

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 294**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2003 E 10180400 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2305301**

54 Título: **Métodos para tratar la preeclampsia**

30 Prioridad:

**19.07.2002 US 397481 P**

**03.03.2003 US 451796 P**

**02.05.2003 US 467390 P**

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

**21.04.2015**

73 Titular/es:

**BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER  
(100.0%)  
330 Brookline Avenue  
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

**SUKHATME, VIKAS;  
MAYNARD, SHARON y  
KARUMANCHI, S ANANTH**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 534 294 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

Métodos para tratar la preeclampsia

**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 (P1GF) es un miembro de la familia del VEGF que también está implicado en el desarrollo de la placenta. El P1GF se expresa por los citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos y es capaz de inducir la proliferación, migración y activación de células endoteliales. El P1GF se une como un homodímero al receptor Flt-1, pero no al receptor KDR. Tanto el P1GF 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 P1GF 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.

El artículo de Vuorela y colaboradores *Amniotic Fluid-Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Preeclampsia* (2000) 95 (3), 353-357 revela que la preeclampsia está asociada con altos niveles de sVEGFR, es decir, sFlt-1, en el fluido amniótico. Zhou y colaboradores en el artículo *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* (2002) 160 (4), 1405-1423 describen que los citotrofoblastos de la placenta de mujeres con un grado elevado de preeclampsia liberan aproximadamente dos veces la cantidad de sFlt-1 en comparación con los controles.

**Compendio de la Invención**

Se ha descubierto un medio para diagnosticar y tratar de forma eficaz la preeclampsia y la eclampsia antes de que se presenten los síntomas.

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 P1GF 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

- 5 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. En la presente invención se administran compuestos que aumentan los niveles de VEGF y P1GF a un sujeto para tratar o prevenir la preeclampsia o la eclampsia contrarrestando los efectos del nivel elevado de sFlt-1. Además, se usan anticuerpos dirigidos contra sFlt-1 para inhibir competitivamente la unión de VEGF o P1GF a este sFlt-1, aumentando de esta manera los niveles de VEGF y P1GF libres. También se usan oligómeros de nucleobases antisentido y de interferencia con el ARN para reducir los niveles de sFlt-1. Finalmente, la presente invención proporciona el uso y el control de sFlt-1, VEGF y P1GF como herramientas de detección para un diagnóstico y tratamiento precoz de la preeclampsia o eclampsia, o una predisposición a esta.
- 10 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-Flt1 soluble (sFlt1) purificado o un fragmento de unión al antígeno sFlt-1 de este capaz de bloquear la unión de VEGF o P1GF, para su uso en el tratamiento o la prevención de la preeclampsia en un sujeto, tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.
- 15 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto por medio de la administración al sujeto de un compuesto (por ejemplo, nicotina, teofilina, adenosina, nifedipina, minoxidil o sulfato de magnesio) que aumenta el nivel de un factor de crecimiento capaz de unirse a sFlt-1, donde la administración se realiza durante un periodo de tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto.
- 20 En otro aspecto relacionado, la invención proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto por medio de la administración al sujeto de un anticuerpo sFlt-1 purificado o un fragmento de unión al antígeno de este durante un periodo de tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto.
- 25 En otro aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, administrando al sujeto un oligómero de nucleobases antisentido complementario a al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1 siendo la administración suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En una realización, el oligómero de nucleobases antisentido tiene una longitud de 8 a 30 nucleótidos.
- 30 En otro aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. El método implica la etapa de administrar a un sujeto un ARN de doble hélice (ARNds) que contiene al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1, siendo la administración suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en el sujeto. En una realización, el ARN de doble hélice se procesa en ARN de interferencia pequeño (ARNip) de 19 a 25 nucleótidos de longitud.
- 35 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, el compuesto candidato es un factor de crecimiento tal como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), incluyendo todas las isoformas tales como VEGF189, VEGF121 o VEGF165; factor de crecimiento placentario (P1GF) incluyendo todas las isoformas; o fragmentos de estos. En realizaciones preferidas, el compuesto candidato es un anticuerpo que se une a sFlt-1. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, el método también implica administrar a un sujeto un compuesto antihipertensivo. En aún otras realizaciones de los aspectos anteriores, el sujeto es una mujer embarazada, una mujer después del parto o un animal no humano (por ejemplo, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato).
- 40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia. El método implica administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido VEGF o P1GF. En una realización, la composición contiene un polipéptido VEGF. En otra realización, la composición contiene un polipéptido P1GF.
- 45 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia. Este método implica la administración a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica VEGF o P1GF. En una realización, la composición contiene una molécula de ácido nucleico de VEGF. En otra realización, la composición contiene una molécula de ácido nucleico de P1GF.
- 50 En otro aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. El método implica la etapa de administrar al sujeto un compuesto (por ejemplo, compuesto químico, polipéptido, péptido, anticuerpo o un fragmento de este) que inhibe la unión del factor de crecimiento a un polipéptido sFlt-1, siendo la administración suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En una realización, el compuesto se une a sFlt-1 y bloquea la unión del factor de crecimiento.
- 55 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, el método también incluye la etapa de administrar a un sujeto un compuesto antihipertensivo (por ejemplo, adenosina, nifedipina, minoxidil y sulfato de magnesio). En otras realizaciones de los aspectos anteriores, el sujeto es una mujer embarazada, una mujer después del parto o un

animal no humano (por ejemplo, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar a un sujeto con preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia, implicando dicho método medir el nivel de los polipéptidos sFlt-1, VEGF o P1GF en una muestra del sujeto.

5 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para diagnosticar a un sujeto con preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollarlas, determinando los niveles de al menos dos de los polipéptidos sFlt-1, VEGF o P1GF en una muestra de un sujeto y calcular la relación entre los niveles de sFlt-1, VEGF o P1GF utilizando una métrica, en donde una alteración en la muestra del sujeto con respecto a la referencia diagnóstica preeclampsia o eclampsia en esta persona. En una realización, la métrica es un índice antiangiogénico preeclampsia (PAAI):  $[sFlt-1/VEGF + P1GF]$ , en donde el PAAI se utiliza como un indicador de la actividad angiogénica. En una realización, un valor PAAI superior a 20 indica preeclampsia o eclampsia. En otra realización, los niveles de polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF se determina mediante un ensayo inmunológico, tal como ELISA.

15 En varias realizaciones de los aspectos anteriores, la muestra es un fluido corporal, tal como suero u orina. En una realización un nivel de sFlt-1 superior a 2 ng/ml es un indicador de preeclampsia o eclampsia. En realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, el nivel de polipéptido sFlt-1 medido es el nivel de polipéptido sFlt-1 libre, unido o total. En otras realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, el nivel de VEGF o P1GF es el nivel de VEGF o P1GF libre.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar en un sujeto el padecimiento o la propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. Este método implica la medición del nivel de una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF en una muestra del sujeto y la comparación de este con una muestra de referencia, diagnosticando una alteración en los niveles de preeclampsia o eclampsia en el sujeto, o diagnosticando una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar en un sujeto el padecimiento o la propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. Este método implica la determinación de la secuencia de ácido nucleico de un gen de sFlt-1, VEGF o P1GF en un sujeto y la comparación de este con una secuencia de referencia, diagnosticando en el sujeto una alteración en la secuencia de ácido nucleico del sujeto que cambia el nivel del producto génico en el sujeto un estado de preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. En una realización, la alteración es un polimorfismo en la secuencia de ácido nucleico.

30 En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, la muestra es un fluido corporal (p. ej., orina, líquido amniótico, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo) del sujeto en el que normalmente se puede detectar sFlt-1, VEGF o P1GF. En realizaciones adicionales, la muestra es un tejido o una célula. Los ejemplos no limitantes incluyen tejido placentario o células placentarias, células endoteliales y leucocitos (p. ej., monocitos). En otras realizaciones de los aspectos anteriores, el sujeto es una mujer que no está embarazada, una mujer embarazada o una mujer después del parto. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, el sujeto no es humano (p. ej., una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato). En otras realizaciones de los aspectos anteriores, al menos uno de los niveles medidos es el nivel de sFlt-1 (libre, unido o total). En otras realizaciones de los aspectos anteriores, cuando se mide el nivel de VEGF entonces también se mide el nivel de sFlt-1 o P1GF. En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, un aumento en el nivel de ácido nucleico o polipéptido sFlt-1 con respecto a una referencia es un indicador de diagnóstico de la preeclampsia o eclampsia. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, una reducción en el nivel de polipéptido VEGF libre o de ácido nucleico de VEGF con respecto a una referencia es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, una reducción en el nivel de polipéptido P1GF libre o de ácido nucleico de P1GF con respecto a una referencia es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.

45 En realizaciones adicionales de los aspectos anteriores, los niveles se miden en dos o más ocasiones y un cambio en los niveles entre las mediciones es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. En una realización preferida, el nivel de sFlt-1 aumenta desde la primera medición a la siguiente medición. En otra realización preferida, el nivel de VEGF o P1GF disminuye desde la primera medición a la siguiente medición.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit de diagnóstico para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende una secuencia de ácido nucleico, o un fragmento de esta, seleccionada entre el grupo compuesto por una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF y P1GF, o una secuencia complementaria a esta, o cualquier combinación de estas. En una realización preferida, el kit comprende al menos dos sondas para la detección de una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF.

55 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende un medio para detectar un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF, y cualquier combinación de estos. En una realización, el medio de detección se selecciona entre el grupo compuesto por un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático y un ensayo colorimétrico. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, el kit diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en una mujer embarazada o no embarazada.

En realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, el kit detecta sFlt-1 o P1GF. En otras realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, cuando el kit detecta VEGF, entonces también se detecta sFlt-1 o P1GF.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, incluyendo el método poner en contacto una célula que expresa una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico en la célula que ha entrado en contacto con el compuesto candidato con el nivel de expresión en una célula de control que no ha entrado en contacto con el compuesto candidato, identificando una alteración en la expresión de la molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF que el compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.

10 En una realización, la alteración es una reducción en el nivel de sFlt-1. En otra realización, la alteración es un aumento en el nivel de VEGF o P1GF. En otras realizaciones, la alteración está en la transcripción o en la traducción. En otra realización, cuando el método identifica un compuesto candidato que aumenta la expresión de VEGF, el compuesto candidato también aumenta la expresión de P1GF o reduce la expresión de sFlt-1.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que incluye un polipéptido VEGF o P1GF o una porción de este, formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de P1GF, o una porción esta, formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición también contiene una molécula de ácido nucleico de VEGF, o una porción de esta.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un anticuerpo purificado o un fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente a sFlt-1. En una realización preferida, el anticuerpo previene la unión de un factor de crecimiento a sFlt-1. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígenos de este es un anticuerpo humano o humanizado. En otras realizaciones, el anticuerpo carece de una porción Fc. En otras realizaciones más, el anticuerpo es una estructura F(ab')<sub>2</sub>, un Fab o una estructura Fv. En otras realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de este está presente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. Este método incluye poner en contacto una célula que expresa un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF con un compuesto candidato y comparar el nivel de expresión del polipéptido en la célula que ha estado en contacto con el compuesto candidato con el nivel de expresión del polipéptido en una célula de control que no ha estado en contacto con el compuesto candidato, identificando una alteración en la expresión del polipéptido sFlt-1 VEGF o P1GF que el compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. En una realización, la alteración en la expresión se ensaya usando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático o un inmunoensayo. En una realización, la alteración en la expresión es una reducción en el nivel de sFlt-1. En otra realización, la alteración en la expresión es un aumento en el nivel de VEGF o P1GF.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. El método incluye poner en contacto una célula que expresa un polipéptido sFlt-1, VEGF, o P1GF con un compuesto candidato, y comparar la actividad biológica del polipéptido en la célula que ha estado en contacto con el compuesto candidato con el nivel de actividad biológica en una célula de control que no ha estado en contacto con el compuesto candidato, identificando un aumento en la actividad biológica del polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF que el compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. En una realización, el aumento de actividad biológica se ensaya usando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático o un inmunoensayo. En una realización, la alteración en la expresión es una reducción en la actividad de sFlt-1. En otra realización, la alteración en la expresión es un aumento en la actividad de VEGF o P1GF.

35 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. El método implica la detección de la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento en presencia de un compuesto candidato, identificando una reducción en la unión con respecto a la unión entre el polipéptido sFlt-1 y el factor de crecimiento en ausencia del compuesto candidato que el compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. En una realización, el factor del crecimiento es VEGF. En otra realización, el factor de crecimiento es P1GF.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para identificar un polipéptido o un fragmento de este, que previene la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento. El método implica la detección de la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento en presencia del polipéptido candidato, identificando una reducción en la unión, con respecto a la unión entre el polipéptido sFlt-1 y el factor de crecimiento en ausencia del polipéptido candidato, que el polipéptido candidato es un polipéptido que previene la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento. En una realización, el factor de crecimiento es VEGF. En otra realización, el factor de crecimiento es P1GF.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, que comprende detectar la unión de un polipéptido sFlt-1 y un compuesto candidato, donde un compuesto que se une al polipéptido sFlt-1 mejora la preeclampsia o eclampsia.

5 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un compuesto identificado de acuerdo con el aspecto previo, donde el compuesto es un polipéptido que se une específicamente a un polipéptido sFlt-1 y previene la unión del polipéptido sFlt-1 a VEGF o P1GF. En una realización preferida, el polipéptido es un anticuerpo. En otra realización preferida, el polipéptido es un fragmento de sFlt-1, VEGF o P1GF.

10 En realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, el compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia reduce los niveles de expresión o la actividad biológica de sFlt-1. En realizaciones preferidas de los aspectos anteriores, el compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia aumenta los niveles de expresión o la actividad biológica de VEGF o P1GF.

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

15 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, un aumento o reducción 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 P1GF). Los ejemplos de actividad biológica del P1GF 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 <sup>3</sup>H-timidina. Los ejemplos de actividad biológica para el sFlt-1 incluyen la unión al P1GF 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 actividad biológica para cada uno de los polipéptidos. Como se usa en este documento, un aumento o reducción 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.

20 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 a la presente 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.

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

45 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.

50 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.

55 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% o 60% 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.

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.

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").

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos 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')<sub>2</sub>, 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.

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.

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.

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 P1GF 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 P1GF se determinan midiendo la cantidad de P1GF libre o VEGF libre (es decir, no unidos al sFlt-1). Un sistema de medición ilustrativo es  $[sFlt-1/(VEGF + P1GF)]$ , también denominado índice antiangiogénico de preeclampsia (PAAI).

Por "índice antiangiogénico de preeclampsia (PAAI)" se entiende la relación de sFlt-1/VEGF + P1GF usada como un indicador de la actividad antiangiogénica. Un PAAI mayor de 20 se considera indicativo de preeclampsia o con riesgo de preeclampsia.

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.<sup>a</sup> edición), A. Gennaro, editor, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos.

Por "factor de crecimiento placentario (P1GF)" 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 P1GF. El P1GF 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 P1GF se expresa por cito- y sincitiotrofoblastos de la placenta y las actividades biológicas del P1GF incluyen inducción de la proliferación, migración y activación de células endoteliales, particularmente células del trofoblasto.

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 anormalidades 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 "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 comparación con las muestras no tratadas con oligómeros de nucleobases antisentido o ARNbc usado para interferencia de ARN.

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 la unión de P1GF 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.

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.

5 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).  
10 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 urinálisis, > 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.  
25

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 P1GF como se mide en los ensayos descritos en este documento.  
30

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.  
40

Por “troblasto” 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.

45 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 a la presente 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). 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).  
55

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.

- 5 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 muestra el ARNm y la 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 ( $PAAI = sFlt-1/(VEGF + P1GF)$ ) 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) + P1GF (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 P1GF 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), P1GF (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), P1GF 500 pg/ml (P), sFlt-1 10 ng/ml (S), VEGF (100 pg/ml) + P1GF 500 pg/ml (V + P) o VEGF (100 pg/ml) + P1GF 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 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 microscopía 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 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  $\leq 5$  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 muestran los niveles de P1GF antes y después de la preeclampsia por edad gestacional. La Figura 6A es un gráfico que muestra los niveles de P1GF 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 P1GF 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  $\leq 5$  semanas antes de la preeclampsia. La Figura 6C es un gráfico que muestra las concentraciones medias en suero de P1GF en pg/ml por ventana de edad gestacional para los controles normotensos y los casos de inicio de preeclampsia.

Las Figuras 7A y 7B muestran los niveles de sFlt-1 y P1GF 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 P1GF (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 P1GF (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.

### **Descripción Detallada**

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 P1GF 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 P1GF pueden usarse para tratar la preeclampsia. Además, se han descubierto agentes terapéuticos que interfieren con la unión de sFlt-1 a VEGF o P1GF purificados, o agentes que aumentan los niveles de VEGF o P1GF biológicamente activos, y que pueden usarse para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. Tales agentes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra sFlt-1, oligonucleótidos para antisentido o ARNi que reducen los niveles de sFlt-1, compuestos que aumentan los niveles de VEGF o P1GF, y pequeñas moléculas que se unen a sFlt-1 y bloquean el sitio de unión al factor de crecimiento. La divulgación también caracteriza métodos para medir los niveles de factores de crecimiento; los métodos pueden usarse como herramientas de diagnóstico para una detección precoz de preeclampsia o un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia o eclampsia.

Aunque la descripción detallada presentada en este documento se refiere específicamente a sFlt-1, VEGF o P1GF será evidente para un especialista en la materia que la descripción detallada también puede aplicarse a sFlt-1, VEGF o miembros de la familia P1GF, 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**

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.

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).

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-eclámpticos, 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.

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 P1GF 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 P1GF y se descubrió que los niveles en suero de P1GF y VEGF eran menores en pacientes con preeclampsia en comparación con los pacientes de control normales (P1GF 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 niveles de VEGF y P1GF 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.

## **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 formarían 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 formarían 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 preeclámplicas. Cuando se añadieron VEGF y P1GF exógenos al ensayo usando suero pre-eclámptico, se restauró la formación del tubo (Figura 2). Para estos ensayos se usaron VEGF humano recombinante, P1GF humano y Flt-1Fc humano. Estos resultados sugerían que las propiedades

antiangiogénicas de suero preecláptico se debían al antagonismo de VEGF y P1GF por sFlt-1 endógeno. Estos resultados también sugerían que la adición de VEGF purificado y/o P1GF puede invertir o mitigar el estado preecláptico y puede usarse terapéuticamente.

### Ejemplo 3. sFlt-1 Inhibe la Vasodilatación Inducida por VEGF y P1GF de Microvasos Renales

5 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  $\mu\text{m}$  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  
10 cámara de microvasos aislada, se canularon con micropipetas de vidrio dobles que medían de 30-60  $\mu\text{m}$  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 (Graptec, Irvine, California, Estados Unidos). Los vasos se dejaron bañar en la cámara de microvasos durante al menos 30 minutos antes de cualquier  
20 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, P1GF y sFlt-1. Para estos ensayos se usaron VEGF de rata recombinante, P1GF de ratón y Flt-1Fc de ratón. Todos los fármacos se aplicaron extraluminariamente. 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 P1GF (Figura 3A). Además, se descubrió que VEGF y P1GF, 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 vasorelajación, 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 preeclápticas y tales inhibidores de sFlt-1 podrían usarse potencialmente como agentes terapéuticos.

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

40 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 P1GF. Por lo tanto, se eligió sFlk1-Fc como control para ayudar a distinguir entre la actividad anti-VEGF y la actividad anti-P1GF de sFlt-1.

Se inyectaron  $1 \times 10^9$  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 cardiaco 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
<b>Fc (P)</b>	5	75,6 ± 11,1	62 ± 21
<b>sFlt-1 (P)</b>	4	109,0 ± 19,3*	6923 ± 658*
<b>sFlk-1Fc (P)</b>	4	72,8 ± 14,7	50 ± 32
<b>Fc (NP)</b>	5	89,3 ± 5,7	138 ± 78
<b>sFlt-1 (NP)</b>	6	117,9 ± 129*	12947 ± 2776*
<b>sFlk-1Fc (NP)</b>	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 sFlk-1Fc. 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 sFlk-Fc desarrollaron hipertensión y proteinuria, mientras que las ratas preñadas tratadas con sFlk-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 P1GF. En el estado no preñado, en el que está prácticamente ausente P1GF, el antagonismo de VEGF solo es suficiente para romper el equilibrio pro/angiogénico 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 fijó en glutaraldehído, se incluyó en una mezcla de araldite-epon y se cortaron secciones renales ultrafinas (1 µm), 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 P1GF 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 P1GF 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 P1GF/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 P1GF libre/creatinina en orina (pg de P1GF 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 P1GF y creatinina en orina es útil como indicador diagnóstico de preeclampsia en un paciente.

**Ejemplo 7: Niveles de Proteína sFlt-1 y P1GF como Indicador de Diagnóstico de Preeclampsia y Eclampsia en mujeres.**

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, P1GF libre y VEGF libre circulantes en embarazos normotensos y preeclámpicos. 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.* 377:69-76, 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" fueron muestras obtenidas durante o después del inicio de los síntomas y signos de la preeclampsia, pero antes del 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 2, 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 2: Características de casos y controles en la inclusión en el CPEP y de sus bebés recién nacidos

Características	Casos (n=120)	Controles (n=120)
Edad (años)	20,8 ± 4,5	20,2 ± 3,46
Altura (cm)	161,0 ± 6,7	163,0 ± 6,9
Peso (kg)	71,0 ± 19,4	66,8 ± 17,1
Índice de masa corporal	27,3 ± 6,8	25,1 ± 6,1**
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	109,5 ± 8,8	105,7 ± 9,0**
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	62,0 ± 7,9	59,4 ± 7,4**
Pérdida de embarazo anterior [n(%)]	23 (19,2)	25 (20,8)
Fumador actual [n (%)]	9 (7,5)	13 (10,8)
Seguro social privado [n (%)]	8 (6,7)	13 (10,8)
Casada [n (%)]	25 (20,8)	24 (20,0)
Raza/etnia		
Blanca, no hispana [n (%)]	24 (20,0)	35 (29,2)
Blanca hispana [n (%)]	21 (17,5)	14 (11,7)
Afroamericana [n (%)]	69 (57,5)	68 (56,7)
Otra, desconocida [n (%)]	6 (5,0)	3 (2,5)
Peso en el nacimiento (g)	3100 ± 796	3255 ± 595
Parto <37 semanas [n (%)]	29 (24,2)	9 (7,5) **
Pequeño para la edad gestacional (< décimo percentil) [n (%)]	18 (15,0)	4 (3,3) **

Media ± desviación estándar a menos que se indique

\*p<0,05 \*\*p<0,01

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.

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, P1GF 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 -70°C, 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, P1GF 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, P1GF 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 P1GF, y del 7,3% y 5,4% para VEGF.

## 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, P1GF 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 P1GF 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 P1GF,  $p < 0,0001$ ; 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, P1GF y VEGF, se midieron las concentraciones circulantes de sFlt-1, P1GF 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  $\leq 5$  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 P1GF en el mismo grupo de pacientes que se ha mostrado en la Figura 6A. Las concentraciones de proteína P1GF 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 P1GF siguieron un modelo gestacional similar, pero fueron significativamente menores que los controles de la semana 13 a la 16. En general, las diferencias en P1GF 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 P1GF 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 P1GF 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 P1GF excluyendo las muestras obtenidas  $\leq 5$  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 P1GF en las semanas previas a la afección era responsable de los niveles considerablemente bajos de P1GF detectados al principio de la afección (o las muestras de criterio de valoración mostradas en la Figura 6A).

5 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  $\leq 5$  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  $\leq 5$  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.

15 La Figura 7 representa sFlt-1 y P1GF 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 P1GF 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 P1GF 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 P1GF significativamente menor.

25 Después se determinó si se podían usar concentraciones circulantes de P1GF y/o sFlt-1 durante el primer trimestre para identificar las mujeres con riesgo de desarrollo de preeclampsia. Entre las 8-20 semanas, después del ajuste para la edad gestacional, índice de masa corporal y sFlt-1, las pacientes de casos con P1GF en el menor cuartil de distribución de valores de control tenían un aumento de casi 12 veces de preeclampsia a  $< 34$  semanas (razón de desigualdad [OR] 11,7,  $p < 0,05$ ) en comparación con los casos con P1GF en los tres cuartiles superiores (Tabla 3). El riesgo de preeclampsia a  $< 34$  semanas en el cuartil inferior, en comparación con el cuartil superior aumentó casi 16 veces (OR 15,8,  $p < 0,01$ ).

**TABLA 3: Razones de Desigualdad (OR) para Preeclampsia de Inicio Precoz por Cuartiles de Distribución de P1GF de Control a las 8-20 Semanas**

P1GF (pg/ml)	Inicio de PE $< 34$ semanas			Inicio de PE $< 37$ semanas		
	Casos (N)	Controles (N)	OR Adj.* (95% CI)	Casos (N)	Controles (N)	OR Adj.* (95% CI)
Q4 $> 267,5$	2	30	1,0 Referente	4	30	1,0 Referente
Q3 $> 128,6-267,5$	1	30	0,7 (0,1-8,9)	4	30	1,3 (0,3-5,8)
Q2 $> 70,1-128,6$	3	30	2,3 (0,3-19,3)	6	30	2,6 (0,6-12,1)
Q1 $< 70,1$	5	30	15,8 (1,5-172,8)**	17	30	22,3 (3,7-135,6)***

30 \*Razones de desigualdad ajustadas por edad gestacional, índice de masa corporal, log sFlt-1  
 \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  95% CI=Límites de confianza del 95%

35 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 P1GF libre y los niveles de VEGF libre se reducen, lo que sugiere que la reducción en P1GF y VEGF puede deberse al menos parcialmente al antagonismo por sFlt-1 y no a una reducción en la producción placentaria de P1GF y VEGF. Tres subgrupos de preeclampsia –preeclampsia grave, inicio precoz de la afección y niños SGA– tuvieron mayores concentraciones de sFlt-1 y menores concentraciones de P1GF 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 P1GF 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 P1GF puede ser un agente útil para predecir una preeclampsia de inicio precoz.

45 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 P1GF 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 P1GF (Maynard y colaboradores, *supra*) sugiere que la reducción de los niveles de P1GF 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 P1GF 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 P1GF. 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.

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 P1GF libre ya a las 13-16 semanas de gestación. Esta reducción en P1GF 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 P1GF pronto en la gestación podrían reflejar una menor producción placentaria de P1GF 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 P1GF antes de la presentación de la afección. También es posible que no haya ningún cambio en la producción placentaria de P1GF en pacientes preeclámpticas y que la elevación de los niveles de sFlt-1 locales en la placenta puedan contribuir a la reducción de los niveles de P1GF libre circulantes. Esto se confirma por el hallazgo de que el P1GF placentario, medido por inmunohistoquímica, no se altera en la preeclampsia (Zhou y colaboradores, *Am J. Pathol.* 160: 1405-1423. 2002).

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 P1GF libre y VEGF libre circulantes. La reducción de P1GF 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 las pacientes del grupo de casos, sugiere que las mayores alteraciones en los niveles de proteínas observadas en los embarazos preeclámpticos 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

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 VEGF, P1GF o sFlt-1, libres o totales en una muestra de un sujeto y se usan como indicador de preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones.

En una realización 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 VEGF, P1GF o sFlt-1 en cualquier fluido corporal, incluyendo pero sin limitación orina, suero, plasma, saliva, fluido amniótico o líquido cefalorraquídeo. Tales métodos incluyen inmuno-ensayo, ELISA, transferencia Western usando anticuerpos dirigidos a VEGF, P1GF o sFlt-1 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 VEGF, P1GF o sFlt-1.

Los niveles en suero de sFlt-1 superiores a 2 ng/ml se consideran un indicador positivo de preeclampsia. Además, cualquier alteración detectable en los niveles de sFlt-1, VEGF o P1GF con respecto a los niveles normales es indicativa de eclampsia, preeclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones. Preferiblemente se mide sFlt-1, más preferiblemente la medición de VEGF y P1GF se combinan con esta medición y aún más preferiblemente se miden las 3 proteínas (o niveles de ARNm indicativos de niveles de proteínas).

En otra realización, el PAAI (sFlt-1/VEGF + P1GF) se usa como índice antiangiogénico que es diagnóstico de preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones. Si el PAAI es mayor de 20 entonces se considera que el sujeto tiene preeclampsia o tiene un riesgo inminente de desarrollarla. La relación de PAAI (sFlt-1/VEGF + P1GF) es simplemente un ejemplo de un sistema de medición útil que puede usarse como indicador de diagnóstico. No pretende limitar la invención. Como indicador de diagnóstico puede usarse prácticamente cualquier

sistema de medición que detecte una alteración en el índice antiangiogénico en el sujeto que tiene eclampsia con respecto a un control normal.

Los niveles de expresión de ácidos nucleicos o polipéptidos particulares pueden correlacionarse con un estado de enfermedad particular (por ejemplo, preeclampsia o eclampsia) y de esta manera son útiles en el diagnóstico. Pueden usarse oligonucleótidos o fragmentos mayores procedentes de una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1, P1GF o VEGF como una sonda no solo para controlar la expresión, sino también para identificar sujetos que tienen una variación genética, mutación, o polimorfismo en una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, P1GF o VEGF que son indicativos de una predisposición a desarrollar las afecciones. Tales polimorfismos se conocen para el especialista en la materia y se describen por Parry y colaboradores (*Eur. J Immunogenet.* 26:321-3, 1999). Tales alteraciones genéticas pueden estar presentes en la secuencia promotora, un marco de lectura abierto, secuencia intrónica o región 3' no traducida de un gen de sFlt-1. Puede usarse la información relacionada con alteraciones genéticas para diagnosticar que un sujeto tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones. Como se ha indicado a lo largo de este documento, las alteraciones específicas en los niveles de actividad biológica de sFlt-1, VEGF y/o P1GF pueden correlacionarse con la probabilidad de preeclampsia o eclampsia, o la predisposición a estas. Como resultado, un especialista en la materia, habiendo detectado una mutación dada, puede ensayar uno o más sistemas de medición de la actividad biológica de la proteína para determinar si la mutación produce o aumenta la probabilidad de preeclampsia o eclampsia.

En una realización, un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones mostrará un aumento en la expresión de un ácido nucleico que codifica sFlt-1 o una alteración de los niveles de P1GF o VEGF. Los métodos para detectar tales alteraciones son convencionales en la materia y se describen en Ausubel y colaboradores, *supra*. En un ejemplo se usa transferencia Northern o PCR a tiempo real para detectar los niveles de ARNm de sFlt-1, P1GF o VEGF.

En otra realización, puede usarse hibridación con sondas de PCR que son capaces de detectar una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, incluyendo secuencias genómicas, o moléculas muy relacionadas, para hibridar con una secuencia de ácido nucleico derivada de un sujeto que tiene preeclampsia o eclampsia o con riesgo de desarrollar tales afecciones. La especificidad de la sonda, si está hecha de una región muy específica, por ejemplo, la región reguladora 5', o de una región menos específica, por ejemplo como motivo conservado, y la astringencia de la hibridación o amplificación (máxima, alta, intermedia o baja) determinan si la sonda hibrida con una secuencia natural, variantes alélicas u otras secuencias relacionadas. Pueden usarse técnicas de hibridación para identificar mutaciones indicativas de una preeclampsia o eclampsia en una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, o pueden usarse para controlar los niveles de expresión de un gen que codifica un polipéptido sFlt-1 (por ejemplo, por análisis Northern, Ausubel y colaboradores, *supra*).

En otra realización, a los seres humanos se les puede diagnosticar una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia por análisis directo de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF.

Un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones mostrará un aumento en la expresión de un polipéptido sFlt-1. 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 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 es diagnóstico de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones.

En una realización, el nivel de polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF o ácido nucleico o cualquier combinación de estos 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.

El nivel de sFlt-1, VEGF o P1GF en los fluidos corporales de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones puede alterarse en una cantidad tan pequeña como del 10%, 20%, 30% 40% o en una cantidad tan grande como del 50%, 60%, 70%, 80% o 90% con respecto al nivel de sFlt-1, VEGF o P1GF en un control normal. El nivel de sFlt-1 presente en los fluidos corporales de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o la propensión a desarrollar tales afecciones puede aumentar 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o incluso hasta 10 veces o más con respecto a los niveles de un sujeto de control normal.

En una realización, se recoge una muestra de un fluido corporal del sujeto (por ejemplo, orina, plasma, suero, fluido amniótico) en la primera parte del embarazo antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. En otro ejemplo, la muestra puede ser un tejido o célula recogida en la primera parte del embarazo antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. Los ejemplos no limitantes incluyen tejido placentario, células placentarias, células endoteliales y leucocitos tales como monocitos. En seres humanos, por ejemplo, se recogen muestras de suero de sangre

- materna de la vena antecubital de mujeres embarazadas durante el primer, segundo o tercer trimestre del embarazo. Preferiblemente, el ensayo se realiza durante el primer trimestre, por ejemplo a las 4, 6, 8, 10, o 12 semanas, o durante el segundo trimestre, por ejemplo a las 14, 16, 18, 20, 22 o 24 semanas. Tales ensayos también pueden realizarse al final del segundo trimestre o al principio del tercer trimestre (aproximadamente a las 28 semanas). Es preferible medir los niveles de sFlt-1, VEGF o P1GF dos veces durante este periodo de tiempo. Para el diagnóstico de la preeclampsia o eclampsia posparto, pueden realizarse los ensayos para sFlt-1, VEGF o P1GF después del parto.
- 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 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 la práctica veterinaria, pueden realizarse ensayos en cualquier momento durante el embarazo, pero preferiblemente pueden realizarse en las primeras fases del embarazo, antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. Dado que el término de los embarazos varía ampliamente entre especies, el tiempo del ensayo se determinará por un veterinario, pero generalmente corresponderá a los tiempos de ensayos durante un embarazo humano.
- 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 P1GF libre en suero de 100 pg/ml, entonces pueden administrarse VEGF hasta que el nivel de P1GF en suero alcance aproximadamente 400 pg/ml. En esta forma de realización, los niveles de sFlt-1, P1GF y VEGF o todos y cada uno de estos 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.

### Kits de Diagnóstico

- La invención también proporciona un kit de ensayo de diagnóstico. Por ejemplo, un kit de ensayo de diagnóstico puede incluir anticuerpos contra sFlt-1, VEGF o P1GF, y medios para detectar y más preferiblemente evaluar la unión entre los anticuerpos y el polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF. Para la detección, el anticuerpo o el polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF se marca, y el anticuerpo o el polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF se une al sustrato, de tal manera que la interacción de polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF-anticuerpo pueda establecerse determinando la cantidad de marcador unido al sustrato después de la unión entre el anticuerpo y el polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF. Una ELISA convencional es un método común conocido en la materia para detectar la interacción de anticuerpo-sustrato y puede proporcionarse con el kit de la invención. Los polipéptidos sFlt-1, VEGF o P1GF pueden detectarse prácticamente en cualquier fluido corporal incluyendo, pero sin limitación orina, suero, plasma, saliva, líquido amniótico o líquido cefalorraquídeo. Un kit que determina una alteración en el nivel de polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF con respecto a una referencia, tal como el nivel presente en un control normal, es útil como kit de diagnóstico en los métodos de la invención.

### Ensayos de Selección

- Como se ha descrito anteriormente, la expresión de un ácido nucleico o polipéptido sFlt-1 aumenta en un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia o una propensión a desarrollar tales afecciones. Basándose en estos descubrimientos, las composiciones de la invención son útiles para la selección de bajo costo y de alto rendimiento de compuestos candidatos para identificar los que modulan la expresión de una molécula de ácido nucleico o polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF cuya expresión está alterada en un sujeto que tiene preeclampsia o eclampsia.
- Se dispone de varios métodos para realizar ensayos de selección para identificar nuevos compuestos candidatos que alteran la expresión de una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF. En un ejemplo de trabajo, se añaden compuestos candidatos a concentraciones variables al medio de cultivo de células cultivadas que expresan una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF. Después se mide la expresión del gen, por ejemplo, por análisis en microarreglo, análisis de transferencia Northern (Ausubel y colaboradores, *supra*), o RT-PCR usando cualquier fragmento apropiado preparado a partir de la molécula de ácido nucleico como sonda de hibridación. El nivel de expresión génica en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel medido en un medio de cultivo de control que carece del compuesto candidato. Un compuesto que promueve una alteración tal como un

aumento en la expresión de un gen VEGF o P1GF, una molécula de ácido nucleico o polipéptido, o una reducción en la expresión de un gen de sFlt-1, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o un equivalente funcional de este, se considera útil en la invención; tal molécula puede usarse, por ejemplo, como terapia para tratar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto.

5 En otro ejemplo de trabajo, puede medirse el efecto de compuestos candidatos a nivel de la producción de polipéptidos usando la misma estrategia general y técnicas inmunológicas convencionales, tales como transferencia Western o inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos para detectar o controlar la expresión de al menos uno de los polipéptidos de la invención en un organismo. Pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales (producidos como se ha descrito anteriormente), que son capaces de unirse a tal polipéptido en cualquier formato de inmunoensayo convencional (por ejemplo ELISA, transferencia Western, ensayo RIA) para medir el nivel del polipéptido. En algunas realizaciones, se considera particularmente útil un compuesto que promueve una alteración tal como un aumento en la expresión o actividad biológica de un polipéptido VEGF o P1GF o una reducción en la expresión o actividad biológica de un polipéptido de sFlt-1. De nuevo, tal molécula puede usarse, por ejemplo, como terapia para retrasar, mejorar o tratar la preeclampsia o eclampsia, o los síntomas de una preeclampsia o eclampsia en un sujeto.

En otro ejemplo de trabajo, pueden analizarse compuestos candidatos para detectar los que se unen específicamente a un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF. La eficacia de tal compuesto candidato depende de su capacidad para interactuar con tal polipéptido o un equivalente funcional de este. Tal interacción puede ensayarse fácilmente usando cualquier número de técnicas de unión convencionales y ensayos funcionales (por ejemplo, los descritos en Ausubel y colaboradores, *supra*). En una realización, un compuesto candidato puede ensayarse *in vitro* con respecto a su capacidad de unirse específicamente a un polipéptido de la invención. En otra realización, un compuesto candidato se ensaya con respecto a su capacidad de reducir la actividad biológica de un polipéptido sFlt-1 reduciendo la unión de un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento, tal como VEGF o P1GF.

En otro ejemplo de trabajo, se expresa un ácido nucleico sFlt-1, VEGF o P1GF como fusión de transcripción o traducción con un indicador detectable, y se expresa en una célula aislada (por ejemplo, célula de mamífero o insecto) bajo el control de un promotor heterólogo, tal como un promotor inducible. La célula que expresa la proteína de fusión después se pone en contacto con un compuesto candidato, y la expresión del indicador detectable en esa célula se compara con la expresión del indicador detectable en una célula de control no tratada. Un compuesto candidato que reduce la expresión de un indicador detectable de sFlt-1 o que aumenta la expresión de un indicador detectable de VEGF o P1GF es un compuesto que es útil para el tratamiento de la preeclampsia o eclampsia. En realizaciones preferidas, el compuesto candidato altera la expresión de un gen indicador fusionado a un ácido nucleico o un ácido nucleico.

En un ejemplo de trabajo particular, un compuesto candidato que se une a un polipéptido sFlt-1 puede identificarse usando una técnica basada en cromatografía. Por ejemplo, un polipéptido recombinante de la invención puede purificarse por técnicas convencionales a partir de células modificadas por ingeniería genética para expresar el polipéptido (por ejemplo, las descritas anteriormente) y puede inmovilizarse en una columna. Después se hace pasar una solución de compuestos candidatos a través de la columna y se identifica un compuesto específico para el polipéptido sFlt-1 basándose en su capacidad de unirse al polipéptido y se inmoviliza en la columna. Para aislar el compuesto, la columna se lava para retirar las moléculas unidas de manera no específica, y luego el compuesto de interés se libera de la columna y se recoge. Pueden usarse métodos similares para aislar un compuesto unido a un microarreglo de polipéptidos. Si se desea, los compuestos aislados por este método (o cualquier otro método apropiado) pueden purificarse adicionalmente (por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución). Además, estos compuestos candidatos pueden ensayarse con respecto a su capacidad de reducir la actividad de un polipéptido sFlt-1 o aumentar la actividad de una ruta de señalización de VEGF (por ejemplo como se describe en este documento). También pueden usarse compuestos aislados por esta estrategia, por ejemplo, como terapia para tratar la preeclampsia o eclampsia en un ser humano. En la invención se consideran particularmente útiles compuestos que se identifican como compuestos que se unen a un polipéptido de la invención con una constante de afinidad menor o igual a 10 mM. Como alternativa, puede utilizarse cualquier sistema de detección de interacción de proteínas *in vivo*, por ejemplo, cualquier ensayo de dos híbridos para identificar compuestos o proteínas que se unen a un polipéptido de la invención.

Los antagonistas potenciales incluyen moléculas orgánicas, péptidos, miméticos de péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos que se unen a una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1 o un polipéptido sFlt-1.

También pueden usarse secuencias de ADN de sFlt-1 en el descubrimiento y desarrollo de un compuesto terapéutico para el tratamiento de preeclampsia y eclampsia. La proteína codificada, tras la expresión, puede usarse como diana para la selección de fármacos. Además, las secuencias de ADN que codifican la región amino terminal de la proteína codificada o Shine-Dalgarno u otras secuencias que facilitan la traducción del ARNm respectivo pueden usarse para construir secuencias que reducen la expresión de una secuencia codificante de sFlt-1. Tales secuencias pueden aislarse por técnicas convencionales (Ausubel y colaboradores, *supra*).

Opcionalmente, los compuestos identificados en cualquiera de los ensayos descritos anteriormente pueden confirmarse como compuestos útiles en un ensayo de compuestos que reduzcan la actividad biológica de sFlt-1 o que aumenten la actividad de una ruta de señalización de VEGF.

5 Las pequeñas moléculas de la invención preferiblemente tienen un peso molecular inferior a 2.000 Daltons, más preferiblemente comprendido entre 300 y 1.000 Daltons y aún más preferiblemente comprendido entre 400 y 700 Daltons. Se prefiere que estas moléculas pequeñas sean moléculas orgánicas.

#### **Agentes Terapéuticos que se Dirigen a la Ruta de Señalización de VEGF**

10 VEGF es un potente mitógeno específico de células endoteliales que estimula la angiogénesis, la hiperpermeabilidad vascular y la vasodilatación. Se han identificado tres receptores de señalización tirosina-quinasa para VEGF. La unión al receptor de VEGF induce una cascada de señalización que da como resultado la fosforilación de tirosina de la fosfolipasa Cy1, produciendo aumentos en los niveles intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato y aumentos en el calcio intracelular que activan la óxido nítrico sintasa para producir óxido nítrico (NO). La formación de NO activa a la guanilato ciclasa dentro de células del músculo liso vascular y células endoteliales, ocasionando la producción de GMPc. Se cree que esta cascada de NO/GMPc media los efectos vasoactivos del VEGF. Otra ruta que parece estar  
15 implicada en la mediación de los efectos vasoactivos del VEGF es la ruta de liberación de prostaciclina. VEGF induce la producción de PGI2 a través de la activación de la fosfolipasa A2 como consecuencia del inicio de la cascada de MAPK.

20 Los mayores niveles de VEGF son útiles para el tratamiento de la preeclampsia y eclampsia. Los compuestos terapéuticos que se dirigen a las rutas de señalización de VEGF, o los componentes de una ruta de señalización de VEGF, y potencia en la actividad de una ruta de señalización de VEGF también son útiles para el tratamiento de la preeclampsia y eclampsia. Tales compuestos incluyen sildenafil, análogos de prostaciclina, tales como Flolan, Remodulin y Tracleer.

#### **Compuestos de Ensayo y Extractos**

25 En general, se identifican compuestos capaces de reducir la actividad de un polipéptido sFlt-1 o aumentar la actividad de VEGF o P1GF a partir de grandes bibliotecas de productos naturales o extractos sintéticos (o semisintéticos) o bibliotecas químicas o de polipéptidos o ácidos nucleicos, de acuerdo con métodos conocidos en la materia. Los especialistas en el campo del descubrimiento y el desarrollo de fármacos entenderán que la fuente precisa de extractos o compuestos de ensayo no es crítica para el procedimiento o los procedimientos de selección de la invención. Los compuestos usados en las investigaciones pueden incluir compuestos conocidos (por ejemplo, agentes terapéuticos conocidos usados para otras enfermedades o trastornos). Como alternativa, puede investigarse prácticamente cualquier número de extractos o compuestos químicos desconocidos usando los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tales extractos o compuestos incluyen, pero sin limitación, extractos vegetales, fúngicos, procarióticos o animales, caldos de fermentación y compuestos sintéticos, así como modificaciones de compuestos existentes. También se dispone de numerosos métodos para generar  
30 síntesis aleatoria o dirigida (por ejemplo, semisíntesis o síntesis total) de cualquier número de compuestos químicos, incluyendo pero sin limitación compuestos basados en sacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos. En el mercado están disponibles bibliotecas de compuestos sintéticos en Brandon Associates (Merrimack, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) y Aldrich Chemical (Milkwaukee, Wisconsin, Estados Unidos). Como alternativa, en el mercado están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de bacterias, hongos, plantas y extractos animales de varias fuentes, incluyendo Biotics (Sussex, Reino Unido); Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch  
35 Oceanographic Institute (Ft. Pierce, Florida, Estados Unidos), y PharmaMar (Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos). Además, se producen bibliotecas naturales y sintéticas, si se desea, de acuerdo con métodos conocidos en la materia, por ejemplo, por métodos de extracción y fraccionamiento convencionales. Además, si se desea, cualquier biblioteca o compuesto se modifica fácilmente usando métodos químicos, físicos o bioquímicos convencionales.  
45

Además, los especialistas en la materia del descubrimiento y desarrollo de fármacos entenderán fácilmente que deben emplearse siempre que sea posible métodos de desreplicación (por ejemplo, desreplicación taxonómica, desreplicación biológica y desreplicación química o cualquier combinación de estas) o la eliminación de replicados o repeticiones de materiales ya conocidos por su actividad de alteración de la muda.

50 Cuando se descubre que un extracto bruto reduce la actividad de un polipéptido sFlt-1, o se une a un polipéptido sFlt-1, se necesita un fraccionamiento adicional del extracto líder positivo para aislar constituyentes químicos responsables del efecto observado. De esta manera, el objetivo del proceso de extracción, fraccionamiento y purificación es la caracterización e identificación cuidadosa de una entidad química dentro del extracto bruto que reduce la actividad de un polipéptido sFlt-1. En la materia se conocen métodos de fraccionamiento y purificación de tales extractos heterogéneos. Si se desea, los compuestos que se ha demostrado que son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de una preeclampsia o eclampsia humana se modifican químicamente de acuerdo con métodos conocidos en la materia.  
55

### Agentes Terapéuticos

La presente invención caracteriza métodos para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. Preferiblemente, el agente terapéutico se administra durante el embarazo para tratamiento o prevención de la preeclampsia o eclampsia o después de un embarazo para tratar la preeclampsia o eclampsia después del parto. Las técnicas y dosificaciones para la administración varían dependiendo del tipo de compuesto (anticuerpo, antiséptico y vector de ácido nucleico, etc.) y son bien conocidos para los especialistas en la materia o se determinan fácilmente.

Los compuestos terapéuticos de la presente invención pueden administrarse con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable en forma de dosificación unitaria. La administración puede ser parenteral, intravenosa, subcutánea, oral o local por inyección directa en el líquido amniótico. El método preferido para administrar los compuestos terapéuticos de la presente invención es la administración intravenosa por infusión continua.

La composición puede estar en forma de una píldora, comprimido, cápsula, líquido o comprimido de liberación sostenida para administración oral; o un líquido para administración intravenosa, subcutánea o parenteral; o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

Se encuentran métodos bien conocidos en la materia para fabricar formulaciones, por ejemplo en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20.<sup>a</sup> edición, A. R. Gennaro, editor, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceite de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Pueden usarse polímeros biocompatibles y biodegradables de lactida, copolímero de lactida/glicolida, o copolímeros de polioxietileno polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Pueden usarse formulaciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas de lípidos sólidos, liposomas) para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de liberación parenteral potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistema de infusión implantables y liposomas. La concentración del compuesto en la formulación varía dependiendo de varios factores que incluye la dosificación del fármaco a administrar y la vía de administración.

Opcionalmente, el compuesto puede administrarse como sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de adición de ácidos no tóxicas o complejos metálicos que se usan comúnmente en la industria farmacéutica. Los ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen ácidos orgánicos tales como ácido acético, láctico, pámico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanosulfónico, toluenosulfónico o trifluoroacético o similares; ácidos poliméricos tales como ácido tánico, carboximetilcelulosa o similares; y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o similares. Los complejos metálicos incluyen cinc, hierro y similares.

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el o los principios activos en una mezcla con excipientes no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyente inertes o cargas (por ejemplo sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo estearato de magnesio, estearato de cinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco).

También pueden proporcionarse formulaciones para uso oral como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte o como cápsulas de gelatina blanda donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso.

La dosificación y el momento de administración del compuesto dependen de varios factores clínicos que incluyen la salud general del sujeto y la gravedad de los síntomas de preeclampsia. En general, una vez que se detecta preeclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia, se usa una infusión continua de la proteína purificada para tratar o prevenir la progresión adicional del estado. El tratamiento puede continuarse durante un periodo de tiempo que varía de 1 a 100 días, más preferiblemente de 1 a 60 días y aún más preferiblemente de 1 a 20 días, o hasta que finalice el embarazo. Las dosificaciones varían dependiendo de cada compuesto y la gravedad de la afección y se titulan para conseguir una concentración en suero sanguíneo en estado estacionario que varía de 1 a 500 ng/ml de VEGF o P1GF, o ambos, preferiblemente de 1 a 100 ng/ml, más preferiblemente de 5 a 50 ng/ml y aún más preferiblemente de 5 a 10 ng/ml de VEGF o P1GF o ambos.

### Métodos para Aumentar la Expresión de Proteína VEGF o P1GF

La presente invención caracteriza métodos para aumentar los niveles de VEGF y P1GF en un sujeto al que se le ha diagnosticado preeclampsia o eclampsia. Los mayores niveles de VEGF o P1GF pueden conseguirse usando varias metodologías diferentes que se describen más adelante, entre otras.

### Proteínas Purificadas

En una realización preferida de la presente invención, se administran formas purificadas de VEGF o P1GF o ambas

al sujeto para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia.

Las proteínas VEGF o de tipo VEGF purificadas incluyen cualquier proteína con una secuencia de aminoácidos que sea homóloga, más deseablemente, sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de VEGF, o cualquier miembro de la familia de VEGF, que puede inducir la angiogénesis o que es capaz de promover el crecimiento selectivo de células endoteliales vasculares o células endoteliales de la vena umbilical. Un ejemplo de un compuesto VEGF purificado es VEGF recombinante humano de Genentech, Inc. (San Francisco, California, Estados Unidos).

Las proteínas P1GF o de tipo P1GF purificadas incluyen cualquier proteína con una secuencia de aminoácidos que sea homóloga, más deseablemente sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de P1GF, o cualquier miembro de la familia de P1GF, que puede inducir angiogénesis o que es capaz de promover el crecimiento disponible en el mercado es P1GF recombinante humano de R&D Systems (número de catálogo 264-PG, R&D Systems, Mineápolis, Minnesota, Estados Unidos). TromboGenics Ltd también está desarrollando una forma purificada de P1GF para el tratamiento de la apoplejía isquémica; supuestamente esta forma de P1GF sería eficaz para las aplicaciones descritas en la presente invención.

### 15 **Compuestos Terapéuticos que Aumentan la Actividad de VEGF o P1GF**

La presente invención proporciona el uso de cualquier compuesto que se sabe que estimula o aumenta los niveles en suero sanguíneo de VEGF o P1GF, o la actividad biológica de estos polipéptidos, para el tratamiento o prevención de la preeclampsia en un sujeto. Estos compuestos pueden usarse solos o en combinación con las proteínas purificadas descritas anteriormente o cualquiera de los otros métodos usados para aumentar los niveles de proteína VEGF o P1GF descritos en este documento.

Un ejemplo de compuesto que se ha demostrado que estimula la producción de VEGF es la nicotina. Aunque el hábito de fumar posee muchos riesgos para la salud general de una mujer embarazada y su feto en desarrollo, se cree que la propia nicotina es más segura que los cigarrillos y puede usarse para una terapia a corto plazo en sujetos de alto riesgo. Los ejemplos incluyen Nicorette (nicotina polacrilex), que es un producto de chicle de nicotina que se vende sin receta fabricado por SmithKline Beecham y NicoDerm CQ, que es un parche de nicotina que se vende sin receta fabricado por Hoechst Marion Roussel Inc. (anteriormente Marion Merrell Dow). La nicotina liberada por el tabaco se excluye específicamente de los métodos de la invención en los que el paciente no se ha diagnosticado usando los métodos de la invención.

La nicotina se administra después del diagnóstico de preeclampsia o eclampsia usando el parche o el chicle. Las dosificaciones varían dependiendo de la gravedad del estado y de la salud general del sujeto. En general, se siguen las instrucciones del fabricante para conseguir un nivel de nicotina en suero que varía de 5 a 500 ng/ml, más preferiblemente de 5 a 100 ng/ml, y aún más preferiblemente de 50 a 100 ng/ml.

La teofilina es otro ejemplo de un compuesto adicional que puede usarse para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia. La teofilina es un broncodilatador que se usa a menudo para el tratamiento del asma y está disponible con muchos nombres comerciales (por ejemplo, Aerolate Sr, Asmalix, Elixophyllin, etc.) así como el genérico. Los métodos de administración y las dosificaciones variarán con cada fabricante y se eligen basándose en la salud general del sujeto y la gravedad del estado. En general, las dosis diarias varían de 1 a 500 mg, más preferiblemente de 100 a 400 mg y aún más preferiblemente de 250 a 350 mg administrados dos veces al día para conseguir un nivel en suero de teofilina de 5 a 50 µg/ml.

La adenosina es otro ejemplo de un compuesto adicional que puede usarse para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia. La adenosina (Fujisawa Pharmaceutical Co.) se usa comúnmente como fármaco antihipertensivo. Los métodos de administración y las dosificaciones varían con cada fabricante y se eligen basándose en la salud general del sujeto y la gravedad de la afección. En general, una dosis diaria de 50 mg/kg administrada dos veces al día es típica para la adenosina.

La nifedipina es otro ejemplo de un compuesto adicional que puede usarse para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia. La nifedipina (Bayer Pharmaceuticals) se usa comúnmente como fármaco antihipertensivo. Los métodos de administración y las dosificaciones varían con cada fabricante y se eligen basándose en la salud general del sujeto y la gravedad de la afección. En general, una dosificación diaria de 1-2 mg/kg administrado dos veces al día por vía oral o por vía subcutánea es típica para la nifedipina.

El minoxidil es otro ejemplo de un compuesto adicional que puede usarse para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia. El minoxidil (Pfizer, Inc.) se usa comúnmente como fármaco antihipertensivo. Los métodos de administración y las dosificaciones varían con cada fabricante y se eligen basándose en la salud general del sujeto y la gravedad de la afección. En general, una dosificación diaria de 0,25 a 1,0 mg/kg administrado dos veces al día por vía oral o subcutánea es típica para el minoxidil.

El sulfato de magnesio es otro ejemplo de un compuesto adicional que puede usarse para tratar o prevenir la

preeclampsia o eclampsia. El sulfato de magnesio es un fármaco genérico que se usa típicamente como fármaco antihipertensivo. Los métodos de administración y las dosificaciones varían con cada fabricante y se eligen basándose en la salud general del sujeto y la gravedad de la afección. En general, una dosificación diaria de 1-2 g administrados por vía intravenosa cada cuatro horas es una dosificación típica para el sulfato de magnesio.

- 5 Además del uso de compuestos que pueden aumentar los niveles en suero de VEGF o P1GF, la invención proporciona el uso de cualquier medicación para la hipertensión crónica usada en combinación con cualquiera de los compuestos dirigidos a VEGF o P1GF. Las medicaciones usadas para el tratamiento de la hipertensión durante el embarazo incluyen metildopa, clorhidrato de hidralazina o labetalol. Para cada una de estas medicaciones, los modos de administración y las dosificaciones se determinan por el médico y por las instrucciones del fabricante.

## 10 **Ácidos Nucleicos Terapéuticos**

Un trabajo reciente ha demostrado que el suministro de ácido nucleico (ADN o ARN) capaz de expresar un mitógeno de células endoteliales tal como VEGF en el sitio de una lesión de un vaso sanguíneo inducirá la proliferación y reendotelización del vaso lesionado. Aunque la presente invención no se refiere a lesiones de vasos sanguíneos, en la presente invención también pueden emplearse las técnicas para suministrar ácidos nucleicos que codifican mitógenos de células endoteliales tales como VEGF y P1GF usados en estos estudios. Estas técnicas se describen en las patentes de EE. UU. 5,830,879 y 6,258,787 y se incorporan en este documento por referencia.

En la presente invención el ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico (ADN o ARN) incluyendo ADN genómico, ADNc y ARNm, que codifica VEGF o P1GF o cualquier miembro de la familia de VEGF o P1GF. El ácido nucleico también puede incluir cualquier ácido nucleico que codifique una proteína que se ha demostrado que se une al receptor sFlt-1. Los ácidos nucleicos que codifican la proteína deseada pueden obtenerse usando procedimientos rutinarios en la materia, por ejemplo ADN recombinante o amplificación por PCR.

### **Ácidos Nucleicos Terapéuticos que Inhiben la Expresión de sFlt-1**

La presente invención se refiere también al uso de oligómeros de nucleobases antisentido para regular negativamente la expresión del ARNm de sFlt-1 directamente. Por medio de la unión a la secuencia de ácido nucleico complementaria (la cadena con sentido o codificante), los oligómeros de nucleobases antisentido pueden inhibir la expresión de proteínas supuestamente por medio de la escisión enzimática de la cadena de ARN por la ARNasa H. Preferiblemente, el oligómero de nucleobases antisentido puede reducir la expresión de la proteína sFlt-1 en una célula que expresa niveles en exceso de sFlt-1. Preferiblemente, la reducción de la expresión de la proteína sFlt-1 es de al menos un 10% con respecto a las células tratadas con un oligonucleótido de control, más preferiblemente de un 25% y aún más preferiblemente de un 50% o mayor. En la materia son bien conocidos los métodos para seleccionar y preparar oligómeros de nucleobases antisentido. Como ejemplo del uso de oligómeros de nucleobases antisentido para regular negativamente la expresión de VEGF, véase la patente de EE. UU. 6,410,322, incorporada en este documento por referencia. En la materia también son bien conocidos los métodos para evaluar los niveles de expresión de proteínas e incluyen transferencia Western, inmunoprecipitación y ELISA.

La presente invención también se refiere al uso de interferencia de ARN (ARNi) para inhibir la expresión de sFlt-1. La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo descubierto recientemente de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en el que un ARN bicatenario (ARNbc) que corresponde a un gen o ARNm de interés se introduce en un organismo dando como resultado la degradación del ARNm correspondiente. En la reacción de ARNi, tanto la cadena con sentido como la cadena antisentido de una molécula de ARNbc se procesan en fragmentos de ARN pequeños o segmentos que varían en longitud de 21 a 23 nucleótidos (nt) y que tienen colas 3' de dos nucleótidos. Como alternativa, pueden sintetizarse, purificarse y usarse en la reacción ARNbc sintéticos que tienen una longitud de 21 a 23 nt y que tienen colas 3' de 2 nucleótidos. Estos ARNbc de 21 a 23 nt se conocen como "ARN guía" o "ARN interferentes cortos" (ARNic).

Después los dúplex de ARNbc se unen a un complejo de nucleasa compuesto de proteínas que dirigen y destruyen el ARNm endógeno que tiene homología con ARNbc dentro del complejo. Aunque la identidad de las proteínas dentro del complejo sigue sin estar clara, la función del complejo es dirigirse a la molécula de ARNm homóloga por medio de interacciones de emparejamiento de bases entre una de las cadenas del ARNbc y el ARNm endógeno. El ARNm después se escinde a una distancia de aproximadamente 12 nt del extremo 3' del ARNbc y se degrada. De esta manera, pueden dirigirse y degradarse genes específicos, consiguiéndose de esta manera una pérdida de expresión de proteína del gen diana.

En la publicación de PCT N.º WO 01/75164 (incorporada a la presente por referencia) se describen los requisitos y modificaciones específicas de ARNbc. Aunque las moléculas de ARNbc pueden variar en longitud, lo más preferible es usar moléculas de ARNbc que sean ARNbc de 21 a 23 nucleótidos con extremos 3' salientes de 2 a 3 nucleótidos típicamente (2'-desoxi)timidina o uracilo. Los ARNbc típicamente comprenden un grupo hidroxilo 3'. También pueden usarse ARNbc monocatenarios así como formas de extremos romos de ARNbc. Además, para mejorar adicionalmente la estabilidad de ARN, los salientes 3' pueden estabilizarse frente a la degradación. En una de estas realizaciones, el ARN se estabiliza incluyendo nucleótidos de purina, tales como adenosina o guanosina. Como

alternativa, se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de salientes de 2 nucleótidos de uridina por (2'-desoxi)timidina y no afecta a la eficacia del ARNi. La ausencia de un grupo 2' hidroxilo mejora significativamente la resistencia a nucleasas del saliente en un medio de cultivo de tejidos.

5 Como alternativa, puede prepararse ARNic usando cualquiera de los métodos indicados en la publicación de PCT N.º WO 01/75164 (incorporada a la presente por referencia) o usando procedimientos convencionales para la transcripción *in vitro* de ARN y procedimientos de templado de ARNbc como se describe en Elbashir y colaboradores, (*Genes & Dev.*, 15:188-200, 2001). También se obtiene ARNic como se describe en Elbashir y colaboradores por incubación de ARNbc que corresponde a una secuencia del gen diana en un lisado de *Drosophila* sin células procedente de embriones de *Drosophila* de blastodermo sincitial en condiciones en las que ARNbc se procesa para generar ARNic de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos, que después se aíslan usando técnicas conocidas por los especialistas en la materia. Por ejemplo, puede usarse electroforesis en gel para separar los ARN de 21-23 nt y los ARN después pueden eluirse de los cortes de gel. Además, puede usarse cromatografía (por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaños), centrifugación en gradiente de glicerol y purificación por afinidad con anticuerpos para aislar los ARN de 21 a 23 nt.

15 En la presente invención, el ARNbc o ARNic es complementario a la secuencia de ARNm de ARNm de sFlt-1 y puede reducir o inhibir la expresión de sFlt-1. Preferiblemente, la reducción de la expresión de la proteína sFlt-1 es de al menos un 10% con respecto a las células tratadas con ARNbc o ARNic de control, más preferiblemente de un 25% y aún más preferiblemente de al menos un 50%. En la materia también son bien conocidos los métodos para evaluar los niveles de expresión de proteína e incluyen transferencia Western, inmunoprecipitación y ELISA.

20 En la presente invención, los ácidos nucleicos usados incluyen cualquier modificación que mejora la estabilidad o función del ácido nucleico de cualquier manera. Los ejemplos incluyen modificaciones en el esqueleto de fosfato, el enlace internucleótido o el resto de azúcar.

Para simplificar la manipulación y manejo del ácido nucleico que codifica la proteína de unión de sFlt-1, el ácido nucleico preferiblemente se inserta en un cassette donde se une operativamente a un promotor. El promotor debe ser capaz de dirigir la expresión de la proteína de unión de sFlt-1 en la célula hospedadora diana deseada. La selección de promotores apropiados puede realizarse fácilmente. Preferiblemente, se usaría un promotor de alta expresión. Un ejemplo de un promotor adecuado es el promotor de citomegalovirus (CMV) de 763 pares de bases. También puede usarse el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Davis, y colaboradores, *Hum. Gene Ther.* 4: 151-159, 1993) y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Ciertas proteínas pueden expresarse usando su promotor nativo. También pueden incluirse otros elementos que pueden aumentar la expresión (por ejemplo, potenciadores o un sistema que tiene como resultado altos niveles de expresión tal como un gen *tat* y un elemento *tar*). El vector recombinante puede ser un vector plasmídico tal como pUC118, pBR322 u otros vectores plasmídicos conocidos que incluyen, por ejemplo, un origen de replicación *E. coli* (véase Sambrook, y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El vector plasmídico también puede incluir un marcador selectivo tal como el gen de la  $\beta$ -lactamasa para resistencia a ampicilina, siempre que el marcador polipeptídico no afecte adversamente al metabolismo del organismo que se va a tratar. El cassette también puede unirse a un resto de unión de ácido nucleico en un sistema de suministro sintético, tal como el sistema descrito en la publicación de PCT N.º WO 95/22618.

40 El ácido nucleico puede introducirse en las células por cualquier medio apropiado para el vector empleado. En la materia son bien conocidos muchos de estos métodos (Sambrook y colaboradores, *supra*, y Watson y colaboradores, *"Recombinant DNA"*, Capítulo 12, 2.ª edición, Scientific American Books, 1992). Los vectores recombinantes pueden transferirse por métodos tales como precipitación con fosfato cálcico, electroporación, transfección mediada por liposomas, pistola génica, microinyección, transferencia mediada por cápsidas virales, transferencia mediada por polibreno o fusión de protoblastos. Como revisión de los procedimientos para la preparación de liposomas, dirección y suministro del contenido, véase Mannino y Gould-Fogerite, (*Bio Techniques*, 6:682-690, 1988), Felgner y Holm (*Bethesda Res. Lab. Focus*, 11:21, 1989) y Maurer (*Bethesda Res. Lab. Focus*, 11:25, 1989).

La transferencia del vector recombinante (el vector plasmídico o vectores virales) puede realizarse por medio de inyección directa en el líquido amniótico o suministro intravenoso.

50 También puede usarse el suministro de genes usando vectores adenovirales o vectores asociados a adeno (AAV). Los adenovirus están presentes en un gran número de especies animales, no son muy patógenos y pueden replicarse igualmente bien en células en división y quiescentes. Por norma general, los adenovirus usados para el suministro de genes carecen de uno o más genes requeridos para la replicación viral. Pueden producirse vectores adenovirales recombinantes con defectos de replicación utilizados para el suministro de VEGF, P1GF o cualquier proteína de unión de sFlt-1, de acuerdo con métodos conocidos en la materia (véase Quantin y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 89: 2581-2584, 1992; Stratford-Perricadet y colaboradores, *J Clin. Invest.*, 90:626-630, 1992; y Rosenfeld y colaboradores, *Cell*, 68:143-155, 1992). Como ejemplo del uso de terapia génica *in utero*

véase la patente de EE. UU. 6,399,585.

Están disponibles varios métodos para transfección o introducción de ARNbc u oligonucleótidos en células de mamífero. Por ejemplo, hay varios reactivos de transfección disponibles en el mercado incluyendo, pero sin limitación: TransIT-TKO™ (Mirus, Cat. N.º MIR 2150), Transmessenger™ (Qiagen, Cat. N.º 301525), y Oligofectamine™ (Invitrogen, Cat. N.º MIR12252-011). Están disponibles protocolos para cada reactivo de transfección en el fabricante.

Una vez transferido, el ácido nucleico se expresa por las células en el sitio de la lesión durante un periodo de tiempo suficiente para aumentar los niveles en suero sanguíneo de VEGF, P1GF o cualquier otra proteína de unión a sFlt-1. Como los vectores que contienen el ácido nucleico normalmente no se incorporan en el genoma de las células, la expresión de la proteína de interés tiene lugar sólo durante un periodo de tiempo limitado. Típicamente, la proteína se expresa a niveles terapéuticos durante aproximadamente dos días a varias semanas, preferiblemente durante aproximadamente una a dos semanas. Puede utilizarse una reaplicación del ADN para proporcionar periodos adicionales de expresión de la proteína terapéutica. Pueden encontrarse ejemplos recientes de terapia génica usando VEGF para el tratamiento de la enfermedad vascular en mamífero en Deodato y colaboradores (*Gene Ther.*, 9:777-785, 2002); Isner y colaboradores (*Human Gene Ther.*, 12:1593-1594, 2001); Lai y colaboradores (*Gene Ther.*, 9:804-813, 2002); y revisado en Freedman e Isner (*Ann. Intern. Med.*, 136:54-71, 2002) e Isner JM (*Nature*, 415:234-239, 2002).

### Ensayos para la Expresión de Genes y Proteínas

Los siguientes métodos pueden usarse para evaluar la expresión de proteínas o genes y determinar la eficacia para cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para aumentar los niveles de VEGF, P1GF o cualquier otra proteína de unión a sFlt-1, o para reducir los niveles de la proteína sFlt-1.

Se miden los niveles de VEGF, P1GF o cualquier ligando proteico que se sabe que se une a sFlt-1 en suero sanguíneo del sujeto. Los métodos usados para medir los niveles en suero de proteínas incluyen ELISA, transferencia Western o inmunoensayos que usan anticuerpos específicos. Además, pueden realizarse ensayos de angiogénesis *in vitro* para determinar si la sangre del sujeto se ha convertido desde un estado antiangiogénico a un estado proangiogénico. Tales ensayos se describen anteriormente en el Ejemplo 2. Un resultado positivo se considera un aumento de al menos un 20%, preferiblemente un 30%, más preferiblemente al menos un 50% y aún más preferiblemente al menos un 60% en los niveles en suero de VEGF, P1GF o cualquier ligando proteico que se sabe que se une a sFlt-1. Un resultado positivo también puede considerarse la conversión desde un estado antiangiogénico a un estado proangiogénico usando el ensayo de angiogénesis *in vitro*.

Hay varios métodos conocidos en la materia para evaluar la expresión génica. Algunos ejemplos incluyen la preparación de ARN a partir de las muestras de sangre de un sujeto y el uso de la ARN para transferencia Northern, amplificación basada en PCR o ensayos de protección de ARNasa.

### Uso de Anticuerpos para el Tratamiento Terapéutico

Los niveles elevados de sFlt-1 encontrado en las muestras de suero extraídas de mujeres embarazadas que padecen preeclampsia sugieren que sFlt-1 está actuando como una "fosa fisiológica" para unirse a y reducir las células del trofoblasto y las células endoteliales maternas del VEGF y P1GF funcionales. El uso de compuestos, tales como anticuerpos, para unirse a sFlt-1 y bloquear la unión de VEGF o P1GF puede ayudar a prevenir o tratar la preeclampsia o eclampsia, produciendo un aumento en los niveles de VEGF o P1GF libre. Tal aumento permitiría un aumento en la proliferación de trofoblastos, migración y angiogénesis requerida para el desarrollo placentario y nutrición fetal, y para la salud de las células endoteliales maternas sistémicas.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente al dominio de unión al ligando de sFlt-1. Los anticuerpos se usan para inhibir sFlt-1 y se cree que el mecanismo más eficaz es por medio del bloqueo directo de los sitios de unión para VEGF o P1GF, sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos. Se describen métodos para la preparación y uso de anticuerpos para fines terapéuticos en varias patentes incluyendo las patentes de EE. UU. 6,054,297; 5,821,337; 6,365,157; y 6,165,464 y se incorporan a la presente por referencia. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; se prefieren los anticuerpos monoclonales.

Se han usado anticuerpos monoclonales, particularmente los derivados de roedores incluyendo ratones, para el tratamiento de diversas enfermedades; sin embargo, hay limitaciones en su uso incluyendo la inducción de respuestas de inmunoglobulina humana antiratón que produce una eliminación rápida y una reducción en la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, una limitación importante en el uso clínico de anticuerpos monoclonales de roedor es una respuesta antiglobulina durante la terapia (Miller y colaboradores, *Blood*, 62:988-995, 1983; Schroff y colaboradores, *Cancer Res.*, 45:879-885, 1985).

La materia ha intentado solucionar este problema construyendo anticuerpos "quiméricos" en los que un dominio variable de unión a un antígeno animal se acopla a un dominio constante humano (patente de EE. UU. 4,816,567;

Morrison y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 81:6851-6855, 1984; Boulianne y colaboradores, *Nature* 312:643-646, 1984; Neuberger y colaboradores, *Nature*, 314:268-270, 1985). Más adelante se describe la producción y uso de tales anticuerpos quiméricos.

5 La inhibición competitiva de la unión de un ligando a sFlt-1 es útil para la prevención o tratamiento de la preeclampsia o eclampsia. Los anticuerpos dirigidos al sFlt-1 pueden bloquear la unión de VEGF o P1GF a sFlt-1 dando como resultado mayores niveles de VEGF o P1GF. Tal aumento puede dar como resultado un rescate de la disfunción endotelial y un desplazamiento en el equilibrio de factores proangiogénicos/antiangiogénicos hacia la angiogénesis.

10 Una mezcla de los anticuerpos monoclonales de la presente invención puede usarse como tratamiento eficaz para la preeclampsia o eclampsia. La mezcla puede incluir solo 2, 3 o 4 anticuerpos diferentes o tantos como 6, 8 o 10 anticuerpos diferentes. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden combinarse con un fármaco antihipertensivo (por ejemplo, metildopa, clorhidrato de hidralazina o labetalol) o cualquier otra medicación usada para tratar la preeclampsia, eclampsia o los síntomas asociados con la preeclampsia o eclampsia.

#### *Preparación de Anticuerpos*

15 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).

20 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.

25 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.

30 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., Nueva York, pp. 51-63, 1987).

35 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.

40 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.

55 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.

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*

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).

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  $\mu$ m Vydac C4 PrepPAK.

#### *Equivalentes Funcionales de Anticuerpos*

La invención también incluye 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. 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, cada uno de los cuales se incorporan a la presente por referencia; 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')<sub>2</sub> 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 Verhoeyen 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).

5 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 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Cuando no se necesita la actividad citotóxica, tal como en la presente invención, el dominio constante preferiblemente es de la clase IgG<sub>2</sub>. 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.

10 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.

25 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<sub>H</sub>) encadenado a al menos un fragmento de una secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo (V<sub>L</sub>) 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<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> 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<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> se une covalentemente por tal enlazador peptídico al extremo de aminoácido de una secuencia de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> 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')<sub>2</sub>. 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.

#### *Preparación de Equivalentes Funcionales de Anticuerpos*

5 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.

10 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.

15 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.

#### 20 *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 de tales técnicas en los Ejemplos II y III de la patente de los EE.UU. N.º 6 365 157, incorporada a la presente por referencia.

#### 25 *Usos Terapéuticos de Anticuerpos*

30 Cuando se usan *in vivo* para el tratamiento o prevención de la preeclampsia o eclampsia, los anticuerpos de la presente invención se administran al sujeto en cantidades terapéuticamente eficaces. Preferiblemente, los anticuerpos se administran por vía parenteral o intravenosa por infusión continua. La dosis y el régimen de dosificación dependen de la gravedad de la enfermedad, y del estado de salud general del sujeto. La cantidad de anticuerpo administrado típicamente está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto.

35 Para la administración parenteral, los anticuerpos se formulan en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión) en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son intrínsecamente no tóxicos y no terapéuticos. Son ejemplos de tales vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También pueden usarse vehículos no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo. Como vehículos también pueden usarse liposomas. El vehículo puede contener cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que aumenten la isotonicidad y la estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes. Los anticuerpos típicamente se formulan en tales vehículos a concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml a 10 mg/ml.

#### 40 **Compuestos Terapéuticos que Inhiben sFlt-1**

45 Dado que los niveles de sFlt-1 están elevados en sujetos que tienen preeclampsia, eclampsia o que tienen propensión a desarrollar tales afecciones, cualquier agente que disminuya la expresión de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de sFlt-1 es útil en los métodos de la invención. Tales agentes incluyen moléculas pequeñas que pueden alterar la unión de sFlt-1 a VEGF o P1GF, oligómeros de nucleobases antisentido y ARNbc usados para mediar la interferencia del ARN.

#### **Terapias de Combinación**

50 Opcionalmente, puede administrarse un agente terapéutico para la preeclampsia o eclampsia en combinación con cualquier otra terapia convencional para la preeclampsia o eclampsia; tales métodos son conocidos para el especialista en la materia y se describen en este documento. Un agente terapéutico para la preeclampsia o eclampsia de la invención puede administrarse en combinación con cualquier compuesto que aumente la actividad de una ruta de VEGF. Los ejemplos no limitantes de agentes que también inducen la producción de VEGF endógena incluyen nicotina, minoxidil, nifedipina, adenosina, sulfato de magnesio y teofilina. En una realización, puede usarse la proteína P1GF en combinación con cualquiera de los agentes que inducen la producción de VEGF endógeno

indicados anteriormente.

### El Control de los Sujetos

5 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, VEGF o P1GF presentes en los fluidos corporales, tales como orina, plasma, líquido amniótico o LCR. 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. Se consideran particularmente útiles en la invención agentes terapéuticos que reducen la expresión de una molécula de ácido nucleico o polipéptido sFlt-1 o que aumenta la expresión de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de VEGF o P1GF.

### 10 Otras realizaciones

A partir de la descripción anterior, es evidente que se pueden realizar variaciones y modificaciones en la invención descrita en la presente para adaptarla a usos y condiciones diferentes.

También se describen:

15 (1) Un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto capaz de unirse al receptor Flt-1 soluble (sFlt-1), donde dicha administración se realiza durante un periodo de tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o prevenir dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

20 (2) Un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto que aumenta el nivel de un factor de crecimiento capaz de unirse a sFlt-1, donde dicha administración se realiza durante un periodo de tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

(3) El método de (2), donde dicho compuesto es nicotina.

(4) El método de (2), donde dicho compuesto es teofilina.

25 (5) El método de (2), donde dicho compuesto se selecciona entre el grupo compuesto por adenosina, nifedipina y minoxidil.

(6) El método de (1), donde dicho compuesto es anticuerpo sFlt-1 purificado o un fragmento de unión al antígeno de sFlt-1.

30 (7) Un método para tratar o prevenir la pre-eclampsia o eclampsia en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho sujeto un oligómero de nucleobases antisentido complementario a al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1, donde dicha administración es suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

(8) El método de (7), donde dicho oligómero de nucleobases antisentido tiene una longitud de 8 a 30 nucleótidos.

35 (9) Un método para tratar o prevenir la pre-eclampsia o eclampsia en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho sujeto un ARN de doble hélice que comprende al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1, donde la administración es suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

(10) El método de (9), donde dicho ARN de doble hélice se procesa en ARN de interferencia pequeños (ARNip) de 19 a 25 nucleótidos de longitud.

(11) El método de (1) o (2), donde dicho compuesto es un factor de crecimiento.

40 (12) El método de (11), donde dicho factor de crecimiento es un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

(13) El método de (11), donde dicho factor de crecimiento es VEGF121.

(14) El método de (11), donde dicho factor de crecimiento es VEGF165.

(15) El método de (11), donde dicho factor de crecimiento es el factor de crecimiento placentario (P1GF).

45 (16) El método de (1), (2), (7) o (9), que comprende además la etapa de administrar a un sujeto un compuesto antihipertensivo.

(17) El método de (1), (2), (7) o (9), donde dicho sujeto es una mujer embarazada.

(18) El método de (1), (2), (7) o (9), donde dicho sujeto es una mujer después del parto.

(19) El método de (1), (2), (7) o (9), donde dicho sujeto no es humano.

50 (20) El método de (19), donde dicho sujeto se selecciona entre el grupo compuesto por una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato.

(21) Un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido VEGF o P1GF.

(22) El método de (21), donde dicha composición comprende un polipéptido VEGF.

55 (23) El método de (21), donde dicha composición comprende un polipéptido P1GF.

(24) Un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica VEGF o P1GF.

(25) El método de (24), donde dicha composición comprende una molécula de ácido nucleico de VEGF.

- (26) El método de (24), donde dicha composición comprende una molécula de ácido nucleico de P1GF.
- (27) Un método para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, comprendiendo dicho método el paso de administrar a dicho sujeto un compuesto que inhibe el factor de crecimiento que se une a un polipéptido sFlt-1, donde dicha donde dicha administración es suficiente para tratar o prevenir la preeclampsia o eclampsia en un sujeto.
- (28) El método de (27), donde dicho compuesto se une a sFlt-1 y bloquea la unión del factor de crecimiento.
- (29) El método de (21), (24) o (27), que comprende además el paso de administrar a un sujeto un compuesto antihipertensivo.
- (30) El método de (21), (24) o (27), donde dicho sujeto es una mujer embarazada.
- (31) El método de (21), (24) o (27), donde dicho sujeto es una mujer después del parto.
- (32) El método de (21), (24) o (27), donde dicho sujeto no es humano.
- (33) El método de (32), donde dicho sujeto se selecciona del grupo compuesto por una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato.
- (34) Un método para diagnosticar a un sujeto preeclampsia o eclampsia o la propensión a desarrollarlas, comprendiendo dicho método medir el nivel del polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF en una muestra de dicho sujeto.
- (35) Un método para diagnosticar a un sujeto preeclampsia o eclampsia o la propensión a desarrollarlas, midiendo los niveles de al menos dos de los polipéptidos sFlt-1, VEGF y P1GF en una muestra de dicho sujeto y calculando la relación entre dichos niveles de sFlt-1, VEGF o P1GF utilizando una métrica, en donde una alteración en la relación entre dichos niveles en la muestra del sujeto en relación con una muestra de referencia, diagnostica preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.
- (36) El método de (35), donde dicha métrica es un índice antiangiogénico de preeclampsia (PAAI) :  $[sFlt-1/VEGF + P1GF]$ .
- (37) El método de (36), donde un valor de PAAI mayor de 20 es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- (38) El método de (34) o (35), donde dicha medición se realiza usando un ensayo inmunológico.
- (39) El método de (38), donde dicho ensayo inmunológico es un ELISA.
- (40) El método de (34) o (35), donde dicha muestra es suero.
- (41) El método de (34) o (35), donde un nivel de sFlt-1 mayor de 2 ng/ml es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- (42) El método de (34) o (35), donde el nivel de sFlt-1 es el nivel de sFlt-1 libre, unido o total.
- (43) El método de (34) o (35), donde el nivel de VEGF o P1GF es el nivel de VEGF o P1GF libre.
- (44) Un método para diagnosticar a un sujeto preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollarlas, comprendiendo dicho método medir el nivel de una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF en una muestra de dicho sujeto y compararlo con una muestra de referencia, donde una alteración en dichos niveles diagnostica preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto, o diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
- (45) Un método para diagnosticar a un sujeto preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollarlas, comprendiendo dicho método determinar la secuencia de ácido nucleico de un gen sFlt-1, VEGF o P1GF en una muestra de un sujeto y compararla con una secuencia de referencia, donde una alteración en la secuencia de ácido nucleico del sujeto que sea una alteración que modifique el nivel de expresión del producto génico en dicho sujeto diagnostica al sujeto preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
- (46) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicha muestra es un fluido corporal de dicho sujeto en el que normalmente se puede detectar dicho sFlt-1, VEGF o P1GF.
- (47) El método de (46), donde dicho fluido se selecciona entre el grupo compuesto por orina, líquido amniótico, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo.
- (48) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicha muestra es una célula.
- (49) El método de (48), donde dicha célula es una célula endotelial.
- (50) El método de (48), donde dicha célula es un leucocito.
- (51) El método de (48), donde dicha célula es un monocito.
- (52) El método de (48), donde dicha célula es una célula derivada de la placenta.
- (53) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicha muestra es un tejido.
- (54) El método de (53), donde dicho tejido es un tejido placentario.
- (55) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicho sujeto es una mujer no embarazada y el método diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
- (56) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicho sujeto es una mujer embarazada.
- (57) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicho sujeto es una mujer después del parto.
- (58) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicho sujeto no es humano.
- (59) El método de (34), (35), (44) o (45), donde dicho sujeto no es humano y se selecciona entre el grupo compuesto por una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato.
- (60) El método de (34), (35), (44) o (45), donde al menos uno de dichos niveles medidos es el nivel de sFlt-1.
- (61) El método de (34), (35), (44) o (45), donde cuando se mide el nivel de VEGF entonces también se mide el nivel de sFlt-1 o P1GF.
- (62) El método de (34), (35), (44) o (45), donde un aumento en el nivel de ácido nucleico o polipéptido sFlt-1 con respecto a una referencia es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.

- (63) El método de (34), (35), (44) o (45), donde una reducción en el nivel de ácido nucleico o polipéptido VEGF libre con respecto a una referencia es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- (64) El método de (34), (35), (44) o (45), donde una reducción en el nivel de ácido nucleico o polipéptido P1GF libre con respecto a una referencia es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- 5 (65) El método de (34), (35) o (44), donde dicha medición de los niveles se realiza en dos o más ocasiones y un cambio en dichos niveles entre las mediciones es un indicador de diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- (66) Un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo compuesto por una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF y P1GF o una secuencia complementaria a esta, o cualquier combinación de estas.
- 10 (67) El kit de (66), donde dicha secuencia de ácido nucleico comprende al menos dos sondas de ácido nucleico para la detección de dicha molécula de ácido nucleico.
- (68) Un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende un medio para detectar un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF, o cualquier combinación de estos.
- (69) El kit de (68), donde dicho medio de detección se selecciona entre el grupo compuesto por un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático y un ensayo colorimétrico.
- 15 (70) El kit de (66) o (68), donde dicho kit diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en una mujer embarazada o no embarazada.
- (71) El kit de (66) o (68), donde dicho kit detecta sFlt-1.
- (72) El kit de (66) o (68), donde dicho kit detecta P1GF.
- 20 (73) El kit de (66) o (68), donde cuando dicho kit detecta VEGF, entonces también se detecta sFlt-1 o P1GF.
- (74) Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula que expresa una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión de dicha molécula de ácido nucleico en dicha célula que ha entrado en contacto con dicho compuesto candidato con el nivel de expresión en una célula de control que no ha
- 25 entrado en contacto con dicho compuesto candidato, donde una alteración en la expresión de dicha molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o P1GF identifica que dicho compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.
- (75) El método de (74), donde dicha alternación es una reducción en el nivel de sFlt-1.
- (76) El método de (74), donde dicha alternación es un aumento en el nivel de VEGF o P1GF.
- 30 (77) El método de (74), donde dicha alteración en la expresión es una alternación en la transcripción.
- (78) El método de (74), donde dicha alteración en la expresión es una alternación en la traducción.
- (79) Una composición farmacéutica que incluye un polipéptido VEGF o P1GF o una porción de este, y un compuesto que reduce la hipertensión formulados en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (80) Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de P1GF o una porción de esta, formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un mamífero
- 35 embarazado.
- (81) La composición de (79), que comprende además una molécula de ácido nucleico de VEGF o una porción de esta.
- (82) Una composición que comprende un anticuerpo purificado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a sFlt-1.
- 40 (83) La composición de (82), donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno previene la unión de un factor de crecimiento sFlt-1.
- (84) La composición de (82), donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- (85) La composición de (82), donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo
- 45 humano o humanizado.
- (86) La composición de (82), donde dicho anticuerpo carece de una porción Fc.
- (87) La composición de (82), donde dicho anticuerpo es un F(ab')<sub>2</sub>, un Fab o una estructura Fv.
- (88) La composición de (82), donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este está presente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 (89) Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula que expresa un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión de dicho polipéptido en dicha célula que ha entrado en contacto con dicho compuesto candidato con el nivel de expresión del polipéptido en una célula de control que no ha entrado en contacto con dicho compuesto candidato, donde una alteración en la expresión de dicho polipéptido sFlt-1, VEGF o
- 55 P1GF identifica que dicho compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.
- (90) El método de (89), donde dicha alteración en la expresión se ensaya usando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático o un inmunoensayo.
- (91) El método de (89), donde dicha alteración en la expresión es una reducción en el nivel de sFlt-1.
- (92) El método de (89), donde dicha alteración en la expresión es un aumento en el nivel de VEGF o P1GF.
- 60 (93) Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, comprendiendo el método poner en contacto una célula que expresa un polipéptido sFlt-1, VEGF o P1GF con un compuesto candidato, y comparar la actividad biológica de dicho polipéptido en dicha célula que ha entrado en contacto con dicho compuesto candidato con el nivel de actividad biológica en una célula de control que no ha entrado en contacto con dicho compuesto candidato, donde una alteración en la actividad biológica de dicho polipéptido sFlt-1, VEGF o

P1GF identifica que dicho compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.

(94) El método de (93), donde dicha alteración en la actividad biológica es una reducción en la actividad de sFlt-1.

(95) El método de (93), donde dicha alteración en la actividad biológica es un aumento en la actividad de VEGF o P1GF.

5 (96) El método de (93), donde dicha alteración en la actividad biológica se ensaya usando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático o un inmunoensayo.

(97) Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, comprendiendo dicho método detectar la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento en presencia de un compuesto candidato, donde una reducción en dicha unión, en relación con la unión entre dicho polipéptido sFlt-1 y dicho factor de crecimiento en ausencia de dicho compuesto candidato identifica que dicho compuesto candidato es un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.

10 (98) Un método para identificar un polipéptido o un fragmento de este, que previene la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento, comprendiendo dicho método detectar la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento en presencia de dicho polipéptido candidato, donde una reducción en dicha unión, en relación con la unión entre dicho polipéptido sFlt-1 y dicho factor de crecimiento en ausencia de dicho polipéptido candidato identifica que dicho polipéptido candidato es un polipéptido que previene la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un factor de crecimiento.

(99) El método de (97) o (98), donde dicho factor de crecimiento es VEGF.

(100) El método de (97) o (98), donde dicho factor de crecimiento es P1GF.

20 (101) Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, que comprende detectar la unión entre un polipéptido sFlt-1 y un compuesto candidato, donde un compuesto que se une a dicho polipéptido sFlt-1 mejora la preeclampsia o eclampsia.

(102) Un compuesto identificado de acuerdo con el método de (101), donde dicho compuesto comprende un polipéptido que se une específicamente a un polipéptido sFlt-1 y previene que dicho polipéptido sFlt-1 se una a VEGF o P1GF.

25 (103) El compuesto de (102), donde dicho polipéptido es un anticuerpo.

(104) El compuesto de (102), donde dicho polipéptido es un fragmento de sFlt-1, VEGF o PLGF.

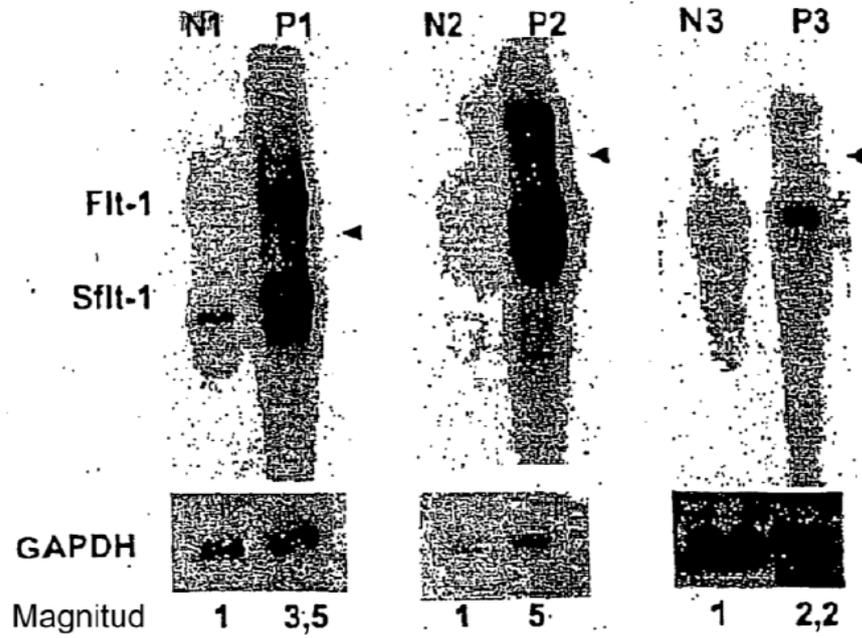
30

## REIVINDICACIONES

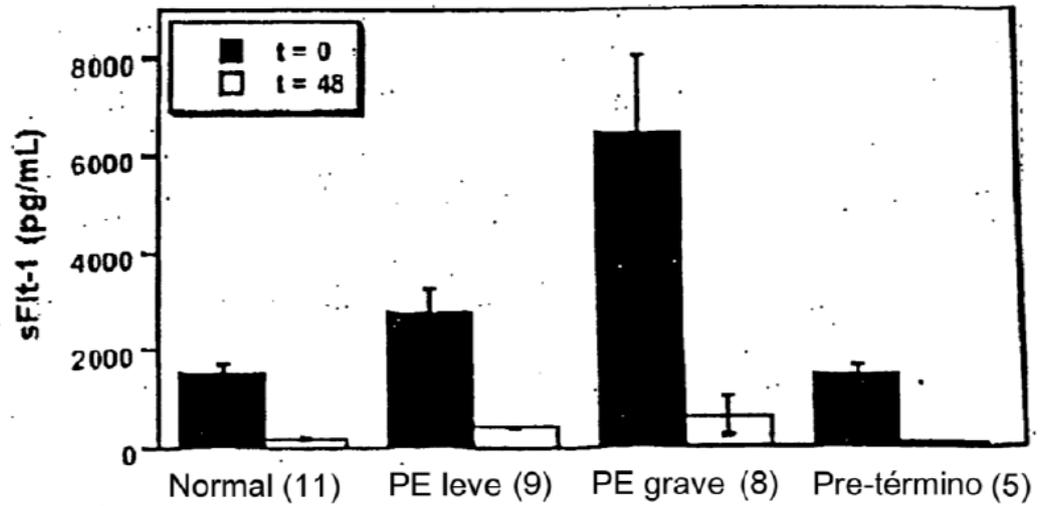
1. Un anticuerpo anti-FIt-1 soluble (sFIt-1) purificado o un fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este capaz de bloquear la unión de VEGF o P1GF, para su uso el tratamiento o la prevención de la preeclampsia en un sujeto.
- 5 2. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno de sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- a) dicho anticuerpo inhibe competitivamente la unión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o factor de crecimiento placentario (P1GF) a sFIt-1, o
- b) dicho anticuerpo se une a sFIt-1 y no se une a FIt-1.
- 10 3. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
4. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o scFv.
- 15 5. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho uso comprende además el uso de un fármaco antihipertensivo.
6. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho fármaco antihipertensivo se selecciona entre el grupo compuesto por metildopa, clorhidrato de hidralazina, labetalol, adenosina, nifedipina, minoxidil y sulfato de magnesio.
- 20 7. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho sujeto es una mujer embarazada, una mujer después del parto o un animal no humano.
8. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicho anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno de este tiene una dosificación de aproximadamente 0.01 y aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto.
- 25 9. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde dicha preeclampsia se **caracteriza por** unos mayores niveles de expresión del polipéptido sFIt-1 o el ácido nucleico de sFIt-1 en relación con una muestra o un nivel de referencia normal.
- 30 10. El anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento o la prevención comprende además
- a) inhibir la unión de VEGF o P1GF a un polipéptido sFIt-1 en un sujeto con preeclampsia, donde dicho anticuerpo anti-sFIt-1 o fragmento de unión al antígeno sFIt-1 de este inhibe competitivamente la unión de VEGF o P1GF a sFIt-1, o
- b) reducir el nivel o la actividad biológica del polipéptido sFIt-1 en un sujeto con preeclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia.
- 35 11. El uso de un anticuerpo anti-FIt-1 soluble (sFIt-1) purificado o un fragmento de unión al antígeno sFIt-1 capaz de bloquear la unión de VEGF o P1GF a este, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención de la preeclampsia en un sujeto.

Figura 1

A



B



C

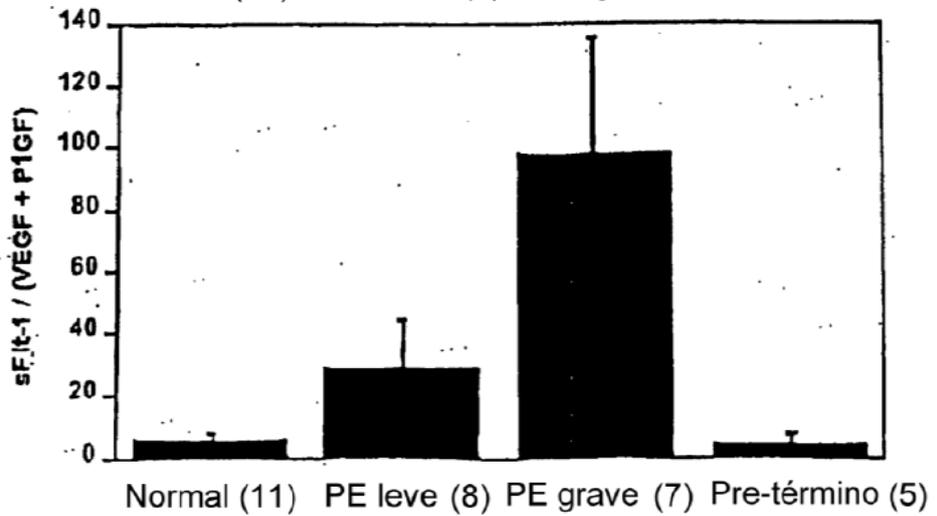


Figura 2

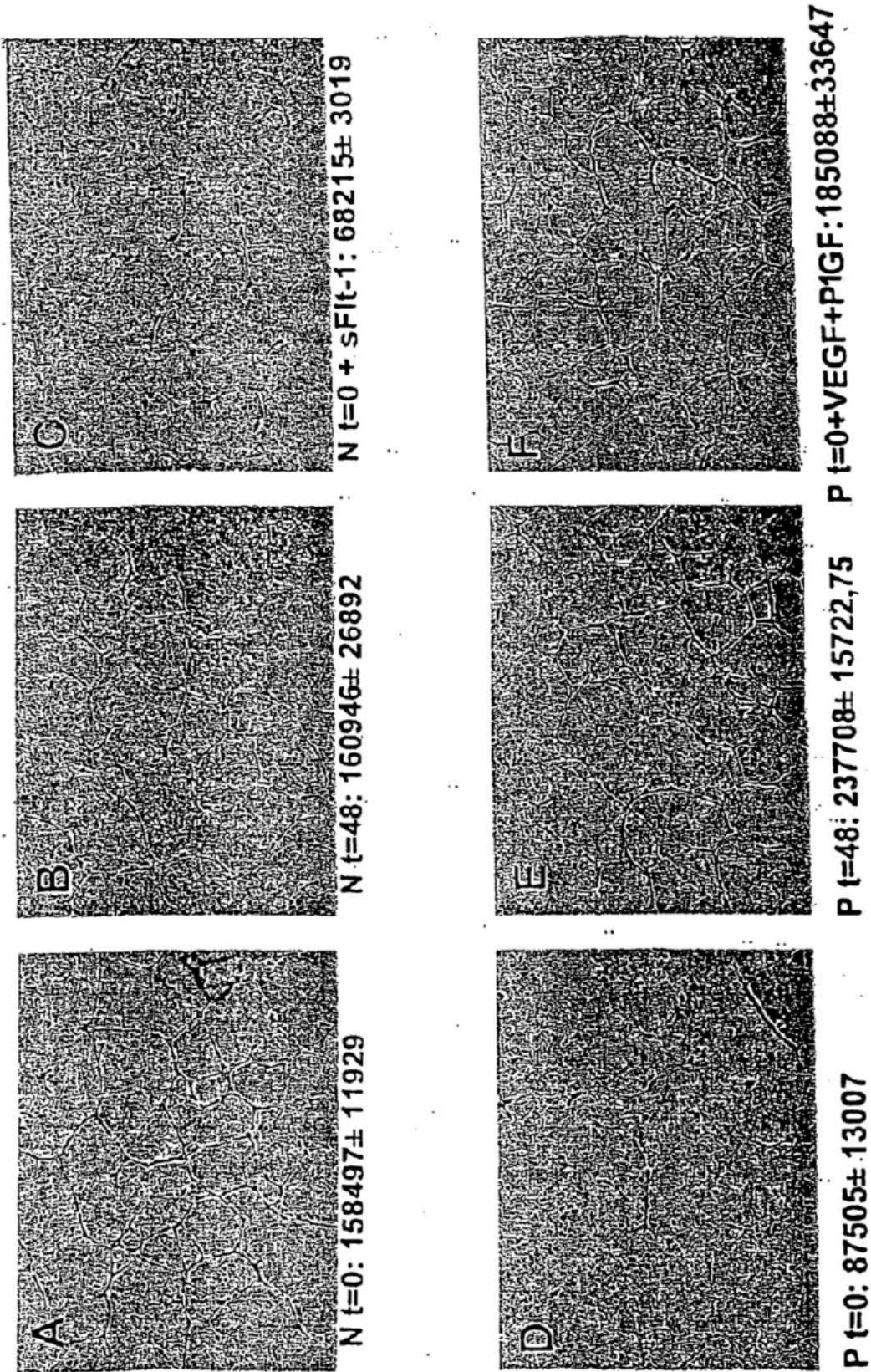


Figura 3

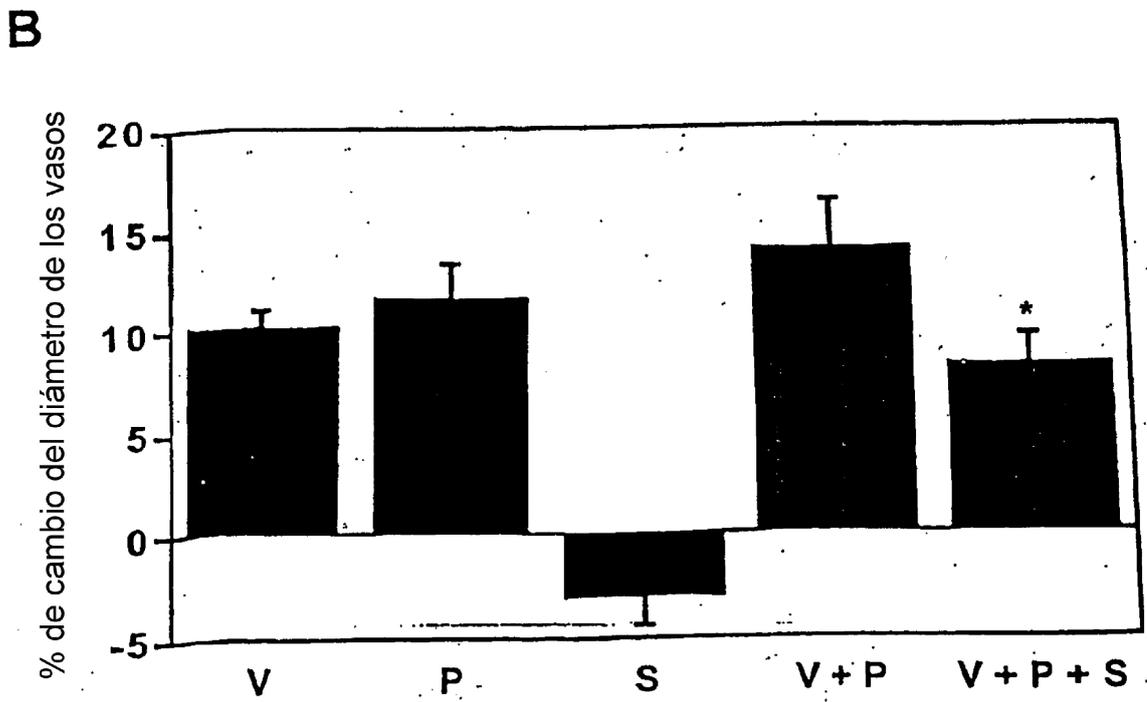
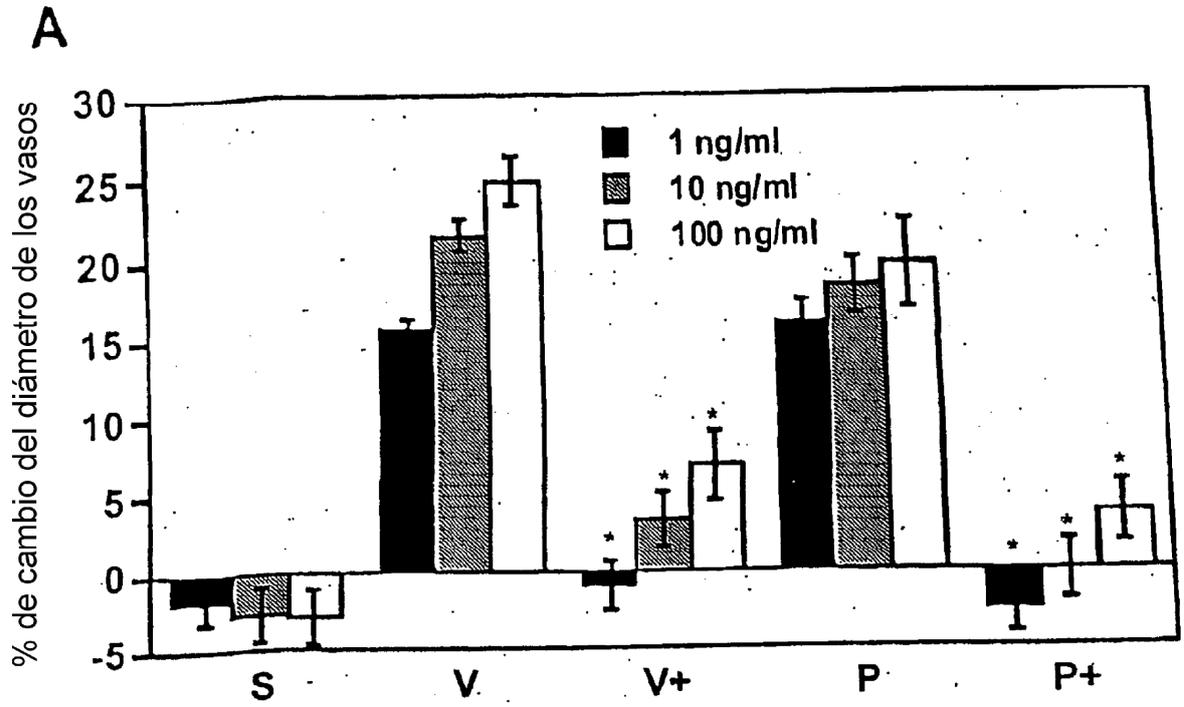




Figura 4B

E.M



Fc



sFlt-1

I.F. (Fibrina)

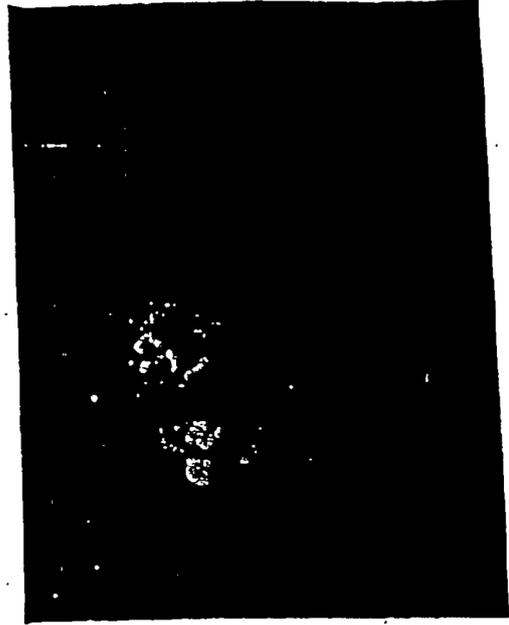
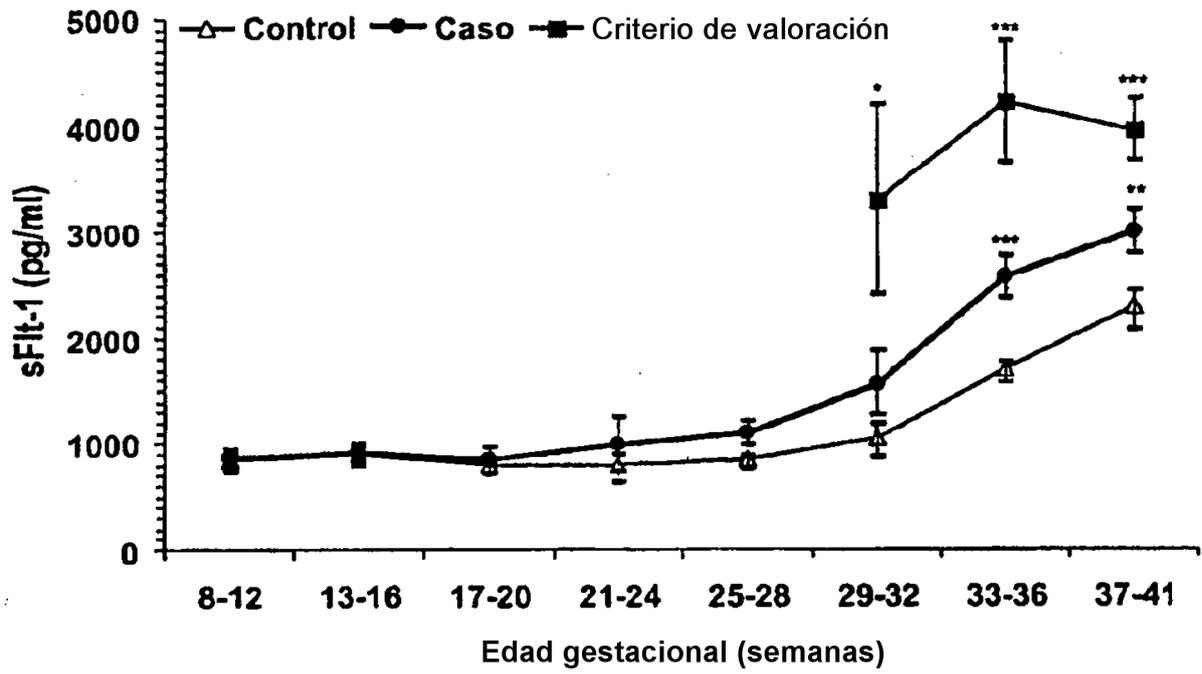
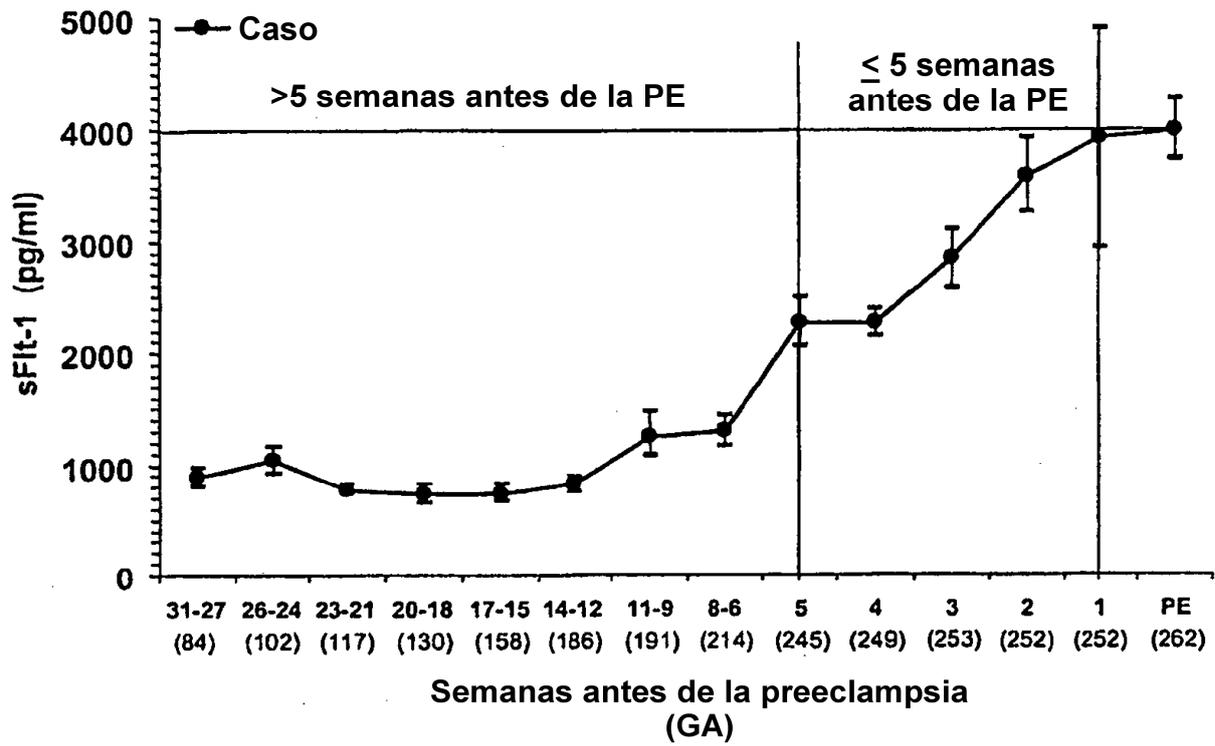


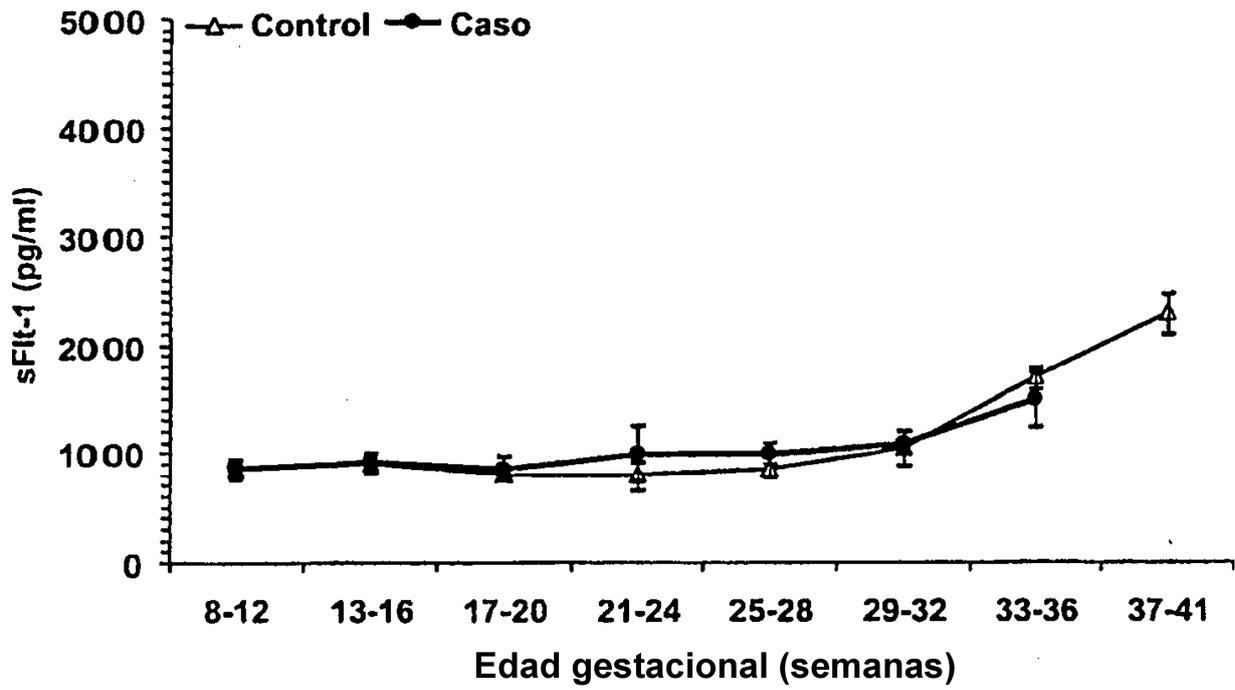
Figura 5A



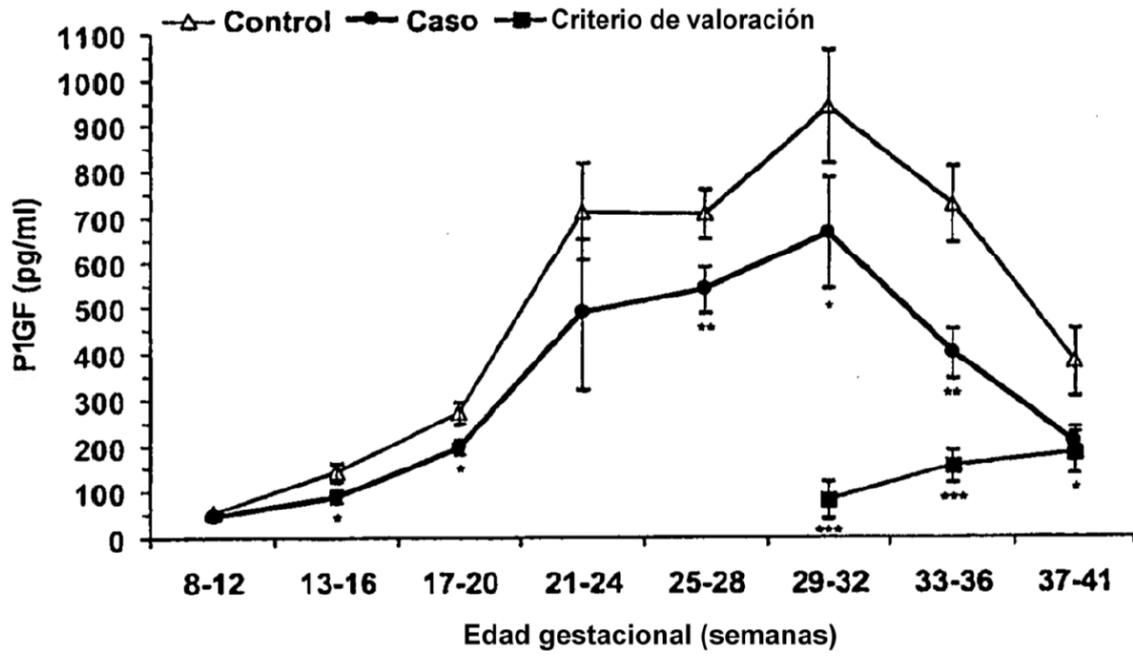
**Figura 5B**



**Figura 5C**



**Figura 6A**



**Figura 6B**

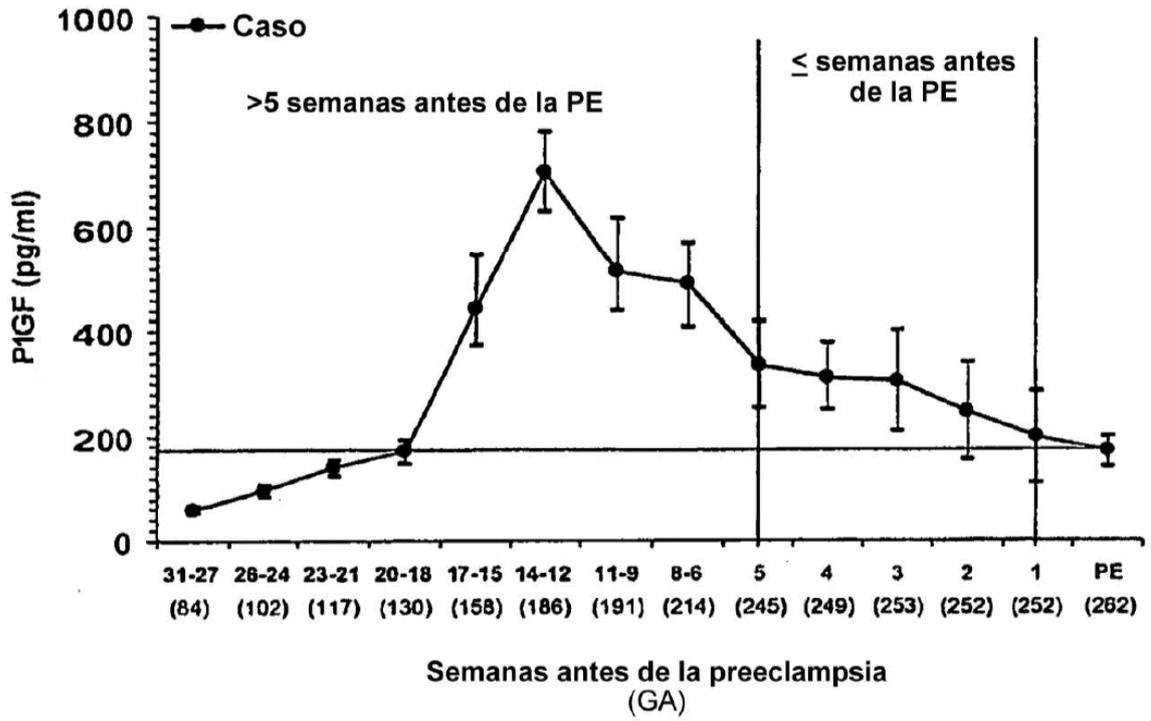


Figura 6C

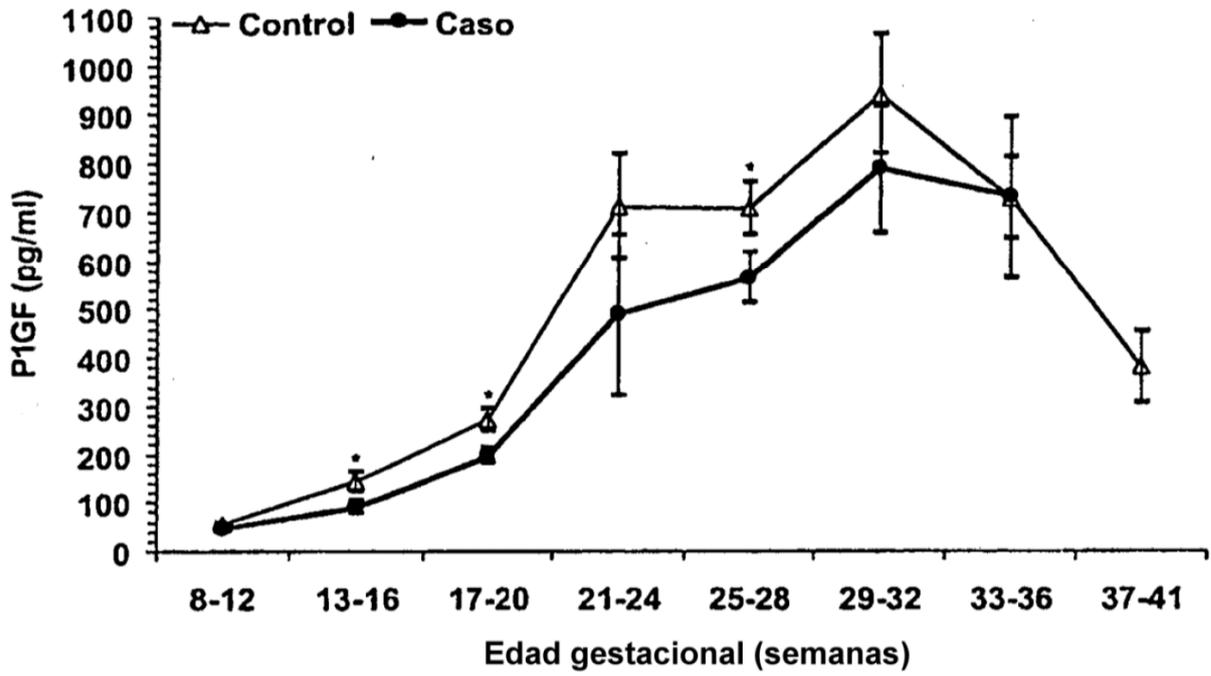


Figura 7

