23	1.9 (0.8 – 4.5)	C3:>160 – 307	25	2	0.6 (0.1 – 3.5)	22	5.6 (1.7 – 19.0)			
C2:>531 - 698	25	4	0.5 (0.1 – 2.3)	16	1.1 (0.4 – 2.7)	C2:>87 - 160	25	6	1.9 (0.4 – 8.2)	26	6.4 (1.9 – 22.1)			
C1:≤531	25	6	1.0 referente	16	1.0 referente	C1:≤87	25	12	9.6 (1.6 – 57.6)	23	6.7 (1.6 – 27.5)			
21-32 semanas														
<u>C4:>1131</u>	25	16	4.7 (1.3 – 16.6)	18	1.7 (0.7 – 4.4)	<u>C4:>1021</u>	25	1	1.0 referente	14	1.0 referente			
C3:>743- 1131	26	5	1.4 (0.3 – 6.0)	21	1.7 (0.7 – 4.2)	C3:>677 – 1021	26	1	1.1 (0.1 – 18.2)	19	1.2 (0.5 – 3.1)			
C2:>512 - 743	25	1	0.3 (0.0 – 2.8)	21	1.9 (0.8 – 4.7)	C2:>363 - 677	25	5	5.3 (0.6 – 49.3)	20	1.3 (0.5 – 3.2)			
C1:≤512	26	4	1.0 referente	14	1.0 referente	C1:≤363	26	19	19.6 (2.3 – 163.8)	21	1.2 (0.5 – 3.1)			
33-41 semanas														
<u>C4:>2191</u>	22			44	7.5 (2.6 – 21.8)	<u>C4:>948</u>	22			6	1.0 referente			
C3:>1633- 2191	22			12	1.7 (0.5 – 5.5)	C3:>377 – 948	22			18	2.7 (0.9 – 8.3)			
C2:>1287 - 1633	22			7	1.0 (0.3 – 3.3)	C2:>175 – 377	22			19	2.8 (0.9 – 8.5)			
C1:≤1287	23			8	1.0 referente	C1:≤175	23			28	4.1 (1.4 – 12.2)			

*Razones de probabilidad ajustadas según edad gestacional e índice de masa corporal (con IC del 95 %). RP con un IC del 95% >1.0 en negrita. Se obtuvieron muestras de los casos antes de los signos clínicos de la preeclampsia.

Estos resultados demuestran que los niveles de sFlt-1 empiezan a elevarse dramáticamente aproximadamente 5 semanas antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. Paralelo con el aumento en sFlt-1, los niveles de PIGF libre y los niveles de VEGF libre se reducen, lo que sugiere que la reducción en PIGF y VEGF puede deberse al menos parcialmente al antagonismo por sFlt-1 y no a una reducción en la producción placentaria de PIGF y VEGF.

5 Tres subgrupos de preeclampsia –preeclampsia grave, inicio precoz de la afección y niños SGA– tuvieron mayores concentraciones de sFlt-1 y menores concentraciones de PIGF a las 23-32 semanas y a las 33-41 semanas que los controles o mujeres con preeclampsia leve. También se ha demostrado una reducción pequeña pero significativa en el nivel de PIGF libre de aparición temprana en el segundo trimestre entre las mujeres propensas a desarrollar preeclampsia. Estos resultados demuestran que un aumento en los niveles de PIGF puede ser un agente útil para predecir una preeclampsia de inicio precoz.

10 En la presente invención se describe por primera vez el modelo gestacional de sFlt-1 en el embarazo normal, observando niveles relativamente estables a lo largo de la gestación seguidos de un aumento constante con inicio a las 33-36 semanas. Esta elevación corresponde a la última reducción gestacional en PIGF observada en el embarazo normal por otros autores (Torry y colaboradores, *J. Soc. Gynecol. Invest.* 10:178-188, 1998; Taylor y colaboradores, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188:177-182, 2003) y en los resultados descritos en este documento. La asociación temporal, junto con el conocimiento de que sFlt-1 interfiere con la medición ELISA de PIGF (Maynard y colaboradores, *supra*) sugiere que la reducción de los niveles de PIGF libre durante la última parte de la gestación puede deberse a la elevación de los niveles de sFlt-1. Durante el primer y segundo trimestre, cuando se necesita el crecimiento placentario para poder responder a las crecientes demandas fetales, las concentraciones de PIGF son elevadas y las concentraciones de sFlt-1 son bajas, creando un estado relativamente proangiogénico. Más adelante en la gestación, cuando puede ser necesario templar y detener el crecimiento vascular placentario, se produce una elevación en el sFlt-1 antiangiogénico y una reducción resultante en PIGF. En mujeres con preeclampsia, la elevación de sFlt-1 empieza antes en la gestación, aproximadamente 5 semanas antes del inicio de los síntomas, a aproximadamente 29-32 semanas de gestación en promedio. De esta manera, en la preeclampsia, los “frenos” antiangiogénicos pueden aplicarse demasiado pronto y con demasiada fuerza, dando como resultado una exageración de un proceso fisiológico normal que detiene el crecimiento placentario. Parece claro que los cambios placentarios patológicos que caracterizan a la preeclampsia se producen pronto en la gestación (10-14 semanas), antes de la elevación dramática en sFlt-1. La propia isquemia placentaria resultante puede potenciar la producción de sFlt-1, activando finalmente un aumento de sFlt-1.

15 Además de las grandes diferencias observadas en las 5 semanas previas al desarrollo de los síntomas clínicos, las mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia tenían reducciones pequeñas pero estadísticamente significativas en los niveles de PIGF libre ya a las 13-16 semanas de gestación. Esta reducción en PIGF generalmente no iba acompañada de un aumento recíproco en los niveles de sFlt-1. Sin embargo, hubo una tendencia de niveles de sFlt-1 ligeramente mayores en los casos durante el primer trimestre aunque no fue estadísticamente significativa (por ejemplo, en la ventana 17-20 semanas, los niveles medios de sFlt-1 en los casos fueron de 865.77 pg/ml frente a 795.25 en los controles). Esta reducción en los niveles de PIGF pronto en la gestación podrían reflejar una menor producción placentaria de PIGF en embarazos comprometidos por afecciones tales como preeclampsia o SGA. De manera importante, en pacientes con preeclampsia complicada por SGA, se encontró un aumento estadísticamente significativo tanto en la elevación de sFlt-1 como en la reducción de PIGF antes de la presentación de la afección. También es posible que no haya ningún cambio en la producción placentaria de PIGF en pacientes preeclámplicas y que la elevación de los niveles de sFlt-1 locales en la placenta puedan contribuir a la reducción de los niveles de PIGF libre circulantes. Esto se confirma por el hallazgo de que el PIGF placentario, medido por inmuno-histoquímica, no se altera en la preeclampsia (Zhou y colaboradores, *Am J. Pathol.* 160: 1405-1423. 2002).

20 En resumen, hemos demostrado que sFlt-1 empieza a elevarse en la preeclampsia al menos 5 semanas antes del inicio de la afección clínica que va acompañado por una reducción en los niveles de PIGF libre y VEGF libre circulantes. La reducción de PIGF durante el primer trimestre puede servir para predecir la preeclampsia y la elevación de sFlt-1 puede servir para predecir la proximidad de la afección clínica. Estos datos junto con el trabajo en animales descrito anteriormente que demuestra que sFlt-1 solo induce síntomas parecidos a los de la preeclampsia en roedores sugieren un papel etiológico probable del sFlt-1 en la patogénesis de la preeclampsia. Nuestros datos limitados sobre niños SGA y parto prematuro en controles, en comparación con los pacientes del grupo de casos, sugiere que las mayores alteraciones en los niveles de proteínas observadas en los embarazos preeclámplicos con un niño SGA son más sustanciales que la diferencia debida únicamente a la restricción del crecimiento uterino o parto prematuro en ausencia de preeclampsia.

Diagnóstico

25 La presente invención caracteriza ensayos de diagnóstico para la detección de preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones. Se miden los niveles de PIGF Y sFlt-1 libres en una muestra de un sujeto y se usan como indicador de preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones.

30 Se usa un sistema de medición para determinar si una relación entre los niveles de al menos dos de las proteínas es indicativa de preeclampsia o eclampsia. Pueden usarse métodos convencionales para medir los niveles de polipéptido PIGF o sFlt-1 en suero de muestra y/u orina. Tales métodos incluyen inmuno-ensayo, ELISA, “ensayos sándwich”, transferencia Western usando anticuerpos dirigidos a VEGF, PIGF o sFlt-1, ensayos de inmuno-difusión,

- ensayos de aglutinación, inmuno-ensayos fluorescentes, inmuno-ensayos de proteína A o G y ensayos de inmunoelectroforesis y técnicas de inmuno-ensayo enzimático cuantitativo tales como las descritas en Ong y colaboradores (*Obstet. Gynecol.* 98:608-611, 2001) y Su y colaboradores (*Obstet. Gynecol.*, 97:898-904, 2001). Los ensayos ELISA son el método preferido para medir los niveles de PIGF o sFlt-1. Se prefiere particularmente, por su
- 5 detección simple y fácil, así como por su naturaleza cuantitativa, el ensayo de anticuerpo doble o sándwich, del cual existen una serie de variaciones, todas las cuales quedan englobadas en la presente invención. Por ejemplo, en un ensayo sándwich habitual, se inmoviliza un anticuerpo no marcado que reconoce el antígeno (es decir, polipéptido PIGF o sFlt-1) sobre una fase sólida, por ejemplo, una placa de microvaloración, y se añade la muestra que se ha de
- 10 evaluar. Después de un periodo de incubación determinado para permitir la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, se añade un segundo anticuerpo, marcado con una molécula indicadora capaz de inducir una señal detectable, y se sigue incubando durante un tiempo suficiente que permita la unión con el antígeno en un sitio diferente, lo cual da como resultado la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. La presencia del antígeno se determina observando una señal, la cual se puede cuantificar por comparación con muestras de control que contienen cantidades conocidas de antígeno.
- 15 Los niveles en suero de sFlt-1 elevados se consideran un indicador positivo de preeclampsia. Este valor de sFlt-1 puede ser preferentemente de 2 ng/ml o superior. Además, cualquier alteración detectable en los niveles de sFlt-1 o PIGF con respecto a los niveles normales es indicativa de eclampsia, preeclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones. En otras formas de realización preferidas, el índice de masa corporal (IMC) y la edad gestacional del feto también se miden e incluyen en los parámetros de diagnóstico.
- 20 Un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones mostrará un aumento en la expresión de un polipéptido sFlt-1. El polipéptido sFlt-1 puede incluir sFlt-1 de longitud completa, productos de degradación, isoformas de sFlt-1 empalmadas de forma alternativa, productos de escisión enzimática de sFlt-1 y similares. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido sFlt-1 puede usarse para diagnosticar la preeclampsia o eclampsia o para identificar un sujeto con riesgo de desarrollar tales afecciones. Se conocen
- 25 diversos protocolos para medir una alteración en la expresión de tales polipéptidos, incluyendo métodos inmunológicos (tales como ELISA y RIA) y proporcionan una base para diagnosticar la preeclampsia o eclampsia o un riesgo de desarrollar tales afecciones. De nuevo, un aumento en el nivel del polipéptido sFlt-1 es diagnóstico de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones.
- 30 En una forma de realización, el nivel de polipéptido o sFlt-1 o PIGF se mide al menos en dos tiempos diferentes y una alteración en los niveles en comparación con los niveles de referencia normales a lo largo del tiempo se usa como indicador de preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones.
- En otra forma de realización, el nivel de polipéptido sFlt-1 o PIGF se compara con el nivel en una muestra de referencia.
- 35 En una forma de realización, se recoge una muestra de un fluido corporal del sujeto (por ejemplo, suero u orina) en la primera parte del embarazo antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. Preferiblemente, el ensayo se realiza entre las semanas 21-32 de gestación o durante el tercer trimestre, por ejemplo a las 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39 o 40 semanas. Es preferible medir los niveles de sFlt-1 o PIGF dos veces durante este periodo de tiempo. Para el diagnóstico de la preeclampsia o eclampsia posparto, pueden realizarse los ensayos para sFlt-1 o PIGF después del parto.
- 40 En un ejemplo particular, pueden recogerse muestras de sangre en serie durante el embarazo y pueden determinarse los niveles de sFlt-1 soluble por ELISA. En un estudio usando esta técnica, el ARNm unido de manera alternativa que codifica sFlt-1 tiene una alta expresión por células de trofoblasto y la proteína era fácilmente detectable en el plasma de mujeres embarazadas. Se observó que los niveles de sFlt-1 aumentaban
- 45 aproximadamente 3 veces entre 20 y 36 semanas de gestación. Se observó que los niveles eran significativamente mayores en mujeres con alto riesgo que posteriormente desarrollaron preeclampsia (Charnock-Jones y colaboradores, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10 (2): 230, 2003).
- En una forma de realización preferida, los niveles del polipéptido PIGF se miden en una muestra de fluido corporal, preferiblemente orina, y se utilizan como un indicador de diagnóstico de preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollarlas. Las medidas de los niveles de polipéptido PIGF en la orina también se pueden utilizar como una
- 50 evaluación inicial del riesgo potencial de sufrir preeclampsia o eclampsia y, cuando se determine que una mujer presenta un factor "de riesgo" según las medidas de PIGF, esta se puede someter a continuación a ensayos de diagnóstico adicionales tales como los que se describen en la presente o se conocen en la técnica. En un ejemplo, una mujer a la que se ha diagnosticado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia o eclampsia mediante la medición del polipéptido PIGF en una muestra de orina se monitoriza mediante el análisis en suero de los niveles de
- 55 PIGF y sFlt-1 según se ha descrito anteriormente.
- Una mujer para la cual se ha identificado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia o eclampsia mediante análisis de PIGF en orina se puede monitorizar regularmente antes del embarazo, durante el embarazo (p. ej., cada mes, cada tres semanas, cada dos semanas, una vez a la semana, una vez cada tres días, una vez cada dos días o una vez al día) o después del embarazo.

La forma libre de PIGF tiene un peso molecular medio de aproximadamente 30 kDa y es lo suficientemente pequeña para ser filtrada por el riñón y eliminada a través de la orina. El PIGF, cuando está complejado con sFlt-1, tiene un peso molecular mucho mayor y, por consiguiente, no se eliminará a través de la orina. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, los inventores han descubierto que durante la preeclampsia, cuando aumentan los niveles de sFlt-1, el sFlt-1 puede complejar a PIGF, de este modo se reducen los niveles de PIGF libre que se eliminan a través de la orina. Como resultado, los niveles de PIGF libre en el análisis de orina se pueden utilizar para diagnosticar preeclampsia o eclampsia o un paciente que corre el riesgo de sufrirlas. Con el fin de detectar PIGF libre, se prefiere utilizar en estos ensayos un anticuerpo que reconozca específicamente el PIGF libre. Un anticuerpo de este tipo puede reconocer, por ejemplo, el dominio de unión a sFlt-1 de PIGF. Los ejemplos de un anticuerpo específico de este tipo incluyen el anticuerpo de captura utilizado en el kit ELISA para PIGF humano (n.º de catálogo DGG00, R&D Systems, Mineápolis, MN) y el factor de crecimiento antiplacentario monoclonal (clon 3720 3.111, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Estos anticuerpos reconocen secuencias específicas en la región N-terminal de la proteína PIGF humana. La región de unión de sFlt-1 a PIGF se encuentra entre los aminoácidos 39-105 de la proteína PIGF, donde la longitud total de PIGF varía entre 149 y 221 aminoácidos, dependiendo de la isoforma de PIGF. Otros anticuerpos preferidos incluyen cualquier anticuerpo que reconozca la región N-terminal (preferiblemente entre los aminoácidos 39-105 de PIGF) y que se unirá específicamente a PIGF libre y no a PIGF unido a sFlt-1. Los anticuerpos dirigidos al extremo C-terminal no tendrán esta propiedad.

Como con cualquiera de los ensayos de diagnóstico de la invención, los niveles de PIGF en una muestra de un sujeto se pueden comparar con una muestra de referencia para determinar los niveles relativos. La muestra de referencia puede ser una muestra de orina de un paciente que sufra preeclampsia (generalmente, que tenga un nivel de PIGF libre inferior a 400 pg/ml, preferiblemente inferior a 200 pg/ml) o de una muestra de orina normal (que tenga una concentración de PIGF comprendida entre 200 pg/ml y 800 pg/ml), dependiendo del uso deseado del ensayo de diagnóstico. Los niveles de PIGF también se pueden comparar con un valor de referencia o estándar para determinar los niveles absolutos. El valor de referencia o estándar se puede determinar utilizando una curva estándar establecida basándose en formas recombinantes o purificadas (p. ej., con una pureza superior a un 80%, 90%, 95%, 99% o 100%) de PIGF para la comparación. Un valor de PIGF inferior a 400 pg/ml, preferiblemente inferior a 200 pg/ml y aún más preferiblemente inferior a 100 pg/ml o un valor de PIGF/creatinina inferior a 200 pg/mg de creatinina y preferiblemente inferior a 100 pg/mg de creatinina se considera un indicador de diagnóstico para preeclampsia o eclampsia o un paciente que corre el riesgo de sufrirlas. Para las curvas estándar, se puede utilizar un nivel de PIGF comprendido entre 10 pg/ml y 1 ng/ml. Otros ejemplos de proteínas recombinantes que se pueden utilizar para generar las curvas estándar incluyen los péptidos específicos que engloban el extremo aminoterminal de PIGF, preferiblemente los aminoácidos 39-105 de la proteína PIGF (la región de PIGF que se une a sFlt-1). Como alternativa, también se puede utilizar un heterodímero de PIGF/VEGF recombinante (se puede adquirir de proveedores comerciales con el n.º de catálogo 297-VP, R&D Systems, MN).

Los ensayos ELISA son el método preferido para medir los niveles de PIGF libre. Se prefiere particularmente, por su detección simple y fácil, así como por su naturaleza cuantitativa, el ensayo ELISA de anticuerpo doble o sándwich, del cual existen una serie de variaciones, todas las cuales quedan englobadas en la presente invención. Por ejemplo, en un ensayo sándwich habitual, se inmoviliza un anticuerpo no marcado que reconoce el polipéptido PIGF sobre una fase sólida, por ejemplo, una placa de microvaloración, y se añade la muestra que se ha de evaluar. Después de un periodo de incubación determinado para permitir la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, se añade un segundo anticuerpo, marcado con una molécula indicadora capaz de inducir una señal detectable, y se sigue incubando durante un tiempo suficiente que permita la unión con el antígeno en un sitio diferente, lo cual da como resultado la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. La presencia del antígeno se determina observando una señal, la cual se puede cuantificar por comparación con muestras de control que contienen cantidades conocidas de antígeno.

En un ejemplo de ELISA sándwich cuantitativo, se recubre previamente un soporte sólido (p. ej., una placa de microvaloración o una membrana) con un agente de unión anti-PIGF (p. ej., un anticuerpo primario). Se añaden los estándares o las muestras al sustrato y el PIGF, si está presente, se unirá al anticuerpo. A continuación, se añade un preparado estandarizado de anticuerpo conjugado con una enzima que también reconoce el PIGF para formar un "sándwich" con el PIGF que ahora se encuentra inmovilizado sobre la placa. Se añade el sustrato y se deja que la enzima y el sustrato reaccionen durante un periodo de incubación corto. Se finaliza la reacción entre la enzima y el sustrato y se mide el cambio mediante métodos conocidos en la técnica (p. ej., mediante inspección visual, utilizando un espectrofotómetro o midiendo la quimioluminiscencia). Un ensayo de este tipo se puede utilizar para determinar el nivel relativo de PIGF (p. ej., en comparación con el nivel en una muestra de referencia, estándar o nivel) o para determinar la concentración absoluta de PIGF. Si se desea, se puede determinar la concentración de PIGF utilizando un conjunto de estándares de calibrado de PIGF purificado con diferentes concentraciones. Los estándares de calibrado se evalúan a la vez que la muestra y se utilizan para producir una curva estándar que se mide, por ejemplo, como la densidad óptica en función de la concentración de PIGF. A continuación, se determina la concentración de PIGF en la muestra comparando, por ejemplo, la densidad óptica de las muestras con la curva estándar. La concentración de PIGF durante un embarazo normal en la mitad y el final del embarazo variará entre 200 y 800 pg/ml, dependiendo de la edad gestacional de la madre. Cualquier valor de PIGF en orina inferior a 400 pg/ml, preferiblemente inferior a 200 pg/ml o un valor de PIGF en orina inferior a 200 pg/mg de creatinina será un

diagnóstico de preeclampsia. En general, las curvas estándares del kit ELISA incluirán PIGF purificado o recombinante con concentraciones que variarán desde 10 pg/ml hasta 1 ng/ml de PIGF.

5 En otro ejemplo, un ensayo para detectar PIGF en una muestra de orina incluye una membrana que tiene inmovilizado un agente de unión a PIGF, el cual está marcado de forma que se pueda detectar y de un modo que permita diferenciar entre el PIGF cuando está unido a PIGF libre y cuando no está unido a PIGF libre. Los marcadores preferidos incluyen marcadores fluorescentes. La membrana se expone a la muestra durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión del agente de unión a PIGF con el PIGF libre presente en la muestra. A continuación, se mide el agente de unión a PIGF marcado unido al PIGF libre. Un ensayo de este tipo se puede utilizar para determinar el nivel relativo de PIGF (p. ej., en comparación con el nivel de una muestra de referencia o estándar o nivel) o para determinar la concentración absoluta de PIGF según se ha descrito anteriormente. Los ensayos preferidos para medir la unión incluyen los inmunoensayos de fluorescencia.

10 En otro ejemplo, un ensayo para detectar PIGF en una muestra de orina incluye una membrana que tiene un agente de unión a PIGF (agente primario) marcado (p. ej., para una detección colorimétrica) deshidratado y un agente anti-unión a PIGF inmovilizado (agente secundario). La membrana se expone a la muestra. La muestra rehidrata el agente de unión a PIGF marcado y, si hay PIGF presente en la muestra, se unirá al agente de unión a PIGF. El complejo de agente primario-PIGF descenderá por la membrana siguiendo un movimiento capilar e interactuará con el agente secundario inmovilizado. Esta interacción producirá una línea visible desde el marcador colorimétrico en la posición en la que se inmoviliza el agente secundario.

15 En otro ejemplo, un ensayo para detectar PIGF en una muestra de orina incluye una membrana que tiene un agente de unión a PIGF (agente primario) marcado (p. ej., para una detección colorimétrica) deshidratado y un agente anti-unión a PIGF inmovilizado (agente secundario). La membrana también incluye PIGF purificado con una concentración umbral también inmovilizado en la membrana. En este ejemplo, la membrana se expone a la muestra de orina. La muestra rehidrata el agente primario marcado y, si hay PIGF presente en la muestra con una concentración superior a la concentración umbral, se unirá con el agente de unión a PIGF. El complejo de PIGF-agente primario marcado descenderá por la membrana siguiendo un movimiento capilar. Debido a que el agente primario ya está unido al PIGF de la muestra, no se unirá al PIGF purificado inmovilizado y no aparecerá ninguna línea visible en esta posición de "prueba". El complejo de PIGF-agente primario continuará descendiendo por la membrana e interactuará con el agente secundario inmovilizado. Esta interacción producirá una línea visible desde el marcador colorimétrico en la posición de "control" en la cual el agente anti-unión a PIGF está inmovilizado. En este ejemplo, solo aparecerá una línea visible e indicará una concentración de PIGF superior a la concentración umbral. Si la concentración de PIGF es inferior a la concentración umbral, el agente primario marcado se unirá al PIGF inmovilizado y aparecerá una línea visible en esta posición de "prueba", así como también en la posición de "control". El ensayo de prueba también puede incluir múltiples líneas de prueba con el objetivo de detectar varias concentraciones de PIGF en la muestra. Un ensayo graduado de este tipo se describe en la Patente de EE. UU. N.º 6,660,534.

20 En otro ejemplo, se utiliza un ensayo similar basado en una membrana, pero se basa en métodos ELISA sándwich estándares. En este ejemplo, la membrana incluye una zona de reacción que tiene un agente de unión a PIGF primario inmovilizado conjugado con una enzima; una zona de prueba que tiene otro agente de unión PIGF inmovilizado que se une a una región de PIGF que no se ha unido al primer agente de unión a PIGF, y una zona de control que tiene una sustancia inmovilizada que reconoce el agente de unión a PIGF primario. En la zona de prueba y la zona de control se incluye un sustrato detectable para la enzima conjugada al primer agente de unión a PIGF inmovilizado. La membrana se expone a la muestra y la muestra se desplaza hacia la zona de reacción por acción capilar. Si hay PIGF presente en la muestra, se une al primer agente de unión a PIGF inmovilizado conjugado con una enzima y forma un complejo que se desplaza a continuación por flujo capilar hacia la zona de prueba. El complejo de PIGF-agente de unión a PIGF inmovilizado conjugado con una enzima se une a continuación con el segundo agente de unión a PIGF y forma una línea visible en la posición del segundo agente de unión a PIGF inmovilizado (la zona de "prueba"). El primer agente de unión a PIGF remanente se desplaza por flujo capilar y se unirá a la sustancia inmovilizada que reconoce o se une al primer agente de unión y producirá una línea visible en esta posición (la zona de "control"). Si no hay PIGF presente en la muestra, solo aparecerá la segunda línea en la zona de control. En realizaciones preferidas, el primer y el segundo agente de unión a PIGF son anticuerpos y el agente que reconoce o se une al primer agente de unión es un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina que reconoce específicamente la inmunoglobulina del primer anticuerpo. La intensidad de la línea en la zona de prueba se puede comparar con la de los ensayos que utilizan una cantidad estándar de proteína PIGF purificada para determinar si la muestra contiene una concentración de PIGF superior o inferior a una concentración umbral.

25 En cualquiera de los ensayos descritos en la presente, se puede utilizar suero de mujeres embarazadas normales como un control adicional y la actividad de PIGF se puede medir y cuantificar como un porcentaje de la actividad de PIGF medida en el suero de mujeres embarazadas normales.

30 La membrana puede adoptar un formato de tipo tira reactiva estándar o un formato de flujo lateral. El ensayo de tipo tira reactiva es conocido en la técnica para ensayos de este tipo, por ejemplo, el test de embarazo (en este caso se miden los niveles hormonales) o el análisis de orina para detectar creatinina o albúmina en la diagnosis de afección renal. En la patente de EE. UU. 6,660,534 se describen varios formatos de ensayos de tipo tira reactiva.

Cualquiera de los ensayos de detección de PIGF anteriores se puede utilizar solo o combinado con ensayos de diagnóstico adicionales descritos en la presente o en la técnica. En una realización preferida, el ensayo de diagnóstico de PIGF se utiliza como un cribado inicial, seguido de análisis para medir los niveles de PIGF y sFlt-1 en suero según se describe en la presente. De este modo, los pacientes con un factor “de riesgo” se pueden identificar y monitorizar cuidadosamente o analizar de forma adicional para obtener una precisión del diagnóstico incluso mayor.

En las realizaciones preferidas de cualquiera de los ensayos de diagnóstico basados en PIGF descritos anteriormente, el agente de unión a PIGF es preferentemente un anticuerpo primario que reconoce PIGF o una proteína o péptido que interacciona con PIGF. El agente secundario anti-unión a PIGF es preferentemente un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario o una proteína que se une al anticuerpo primario (p. ej., proteína A o proteína G) o un anticuerpo que se une específicamente al péptido que interacciona con PIGF. En realizaciones en las que el agente de unión a PIGF está marcado con una enzima, la enzima utilizada cataliza preferentemente una reacción colorimétrica que se puede detectar mediante una inspección visual y/o que se puede medir por espectrofotometría. Los ejemplos no limitantes de combinaciones de enzima/sustrato son peroxidasa de rábano picante/TMB, β -galactosidasa/XGAL y fosfatasa alcalina/1,2-dioxetano. Para las realizaciones que incluyen un agente de unión a PIGF marcado, los marcadores preferidos incluyen marcadores colorimétricos (p. ej., oro coloidal), quimioluminiscentes o fluorescentes.

Los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden usarse individualmente o en combinación con cualquier otro método de diagnóstico descrito en este documento para un diagnóstico más preciso de la presencia, gravedad o tiempo estimado del inicio de preeclampsia o eclampsia. Además, los métodos de diagnóstico descritos en este documento pueden usarse en combinación con cualquier otro método de diagnóstico útil para el diagnóstico preciso de la presencia, gravedad o tiempo estimado del inicio de preeclampsia o eclampsia.

Los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento también pueden usarse para controlar y tratar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En un ejemplo, si se determina que un sujeto tiene un nivel de proteína sFlt-1 en suero de 10 ng/ml y un nivel de PIGF libre en suero de 100 pg/ml, entonces pueden administrarse VEGF hasta que el nivel de PIGF en suero alcance aproximadamente 400 pg/ml. En esta forma de realización, los niveles de sFlt-1 y PIGF se miden repetidamente como un método no solo para diagnosticar la afección, sino también para controlar el tratamiento y el manejo de la preeclampsia y la eclampsia. Tal y como se describe anteriormente, los niveles de PIGF en orina de embarazos normales varían entre 200 y 800 pg/ml o 200 y 800 pg/mg de creatinina después de 20 semanas de gestación. Un valor de PIGF inferior a 400 pg/ml, preferiblemente inferior a 200 pg/ml o 200 pg/mg de creatinina en una muestra de orina se considera un diagnóstico de preeclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia.

Preparación de Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor sFlt-1 pueden producirse por métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen el método inmunológico descrito por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975) y Campbell (“Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas” en Burdon y colaboradores, editores, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volumen 13, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, 1985), así como por el método de ADN recombinante descrito por Huse y colaboradores (Science, 246, 1275-1281, 1989).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadantes de células de hibridoma cultivadas o a partir de líquido ascítico inducido por inoculación intraperitoneal de células de hibridoma en ratones. La técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Eur. J. Immunol, 6, 511-519, 1976) se ha aplicado ampliamente para producir líneas de células híbridas que segregan altos niveles de anticuerpos monoclonales contra muchos antígenos específicos.

La ruta y programa de inmunización del animal huésped o de las células productoras de anticuerpos cultivadas del mismo, generalmente están de acuerdo con técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos. Normalmente, se usan ratones como modelo de ensayo; sin embargo, cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o células productoras de anticuerpos de los mismos, pueden manipularse de acuerdo con los procesos de esta invención para servir como base para la producción de líneas celulares híbridas de mamífero, incluyendo humanas.

Después de la inmunización, se fusionan células linfoides inmunes con células de mieloma para generar una línea celular híbrida que puede cultivarse y subcultivarse indefinidamente, para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales. Para los fines de esta invención, las células linfoides inmunes seleccionadas para la fusión son linfocitos y su progenie diferenciada normal, extraídos de tejido de ganglio linfático o de tejido de bazo de animales inmunizados. Se prefiere el uso de células de bazo, ya que ofrecen una fuente más concentrada y conveniente de células productoras de anticuerpos con respecto al sistema de ratón. Las células de mieloma proporcionan la base para una propagación continua del híbrido fusionado. Las células de mieloma son células tumorales derivadas de células plasmáticas. Pueden obtenerse líneas de células de mieloma murino, por ejemplo, a partir de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virginia, Estados Unidos). También se han descrito

líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano (Kozbor y colaboradores, J. Immunol., 133:3001-3005, 1984; Brodeur y colaboradores; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63, 1987).

5 Las líneas celulares híbridas pueden mantenerse *in vitro* en medio de cultivo celular. Una vez que se ha establecido la línea de células de hibridoma, puede mantenerse en una diversidad de medios nutricionalmente adecuados tales como el medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). Además, las líneas celulares híbridas pueden almacenarse y conservarse en cualquier número de formas convencionales, incluyendo congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido. Las líneas de células congeladas pueden revivirse y cultivarse indefinidamente con una síntesis y secreción reanudadas de anticuerpo monoclonal. El anticuerpo secretado se recupera del sobrenadante de cultivo de tejido por métodos convencionales tales como precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

El anticuerpo puede prepararse en cualquier mamífero, incluyendo ratones, ratas, conejos, cabras y seres humanos. El anticuerpo puede ser un miembro de una de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD o IgE y sus subclases, y preferiblemente es un anticuerpo IgG.

15 Aunque el animal preferido para producir anticuerpos monoclonales es el ratón, la invención no se limita a este; de hecho, pueden usarse anticuerpos humanos y puede resultar preferible. Tales anticuerpos pueden obtenerse usando hibridomas humanos (Cole y colaboradores, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss Inc., p 77-96, 1985). En la presente invención, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos por ajuste de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana (Morrison y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855, 1984; Neuberger y colaboradores, Nature 312, 604-608, 1984; Takeda y colaboradores, Nature 314, 452-454, 1985). Tales anticuerpos están dentro del alcance de esta invención y se describen más adelante.

25 Como alternativa distinta a la técnica de fusión de células, se usan células B inmortalizadas del virus de Epstein-Barr (EBV) para producir los anticuerpos monoclonales de la presente invención (Crawford D. y colaboradores, J. of Gen. Virol., 64:697-700, 1983; Kozbor y Roder, J. Immunol., 4:1275-1280, 1981; Kozbor y colaboradores, Methods in Enzymology, 121:120-140, 1986). En general, el procedimiento consiste en aislar el virus Epstein-Barr de una fuente adecuada, generalmente una línea de células infectadas, y exponer las células secretoras del anticuerpo diana a los sobrenadantes que contienen el virus. Las células se lavan y se cultivan en un medio de cultivo de células apropiado. Posteriormente, las células transformadas por el virus presentes en el cultivo celular pueden identificarse por la presencia del antígeno nuclear del virus Epstein-Barr y las células secretoras de anticuerpos transformadas pueden identificarse usando métodos convencionales conocidos en la materia. Dentro del alcance de la invención también se incluyen otros métodos para producir anticuerpos monoclonales tales como ADN recombinante.

Preparación de Inmunógenos de sFlt-1

35 El sFlt-1 puede usarse por sí mismo como un inmunógeno o puede unirse a una proteína de transporte o a otros objetos tales como perlas de sefarosa. El sFlt-1 puede purificarse a partir de células que se sabe que expresan la proteína endógena tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC; Kendall y colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Comm., 226:324-328, 1996). Además, pueden insertarse moléculas de ácido nucleico que codifican sFlt-1 o porciones de las mismas en vectores conocidos para la expresión en células huésped usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Las células huésped adecuadas para la expresión de sFlt-1 incluyen células de baculovirus (por ejemplo, células Sf9), células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*) y células de mamífero (por ejemplo, células NIH3T3).

45 Además, pueden sintetizarse péptidos y usarse como inmunógenos. Los métodos para fabricar anticuerpos contra péptidos son bien conocidos en la materia y generalmente requieren el acoplamiento del péptido con una molécula de transporte adecuada, tal como albúmina de suero. Los péptidos incluyen cualquier secuencia de aminoácidos que sea sustancialmente idéntica a cualquier parte de la secuencia de aminoácidos de sFlt-1 correspondiente al número de acceso del GenBank U01134. Los péptidos pueden ser de cualquier longitud, preferiblemente de 10 aminoácidos o más, más preferiblemente de 25 aminoácidos o más, y aún más preferiblemente de 40, 50, 60, 70, 80 o 100 aminoácidos o más. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos tienen una identidad de al menos un 60%, más preferiblemente de un 85% y aún más preferiblemente de un 95% con la secuencia de U01134. Los péptidos pueden obtenerse en el mercado o fabricarse usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, el método de fase sólida de Merrifield (Science, 232:341-347, 1985). El procedimiento puede usar sintetizadores disponibles en el mercado tales como la máquina de péptidos automática Bioearth 9500, consiguiéndose escisión de los aminoácidos bloqueados con fluoruro de hidrógeno, y purificándose los péptidos por HPLC preparativa usando un instrumento Waters Delta Prep 3000, en una columna de 15-20 µm Vydac C4 PrepPAK.

Equivalentes Funcionales de Anticuerpos

Los métodos de diagnóstico de la invención también pueden utilizar equivalentes funcionales de los anticuerpos descritos en esta memoria descriptiva. Los equivalentes funcionales incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de

los anticuerpos de la invención. Los equivalentes funcionales tienen características de unión comparables a las de los anticuerpos e incluyen, por ejemplo, anticuerpos quimerizados humanizados y monocatenarios así como sus fragmentos. Por ejemplo, en los siguientes documentos: publicación de PCT N.º WO 93/21319; solicitud de patente europea No.º 239 400; publicación de PCT N.º WO 89/09622; solicitud de patente europea N.º 338 745; solicitud de patente europea N.º 332 424; y patente de los EE.UU. N.º 4 816 567; se describen métodos para producir tales equivalentes funcionales.

Los anticuerpos quimerizados preferiblemente tienen regiones constantes derivadas sustancial o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables derivadas sustancial o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. Tales anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmento de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En la materia son bien conocidos los métodos para humanizar anticuerpos no humanos (como reseñas véanse Vaswani y Hamilton, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 81: 105-119, 1998 y Carter, *Nature Reviews Cancer*, 1:118-129, 2001). Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de importación, que se toman normalmente a partir de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos conocidos en la materia (Jones y colaboradores, *Nature*, 321: 522-525, 1986; Riechmann y colaboradores, *Nature*, 332:323-329, 1988; y Verhoeven y colaboradores, *Science*, 239:1534-1536, 1988), sustituyendo CDR de roedor u otras secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 4 816 567). En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedor (Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992).

Pueden encontrarse otros métodos para la preparación de anticuerpos humanizados en las patentes de los EE.UU. N.ºs 5 821 337 así como 6 054 297, y Carter, (*supra*) todos los cuales se incorporan en este documento como referencia. El anticuerpo humanizado se selecciona entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isótopo, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Cuando no se necesita la actividad citotóxica, tal como en la presente invención, el dominio constante preferiblemente es de la clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y está dentro de la experiencia habitual en la materia la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (Marks y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991 y Winter y colaboradores *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-455, 1994). Las técnicas de Cole y colaboradores y Boerner y colaboradores también son útiles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y colaboradores, *supra*; Boerner y colaboradores, *J. Immunol.*, 147:86-95, 1991).

Los mamíferos adecuados distintos del ser humano incluyen cualquier mamífero a partir del cual puedan fabricarse anticuerpos monoclonales. Los ejemplos de mamíferos distintos del ser humano incluyen, por ejemplo, un conejo, rata, ratón, caballo, cabra o primate; se prefiere un ratón.

Los equivalentes funcionales de anticuerpos también incluyen fragmentos de anticuerpos monocatenarios, también conocidos como anticuerpos monocatenarios (scFvs). Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios son polipéptidos recombinantes que normalmente se unen a antígenos o receptores; estos fragmentos contienen al menos un fragmento de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de anticuerpo (V_H) encadenado a al menos un fragmento de una secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo (V_L) con o sin uno o más enlazadores de interconexión. Tal enlazador puede ser un péptido flexible corto seleccionado para asegurar que se produce el plegamiento tridimensional apropiado de los dominios V_L y V_H una vez que se han asociado para mantener la especificidad de unión de la molécula diana del anticuerpo entero del que procede el fragmento de anticuerpo monocatenario. Generalmente, el extremo carboxilo de la secuencia V_L o V_H se une covalentemente por tal enlazador peptídico al extremo de aminoácido de una secuencia de V_L y V_H complementaria. Pueden generarse fragmentos de anticuerpo monocatenarios por clonación molecular, bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpo o técnicas similares. Estas proteínas pueden producirse en células eucariotas o células procariotas, incluyendo bacterias.

Los fragmentos de anticuerpo monocatenario contienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las regiones variables o CDR de los anticuerpos enteros descritos en esta memoria descriptiva, pero que carecen de algunos o todos los dominios constantes de esos anticuerpos. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión a antígenos, pero constituyen una porción principal de la estructura de anticuerpos enteros. Por lo tanto, los fragmentos de anticuerpo monocatenarios pueden solucionar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen parte o todo el dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo monocatenario tienden a estar libres de interacciones indeseadas entre moléculas biológicas y la región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica indeseada. Además, los fragmentos de anticuerpos monocatenarios

son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y, por lo tanto, pueden tener mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos enteros, permitiendo que los fragmentos de anticuerpo monocatenario se localicen y se unan a sitios de unión a antígeno diana de manera más eficaz. Además, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse a una escala relativamente grande en células procariotas, facilitando de esta manera su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpos monocatenarios hace que sea menos probable que provoquen una respuesta inmune en un receptor en comparación con los anticuerpos enteros.

Los equivalentes funcionales también incluyen fragmentos de anticuerpos que tienen las mismas características de unión o características de unión comparables a las del anticuerpo entero. Tales fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo contienen las seis CDR del anticuerpo entero, aunque también son funcionales los fragmentos que contienen menos que todas esas regiones tales como tres, cuatro o cinco CDR.

Además, los equivalentes funcionales pueden ser o pueden combinar miembros de cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, y sus subclases.

15 *Preparación de Equivalentes Funcionales de Anticuerpos*

Se preparan los equivalentes de anticuerpos por métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de anticuerpos enzimáticamente a partir de anticuerpos enteros. Preferiblemente, se preparan equivalentes de anticuerpos a partir de ADN que codifica tales equivalentes. El ADN que codifica fragmentos de anticuerpos puede prepararse por eliminación de todo excepto de la porción deseada del ADN que codifica el anticuerpo de longitud completa.

El ADN que codifica anticuerpos quimerizados puede prepararse por ADN recombinante que codifica sustancial o exclusivamente regiones constantes humanas y ADN que codifica regiones variables derivadas sustancial o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. Puede prepararse ADN que codifica anticuerpos humanizados por recombinación de ADN que codifica regiones constantes y regiones variables distintas de las CDR derivadas sustancial o exclusivamente de las correspondientes regiones de anticuerpo humanas y ADN que codifica CDR derivadas sustancial o exclusivamente de un mamífero distinto de un ser humano.

Las fuentes adecuadas de moléculas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen células, tales como hibridomas, que expresan el anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos pueden usarse por sí mismos como equivalentes de anticuerpo, o pueden recombinarse en equivalentes como se ha descrito anteriormente.

Las eliminaciones de ADN y recombinaciones descritas en esta sección pueden realizarse por métodos conocidos, tales como los descritos en las solicitudes de patente publicadas indicadas anteriormente.

Investigación y Selección de Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales se aíslan y purifican usando métodos convencionales conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden investigarse anticuerpos usando métodos convencionales conocidos en la materia tales como ELISA contra el antígeno peptídico sFlt-1 o análisis de transferencia Western. Se describen ejemplos no limitantes de tales técnicas en los Ejemplos II y III de la patente de los EE.UU. N.º 6 365 157.

El Control de los Sujetos

El estado de afección o tratamiento de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o propensión a desarrollar tal afección puede controlarse usando los métodos y composiciones de la invención. En una forma de realización, se controla la expresión de un polipéptido sFlt-1 y PlGF presentes en suero u orina. Tal control puede ser útil, por ejemplo, para evaluar la eficacia de un fármaco particular en un sujeto o para evaluar la evolución de la afección.

Otras Formas de Realización

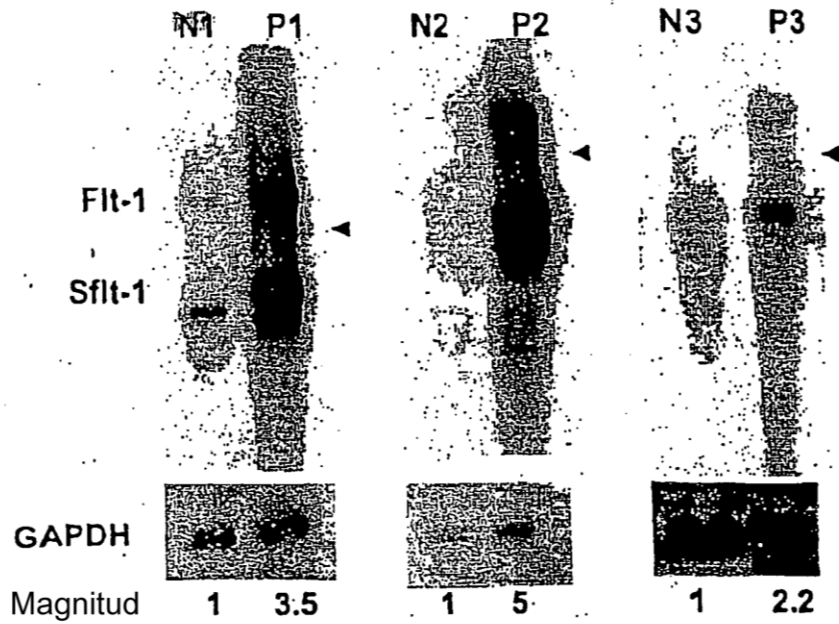
A partir de la descripción anterior, es evidente que pueden realizarse variaciones y modificaciones en la invención descrita en este documento para adaptarla a diversos usos y condiciones. Tales formas de realización también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

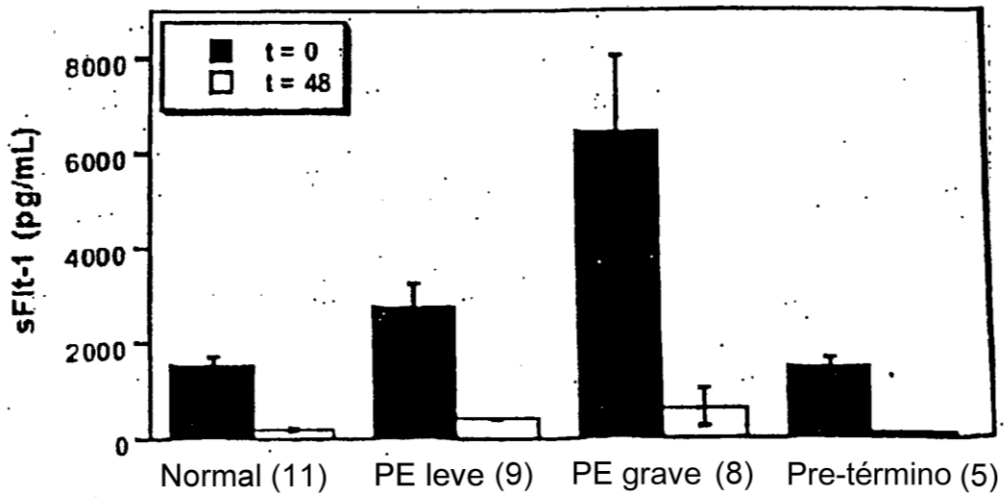
- 5 1. Un método para diagnosticar, en una persona embarazada, preeclampsia o eclampsia, o la propensión a desarrollarlas, comprendiendo dicho método medir el nivel del receptor Flt-1 soluble (sFlt-1) y el factor de crecimiento placentario libre (PIGF) en una muestra de suero de dicha persona embarazada y que también comprende calcular la relación entre dicho nivel de sFlt-1 y PIGF libre utilizando una medición, donde dicha medición es sFlt-1/PIGF, donde:
- (a) dicha preeclampsia o eclampsia es preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término;
- (b) dicha persona tiene un embarazo de 21-32 semanas o está en el tercer trimestre de embarazo; o
- 10 (c) dicho método comprende además medir el nivel de PIGF libre en una muestra de orina de dicha persona embarazada.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho valor de medición de sFlt-1/PIGF de dicha persona se compara con el valor de una referencia normal, y donde un aumento de dicho valor en dicha persona en comparación con dicho valor de dicha referencia normal arroja el diagnóstico para esa persona de sufrir preeclampsia o eclampsia, o bien preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término, o una propensión a desarrollar estas afecciones.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde una relación de sFlt-1/PIGF de al menos 5 arroja el diagnóstico para esa persona de sufrir preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho método comprende medir el nivel de PIGF libre en una muestra de orina de dicha persona embarazada.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha medición de PIGF libre de dicha muestra de orina se realiza antes que dicha medición de sFlt-1 y PIGF libre de dicha muestra de suero.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha preeclampsia es preeclampsia antes de llegar a término.
- 25 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicha persona tiene un embarazo de 21-32 semanas.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la persona se encuentra en el tercer trimestre de embarazo.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho PIGF es una isoforma de P1GF derivada de un empalme alternativo.
- 30 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho sFlt-1 es el nivel de sFlt-1 libre, unido o total.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho sFlt-1 es una isoforma de sFlt-1 derivada de un empalme alternativo.
- 35 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho nivel de sFlt-1 es el nivel de un subproducto polipeptídico de un polipéptido sFlt-1 que ha sido degradado o escindido enzimáticamente.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 9 o 10, donde dicha referencia es una muestra o nivel anterior de dicha persona.
- 40 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 6, 9 o 10, donde dicha referencia es una muestra tomada de una persona normal que está embarazada, pero que no tiene preeclampsia ni eclampsia ni es propensa a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5 o 6, donde dicha medición se realiza en dos o más ocasiones y una alteración en dicho valor de medición o dichos niveles de PIGF libre en orina entre mediciones es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- 45 16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha preeclampsia o eclampsia antes de llegar a término ocurre antes de la semana 37 de embarazo.

Figura 1

A



B



C

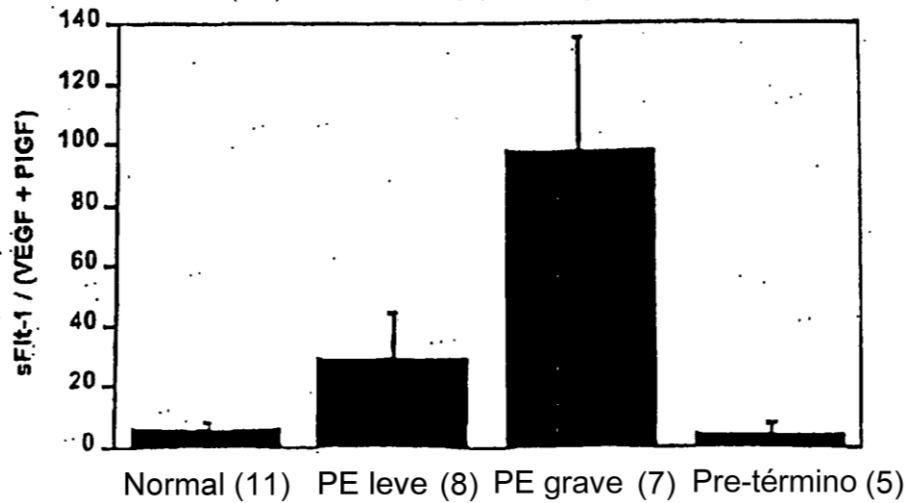


Figura 2

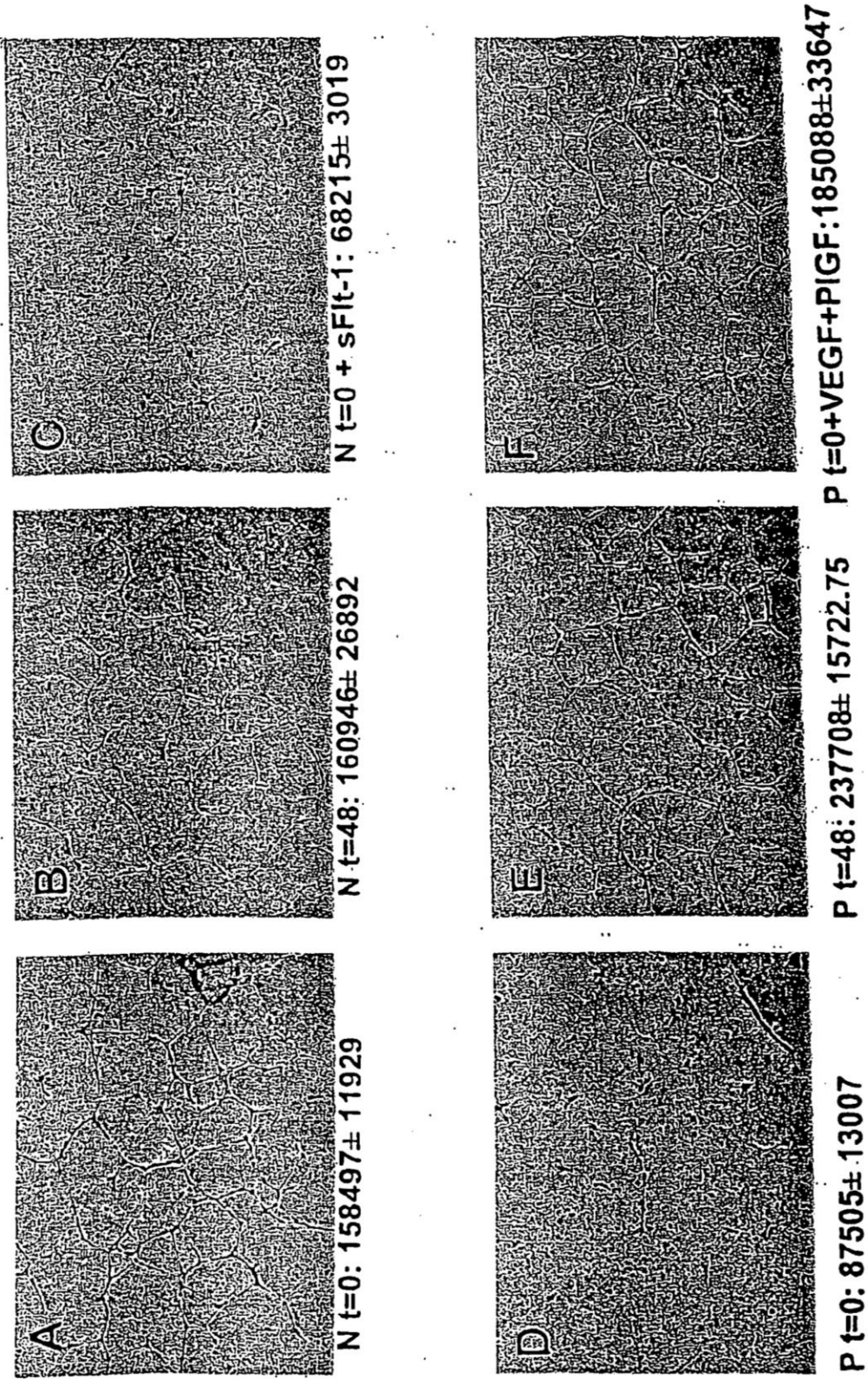


Figura 3

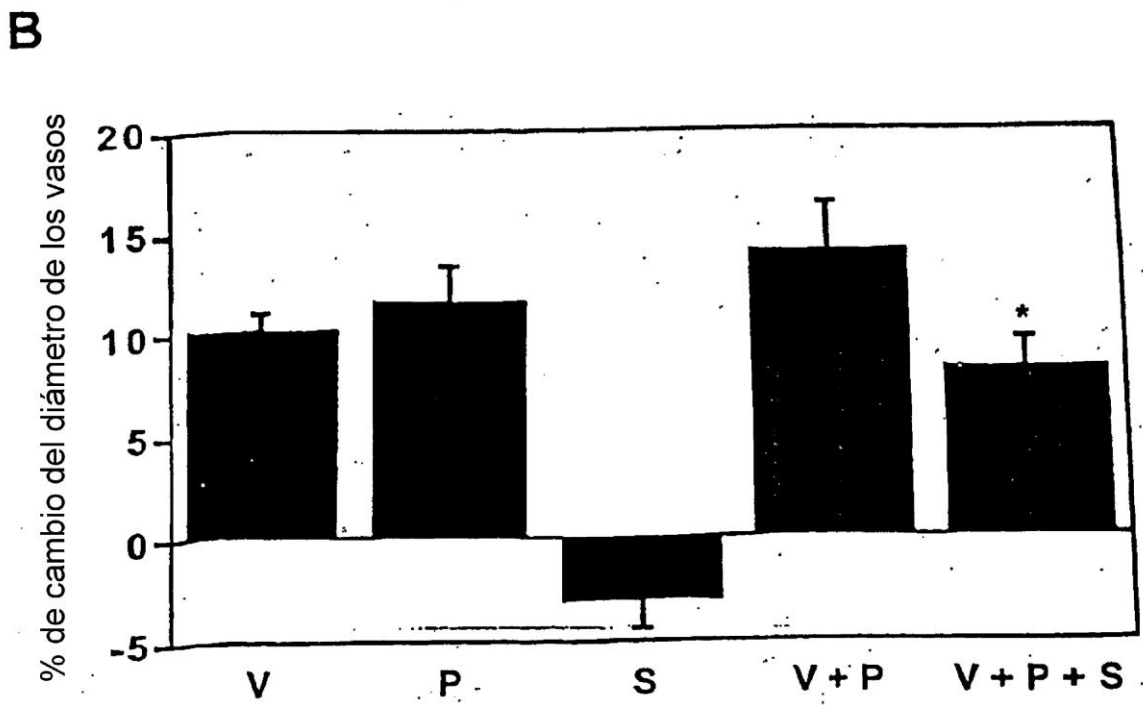
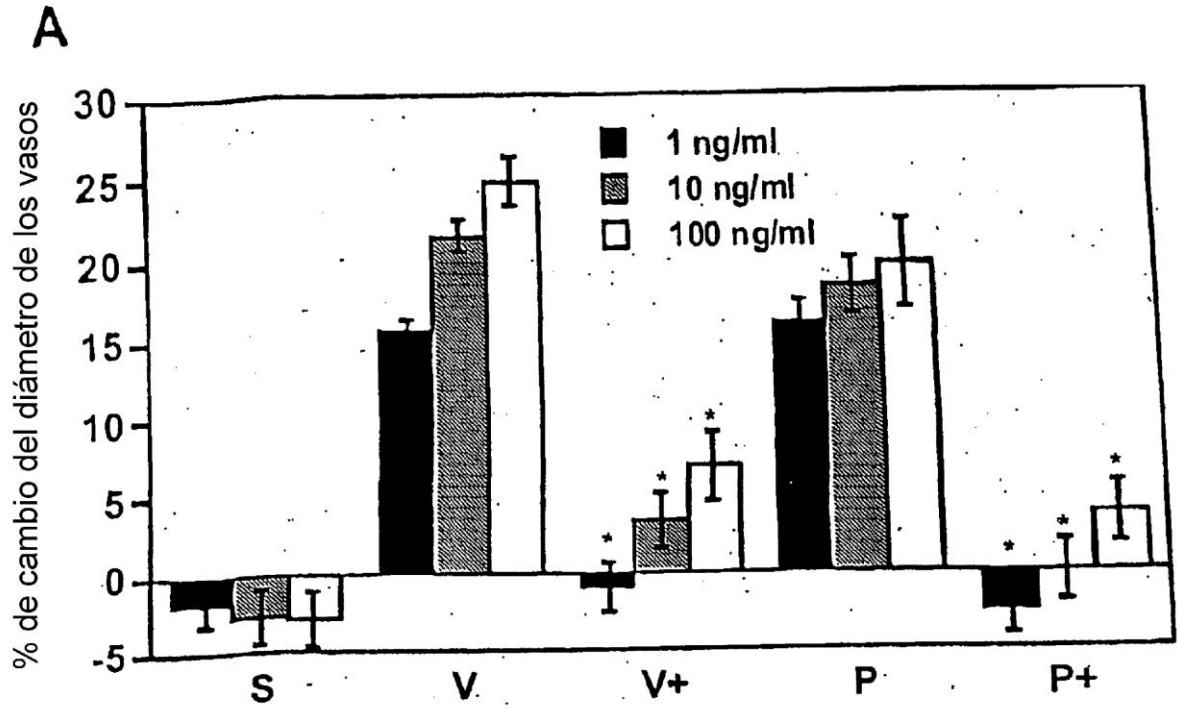


Figura 4A

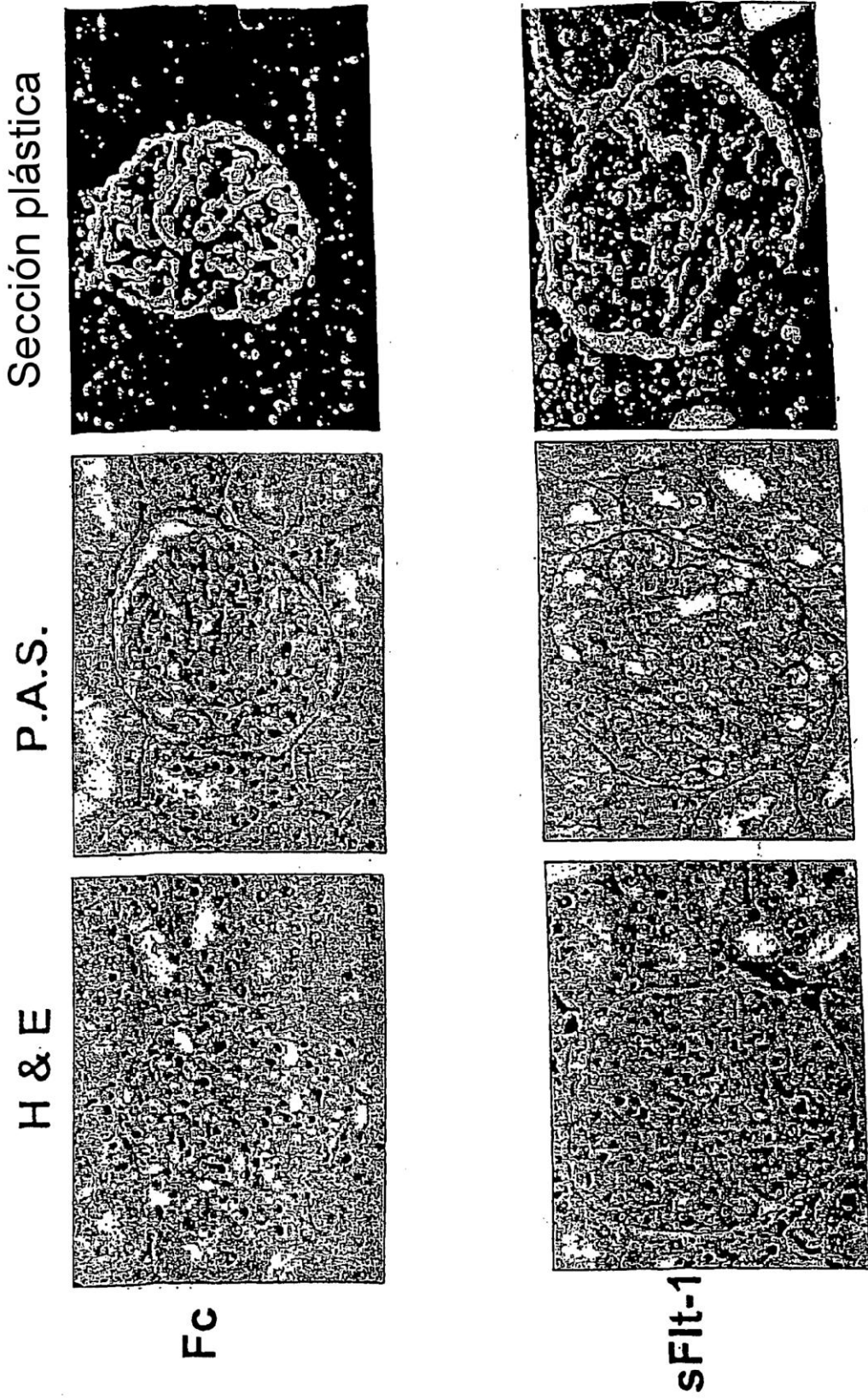


Figura 4B

E.M



Fc



sFIt-1

I.F. (Fibrina)

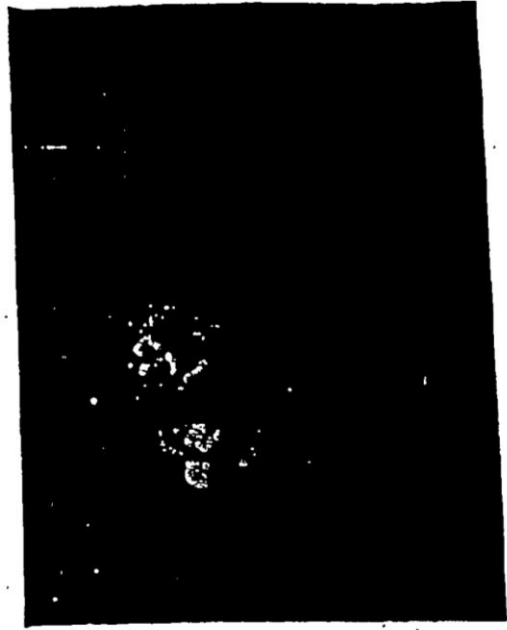


Figura 5A

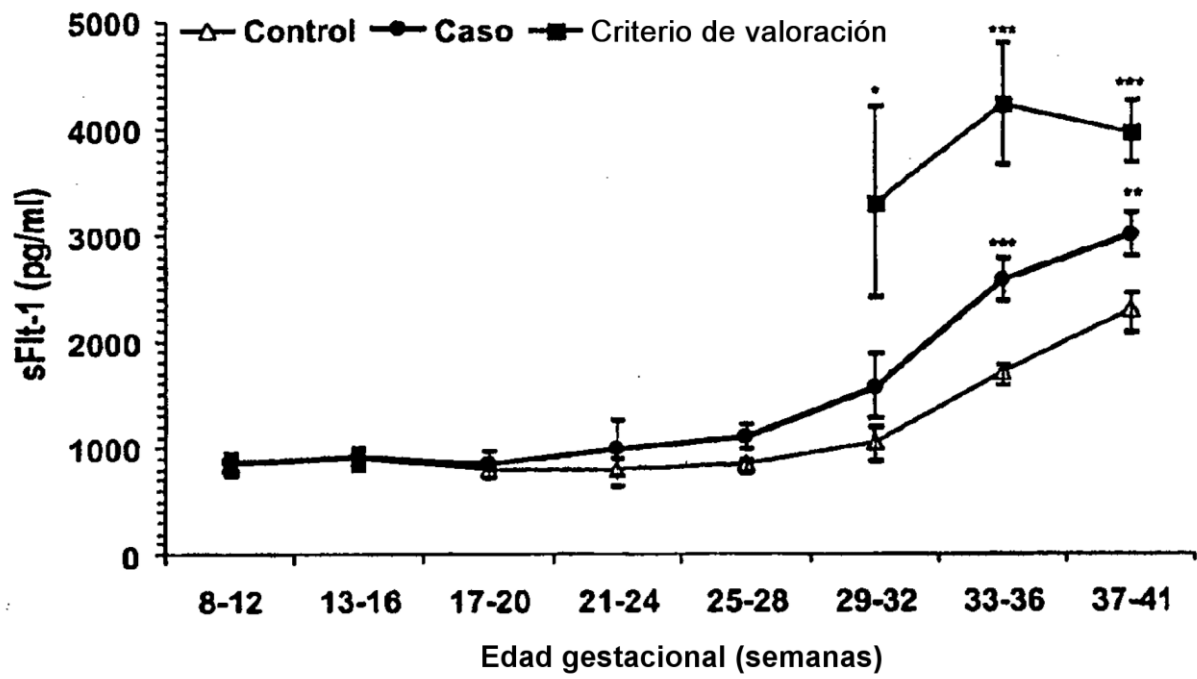


Figura 5B

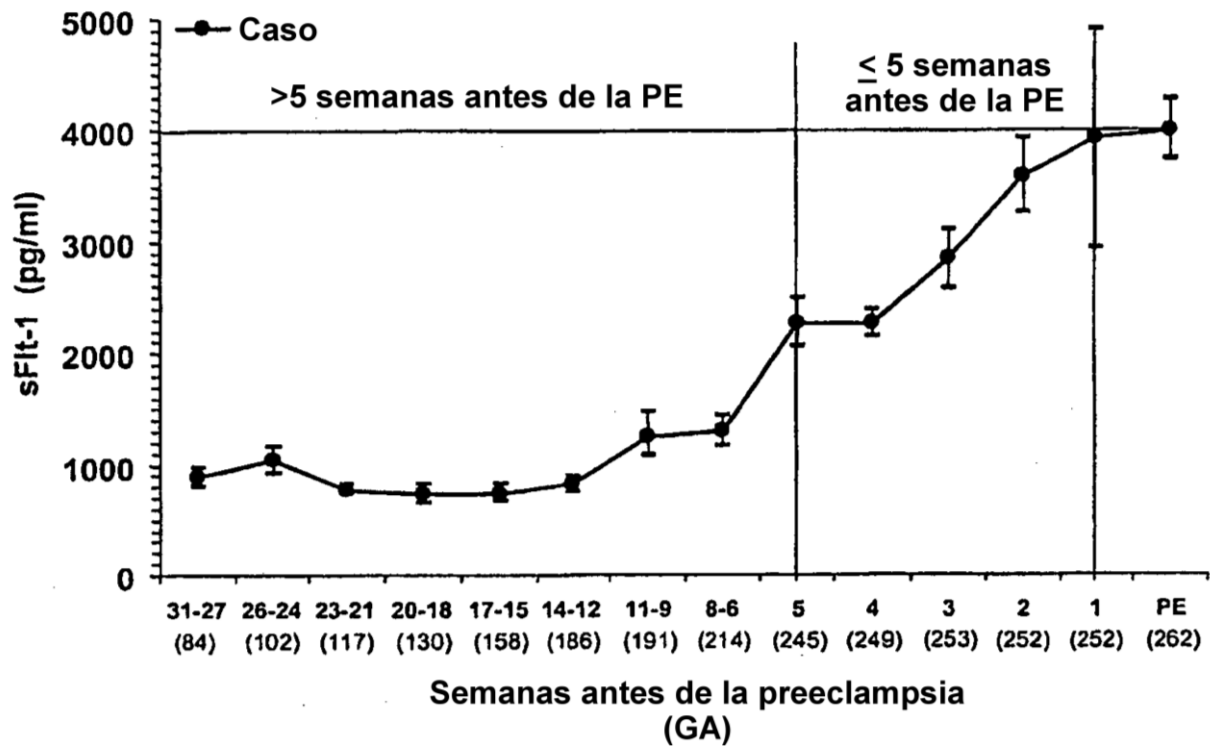


Figura 5C

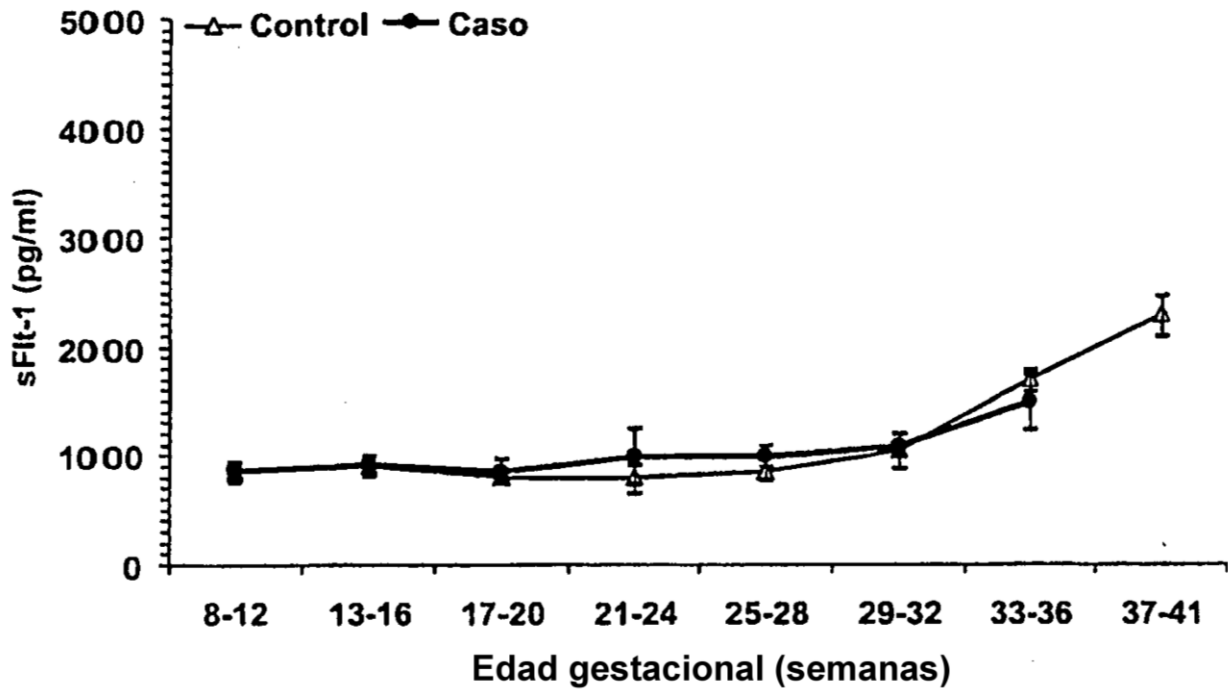


Figura 6A

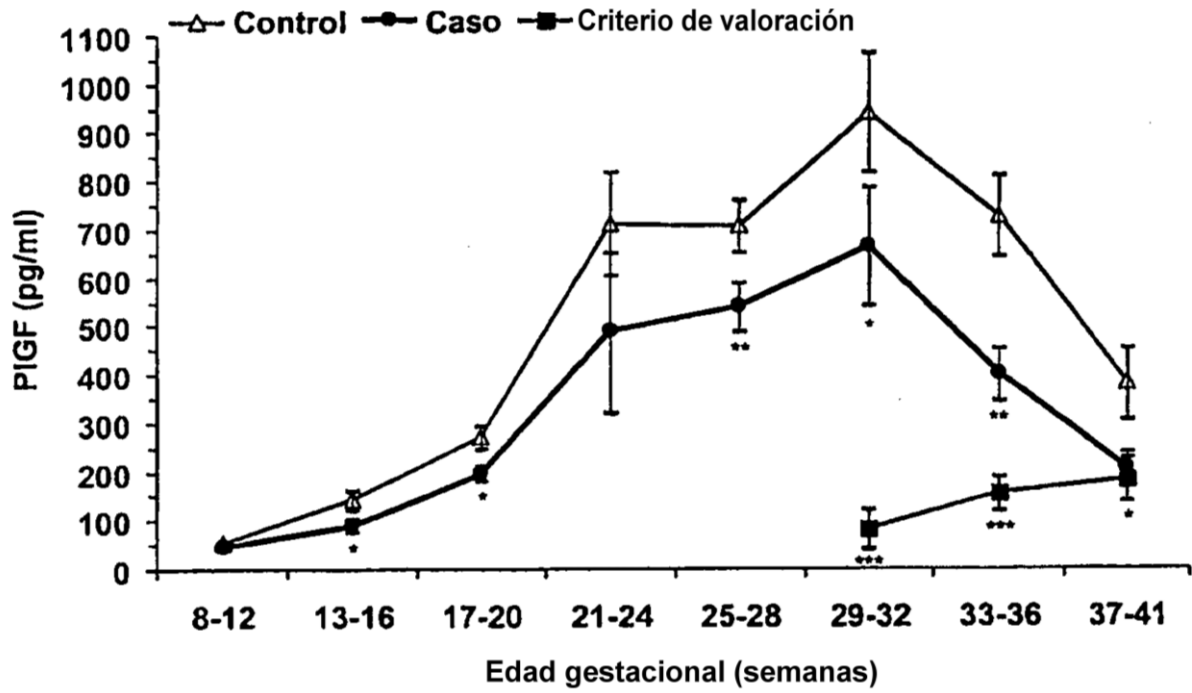


Figura 6B

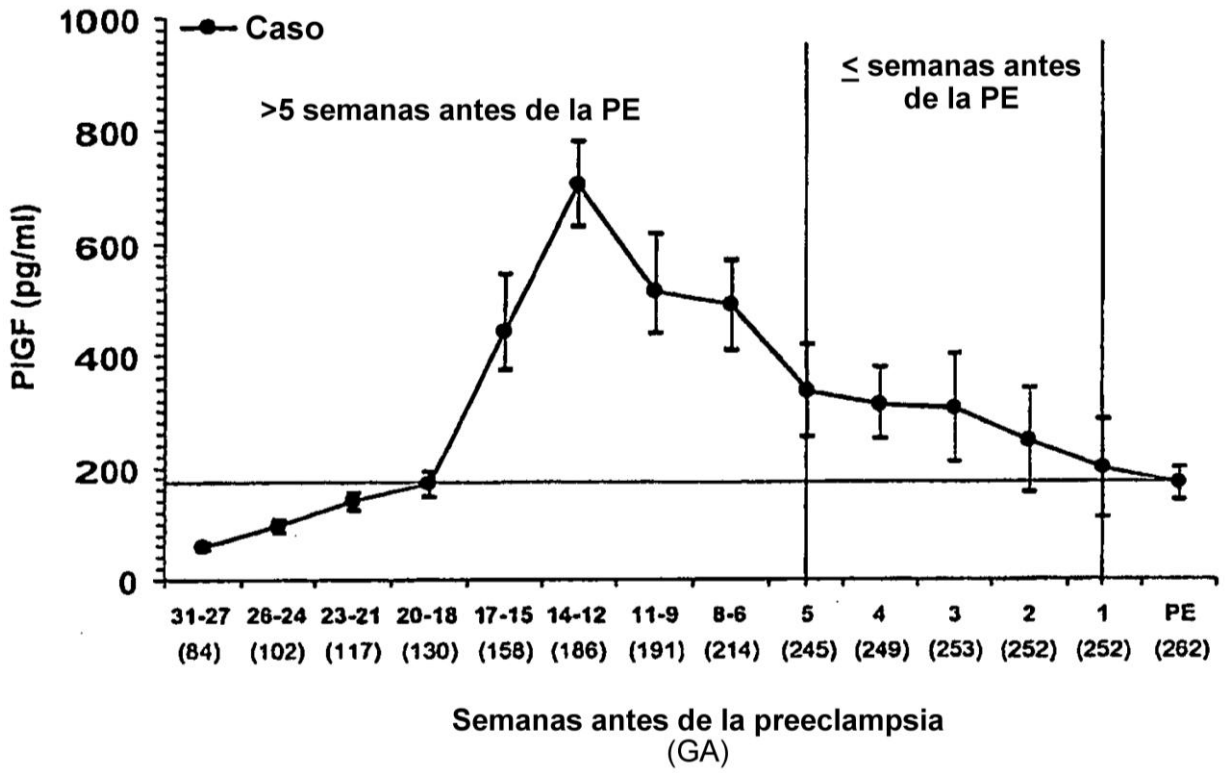


Figura 6C

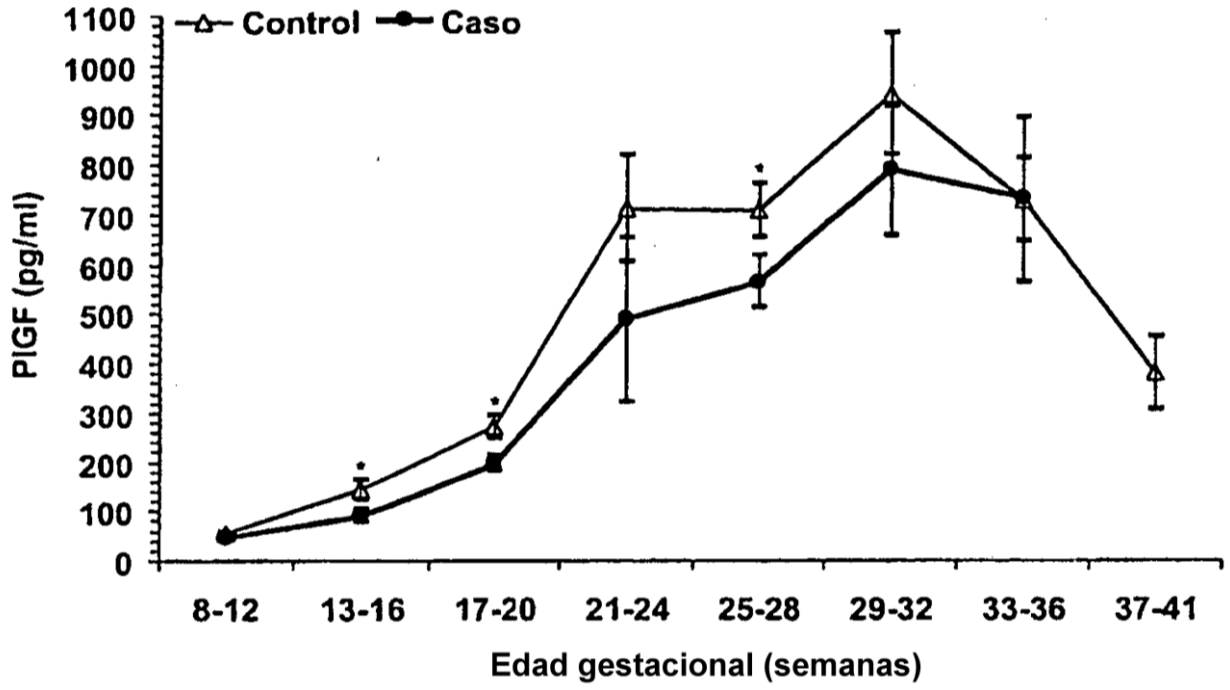


Figura 7

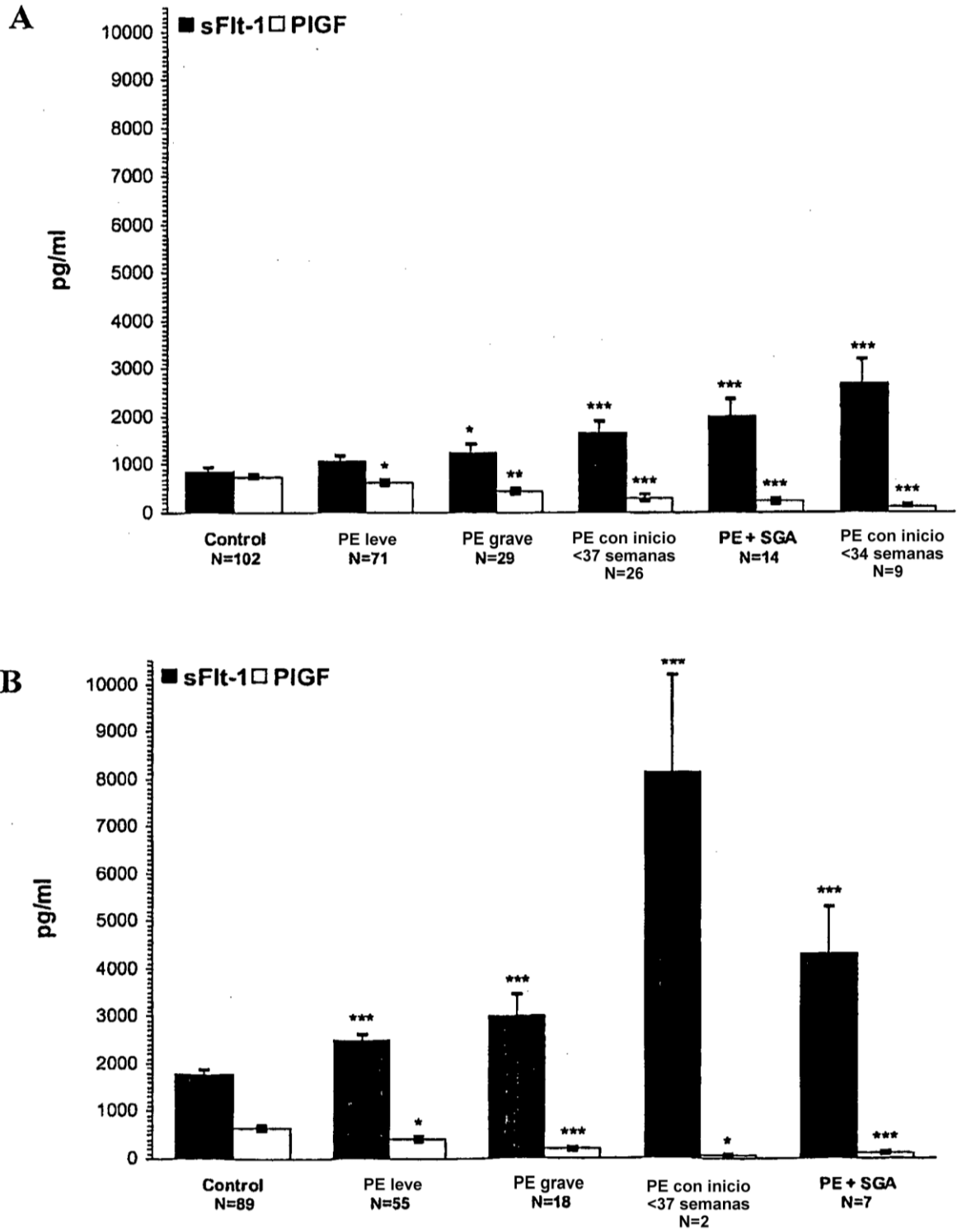
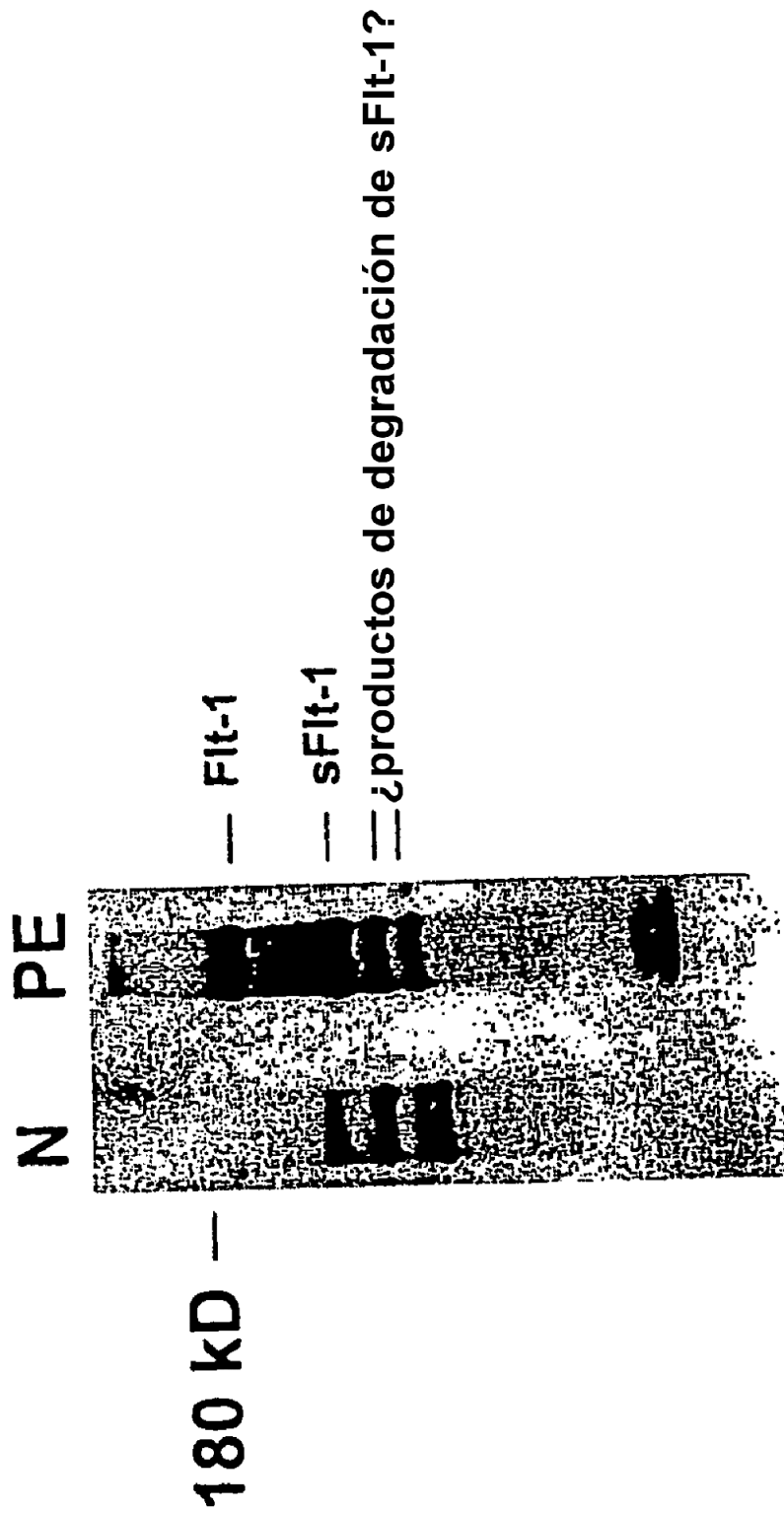
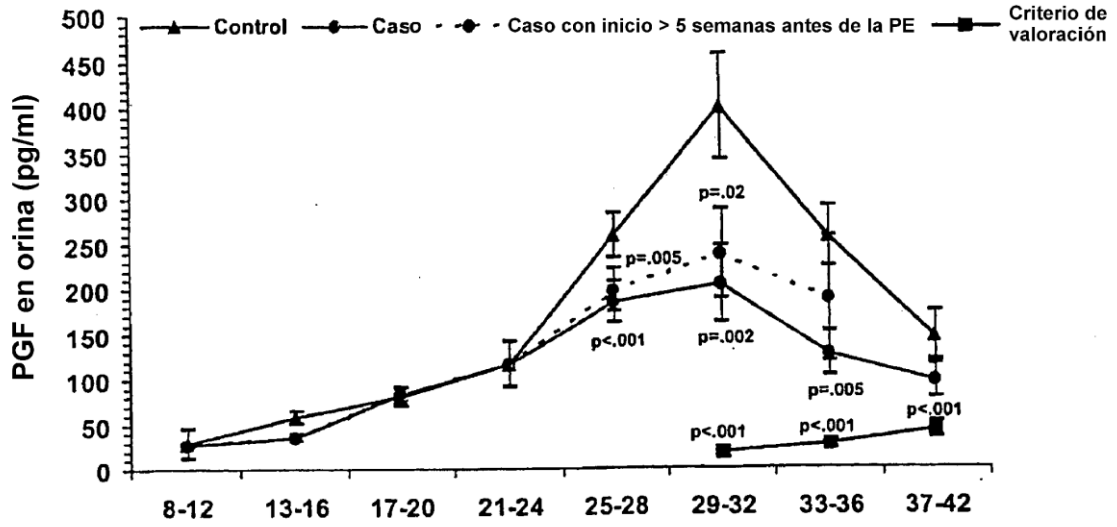


Figura 8



9A

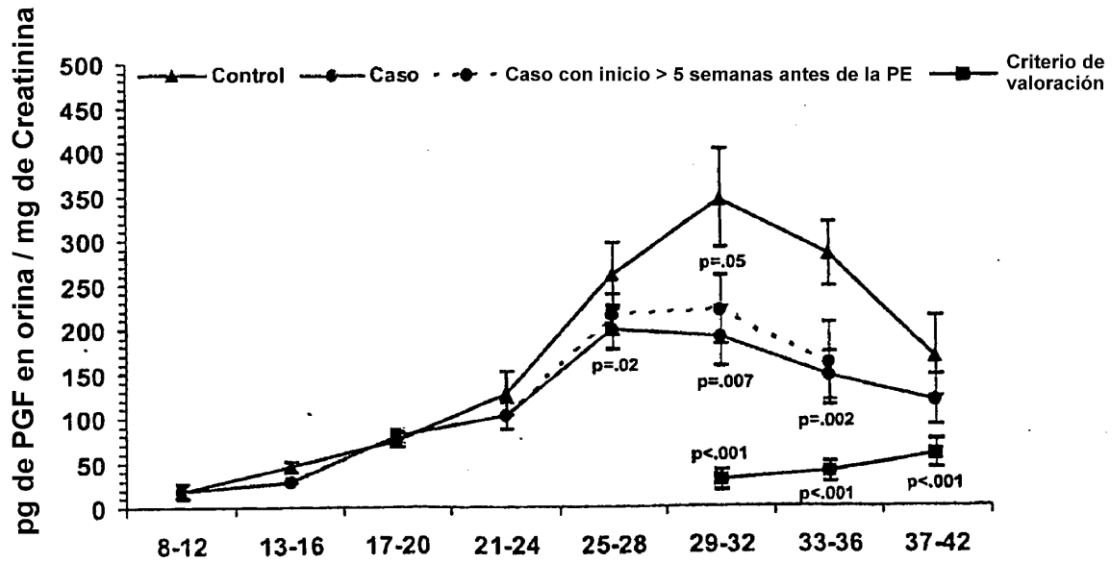


N.º de muestras

Edad gestacional (semanas)

Controles	6	39	58	14	76	26	74	25
Antes de la PE	2	46	63	15	71	34	49	28
>5 semanas antes de la PE	2	46	63	15	65	28	5	-
Durante la PE	-	-	-	-	-	6	13	21

9B

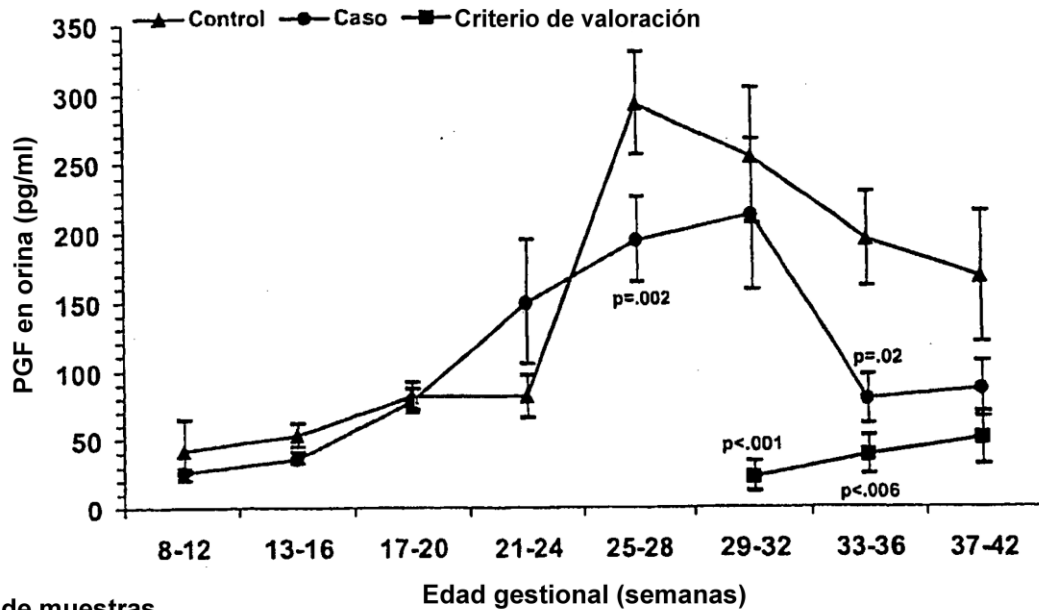


N.º de muestras

Edad gestacional (semanas)

Controles	6	39	58	14	76	26	74	25
Antes de la PE	2	46	63	15	71	34	49	28
>5 semanas antes de la PE	2	46	63	15	65	28	5	-
Durante la PE	-	-	-	-	-	6	13	21

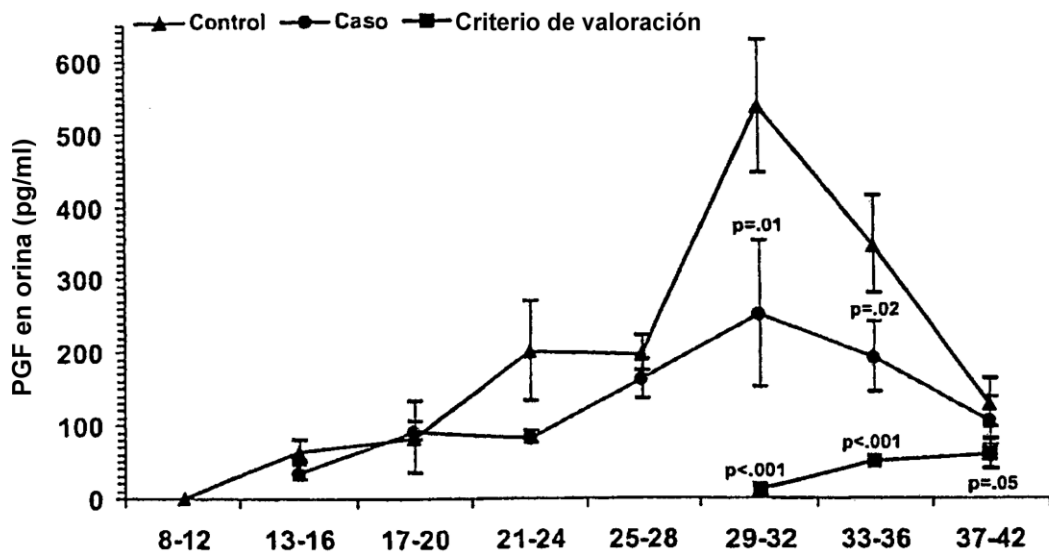
9C



N.º de muestras

	Edad gestacional (semanas)							
	8-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36	37-42
Controles	4	23	46	7	47	10	47	13
Antes de la PE	2	36	44	8	48	19	25	12
Durante la PE	-	-	-	-	-	3	4	5

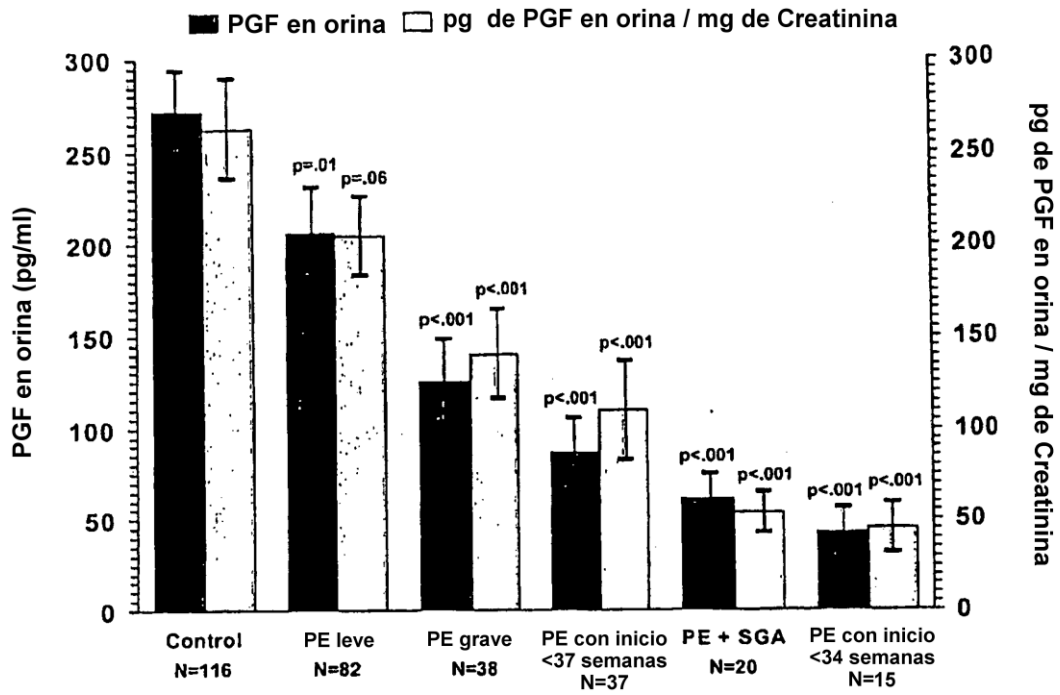
9D



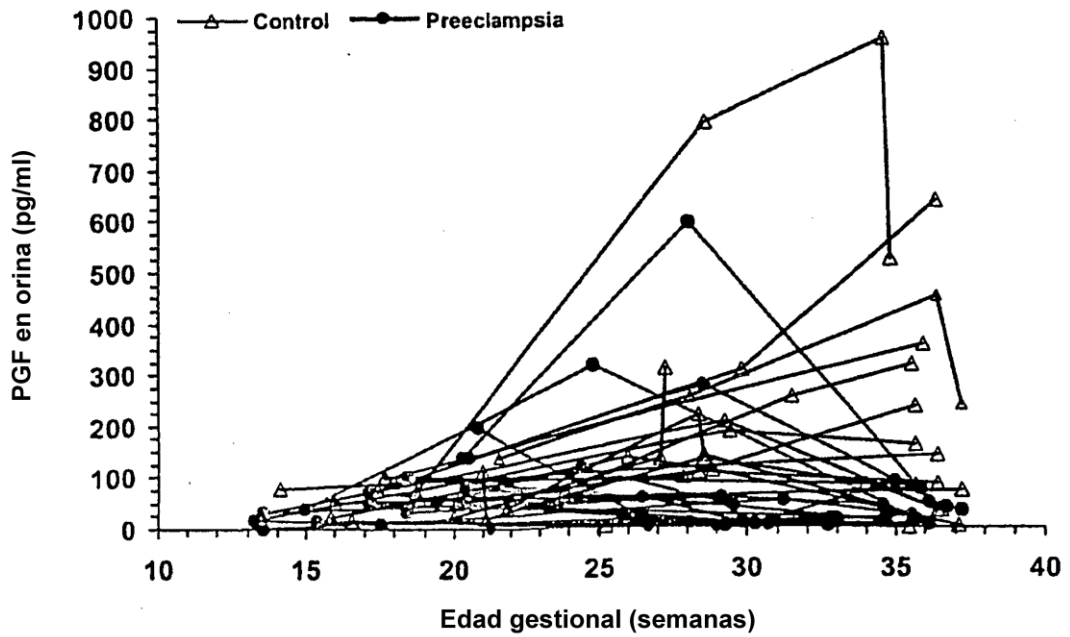
N.º de muestras

	Edad gestacional (semanas)							
	8-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36	37-42
Controles	1	13	8	4	20	13	21	9
Antes de la PE	-	9	16	6	23	10	22	14
Durante la PE	-	-	-	-	-	1	1	7

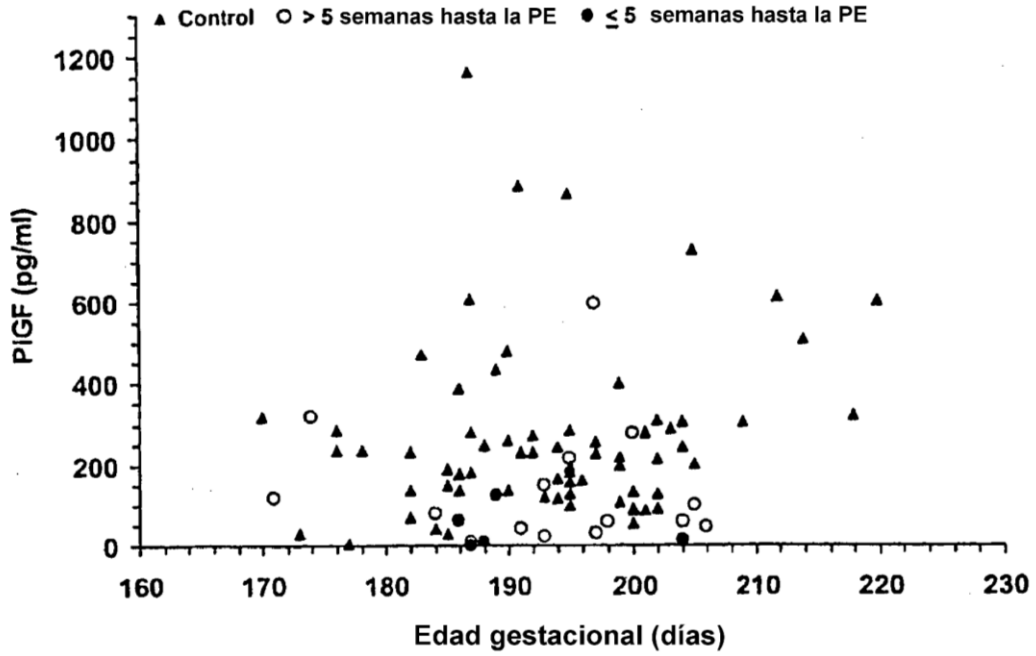
10



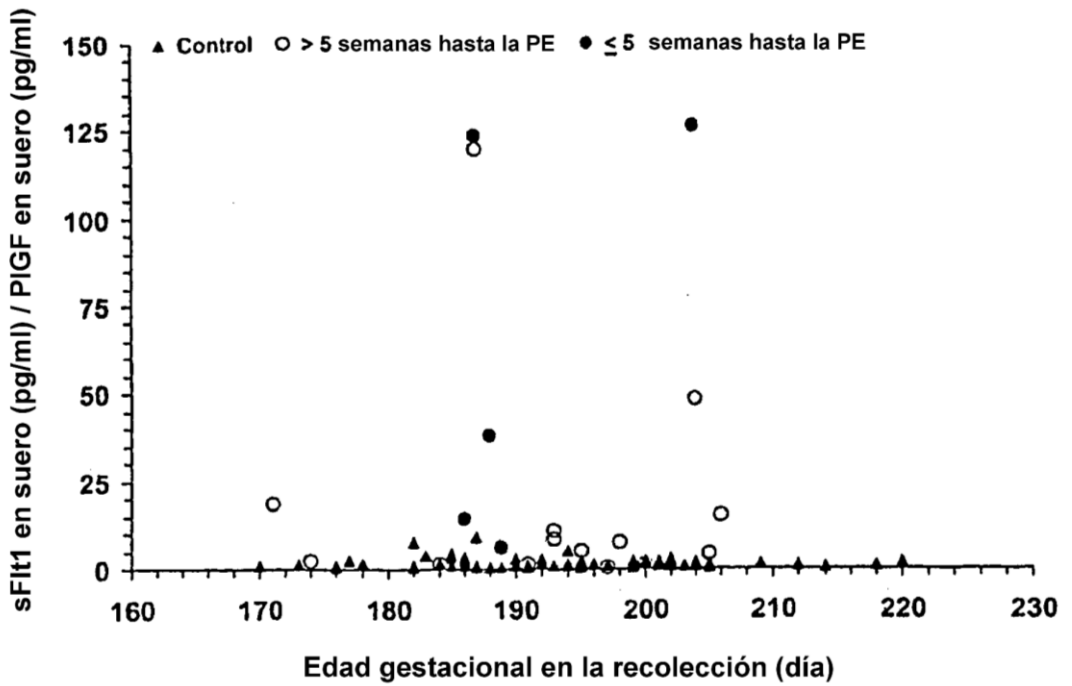
11



12A



12B



13

