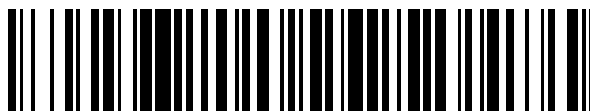


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 164**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2004** **E 04784919 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 1664797**

54 Título: **Cribado de la preeclampsia**

30 Prioridad:

23.09.2003 US 505707 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.01.2016

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)**

**55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US y
BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,
INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**THADHANI, RAVI y
KARUMANCHI, ANANTH S.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 556 164 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

Cribado de la preeclampsia

- 5 **[0001]** Esta invención se refiere al cribado de la preeclampsia, y más en particular al cribado de biomarcadores presentes en una muestra biológica obtenida de una persona embarazada que son indicativos de preeclampsia.
- [0002]** La diabetes mellitus gestacional (DMG) y la hipertensión inducida por embarazo (HIE) complican 2-3% y 5-10% de todos los embarazos, respectivamente. Estos trastornos se pueden producir en el tercer trimestre de embarazo y están asociados con morbilidad y mortalidad materna y fetal significativas. La diabetes gestacional se ha descrito como el inicio nuevo o diagnóstico nuevo de intolerancia a la glucosa durante el embarazo, y está asociada con complicaciones fetales relacionadas con la macrosomía, tales como distocia de hombros y traumatismo obstétrico. Además la DMG está asociada con mayores tasas de cesáreas y mayor riesgo de HIE. La HIE está asociada con parto prematuro, mayores tasas de cesáreas, insuficiencia renal aguda, disfunción hepática, accidente cerebrovascular y muerte. Para el feto, la HIE está asociada con bajo peso al nacer, cuidados intensivos neonatales prolongados y muerte intrauterina.
- [0003]** Los trastornos relacionados con la HIE incluyen la preeclampsia (PE) y la hipertensión gestacional (HG). La preeclampsia se caracteriza como la combinación de alta presión arterial (hipertensión), hinchamiento (edema), y proteína en la orina (albuminuria, proteinuria) que se desarrollan después de la 20ª semana de embarazo. La preeclampsia varía en gravedad desde leve a grave; la forma leve se llama a veces hipertensión inducida por embarazo proteinúrico o hipertensión gestacional proteinúrica. La hipertensión gestacional (transitoria) se caracteriza en general como el inicio agudo de hipertensión en el embarazo o el puerperio temprano sin proteinuria o edema anormal, y se resuelve en el espacio de 10 días después del parto.
- [0004]** Los individuos con riesgo mayor de desarrollar preeclampsia y eclampsia incluyen primigrávidas y mujeres con gestaciones múltiples, embarazo molar o hidropesía fetal, hipertensión crónica o diabetes, o una historia personal o familiar de eclampsia o preeclampsia. La preeclampsia (PE) y la hipertensión gestacional (HG) son formas de HIE.
- [0005]** El presente tratamiento estándar para la HIE, incluyendo HIE que resulta de la DMG, es el parto, a menudo a expensas del bienestar fetal. Las estrategias profilácticas para prevenir la HIE, incluyendo el tratamiento con suplementos de calcio y aspirina, mayoritariamente no han tenido éxito. Una razón por la que han fallado estos ensayos es que la ausencia de ensayos de cribado limita la capacidad para administrar las intervenciones terapéuticas suficientemente pronto para modificar el desenlace del embarazo. Por ejemplo, el diagnóstico de la PE por la aparición de edema y proteinuria solo no es fiable, ya que el edema es común en los embarazos normales y la proteinuria medible normalmente ocurre solo después de que se manifieste la hipertensión. Por lo tanto, dicho ensayo carece de especificidad y falla en la detección de la DMG o HIE antes de la manifestación de la enfermedad en el tercer trimestre de embarazo.
- [0006]** Actualmente, ningún marcador bioquímico individual ni pluralidad de marcadores bioquímicos, identifican de forma fiable a las mujeres con riesgo de desarrollar DMG o HIE antes del tercer trimestre de embarazo. Por lo tanto, son necesario procedimientos de diagnóstico y composiciones que conduzcan a la implementación temprana de la terapia y mejores desenlaces del embarazo para mujeres con riesgo de trastornos gestacionales.
- [0007]** Seely Ellen W y col., *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 88, No. 6, Junio 2003, páginas 2393-2398, describen la potencial función de la resistencia a la insulina en la hipertensión inducida por embarazo.
- [0008]** Wolf Myles y col., *Hypertension*, Dic. 2002, Vol. 40, No. 6, páginas 886-891, describen que la resistencia a la insulina pero no la inflamación, está asociada con la hipertensión gestacional. Wolf Myles y col., *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 87, No. 4, Abril 2002, páginas 1563-1568, describen un estudio prospectivo de la resistencia a la insulina el primer trimestre y la posterior preeclampsia. Wolf Myles y col., *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 89(12), Diciembre 2004, páginas 6239-6243, describe la preeclampsia y enfermedad cardiovascular futura: potencial función de la angiogénesis alterada y resistencia a la insulina.
- [0009]** Maynard Sharon E y col., *J. Clinical Investigation*, Vol. 111, No. 5, Marzo 2003, páginas 649-658, describen que el exceso de tirosina quinasa 1 similar a fms soluble (sFlt1) placentaria puede contribuir a la

disfunción endotelial, hipertensión y proteinuria en la preeclampsia.

[0010] Polliotti B. y col., *Obstetrics & Gynecology* Vol. 101(6), Junio 2003, páginas 1266-1274, describen el factor de crecimiento placentario y el factor de crecimiento endotelial vascular del suero materno del segundo-tercer trimestre, para predecir el inicio temprano de la preeclampsia.

[0011] Taylor R.N. y col., *Am. J., Obstetrics & Gynecology* Vol. 188(1), Enero 2003, páginas 177-182, describen concentraciones en el suero longitudinales del factor de crecimiento placentario: evidencia de angiogénesis placentaria anormal en embarazos patológicos.

[0012] Tidwell S.C. y col., *Am. J., Obstetrics & Gynecology* Vol. 184(6), Mayo 2001, páginas 1267-1272, describen niveles bajos en el suero materno del factor de crecimiento placentario como un antecedente de la preeclampsia clínica.

[0013] Thadani R. y col., *Hypertension* Vol. 43(5), Mayo 2004, páginas 988-992, describen resistencia a la insulina y alteraciones en la angiogénesis: agresiones por aditivos que pueden conducir a la preeclampsia.

[0014] Levine R.J. y col., *The New England Journal of Medicine* Vol. 89(12), 12 Feb 2004, páginas 672-683, describen factores angiogénicos en la circulación y el riesgo de preeclampsia.

[0015] Ong Charas Y.T. y col., *J. Reproductive Medicine* Vol. 49(6), Junio 2004, páginas 477-480, describen el nivel en el suero materno del factor de crecimiento placentario en embarazos diabéticos.

[0016] El documento US 6335170 describe la expresión de genes en tumores de vejiga. El documento US 2003/175253 describe matrices para el diagnóstico y tratamiento de trastornos mentales.

[0017] La invención proporciona un procedimiento para determinar si una persona embarazada tiene, o está predispuesta a tener, preeclampsia, comprendiendo el procedimiento: a) medir un nivel de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en una muestra biológica obtenida de una persona embarazada; b) medir un nivel del factor de crecimiento placentario (PIGF) en una muestra biológica obtenida de la persona embarazada; c) comparar el nivel de SHBG obtenido de la persona embarazada con un nivel de SHBG obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal; y d) comparar el nivel de PIGF obtenido de la persona embarazada con un nivel de PIGF obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal; en el que niveles bajos de SHBG y de PIGF presentes en la muestra obtenida de la persona embarazada, comparados con los niveles presentes en la al menos una persona que tiene un embarazo normal, indican que la persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia. La invención también proporciona un procedimiento para determinar si una terapia es eficaz para tratar la preeclampsia, comprendiendo el procedimiento: a) determinar los niveles de SHBG y factor de crecimiento placentario (PIGF) en una primera muestra obtenida de una paciente embarazada que está en tratamiento para la preeclampsia; (b) comparar el nivel determinado en (a) con un nivel de SHBG y PIGF detectado en una segunda muestra obtenida de la paciente antes de, o posteriormente a la administración del tratamiento, en el que una diferencia entre la primera muestra y la segunda muestra indica la eficacia del tratamiento.

[0018] La invención proporciona además una matriz para detectar la preeclampsia, comprendiendo la matriz un sustrato que tiene una pluralidad de sitios, teniendo cada sitio dispuesto en el mismo un conjunto de uno o más anticuerpos, y detectando específicamente cada anticuerpo en un conjunto la misma molécula; en la que un primer conjunto de uno o más anticuerpos detecta específicamente la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), y un segundo conjunto de uno o más anticuerpos detecta específicamente el factor de crecimiento placentario (PIGF)

[0019] La invención también proporciona un sistema de ordenador para determinar si una persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia, comprendiendo el sistema: una base de datos que comprende uno o más perfiles de referencia codificados digitalmente, en donde un primer perfil de referencia representa un nivel de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia, y un segundo perfil de referencia representa un nivel del factor de crecimiento placentario (PIGF) en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia; y un servidor que comprende un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador: i) reciba un perfil de una persona embarazada que comprende los niveles de SHBG y PIGF detectados en una muestra de la persona; ii) identificar en la base de datos un perfil de referencia que se corresponda que es relevante en el diagnóstico, con el perfil de la persona embarazada; y iii) generar una indicación de si la persona tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.

[0020] La invención se basa en el descubrimiento de que la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y/o el factor de crecimiento placentario (PIGF) se pueden usar como indicadores tempranos del riesgo de desarrollo de preeclampsia. Los ensayos para la SHBG y PIGF son sencillos y baratos, se pueden llevar a cabo durante el primer trimestre, tan pronto como a las 5 semanas después de la concepción, y no requieren ninguna preparación por parte de la mujer (por ejemplo, los ensayos se pueden hacer en condiciones de ayunas o no). Por lo tanto, la invención proporciona procedimientos para usar un biomarcador de resistencia a la insulina, la SHBG, y biomarcador angiogénico, el PIGF, como indicadores del riesgo de desarrollo.

[0021] En general, la invención describe procedimientos (como se definen en las reivindicaciones) para determinar en una mujer el riesgo de desarrollar preeclampsia durante el embarazo, realizados en una muestra biológica, tal como sangre o suero, obtenida de una mujer embarazada durante el primer o segundo trimestre de embarazo (p. ej., a las 5 semanas después de la concepción, en cualquier momento entre las 6 y 12 semanas, o a las 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, o 24 semanas después de la concepción); midiendo el nivel de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y de PIGF en la muestra; en donde el nivel de SHBG y PIGF en la muestra indica el nivel de riesgo de desarrollar preeclampsia. En estos procedimientos, la muestra puede ser una muestra tomada en ayunas o no. Los nuevos procedimientos se pueden usar para evaluar el nivel de riesgo de preeclampsia. El PIGF también se puede detectar en muestras de orina.

[0022] En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen medir el nivel de SHBG en una muestra biológica, p. ej., de suero o sangre, obtenida de la persona embarazada; medir el nivel de PIGF en una muestra biológica, p. ej., muestra de suero, sangre u orina, obtenida de la persona embarazada; comparar el nivel de SHBG obtenido de la persona embarazada con un nivel de SHBG obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal; y comparar el nivel de PIGF obtenido de la persona embarazada con un nivel de PIGF obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal. Un nivel bajo de SHBG y PIGF presente en la muestra obtenida de la persona embarazada, comparado con los niveles presentes en la al menos una persona que tiene un embarazo normal, indica que la persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.

[0023] En otro aspecto, los niveles de SHBG y/o PIGF se correlacionan con: 1) la edad gestacional en el momento en el que se miden los niveles de SHBG y PIGF; 2) la edad de la persona embarazada; 3) el número de partos de la persona embarazada; y 4) el índice de masa corporal de la persona embarazada.

[0024] En otro aspecto, el procedimiento incluye además medir el nivel de al menos una citoquina o factor de crecimiento (o ambos) en la muestra biológica de la persona; p. ej., muestra de orina, sangre o suero, y generar un perfil de ensayo que comprende un valor o una pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de una citoquina específica, SHBG y/o PIGF, y comparar el perfil de ensayo con un perfil de referencia, en donde el perfil de referencia comprende un valor o una pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de una citoquina específica, SHBG y/o PIGF en una muestra de orina de referencia obtenida de una persona de referencia. La citoquina puede ser una inmuno/hematopoyetina, un interferón, una molécula relacionada con un factor de necrosis tumoral (TNF) o una quimioquina. Los ejemplos incluyen interleuquina (IL)-6, IL-8, IL-1 β , proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1 o TNF- α , o cualquier combinación de los mismos. Un perfil de referencia se puede generar a partir de una muestra obtenida de cualquier fuente que contenga, o se crea que contiene, una citoquina. Los niveles de referencia de las citoquinas y/o factores de crecimiento se pueden usar para generar perfiles de referencia. Por ejemplo, el perfil de referencia se puede obtener de la orina, suero, plasma, líquido amniótico o tejido placentario de una persona de referencia. Una persona de referencia puede ser una embarazada que tiene preeclampsia o una embarazada que tiene un embarazo normal.

[0025] Los procedimientos de la invención se pueden llevar a cabo poniendo en contacto una muestra obtenida de una persona embarazada con una matriz de biomoléculas inmovilizadas específicas para SHBG y/o PIGF y detectando una modificación de las biomoléculas. La modificación es indicativa del nivel de SHBG y/o PIGF en una muestra y puede incluir la unión estable o transitoria de la biomolécula a la SHBG o PIGF. Los niveles de SHBG y PIGF de ensayo se pueden comparar con niveles de referencia obtenidos de personas de referencia. Los niveles de referencia se pueden usar además para generar un perfil de referencia a partir de una o más personas de referencia. En un aspecto, las biomoléculas son anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, las biomoléculas son antígenos, tales como antígenos víricos que reconocen específicamente citoquinas. En otro aspecto más, las biomoléculas son receptores.

[0026] En otro aspecto, la invención se caracteriza por matrices (como se definen en las reivindicaciones) para detectar la preeclampsia. Estas matrices incluyen un sustrato que tiene una pluralidad de sitios, teniendo cada sitio dispuesto en el mismo un conjunto de una o más biomoléculas, y detectando cada biomolécula en un conjunto

- específicamente la misma molécula; en donde un primer conjunto de una o más biomoléculas detecta específicamente la SHBG, y un segundo conjunto de una o más biomoléculas detecta específicamente el PIGF. Las matrices pueden además incluir biomoléculas que detectan específicamente citoquinas tales como, por ejemplo, interleuquina (IL)-6, IL-8, IL-1 β , proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1 o TNF- α . En un aspecto, una matriz
- 5 de la invención incluye además al menos dos sitios que tienen dispuestos en los mismos una biomolécula inmovilizada específica de un factor de crecimiento que detecta específicamente al menos un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo el receptor de la tirosina quinasa 1 similar a fms soluble (sFlt1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2).
- 10 **[0027]** La invención también se caracteriza por un kit de diagnóstico preenvasado (como se define en las reivindicaciones) para detectar la preeclampsia. El kit puede incluir una matriz como se describe en el presente documento e instrucciones para usar la matriz para ensayar una muestra biológica, p. ej., una muestra de orina, sangre o suero, para detectar la preeclampsia.
- 15 **[0028]** La invención también incluye procedimientos como se definen en las reivindicaciones, p. ej., que usan las nuevas matrices, para determinar la eficacia de un tratamiento administrado para tratar la preeclampsia.
- [0029]** Estos procedimientos incluyen poner en contacto la matriz con una muestra obtenida de una paciente embarazada en tratamiento para la preeclampsia. El nivel de SHBG y/o PIGF se puede determinar y comparar con el
- 20 nivel de SHBG y/o PIGF detectado en una muestra obtenida de la paciente antes, o posteriormente a la administración del tratamiento. Posteriormente, se puede proporcionar a un cuidador la información de la comparación para la posterior evaluación.
- [0030]** Además, se puede introducir un perfil de ensayo en un sistema de ordenador que contiene, o tiene acceso
- 25 a una base de datos que incluye una pluralidad de perfiles de referencia codificados digitalmente. Cada perfil de la pluralidad tiene una pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de SHBG y/o PIGF de una embarazada que tiene, o con predisposición a tener, preeclampsia. De esta forma, se puede usar un solo perfil de persona para identificar una persona con riesgo de desarrollar preeclampsia basándose en los valores de referencia.
- 30 **[0031]** Por lo tanto, en otros aspectos, la invención también se caracteriza por medios de lectura por ordenador (como se define en las reivindicaciones) que contienen una base de datos que incluye uno o más perfiles de referencia digitalmente codificados, en donde un primer perfil de referencia representa un nivel de SHBG en una o más muestras de una o más personas embarazadas que tienen preeclampsia, y opcionalmente un segundo perfil de
- 35 referencia que representa un nivel de PIGF en una o más muestras de una o más personas embarazadas que tienen preeclampsia.
- [0032]** La invención también se caracteriza por sistemas de ordenador (como se definen en las reivindicaciones) para determinar si una persona embarazada tiene o tiene predisposición a tener, preeclampsia.
- 40 **[0033]** Estos sistemas incluyen una base de datos que tiene uno o más perfiles de referencia digitalmente codificados, en donde un primer perfil de referencia representa un nivel de SHBG en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia, y opcionalmente un segundo perfil de referencia que representa un nivel de PIGF en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia, y un servidor que incluye un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador: i) reciba un perfil de una persona
- 45 embarazada que comprende un nivel de SHBG, o los niveles de SHBG y PIGF detectados en una muestra de las personas; ii) identifique de la base de datos un perfil de referencia que se corresponda que sea diagnósticamente relevante con el perfil de la persona embarazada; y iii) genere una indicación de si la persona tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.
- 50 **[0034]** Además de su uso para identificar qué mujeres tienen riesgo, los nuevos procedimientos se pueden usar como un cribado o "precibado" rutinario para todas las mujeres embarazadas para identificar aquellas mujeres que no están en riesgo de padecer preeclampsia, evitando así la necesidad de ensayos adicionales posteriores durante el embarazo.
- 55 **[0035]** Como se usa en el presente documento, las expresiones "moléculas biológicas" y "biomoléculas" se pueden usar de forma intercambiable. Se entiende que estas expresiones deben interpretarse de forma amplia, y en general abarcan polipéptidos, péptidos, oligosacáridos, polisacáridos, oligopéptidos, proteínas, oligonucleótidos y polinucleótidos. Los oligonucleótidos y polinucleótidos incluyen, por ejemplo, ADN y ARN, p. ej., en forma de aptámeros. Las biomoléculas también incluyen compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de

compuestos orgánicos y organometálicos, sacáridos, aminoácidos y nucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, fármacos, esteroides, lecitinas, vitaminas, minerales, metabolitos, cofactores y coenzimas. Las biomoléculas además incluyen derivados de las moléculas descritas. Por ejemplo, los derivados de biomoléculas incluyen lípidos y derivados de glicosilación, derivados de oligopéptidos, polipéptidos, péptidos y proteínas, tales como anticuerpos.

- 5 Ejemplos adicionales de derivados de biomoléculas incluyen derivados lipídicos de oligosacáridos y polisacáridos, p. ej., lipopolisacáridos.

10 **[0036]** Salvo que se define de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento, tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos, y no se pretende que sean limitantes.

- 15 **[0037]** Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 **[0038]**

La figura 1 es una gráfica tridimensional de una comparación entre los niveles de PIGF (pg/ml) y SHBG (nmol/l) en personas identificadas con riesgo de desarrollar un trastorno gestacional.

- 25 La figura 2 es un mapa térmico de una matriz de citoquinas que representa la correlación entre los niveles de citoquinas en la orina y el riesgo de desarrollar un trastorno gestacional.

La figura 3 es una tabla que proporciona datos relacionados con la recuperación de citoquinas de muestras de orina, en presencia o ausencia de un inhibidor de proteasa.

30

La figura 4 es una tabla que proporciona datos relacionados con la reproducibilidad de la identificación de citoquinas en una muestra biológica usando una matriz de citoquinas.

- 35 La tabla 5 es una tabla que proporciona datos relacionados con la relación de sFlt-1/PIGF en el suero de mujeres embarazadas.

La tabla 6 es una tabla que proporciona datos relacionados con la correlación de niveles de citoquinas y niveles de factores de crecimiento en la identificación de un trastorno gestacional.

- 40 La figura 7 es una tabla que proporciona datos de muestras de suero de mujeres con antecedentes de DMG, PE y embarazo normoglucémico/normotenso no complicado (ENC).

La figura 8 representa una gráfica tridimensional de los resultados de un análisis de componentes principales (ACP) de datos de factores de crecimiento de "caso" (es decir, persona de ensayo) frente a "control" (es decir, referencia).

45

La figura 9 es una gráfica que representa los resultados de un análisis discriminante bayesiano aplicado al conjunto de datos de 5 proteínas (citoquinas) medidas en cada uno de 5 casos y 5 controles.

- 50 La figura 10 es una tabla que proporciona los resultados para detectar diferencias medias en los niveles de citoquinas en casos frente a personas de control.

La tabla 11 es una tabla que proporciona los resultados de un cálculo que detecta tendencias lineales significativas (prueba chi-cuadrado para la tendencia) a través de terciles para identificar el riesgo relativo (RR) de una persona a desarrollar un trastorno gestacional.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0039] Los trastornos gestacionales tales como la hipertensión inducida por embarazo (HIE) y la diabetes mellitus gestacional (DMG) ocurren en el tercer trimestre de embarazo, y están asociados a una morbosidad y mortalidad

materna y fetal significativas. Actualmente no hay pruebas de laboratorio eficaces para predecir la incidencia de cualquiera de los trastornos pronto en el embarazo. Los diagnósticos en general se hacen durante el tercer trimestre cuando surgen los síntomas o durante cribados de la presión arterial y glucosa sanguínea rutinarios. La ausencia crítica de ensayos de diagnóstico para predecir estos trastornos ha obstaculizado la capacidad de los investigadores para identificar agentes terapéuticos preventivos; las estrategias preventivas actuales han fracasado en gran medida debido a que estas intervenciones se iniciaban tarde en el embarazo cuando la posibilidad de alterar el desenlace del embarazo está limitada. Además, la ausencia de marcadores predictivos tempranos limita la capacidad de los médicos para implementar tratamientos preventivos en mujeres con alto riesgo.

- 10 **[0040]** La preeclampsia (PE) es un trastorno de células endoteliales, cuya patogénesis no se entiende bien. La PE se ha asociado con alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis, de modo que la administración de sFlt1, un inhibidor endógeno para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PIGF), producía similitudes fenotípicas a la PE en animales. De hecho, parece que niveles bajos de PIGF y VEGF (proangiogénico) en el suero y niveles aumentados de sFlt-1 (antiangiogénico) preceden al inicio de síntomas clínicos. Por lo tanto, como se describe en el presente documento, niveles bajos de PIGF están relacionados con la preeclampsia.

- 20 **[0041]** Sin embargo, además de alteraciones en la angiogénesis, las mujeres que desarrollan PE también tienen pruebas de resistencia a la insulina. Los modelos in vitro fuera del embarazo sugieren que la señalización de la insulina y la angiogénesis están íntimamente relacionadas. Por ejemplo, la insulina activa la expresión del ARNm de VEGF en células endoteliales, y tanto la señalización de insulina como de VEGF conducen a la producción de óxido nítrico. El síndrome de resistencia a la insulina está compuesto de un grupo de anomalías metabólicas que confieren un riesgo mayor de diabetes, hipertensión y enfermedad cardiovascular. Algunas características del síndrome de resistencia a la insulina, tales como la obesidad, hipertensión, dislipidemia, inflamación sistémica e fibronilisis alterada, también están asociadas con la preeclampsia. Además, las mujeres con síndrome del ovario poliquístico o diabetes gestacional, dos trastornos caracterizados por la resistencia a la insulina, tienen un mayor riesgo de preeclampsia.

- 30 **[0042]** Debido a que tanto la señalización de insulina como la angiogénesis normales mantienen la salud de células endoteliales, es posible que mujeres con resistencia a la insulina preexistente tengan una respuesta exagerada a alteraciones en factores angiogénicos, y alteraciones en ambas rutas actúan de forma sinérgica para aumentar el riesgo de PE. La presente invención proporciona pruebas epidemiológicas de que existe una interacción entre la resistencia a la insulina y la angiogénesis.

- 35 **[0043]** La invención proporciona procedimientos (como se definen en las reivindicaciones) para usar un biomarcador de resistencia a la insulina, la SHBG, y un biomarcador angiogénico, el PIGF, como indicadores del riesgo de desarrollar preeclampsia, los niveles de SHBG y PIGF se pueden usar conjuntamente con otros niveles de biomarcadores, tales como una citoquina o factor de crecimiento, para predecir la probabilidad de una persona de desarrollar preeclampsia. Es importante que a diferencia de otros marcadores de resistencia a la insulina, la SHBG es fiable tanto en ayunas como en estado de no ayunas y presenta una variación diurna mínima (Hamilton-Fairley y col., *Clin. Endocrinol.* (Oxford), 43:159 (1995)). Estas características hacen a la SHBG un marcador único de la resistencia a la insulina, en especial útil en situaciones clínicas cuando no se recogen rutinariamente muestras de sangre en ayunas, tal como durante la atención obstétrica prenatal.

- 45 **[0044]** La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) es una glicoproteína sintetizada por el hígado que une estrógenos y testosterona de la circulación. La producción de SHBG hepática es inhibida por la insulina y por lo tanto, un nivel reducido de SHBG es un marcador de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. La utilidad clínicas de la medición de SHBG como un índice de la resistencia a la insulina se estableció en estudios en los que un nivel reducido de SHBG se asociaba con riesgo mayor de futura diabetes de tipo II en mujeres por lo demás sanas (véase, p. ej., Lindstedt y col., *Diabetes*, 40:123 (1991) y Haffner y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:56 (1993)). En el embarazo normal, los niveles de SHBG aumentan de forma constante durante el primer y segundo trimestre, alcanzando un máximo que es 4-6 veces el intervalo normal para no embarazadas. Durante el primer trimestre de embarazo, los niveles de SHBG aumentan de 3 a 5 veces por encima del intervalo normal en mujeres sanas que están menstruando (Kerlan y col., *Clin. Endocrinol.* (Oxford), 40:253 (1994), O'Leary y col., *Clin. Chem.*, 37:667 (1991)). Este aumento temprano en la gestación del nivel de SHBG refleja el aumento contemporáneo del nivel de estradiol, que aumenta casi 20 veces durante el primer trimestre de embarazo solo (ídem).

[0045] El nivel de estradiol continua aumentando a lo largo del final del embarazo de modo que en el parto, el nivel alcanza más de 100 veces el intervalo normal de fase folicular temprana, de no embarazadas. En cambio, el máximo

de la SHBG tiene un máximo en un nivel que es 4-6 veces el intervalo normal de no embarazadas, en el espacio de 24 semanas de gestación, y después el nivel permanece constante a lo largo de la duración del embarazo. La resistencia a la insulina y los niveles de insulina también aumentan progresivamente durante la gestación normal, pero el mayor aumento ocurre durante la segunda mitad del embarazo (véase, p. ej., Catalano y col., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165:1667 (1991), Stanley y col., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 105:756 (1998)). Este aumento fisiológico de la resistencia a la insulina durante el tercer trimestre puede prevenir posteriores aumentos de los niveles de SHBG que de lo contrario se esperaría en el marco de aumentos progresivos en los niveles de estradiol.

[0046] La asociación identificada en el presente documento entre los niveles de SHBG y PIGF en el primer trimestre y el desenlace adverso del embarazo en el análisis univariante y multivariante, indica que la resistencia a la insulina contribuye a la patogénesis de la preeclampsia, hipertensión gestacional, y diabetes gestacional. Además, demuestra que las mediciones de SHBG del primer trimestre son un procedimiento de cribado útil para identificar mujeres con riesgo alto de tener estos trastornos.

Procedimientos de identificación de personas con riesgo

[0047] La resistencia a la insulina y el síndrome metabólico caracterizan a mujeres que desarrollan preeclampsia (PE). Los factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis (PIGF) y sus inhibidores (sFlt-1) se han asociado con el desarrollo de la PE. La presente invención proporciona la primera prueba de que en la PE los niveles de factores maternos (p. ej., resistencia a la insulina) y los niveles de factores placentarios (p. ej., indicadores de angiogénesis, tales como PIGF y sFlt-1) se puede correlacionar (es decir, son ataques aditivos) para predecir epidemiológicamente el riesgo en una mujer embarazada de desarrollar un trastorno gestacional tal como la preeclampsia. Más específicamente, las alteraciones en dos rutas, la resistencia a la insulina (p. ej., puesta de manifiesto por niveles anómalos de SHBG o citoquinas (tal como IL-6)) y la angiogénesis (p. ej., puesta de manifiesto por PIGF bajo o sFlt-1 alto), cuando se combinan, se pueden usar para predecir trastornos gestacionales.

[0048] El síndrome metabólico y la resistencia a la insulina (caracterizada por mediciones de resistencia a la insulina que incluyen niveles elevados de insulina, niveles alterados de glucosa, un marcador de este síndrome, en concreto, niveles bajos de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), niveles elevados de lípidos, índice de masa corporal elevado, marcadores inflamatorios elevados, y factores de coagulación alterados) interaccionan epidemiológica y biológicamente con factores angiogénicos para conferir mayor riesgo de preeclampsia y enfermedades relacionadas, incluyendo el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes. La SHBG añade una cantidad significativa de información explicativa (información predictiva) al PIGF y sFlt-1, y la combinación proporciona un mecanismo para identificar personas con riesgo.

[0049] Debido al aumento natural de los niveles de SHBG durante el embarazo, y dados los otros factores conocidos que influyen en los niveles de SHBG, para usar en los nuevos procedimientos, los resultados de los niveles de SHBG se pueden ajustar para el número de semanas en el embarazo (es decir, edad gestacional en el momento de la toma de muestra de sangre). Además, los niveles de SHBG también se pueden ajustar para uno o más de la edad, edad gestacional, grado, niveles de estradiol y testosterona e índice de masa corporal (IMC).

[0050] Las características iniciales de la población del estudio se muestran en la tabla 1 (en los ejemplos, a continuación). Las mujeres que desarrollaron preeclampsia (PE) tenían más probabilidad de ser nulíparas, tenían un índice de masa corporal mayor y mayor presión arterial sistólica comparadas con los controles normotensos. Además las edades gestacionales en el parto eran más tempranas y los pesos fetales al nacer eran menores entre las mujeres que desarrollaban PE comparadas con los controles.

[0051] La recolección de sangre de la primera visita prenatal puso de manifiesto que los niveles en el suero del factor de crecimiento placentario (PIGF) y la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) eran significativamente menores entre mujeres que posteriormente desarrollaban PE comparadas con los controles normotensos (tabla 2, en ejemplos). En esta etapa temprana del embarazo, los niveles en el suero de sFlt-1 no diferían notablemente entre los dos grupos, pero la tendencia sugería que las mujeres que desarrollan PE tenían niveles elevados incluso en esta etapa temprana del embarazo. La correlación entre SHBG y PIGF era fuertemente positiva ($r = 0,58$, $P < 0,001$), sugiriendo que las mujeres con niveles iniciales bajos de PIGF también tenían niveles bajos en el suero de SHBG. La correlación entre sFlt-1 y SHBG era $r = 0,17$, $P = 0,10$.

[0052] Los niveles en el suero de PIGF se dividieron entonces en una variable binomial (bajo frente a alto) con puntos de corte basados en el percentil 25 de la población de control (≤ 20 pg/ml frente a > 20 pg/ml). En el análisis no ajustado, las mujeres con niveles iniciales de PIGF en el suero bajos tenían un riesgo 6 veces mayor de desarrollar preeclampsia comparado con mujeres con niveles de PIGF iniciales altos (tabla 3, en los ejemplos).

Después de ajustar la edad materna, edad gestacional de la toma de sangre, raza, número de partos, índice de masa corporal, presión arterial sistólica, y niveles en el suero de sFlt-1 y SHBG, la estimación puntual aumentó ligeramente (tabla 3). Es importante que el ajuste del modelo (área bajo la curva) mejoró cuando se añadió la SHBG al modelo (de 0,80 a 0,86), sugiriendo que la inclusión de la SHBG en el análisis no representaba un sobreajuste del modelo, sino una mejora.

[0053] Después, se examinaron las estimaciones puntuales específicas de estrato basados en los niveles bajo (≤ 175 mg/dl) y alto (>175 mg/dl) de SHBG (de nuevo representan el percentil 25 entre controles). Estos análisis pusieron de manifiesto estimaciones puntuales notablemente diferentes para el PIGF entre los dos estratos. En los estratos de mujeres con niveles bajos en el suero de SHBG, el riesgo de preeclampsia entre mujeres con niveles bajos en el suero de PIGF era 25,5, mientras que la estimación entre mujeres con niveles altos de SHBG (y niveles bajos de PIGF) era 1,8 (tabla 3). Por lo tanto, las diferencias en estas estimaciones puntuales observadas en análisis estratificado, sugerían que el efecto del PIGF era modificado por diferentes grados de resistencia a la insulina. Se exploró más la sugerencia de una interacción o efecto de modificación.

[0054] En una modelo univariante, el término de interacción PIGF x SHBG era estadísticamente significativo (Wald $p = 0,02$). Sin embargo, en el modelo ajustado (incluyendo otras variables de confusión, PIGF, sFlt-1 y SHBG en el suero), el término de interacción ya no era significativo (Wald $p = 0,10$) y los intervalos de confianza se ampliaban como era de esperar. Los autores de la invención entonces incluyeron términos de interacción basados en los puntos de corte examinados previamente en un modelo multivariante que ajustaba para las variables de confusión importantes. En este modelo con tres ($n-1$) términos de interacción (PIGF *alto* y SHBG *alto* y referencia), el riesgo de desarrollar preeclampsia entre mujeres con niveles bajos el primer trimestre de PIGF y SHBG era aproximadamente el doble del riesgo encontrado en mujeres con solo niveles bajos de PIGF, y aproximadamente cuatro veces el riesgo entre mujeres con solo niveles bajos de SHBG (tabla 3). Es importante que estas estimaciones no difieren notablemente cuando estos análisis se restringían a mujeres nulíparas (PIGF *bajo* y SHBG *bajo*, CP 13,8, IC al 95% 1,5-124,2) o multiparas (CP, 15,7, IC al 95% 0,9-276,6), sugiriendo que las diferencias en los valores iniciales en el número de partos no explican los hallazgos (no se muestran otros datos).

[0055] La gráfica tridimensional mostrada en la figura 1 indica que las personas embarazadas con niveles de SHBG que son menores que una persona de referencia (es decir, $<$ aproximadamente 175 nmol/l) y niveles de PIGF que son menores que una persona de referencia (es decir, $<$ aproximadamente 20 pg/ml/l) tienen un riesgo mayor de desarrollar un trastorno gestacional. La gráfica también indica que hay al menos cuatro categorías de riesgo: riesgo muy bajo, riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto. Específicamente, un nivel bajo de SHBG y nivel bajo de PIGF corresponden a riesgo alto. Un nivel alto de SHBG y nivel alto de PIGF corresponden a un riesgo muy bajo. Un nivel bajo de SHBG y nivel alto de PIGF corresponde a riesgo bajo. Un nivel alto de SHBG y nivel bajo de PIGF corresponde a riesgo intermedio. Las mujeres que tienen resultados que indican un riesgo bajo, intermedio o riesgo alto, pueden entonces tomar medidas para hacer pruebas adicionales y/o ser tratadas de un trastorno particular. Por lo tanto, la nueva prueba es útil no solo para determinar las mujeres con riesgo, sino también para determinar qué mujeres no tienen riesgo de futuras complicaciones gestacionales. Por lo tanto, el nuevo procedimiento de prueba puede reducir significativamente pruebas posteriores innecesarias durante el embarazo.

[0056] Estos datos proporcionan la primera prueba de que mujeres con alteraciones en marcadores para los factores angiogénicos en la circulación y en marcadores para la resistencia a la insulina tenían un riesgo mayor de desarrollar preeclampsia (PE) comparado con mujeres con alteraciones en una sola de las mediciones, y también comparado con mujeres sin ninguna alteración. Específicamente, las mujeres con niveles bajos del factor de crecimiento placentario (PIGF) en el suero en el primer trimestre tenían riesgo mayor de desarrollar posteriormente PE, y el riesgo era extremo en mujeres que también tenían niveles bajos de SHBG, un marcador subrogado de la resistencia a la insulina. Los datos indican que hay una interacción significativa entre el PIGF y SHBG en el suero, de modo que la asociación entre los niveles de PIGF y el posterior riesgo de PE era modificado dependiendo del nivel de SHBG en el suero.

[0057] Este descubrimiento de una interacción estadística convincente indica además que se producen interacciones moleculares críticas entre la señalización de insulina intracelular y la angiogénesis. Por ejemplo, la unión de la insulina al receptor de insulina conduce a la activación de una variedad de rutas de señalización que implican proteína quinasas específicas, y lo más importante es que incluyen la proteína quinasa B alfa/Akt quinasa. Esta etapa crítica gobierna funciones celulares que incluyen apoptosis, metabolismo y proliferación. Además, la insulina también regula la expresión de genes implicados en la angiogénesis, incluyendo la expresión del ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la señalización de VEGF (y probablemente PIGF) también activa la fosforilación de Akt. Es interesante que ratas diabéticas demuestran una expresión celular reducida del ARNm de

VEGF, un proceso que puede ser rescatado por insulina. Por lo tanto, los defectos en el receptor de insulina o en las rutas de señalización de insulina corriente abajo pueden conducir a alteraciones en factores angiogénicos. Una combinación de estos ataques puede actuar de forma sinérgica para alterar funciones celulares críticas, lesionar células endoteliales, y posteriormente aumentar el riesgo de desarrollar PE.

5

[0058] La angiogénesis normal también es un componente crítico del desarrollo placentario. Además de mantener la integridad de las células endoteliales, el VEGF y PIGF son responsables de la proliferación, migración e invasión de trofoblastos, procesos clave que dictan la formación de la placenta normal y que están alterados en la preeclampsia. Por lo tanto, las alteraciones en VEGF, PIGF y su inhibidor sFlt-1, pueden tener funciones centrales en la patogénesis de la PE. Además, sin embargo, la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina tienen funciones importantes en la función vascular, incluyendo la proliferación de células endoteliales. Además, los investigadores han identificado alteraciones en la insulina y factores de crecimiento similares a insulina a nivel de la placenta en mujeres con preeclampsia. Por lo tanto, las alteraciones en la insulina o factores de crecimiento similares a insulina en presencia de alteraciones en VEGF, PIGF y sFlt-1, pueden actuar de forma sinérgica a nivel de la placenta para llevar a la invasión de trofoblastos anormal, explicando los hallazgos placentarios característicos de la PE.

[0059] Las alteraciones específicas en citoquinas inflamatorias y de resistencia a la insulina (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, e IL-8), factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis (PIGF, FGF-2), un antagonista de factor de crecimiento (sFlt-1), y un biomarcador para el síndrome metabólico asociado con la resistencia a la insulina (es decir, la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG)) se pueden conectar biológicamente con trastornos gestacionales tales como la DMG y la HIE. Como se describe con más detalle más adelante, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un cambio en los niveles de SHBG/PIGF, en la orina y/o sangre antes del tercer trimestre de embarazo, y tan pronto como en el primer trimestre, puede ser indicativo de mayor riesgo de preeclampsia. Se proporcionan procedimientos para determinar si una persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener preeclampsia.

[0060] En una realización, la invención proporciona procedimientos (como se definen en las reivindicaciones) de determinar si una persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia, que incluyen medir el nivel de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en una muestra de suero obtenida de la persona embarazada; medir el nivel del factor de crecimiento placentario (PIGF) en una muestra de suero o una muestra de orina obtenida de una persona embarazada; comparar el nivel de SHBG obtenido de la persona embarazada con un nivel de SHBG obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal; y comparar el nivel de PIGF obtenido de una persona embarazada con un nivel de PIGF obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal. Un nivel bajo de SHBG y/o PIGF presente en la muestra obtenida de la persona embarazada, comparado con los niveles presentes en al menos una persona que tiene un embarazo normal, indica que la persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia. Los niveles de SHBG y/o PIGF se correlacionan con: 1) la edad gestacional en el momento de medir los niveles de SHBG y PIGF; 2) la edad de la persona embarazada; 3) el número de partos de la persona embarazada; y 4) el índice de masa corporal de la persona embarazada. Como se usa en el presente documento, un "nivel bajo" de SHBG o PIGF se puede definir como un nivel que es menor que el nivel de SHBG o PIGF detectado en una persona que tiene un embarazo normal. En general, los niveles de SHBG y PIGF son comparables entre una persona de ensayo y una persona que tiene un embarazo normal cuando las muestras se toman de ambas personas aproximadamente a la semana "x" del embarazo de la persona más o menos 1-2 semanas (véase más adelante). Alternativamente, el nivel de SHBG o PIGF se puede definir como "bajo" en comparación con un valor umbral establecido por una o más personas de referencia. Los valores umbral de ejemplo de 175 nmol/l y 20 pg/ml para SHBG y PIGF, respectivamente, se proporcionan en la figura 1 descrita en el presente documento.

[0061] Los procedimientos pueden incluir además medir el nivel de al menos una citoquina en la muestra de orina de la persona y generar un perfil de ensayo que comprende un valor o pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de una citoquina específica, y comparar el perfil de ensayo con un perfil de referencia, en donde el perfil de referencia incluye un valor o pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de una citoquina específica en una muestra de orina de referencia obtenida de una persona de referencia. Los niveles de referencia de citoquinas y/o factores de crecimiento se pueden usar para generar perfiles de referencia. Por ejemplo, el perfil de referencia se puede obtener de la orina, suero, plasma, líquido amniótico o tejido placentario de una persona de referencia. Una persona de referencia puede ser una embarazada que tiene preeclampsia y embarazada que tiene un embarazo normal.

[0062] Un "trastorno gestacional" como se usa en el presente documento incluyen preeclampsia (PE). Un

embarazo “normal”, como se usa en el presente documento, es un embarazo que no está asociado con un trastorno gestacional.

[0063] Un perfil de “persona de ensayo” se describe en general como un perfil de “ensayo”. Un perfil de una persona se puede generar a partir de una muestra tomada de una persona antes del tercer trimestre, para identificar el riesgo de la persona a desarrollar DMG y/o HIE. Por lo tanto, un perfil de una “persona de ensayo” se genera a partir de la persona de la que se está haciendo el ensayo de preeclampsia.

[0064] Un perfil de “referencia” en general es un perfil de “control”. Un perfil de referencia se puede generar a partir de una muestra tomada en un punto de medición particular en el embarazo de una persona normal o una que tiene preeclampsia. El perfil de referencia o la pluralidad de perfiles de referencia, se pueden usar para establecer valores umbrales de los niveles, por ejemplo, de citoquinas específicas en una muestra o niveles de SHBG y PIGF en una muestra. Un perfil de “referencia” puede ser un perfil generado a partir de una sola mujer embarazada que tiene preeclampsia o un perfil generado a partir de una mujer embarazada que tiene un embarazo normal. Alternativamente, un perfil de referencia puede ser un perfil generado a partir de un conjunto de mujeres embarazadas que tienen preeclampsia o un conjunto de mujeres embarazadas que tienen embarazos normales. Un perfil de referencia se puede expresar como una matriz de “representaciones” o “patrón” de biomarcadores identificables específicos. La matriz de representaciones puede tener un código de colores para la identificación fácil visual o asistida por ordenador. La representación también se puede describir como uno o más números que corresponden a valores atribuidos a los biomarcadores identificados por la matriz. La clave mostrada en la figura 2 (lado derecho) proporciona un ejemplo de cómo se pueden atribuir valores a concentraciones de biomarcadores identificados por una matriz. El “análisis de matriz” como se usa en el presente documento, es el procedimiento de extrapolación de información de una matriz usando cálculos estadísticos tales como análisis de factores o análisis de componentes principales (ACP).

[0065] Además de ser expresado como una representación, un perfil de referencia se puede expresar como un valor “umbral” o series de valores umbral. Por ejemplo, se puede determinar un solo valor umbral para el nivel de SHBG o PIGF en una persona embarazada. Los valores umbral de ejemplo para la SHBG (aproximadamente 175 nmol/l) y PIGF (aproximadamente 20 pg/ml) se proporcionan en la tabla 3 y la figura 1. En relación con los niveles de citoquinas, se puede determinar un solo valor umbral promediando los valores de una serie de niveles de citoquina de mujeres embarazadas que tienen embarazos normales. De forma similar, se puede determinar uno solo o dos o más valores umbral promediando los valores de una serie de niveles de citoquina de mujeres embarazadas que tienen un trastorno gestacional. Por lo tanto, un valor umbral puede tener un solo valor o una pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de una citoquina específica o factor de crecimiento, o antagonista del mismo, detectado en una muestra de orina o sangre, p. ej., de una persona embarazada, o múltiples personas, que tienen un trastorno gestacional.

[0066] Por ejemplo, cuando también se consideran valores de citoquinas, la figura 2 muestra que un valor umbral para los niveles de MCP-1 obtenidos de muestras obtenidas de mujeres embarazadas que tienen embarazos normales, se puede calcular basándose en el promedio de las 5 muestras de orina (véase las columnas horizontales de “control” para las pacientes designadas 262, 104, 102, 35, y 20 y la correspondiente columna vertical de MCP-1). El nivel medio de MCP-1 (suponiendo $90 + 230 + 210 + 300 + 210$ pg/ml) es aproximadamente 200 pg/ml. Una comparación de estos datos con los niveles de MCP-1 en muestras de orina de las pacientes designadas 381, 305, 289, 94 y 64, indica que un valor de MCP-1 inferior a aproximadamente 200 pg/ml es indicativo de un embarazo normal. En cambio, una mujer embarazada que tiene un nivel de MCP-1 en su orina que supera aproximadamente 200 pg/ml a las 16-18 semanas de gestación, se predice que tiene riesgo de desarrollar un trastorno gestacional. De forma similar, muestras de orina tomadas de las mismas pacientes indican que un nivel de IL-6 por encima de 20 pg/ml es indicativo de un trastorno gestacional. Además, las muestras de orina tomadas de las mismas pacientes indican que un nivel de IL-8 inferior 200 pg/ml es indicativo de un trastorno gestacional.

[0067] Las muestras usadas para generar un perfil de la invención, que incluye los niveles de SHBG y PIGF, se pueden obtener entre aproximadamente las 6 y 24 semanas, entre aproximadamente las 12 y 24 semanas o entre aproximadamente las 18 y 24 semanas después de la concepción. Típicamente, la muestra se toma antes del tercer trimestre, p. ej., en cualquier momento entre las 5 y 24 semanas después de la concepción (p. ej., a las 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 semanas). Por ejemplo, se puede obtener una muestra biológica de una mujer embarazada entre aproximadamente las 6 y 24 semanas, entre aproximadamente las 12 y 24 semanas, o entre aproximadamente las 18 y 24 semanas después de la concepción. La muestra se puede usar para generar un perfil de ensayo o un perfil de referencia.

[0068] Un perfil de ensayo o perfil de referencia se genera a partir de una muestra tomada en cualquier momento de tiempo en el embarazo. La muestra puede ser sangre, suero u orina. Los perfiles de ensayo y de referencia se generan a partir de muestras tomadas de periodos de tiempo similares en los embarazos de ensayo y de referencia. En general, si un perfil de ensayo se genera a partir de una muestra tomada la semana "x" del embarazo de ensayo, entonces el perfil de referencia adecuado para fines de comparación se generará a partir de una muestra tomada la semana "x" más o menos 2 semanas (o 1 semana) del embarazo de referencia. Por ejemplo, un perfil de ensayo obtenido de una muestra de una mujer embarazada que se calcula que está en su 16ª semana de embarazo, se puede comparar con un perfil de referencia, o una pluralidad de perfiles de referencia, obtenidos de muestras obtenidas de mujeres embarazadas en su 14ª o 18ª semana de embarazo.

10

[0069] Las mujeres que tienen, o tienen predisposición a tener, un trastorno gestacional se pueden identificar antes del tercer trimestre de embarazo. Un biomarcador puede ser una citoquina, un factor de crecimiento o un inhibidor de factor de crecimiento. Más específicamente, un biomarcador de resistencia a la insulina o biomarcador angiogénico incluye citoquinas, factores de crecimiento e inhibidores de factores de crecimiento. Un biomarcador de resistencia a la insulina incluye la SHBG. Un biomarcador angiogénico incluye el PIGF.

15

[0070] Un perfil de ensayo puede incluir el nivel de SHBG y PIGF en una muestra de sangre, suero de superficie u orina obtenida de una persona embarazada. El perfil puede incluir además el nivel de al menos dos citoquinas detectadas en una muestra de orina de una persona y comparar el perfil de ensayo con un perfil de "referencia" que incluye el nivel de SHBG y PIGF obtenido de una persona embarazada normal. El perfil de referencia puede incluir además el nivel de al menos dos citoquinas detectadas en una muestra de orina. Si el perfil de referencia se obtiene de una muestra obtenida de una persona de referencia que tiene un embarazo normal, entonces la similitud del perfil de ensayo con el perfil de referencia es indicativo de un embarazo normal (no asociado a preeclampsia) para la persona ensayada. Alternativamente, si el perfil de referencia se obtiene de una muestra obtenida de una persona de referencia que tiene preeclampsia, entonces la similitud del perfil de ensayo con el perfil de referencia es indicativo de un embarazo asociado a preeclampsia para la persona ensayada.

Citoquinas

[0071] Los procedimientos de la invención pueden incluir además correlacionar los niveles de SHBG y PIGF con niveles de una o más citoquinas, en muestras de sangre y/o suero. La citoquina puede ser una inmuno/hematopoyetina, un interferón, una molécula relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF) o una quimioquina. Los ejemplos incluyen interleuquina (IL)-6, IL-8, IL-1 β , proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1 o TNF- α , o cualquier combinación de los mismos. Las citoquinas comprenden una amplia serie de proteínas farmacológicamente activas, de pesos moleculares relativamente bajos, que son secretadas por células con el fin de alterar sus propias funciones (efecto autocrino) o las de células adyacentes (efecto paracrino). En muchos casos, citoquinas individuales tienen múltiples actividades biológicas. Diferentes citoquinas también pueden tener la misma actividad, lo que proporciona redundancia funcional dentro de los sistemas inflamatorio e inmunitario. Como resultado, no es frecuente que la pérdida o neutralización de una citoquina interfiera notablemente con cualquiera de estos sistemas. Este hecho tiene una gran importancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas.

[0072] Las citoquinas se pueden subdividir en varios grupos, que incluyen las inmuno/hematopoyetinas, interferones, moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) y quimioquinas. Las inmuno/hematopoyetinas representativas incluyen eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de inhibición de leucemia (LIF), oncostatina-M (OSM), factor neutrófico ciliar (CNTF), hormonas de crecimiento (GH), prolactina (PRL), interleuquina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, e IL-12. Los interferones (IFN) representativos incluyen IFN α , IFN β , e IFN-gamma.

[0073] Los miembros de la familia de TNF representativos incluyen TNF α , interferón (IFN) β , gp³⁹ (CD40-L), CD27-L, CD30-L, y factor de crecimiento nervioso (NGF).

[0074] Las quimioquinas representativas incluyen factor de plaquetas (PF)4, proteína básica de plaquetas (PBP), gro α , MIG, ENA-78, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)1 α , MIP1 β , proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1, I-309, HC14, C10, quimioquina expresada y secretada por linfocitos T normales regulada por activación (RANTES), e IL-8.

[0075] Las quimioquinas son una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas con potente activación de leucocitos y/o actividad quimiotáctica. Tienen de 70 a 90 aminoácidos de longitud y peso molecular de

aproximadamente 8 a 10 kDa. La mayoría encajan en dos subfamilias con cuatro restos de cisteína. Estas subfamilias se distinguen en si los dos restos de cisteína amino terminales están inmediatamente adyacentes uno de otro o están separados por un aminoácido. Las quimioquinas, también llamadas quimioquinas CXC, contienen un solo aminoácido entre el primer y el segundo resto de cisteína; las quimioquinas B o CC tienen restos de cisteína adyacentes. La mayoría de las quimioquinas CXC son quimioattractoras para neutrófilos, mientras que las quimioquinas CC en general atraen monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos. Hay también otros dos subgrupos pequeños. El grupo C tiene un miembro (linfotactina). Carece de una de las cisteínas en el patrón de cuatro cisteínas, pero comparte homología en su extremo carboxilo con las quimioquinas C-C. La quimioquina C parece que es específica de linfocitos. El cuatro subgrupo es el subgrupo C-X3-C. La quimioquina C-X3-C (fractalquina/neurotactina) tiene tres restos de aminoácidos entre las dos primeras cisteínas. Está ligada directamente a la membrana celular por un tallo de mucina e induce tanto la adhesión como la migración de leucocitos.

[0076] El mapa térmico de la matriz de citoquinas en la orina, suero y plasma mostrado en la figura 2, demuestra que entre las mujeres que desarrollan preeclampsia ("casos"), la IL-6 está elevada y la IL-8 está reducida (véase el círculo blanco) en la orina en las semanas 16-18 de gestación comparado con mujeres que tienen en embarazo normotenso y con muestras de orinas recogidas en el mismo tiempo. Esta es la primera vez que se ha medido una matriz de citoquinas en la orina por esta técnica sensible y la primera vez que se han visto diferencias en la orina en esta etapa temprana del embarazo. La figura 2 también demuestra que a las 16 semanas de gestación, los niveles de otra citoquina, MCP-1, eran elevados en la orina de los casos comparado con los controles. Todas las mediciones de proteínas se normalizaron respecto a las concentraciones de creatinina en la orina.

Factores de crecimiento

[0077] El procedimiento incluye además medir el nivel de al menos un inhibidor de factor de crecimiento, tal como la tirosina quinasa 1 similar a fms soluble placentaria (sFlt-1), o un factor de crecimiento tal como el VEGF. sFlt-1, una variante de corte y empalme del receptor de VEGF que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático, actúa como un potente antagonista de VEGF y sFlt-1. Se sabe que sFlt-1 es regulada por aumento en la preeclampsia, conduciendo a niveles sistémicos aumentados de sFlt-1 que disminuyen después del parto (Maynard y col., *J. Clinical Invest.*, 111:5, 2003). La sFlt-1 en la circulación aumentada en paciente con preeclampsia está asociada con niveles disminuidos en la circulación de VEGF y PlGF libres.

[0078] El factor de crecimiento placentario (PlGF), un miembro de la familia de factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF) de factores angiogénicos (58% de identidad de secuencia con el VEGF), y otros VEGF placentarios, pueden contribuir a la patogénesis de la DMG e HIE. Además, parece que las citoquinas y factores de crecimiento cooperan en el avance de determinados trastornos patológicos. Por ejemplo, se sabe que la IL-6 promueve el cáncer de cuello uterino y pancreático y la actividad de mieloma múltiple. Estos procesos también son mediados por el VEGF (Wei y col., *Oncogene*, 22:1517, 2003). Además, el TNF- α está implicado en la secreción de VEGF por las células de mieloma (Alexandrakis y col., *Ann Hematol*, 82:19, 2003). Los factores de crecimiento y las citoquinas pueden actuar en las mismas células diana, ya que tanto el VEGF como la IL-8 activan la proliferación tanto de monocitos como de células endoteliales, y la propia IL-8 está implicada en la angiogénesis. Los factores de crecimiento y las citoquinas pueden regularse unos a otros, ya que el PlGF no solo activa monocitos, sino que también aumenta la transcripción de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β) y quimioquinas (MCP-1, IL-8). Finalmente, los factores de crecimiento pueden contrarrestar la lesión mediada por citoquinas, ya que el TNF- α induce la apoptosis de células trofoblastos, y los factores de crecimiento placentarios, tales como factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), mitigan este proceso (García-Lloret y col., *J. Cell Physiol.*, 167:324, 1996). Las funciones de las citoquinas y los factores de crecimiento están probablemente entrecruzadas, en cuanto que es necesaria la función normal de ambos para el desarrollo placentario normal, y por lo tanto, las alteraciones en ambos pueden conducir a un trastorno gestacional. El examen simultáneo de ambos puede proporcionar un procedimiento más preciso para identificar si una persona tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.

[0079] Se describe en el presente documento el uso de una combinación de alteraciones de niveles de citoquinas y factores de crecimiento como indicadores de futura enfermedad. Por ejemplo, un caso tenía un nivel en la orina de PlGF de 91,2 pg/gCr (alto, no concuerda con PE), pero tenía un nivel de IL-6 de 58 pg/gCr (alto, concuerda con PE), y un nivel de MCP-1 de 460 pg/gCr (alto, concuerda con PE). Por lo tanto, una sola medición en la orina de PlGF habría sugerido incorrectamente que esa mujer no tenía riesgo de PE, pero el examen de los niveles de IL-6 y MCP-1 habría sugerido justo lo contrario. Otro ejemplo, una persona control, el nivel de PlGF era 115,2 pg/gCr (alto, concuerda con riesgo bajo de PE) y los niveles de IL-6 eran 20 pg/gCr (bajo, concuerda con riesgo bajo de PE), pero el nivel de MCP-1 era 410 pg/gCr (alto, concuerda con riesgo alto de PE), por lo tanto, el uso de solo los niveles de

MCP-1 habría predicho incorrectamente su resultado. Por lo tanto, la memoria descriptiva también describe el uso de patrones de niveles de citoquinas y factores de crecimiento en el suero y/o la orina para determinar la predisposición de una persona a una futura enfermedad asociada con la hipertensión inducida por embarazo.

- 5 **[0080]** La memoria descriptiva describe un procedimiento de identificación de preeclampsia comparando el nivel de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 o MCP-1, o cualquier combinación de los mismos, en una primera muestra biológica de una persona embarazada, el nivel de citoquina en una segunda muestra biológica obtenida de la misma persona embarazada. Una diferencia en el nivel de una citoquina, o cualquier combinación de citoquinas, en la primera muestra comparado con la segunda muestra, es indicativa de que la persona tiene, o tiene predisposición a tener un
- 10 trastorno gestacional. La primera y la segunda muestras biológicas se pueden seleccionar de orina, sangre, suero, líquido amniótico o tejido placentario.

- [0081]** Un ensayo bioquímico de ejemplo para la identificación de proteínas específicas, tales como citoquinas, factores de crecimiento, o antagonistas de los mismos, usa un formato de ensayo estandarizado, tal como
- 15 enzoinmunoanálisis de adsorción o ensayo ELISA, aunque la información proporcionada en el presente documento se puede aplicar al desarrollo de otros ensayos bioquímicos o de diagnóstico y no está limitado al desarrollo de un ensayo ELISA (véase, p. ej., Molecular Immunology: A Textbook, editado por Atassi y col. Marcel Dekker Inc., New York and Basel 1984, para una descripción de ensayos ELISA).

- 20 **[0082]** Se entiende que están disponibles ensayos comerciales de kits de enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) para diferentes citoquinas y factores de crecimiento. Por ejemplo, en relación con los factores de crecimiento, están disponibles kits de ELISA para sFlt-1, PlGF, y FGF-2 ELISA de R&D systems. Estos kits pueden medir proteínas libres o no unidas. El CV de la precisión intraensayo (%) para sFlt-1 y PlGF es aproximadamente 3,5 y 5,6 respectivamente. El CV de la precisión interensayos (%) para sFlt-1 y PlGF es aproximadamente 8,1 y 10,9
- 25 respectivamente. Para las mediciones de FGF-2 en el suero, el CV de la precisión intraensayo e interensayos (%) es aproximadamente 8 y 12,7, respectivamente. Para PlGF y FGF-2 en la orina, el CV de la precisión intraensayo e interensayos (%) es aproximadamente 11, 9,8, 12,1 y 14,4, respectivamente.

Proteómica y micromatrices

- 30 **[0083]** La invención proporciona procedimientos (como se definen en las reivindicaciones) para predecir la preeclampsia bastante antes del final del embarazo, mediante el uso de proteómica. La proteómica es una tecnología en desarrollo capaz de ensayar la presencia de cantidades minoritarias de una amplia serie de proteínas, usando muestras pequeñas de tejido humano. Usando herramientas de proteómica, se pueden determinar
- 35 niveles aumentados o disminuidos de determinadas proteínas en una muestra biológica tal como orina, suero, líquido amniótico o tejido placentario. La invención abarca el análisis proteómico de orina como un procedimiento no invasivo para el diagnóstico de la preeclampsia alejado del final. Además, usando algoritmos matemáticos se puede obtener un proteoma complejo o "huella dactilar". Como se ha indicado previamente, dichos algoritmos incluyen "análisis de factores" y "análisis de componentes principales (ACP)". El proteoma puede consistir en un grupo de
- 40 proteínas, algunas en mayor concentración que la normal y otras en menor concentración, que son diagnóstico de preeclampsia.

- [0084]** La invención proporciona una matriz (es decir, "biochip" o "micomatriz") como se define en las reivindicaciones, que incluye biomoléculas inmovilizadas que facilitan la detección de una molécula o moléculas
- 45 particulares en una muestra biológica. Las biomoléculas que identifican los biomarcadores descritos antes y mostrados en la figura 2, pueden estar incluidas en una matriz adaptada para detectar personas con predisposición a DMG y/o HIE. Por ejemplo, una matriz adaptada puede incluir biomoléculas que identifican la SHBG y/o PlGF, o citoquinas específicas tales como EL-6, IL-8, y MCP-1. La matriz también puede incluir biomoléculas que identifican factores de crecimiento adicionales tales como FGF-2. La matriz puede incluir además una biomolécula que
- 50 identifica un antagonista de factor de crecimiento, tal como sFlt-1. Las matrices que comprenden biomoléculas que identifican específicamente biomarcadores seleccionados (p. ej., una citoquina o un factor de crecimiento o antagonista del mismo) se pueden usar para desarrollar una base de datos de información usando datos proporcionados en la presente memoria descriptiva. Se pueden incluir biomoléculas adicionales que identifican
- 55 citoquinas y/o factores de crecimiento que conducen a tasas de error por validación cruzada mejoradas en modelos de predicción multivariantes (p. ej. regresión logística, análisis discriminante, o modelos de árbol de regresión) en una matriz adaptada de la invención.

- [0085]** La matriz o matrices personalizadas proporcionan una oportunidad para estudiar la biología de la DMG e HIE. Se pueden escoger valores p estándar de significación (0,05) para excluir o incluir biomoléculas específicas

adicionales en la micromatriz que identifican biomarcadores particulares.

[0086] El término “matriz”, como se usa en el presente documento, en general se refiere a una disposición especial predeterminada de islas de unión, biomoléculas, o disposiciones espaciales de islas de unión o biomoléculas. Las matrices de acuerdo con la presente invención que incluyen biomoléculas inmovilizadas sobre una superficie también se pueden denominar “matrices de biomoléculas”. Las matrices de acuerdo con la presente invención, que comprenden superficies activadas, adaptadas, preparadas o modificadas para facilitar la unión de biomoléculas a la superficie, también se pueden denominar “matrices de unión”. Además, el término “matriz” se puede usar en el presente documento para referirse a múltiples matrices dispuestas sobre una superficie, tal como sería el caso donde una superficie lleva múltiples copias de una matriz. Dichas superficies que llevan múltiples matrices también se pueden denominar “matrices múltiples” o “matrices de repetición”. El uso del término “matriz” en el presente documento puede abarcar matrices de biomoléculas, matrices de unión, matrices múltiples y cualquier combinación de las mismas; el significado adecuado será evidente a partir del contexto. Una matriz puede incluir biomoléculas específicas de citoquinas que detectan citoquinas y otras proteínas alteradas en un trastorno gestacional. La muestra biológica puede incluir muestras líquidas o sólidas de cualquier tejido del cuerpo incluyendo fluidos de excreción tales como orina. Las muestras que no son orina incluyen, pero no se limitan a suero, plasma, líquido amniótico y tejido placentario.

[0087] Una matriz de la invención comprende un sustrato. Por “sustrato” o “soporte sólido” u otros equivalentes gramaticales, se entiende en el presente documento cualquier material adecuado para la unión de biomoléculas y es adecuado para al menos un procedimiento de detección. Como apreciarán los expertos en la materia, el número de posibles sustratos es muy grande. Los posibles sustratos incluyen, pero no se limitan a vidrio o vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo materiales acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon®, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales basados en sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, materiales cerámicos, y una variedad de otros polímeros. Además, como se conoce en la materia, el sustrato puede estar recubierto por una serie de materiales, incluyendo polímeros, tales como dextranos, acrilamidas, gelatinas o agarosa. Dichos recubrimientos pueden facilitar el uso de la matriz con una muestra biológica obtenida de la orina o suero.

[0088] Una matriz plana de la invención en general contendrá localizaciones direccionables (p. ej., “almohadillas”, “sitios”, o “microlocalizaciones”) de biomoléculas en un formato de matriz. El tamaño de la matriz dependerá de la composición y el uso final de la matriz. Se pueden hacer matrices que contienen de aproximadamente 2 biomoléculas diferentes a muchos miles. En general, la matriz comprenderá desde dos hasta a tantos como 100.000 o más, dependiendo del uso final de la matriz. Una micromatriz de la invención comprenderá en general al menos una biomolécula que identifica o “captura” un biomarcador, tal como la SHBG, SHBG, una citoquina, factor de crecimiento, o antagonista del mismo, presente en una muestra biológica. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden no estar en un formato de matriz; es decir, para algunas realizaciones, también se pueden hacer composiciones que comprenden una sola biomolécula. Además, en algunas matrices se pueden usar múltiples sustratos, de composiciones diferentes o iguales. Por lo tanto, por ejemplo, las matrices planas grandes pueden comprender una pluralidad de sustratos más pequeños.

[0089] Como una alternativa a las matrices planas, se han desarrollado ensayos basados en perlas en combinación con citometría de flujo para realizar inmunoensayos multiparamétricos. En los sistemas de ensayo basados en perlas, las biomoléculas se pueden inmovilizar en microesferas direccionables. Cada biomolécula para cada ensayo individual está acoplada a una microesfera distinta (es decir, “microperla”) y la reacción del inmunoensayo tiene lugar en la superficie de las microesferas. Se cargan microesferas teñidas con diferentes intensidades de fluorescencia por separado con sus biomoléculas adecuadas. Los diferentes conjuntos de perlas que llevan diferentes sondas de captura se pueden agrupar según sea necesario para generar matrices de perlas habituales. Después las matrices de perlas se incuban con la muestra en un solo recipiente de reacción para llevar a cabo el inmunoensayo.

[0090] La formación de producto del biomarcador con sus biomoléculas de captura inmovilizadas se puede detectar con un sistema indicador basado en fluorescencia. Los biomarcadores, tales como citoquinas, factores de crecimiento o antagonistas de los mismos, pueden estar marcados directamente con un fluorógeno o se pueden detectar mediante una segunda biomolécula de captura con marcaje fluorescente. Las intensidades de las señales derivadas de los biomarcadores de captura se miden en un citómetro de flujo. El citómetro de flujo primero identifica cada microesfera mediante su código de color individual. Segundo, se mide la cantidad de biomarcadores capturados en cada perla individual mediante el segundo color fluorescente específico para la diana unida. Esto

permite la cuantificación multiplexada de múltiples dianas de una sola muestra en el mismo experimento. La sensibilidad, fiabilidad y precisión son comparables a los procedimientos ELISA de microvaloración estándar. Con los sistemas de inmunoensayo basados en perlas, se pueden cuantificar simultáneamente citoquinas de muestras biológicas. Una ventaja de los sistemas basados en perlas es el acoplamiento individual de la biomolécula de
5 captura a distintas microesferas.

[0091] Por lo tanto, se puede usar la tecnología de matrices de microperlas para clasificar citoquinas, factores de crecimiento o antagonistas de factores de crecimiento, unidos a una biomolécula específica usando una pluralidad de microperlas, cada una de las cuales puede llevar aproximadamente 100.000 moléculas iguales de una
10 biomolécula anti-marcador específica en la superficie de una microperla. Una vez capturado, el biomarcador, tal como una citoquina se puede manipular como un fluido, denominado en el presente documento "micromatriz fluida".

[0092] Una matriz de la presente invención abarca cualquier medio para detectar una molécula biomarcadora tal como una citoquina, factor de crecimiento o antagonista del mismo. Por ejemplo, las micromatrices pueden ser
15 biochips que proporcionan matrices inmovilizadas de alta densidad de moléculas de reconocimiento (por ejemplo, anticuerpos), donde la unión del biomarcador se controla indirectamente (por ejemplo, por fluorescencia). Además, una matriz puede ser de un formato que implica la captura de proteínas por interacción bioquímica o intermolecular, acoplado con la detección directa por espectrometría de masas (MS).

[0093] Las matrices y micromatrices que se pueden usar con los nuevos procedimientos para detectar los biomarcadores descritos en el presente documento, se pueden hacer de acuerdo con los procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.329.209; 6.365.418; 6.406.921; 6.475.808; y 6.475.809, y solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/884269. Por ejemplo, el Zyomyx Human Cytokine Biochip® proporciona un sistema de perfiles de proteínas altamente sensible para 30 citoquinas biológicamente relevantes. También se pueden hacer nuevas
25 matrices, para detectar selecciones específicas de conjuntos de biomarcadores descritos en el presente documento, usando los procedimientos descritos en estas patentes.

[0094] Las matrices y micromatrices cómo se usan en el presente documento, incluyen además matrices que tienen proteínas de unión a citoquinas codificadas por patógenos inmovilizadas en una superficie sólida. Por
30 ejemplo, se han identificado genes del virus de la viruela que codifican actividades de unión para TNF, interferones de tipo I y tipo II, interleuquina (IL)-1beta, IL-18 y beta-quimioquinas. Estos receptores de alta afinidad tienen el potencial de actuar como anticuerpos subrogados en una serie de aplicaciones de cuantificación y purificación de citoquinas, y podrían ser reactivos potencialmente útiles para complementar el panel existente de anticuerpos monoclonales, policlonales o genéticamente modificados, anticitoquinas, que están actualmente disponibles.

[0095] En muchas realizaciones, las biomoléculas inmovilizadas, o biomoléculas que se van a inmovilizar, son proteínas. Se pueden inmovilizar uno o más tipos de proteínas en una superficie. En algunas realizaciones, las proteínas se inmovilizan usando procedimientos y materiales que minimizan la desnaturalización de las proteínas, que minimizan las alteraciones en las actividades de las proteínas, o que minimizan las interacciones entre la
40 proteína y la superficie sobre la que se inmoviliza.

[0096] Las superficies útiles de acuerdo con la presente invención pueden ser de cualquier forma y tamaño deseado. Los ejemplos no limitantes de superficies incluyen chips, superficies continuas, superficies curvadas, películas, placas, láminas, tubos y similares. Las superficies preferiblemente tienen áreas en el intervalo de
45 aproximadamente un micrómetro cuadrado a aproximadamente 500 cm². El área, longitud y anchura de la superficie de acuerdo con la presente invención, pueden variar de acuerdo con los requisitos del ensayo que se va a realizar. Las consideraciones pueden incluir, por ejemplo, facilidad de manejo, limitaciones del o de los materiales de los que está hecha la superficie, requisitos de los sistemas de detección, requisitos de los sistemas de deposición (p. ej., impresor robotizado), y similares.

[0097] En algunas realizaciones, es conveniente usar un medio físico para separar grupos o matrices de islas de unión o biomoléculas inmovilizadas: dicha separación física facilita la exposición de diferentes grupos o matrices a diferentes soluciones de interés. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las matrices están situadas en los pocillos de placas de 96, 384, 1536, o 3456 micropocillos. En dichas realizaciones, los fondos de los pocillos pueden servir como
50 superficies para la formación de matrices, o las matrices se pueden formar sobre otras superficies y después poner en los pocillos. En algunas realizaciones, tal como cuando se usa una superficie sin pocillos, se pueden formar islas de unión o se pueden inmovilizar biomoléculas sobre una superficie, y se puede poner sobre la superficie una junta que tiene agujeros dispuestos espacialmente de modo que se corresponden a las islas o biomoléculas. Dicha junta preferiblemente es estanca para líquidos. Se puede poner una junta sobre una superficie en cualquier momento o

durante el procedimiento de formación de la matriz y se puede retirar sí ya no es necesaria la separación de grupos o matrices.

[0098] Las biomoléculas inmovilizadas se pueden unir a moléculas presentes en una muestra biológica que está por encima de las biomoléculas inmovilizadas. Alternativamente, las biomoléculas inmovilizadas modifican o son modificadas por moléculas presentes en una muestra biológica que está por encima de las biomoléculas inmovilizadas. Por ejemplo, una citoquina presente en una muestra biológica se puede poner en contacto con una biomolécula inmovilizada y unirse a ella, facilitando de esta forma la detección de la citoquina. Alternativamente, la citoquina o factor de crecimiento o antagonista del mismo, se puede poner en contacto con una biomolécula inmovilizada sobre una superficie sólida de una forma transitoria e iniciar una reacción que da como resultado la detección de la citoquina sin unión estable de la citoquina a la biomolécula.

[0099] Las modificaciones o uniones de biomoléculas en solución o inmovilizadas en una matriz, se pueden detectar usando técnicas de detección conocidas en la materia. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen técnicas inmunológicas tales como ensayos de unión competitivos y ensayos de tipo sándwich; detección de fluorescencia usando instrumentos tales como escáner confocal, microscopios confocales, o sistemas basados en CCD y técnicas tales como fluorescencia, polarización de fluorescencia (FP), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), fluorescencia de reflexión interna total (TIRF), espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS); técnicas colorimétricas/espectroscópicas; resonancia de plasmón de superficie, mediante las cuales se pueden medir cambios en la masa de materiales adsorbidos en superficies; técnicas que usan radioisótopos, incluyendo ensayos de unión de radioisótopos convencionales y de centelleo de proximidad (SPA); espectroscopía de masas, tal como espectroscopía de masas de ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI) y espectroscopía de masas MALDI en tiempo de vuelo (TOF); elipsometría, que es un procedimiento óptico de medición del grosor de películas de proteínas; microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), un procedimiento muy sensible para medir la masa de materiales adsorbidos en superficies; microscopios de sonda de barrido, tales como AFM y SEM; y técnicas tales como detección electroquímica, por impedancia, acústica, de microondas, e IR/Raman. Véase, p. ej., Mere L, y col., "Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultra-high-throughput screening," *Drug Discovery Today* 4(8):363-369 (1999), y referencias citadas en el mismo; Lakowicz J R, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2ª edición, Plenum Press (1999).

[0100] Las matrices de la invención adecuadas para identificar preeclampsia pueden estar incluidas en kits, como se definen en las reivindicaciones. Dichos kits pueden incluir también, como ejemplos no limitantes reactivos útiles para preparar biomoléculas para la inmovilización sobre islas de unión o áreas en una matriz, reactivos útiles para detectar modificaciones de biomoléculas inmovilizadas, o reactivos útiles para detectar la unión de biomoléculas de soluciones de interés a biomoléculas inmovilizadas, e instrucciones de uso.

[0101] Igualmente, los kits pueden incluir matrices que comprenden biomoléculas inmovilizadas. Dichos kits también pueden incluir, como ejemplos no limitantes, reactivos útiles para detectar modificaciones de biomoléculas inmovilizadas o para detectar la unión de biomoléculas de soluciones de interés a biomoléculas inmovilizadas.

Teranóstica

[0102] La memoria descriptiva describe composiciones y procedimientos para identificar mujeres con riesgo alto de preeclampsia, de modo que se pueda usar un procedimiento teranóstico para el ensayo de dichas personas para determinar la eficacia de una intervención terapéutica particular (farmacéutica o no farmacéutica) y alterar la intervención para 1) reducir el riesgo de desarrollar resultados adversos, y 2) potenciar la eficacia de la intervención. Por lo tanto, además de diagnosticar o confirmar la presencia o el riesgo de preeclampsia, los procedimientos y composiciones de la invención también proporcionan medios para optimizar el tratamiento de una persona que tiene un trastorno. La invención proporciona un procedimiento teranóstico para tratar la preeclampsia integrando diagnóstico y tratamiento para mejorar el tratamiento en tiempo real de un sujeto que tiene, por ejemplo, DMG y/o HIE. En la práctica, esto significa crear ensayos que puedan identificar qué pacientes son más adecuadas para un tratamiento particular, y proporcionar respuesta en cómo de bien funciona un fármaco para optimizar los regímenes de tratamiento. En el campo de las enfermedades asociadas con la hipertensión inducida por embarazo, el teranóstico puede controlar de forma flexible cambios en parámetros importantes (p. ej., niveles de citoquina y/o factor de crecimiento) a lo largo del tiempo. Por ejemplo, se pueden usar inmunoensayos de múltiples parámetros teranósticos para una serie de moléculas relevantes para el diagnóstico, tales como SHBG y PIGF, para seguir el progreso de una persona que sigue tratamiento por HIE. Los marcadores proporcionados en el presente documento son particularmente adaptables para usar en el diagnóstico y tratamiento, porque están disponibles en fluidos corporales fácilmente obtenidos tales como orina, sangre o suero.

[0103] En el marco de ensayos clínicos, un procedimiento teranóstico o composición puede proporcionar información clave para optimizar el diseño del ensayo, controlar la eficacia y potenciar la seguridad del fármaco. Por ejemplo, se puede usar teranóstica para el “diseño de ensayo” para la estratificación de pacientes, determinación de la elegibilidad de pacientes (inclusión/exclusión), creación de grupos de tratamiento homogéneos, y selección de muestras de pacientes que son representativas de la población general. Dichos ensayos teranósticos pueden, por lo tanto, proporcionar medios para el enriquecimiento de la eficacia del paciente, minimizando así el número de personas necesarias para el reclutamiento del ensayo. Los teranósticos de “eficacia” son útiles para controlar la terapia y evaluar los criterios de eficacia. Finalmente, los teranósticos de “seguridad” se pueden usar para prevenir reacciones adversas de fármacos o evitar errores de medicación.

Análisis estadístico

[0104] Los datos presentados en el presente documento proporcionan una base de datos de información relacionados con el diagnóstico de la preeclampsia. La clasificación y predicción proporcionan un procedimiento estadístico para interpretar y usar los datos generados por una matriz como se muestra en la figura 2. Se pueden seleccionar reglas de predicción basándose en la validación cruzada, y después validar la regla elegida en una cohorte separada. Se puede usar una variedad de procedimientos para generar datos predictivos de un trastorno gestacional basados en niveles de citoquinas y/o factores de crecimiento, que incluyen análisis discriminante, regresión logística y árboles de regresión. Por ejemplo, se pueden generar datos basándose en modelos de regresión logística. La figura 9 ilustra un análisis discriminante bayesiano aplicado al conjunto de datos de 5 proteínas (citoquinas) medidas en cada uno de cinco casos (personas de ensayo) y 5 controles (personas de referencias) mostrado en la figura 2. El análisis discriminante intenta buscar un plano en el espacio multivariante de los datos de marcadores de modo que, en la medida de lo posible, los casos aparecen en un lado de este plano y los controles en el otro. Los coeficientes que determinan este plano constituyen una regla de clasificación: una función lineal de los valores de marcadores, que se compara con un umbral. En la clasificación bayesiana, se puede usar información de la probabilidad de que una persona sea un caso (es decir, una persona que tiene, o tiene predisposición a tener preeclampsia) que se conoce antes de obtener los datos. Por ejemplo, la probabilidad anterior a ser un caso se puede establecer en aproximadamente 0,5; para un ensayo de cribado aplicado a una población general la correspondiente probabilidad será aproximadamente 0,05. Una persona se clasifica como que tiene una complicación (es decir, preeclampsia) si la correspondiente probabilidad posterior (es decir, la probabilidad previa puesta al día usando los datos) supera 0,5. Obsérvese que 9 de 10 casos y controles se clasifican de forma correcta (véase figura 9).

[0105] Se puede combinar información del paciente adicional con los niveles de SHBG y PIGF proporcionados en el presente documento. Estos datos se pueden combinar en una base de datos que analiza la información para identificar tendencias que complementan los datos de biomarcadores presentes. Los resultados se pueden almacenar en un formato electrónico.

[0106] Los presentes procedimientos usan los niveles de SHBG y PIGF, y opcionalmente niveles de citoquinas y/o factores de crecimiento adicional, como biomarcadores para determinar el riesgo de desarrollar preeclampsia. La preeclampsia e hipertensión gestacional se desarrollan más habitualmente en mujeres nulíparas (primer embarazo) que son obesas y tienen valores iniciales de presión arterial altos-normales. Estos trastornos también se desarrollan en mujeres con antecedentes de diabetes preexistente o diabetes gestacional, y en mujeres con el síndrome del ovario poliquístico. En la mayoría de los casos, la preeclampsia o hipertensión gestacional se desarrolla sin aviso, a menudo en mujeres sin ninguno de estos factores de riesgo establecidos. Por consiguiente, los procedimientos y composiciones para identificar un trastorno gestacional proporcionados en el presente documento se pueden combinar con los antecedentes del paciente para potenciar la fiabilidad de un diagnóstico médico. El análisis puede evaluar, por ejemplo, biomarcadores en la orina o suero obtenidos del paciente a través de una muestra. Además, se puede proporcionar junto con el ensayo información relativa al paciente. Dicha información incluye, pero no se limita a la edad, peso (IMC), presión arterial, antecedentes genéticos, número de partos, edad gestacional, y otros parámetros o variable similares descritos en los ejemplos más adelante.

[0107] Las variantes de confusión y covariantes en el análisis de datos generados para establecer directrices para la DMG e HIE se pueden incluir en la base de datos de información. Estos datos pueden incluir, por ejemplo, la edad puesto que la mayor edad está asociada con un aumento de las citoquinas inflamatorias en la circulación. Además, una correlación entre la etnicidad y los polimorfismos genéticos de citoquinas (IL-6, TNF- α , IL-10) pueden proporcionar valores iniciales de citoquinas de acuerdo con la raza. Fumar es un ejemplo de variable de confusión porque puede disminuir los niveles de sFlt-1, aumentar los niveles de VEGF, disminuir los niveles de citoquinas,

aumentar el riesgo de DMG y reducir riesgo de PE. La alteración de citoquinas y factores de crecimiento en mujeres con antecedentes de fumadoras en el pasado o actualmente, se pueden evaluar y añadir a la base de datos de información relacionada con la predicción de DMG o HIE.

5 **[0108]** La obesidad es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de DMG y PE, y los niveles en el suero de citoquinas específicas, incluyendo TNF- α e IL-6, están ambos correlacionados positivamente con el índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula como el peso en kilogramos dividido entre la altura en metros al cuadrado. Además, los adipocitos secretan factores de crecimiento, incluyendo VEGF. El IMC elevado puede estar en la ruta causal, en cuanto que la obesidad conduce a citoquinas elevadas, lo que conduce a resistencia a la insulina e inflamación, lo cual después puede predisponer a DMG e HIE.

[0109] El peso fetal al nacer se puede considerar un resultado secundario, puesto que la DMG y PE conducen a mayor y menor peso fetal al nacer, respectivamente. Esta información se incluirá para determinar la asociación entre variables de exposición primaria y peso fetal al nacer en los casos (es decir, aquellas personas que presentan DMG y/o HIE) y controles. La preeclampsia es una causa del trastorno heterogéneo identificado como restricción de crecimiento fetal (RCF). Factores de crecimiento de la placenta pueden estar implicados en la fisiopatología subyacente en la RCF, y los niveles maternos en el suero y orina de factores de crecimiento específicos pueden estar alterados en mujeres con recién nacidos que tienen RCF. Por ejemplo, entre mujeres con PE, los niveles de PIGF a las 15-19 semanas de gestación pueden ser menores entre mujeres (n = 18) que desarrollan PE con edad gestacional de recién nacidos pequeños (peso al nacer < percentil 10), comparado con mujeres (n = 25) que acababan de desarrollar PE. Una selección aleatoria de mujeres nulíparas puede proporcionar controles de embarazo no complicados para fines de comparación. Dichas mujeres pueden ser, por ejemplo, normotensas a lo largo de la gestación; normoglucémicas, a término (>37 semanas); sin evidencias de RCF; nacido vivo; sin presión arterial elevada o hipoglucemia en la visita posparto de la semana 6.

[0110] El análisis estadístico descrito antes se puede correlacionar con los niveles de SHBG y PIGF como se describe en el presente documento. Los resultados primarios serán DMG, HIE y antecedentes de DMG y PE. La estadística descriptiva se puede usar para localizar errores en la codificación (p. ej., valores extremos), para determinar si se cumplen los supuestos de normalidad, si es necesaria transformación (p. ej., log de niveles de citoquinas) para mejorar la normalidad, o si son necesarios procedimientos no paramétricos. La distribución de covariables y variables de confusión se puede examinar (p. ej., tablas de contingencia).

[0111] Además, el análisis estadístico generado a partir de la información anterior se puede combinar con información relacionada con los niveles de citoquinas y factores de crecimiento adicionales y niveles de antagonista de factor de crecimiento descritos en el presente documento. Por lo tanto, la invención abarca examinar niveles de citoquinas y niveles de factores de crecimiento (y sus antagonistas) en la misma mujer, y correlacionar esta información para identificar aquellas personas predispuestas a la DMG y/o HIE, usando información estadística adicional tal como el IMC, presión arterial y peso fetal al nacer.

[0112] Se pueden llevar a cabo análisis adicionales para identificar sujetos con riesgo de DMG o HIE. Dichos análisis incluyen análisis bivalente de cada una de las variables de exposición primarias, modelos multivariantes que incluyen variables con una fuerte relación (biológica y estadística) con resultados, procedimientos para tener en cuenta múltiples variables de exposición críticas incluyendo reducción de variables usando análisis de factores y modelos de predicción.

[0113] Para análisis bivalente, se puede llevar a cabo el nivel medio de cada variable de exposición primaria entre casos y controles usando una prueba t de 2 muestras o prueba de suma de rangos de Wilcoxon, según sea adecuado. Si la asociación aparece lineal, se puede analizar la tendencia usando la prueba de Mantel Haenszel. Los datos se pueden juntar en categorías menos finas (p. ej., terciles) usando la distribución de los controles, y examinar estos como variables indicadoras en análisis multivariante.

[0114] Para análisis multivariante, se pueden correlacionar datos entre dos grupos control, uno emparejado y el otro no emparejado. Tanto en el análisis emparejado como en el no emparejado, se pueden examinar los efectos independientes de todas las variables de exposición primarias de interés usando modelos de regresión logística (con modelos condicionales en análisis emparejado). Los modelos pueden incluir un número mínimo de covariables para ensayar el efecto principal de predictores específicos. El efecto de proteínas específicas se puede determinar además del desenlace del embarazo después de tener en cuenta las variables de confusión o variables potencialmente mediadoras. Como se ha indicado antes, las tablas 1-5 son ejemplos de dichos análisis.

[0115] Los modelos de regresión logística tienen la forma general $[\ln(p/1-p_i) = b_0 + b_1X_{1i} + b_2X_{2i} + \dots + b_nX_{ni} + e]$, donde p_i es la probabilidad de DMG, b_0 representa la ordenada en el origen de la recta ajustada, b_1 es el coeficiente asociado con el aumento de una unidad en el nivel de un factor de crecimiento tal como SHBG, $b_2 \dots b_n$ son los coeficientes asociados con la covariables de confusión $X_2 \dots X_n$, y e es un término de error. El cociente de posibilidades asociado con un aumento de una unidad en el nivel de un factor de crecimiento o citoquina específico se calcula por exponenciación del coeficiente b_1 , y el intervalo de confianza al 95% alrededor de esta estimación puntual se estima por exponenciación del término $(b_1 \pm 1,96 \text{ (error estándar de } b_1))$. En modelos con más de una covariable b_n , el efecto de b_1 se puede interpretar como el efecto del nivel del factor de crecimiento o citoquina específico en el riesgo de DMG y/o HIE después de ajustar los niveles de las covariables de confusión incluidas en el modelo.

[0116] En el análisis factorial, las citoquinas específicas se pueden reducir a un número menor de citoquinas intercorrelacionadas. Las puntuaciones de factores de componentes principales rotados (que son variables continuas distribuidas normalmente) se pueden modelar en lugar de los niveles de citoquinas originales en análisis de regresión que predice el desenlace del embarazo. Esta estrategia de construcción de modelo es similar a la descrita antes, salvo la puntuación de los factores de modelización que permite la identificación de representaciones de citoquinas específicas como predictivo de resultados independientemente de otras representaciones de citoquinas, o independientemente del IMC u otras variables de confusión previamente especificadas o variables mediadoras.

[0117] La matriz diversa de citoquinas potencialmente intercorrelacionadas derivadas de experimentos de matrices, se puede reducir con análisis factorial usando análisis de componentes principales. El análisis de componentes principales identifica subconjuntos de variables correlacionadas que agrupa entre sí. Estos subconjuntos definen componentes: variables matemáticamente obtenidas que no están correlacionadas entre sí y que explican la mayoría de la variación en los datos originales. El análisis de componentes principales (PCA) intenta identificar un número mínimo de componentes necesarios para hacer un diagnóstico. Después de la identificación, los componentes se transforman o rotan en factores interpretables. La interpretación se basa en el patrón de correlaciones entre los factores y las variables independientes originales; estas correlaciones se llaman cargas. En experimentos de matrices, patrones de factores representan dominio o agrupaciones distintas de citoquinas que subyacen las relaciones en conjunto entre la matriz original de los niveles de citoquinas putativamente independientes. Estas agrupaciones se pueden considerar como patrones de representaciones de citoquinas.

[0118] Usando los datos de pacientes descritos en las figuras 3 y 4, se usó el análisis ACP como se muestra en la figura 8 para reducir las 5 citoquinas explicativas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, e IL-8) a 3 componentes, y muestra que empieza a aparecer una separación entre casos (5 recuadros más a la izquierda) y controles (5 recuadros más a la derecha). Se llevó a cabo el análisis factorial usando variables distribuidas de forma continua con la opción de componente principal del procedimiento SAS FACTOR. Las variables se pueden transformar para mejorar la normalidad, aunque los componentes principales son bastante robustos frente a las desviaciones de la normalidad. Las variables incluidas en el análisis factorial incluyen todos los niveles de citoquinas incluídas en un experimento de matriz, por ejemplo. En la mayoría de los casos, se selecciona el número mínimo de componentes basándose en los componentes cuyos valores propios superan la unidad. Los valores propios son la suma de las correlaciones al cuadrado entre las variables independientes originales y los componentes principales y representan las cantidades de varianza atribuibles a los componentes.

[0119] Para evitar modelos sobrefactorizados, en general se excluyen componentes con valores propios iguales o que apenas superan la unidad, que caen por debajo del punto de inflexión en una gráfica y que no contribuyen a la claridad adicional para el patrón de factores resultante. Para producir factores interpretables, el número mínimo de componentes principales se puede rotar usando el procedimiento varimax ortogonal. Esta rotación ortogonal es una transformación de los componentes originales que produce factores no correlacionados entre sí (que representan dominios independientes únicos), pero muy correlacionados con subconjuntos únicos de citoquinas originales. En general, se usan cargas (correlaciones entre los factores y las variables independientes originales; intervalo -1,0 a 1,0) mayores que $\pm 0,30$, para interpretar el patrón de factores resultante. Se pueden evaluar similitudes entre cargas en el mismo factor dentro de subgrupos seleccionados (por ejemplo, mujeres asiáticas frente a blancas) usando coeficientes de congruencia. El coeficiente de congruencia se aproxima a la unidad cuando las cargas del factor son idénticas entre subgrupos.

[0120] Aunque el análisis factorial no es una metodología de ensayo de hipótesis estricta, se puede usar el procedimiento de Bartlett, que da un valor distribuido aproximadamente como chi-cuadrado, para ensayar la hipótesis nula de que el primer factor dominante puede ser significativo, pero el resto de los factores explican solo la

varianza del error y no son significativos. El análisis factorial de confirmación se puede llevar a cabo para evaluar si un modelo determinado empíricamente (p. ej., una solución de tres factores con dos variables independientes que carga sobre dos factores) proporciona mejor ajuste de los datos que un modelo con todas las variables independientes que carga sobre un único factor (el modelo de hipótesis nula). En general se usan tres índices de bondad del ajuste: (i) el índice de bondad del ajuste de probabilidad máxima, que da un valor distribuido como chi-cuadrado y donde un valor menor indica un mejor ajuste de los datos, (ii) ajuste no normalizado de Bentler, y (iii) índices de ajuste comparativo de Bentler y Bonett, donde valores más altos (intervalo, de 0 a 1,0) indican un ajuste mejor.

10 Bases de datos y procedimientos computerizados de análisis de datos

[0121] Una base de datos generada por los procedimientos y análisis descritos en el presente documento se pueden incluir o asociar con un sistema de ordenador para determinar si una persona embarazada tiene o tiene predisposición a tener preeclampsia. La base de datos puede incluir una pluralidad de perfiles de "referencia" (o "control") digitalmente codificados. Cada perfil de referencia de la pluralidad puede tener una pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de SHBG o PIGF en una muestra o una citoquina específica detectada en la sangre, suero, u orina, de una persona embarazada que tiene o tiene predisposición a tener preeclampsia. Alternativamente, un perfil de referencia se puede obtener de una persona embarazada que es normal. Ambos tipos de perfiles se pueden incluir en la base de datos para la comparación consecutiva o simultánea con un perfil de ensayo. El sistema de ordenador puede incluir un servidor que contiene un código ejecutable por ordenador para recibir un perfil de una persona embarazada e identificar de la base de datos un perfil de referencia que se corresponde que es relevante para el diagnóstico para el perfil de la persona embarazada. El perfil identificado se puede suministrar a un cuidador para el diagnóstico o análisis adicional.

[0122] Usando programas estándar, se pueden acumular historias clínicas electrónicas (HCE) para proporcionar una base de datos que combina datos de citoquinas, factores de crecimiento y antagonistas de factores de crecimiento con información adicional tal como el IMC de una paciente o cualquier otro parámetro útil para predecir el riesgo de desarrollar preeclampsia. La información del paciente se puede asignar aleatoriamente a un identificador numérico para mantener el anonimato con los laboratorios de ensayo y con fines de seguridad. Todos los datos se pueden almacenar en una red que proporciona acceso a múltiples usuarios de diferentes localizaciones geográficas.

[0123] Por lo tanto, se pueden implementar diferentes técnicas, procedimientos y aspectos de la invención descritos en el presente documento, en parte o todo usando sistemas y procedimientos basados en ordenador. Además, los sistemas y procedimientos basados en ordenador se pueden usar para aumentar o potenciar la funcionalidad descrita en el presente documento, aumentar la velocidad a la que se pueden realizar las funciones, y proporcionar características adicionales y aspectos como parte de, o además de los de la invención descritos en el presente documento. Los sistemas, procedimientos e implementaciones basados en ordenador, de acuerdo con la tecnología descrita antes, se presentan a continuación.

[0124] Un sistema basado en procesador puede incluir una memoria principal, preferiblemente memoria de acceso aleatorio (RAM) y también puede incluir una memoria secundaria. La memoria secundaria puede incluir, por ejemplo, un disco duro y/o un disco de almacenamiento extraíble, p. ej., un disco flexible, un disco de cinta magnética o un disco óptico. El disco de almacenamiento extraíble lee de y/o escribe en un medio de almacenamiento extraíble. El medio de almacenamiento extraíble puede ser un disco flexible, cinta magnética, disco óptico, o similar, que es leído y escrito por un disco de almacenamiento extraíble. Como se apreciará, el medio de almacenamiento extraíble puede comprender software de ordenador y/o datos.

[0125] En realizaciones alternativas, la memoria secundaria puede incluir otros medios similares para permitir cargar programas de ordenador u otras instrucciones en un sistema de ordenador. Dichos medios pueden incluir, por ejemplo, un disco de almacenamiento extraíble y una interfaz. Los ejemplos pueden incluir un cartucho de programa o interfaz de programa (tal como el encontrado en dispositivos de juegos de vídeo), un chip de memoria extraíble (tal como EPROM o PROM) y enchufe asociado, y otras unidades de almacenamiento extraíbles e interfaces, que permiten transferir el software y datos desde la unidad de almacenamiento extraíble al sistema de ordenador.

[0126] El sistema de ordenador también puede incluir una interfaz de comunicaciones. Las interfaces de comunicaciones permiten que el software y los datos sean transferidos entre el sistema de ordenador y dispositivos externos. Los ejemplos de interfaces de comunicaciones incluyen un modem, una interfaz de red (tal como, por ejemplo, una tarjeta de Ethernet), un puerto de comunicaciones, una ranura PCMCIA y tarjeta, y similares. El software y los datos transferidos por un interfaz de comunicaciones están en forma de señales, que pueden ser

electrónicas, electromagnéticas, ópticas u otras señales capaces de ser recibidas por un interfaz de comunicaciones. Estas señales se proporcionan a un interfaz de comunicaciones por un canal capaz de llevar señales y se puede implementar usando un medio inalámbrico, medio con alambres o cables, fibras ópticas u otras comunicaciones. Algunos ejemplos de un canal incluyen una línea de teléfono, una conexión de teléfono celular, una conexión de RF, una interfaz de red, y otros canales de comunicaciones.

[0127] En este documento, las expresiones “medio de programa de ordenador” y “medio usable por ordenador” se usan para referirse en general a medios tales como un dispositivo de almacenamiento extraíble, un disco capaz de instalarse en un disco duro, y señales en un canal. Estos productos de programas de ordenador son medios para proporcionar software o instrucciones de programas a un sistema de ordenador.

[0128] Los programas de ordenador (también llamados lógico de control de ordenador) se almacenan en la memoria principal y/o memoria secundaria. Los programas de ordenador también se pueden recibir por un interfaz de comunicaciones. Dichos programas de ordenador, cuando se ejecutan, permiten que el sistema de ordenador lleve a cabo prestaciones de los procedimientos descritos en el presente documento. En particular, los programas de ordenador, cuando se ejecutan, permiten que el procesador lleve a cabo las características de la invención. Por consiguiente, dichos programas de ordenador representan controladores del sistema de ordenador.

[0129] En una realización donde los elementos se implementan usando software, el software se puede almacenar en o transmitir por un producto de programa de ordenador y cargar en un sistema de ordenador usando un disco de almacenamiento extraíble, disco duro, o interfaz de comunicaciones. El lógico de control (software), cuando es ejecutado por el procesador, hace que el procesador realice las funciones de los procedimientos descritos en el presente documento.

[0130] En otra realización, los elementos se implementan principalmente usando hardware, por ejemplo, componentes de hardware tales como PAL, circuitos integrados para aplicaciones específicas (ASIC) u otros componentes de hardware. La implementación de una máquina de estado de hardware para realizar las funciones descritas en el presente documento, serán evidentes para el experto en la materia o materias relevantes. En otras realizaciones, se implementan elementos usando una combinación tanto de hardware como de software.

[0131] En otra realización, se puede tener acceso o implementar los procedimientos basados en ordenador en la web proporcionando acceso a través de una página web a los procedimientos de la invención. Por consiguiente, la página web se identifica mediante un localizador de recursos uniforme (URL). El URL designa tanto la máquina servidora como el fichero o página particular en esa máquina. En esta realización, está previsto que un sistema de ordenador del consumidor o cliente interactúe con un buscador para seleccionar un URL particular, que a su vez hace que el buscador envíe una petición para ese URL o página al servidor identificado en el URL. Típicamente el servidor responde a la petición recuperando la página requerida y transmitiendo los datos para esa página de vuelta al sistema de ordenador del cliente peticionario (la interacción cliente/servidor típicamente se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo de transporte de hipertexto (“HTTP”). La página seleccionada después se presenta al usuario en la pantalla del cliente. El cliente después puede hacer que el servidor que contiene un programa de ordenador de la invención lance una aplicación, por ejemplo, para realizar un análisis de acuerdo con la invención.

EJEMPLOS

[0132] La invención se describe además en los siguientes ejemplos, que sirven para ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLO 1 - Ensayos de SHBG y PIGF

Estudio de población y adquisición de datos

[0133] Se llevó a cabo un estudio de casos y controles anidados, prospectivo, de pacientes reclutados en el Massachusetts General Hospital Obstetrical Maternal Study (MOMS). Brevemente, la cohorte del MOMS se estableció en 1998 para el estudio prospectivo de factores de riesgo gestacionales tempranos para desenlaces adversos que ocurren más tarde en el embarazo. Para este estudio, eran elegibles para la inclusión mujeres consecutivas con gestaciones únicas entre el 1 de junio de 2001 y el 1 de mayo de 2003 en la cohorte del MOMS aproximadamente a las 12 semanas de gestación, y que parieron después de 20 semanas. Todas las personas proporcionaron el consentimiento informado escrito.

[0134] La historia clínica electrónica, que es la historia clínica usada por el personal médico, proporciona datos clínicos y demográficos que detallan prospectivamente los sucesos del embarazo a lo largo del periodo posparto temprano. La información específica obtenida de la historia clínica electrónica incluye la edad, raza, altura, peso, presión arterial recogida durante la gestación, edad gestacional fetal y peso en el parto, desenlace del embarazo y valores de laboratorio, incluyendo resultados de pruebas de tolerancia a la glucosa. Ninguna de las personas para el presente estudio tenía antecedentes de hipertensión preexistente o diabetes mellitus, todas iniciaron y completaron su cuidado prenatal y embarazo dentro de la red de los autores de la invención, parieron un bebé vivo, y no tenían evidencias de hipertensión en las siguientes 6 semanas después del parto.

10 Variables de exposición

[0135] Los ensayos de la SHBG y PIGF se llevan a cabo en muestras de sangre, muestras de suero o muestras de orina de mujeres embarazadas, tan pronto como el primer trimestre, p. ej., en las primeras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 semanas de embarazo. Después de proporcionar el consentimiento informado escrito, se recogieron muestras de suero de mujeres elegibles en la primera visita prenatal, las muestras se almacenaron en hielo durante menos de 3 horas, y después se congelaron a -80°C para el futuro análisis. Las variables de exposición primarias eran la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y sFlt-1 (inhibidor soluble de VEGF y PlIGF). Los niveles de VEGF en el suero eran indetectables pronto en el embarazo. El presente estudio se centraba en los niveles en el suero de PIGF que es una molécula de tipo VEGF con propiedades proangiogénicas y que se une y activa el receptor de VEGF Flt-1. Niveles bajos de SHBG se han asociado con resistencia a la insulina tanto en estados de embarazo como de no embarazo. En los presentes procedimientos, la SHBG se puede medir en estado en ayunas o no en ayunas. La globulina fijadora de hormonas sexuales se midió usando un inmunoensayo radiométrico (Diagnostic Products Corporation, California, EE.UU.) que tiene un coeficiente de variación intraensayo (CV) $< 4\%$ y un CV interensayos $< 7,8\%$. La sensibilidad del ensayo de la SHBG es 2 nmol/l. Se usaron ensayos comerciales de kits de ELISA para la sFlt-1 y PIGF libre (R&D systems, Minnesota, EE.UU.) como se ha descrito previamente en 2. El CV de la precisión intraensayo (%) para sFlt1 y PIGF era 3,5 y 5,6, respectivamente. El CV de la precisión interensayos (%) para sFlt1 y PIGF era 8,1 y 10,9, respectivamente. Todas las muestras se ensayaron por duplicado, y si existía una variación $>10\%$ entre las repeticiones, se repetía el ensayo y se daban los promedios. El laboratorio correspondiente no conocía el estado del caso, y todas las muestras se ordenaron aleatoriamente.

Resultados

[0136] Todos los resultados de los embarazos se examinaron prospectivamente y se verificaron por examen detallado de las historias clínicas que incluían láminas de flujo prenatal e investigaciones de laboratorio. Los casos elegibles se identificaron consecutivamente durante el periodo de estudio. La preeclampsia se definió como elevación de la presión arterial sistólica a 140 o presión arterial diastólica a 90 mm de Hg después de 20 semanas de gestación, asociado con proteinuria, 32+ por tira reactiva o 3300 mg/24 horas en ausencia de infección del tracto urinario. Los controles ($\sim 2:1$) se seleccionaron aleatoriamente de mujeres que participaban en la cohorte del MOMS en el mismo periodo de tiempo que los casos, parieron bebés de forma adecuada para la edad gestacional y permanecieron normotensas y sin proteinuria durante el embarazo. Se excluyeron mujeres con antecedentes de diabetes, enfermedad tiroidea, hepática o renal crónica, o hipertensión crónica preexistente (definida como presión arterial $> 140/90$ o necesidad de medicación antihipertensiva antes del embarazo o antes de las 20 semanas de gestación), así como todas las mujeres que fallaron en la prueba de carga de glucosa inicial que se administra típicamente temprano en el primer trimestre de gestación.

Análisis estadístico

[0137] Se analizaron las variables continuas por la prueba t de Student, y las variables categóricas se analizaron por la prueba de chi-cuadrado. Las variables de exposición primaria, PIGF, sFlt1, y SHBG, se examinaron como variables continuas, y como variables binomiales con puntos de corte basados en los niveles de percentil 25 en los controles. El análisis multivariante se llevó a cabo usando técnicas de regresión logística, y pruebas estándar para la modificación de efecto (interacción) incluyendo modelos estratificados. Dada la fuerte asociación entre los niveles en el suero del primer trimestre del PIGF y el riesgo de PE 3, el objetivo del análisis era determinar si el riesgo basado en los niveles de PIGF del primer trimestre era diferente entre mujeres con grados distintos de resistencia a la insulina basado en los niveles en el suero de SHBG. Todos los p valores eran bilaterales y un p valor $< 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los niveles de PIGF, sFlt1 y SHBG se pueden correlacionar de forma cruzada con: 1) la edad gestacional en el momento de medir las proteínas (ga-pnv); 2) edad de la mujer (edad Mat); 3) su número de partos (par); y 4) su índice de masa corporal (IMC). Las tablas 1-3 y la figura 1 proporcionan

pruebas epidemiológicas para predecir un trastorno gestacional basado en modelo multivariante.

Tabla 1

Características iniciales	Preeclampsia (n=28)	Control normotenso (n=57)
Edad (años)	31 ± 5	30 ± 6
Edad gestacional en la primer visita prenatal (semanas)	11 ± 2	12 ± 3
Raza caucasiana (%)	64	45
Nulíparas (%)	60 *	25
Índice de masa corporal (kg/m ²)	26,8 ± 5,4	25,2 ± 4,6
Presión arterial sistólica (mm de Hg)	114 ± 8*	109 ± 10
Características del parto		
Edad gestacional en el parto (semanas)	37,7 ± 2,7*	39,6 ± 1,2
Peso fetal al nacer (gramos)	3113 ± 835*	3482 ± 460

5

[0138] La tabla 1 muestra las características iniciales de las mujeres que desarrollaron preeclampsia y los controles normotensos (* indica que $P < 0,05$).

Tabla 2

	Preeclampsia (n=28)	Control normotenso (n=57)
Factor de crecimiento placentar (pg/ml)	18 ± 14*	65 ± 150
sFlt1 (pg/ml)	1032 ± 686	938 ± 491
Globulina fijadora de hormonas sexuales (nmol/l)	208 ± 116 †	256 ± 101

10

[0139] La tabla 2 muestra niveles en el suero del primer trimestre del factor de crecimiento placentario, sFlt1 y SHBG en mujeres que desarrollaron preeclampsia comparado con controles (* indica que $p < 0,001$ e † indica que $p = 0,05$).

15

[0140] La tabla 3 (a continuación) muestra un estudio de casos y controles anidados de 25 mujeres que desarrollaron PE y 53 controles normotensos. Las medidas de angiogénesis, específicamente el factor de crecimiento placentario y sFlt1, se ajustan para diferentes factores de confusión. Todas las mediciones se hicieron a las 10-12 semanas de gestación y los marcadores son mediciones en la sangre.

20

Tabla 3: riesgo de preeclampsia de acuerdo con los niveles de PIGF y SHBG el primer trimestre

	Cociente de posibilidades	Intervalos de confianza al 95%
<u>PIGF < 20 pg/ml</u>		
No ajustado *	6,4	1,4-29,5
Ajustado †	7,6	1,4-38,4
Estimaciones específicas de estrato		
<u>SHBG ≤ 175 mg/dl</u>	25,5	0,32 - 119,2
<u>PIGF < 20 pg/ml ‡</u>		
<u>SHBG >175 mg/dl</u>	1,8	0,4 - 15,1
<u>PIGF < 20 pg/ml ‡</u>		
Modelo		
multivariante ¶		
<u>SHBG ≤ 175 mg/dl</u>		
<u>PIGF < 20 pg/ml</u>	15,1	1,7-134,9
<u>PIGF ≥ 20 pg/ml</u>	4,1	0,45 - 38,2
<u>SHBG > 175 mg/dl</u>		
<u>PIGF < 20 pg/ml</u>	8,7	1,2-60,3
<u>PIGF ≥ 20 pg/ml</u>	1,0	Ref.

*Grupo referente, PIGF ≥ 20 pg/ml

† Modelo multivariante ajustado para edad materna, edad gestacional de recogida de sangre, raza, número de partos, índice de masa corporal, presión arterial sistólica, antecedentes de fumadora, niveles en el suero de sFlt-1 y SHBG

‡ Grupo referente es PIGF ≥ 20 pg/ml

¶ Modelo multivariante ajustado para edad materna, edad gestacional de recogida de sangre, raza, número de partos, índice de masa corporal, presión arterial sistólica, antecedentes de fumadora, niveles en el suero de sFlt-1

- 5 [0141] Los datos en la tabla 3 y figura 1, indican que el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina (caracterizada por mediciones de resistencia a la insulina que incluyen niveles elevados de insulina, niveles alterados de glucosa, un marcador de este síndrome en particular niveles bajos de SHBG, niveles elevados de lípidos, índice de masa corporal elevada, marcadores inflamatorios elevados, y factores de coagulación alterados) interaccionan epidemiológica y biológicamente con factores de angiogénesis para conferir riesgo aumentado de
- 10 preeclampsia y enfermedades relacionadas, incluyendo riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes.

EJEMPLO 2 - Ensayos de citoquinas

- [0142] La presente invención demuestra que la alteración de una sola citoquina o factor de crecimiento se puede
- 15 usar para identificar personas que tienen, o tienen predisposición a tener, preeclampsia, DMG o HG. Se ensayó en muestras de orina, plasma y suero los niveles de citoquinas usando una matriz de citoquinas (Zyomyx®). La matriz permite el análisis cuantitativo de 30 citoquinas y quimioquinas, que incluyen IL-1α, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), TNF-α, MCP-1, CD95 (sFas), IP-10, GM-CSF, IL-1β, IL- 4, IL-7, IL-12 (p40), IL-13, TNF-β, MCP-3, MIG, CD23, GCSF, IL-2, IL-5, IL-8, IL-12 (p40/p70), IL-15, Eotaxina, TRAIL, sICAM-1, TGF-β y IFN-γ, usando un volumen de
- 20 muestra de aproximadamente 40 µl de fluidos biológicos complejos, tales como suero u orina. La calidad de los datos es comparable a las referencias establecidas para ensayos ELISA. Se llevó a cabo un análisis de adición/recuperación en orina, y se determinó la recuperación de citoquinas en la orina (r = 0,92). Todas las personas tenían función renal normal, por lo tanto no era probable que la urea interfiriera con el análisis.
- 25 [0143] Se examinó en muestras de 5 mujeres que desarrollaron preeclampsia y 5 controles con embarazos normotensos, los niveles de citoquinas. En todas las personas la orina se recogió a las 16-18 semanas de embarazo, casi 20 semanas antes del diagnóstico clínico de trastornos gestacionales. Estas muestras se recogieron, clasificaron y almacenaron a 80°C hasta que se realizó el análisis. Los datos presentados en la figura 2 muestran el patrón de la matriz de citoquinas en el suero, plasma y orina de 5 mujeres que posteriormente desarrollaron PE y 5
- 30 mujeres con embarazos normotensos. Todas las mujeres eran nulíparas. La cuantificación de citoquinas se llevó a cabo con técnicas de calibración estándar usando intensidad de fluorescencia.

- [0144] El mapa térmico de la matriz de citoquinas en la orina, suero y plasma mostrado en la figura 2, demuestra que entre las mujeres que desarrollaron preeclampsia ("persona de ensayo" o "casos"), la IL-6 está elevada y la IL-8
- 35 reducida (véase el círculo blanco) en la orina a las 16-18 semanas de gestación comparado con mujeres que tenían

un embarazo normotenso (“referencia” o “control”) y con muestras de orina recogidas al mismo tiempo. Esta es la primera vez que se ha medido una matriz de citoquinas en orina mediante esta técnica sensible y la primera vez que se han visto diferencias en la orina en esta etapa temprana del embarazo.

- 5 **[0145]** La figura 2 también demuestra que a la semana 16 de gestación, los niveles de otra quimioquina, la MCP-1, eran elevados en la orina de los casos comparado con los controles. Todas las mediciones de proteínas se normalizaron para las concentraciones de creatinina en la orina.

- [0146]** Se llevaron a cabo ensayos adicionales en las muestras de orina para determinar si la adición o no de un
 10 inhibidor de proteasa estándar (Complete MINI™, Roche) mejoraría notablemente la recuperación de citoquinas. Como se muestra en la figura 3, se ensayaron 5 muestras de orina con (+I) y sin la adición del inhibidor en el momento de la recolección. Se muestran los perfiles de proteínas (pg/ml) log transformados (todas las muestras hechas por duplicado). Como se indica, la recuperación de citoquinas no aumenta de forma regular en presencia de inhibidores de proteasa. Además, incluso entre muestras con concentraciones elevadas de citoquinas, no parece
 15 que haya un deterioro de la recuperación. Finalmente, también se llevaron a cabo estudios de reproducibilidad usando el chip de citoquinas (figura 4). Estos resultados indican que la reproducibilidad de los ensayos de citoquinas en la orina es excelente.

EJEMPLO 3 - Ensayos de factores de crecimiento

- 20 **[0147]** Junto con los niveles de citoquinas, los presentes estudios proporcionan información relacionada con los niveles de factores de crecimiento en muestras de orina y sangre. Las muestras de suero y orina de las 16 semanas de gestación en 15 personas (5 que desarrollaron DMG, 5 PE y 5 controles) se ensayaron con kits de ELISA disponibles en el comercio, para factores de crecimiento de ejemplo sFlt-1, VEGF libre, y PIGF libre (R&D Systems).
 25 Los kits de ELISA tienen CV interensayos e intraensayos <10%. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado, y se dan las medias en las figuras 5 y 6. Los niveles de VEGF libre eran indetectables, de acuerdo con niveles de VEGF bajos detectados en general a término.

- [0148]** Los datos obtenidos de las muestras de suero mostradas en la figura 5 indican que, comparado con las
 30 mujeres de control, las mujeres que desarrollaron DMG tienen niveles bajos de PIGF libre y ligeramente elevados de sFlt-1 a las 16 semanas de gestación. Además, las mujeres que posteriormente desarrollaron PE tienen incluso niveles de PIGF libre menores y de sFlt-1 mayores en este mismo período de tiempo. El equilibrio de los factores anti y proangiogénicos, reflejado por la relación de sFlt-1/PIGF, difiere incluso a las 16 semanas de gestación. Los datos obtenidos de las muestras de orina se muestran en la figura 6. Puesto que sFlt-1 no es secretado en la orina debido
 35 a su gran tamaño, se abordó la identificación del PIGF libre en la muestra de orina. Los niveles de citoquinas en la orina se compararon con los niveles de PIGF en la orina. Los datos en la figura 6 demuestran que en general, los niveles bajos de PIGF libre y niveles elevados de IL-6 y MCP-1 estaban fuertemente asociados con la posterior PE.

- [0149]** La figura 7 presenta datos de muestras de suero de mujeres con antecedentes de DMG (n=5), PE (n=5) y
 40 embarazo no complicado (ENC) normoglucémico/normotenso (n = 5) 12 ± 3 meses después del embarazo incidente. Estos datos indican que están presentes alteraciones aterogénicas y metabólicas entre mujeres con antecedentes de DMG y de PE, cuando se comparan con mujeres con ENC. Es importante que la elevación de CRP e IL-6 sugiere inflamación subclínica persistente, y las mediciones de menor resistencia a la insulina (HOMA-IR elevado) y poca secreción de insulina ($\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$) sugieren mayor riesgo para una futura diabetes mellitus de tipo 2. Ambas
 45 características están asociadas con elevados niveles de citoquinas. Además, se ensayaron los niveles de IL-6 y TNF- α de estas mismas mujeres (DMG frente a ENC) a las 16 semanas de gestación, y se encontró que los niveles de IL-6 (DMG 1,7 pg/ml frente a 1,1 pg/ml) y TNF- α (4,37 pg/ml frente a 3,07 pg/ml) en el suero, e IL-6 (DMG 4,24 pg/gCr frente a 1,34 pg/gCr) en la orina diferían. Estos datos indican que las alteraciones de citoquinas precedente a la DMG y persisten posparto.

EJEMPLO 4 - Ensayos de IL-6, MCP-1 e IL-8

- [0150]** Los presentes estudios muestran que son detectables diferencias en los niveles de IL-6 en la orina (y MCP-1 en el suero y orina e IL-8 en la orina) a las 16 semanas de gestación entre mujeres que después desarrollaron PE
 55 (o DMG). Sin embargo, estudios previos no han conseguido detectar dichas diferencias (Djurovic y col., *BJOG*, 109:759, 2002). Como se describe en el ejemplo 2 y se muestra en la figura 2, se examinaron los niveles de citoquinas en una muestra de orina de 5 mujeres que desarrollaron preeclampsia y 5 controles con embarazos normotensos. En todas las personas se recogió la orina a las 16-18 semanas de embarazo, casi 20 semanas antes del diagnóstico clínico. Usando estos datos, se compararon los niveles medios de proteínas específicas a las 16

semanas de gestación y posparto. Las diferencias entre las medias (Δ), fracción de la desviación estándar representada y los p valores se muestran en la tabla 4 (a continuación).

Tabla 4

5

Citoquinas en la orina intraparto (casos frente a controles)

DMG

IL-6: 4,2 frente a 1,3 pg/gCr (Δ 1,2 x DE, p = 0,09);
IL-1 β : 1,2 frente a 0,7 pg/gCr (Δ 0,87 x DE, p = 0,27);

PE

IL-6: 3,6 frente a 1,3 pg/gCr (Δ 1 x DE, p = 0,13);
IL-8: 106,2 frente a 3,9 pg/ml (Δ 0,94 x DE, p = 0,18);
MCP1: 494 frente a 244 pg/gCr (Δ 1,1 x DE, p = 0,08);
PIGF: 53,7 frente a 71,9 pg/gCr (Δ 0,89 x DE, p = 0,22),

Citoquinas en el suero (casos frente a controles): DMG

IL-6 (posparto): 2,1 frente a 1,1 pg/ml (Δ 0,98 x DE, p = 0,15);
TNF- α (intraparto): 4,37 frente a 3,07 pg/ml (Δ 0,88 x DE, p = 0,21);

PE

sFlt-1 intraparto: 1176 frente a 478 pg/m (Δ 0,99 x DE, p = 0,12);
PIGF intraparto: 26 frente a 163 pg/ml (Δ 1,14 x DE, p = 0,08),

[0151] La potencia (1- β) para detectar diferencias medias se calculó con las desviaciones estándar que diferían en 0,75, 1,0 y 1,25 (basado en dos muestras, pruebas t bilaterales con un ajuste de Bonferonni conservativo de p de 0,05/8, o 0,006 para 8 citoquinas preespecificadas) y casos:controles 1:1. Los resultados se muestran en la figura 10. Los datos indican que 60 casos y 60 controles proporcionan al menos 90% de potencia para detectar diferencias en medias separadas en una desviación estándar de 0,75 o mayor. La figura 11 es una tabla que proporciona los resultados de un cálculo que detecta tendencias lineales significativas (prueba de chi-cuadrado para la tendencia) a través de terciles para identificar el riesgo relativo (RR) de una persona a desarrollar un trastorno gestacional.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar si una persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia, comprendiendo el procedimiento:
5 a) medir un nivel de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en una muestra biológica obtenida de una persona embarazada;
b) medir un nivel del factor de crecimiento placentario (PIGF) en una muestra biológica obtenida de la persona embarazada;
10 c) comparar el nivel de SHBG obtenido de la persona embarazada con un nivel de SHBG obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal; y
15 d) comparar el nivel de PIGF obtenido de la persona embarazada con un nivel de PIGF obtenido de al menos una persona que tiene un embarazo normal,
en donde niveles bajos de SHBG y de PIGF presentes en la muestra obtenida de la persona embarazada, comparados con los niveles presentes en la al menos una persona que tiene un embarazo normal, indican que la
20 persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde las muestras obtenidas de la persona embarazada y la persona que tiene un embarazo normal se obtienen antes del tercer trimestre de embarazo y durante la misma semana de embarazo.
25
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde las muestras obtenidas de la persona embarazada y la persona que tiene un embarazo normal se obtienen durante la misma semana de embarazo, entre las 6 y 24 semanas después de la concepción.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde las muestras obtenidas de la persona embarazada y la persona que tiene un embarazo normal se obtienen durante la misma semana de embarazo, entre las 12 y 24 semanas después de la concepción.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde las muestras obtenidas de la persona embarazada y
35 la persona que tiene un embarazo normal se obtienen durante la misma semana de embarazo, entre las 18 y 24 semanas después de la concepción.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde las muestras obtenidas de la persona embarazada y la persona que tiene un embarazo normal se obtienen cada una durante la misma semana de embarazo en el primer
40 trimestre.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende medir los niveles del receptor de la tirosina quinasa 1 similar a fms soluble (sFlt1) en la muestra de suero o sangre obtenida de la persona embarazada.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende correlacionar los niveles de SHBG y PIGF obtenidos de la persona embarazada con: 1) la edad gestacional en el momento en que se miden los niveles de SHBG y PIGF; 2) la edad de la persona embarazada; 3) el número de partos de la persona embarazada; y 4) el índice de masa corporal de la persona embarazada.
- 50 9. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende medir el nivel de al menos una citoquina o factor de crecimiento, o al menos una citoquina y al menos un factor de crecimiento, en la muestra de la persona y generar un perfil de ensayo que comprende un valor o una pluralidad de valores, representando cada valor un nivel de una citoquina específica, factor de crecimiento, SHBG o PIGF, y comparar el perfil de ensayo con un perfil de referencia, en donde el perfil de referencia comprende un valor o una pluralidad de valores,
55 representando cada valor un nivel de una citoquina específica en una muestra de referencia obtenida de una persona de referencia.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde la citoquina se selecciona del grupo que consiste en inmuno/hematopoyetinas, interferones, moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) y

quimioquinas.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde las inmuno/hematopoyetinas se seleccionan del grupo que consiste en eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de inhibición de leucemia (LIF), oncostatina-M (OSM), factor neutrófico ciliar (CNTF), hormonas de crecimiento (GH), prolactina (PRL), interleuquina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, e IL-12.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde las quimioquinas se seleccionan del grupo que consiste en factor de plaquetas (PF)4, proteína básica de plaquetas (PBP), gro α , MIG, ENA-78, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)1 α , MIP1 β , proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1, I-309, HC14, C10, quimioquina expresada y secretada por linfocitos T normales regulada por activación (RANTES).
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde el interferón se selecciona del grupo que consiste en IFN α IFN β , e IFN-gamma.
14. El procedimiento de la reivindicación 10, en donde las moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) se seleccionan del grupo que consiste en TNF α , interferón (IFN) β , gp³⁹ (CD40-L), CD27-L, CD30-L, y factor de crecimiento nervioso (NGF).
15. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde la muestra de ensayo y la muestra de referencia son muestras de orina.
16. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde medir el nivel de al menos una citoquina comprende medir el nivel de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, o MCP-1, o cualquier combinación de los mismos.
17. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde medir el nivel de al menos una citoquina comprende medir el nivel de IL- 6, IL-8, o MCP-1.
18. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde el perfil de referencia se obtiene de una o más personas que tienen preeclampsia.
19. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde el perfil de referencia se obtiene de una o más personas que tienen un embarazo normal.
20. El procedimiento de la reivindicación 9, en donde el factor de crecimiento es el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2 o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
21. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el nivel de SHBG y el nivel de PIGF en la muestra obtenida de la persona embarazada se miden con dos o más biomoléculas diferentes, en donde una primera biomolécula interacciona específicamente con la SHBG y una segunda biomolécula interacciona específicamente con el PIGF.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, que además comprende preparar un perfil de ensayo para detectar la unión de las biomoléculas a SHBG y PIGF, en donde la unión es indicativa de un nivel de SHBG y PIGF en la muestra; y comparar el perfil de ensayo con un perfil de referencia, en donde el perfil de referencia comprende uno o más valores, representando cada valor un nivel de SHBG y PIGF en una muestra de referencia obtenida de uno o más personas de referencia que tienen un embarazo normal; en donde niveles inferiores de SHBG y PIGF en el perfil de ensayo comparado con el perfil de referencia son indicativos de una persona que tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.
23. El procedimiento de la reivindicación 21, en donde las biomoléculas se inmovilizan para formar una matriz.
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en donde la matriz comprende un primer conjunto de una pluralidad de la primera biomolécula y un segundo conjunto de una pluralidad de la segunda biomolécula.
25. El procedimiento de la reivindicación 21, en donde las biomoléculas son anticuerpos.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, en donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
27. El procedimiento de la reivindicación 21, en donde las biomoléculas son receptores.
- 5 28. Un procedimiento para determinar si un tratamiento es eficaz para tratar la preeclampsia, comprendiendo el procedimiento:
- a) determinar los niveles de SHBG y factor de crecimiento placentario (PIGF) en una primera muestra obtenida de una paciente embarazada que está en tratamiento para la preeclampsia;
- 10 b) comparar el nivel determinado en a) con un nivel de SHBG y PIGF detectado en una segunda muestra obtenida de la paciente antes de, o posteriormente a la administración del tratamiento,
- en donde una diferencia entre la primera muestra y la segunda muestra indica la eficacia del tratamiento.
- 15 29. El procedimiento de la reivindicación 28, que además comprende proporcionar la indicación a un cuidador.
30. Una matriz para detectar preeclampsia, comprendiendo la matriz un sustrato que tiene una pluralidad de sitios, teniendo cada sitio dispuesto sobre el mismo un conjunto de uno o más anticuerpos, y detectando específicamente cada anticuerpo en un conjunto la misma molécula; en donde un primer conjunto de uno o más anticuerpos detecta específicamente la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), y un segundo conjunto de uno o más anticuerpos detecta específicamente el factor de crecimiento placentario (PIGF).
- 20 31. La matriz de la reivindicación 30, que además incluye al menos un sitio que tiene dispuesto sobre el mismo una o más biomoléculas que detectan específicamente al menos una citoquina.
32. Un kit de diagnóstico preenvasado para detectar preeclampsia, comprendiendo el kit una matriz de acuerdo con la reivindicación 30.
- 30 33. Un producto de programa de ordenador que proporciona software o instrucciones del programa a un sistema de ordenador adaptado para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en el que dicho producto de programa de ordenador comprende una base de datos que comprende una pluralidad de perfiles de referencia digitalmente codificados, en el que un primer perfil de referencia
- 35 representa un nivel de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia y un segundo perfil de referencia representa un nivel del factor de crecimiento placentario (PIGF) en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia.
34. Un sistema de ordenador adaptado para llevar a cabo un procedimiento para determinar si una
- 40 persona embarazada tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia, comprendiendo el sistema:
- una base de datos que comprende uno o más perfiles de referencia digitalmente codificados, en donde un primer perfil de referencia representa un nivel de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia y un segundo perfil de referencia representa un nivel
- 45 del factor de crecimiento placentario (PIGF) en una o más muestras de una o más embarazadas que tienen preeclampsia; y
- un servidor que comprende un código ejecutable por ordenador para hacer que el ordenador:
- 50 i) reciba un perfil de una persona embarazada que comprende los niveles de SHBG y PIGF detectados en una muestra de la persona;
- ii) identificar de la base de datos un perfil de referencia que se corresponda que sea relevante para el diagnóstico, con el perfil de la persona embarazada; y
- 55 iii) generar una indicación de si la persona tiene, o tiene predisposición a tener, preeclampsia.

FIG 1

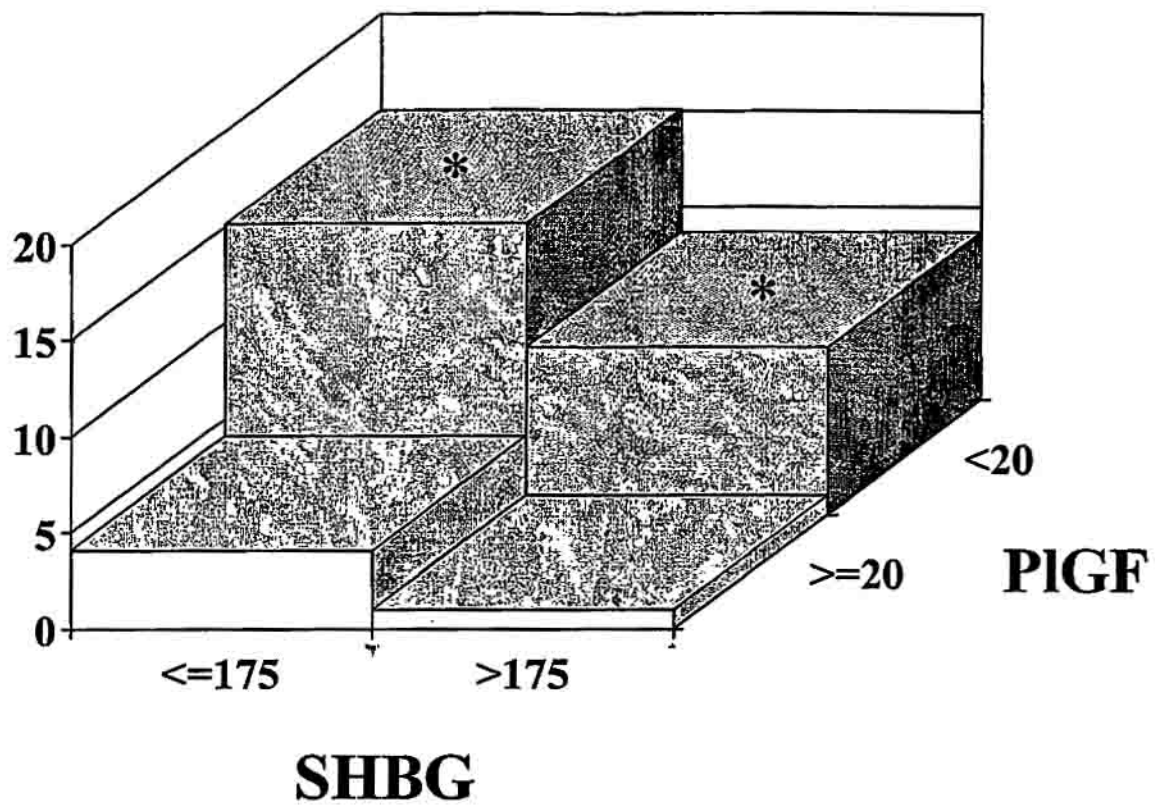


FIG. 2

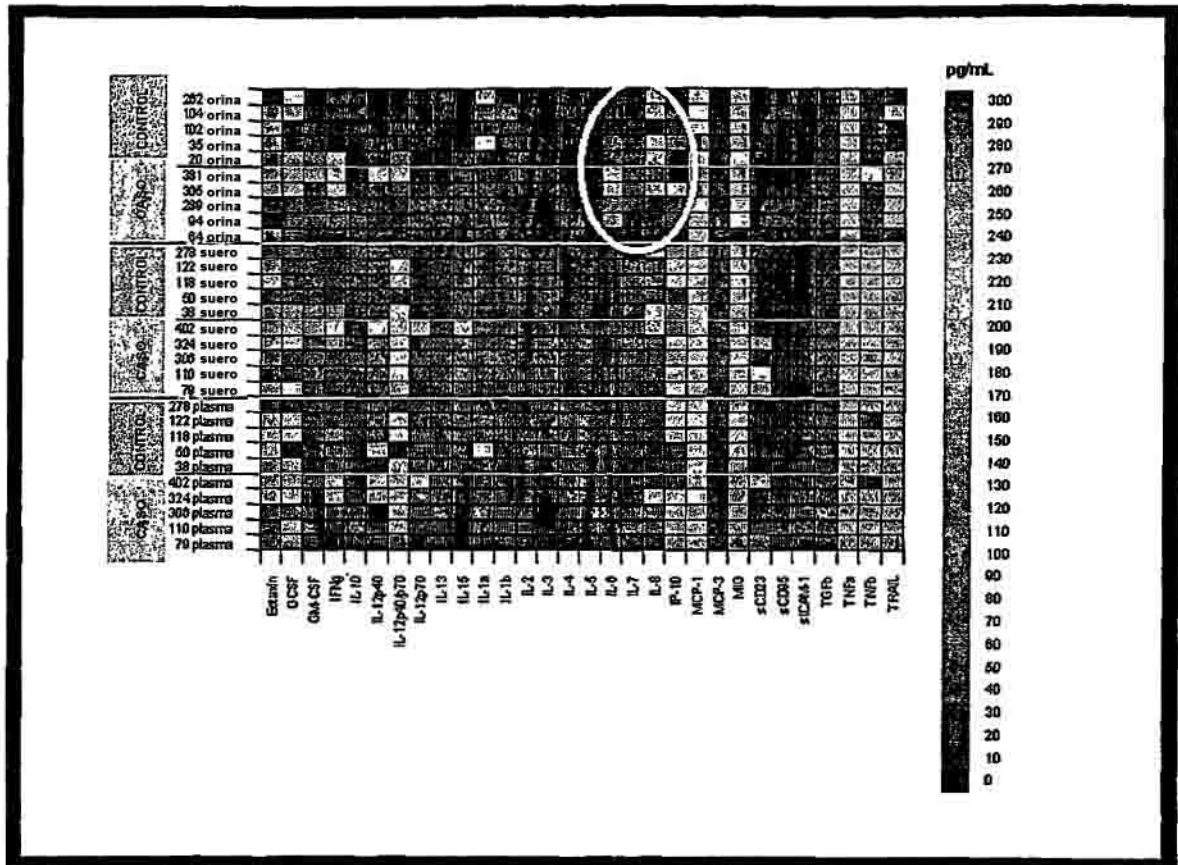


FIG. 3

+/- I	IL-6	IL-6 + I	IL-8	IL-8 + I	MCP	MCP + I
Paciente 1	1,3	1,0	2,6	2,6	1,6	1,5
Paciente 2	1,0	1,1	2,1	2,0	1,9	1,9
Paciente 3	0,8	0,8	2,5	2,7	1,5	1,4
Paciente 4	3,3	3,5	2,2	2,0	4,3	4,3
Paciente 5	1,1	0,9	2,5	2,7	1,5	1,3

FIG. 4

Reproducibilidad	IL-6 (1)	IL-6 (2)	IL-8 (1)	IL-8 (2)	MCP (1)	MCP (2)
Paciente 1	1,3	1,3	2,6	2,4	1,6	1,8
Paciente 2	1,0	1,3	2,2	2,2	1,8	1,9
Paciente 3	0,8	0,9	2,5	2,4	1,6	1,4
Paciente 4	3,5	3,4	2,2	2,1	4,6	4,3
Paciente 5	1,1	1,2	2,7	2,5	1,4	1,5

FIG. 5

SUERO	PIGF*	sFlt1	Relación
	pg/ml	pg/ml	(sFlt-1/PIGF)
Controles	163	478	3
DMG	34	723	21
PE	26	1176	45

FIG. 6

ORINA	PIGF	IL-6*	MC-1*
	pg/g	pg/g	pg/g
PE	53,7	40,7	494
Control	71,9	10,9	244

*Normalizado para e

FIG. 7

Preliminar posparto	DMG	PE	ENC
Edad (años)	27	33	32
IMC (kg/m ²)	27	26	25
CRP (mg/l)	1,2	1,4	0,6
IL-6 (pg/ml)	2,1	1,9	1,1
Glucosa en ayunas (mmol)	5	4,7	4,4
Insulina en ayunas (pmol/l)	84	84	66
HOMA _{IR}	3,12	2,86	1,96
$\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$ (pmol/mmol)	104	180	147
HOMA-IR = (insulina en ayunas x glucosa en ayunas)/22,5)			
$\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$ (pmol/mmol) secreción de insulina primera fase			

FIG. 8

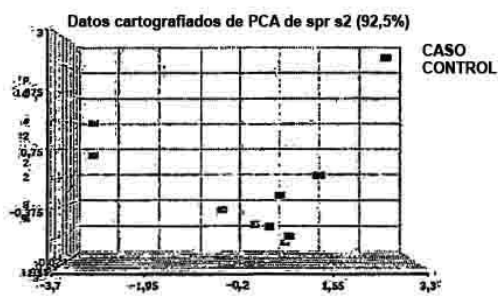


FIG. 9

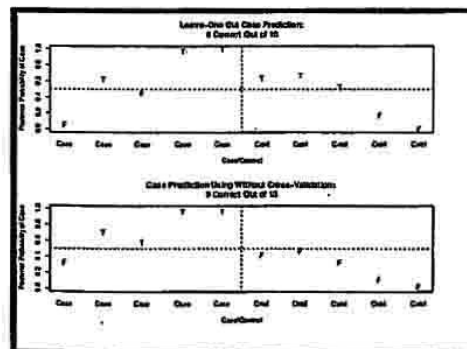


FIG. 10

Casos:Controles 1:1	Potencia		
SD	0,75	1,0	1,25
N=5	0,82	0,98	1,0
N=6	0,90	1,0	1,0
N=7	0,95	1,0	1,0

FIG. 11

Casos:Controles 1:1	Potencia		
RR	2,5	3,0	3,5
N=60	0,81	0,87	0,94