

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 171**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011 E 11710137 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2550535**

54 Título: **HbF y A1M como marcadores de fase inicial para preeclampsia**

30 Prioridad:

24.03.2010 DK 201000245

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

17.08.2015

73 Titular/es:

**PREELUMINA DIAGNOSTICS AB (100.0%)
Medicon Village
223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**AKERSTRÖM, BO;
OLSSON, MAGNUS y
HANSSON, STEFAN**

ES 2 543 171 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

HbF y A1M como marcadores de fase inicial para preeclampsia

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de hemoglobina fetal (HbF) y (A1M) como marcadores para preeclampsia (PE).

10 **Antecedentes de la invención**

La preeclampsia (PE) afecta a hasta el 7-15% de todos los embarazos y es un factor importante de morbimortalidad materna. Las manifestaciones clínicas de PE aparecen en del segundo al tercer trimestre. La PE de aparición temprana, la forma más grave, aparece antes de las 34 semanas de gestación (SG). Los síntomas son a menudo poco claros y diversos, tales como dolor de cabeza, visión borrosa y edema. La hipertensión y proteinuria no son sólo características de la enfermedad, sino también son fundamentales para el diagnóstico.

En general se cree que la PE se desarrolla en dos fases, estando la primera fase caracterizada por placentación defectuosa, que conduce a perfusión sanguínea desigual, lesiones por reperfusión isquémica y aumento del estrés oxidativo en la placenta. La segunda fase de la PE, el síndrome materno, se caracteriza por una disfunción vascular general basada en daño endotelial grave que provoca eventualmente vasoconstricción, inflamación vascular general y disfunción multiorgánica.

Aunque hay parámetros clínicos usados para el diagnóstico de PE, existen grandes dificultades en el diagnóstico clínico de PE principalmente debido a los síntomas poco claros. Ni la cantidad de proteinuria ni el nivel de hipertensión se correlacionan muy bien con la gravedad de la PE tal como se examina por Schroeder BM. ACOG practice bulletin on diagnosing and managing preeclampsia and eclampsia, 15;66(2):330-1 y Redman CW & Sargent IL, Science ;308(5728):1592-4).

Debido al hecho de que no hay biomarcadores fiables para predecir y/o diagnosticar la PE, últimamente se han dedicado grandes esfuerzos a este campo. Sin embargo, encontrar un buen biomarcador es un gran reto. Muchos de los marcadores sugeridos necesitan combinarse entre sí y/o evaluarse en combinación con ultrasonido Doppler para mejorar la precisión del diagnóstico. Hasta la fecha, se han sugerido varios marcadores, pero ninguno se acepta como biomarcador útil para el diagnóstico o la predicción clínica de la PE. Dos factores antiangiogénicos son prometedores, mostrando una asociación significativa con PE: tirosina cinasa 1 similar a fms soluble (sFlt) y endoglina soluble tal como se discute y se revisa en Baumann *et al.*, Molecular aspects of medicine, abril de 2007;28(2):227-44, Grill *et al.*, Reprod Biol Endocrinol 2009;7:70, Levine *et al.*, The New England journal of medicine, 12 de febrero de 2004;350(7):672-83 y en Papageorghiou *et al.*, Current opinion in obstetrics & gynecology, diciembre de 2006;18(6):594-600.

Se han descrito algunos métodos de diagnóstico en la técnica anterior pero ninguno de ellos se ha usado aún con éxito en la práctica clínica a gran escala. Por ejemplo pueden mencionarse: el documento US 5.079.171 y el documento US 5.108.898, que dan a conocer que la PE, hipertensión inducida por el embarazo y la eclampsia pueden diagnosticarse identificando la presencia de un marcador de células endoteliales, fibronectina celular, en una muestra de sangre, plasma o suero de una mujer embarazada, por ejemplo, usando un inmunoensayo de tipo sándwich o de competición. La fibronectina celular se deriva de células endoteliales que se rompen o alteran durante el proceso patológico.

Varios estudios han mostrado una tasa de predicción alrededor del 50% particularmente para PE de aparición temprana, usando ultrasonido Doppler.

El marcador antiangiogénico sFlt es un posible marcador de PE ampliamente descrito cuando se usa en el segundo y tercer trimestre. Sin embargo, en el primer trimestre, los niveles de sFlt no cambian en comparación con los embarazos normales, haciéndolo menos útil para la predicción de PE. También se ha propuesto el factor de crecimiento placentario (PIGF) como marcador de PE, pero los datos disponibles muestran resultados contradictorios. La endoglina tiene una menor eficiencia de detección en la fase inicial del embarazo en comparación con los valores predictivos obtenidos cuando se usó la combinación sFlt/PIGF.

El documento US 5.238.819 da a conocer el diagnóstico de PE usando un ensayo para medir un factor mitogénico en la sangre. El factor mitogénico es un compuesto proteínico de aproximadamente 160 kDa y puede estimular la mitosis de fibroblastos. Se detecta su presencia detectando la absorción de timidina radiomarcada por células activadas mediante los sueros o el plasma de un sujeto con PE. Este marcador aparece una vez que ya se ha producido el daño en el lecho vascular materno, por tanto de manera tardía en el progreso de la enfermedad.

El documento WO 05/093413 (Yale University y Brigham and Women's Hospital) da a conocer un método de diagnóstico de PE grave en una mujer embarazada, que comprende medir el nivel de hemoglobina (Hb) libre en una muestra de líquido cefalorraquídeo.

- 5 Olsson *et al.* (Free Radical Biology and Medicine, vol. 48, 2010, 284-291) describen mediciones de HbA, HbF y A1M en plasma y orina. Se recogieron muestras de mujeres embarazadas justo antes del parto.

El documento WO 2008/098734 da a conocer el uso de HbF para el diagnóstico de preeclampsia.

- 10 Actualmente, no hay curas conocidas para la PE. La PE puede variar en su gravedad desde leve hasta potencialmente mortal. Una forma leve de PE puede mantenerse leve con reposo en cama y monitorización frecuente. Para casos de moderados a graves, es necesaria la hospitalización y medicación para la tensión arterial y se prescriben medicaciones anticonvulsivas para prevenir convulsiones. Si el estado se vuelve potencialmente mortal para la madre o el bebé, la única cura es terminar el embarazo lo que a menudo da como resultado un bebé de parto prematuro.

- 15 Claramente, la falta de terapia para PE asociada con la falta tradicional de capacidad de diagnosticarla hasta que la enfermedad ha progresado a una forma más grave, da lugar a la necesidad de enfoques novedosos para diagnosticar y tratar la PE, que es un problema significativo de salud pública.

20 **Sumario de la invención**

- La invención, tal como se da a conocer en el presente documento, se basa en datos de estudios del perfil de proteínas y genes que han revelado un aumento en la síntesis y acumulación de hemoglobina fetal (HbF) en la luz vascular de placenta obtenida de mujeres con PE. Además, los inventores han encontrado que las concentraciones en suero y/o plasma materno de HbF y el eliminador de grupo hemo α 1-microglobulina (A1M) se correlacionan con la gravedad de la enfermedad en embarazos a término.

- 25 Tal como se da a conocer en el presente documento, los inventores han encontrado sorprendentemente que la combinación de la razón de HbF y los niveles de A1M proporciona una predicción precisa extraordinaria y puede aplicarse como biomarcadores para la detección temprana de la PE.

- La invención proporciona un método para predecir el riesgo de desarrollar preeclampsia, estando el método caracterizado por comprender las etapas de

- 35 a) durante la semana de gestación 10-20 medir los niveles de A1M, HbA y HbF en una muestra de suero aislada de un sujeto,

- b) calcular la razón de HbF/Hb total (razón de HbF)

- 40 en el que se considera que el sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF medida supera 0,0020 y el nivel de A1M medido supera 21 μ g/ml.

- 45 La invención también proporciona el uso de A1M, HbA y HbF como marcadores de fase inicial durante la semana de gestación 10-20 para predecir la posibilidad de que un sujeto desarrolle preeclampsia, en el que se considera que el sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF/Hb total (razón de HbF) supera 0,0020 y el nivel de A1M medido supera 21 μ g/ml.

50 **Descripción detallada de la invención**

- Estudios realizados por los inventores han indicado la implicación de estrés oxidativo inducido por Hb en el desarrollo de PE. Se han observado la regulación por incremento de los genes de HbF y la acumulación de la proteína en la placenta de sujetos con PE. La Hb libre, es decir fuera de los glóbulos rojos, y sus metabolitos grupo hemo e hierro inducen estrés oxidativo mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). El estrés oxidativo puede dañar la barrera hematoplacentaria, conduciendo a la fuga de HbF a la circulación materna y provoca eventualmente niveles elevados en el suero o plasma materno. De hecho, se encontró que los niveles aumentados de HbF, Hb total y marcadores para el estrés oxidativo, así como el eliminador de grupo hemo y proteína endógena antioxidante, A1M, se elevan tanto en el plasma como en la placenta de mujeres con PE.

- 60 A1M es un importante eliminador endógeno para el grupo hemo. Se ha mostrado que su expresión se regula por incremento en respuesta a Hb libre y ERO. A1M se sintetiza y se secreta principalmente del hígado, y se distribuye rápidamente a diferentes tejidos en los que se encuentra en los compartimentos extravasculares tanto en forma libre como como complejos de alto peso molecular unidos a IgA, albúmina y protrombina. El enlace biológico y metabólico entre Hb y A1M se soporta adicionalmente por los resultados actuales, puesto que se elevaron tanto HbF como A1M en las muestras del primer trimestre. También se ha mostrado el aumento simultáneo de A1M y Hb en PE en embarazos a término.

5 Tal como se da a conocer en el presente documento, la concentración de A1M y uno o más de los marcadores HbA, HbF o la razón de HbF (Hb total/HbF) pueden usarse para predecir el riesgo de desarrollar PE. Los valores predictivos obtenidos para la razón de HbF y los niveles de A1M, especialmente en combinación, se comparan de manera favorable con la mayoría de otros biomarcadores de PE prometedores. Además, la razón de HbF y los niveles de A1M también son útiles para el diagnóstico de PE y la determinación de la gravedad de PE en embarazos a término.

10 Un aspecto de la invención se refiere al uso del nivel de A1M y HbF en combinaciones para el diagnóstico de PE según la reivindicación 1 ó 13. Por tanto este aspecto de la invención se refiere a un método para predecir el riesgo de desarrollar PE midiendo la concentración de HbF y A1M (el nivel de HbF y A1M) en un sujeto y relacionando los niveles medidos con valores de referencia con el fin de evaluar el riesgo de desarrollar PE. La concentración puede medirse en muestras que incluyen muestras de orina, sangre, suero o plasma, saliva y lo más preferiblemente de plasma humano. El nivel de HbF y A1M puede medirse mediante cualquier método aplicable incluyendo cromatografía, espectrometría de masas y lo más preferiblemente mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, es decir ELISA, para HbF y radioinmunoensayo (RIA) para A1M.

20 La invención se refiere al uso de la razón de HbF con el nivel de A1M para el diagnóstico de PE según la reivindicación 1. Para corregir la contribución de HbF derivada de glóbulos rojos maternos lisados, se usó la razón de HbF/Hb total (razón de HbF). Aunque debe tenerse cuidado para minimizar la hemólisis técnica durante el procesamiento de la muestra, se produce a menudo. Al usar la razón de HbF, la mayoría de las muestras pueden evaluarse sin riesgo de un diagnóstico o predicción de falso positivo. La razón de HbF se correlaciona con el nivel de A1M y de ese modo proporciona una medición más precisa, aplicable para predecir el riesgo de desarrollar PE. Por tanto, este aspecto de la invención se refiere a un método para predecir el riesgo de desarrollar PE midiendo la concentración de HbA, HbF y A1M (el nivel de HbA, HbF y A1M) en un sujeto, calculando la razón de HbF y correlacionando la razón de HbF calculada con el nivel de A1M para dar un esquema o valores de referencia con el fin de proporcionar una indicación del riesgo de desarrollar PE. El análisis matemático puede realizarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo el análisis de regresión o análisis de regresión logística como por ejemplo análisis de regresión logística binaria. La concentración puede medirse en muestras que incluyen orina, sangre, suero, saliva y lo más preferiblemente en plasma humano. El nivel de HbF y A1M puede medirse mediante cualquier método aplicable incluyendo cromatografía, espectrometría de masas y lo más preferiblemente mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, es decir ELISA para HbF, y radioinmunoensayo (RIA) o ELISA para A1M.

35 En el presente documento se describe un método para el diagnóstico o la predicción del riesgo de desarrollar PE, estando el método caracterizado por comprender las etapas de:

- a) medir el nivel de A1M y uno o más de los compuestos HbA, HbF en un sujeto o en una muestra aislada de un sujeto
- 40 b) comparar los niveles medidos con uno o más valores de referencia para evaluar la probabilidad de desarrollar PE.

Tal como se mencionó anteriormente, la información combinada relacionada con los niveles de A1M y HbF proporciona ventajas en comparación con la información relacionada con HbF sola.

45 La invención proporciona un método para predecir el riesgo de desarrollar preeclampsia, estando el método caracterizado por comprender las etapas de

- a) durante la semana de gestación 10-20 medir los niveles de A1M, HbA y HbF en una muestra de suero aislada de un sujeto,
- 50 b) calcular la razón de HbF/Hb total (razón de HbF)

en el que se considera que el sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF medida supera 0,0020 y el nivel de A1M medido supera 21 $\mu\text{g/ml}$.

55 La invención también proporciona el uso de A1M, HbA y HbF como marcadores de fase inicial durante la semana de gestación 10-20 para predecir la posibilidad de que un sujeto desarrolle preeclampsia, en el que se considera que el sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF/Hb total (razón de HbF) supera 0,0020 y el nivel de A1M medido supera 21 $\mu\text{g/ml}$.

60 El método se caracteriza por comprender las etapas de

- a) medir el nivel de A1M, HbA y HbF en un sujeto o en una muestra aislada de un sujeto
- 65 b) calcular la razón de HbF

c) comparar la razón de HbF y la concentración de A1M con valores de referencia para evaluar la probabilidad de desarrollar preeclampsia según la reivindicación 1.

5 Como desarrollo adicional, pueden emplearse análisis y métodos matemáticos, en los que los valores medidos se analizan estadísticamente, proporcionando de ese modo un método para el diagnóstico o la predicción del riesgo de desarrollar PE, estando el método caracterizado por comprender las etapas de:

a) medir el nivel de A1M y uno o más de los compuestos HbA, HbF en un sujeto o en una muestra aislada de un sujeto

10 b) calcular la razón de HbF

c) correlacionar la razón de HbF con el nivel de A1M

15 d) comparar la razón tal como se calcula en b), los datos de correlación tal como se calculan en c) o niveles medidos en a) con uno o más valores de referencia para evaluar la probabilidad de desarrollar PE.

20 El/los presente(s) método(s) puede(n) incluir además análisis estadísticos de los valores medidos tal como se explica en el presente documento. Por tanto el diagnóstico de, o el riesgo de desarrollar, PE puede evaluarse analizando el nivel de A1M y la razón de HbF y/o los niveles de HbF, HbA o A1M como mediciones separadas, usando un análisis de regresión logística binaria, opcionalmente con una prueba de la razón de verosimilitud (LR).

25 Para evaluar el riesgo de desarrollar PE, los valores medidos y/o calculados pueden interpretarse y compararse con conjuntos de valores de referencia.

Al medir y analizar el nivel de HbF en un sujeto, puede evaluarse el riesgo de desarrollar PE. Se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar PE si el nivel de HbF medido supera 0,45 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 0,75 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 1,0 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 1,5 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

30 Al medir y analizar el nivel de A1M en un sujeto, puede evaluarse el riesgo de desarrollar PE. Se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar PE si el nivel de A1M medido supera 21 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 23 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 25 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 30 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 35 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 40 $\mu\text{g/ml}$.

35 Al medir y analizar el nivel de HbA y HbF en un sujeto, puede evaluarse el riesgo de desarrollar PE calculando la razón de HbF. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar PE si la razón de HbF supera 0,0020, tal como por ejemplo 0,0025, tal como por ejemplo 0,0060, tal como por ejemplo 0,01.

40 Al medir y analizar el nivel de HbF, HbA y A1M, puede evaluarse el riesgo de desarrollar PE calculando la razón de HbF y relacionando la razón de HbF con el nivel de A1M. Esto puede realizarse mediante, por ejemplo, regresión logística.

45 Tal como se esboza en la figura 6, puede usarse la razón de HbF en combinación con el nivel de A1M para mejorar la predicción del desarrollo de PE.

50 Al combinar los dos parámetros se potencia mucho la precisión de la predicción. Tal como se esboza en la figura 6, pueden definirse valores de referencia específicos del nivel de A1M (valor m, en la figura 6) así como la razón de HbF (valor n, en la figura 6), según los cuales se considera que los sujetos tienen un riesgo elevado de desarrollar PE si se superan dichos valores de referencia.

55 En la presente invención, el valor de referencia (m) es de aproximadamente 21 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 23 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 25 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 30 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 35 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 40 $\mu\text{g/ml}$, cuando se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia. El valor de referencia (n) es de aproximadamente 0,0020, tal como por ejemplo 0,0025, tal como por ejemplo 0,0060, tal como por ejemplo 0,01. Por tanto, si se supera uno de los valores de referencia (representados como área II y IV), se considera que un sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar PE. Si se superan ambos valores (es decir, área III, en la figura 6) se considera que un sujeto tiene un riesgo sumamente elevado de desarrollar PE.

60 Pueden medirse niveles de marcador en muestras aisladas de un sujeto, lo más preferiblemente muestras maternas.

65 Las muestras pueden incluir sangre, plasma, orina y suero. En el presente documento se describen resultados derivados de plasma/suero venoso materno. Los niveles pueden medirse mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunotransferencia de tipo Western, espectrofotometría, CL-EM, MALDI-TOF EM, cromatografía, etc. Las muestras también pueden ser de placenta u orina.

Pueden aislarse muestras de un sujeto y analizarse durante todo el periodo de embarazo, como ejemplo durante la semana de gestación 3-42, tal como por ejemplo la semana de gestación 7-24, tal como por ejemplo la semana de gestación 10-20, tal como por ejemplo la semana de gestación 11-16.

5 Si es posible, puede realizarse una medición no invasiva en el sujeto durante la semana de gestación 3-42, tal como por ejemplo la semana de gestación 7-24, tal como por ejemplo la semana de gestación 10-20, tal como por ejemplo la semana de gestación 11-16.

10 Puede medirse el nivel de HbF mediante cualquier método aplicable incluyendo cromatografía, espectrometría de masas y lo más preferiblemente mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, es decir ELISA.

Puede medirse el nivel de A1M mediante cualquier método aplicable incluyendo cromatografía, espectrometría de masas y preferiblemente mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas o radioinmunoensayo (RIA).

15 Puede medirse el nivel de Hb total así como la HbA mediante cualquier método aplicable incluyendo cromatografía, espectrometría de masas y preferiblemente mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas o radioinmunoensayo (RIA).

20 En una realización adicional, la invención se refiere a un kit para medir y analizar el nivel de A1M y uno más de los compuestos HbA o HbF en un sujeto o en una muestra aislada de un sujeto. Adicionalmente a las herramientas para medir los niveles de A1M, HbA y HbF, el kit puede comprender una orientación sobre cómo realizar un análisis estadístico de los datos medidos, algoritmos para realizar el análisis estadístico de los niveles medidos y valores de referencia según los cuales los valores medidos y/o calculados pueden compararse con el fin de evaluar el riesgo de desarrollar PE. Además, el kit puede proporcionar un dispositivo automatizado para medir, calcular y evaluar el riesgo de PE, tal como por ejemplo un dispositivo electrónico estacionario o portátil.

25

Definiciones

30 En esta memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, “un” o “una” significa “uno/una o más”.

Tal como se usa en el presente documento, la PE se define según la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo. La definición para PE es por tanto: dos lecturas de tensión arterial mayor de 140/90 mmHg al menos con cuatro horas de diferencia, y proteinuria mayor de o igual a 300 mg en 24 horas, o dos lecturas de al menos 2+ en análisis con tiras reactivas de especímenes de orina de chorro medio u obtenida por catéter, si no había disponible una recogida de orina de 24 horas. Alternativamente, pueden aplicarse otras definiciones del término “preeclampsia” tal como se define según, por ejemplo, los criterios establecidos por el Comité sobre Terminología del Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología, es decir, hipertensión más proteinuria, edema manifiesto o ambos. Por ejemplo, la PE puede definirse como tensión arterial > 140/90 mm Hg y proteinuria > 0,3 g/l tras 20 semanas de gestación.

35

Tal como se define en el presente documento, el término embarazo normal se definió como parto tras 37 SG y tensión arterial normal.

45 Hemoglobina A (HbA). Existen diferentes formas de Hb. La Hb de adulto (HbA) consiste en dos cadenas polipeptídicas alfa y dos beta (Hb α , Hb β), que contienen cada una un grupo hemo no peptídico que se une de manera reversible a una molécula de oxígeno individual. Hb A2, otro componente de Hb de adulto está compuesta por dos cadenas alfa y dos cadenas delta (Hb α , Hb δ).

50 El término “Hb libre”, en esta memoria descriptiva se refiere a Hb libre en general e incluye Hb libre total, Hb A libre, Hb A2 libre, Hb F libre, cualquier subunidad de Hb libre (por ejemplo una cadena Hb α , Hb β , Hb δ o Hb γ), o cualquier combinación de las mismas. Incluye además estas entidades de Hb en una forma o bien polipeptídica (proteína) o bien nucleotídica (ARN), excepto cuando se aplican como diana para el tratamiento.

55 Hemoglobina fetal (HbF). El término “Hb fetal” se refiere a Hb F libre o cualquier subunidad de Hb F e incluye las entidades de Hb F en una forma polipeptídica (proteína) o nucleotídica (ARN), excepto cuando se aplican como diana para el tratamiento.

60 En esta memoria descriptiva, el término “libre” tal como se usa, entre otros, en las expresiones “Hb libre”, “Hb fetal libre” o “subunidades de Hb libres (por ejemplo cadenas Hb α , Hb β , Hb δ o Hb γ)” se refiere a Hb, Hb fetal o subunidades de Hb que circulan libremente en un fluido biológico, en oposición a Hb celular, que se refiere a las moléculas que residen dentro de las células. Por tanto, el término “libre” en este sentido se usa principalmente para distinguir Hb libre de Hb, que está presente en eritrocitos intactos.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término denominado razón de HbF se refiere a HbF/Hb total y se calcula por consiguiente como el nivel de HbF dividido entre el nivel de Hb total.

5 Los términos “marcador” o “biomarcador”, en esta memoria descriptiva, se refieren a una biomolécula, preferiblemente un polipéptido o proteína, que está presente de manera diferenciada en una muestra tomada de una mujer que tiene PE o una mujer que corre un riesgo creciente de desarrollar PE en comparación con una muestra comparable tomada de una mujer, denominada mujer/sujeto “normal” que no tiene preeclampsia ni corre un riesgo creciente de desarrollar PE.

10 El término “muestra biológica de mamífero hembra embarazada”, el término “sujeto” o equivalentes de los mismos pretenden indicar una muestra del propio mamífero; por consiguiente, la muestra no se obtiene de, por ejemplo, el feto o el líquido amniótico.

Tal como se usa en el presente documento, Hb fetal abreviado HbF se refiere al tipo de Hb, que es el componente principal de Hb en el feto. La Hb fetal tiene dos cadenas polipeptídicas alfa y dos gamma (Hb α , Hb γ).

15 Tal como se usa en el presente documento, α 1-microglobulina (A1M) se refiere al miembro de la familia de la lipocalina denominado alfa-1-microglobulina. Alfa-1-microglobulina puede denominarse en la bibliografía A1M, EDC1, HCP, HI30, IATIL, ITI, ITIL, ITILC y UTI.

20 Durante toda la memoria descriptiva, cualquiera de y todas las referencias se incorporan específicamente en esta solicitud de patente mediante referencia.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Demografía de casos y controles. Datos de semana de gestación en el parto, en el momento de muestreo, peso de nacimiento, paridad y parto prematuro. Los valores se muestran como mediana (± 2 errores estándar) o número (%). Se usó la prueba U de Mann-Whitney excepto para ^e.

^a: p=0,0001

30 ^b: p=0,03

^c: p=0,001 tras la normalización para la edad de gestación.

35 ^d: 27 primigrávidas entre los sujetos con PE y 18 entre los embarazos normales.

^e: Prematuro definido como parto antes de 37+0 SG. 7 pacientes con PE dieron a luz antes de 34+0 SG.

La figura 2 muestra la concentración media de HbF, A1M y Hb total en los casos con preeclampsia y los controles. Se usó regresión logística binaria para determinar la significación.

40 ^a: No calculado ya que la diferencia entre los grupos no es significativa.

^b: Razón de HbF se define como concentración de HbF/concentración de Hb total

45 ^c: Cálculos de razón de posibilidades basados en razón de HbF x 100. Esto se debe a los valores muy bajos de la fracción de HbF.

Figura 3. Valores de sensibilidad y especificidad para la razón de HbF, niveles de A1M y la combinación de los dos parámetros.

50 ^a: Razón de HbF = concentración de HbF/concentración de Hb total

^b: Basado en regresión logística incluyendo ambos parámetros.

55 Figura 4. Gráfico de dispersión

A: El gráfico de dispersión proporciona una representación gráfica de la distribución de muestras control y PE con respecto a la razón de HbF y el tiempo de muestreo.

60 Razón de HbF= HbF/Hb total

Muestreo de SG: la semana de muestreo

65 B: El gráfico de dispersión proporciona una representación gráfica de la distribución de muestras control y PE con respecto al nivel de A1M y el tiempo de muestreo.

A1M: El nivel de A1M medido en $\mu\text{g/ml}$

Muestreo de SG: la semana de muestreo

5 La figura 5. Curvas de características operativas del receptor (ROC).

Las curvas ROC proporcionan una representación gráfica de la especificidad (eje X) y sensibilidad (eje Y) de la razón de HbF, nivel de A1M y su combinación.

10 La figura 6. Representación gráfica del perfil de riesgo.

m: valor de referencia, A1M

n: valor de referencia, razón de HbF

15 Áreas en escala de grises

I: Riesgo bajo

20 II y IV: Riesgo elevado

III: Riesgo sumamente elevado.

Gradiente en color, oscuridad representa riesgo.

25

Ejemplos

Ejemplo 1

30 *Pacientes y demografía*

Se incluyeron un total de 96 mujeres. Se excluyeron pacientes con otras enfermedades tales como diabetes e hipertensión esencial. Se incluyeron sesenta mujeres que desarrollaron PE posteriormente (casos) y 36 con embarazos sin complicaciones normales (controles). Todos los controles dieron a luz tras 37+0 SG.

35

Las características se muestran en la tabla 1. De los 60 casos, 20 casos dieron a luz antes de 37+0 semanas de gestación (SG), de los cuales siete dieron a luz antes de 34+0 SG. Se obtuvieron todos los resultados de embarazo de la base de datos de la sala de parto principal y se comprobaron para cada paciente individual. Se usó la definición para PE de La Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo: dos lecturas de tensión arterial mayor de 140/90 mmHg al menos con cuatro horas de diferencia, y proteinuria mayor de o igual a 300 mg en 24 horas, o dos lecturas de al menos 2+ en análisis con tiras reactivas de especímenes de orina de chorro medio u obtenida por catéter, si no había disponible una recogida de orina de 24 horas. Se definió el embarazo normal como parto tras 37 SG y tensión arterial normal. Se seleccionaron al azar las muestras control de mujeres que participaron en el estudio durante el mismo periodo de tiempo.

45

Se reclutaron los pacientes con permiso del comité ético, como parte de un estudio prospectivo en curso de marcadores de suero y ultrasonidos del primer trimestre para PE en mujeres que asisten a una visita de atención prenatal de rutina en la unidad obstétrica del Hospital St Georges, Londres. Se calculó la edad de gestación a partir del último periodo menstrual y se confirmó mediante medición de longitud céfalo-caudal por ultrasonidos.

50

Ejemplo 2

Muestreo

55 Se recogió una muestra de suero venoso materno en las SG 11 a 16 para el análisis de HbF, Hb total y A1M. Se recogió la sangre venosa en un tubo Vacutainer de 5 ml (Beckman Dickson) sin aditivos para permitir la coagulación, y se centrifugó a 2000 g a temperatura ambiente durante 10 min.

Se almacenó el suero a -80°C hasta su análisis adicional.

60

Ejemplo 3

Medición de Hb total, HbF y A1M

65 Se determinaron concentraciones de HbF y A1M mediante un ELISA tipo sándwich y radioinmunoensayo (RIA), respectivamente, tal como se describió anteriormente. Se midió la concentración de Hb total en suero mediante un

ELISA competitivo, usando anticuerpos frente a Hb de adulto (HbA) tal como se describió anteriormente. Se calculó la razón de HbF/Hb total y se denominó razón de HbF.

Ejemplo 4

5 *Análisis estadístico*

Se usó un software informático estadístico (SPSS) para analizar los datos. Se analizó la probabilidad de desarrollar PE en relación con la razón de HbF y/o los niveles de HbF, HbA o A1M, usando un análisis de regresión logística binaria con una prueba de la razón de verosimilitud (LR). Se calculó la razón de posibilidades (OR) para los biomarcadores. Puesto que la razón de HbF mostró valores bajos, se multiplicó por 100 antes de calcular la OR. Se usó un nivel de significación de 0,05 en todas las pruebas.

15 Se realizaron curvas ROC para HbF, A1M, razón de HbF y la combinación de razón de HbF y A1M basándose en los resultados de regresión logística. Se calculó el área bajo la curva (AUC) a partir de las curvas ROC. El análisis de regresión logística permitió someter a prueba la sensibilidad a diferentes tasas positivas de detección. Se evaluó el nivel de sensibilidad óptimo. Se evaluaron las correlaciones lineales entre los tres biomarcadores mediante análisis de correlación bivalente calculando los coeficientes de correlación de Pearson.

20 Ejemplo 5

Los grupos de estudio

25 Se muestran los datos demográficos de los casos incluidos y los controles en la figura 1 y el ejemplo 1. Hubo una diferencia significativa, esperada en la duración de la gestación en el momento del parto. Hubo una diferencia significativa en el peso de nacimiento tras la correlación con la edad de gestación ($p=0,001$). Las muestras de sangre de sujetos con PE se recogieron en promedio 8 días después de las muestras control ($p=0,018$).

30 Ejemplo 6

Razón de HbF y niveles plasmáticos de A1M

35 Se observó una alta concentración de Hb total en todas las muestras, sugiriendo un determinado grado de hemolisis. Se verificaron los niveles altos mediante espectrofotometría (datos no mostrados). Sin embargo, no hubo diferencia significativa en la concentración de Hb total entre los grupos examinados, 178 $\mu\text{g/ml}$ en PE y 206 $\mu\text{g/ml}$ en los controles ($p=0,232$) (figura 2). La concentración media de HbF fue de 1,38 $\mu\text{g/ml}$ en sujetos con PE y de 0,45 $\mu\text{g/ml}$ en los controles. Puesto que la hemolisis inicial puede contribuir a los valores de HbF, y puesto que los niveles de HbF se correlacionaban significativamente con los niveles de Hb total, se calculó la razón de HbF (HbF/Hb total). La razón media de HbF en sujetos con PE era significativamente elevada en comparación con los controles ($p<0,0001$) (figura 2). Se muestra la razón de HbF en relación con la edad de gestación en un gráfico de dispersión (figura 3A). El nivel medio de A1M era significativamente elevado en sujetos con PE (24 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con los controles (21 $\mu\text{g/ml}$, $p=0,0001$). Los niveles de A1M se relacionan con la edad de gestación y se muestran en un gráfico de dispersión (figura 3B).

45 Ejemplo 7

Análisis de correlación

50 No se correlacionaron significativamente ni los niveles de HbF ni los niveles de razón de HbF con los niveles de A1M ($p=0,17$, $r=0,16$). Sin embargo, los niveles de HbF se correlacionaron significativamente con los niveles de Hb total ($p=0,001$, $r=0,35$), una correlación que fue incluso más fuerte en los casos de PE ($p=0,005$, $r=0,39$). No se correlacionaron significativamente los niveles de Hb total y A1M ($p=0,61$, $r=-0,055$).

Correlación de la razón de HbF con la edad de gestación

55 Se sometieron a prueba la razón de HbF y los niveles de A1M para determinar la correlación con la edad de gestación en muestreo (presentado gráficamente en la figura 1). No se observó correlación con la edad de gestación entre 10-16 SG ni para razón de HbF ni para A1M.

60 *Regresión logística y curvas de características operativas del receptor (ROC)*

65 Se usó regresión logística para calcular razones de posibilidades y significación (figura 2). Se trazaron curvas ROC (figura 5) y se obtuvieron la sensibilidad y especificidad para la razón de HbF, A1M y su combinación. Se analizaron los resultados en cuatro valores de corte diferentes tal como se presenta en la figura 3. El área bajo la curva (AUC) fue de 0,82 para la razón de HbF, de 0,75 para A1M y de 0,89 para la combinación de la razón de HbF y A1M. La

combinación de los dos marcadores mostró los mayores valores de predicción, con una sensibilidad óptima del 90% a una tasa positiva de detección del 23% (figura 3).

Ejemplo 8

5

Diagnóstico mediante medición combinada de la razón de HbF y el nivel de A1M

Se determinaron las concentraciones de HbF y A1M mediante un ELISA de tipo sándwich y radioinmunoensayo (RIA), respectivamente, tal como se describió anteriormente. Se midió la concentración de Hb total en suero mediante un ELISA competitivo, usando anticuerpos frente a Hb de adulto (HbA) tal como se describió anteriormente. Se calculó la razón de HbF/Hb total y se denominó razón de HbF.

10

Tal como se esboza en la figura 6, puede usarse la razón de HbF en combinación con el nivel de A1M para mejorar la predicción del desarrollo de PE.

15

Al combinar los dos parámetros se potencia mucho la precisión de la predicción. Tal como se esboza en la figura 6, pueden definirse valores de referencia específicos del nivel de A1M (valor m, en la figura 6) así como la razón de HbF (valor n, en la figura 6), según los cuales se considera que los sujetos tienen un riesgo elevado de desarrollar PE si se superan dichos valores de referencia.

20

En la presente invención, el valor de referencia (m) es de aproximadamente 21 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 23 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 25 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 30 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 35 $\mu\text{g/ml}$, tal como por ejemplo 40 $\mu\text{g/ml}$, se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia. El valor de referencia (n) es de aproximadamente 0,0020, tal como por ejemplo 0,0025, tal como por ejemplo 0,0060, tal como por ejemplo 0,01. Por tanto, si se supera uno de los valores de referencia (representados como área II y IV), se considera que un sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar PE. Si se superan ambos valores (es decir área III, en la figura 6) se considera que un sujeto tiene un riesgo sumamente elevado de desarrollar PE.

25

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir el riesgo de desarrollar preeclampsia, estando el método caracterizado por comprender las etapas de
 - a) durante la semana de gestación 10-20 medir los niveles de A1M, HbA y HbF en una muestra de suero aislada de un sujeto,
 - b) calcular la razón de HbF/Hb total (razón de HbF),
 en el que se considera que el sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF medida supera 0,0020 y el nivel de A1M medido supera 21 µg/ml.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra materna.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se aísla la muestra de un sujeto en la semana de gestación 11-16.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se realiza la medición durante la semana de gestación 11-16.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina el nivel de HbF mediante ELISA.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina el nivel de A1M mediante radioinmunoensayo (RIA) o ELISA.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se mide la concentración de Hb total mediante ELISA o ELISA competitivo.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se analiza la probabilidad de desarrollar preeclampsia usando un análisis de regresión logística binaria con una prueba de la razón de verosimilitud (LR).
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si el nivel de HbF medido supera 0,45 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml o 2,5 µg/ml.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si el nivel de A1M medido supera 23 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml o 40 µg/ml.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se considera que un sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF supera 0,0025, 0,0060 ó 0,01.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se considera que un sujeto tiene una probabilidad sumamente elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF supera 0,0020, 0,0025, 0,0060 ó 0,01 y el nivel de A1M supera 21 µg/ml, 23 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml o 40 µg/ml.
13. Uso de A1M, HbF y Hb total como marcadores de fase inicial durante la semana de gestación 10-20 para predecir la posibilidad de que un sujeto desarrolle preeclampsia, en el que se considera que el sujeto tiene una probabilidad elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF/HB total (razón de HbF) supera 0,0020 y el nivel de A1M medido supera 21 µg/ml.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que se miden los niveles de A1M, HbA y HbF en una muestra de suero aislada.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que se aísla la muestra de un sujeto durante la semana de gestación 11-16.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que se considera que un sujeto tiene una probabilidad sumamente elevada de desarrollar preeclampsia si la razón de HbF supera 0,0020, 0,0025, 0,0060 ó 0,01 y el nivel de A1M supera 21 µg/ml, 23 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml o 40 µg/ml.

	Embarazo normal C (n=36)	Preeclampsia PE (N=60)
SG en el parto ^a	282 (280-285)	260 (253-268)
SG en el muestreo ^b	90 (85-95)	99 (94-103)
Peso de nacimiento ^c (gramos)	3484 (3281-3687)	2752 (2484-3019)
Paridad ^d	1 (0-2)	1 (0-2)
Prematuro ^e	0 (0%)	20 (33,3%)

Fig. 1

Concentraciones en suero de HbF, A1M, Hb total y razón de HbF

	PE	Controles	Valor de P	Razón de posibilidades (IC al 95%)
HbF (µg/ml)	1,38	0,45	<0,0001	3,641 (1,54-8,56)
A1M (µg/ml)	24,77	21,01	<0,0001	1,221 (1,09-1,37)
Hb total(µg/ml)	177,9	206,19	0,232	^a
Razón de HbF ^b	0,0079	0,0020	<0,0001	86,96 (6,3-1206,7)^c

Fig. 2

Valores de sensibilidad y especificidad para la razón de HbF, los niveles de A1M y la combinación de los dos parámetros

Tasa positiva de detección	Sensibilidad de la razón de HbF ^a	Sensibilidad de A1M	Sensibilidad de la razón de HbF combinada con A1M ^b
5%	55%	17%	69%
10%	69%	25%	73%
20%	76%	48%	73%
30%	78%	73%	90%
Óptimo	Sensibilidad del 78% Tasa positiva de detección del 26%	Sensibilidad del 77% Tasa positiva de detección del 35%	Sensibilidad del 90% Tasa positiva de detección del 23%

Fig. 3

Gráfico de dispersión

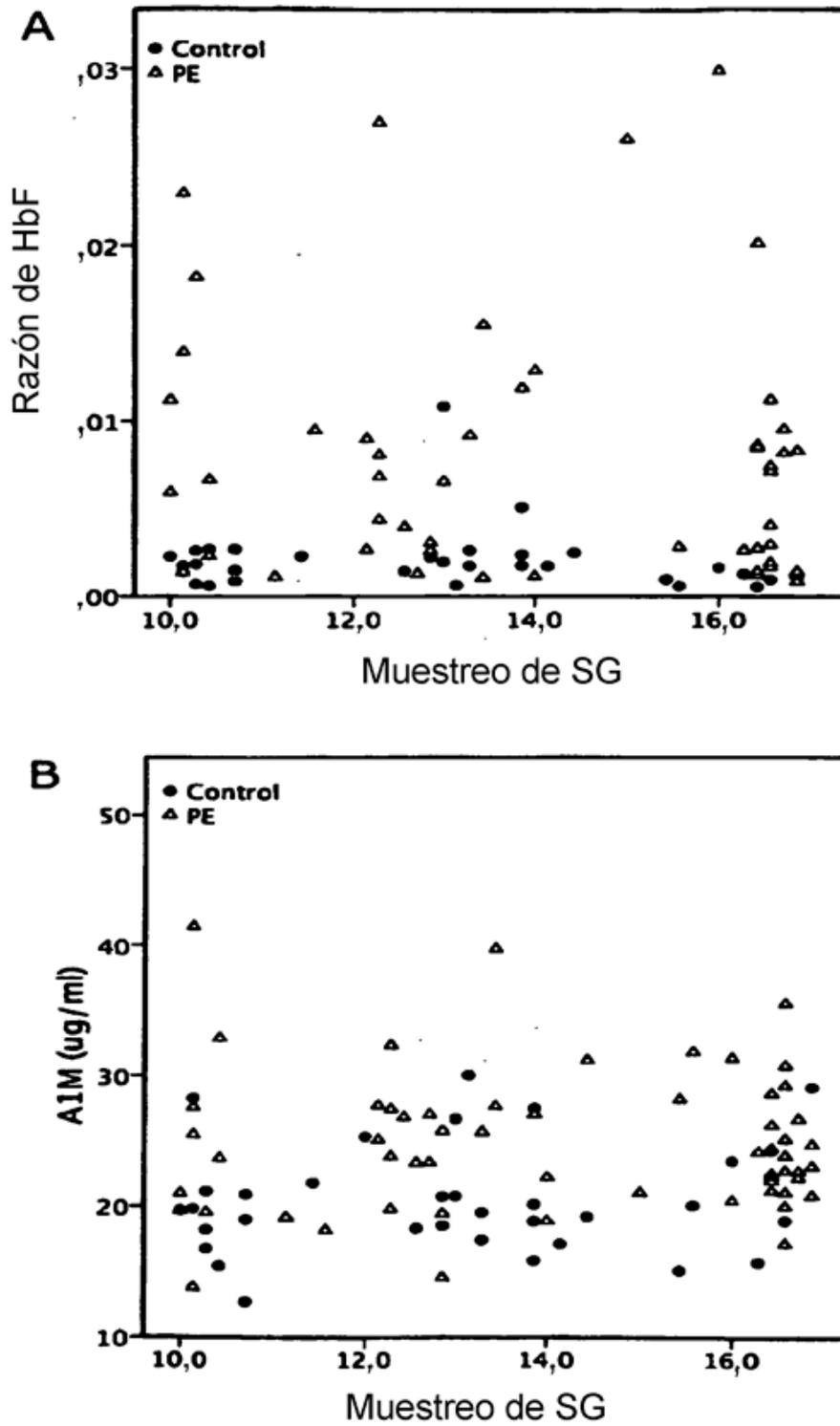


Fig. 4

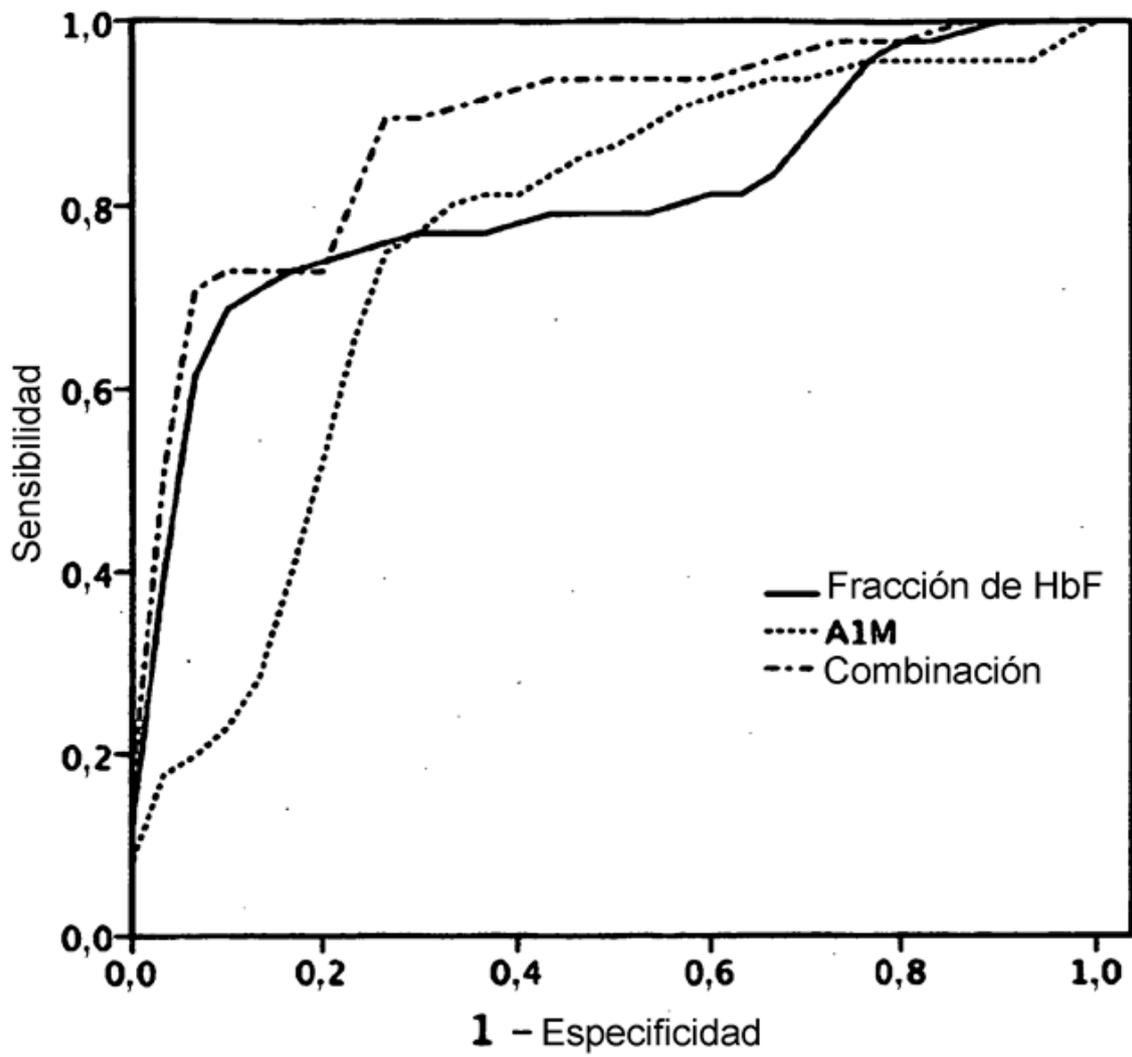


Fig. 5

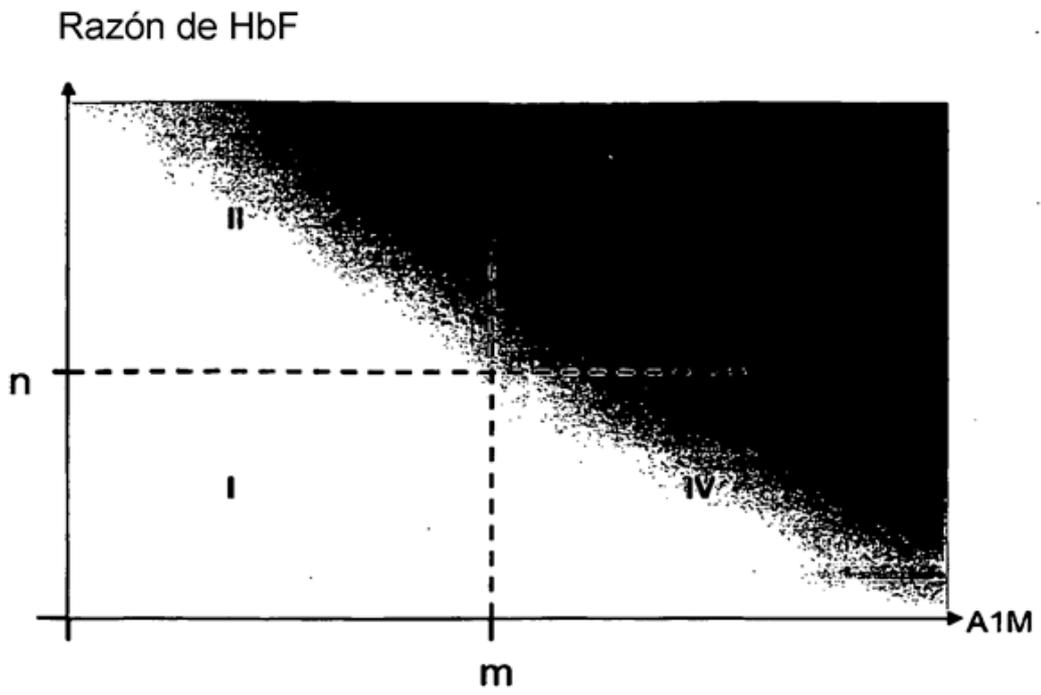


Fig. 6