

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 003**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2008** **E 13160275 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016** **EP 2614832**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de preeclampsia**

30 Prioridad:

**12.02.2007 SE 0700339**

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

**31.01.2017**

73 Titular/es:

**A1M PHARMA AB (100.0%)  
Scheelevägen 22  
223 63 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**HANSSON, STEFAN y  
ÅKERSTRÖM, BO**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 599 003 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

Diagnóstico y tratamiento de preeclampsia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a biomarcadores para preeclampsia. En particular, la invención se refiere a métodos para el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de preeclampsia de un mamífero hembra embarazado para detectar niveles elevados de sustancias particulares. Esto facilita y hace posible el diagnóstico temprano y la intervención clínica cuando se encuentra un estado preeclámptico. Además, la invención se refiere a un método para tratar mamíferos hembra con preeclampsia con el propósito de revertir los estados patológicos asociados con esta enfermedad.

15 **Antecedentes de la invención**

La preeclampsia (PE), hipertensión proteinúrica gestacional, complica el 3-7% de todos los embarazos, y es un trastorno materno multisistémico. Cada año se notifican 8.500.000 casos en todo el mundo, de los cuales 5.000 son en Suecia. Actualmente es la causa más común de muerte para tanto los niños como las madres durante el embarazo.

La PE se ha denominado la enfermedad de las teorías [Roberts, 2001] y se describió tan pronto como hace 3000 años por los antiguos egipcios [Stevens, 1975]. La PE es todavía una de las complicaciones obstétricas dominantes que provocan morbilidad perinatal y materna. Las manifestaciones clínicas, es decir, hipertensión y proteinuria, aparecen desde las 20 semanas de gestación en adelante, pero los mecanismos subyacentes pueden empezar tan pronto como en el momento de la implantación. A medida que la enfermedad progresa, el angiospasma en el cerebro y el edema cerebral pueden provocar convulsiones epilépticas graves-eclampsia [Lipstein *et al.*, 2003].

La etiología para la PE se desconoce todavía; sin embargo datos recientes sugieren que la enfermedad evoluciona en dos fases:

30 Fase 1. Durante la placentación, se ha mostrado una invasión defectuosa de las células placentarias, trofoblastos, al interior de las capas musculares de las arterias espirales [Brosens *et al.*, 2002; página, 1939]. Un conjunto creciente de pruebas sugiere que el estrés oxidativo (véase a continuación) agrava adicionalmente la función vascular en la placenta [Roberts, 1999], lo que a su vez [Shennan *et al.*, 2001] da lugar a perfusión sanguínea alterada [Hung *et al.*, 2002]. Siguen como consecuencia vasoconstricción y resistencia elevada al flujo sanguíneo. Los resultados de la matriz muestran participación de genes tanto en la regulación redox como en la inflamación [Hansson *et al.*, 2005].

40 Fase 2. La perfusión placentaria disminuida, en combinación con el estrés oxidativo, provoca daño de células endoteliales general dentro de la placenta. En la última parte de la fase 2, la inflamación endotelial también daña el sistema vascular materno, los riñones en particular, lo que es un hallazgo histológico típico en la PE [Roberts *et al.*, 1989; de Groot y Taylor, 1993; Granger *et al.*, 2001; Strevens *et al.*, 2003]. Hasta la fecha no se conoce el vínculo entre la fase uno y dos.

45 En general, la preeclampsia se produce en mujeres durante su primer embarazo, y más comúnmente afecta a adolescentes y mujeres de más de 35 años de edad. Mujeres con enfermedades subyacentes que las predisponen a hipertensión también están entre las que corren mayor riesgo para el desarrollo de este estado. La preeclampsia es la causa principal de morbilidad materna. Representa el 12-18% de todas las muertes maternas relacionadas con el embarazo (alrededor de 70 muertes maternas al año en los Estados Unidos y una estimación de 50.000 muertes maternas al año en todo el mundo). También se asocia con una alta morbilidad perinatal, debido principalmente a prematuridad iatrogénica. Son comunes manifestaciones neurológicas en la preeclampsia, e incluyen de cefaleas, aberraciones visuales a manifestaciones más graves tales como convulsiones, accidente cerebrovascular y ceguera cortical. El parto del feto y la eliminación de la placenta es el único tratamiento curativo para la preeclampsia, un hecho que ha conducido a la teoría generalmente aceptada de que la patología placentaria es fundamental para el desarrollo de preeclampsia. A pesar de intensos esfuerzos de investigación, la etiología de la preeclampsia sigue siendo en gran parte desconocida.

60 Tal como se mencionó anteriormente, se cree que una placentación inadecuada, que da como resultado perfusión placentaria reducida, es una etapa temprana en el desarrollo de PE. La perfusión reducida asociada con el aumento de la resistencia vascular puede detectarse con ultrasonido Doppler, y mujeres con pruebas de resistencia aumentada en las arterias uterinas de manera temprana en sus embarazos ("incisura") corren un riesgo superior de desarrollo de PE que mujeres sin este hallazgo. A medida que la PE progresa, el lecho vascular materno se ve afectado, y se observa una inflamación endotelial general. La mala perfusión placentaria parece para dar como resultado una cascada de cambios patológicos: disminución del suministro de oxígeno, estrés oxidativo, formación de especies reactivas de oxígeno, daño endotelial, aumento de la permeabilidad vascular e inflamación (véase la figura 1).

Los síntomas de preeclampsia aparecen normalmente en el tercer trimestre de embarazo y habitualmente se detectan mediante monitorización de rutina de la orina y tensión arterial de la mujer. Sin embargo, estos métodos de monitorización son ineficaces para el diagnóstico del síndrome en una fase temprana. El diagnóstico temprano podría reducir el riesgo para el sujeto o feto en desarrollo y podrían monitorizarse más específicamente pacientes de alto riesgo. Además, un tratamiento eficaz, del que actualmente todavía se carece, sería ideal en combinación con una detección temprana.

Se han descrito algunos métodos de diagnóstico en la técnica anterior pero ninguno de ellos se ha usado aún satisfactoriamente en la práctica clínica a gran escala. Por ejemplo pueden mencionarse: los documentos US 5.079.171 y US 5.108.898, que dan a conocer que la preeclampsia, hipertensión inducida por el embarazo, y la eclampsia pueden diagnosticarse identificando la presencia de un marcador de células endoteliales, fibronectina celular, en una muestra de sangre, plasma o suero de una mujer embarazada, por ejemplo, usando un inmunoensayo de competición o de tipo sándwich. La fibronectina celular se deriva de células endoteliales que se rompen o alteran durante el proceso patológico. El documento US 5.238.819 da a conocer el diagnóstico de preeclampsia usando un ensayo para medir un factor mitogénico en la sangre. El factor mitogénico es un compuesto proteínico de aproximadamente 160 kDa y puede estimular la mitosis de fibroblastos. Su presencia se detecta detectando la captación de timidina radiomarcada por células activadas mediante los sueros o el plasma de un sujeto preeclámpico. Este marcador aparece después que ya se haya producido el daño al lecho vascular materno, por tanto de manera tardía en la progresión de la enfermedad.

El documento WO 05/093413 (Yale University and Brigham and Women's Hospital) da a conocer un método de diagnóstico de preeclampsia grave en una mujer embarazada, que comprende medir el nivel de hemoglobina libre en una muestra de líquido cefalorraquídeo. No se menciona ningún compuesto específico como útil para el tratamiento de preeclampsia.

Lödberg y Åkerström (Scand. J. Immunol. 13, 383-390, 1981) se refieren a estudios *in vitro* de alfa-1-microglobulina. Los autores indican que la alfa-1-microglobulina tiene propiedades inmunosupresoras. Sin embargo, como mucho pueden demostrarse un efecto supresor de la alfa-1-microglobulina sobre la estimulación de linfocitos inducida por antígeno así como un efecto inhibidor de la migración. En ningún punto en el documento se proporciona ninguna indicación de que la alfa-1-microglobulina sea una sustancia farmacológica. En los experimentos se emplea una disolución de alfa-1-microglobulina.

Actualmente, no hay curas conocidas para la preeclampsia. La preeclampsia puede variar en gravedad desde leve hasta potencialmente mortal. Una forma leve de preeclampsia puede permanecer leve con reposo en cama y monitorización frecuente. Para casos de moderados a graves, es necesaria hospitalización y se prescriben medicación para la tensión arterial y medicamentos anticonvulsivos para prevenir las convulsiones. Si el estado se vuelve potencialmente mortal de la madre o el bebé, la única cura es terminar el embarazo dando como resultado a menudo un bebé nacido prematuramente.

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

### Descripción de la invención

Por consiguiente, hay una necesidad de identificar biomarcadores que puedan identificar de manera fiable i) sujetos embarazados que corren el riesgo de desarrollar preeclampsia, ii) sujetos embarazados que padecen preeclampsia en fase temprana, y/o iii) sujetos embarazados que padecen preeclampsia (independientemente de si se ha diagnosticado o no). Además, hay una necesidad de desarrollar regímenes de tratamiento para mujeres embarazadas en cualquiera de los grupos i)-iii) mencionados anteriormente.

La presente invención se refiere a alfa-1-microglobulina (A1M) y a composiciones farmacéuticas que comprenden A1M para su uso en la profilaxis o el tratamiento de preeclampsia así como a composiciones farmacéuticas específicas que comprenden A1M.

También se proporciona en el presente documento un biomarcador, concretamente hemoglobina fetal, que se ha mostrado que entra en el sistema circulatorio materno en mujeres embarazadas que padecen preeclampsia.

La presente invención se basa en el conocimiento de los inventores y la realización de que niveles elevados de hemoglobina fetal libre en una mujer embarazada están asociados con un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia. Por tanto, puede usarse hemoglobina fetal libre como biomarcador para el diagnóstico de preeclampsia y también es una diana candidata para el tratamiento de preeclampsia.

Este biomarcador permite la detección de un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia en una fase temprana, ofreciendo por tanto más esperanza de tratamiento significativo. Además, los métodos para el diagnóstico de preeclampsia según la presente invención pueden evitar la hospitalización innecesaria de mujeres embarazadas que

no están en el grupo de riesgo. Además, el método para monitorizar la progresión o regresión de preeclampsia puede ayudar a planear el parto del feto y disminuir el riesgo de nacimiento prematuro.

Se ha descrito brevemente la preeclampsia antes en el presente documento. En mujeres, ya después de 12 semanas de gestación, se establece el flujo de sangre útero-placenta. La barrera placentaria mantiene la circulación de sangre fetal bien separada de la materna (véase la figura 2). Las unidades funcionales más pequeñas de la placenta, concretamente las vellosidades, proporcionan al feto la nutrición y el oxígeno, transportados a través de la barrera. Sin embargo, en la PE, la perfusión placentaria disminuida da como resultado menos sangre oxigenada a la placenta. La falta de oxígeno y la perfusión de sangre desigual dan lugar a estrés oxidativo dentro de la placenta. El estrés oxidativo induce apoptosis en las células placentarias, lo que a su vez provoca inflamación y daño de células endoteliales general dentro de la placenta (véase la figura 3). Cuando se daña la barrera placentaria, las células fetales pueden transferirse a la circulación materna. El conocimiento de la transferencia de células fetales a la circulación materna ha estado disponible durante aproximadamente diez años pero nadie hasta ahora ha observado hemoglobina libre (es decir, hemoglobina encontrada fuera de las células (por ejemplo en el plasma) y, por consiguiente, no unida en las células. Sobre todo se ha examinado el análisis de ADN fetal libre.

Soportado por los hallazgos notificados en la sección experimental en el presente documento, las presentes invenciones han encontrado niveles elevados de hemoglobina fetal libre (o de sus subunidades, la cadena alfa y/o gamma) en pacientes que padecen PE. En mujeres que no padecen PE, el nivel de hemoglobina fetal libre debe ser de aproximadamente 0,038 µg/ml [Turpeinen *et al*, 1992] mientras que los hallazgos indican un aumento en 20 veces hasta niveles de aproximadamente 1 µg/ml, o más dependiendo de la gravedad de la enfermedad.

Aunque ha habido indicaciones de que mujeres que padecen PE tienen un nivel aumentado de hemoglobina total, ningún informe ha mostrado hasta ahora que la hemoglobina fetal libre es un indicador fiable. Además, la medición de un aumento creciente en el nivel de hemoglobina fetal libre en vez de un aumento creciente en la hemoglobina total proporciona resultados mucho más seguros y fiables. El motivo es que el nivel normal de hemoglobina total es mucho más alto que el de hemoglobina fetal. Si el nivel de hemoglobina fetal en plasma en una mujer embarazada normal es de 0,05 µg/ml y en una paciente con PE de 1 µg/ml, entonces el aumento es  $(1-0,05)/0,05 \times 100 = 2000\%$  (o 21 veces). En comparación, los niveles de hemoglobina total en pacientes normales y con PE son de 3 µg/ml y 4,5 µg/ml, respectivamente (véase el ejemplo 5.1), lo que corresponde a un aumento de  $(4,5-3)/3 \times 100 = 50\%$  (o 1,5 veces).

Tal como se muestra en la figura 1, los resultados indicados en los ejemplos en el presente documento indican que la hemoglobina fetal (Hb-F) es el vínculo entre la fase 1 y la fase 2. Una toxina de la placenta ha sido una hipótesis durante muchos años como indicador para PE. Se sabe que la fase I tiene lugar en la placenta como consecuencia de hipoxia debida a perfusión alterada. Entonces la reacción de la placenta afecta al sistema materno pero no se ha identificado ningún factor específico. Basándose en los resultados presentados en la sección experimental, los presentes inventores sugieren que un factor de ese tipo es Hb fetal según los mecanismos anteriores. El diagnóstico temprano puede ayudar a seguir a mujeres que corren el riesgo de desarrollar PE, "salud temprana". Pueden monitorizarse mujeres con signos clínicos de PE como paciente ambulatoria suponiendo que puede monitorizarse la progresión específicamente, siguiendo por tanto los niveles de Hb fetal y/o la razón de Hb fetal/Hb total. La necesidad de un nuevo tratamiento es obvia y el beneficio del mismo sería enorme.

El nivel de hemoglobina fetal puede usarse solo para la evaluación de si una paciente corre el riesgo de o ya ha desarrollado preeclampsia, pero también puede usarse en combinación con el nivel total de hemoglobina o el nivel de hemoglobina de adulto presente en la muestra corporal específica como indicador de la progresión de la enfermedad.

Se encontró sorprendentemente que niveles elevados de hemoglobina libre, notablemente hemoglobina fetal, en una mujer embarazada están asociados con un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia. Por tanto, puede usarse hemoglobina fetal como biomarcador para el diagnóstico de preeclampsia y también es una diana candidata para el tratamiento de preeclampsia.

Basándose en esta observación, la presente invención se refiere a lo siguiente:

- i) un método para diagnosticar PE
- ii) un método para evaluar la progresión o regresión de PE
- iii) un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de PE
- iv) un kit para su uso en uno de los métodos mencionados anteriormente
- v) sustancias y composiciones para su uso en el tratamiento de PE

vi) antígeno leucocitario humano DPA1 (HLA-DPA1) como biomarcador.

**Definiciones**

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

Tal como se usa en esta memoria descriptiva, el término “preeclampsia” se define según criterios establecidos por el comité de terminología del Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología, es decir, hipertensión más proteinuria, edema manifiesto o ambos. Por ejemplo, puede definirse la preeclampsia como tensión arterial > 140/90 mm Hg y proteinuria > 0,3 g/l.

10 Existen diferentes formas de hemoglobina. La hemoglobina de adulto (hemoglobina A) consiste en dos cadenas polipeptídicas alfa y dos beta (Hb $\alpha$ , Hb $\beta$ ), que contienen cada una un grupo hemo no peptídico que se une de manera reversible a una molécula de oxígeno individual. La hemoglobina A2, otro componente de hemoglobina de adulto, está compuesta por dos cadenas alfa y dos cadenas delta (Hb $\alpha$ , Hb $\delta$ ). La hemoglobina fetal (hemoglobina F), por otro lado, es el componente principal de hemoglobina en el feto. Esta hemoglobina tiene dos cadenas polipeptídicas alfa y dos gamma (Hb $\alpha$ , Hb $\gamma$ ).

15 El término “hemoglobina libre”, en esta memoria descriptiva se refiere a hemoglobina libre en general e incluye hemoglobina libre total, hemoglobina A libre, hemoglobina A2 libre, hemoglobina F libre, cualquier subunidad de hemoglobina libre (por ejemplo cadena Hb $\alpha$ , Hb $\beta$ , Hb $\delta$  o Hb $\gamma$ ), o cualquier combinación de las mismas. Incluye además estas entidades de hemoglobina en una forma o bien de polipéptido (proteína) o bien de nucleótido (ARN), excepto cuando se aplica como una diana para el tratamiento. El término “hemoglobina fetal libre” se refiere a hemoglobina F libre o cualquier subunidad de hemoglobina F e incluye las entidades de hemoglobina F en una forma de polipéptido (proteína) o nucleótido (ARN), excepto cuando se aplica como una diana para el tratamiento.

20 En esta memoria descriptiva, el término “libre” tal como se usa, entre otros, en las expresiones “hemoglobina libre”, “hemoglobina fetal libre” o “subunidades de hemoglobina libre (por ejemplo cadenas Hb $\alpha$ , Hb $\beta$ , Hb $\delta$  o Hb $\gamma$ )” se refiere a hemoglobina, hemoglobina fetal o subunidades de hemoglobina que circulan libremente en un líquido biológico, en contraposición a hemoglobina celular que se refiere a las moléculas que residen dentro de las células. Por tanto el término “libre” en este sentido se usa principalmente para distinguir la hemoglobina libre de la hemoglobina que está presente en eritrocitos intactos.

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

30 El término “muestra biológica de mamífero hembra embarazado” o equivalentes del mismo pretende indicar una muestra del propio mamífero; por consiguiente, la muestra no se obtiene de por ejemplo el feto o el líquido amniótico.

Re i) Método para diagnosticar PE

35 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de preeclampsia que comprende las siguientes etapas: (a) obtener una muestra biológica de un mamífero hembra embarazado; (b) medir el nivel de hemoglobina fetal libre o medir el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en dicha muestra biológica; y (c) comparar el nivel de hemoglobina fetal libre en la muestra con un valor de referencia o comparar la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la muestra con un valor de referencia, para determinar si dicha hembra embarazada tiene o no tiene preeclampsia, o corre o no un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia.

40 La etapa de obtener una muestra biológica de dicho mamífero hembra embarazado incluye el procedimiento de dotarse de una muestra biológica obtenida con métodos convencionales bien conocidos en la técnica.

45 La muestra biológica podría ser, por ejemplo, sangre, suero sanguíneo, plasma, orina, secreciones vaginales, lágrimas, tejido, suero, heces, esputo, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo. En realizaciones específicas, la muestra biológica es sangre, orina, líquido amniótico o tejido de la placenta.

50 En determinadas realizaciones, la muestra biológica es sangre, plasma, orina o tejido de la placenta.

55 El tamaño de muestra de la muestra biológica recogida varía según las necesidades y sensibilidades individuales. La cantidad recogida puede variar ampliamente, dependiendo del tipo de pruebas que están usándose, el sitio de recogida y la posibilidad de cualquier efecto adverso para la madre o el feto. En una realización específica, un

tamaño de muestra de sangre está en algún punto en el intervalo de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 75 ml, preferiblemente desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 ml.

5 Se contempla que los métodos de esta invención son aplicables a cualquier animal que sea un animal "placentario", es decir, uno que nutre al feto no nacido a través de una placenta. Tales animales incluyen, entre otros, seres humanos, otros primates, animales de alimentación mamífera. Un animal preferido para el diagnóstico es un ser humano o un animal o ganado valioso comercialmente.

10 En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

15 En una determinada realización, se recogen muestras de mujeres embarazadas. La mujer embarazada puede ser un individuo que se ha determinado que corre un alto riesgo de preeclampsia basándose en su historia personal o familiar. Otras pacientes, entre otros, incluyen mujeres embarazadas que se sabe que tienen preeclampsia y para las que está usándose la prueba para determinar la eficacia de la terapia o el tratamiento que están recibiendo. Además, las pacientes podrían incluir mujeres embarazadas sanas que están sometándose a una prueba como parte de un examen de rutina.

20 Si se desea, puede prepararse la muestra para potenciar la capacidad de detección de hemoglobina fetal libre. Normalmente, la preparación de la muestra implica el fraccionamiento de la muestra y la recogida de fracciones que se determina que contienen hemoglobina libre. Los métodos de fraccionamiento previo incluyen, por ejemplo, centrifugación, extracción de ARN/ADN, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel y cromatografía de líquidos.

25 La etapa de medir el nivel de hemoglobina fetal libre puede realizarse mediante, por ejemplo, un ensayo inmunológico (por ejemplo, un ELISA u otro inmunoensayo basado en fase sólida tal como SPRIA o ELISA amplificado denominado IMRAMP), un ensayo de chip de proteínas, amplificación por PCR en tiempo real cuantitativa, desorción/ionización láser potenciada en superficie (SELDI), cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrometría de masas, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, quimioluminiscencia, nefelometría/turbometría, flujo lateral o electroforesis o fluorescencia pura o polarizada. Sin embargo, resultaría evidente para un experto en la técnica que esta lista de técnicas no es completa y estas técnicas no son los únicos métodos adecuados que pueden usarse en la presente invención para medir el nivel de hemoglobina fetal libre.

35 Las sustancias que se detectan y/o se miden en los métodos de la invención incluyen hemoglobina total, hemoglobina A, hemoglobina A2, hemoglobina F, cualquiera de las cadenas de hemoglobina (Hb $\alpha$ , Hb $\beta$ , Hb $\delta$  y Hb $\gamma$ ), o cualquier combinación de las mismas. En una realización específica de la invención, se detecta y/o se mide la cadena gamma de la hemoglobina (Hb $\gamma$ ) en el método de la invención. Claramente, la hemoglobina F y sus subunidades son las más importantes ya que los hallazgos se basan en niveles aumentados de hemoglobina fetal libre y su impacto en el desarrollo de PE. Tal como se comenta en el presente documento, la cadena gamma es indicativa de hemoglobina fetal, mientras que por ejemplo la cadena beta y delta son indicativas de hemoglobina de adulto. Basándose en la descripción en el presente documento, un experto en la técnica sabrá qué cadena(s) de hemoglobina debe(n) medirse.

45 Puede usarse un ensayo inmunológico (inmunoensayo), según la presente invención, para medir el nivel de hemoglobina libre. Un inmunoensayo es un ensayo que usa un anticuerpo para unir específicamente un antígeno (por ejemplo, hemoglobina). El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específica de un anticuerpo particular para aislar, seleccionar como diana y/o cuantificar el antígeno. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Usando los marcadores purificados o sus secuencias de ácido nucleico, pueden prepararse anticuerpos que se unen específicamente a un marcador (por ejemplo, hemoglobina) usando cualquier método adecuado conocido en la técnica [véase por ejemplo, Coligan, 1991].

50 En una determinada realización del primer aspecto, se mide el nivel de hemoglobina fetal libre usando por ejemplo un ensayo inmunológico. Particularmente, el ensayo inmunológico es un ELISA. Sin embargo, tal como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, también puede emplearse inmunotransferencia de tipo Western.

55 En una determinada realización del primer aspecto, se determina el nivel de hemoglobina fetal libre midiendo el ARN de hemoglobina fetal libre. Particularmente, se mide el ARN de hemoglobina fetal libre usando PCR en tiempo real. En los casos en los que también se determina el nivel de hemoglobina total, este nivel también puede determinarse midiendo el ARN de cadena alfa de hemoglobina, usando por ejemplo PCR en tiempo real.

60 En general, puede ponerse en contacto una muestra obtenida de un sujeto con el anticuerpo que se une específicamente al marcador. Opcionalmente, el anticuerpo puede fijarse a un soporte sólido para facilitar el lavado y posterior aislamiento del complejo, antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microtitulación, una barra, una

perla o una microperla.

Tras incubar la muestra con anticuerpos, se lava la mezcla y puede detectarse el complejo de anticuerpo-marcador formado. Esto puede lograrse incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. Este reactivo de detección puede ser, por ejemplo, un segundo anticuerpo que se marca con un marcador detectable. Los marcadores detectables a modo de ejemplo incluyen perlas magnéticas, tintes fluorescentes, radiomarcadores, enzimas (por ejemplo, peróxido del rábano, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en un ELISA) y marcadores calorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico.

Alternativamente, el marcador en la muestra puede detectarse usando un ensayo indirecto, en el que, por ejemplo, se usa un segundo anticuerpo marcado para detectar el anticuerpo específico de marcador unido y/o en un ensayo de competición o inhibición en el que, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo distinto del marcador se incuba simultáneamente con la mezcla.

Métodos para medir la cantidad o presencia de un complejo de anticuerpo-marcador incluyen, por ejemplo, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas de acoplador direccional o interferometría) o radioactividad. Los métodos ópticos incluyen microscopía (tanto confocal como no confocal), métodos de obtención de imágenes y métodos de no obtención de imágenes. Los métodos electroquímicos incluyen métodos de voltametría y amperometría. Los métodos de radiofrecuencia incluyen espectroscopía de resonancia multipolar.

Se conocen bien en la técnica ensayos útiles, incluyendo, por ejemplo, un inmunoensayo enzimático (EIA) tal como ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos tales como RIA y SPRIA; un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western; o un ensayo de transferencia por ranuras.

En una realización específica, un ELISA es el método preferido para medir el nivel de hemoglobina libre.

La etapa de medir el nivel de hemoglobina fetal libre, según la presente invención, también puede lograrse mediante la detección y medición de ARN libre que codifica para polipéptidos de hemoglobina en la muestra, por ejemplo detección de secuencias de ARN que codifican para la cadena gamma de la hemoglobina (H<sub>γ</sub>), o fragmentos de la misma, en el plasma sanguíneo.

Según una realización específica, se cuantifica el ARN de hemoglobina libre usando PCR en tiempo real.

En la etapa de comparar el nivel de hemoglobina libre en la muestra con un valor de referencia o comparar la razón entre el nivel de la subunidad de hemoglobina libre y el nivel de hemoglobina libre total en la muestra con un valor de referencia, el término "valor de referencia" en relación con la presente invención, según una realización, se refiere a un nivel medio o de referencia determinado de hemoglobina libre, es decir, el mismo tipo de hemoglobina libre que está midiéndose en la etapa (b), o la razón entre el nivel de la subunidad de hemoglobina libre y el nivel de hemoglobina libre total, en muestras de un grupo control. Preferiblemente, el grupo control comprende mamíferos hembra embarazados no diagnosticados con preeclampsia.

Cuando se usa un grupo control, se realiza la determinación del valor de referencia de hemoglobina fetal libre usando métodos convencionales de análisis bien conocidos en la técnica. Por supuesto, el valor variará dependiendo de, por ejemplo, el tipo de ensayo usado, la forma de hemoglobina libre que está midiéndose, la clase de muestra biológica y el grupo de sujetos. Por ejemplo, niveles en sangre promedio normales de hemoglobina libre total en un grupo de mujeres embarazadas no diagnosticadas con preeclampsia, y medidos con un ELISA, están normalmente en el intervalo de 2,5 a 3,5 µg/ml, pero por supuesto pueden variar dependiendo de la edad, el peso, el número de embarazos tempranos etc.

En el caso de que dicho valor de referencia sea el nivel de hemoglobina fetal libre o la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en muestras de un grupo control, un nivel superior de hemoglobina fetal libre o un valor superior de dicha razón en la muestra con respecto al valor de referencia indica que dicha hembra embarazada tiene preeclampsia o corre un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia.

En una determinada realización del primer aspecto, el valor de referencia es el nivel de hemoglobina fetal libre o la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en muestras de un grupo control, en el que un nivel superior de hemoglobina fetal libre o un valor superior de dicha razón en la muestra con respecto al valor de referencia indica que dicha hembra embarazada tiene preeclampsia o corre un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia. Los resultados preliminares, usando un método de inmunotransferencia de tipo Western para la determinación de la hemoglobina fetal libre, indican que mujeres que tienen un nivel en plasma de aproximadamente 5 µg/ml o más o, alternativamente un nivel en orina de 1 µg/ml o más están sujetas a PE o a desarrollar PE. Sin embargo, se espera que estos valores se identifiquen mejor usando un método más sensible como por ejemplo ELISA. A partir de la bibliografía, se ha notificado un nivel en plasma normal de hemoglobina fetal de aproximadamente 0,3-76 µg/l, es decir, 0,0003-0,076 µg/ml (véase Turpeinen *et al*, 1992) con un valor medio de

0,038 µg/ml. Por consiguiente, se han observado niveles pronunciados de hemoglobina fetal en mujeres que desarrollan PE o que ya padecen PE. Por consiguiente, se contempla que mujeres que tienen un nivel en plasma de hemoglobina fetal 5-10 veces o más por encima del nivel normal (es decir, 0,3 µg/ml o más) corren el riesgo de desarrollar PE. Sin embargo, también se espera que este valor se identifique mejor usando un método más sensible como por ejemplo ELISA. En realizaciones específicas, se contempla que si el nivel en plasma de hemoglobina fetal es de aproximadamente 20 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, aproximadamente 75 veces o más o aproximadamente 100 veces o más entonces la mujer o bien corre el riesgo de desarrollar PE o bien padece PE en estadio o bien 1 o bien 2. Visto de otro modo y siempre que se aplique el intervalo normal mencionado anteriormente, una mujer corre el riesgo de o padece PE si el nivel en plasma de hemoglobina fetal libre es de aproximadamente 0,5 µg/ml o más tal como, por ejemplo, aproximadamente 0,75 µg/ml o más, aproximadamente 1 µg/ml o más, aproximadamente 1,25 µg/ml o más, aproximadamente 1,5 µg/ml o más, aproximadamente 1,75 µg/ml o más, aproximadamente 2 µg/ml o más, aproximadamente 2,5 µg/ml o más, aproximadamente 3 µg/ml o más, aproximadamente 3,5 µg/ml o más, aproximadamente 4 µg/ml o más, aproximadamente 4,5 µg/ml o más o aproximadamente 5 µg/ml. Se contempla que cuanto menor es el nivel de hemoglobina fetal menos grave es la enfermedad en su presente estadio. Entonces la progresión (o regresión) de la enfermedad puede seguirse mediante la medición frecuente del nivel de hemoglobina fetal de la misma mujer.

Los resultados de los ejemplos en el presente documento apoyan las consideraciones anteriores. Por tanto, usando el método de inmunotransferencia de tipo Western, aproximadamente el 20% de las mujeres en el grupo II (es decir, el grupo que ya padece PE) tuvieron un nivel en plasma de 5 µg/ml o más. Con respecto al nivel en orina, aproximadamente el 20% de las mujeres que padecen PE tuvieron un nivel en orina de Hb fetal de 1 µg/ml o más (véase el ejemplo 5.2). Por consiguiente, con respecto a los niveles en orina parece como si el nivel fuese un poco más bajo que el nivel en plasma y, por consiguiente, se aplican todos los niveles mencionados anteriormente para el plasma, pero los niveles inferiores se reducen hasta aproximadamente 0,06 µg/ml o más, aproximadamente 0,1 µg/ml o más, aproximadamente 0,2 µg/ml o más, 0,4 µg/ml o más etc., en orina.

Otro modo diferente a observar el nivel en plasma u orina exacto de hemoglobina fetal con el fin de juzgar si una mujer corre el riesgo o ya tiene una indicación de PE, es observar la desviación estándar para la prueba llevada a cabo cuando se determina el nivel en plasma u orina (o de hecho el nivel en cualquier otro líquido corporal adecuado). Se contempla en el presente documento que un parámetro relevante es un aumento del nivel normal (por ejemplo en plasma u orina etc.) con 5 veces la desviación estándar o más tal como, por ejemplo 10 veces la desviación estándar o más, 25 veces la desviación estándar o más, 50 veces la desviación estándar o más o 100 veces la desviación estándar o más.

Con respecto a la medición de la razón (R) entre Hb fetal libre (Hb F) y Hb total libre (Hb total), la razón de una mujer normal (es decir, que no padece PE) es de aproximadamente  $0,038 \mu\text{g/ml} / 3 \mu\text{g/ml} = 0,012$  cuando los dos parámetros se miden mediante ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal tal como se describe por Turpeinen *et al.*, y ELISA tal como se describe a continuación (ejemplo 5). Por consiguiente, se contempla que una razón R de 0,12 o más indica que la mujer corre el riesgo o ya ha desarrollado PE en un determinado estadio. En determinadas realizaciones, se indica enfermedad o riesgo de PE en una determinada fase si R es 0,15 o más tal como, por ejemplo, 0,2 o más, 0,3 o más, 0,4 o más, 0,5 o más o 0,6 o más. Teóricamente,  $R=1$  cuando toda (el 100%) la Hb total libre es Hb fetal. Por tanto, éste es el límite superior.

La presente invención también contempla el uso de los métodos descritos en el presente documento en combinación con otros métodos de diagnóstico. Los métodos de diagnóstico que pueden usarse en combinación con los métodos de la invención incluyen métodos actuales para el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de preeclampsia conocidos por profesionales médicos expertos en la técnica, como ejemplos de tales métodos pueden mencionarse medir el nivel de urato o el nivel de cistatina C en suero. En primer lugar puede analizarse una muestra biológica por los métodos descritos en el presente documento. Entonces la muestra biológica puede someterse a prueba mediante otros métodos para corroborar la observación. Por tanto, la precisión del método de diagnóstico de la presente invención puede mejorarse combinándolo con otros métodos de diagnóstico.

Re ii) Evaluación de la progresión/regresión de PE

En realizaciones adicionales de la invención, puede emplearse la hemoglobina fetal libre, por ejemplo subunidades de hemoglobina fetal libre, para determinar el estado de preeclampsia (por ejemplo, preeclampsia grave) o para el pronóstico, es decir, la predicción del desenlace de la enfermedad, de la paciente. Por ejemplo, la concentración de hemoglobina libre se correlaciona con la gravedad de la preeclampsia (por ejemplo, preeclampsia leve o grave). Se sabe que manifestaciones neurológicas, tales como convulsiones o coma (eclampsia), accidente cerebrovascular, encefalopatía hipertensiva, cefaleas y aberraciones visuales (escotoma, diplopía, amaurosis, hemianopsia homónima), son comunes en preeclampsia grave [Douglas y Redman, 1994].

Por tanto, según el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para monitorizar la progresión o la regresión de preeclampsia, que comprende: (a) medir el nivel de hemoglobina fetal libre o medir el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en una primera muestra biológica aislada de un

mamífero hembra embarazado; (b) medir el nivel de hemoglobina fetal libre o medir el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en una segunda muestra biológica aislada de dicho mamífero hembra embarazado en un momento posterior; y (c) comparar los valores medidos en la etapa (a) y (b), en el que un aumento en el nivel de hemoglobina fetal libre en la segunda muestra con respecto al nivel de hemoglobina fetal libre en la primera muestra o un aumento en la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la segunda muestra con respecto a la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la primera muestra indica progresión de preeclampsia; y una disminución en el nivel de hemoglobina fetal libre en la segunda muestra con respecto al nivel de hemoglobina fetal libre en la primera muestra o una disminución en la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la segunda muestra con respecto a la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la primera muestra indica regresión de preeclampsia.

Se realizó la parte de campo del estudio en el hospital Muhimbili en Dar es Salaam, la principal ciudad de Tanzania (véase el ejemplo 5). El hospital Muhimbili es un centro de referencia de tercer nivel, que recibe pacientes predominantemente de los hospitales municipales. La Muhimbili University of Health and Allied Sciences (MUHAS) es la única universidad pública en el país que ofrece educación superior de formación en ciencias de la salud. Los altos números de embarazos complicados por PE y eclampsia en Tanzania hacen que sea un entorno adecuado para el estudio. En el hospital Muhimbili, se encontró PE en el 16% de las mujeres que se trataron en la clínica prenatal. La incidencia de eclampsia basada en el hospital fue de 200/10.000 partos basándose en un estudio durante 1999-2000. Esto puede compararse a la incidencia de 5/10.000 maternidades en Europa. Se incluyeron diez pacientes con eclampsia o PE grave y diez controles correspondidos en el estudio (véase la siguiente tabla).

Tabla 1: Características clínicas en el parto de pacientes que participaron en este estudio.

	PE	Control
Número <sup>a</sup>	10	10
Edad (años)	28,5 (19-40)	21,5 (18-30)
Paridad	1,6 ± 2,3	0,6 ± 1,4
Edad gestacional (días)	256 (217-266)	280 (231-287)
Tensión arterial sistólica (mmHg) <sup>***</sup>	191 ± 34	115 ± 9
Tensión arterial diastólica (mmHg) <sup>***</sup>	124 ± 18	74 ± 7
Proteinuria (g/l) <sup>*** b</sup>	2,6 ± 0,8	0,3 ± 1,0
Peso al nacer (g)	2005 ± 717	3040 ± 398
Peso de la placenta (g)	335 ± 120	506 ± 68
Sección (n)	6	4
IUFD (n)	5	0
Eclampsia (n)	4	0
PE=Preeclampsia Se usó Anova de una vía con prueba de Bonferroni post-hoc para evaluar estadísticamente diferencias entre los grupos. Se consideró un valor de p < 0,05 estadísticamente significativo. *** La prueba mostró una diferencia significativa entre PE frente al control (p<0,001). <sup>a</sup> Un caso de muerte materna en el plazo de 24 horas tras el parto en el grupo de PE. <sup>b</sup> Los valores para la proteinuria son inexactos debido a limitaciones del método. El valor medible más alto fue 3 g/l		

Se seleccionaron pacientes durante un periodo de seis semanas, septiembre - octubre de 2007, en el departamento de ginecología y obstetricia en el hospital Muhimbili. Se seleccionó el grupo preeclámpctico de la sala de cuidados intensivos eclámpcticos, en la que se admitió un promedio de dos pacientes con PE al día. Los criterios de inclusión fueron o bien PE grave (tensión arterial diastólica ≥ 110 mmHg en dos ocasiones) o bien eclampsia. Se excluyeron del estudio todas las pacientes con hipertensión crónica documentada antes del embarazo. Se entrevistaron a las pacientes usando una hoja de preguntas traducida a swahili. Se estudiaron las historias clínicas para cada paciente participante con el fin de obtener información adicional. Las mujeres incluidas en el estudio tenían una elevación persistente de la tensión arterial durante las 24 horas iniciales de hospitalización y una proteinuria ≥1 g/l. Se indicaron la edad, la paridad, el número de visitas prenatales, el modo de parto, la admisión a intervalo de parto, los resultados maternos y fetales.

Las muestras de orina recogidas antes del parto mostraron una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de hemoglobina total entre los grupos de PE y control (figura 21). Se realizaron cálculos estadísticos mediante una prueba U de Mann-Whitney no paramétrica, que mostró un valor de p de 0,0093. La mediana del valor para el grupo preeclámpctico fue de 31,0 mg/ml en comparación con 2,5 mg/ml en el grupo control. El alto valor del grupo control se debe lo más probablemente a la alta incidencia de malaria. También se analizaron las muestras de orina recogidas tras el parto.

En realizaciones específicas se contempla que un aumento en el nivel de hemoglobina fetal libre correspondiente a dos desviaciones estándar o más tal como, por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 7 o más o 10 o más desviaciones estándar es indicativo de un riesgo aumentado para el desarrollo de PE y/o la progresión de la

enfermedad. En un tema análogo, una disminución en el nivel de hemoglobina fetal libre correspondiente a dos desviaciones estándar o más tal como, por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 7 o más o 10 o más desviaciones estándar es indicativa de un riesgo disminuido para el desarrollo de PE y/o la regresión de la enfermedad. Otra medida puede ser la razón ( $R_t$ ) entre la Hb F en el momento  $t_2$  y Hb F en el momento  $t_1$ , en el que  $t_1$  es el tiempo en el que se tomó la primera muestra y  $t_2$  es el tiempo en el que se tomó la segunda muestra. Un aumento en  $R_t$  es indicativo de una progresión de la enfermedad y una disminución en  $R_t$  es indicativa de una regresión de la enfermedad. Puesto que se espera que la variación individual sea mínima debido al hecho de que es la misma mujer la que se somete a las pruebas, se cree que incluso un pequeño aumento o disminución es un indicador válido. Se espera que un valor de  $R_t$  de 1,1 o más sea indicativo de una progresión de la enfermedad, mientras que un valor de  $R_t$  de 0,9 o menos sea indicativo de una regresión de la enfermedad.

En los casos en los que se emplea la razón R (es decir, la razón entre Hb F y Hb total) la medida es normalmente la razón entre R ( $R_2$ ) obtenido en un segundo punto en el tiempo y R obtenido en un primer punto en el tiempo ( $R_1$ ). Un aumento en  $R_2/R_1$  es indicativo de una progresión de la enfermedad y una disminución en  $R_2/R_1$  es indicativa de una regresión de la enfermedad. Puesto que se espera que la variación individual sea mínima debido al hecho de que es la misma mujer la que se somete a las pruebas, se cree que incluso un pequeño aumento o disminución es un indicador válido. Se espera que un valor de la razón  $R_2/R_1$  de 1,1 o más sea indicativo de una progresión de la enfermedad, mientras que un valor de la razón  $R_2/R_1$  de 0,9 o menos sea indicativo de una regresión de la enfermedad.

Los detalles mencionados en el primer aspecto también se aplican a éste y los siguientes aspectos.

Re iii) Un método para evaluar la eficacia de un tratamiento específico de PE

Según el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para preeclampsia que comprende las siguientes etapas: (a) medir el nivel de hemoglobina fetal libre o medir el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en una primera muestra biológica obtenida de un mamífero hembra embarazado antes del tratamiento; (b) medir el nivel de hemoglobina fetal libre o medir el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total, en una segunda muestra biológica del mismo mamífero embarazado tras el tratamiento; y (c) comparar el nivel o los niveles determinado(s) en (a) con el nivel o los niveles determinado(s) en (b), en el que una disminución en el nivel de hemoglobina fetal libre en la segunda muestra con respecto al nivel de hemoglobina fetal libre en la primera muestra o una disminución en la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la segunda muestra con respecto a la razón entre el nivel de hemoglobina fetal libre y el nivel de hemoglobina libre total en la primera muestra indica que el tratamiento es eficaz para el tratamiento de preeclampsia.

En realizaciones específicas se contempla que la eficacia del tratamiento puede evaluarse determinando cualquier disminución en el nivel de hemoglobina fetal libre. Si la disminución corresponde a dos desviaciones estándar o más tal como, por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 7 o más o 10 o más desviaciones estándar es indicativa de que el tratamiento es eficaz en la reducción de la progresión de PE y/o el tratamiento de la enfermedad y/o alivio de los síntomas asociados con la enfermedad. En un tema análogo un aumento en el nivel de hemoglobina fetal libre correspondiente a dos desviaciones estándar o más tal como, por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 7 o más o 10 o más desviaciones estándar es indicativo de un tratamiento ineficaz. Otra medida puede ser la razón ( $R_t$ ) entre la Hb F en el momento  $t_2$  y Hb F en el momento  $t_1$  en el que  $t_1$  es el tiempo en el que se tomó la primera muestra y  $t_2$  es el tiempo en el que se tomó la segunda muestra. Un aumento en  $R_t$  es indicativo de una progresión de la enfermedad, es decir, el tratamiento no es suficiente, mientras que una disminución en  $R_t$  es indicativa de una regresión de la enfermedad y un tratamiento eficaz. Puesto que se espera que la variación individual sea mínima debido al hecho de que es la misma mujer la que se somete a las pruebas, se cree que incluso un pequeño aumento o disminución es un indicador válido. Se espera que un valor de  $R_t$  de 1,1 o más sea indicativo de una progresión de la enfermedad, mientras que un valor de  $R_t$  de 0,9 o menos sea indicativo de una regresión de la enfermedad.

En los casos en los que se emplea la razón R (es decir, la razón entre Hb F y Hb total) la medida es normalmente la razón entre R ( $R_2$ ) obtenido en un segundo punto en el tiempo y R obtenido en un primer punto en el tiempo ( $R_1$ ). Un aumento en  $R_2/R_1$  es indicativo de una progresión de la enfermedad, es decir, el tratamiento no parece que sea suficiente, y una disminución en  $R_2/R_1$  es indicativa de una regresión de la enfermedad, es decir, el tratamiento parece que tiene el efecto deseado. Puesto que se espera que la variación individual sea mínima debido al hecho de que es la misma mujer la que se somete a las pruebas, se cree que incluso un pequeño aumento o disminución es un indicador válido. Se espera que un valor de la razón  $R_2/R_1$  de 1,1 o más sea indicativo de una progresión de la enfermedad, mientras que un valor de la razón  $R_2/R_1$  de 0,9 o menos sea indicativo de una regresión de la enfermedad.

Re iv) Kit de diagnóstico

Según el cuarto aspecto, se proporciona un kit de ensayo para el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de preeclampsia, según la presente invención, que comprende medios para medir el nivel de hemoglobina fetal libre en una muestra biológica de un mamífero hembra embarazado e instrucciones para el uso de dichos medios de

detección.

En el presente documento también se dan a conocer kits para el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de preeclampsia. Se usan los kits para detectar o examinar la presencia de hemoglobina libre que está presente de manera diferencial en muestras de sujetos con preeclampsia.

En una realización, el kit comprende medios para detectar en una muestra biológica de un mamífero hembra embarazado niveles de hemoglobina libre (por ejemplo cadena alfa de hemoglobina (Hb $\alpha$ ), cadena beta de hemoglobina (Hb $\beta$ ), cadena delta de hemoglobina (Hb $\delta$ ), cadena gamma de hemoglobina (Hb $\gamma$ ) y hemoglobina libre total), o bien individualmente o bien en combinación con otros medios de detección e instrucciones para el uso de dichos medios de detección. Alternativa o adicionalmente, un kit comprende medios para medir ARNm de Hb fetal.

En una realización preferida, el kit comprende medios para detectar el nivel de hemoglobina fetal libre, por ejemplo medios para medir el nivel de cadena gamma de hemoglobina (Hb $\gamma$ ) en una muestra. En otra realización, comprende además medios para detectar el nivel de hemoglobina libre total.

En una realización, los medios para detectar comprenden anticuerpos específicos para la hemoglobina, preferiblemente para la hemoglobina fetal (por ejemplo un anticuerpo anti-Hb $\gamma$  humana).

En una realización adicional, dichas instrucciones comprenden parámetros operativos adecuados en forma de una etiqueta o prospecto separado. Por ejemplo, las instrucciones pueden informar a un consumidor de cómo recoger la muestra y cómo lavar la sonda. Especialmente debe tenerse cuidado para minimizar la hemólisis de muestras de sangre para evitar valores falsos de Hb total.

Un kit que va a usarse en el método de la invención puede comprender además patrones de analitos, reactivos etc.

En una determinada realización del cuarto aspecto, el nivel de hemoglobina fetal libre se determina midiendo el nivel de cadena gamma de hemoglobina (Hb $\gamma$ ).

En una determinada realización del cuerpo aspecto, el kit de ensayo comprende además medios para detectar el nivel de hemoglobina libre total por ejemplo para determinar razones de Hb total frente a Hb fetal y/o frente a ARNm de Hb fetal.

Más específicamente, un kit de diagnóstico puede comprender por ejemplo todos los componentes (excepto agua) que se necesitan para realizar un ELISA diseñado para medir la concentración de hemoglobina fetal en una muestra o dos ELISA diseñados para medir las concentraciones de tanto la hemoglobina fetal como la hemoglobina total en una muestra. Un modo preferido de medir las concentraciones de hemoglobina fetal es la variante competitiva de ELISA descrita a continuación en el presente documento:

Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos con hemoglobina-F, diluida a 1-5  $\mu\text{g/ml}$  en una disolución acuosa, mediante incubación durante la noche. Se proporcionarán placas recubiertas previamente listas para su uso en el kit. Deben incubarse los pocillos de las placas de microtitulación en la clínica con una mezcla, que contiene 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-hemoglobina-F de conejo, diluido 1000-10000 veces con disolución acuosa A (por ejemplo NaCl al 0,9% que contiene el 0,1% de un detergente, por ejemplo Tween 20, y 0,1% de albúmina sérica bovina), más o bien 50  $\mu\text{l}$  de una serie de muestras de oxihemoglobina-F patrón, diluida con disolución acuosa A a las concentraciones 1-10000 ng/ml, o bien 50  $\mu\text{l}$  de las muestras del paciente (diluidas 100-10000x con disolución acuosa A). Esta mezcla debe dejarse en los pocillos de la placa de microtitulación durante un periodo de tiempo de entre 30 minutos y 3 horas a temperatura ambiente. Entonces deben lavarse las placas 3 veces con disolución acuosa A, e incubarse cada pocillo durante 30 minutos con 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina (ALP) porcino, diluido 1000-10000x en disolución acuosa A. Entonces deben lavarse las placas 3 veces con disolución acuosa A y finalmente se incuban con un sustrato con el que ALP puede reaccionar específicamente, convirtiéndolo en un producto coloreado. La disolución de sustrato puede ser, por ejemplo, fosfato de p-nitrofenilo 1 mg/ml en dietanolamina 1 M + MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, pH 9,8. La concentración del producto (=intensidad de color) en un pocillo es entonces proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-hemoglobina-F en ese pocillo, y la cantidad de anticuerpo es, a su vez, inversamente proporcional a la cantidad de hemoglobina-F en el paciente o muestra control. La intensidad de color puede determinarse exactamente por un lector de placas de microtitulación de tipo de absorbancia de luz, o incluso se estima a simple vista.

La enzima peroxidasa del rábano (HRP), en lugar de ALP, es la elección obvia del par de enzimas para los anticuerpos secundarios para un experto en la técnica. Sin embargo, en este contexto, no puede usarse HRP debido a que la hemoglobina, que estará presente en los mismos pocillos de placa de microtitulación, también es una enzima peroxidasa y proporcionará valores falsamente altos del producto coloreado.

Hasta donde conocen los inventores, no se ha usado previamente un ELISA competitivo usando un antisuero de conejo policlonal en combinación con ALP para medir la hemoglobina-F fetal.

Se proporcionará con el kit un manual, que contiene instrucciones referentes al procedimiento, los volúmenes exactos, las diluciones, las concentraciones, las veces de incubación y las temperaturas de cada etapa y reactivo. También se proporcionan placas de microtitulación recubiertas previamente, disoluciones de oxihemoglobina-F u oxihemoglobina "total" para el recubrimiento y una serie de dilución patrón, una disolución de anticuerpo anti-hemoglobina-F de conejo o anticuerpo anti-hemoglobina total de conejo, una disolución de anticuerpo anti-IgG de conejo-ALP porcino, una disolución de sustrato de ALP y disolución acuosa A.

Se prepararán oxihemoglobina-F y oxihemoglobina "total" en los laboratorios tal como sigue. Se aíslan glóbulos rojos a partir de 50 ml de sangre de cordón humano (preparación de Hb-F) o sangre de adulto (preparación de Hb total) mediante centrifugación (1200 xg, 10 minutos) y se lavan 4 veces con 10 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato 10 mM, pH 7,4; NaCl 120 mM y KCl 3 mM). Entonces se lisan las células sanguíneas mediante resuspensión en tampón hipotónico (20 volúmenes de H<sub>2</sub>O:1 volumen de PBS) en hielo. Se separan las membranas del citosol mediante centrifugación (14000 xg, 20 minutos) y se dializa el sobrenadante 3 veces frente a Tris-HCl 15 mM, pH 8,0 en 4°C. Se empaquetan doscientos ml de DEAE-Sepharose (GE Healthcare) en una columna y se aplica el sobrenadante dializado al gel y se separa mediante un gradiente que consiste en Tris-HCl 15 mM, pH 8,0 y Tris-HCl 15 mM, pH 8,0 + NaCl 0,2 M. Se recogen las fracciones y se mide la absorbancia a 280 nm, 577 nm y 630 nm para identificar y determinar la concentración de oxihemoglobina-F u oxihemoglobina total [Winterbourn, 1990]. Se preparan la disolución para el recubrimiento y las series patrón mediante dilución en disolución acuosa A.

Se compra anticuerpo anti-hemoglobina total de conejo de Dako, Dinamarca y se prepara anticuerpo anti-hemoglobina-F de conejo mediante inmunización de conejos con cadena  $\gamma$  de hemoglobina purificada (Hb- $\gamma$ ) y sangría de los conejos según protocolos convencionales. Se realiza la inmunización y sangría en un instituto comercial ("servicio externo"). Se purifica Hb- $\gamma$  a partir de Hb-F en el laboratorio disociando y separando las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ , principalmente siguiendo los protocolos de Kajita *et al.* y Noble [1971]. Se añaden fosfato de potasio (0,1 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M) y cloruro de sodio (0,2 ml de NaCl 2 M) a 10 ml de una disolución al 3% (p/v) de hemoglobina-F. Se disuelven cincuenta mg de p-mercuribenzoato en 0,2 ml de NaOH 1 M y se añade 1 ml de agua añadida a lo mismo. Se mezclan estas dos disoluciones, se titula cuidadosamente con ácido acético 1 M hasta pH 4,5 y se deja durante la noche moviendo suavemente en frío. La siguiente mañana, se ajusta el pH a 7 con NaOH 1 M y se centrifuga (5000xg, 10 minutos, 10°C). Se descarta el sedimento y se dializa el sobrenadante frente a Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Entonces se aplica la muestra dializada a una columna de 10 ml de DEAE-Sepharose (GE Healthcare), que se ha equilibrado previamente con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Tras la aplicación de la muestra, se enjuaga la columna con 50 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y luego con un gradiente de tampón salino que consiste en 100 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y 100 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 + NaCl 0,2 M. Se realiza la aplicación de la muestra, el lavado y la elución en gradiente a un flujo de 40 ml/hora y se recogen fracciones de 3 ml. Entonces se evalúan las concentraciones de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  de cada fracción eluida mediante absorbancia de luz a 415 nm, SDS-PAGE, PAGE nativa y secuenciación de aminoácidos aminoterminal. Se combinan las fracciones que contienen cadena  $\gamma$  pura, se añade 2-mercaptoetanol hasta 50 mM para disociar el p-mercuribenzoato de la mitad de las cistinas. Entonces se elimina el p-mercuribenzoato de la proteína desalando en una columna Sephadex G-25 (PD-10, GE Healthcare), eluyendo con fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 + 2-mercaptoetanol 50 mM. Finalmente, se dializan las fracciones de proteína eluidas frente a fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5.

Se compra el anticuerpo anti IgG-ALP de conejo porcino de Sigma, mientras que se preparan la disolución de sustrato y disolución acuosa A en el laboratorio a partir de productos químicos disponibles comercialmente.

Alternativamente, el ELISA de hemoglobina fetal puede ser un ELISA de tipo sándwich usando un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para Hb- $\gamma$  para el recubrimiento, la muestra clínica a una dilución apropiada o una serie de hemoglobina fetal patrón en la etapa 1 de la incubación y un anticuerpo anti-hemoglobina-ALP de conejo en la segunda etapa de la incubación.

Alternativamente, puede usarse un chip de proteínas recubierto con un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con Hb- $\gamma$  en el kit de diagnóstico como medio para medir la concentración de hemoglobina fetal en las muestras clínicas.

#### Re v) Sustancias y composiciones para su uso en la prevención y/o el tratamiento de PE

Según los hallazgos notificados en el presente documento de que la hemoglobina fetal libre es un indicador de PE y que una reducción en el nivel de Hb F (o nivel de Hb en general) es probable que reduzca cualquier progresión de la enfermedad, se contempla que cualquier sustancia que tiene i) la capacidad de inhibir la formación de Hb libre (Hb F libre o cualquier otra Hb), ii) la capacidad de unirse a Hb libre (Hb F libre o cualquier otra Hb) o iii) la capacidad de reducir la concentración de Hb libre circulante (Hb F libre o cualquier otra Hb) sería una posible sustancia para el tratamiento eficaz y/o la prevención de PE. Por consiguiente, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un uso de al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en agentes de unión a hemoglobina; agentes de degradación/unión a grupo hemo; agentes de unión a hierro; agentes que estimulan la

degradación de hemoglobina, degradación de grupo hemo y/o secuestro de hierro; y/o agentes que inhiben la hematopoyesis placentaria para el tratamiento de PE. Además, en un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una sustancia de ese tipo para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de preeclampsia.

5 Los términos “tratamiento o profilaxis” en sus diversas formas gramaticales en relación con la presente invención se refieren a la prevención, cura, reversión, atenuación, alivio, mejora, inhibición, minimización, supresión o detención (1) de los efectos nocivos de la preeclampsia, (2) la progresión del trastorno o (3) el agente que causa el trastorno.

10 La hemoglobina es crítica para la oxigenación, pero la hemoglobina libre en la circulación es tóxica para los tejidos al alterar el equilibrio redox vascular durante la auto-oxidación del grupo hemo desde su estado ferroso a férrico [Mottlerini *et al.*, 1995] y posiblemente a través de la inducción de radicales libres centrados en globina [Svistunenko *et al.*, 1997].

15 Los solicitantes proponen que los niveles aumentados de hemoglobina libre en la sangre de mujeres con preeclampsia no sólo sirven como marcador para la enfermedad, sino que también son responsables, o parcialmente responsables, de las manifestaciones de la enfermedad comúnmente observadas en tales pacientes. Por tanto, la hemoglobina libre también es una diana candidata para el tratamiento de preeclampsia. Incluso si se considera la hemoglobina fetal libre como marcador para PE, se contempla que la reducción de hemoglobina libre en general (es decir, hemoglobina fetal así como hemoglobina más inespecífica tal como, por ejemplo, hemoglobina de adulto) minimizará el progreso de o tratará la PE.

25 En una determinada realización de este aspecto, los agentes de unión a hemoglobina y/o agente de unión a grupo hemo es alfa-1-microglobulina. A partir de ahora, este agente se denominará alfa-1-microglobulina o  $\alpha_1$ -microglobulina y se abreviará  $\alpha_1$ m. Otros nombres para esta sustancia que se han usado en la bibliografía científica son proteína HC (heterogénea en carga; formadora de complejo humano), AMBP-proteína y alfa-1-microglicoproteína pero estos nombres son sinónimos de  $\alpha_1$ m.

30 En una determinada realización de este aspecto, los agentes de unión a hemoglobina y/o agente de unión a grupo hemo es un anticuerpo específico para la hemoglobina y/o el grupo hemo.

35 Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de preeclampsia, método que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento o profilaxis una cantidad eficaz de uno o más de tales agentes mencionados anteriormente incluyendo al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en agentes de unión a hemoglobina y/o agentes de degradación/unión a grupo hemo y/o agentes de unión a hierro; agentes que estimulan la degradación de hemoglobina y/o degradación de grupo hemo y/o secuestro de hierro; y agentes que inhiben la hematopoyesis placentaria. El agente puede administrarse normalmente en forma de una composición farmacéutica que comprende el agente activo en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 Además, la presente invención proporciona el uso de al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en agentes de unión a hemoglobina y/o agentes de degradación/unión a grupo hemo, agentes que estimulan la degradación de hemoglobina y/o degradación de grupo hemo y/o secuestro de hierro, y agentes que inhiben la hematopoyesis placentaria para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de preeclampsia; y un método para el tratamiento o la profilaxis de preeclampsia, método que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento o profilaxis una cantidad eficaz de una preparación farmacéutica que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en agentes de unión a hemoglobina y/o agentes de degradación/unión a grupo hemo y/o agentes secuestrantes de hierro, agentes que estimulan la degradación de hemoglobina y/o degradación de grupo hemo y/o secuestro de hierro, y agentes que inhiben la hematopoyesis placentaria. En estos aspectos el objetivo es disminuir la cantidad de hemoglobina libre y su producto de degradación grupo hemo, en por ejemplo sangre materna, prevenir el daño tisular y además el progreso de la enfermedad.

55 Los agentes de unión a hemoglobina y/o agentes de degradación/unión a grupo hemo son compuestos que presentan propiedades de degradación/unión a hemoglobina y/o grupo hemo. Los agentes secuestrantes de hierro son compuestos que se unen a hierro libre e impiden que participen en las reacciones redox.

60 Según la presente invención, los agentes de unión a hemoglobina y/o agente de degradación/unión a grupo hemo es  $\alpha_1$ m. Esta pequeña proteína tisular y plasmática es una molécula de unión a grupo hemo [Allhorn *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2004] y eliminador de radicales [Åkerström *et al.* 2007] y una forma de degradación de grupo hemo, t- $\alpha_1$ m, se induce mediante eliminación proteolítica de un tetrapéptido C-terminal, LIPR cuando se mezcla  $\alpha_1$ m con hemoglobina libre [Allhorn *et al.*, 2002]. También puede unirse a hemoglobina en placentas (véase a continuación). La hemoglobina libre y especies reactivas de oxígeno provocan una producción aumentada de  $\alpha_1$ m en células hepáticas y células sanguíneas [Olsson *et al.* 2007]. Por tanto,  $\alpha_1$ m es un posible antagonista de grupo hemo y hemoglobina que puede proteger frente al daño inducido por grupo hemo y hemoglobina a células y componentes

5 tisulares. Los ejemplos 5.4-5.7 proporcionan pruebas adicionales de esto. Por tanto, el ejemplo 5.4 muestra que pacientes preeclámpticas responden a la enfermedad aumentando los niveles de  $\alpha_1m$ , el ejemplo 5.5 muestra que  $\alpha_1m$  inhibe y repara el daño oxidativo inducido por grupo hemo en células y tejidos, el ejemplo 5.6 describe un modelo *in vitro* de placenta en el que pueden tomarse pruebas de agentes de terapia una etapa más cerca a pruebas *in vivo*, y el ejemplo 5.7 muestra que  $\alpha_1m$  se une a hemoglobina en placenta-tejido.

Otros agentes que se contempla que son posibles agentes activos para el tratamiento o la prevención de PE son los siguientes:

10 Moléculas de unión a hemoglobina:

Anticuerpos

15 Pueden desarrollarse anticuerpos monoclonales con fuerte unión de hemoglobina y bloqueo de actividad enzimática redox de hemoglobina. Los anticuerpos pueden producirse mediante inmunización *in vivo* o *in vitro* o seleccionarse a partir de bibliotecas preexistentes. Los anticuerpos pueden seleccionarse por especificidad frente a cadenas de globina alfa, beta, delta o gamma, o frente a partes comunes de estas cadenas de globina. Los anticuerpos pueden modificarse para hacerlos adecuados para la terapia en seres humanos, es decir, dotados de un entramado de inmunoglobulina humana. Puede usarse cualquier parte de anticuerpos: fragmentos Fv, Fab o inmunoglobulina completa.

20 Haptoglobulina

25 La haptoglobulina es una glicoproteína encontrada en el plasma sanguíneo. Existen tres formas de haptoglobina, Hp1-1, Hp2-1 y Hp2-2. Todas las formas se unen a hemoglobina y forma un complejo de Hp-Hb. El complejo de Hb-Hp tiene una actividad enzimática redox más débil que la hemoglobina libre y por tanto provoca menos daño oxidativo. La unión a Hb previene, por ejemplo, la pérdida de hierro del grupo hemo.

30 CD163

35 CD163 es un receptor eliminador, encontrado en macrófagos, monocitos y sistema reticuloendotelial que reviste los vasos sanguíneos. El receptor reconoce el complejo de Hp-Hb y media en la endocitosis y el suministro de éste a los lisosomas, la degradación mediante HO-1 (véase a continuación) y el secuestro de hierro libre mediante ferritina celular. Por tanto CD163 contribuye a la eliminación del estrés oxidativo inducido por hemoglobina.

Degradadores/moléculas de unión a grupo hemo:

Hemopexina

40 La hemopexina es una glicoproteína (60 kDa) encontrada en el plasma sanguíneo humano, y que elimina grupo hemo libre del plasma sanguíneo uniéndolo fuertemente (Kd aprox. 1 pmol/l) y transportando el grupo hemo al hígado para la degradación en el sistema reticuloendotelial.

45 Hemo-oxigenasa

50 La hemo-oxigenasa es un complejo enzimático de degradación y unión a grupo hemo celular que convierte el grupo hemo en biliverdina, monóxido de carbono y hierro libre. Se secuestra este último mediante ferritina celular y se reduce la biliverdina mediante biliverdina reductasa para dar bilirrubina que se excreta finalmente en la orina. Se han descrito tres formas de genes de hemo-oxigenasa, con estructuras muy diferentes, HO-1, HO-2 y HO-3. HO-1 es el más importante. Este gene se regula por incremento en prácticamente todas las células en el organismo por hemoglobina, grupo hemo libre, hipoxia, radicales libres, ROS (especies reactivas de oxígeno) y muchos signos inflamatorios diferentes. El HO-1 es un anti-oxidante fuerte porque elimina los oxidantes grupo hemo y hierro, pero también porque produce bilirrubina, que tiene efectos antioxidantes frente a algunos oxidantes.

55 Albúmina

60 La albúmina es una proteína de 66 kDa en el plasma sanguíneo humano que puede unirse a grupo hemo. No hay pruebas de captación celular y degradación del complejo de albúmina-grupo hemo, y el efecto de la albúmina es probablemente actuar como depósito de grupo hemo impidiendo por tanto que el grupo hemo entre en las membranas celulares endoteliales, membranas basales de los vasos, etc.

Moléculas de unión a hierro:

Transferrina

65 La transferrina es el transportador de hierro más importante en la sangre. Se reconoce el complejo de transferrina-

hierro y se une por receptores celulares que internalizan y disocian el complejo.

### Ferritina

5 Esta proteína multimérica, que consiste en 24 subunidades de dos tipos, es el principal depósito intracelular de hierro libre. Tiene una alta capacidad de almacenamiento de hierro, 4500 átomos de hierro/molécula de ferritina. Unido a ferritina, se impide ampliamente que el hierro participe en reacciones de oxidación y reducción, y por tanto que provoque daño oxidativo.

10 En una realización adicional, el agente de unión a hemoglobina es un anticuerpo específico para la hemoglobina y/o el grupo hemo.

En realizaciones específicas, la preparación farmacéutica comprende una combinación de agentes de unión a hemoglobina y/o agentes de unión a grupo hemo y/o agentes secuestrantes de hierro. Los agentes que estimulan la degradación de hemoglobina y/o degradación de grupo hemo incluyen, pero no se limitan a, proteínas como haptoglobina, hemopexina y hemo-oxigenasa.

15 Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse a un animal "placentario", tal como ser un humano, otro primate o animal de alimentación mamífera. Un animal preferido para la administración es un ser humano o un animal o ganado valioso comercialmente.

La administración puede realizarse de diferentes maneras dependiendo de qué animal va a tratarse, del estado del animal que necesita dicho tratamiento y la indicación específica que va a tratarse. La vía de administración puede ser oral, rectal, parenteral o a través de un tubo nasogástrico. Ejemplos de vías de administración parenteral son intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o inyección subcutánea.

25 La formulación de la preparación farmacéutica debe seleccionarse dependiendo no sólo de propiedades farmacológicas del principio activo sino también de sus propiedades fisicoquímicas y el tipo de vía de administración. Los expertos en la técnica conocen bien diferentes métodos de formulación de preparaciones farmacéuticas.

30 Para las composiciones parenterales, se prefieren composiciones líquidas o composiciones sólidas diseñadas para reconstituirse con por ejemplo un medio acuoso antes de su aplicación. Los excipientes adecuados incluyen: disolventes (por ejemplo agua, medio acuoso, alcoholes, aceites vegetales, lípidos, disolventes orgánicos como propilenglicol y similares), ajustadores de la presión osmótica (por ejemplo cloruro de sodio, manitol y similares), solubilizantes, agentes de ajuste del pH, conservantes (si es relevante), potenciadores de la absorción etc.

35 Para composiciones orales, las composiciones pueden estar en forma sólida, semisólida o líquida. Las composiciones adecuadas incluyen formas farmacéuticas sólidas (por ejemplo comprimidos incluyendo todos los tipos de comprimidos, sobres y cápsulas), polvos, gránulos, grageas, perlas, jarabes, mezclas, suspensiones, emulsiones y similares.

40 Los excipientes adecuados incluyen por ejemplo cargas, aglutinantes, disgregantes, agentes lubricantes etc. (para formas farmacéuticas sólidas o composiciones en forma sólida), disolventes tales como, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos, aceites vegetales etc. para formas líquidas o semisólidas. Además, pueden añadirse aditivos como agentes de ajuste del pH, agentes enmascaradores del sabor, aromatizantes, agentes estabilizantes etc.

45 Además, pueden incluirse portadores específicos para dirigir el principio activo a una parte específica del cuerpo. Por ejemplo un complejo de anticuerpo- $\alpha_1\text{M}$  en el que el anticuerpo se dirige a la placenta ("direccionamiento") por su especificidad para un epítipo de placenta; una célula madre o una célula recombinante con propiedades de direccionamiento a la placenta, por ejemplo receptores de integrina específicos para placenta y con la capacidad artificial o natural de secretar grandes cantidades de  $\alpha_1\text{M}$ . El tratamiento sería más eficaz ya que el fármaco se concentraría en la placenta.

50 El término "cantidad eficaz" en relación con la presente invención se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un régimen de administración y estado dados. Ésta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con los aditivos y diluyentes requeridos; es decir, un portador, o vehículo de administración. Además, se pretende que signifique una cantidad suficiente para reducir y lo más preferiblemente prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en un estado clínicamente significativo en un huésped. Tal como se aprecia por los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con los diluyentes requeridos; es decir, portador o aditivo. Además, la dosificación que va a administrarse variará dependiendo del principio o los principios activos que van a usarse, la edad, el peso etc. del paciente que va a tratarse pero en general estará dentro del intervalo de desde 0,001 hasta 1000 mg/kg de peso corporal/día. Además, la dosis depende de la vía de administración.

Re vi) HLA-DPA-1 como biomarcador

5 Un aspecto adicional se refiere a la observación de que las células fetales pueden desencadenar la respuesta inmunitaria materna ya que son diferentes. El papel de la familia génica HLA es presentar el antígeno foráneo al sistema inmunitario materno. Mujeres que expresan el gen de HLA-DPA1 pueden “observar” las células fetales en una fase temprana, lo que podría ayudarlas a protegerse del daño adicional. (En los estudios notificados en el presente documento, se ha observado que mujeres con incisura, pero que no desarrollan PE, expresaban HLA-DPA1.)

10 Por consiguiente, puede usarse HLA-DPA1 como un indicador indirecto para hemoglobina fetal y/o para PE. Por tanto, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de pronóstico para la preeclampsia que comprende las siguientes etapas: (a) obtener una muestra biológica de un mamífero hembra embarazado; (b) medir el nivel de antígeno leucocitario humano DPA1 (HLA-DPA1), en dicha muestra biológica; y  
15 (c) comparar el nivel de HLA-DPA1 en la muestra con un valor de referencia. Se contempla que si las composiciones de HLA mencionadas anteriormente están presentes, la hembra probablemente corre menos riesgo de desarrollar PE (con o sin HB fetal libre), mientras que si la hembra no tiene este HLA protector, entonces ella corre mayor riesgo, especialmente si también aumenta el nivel de Hb fetal libre.

20 En una determinada realización de este aspecto, se realizan las etapas (a) a (c) para determinar si dicha hembra embarazada corre o no un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia o corre o no un riesgo aumentado de desarrollar una forma grave de preeclampsia.

25 En una determinada realización de este aspecto, una expresión o una alta expresión de HLA-DPA1 indica un mejor pronóstico que la no expresión de HLA-DPA1.

30 En un último aspecto, se proporciona un kit de ensayo para el pronóstico o la ayuda en el pronóstico de preeclampsia, según el método de pronóstico para la preeclampsia según la invención, que comprende medios para detectar, en una muestra biológica de un mamífero hembra embarazado, los niveles de HLA-DPA1 e instrucciones para el uso de dichos medios de detección.

La presente invención se describirá ahora en más detalle.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra un modelo extendido de desarrollo de preeclampsia, basado en los hallazgos de Hb-F y Hb-A en el plasma sanguíneo materno, destacando la aparición de Hb-F y Hb-A y su posible uso como marcadores de diferentes estadios de la enfermedad.

40 La figura 2 A muestra la placenta en el embarazo temprano (ultrasonido), B muestra la circulación fetal en las vellosidades, que se sumergen en el espacio entre vellosidades lleno de sangre materna y C muestra la vellosidad unitaria funcional más pequeña con la circulación fetal.

45 La figura 3 A muestra la circulación fetal en las vellosidades, que se sumergen en el espacio entre las vellosidades lleno de sangre materna menos oxigenada (más oscuro), B muestra que se induce apoptosis (puntos ovalados) en las células placentarias-trofoblastos, mediante especies reactivas oxidativas (ROS) y C muestra que se daña la barrera sangre-placenta.

50 La figura 4 muestra resultados de la cuantificación por PCR en tiempo real de Hb $\alpha$ , Hb $\gamma$ , Hb $\beta$  y ARNm de HLA-DPA1 en la placenta.

La figura 5 muestra imágenes de hibridaciones *in situ* de placenta humana y muestras de lecho de placenta.

55 La figura 6 es una imagen representativa de la expresión de proteína Hb $\gamma$  en la placenta.

La figura 7 muestra un gráfico de dispersión de los niveles de ARNm de Hb $\gamma$  en el plasma materno tomado antes del parto de mujeres con PE cuantificados por PCR en tiempo real. El gráfico muestra el valor de Ct en el eje izquierdo, que proporciona una estimación de la cantidad de niveles de ARNm de Hb $\gamma$  en la muestra.

60 La figura 8 muestra imágenes de geles representativos para Hb $\delta$ . A) Muestra de PE en la que el punto de Hb $\delta$  es claramente visible (flecha). B) Gel de una muestra control en la que el punto de Hb $\delta$  está ausente (círculo).

65 La figura 9 muestra los valores de ARNm de Hb $\delta$  en la placenta cuantificados con qPCR presentados en un gráfico de dispersión.

La figura 10 muestra imágenes *in situ* de una placenta preecláptica que expresa ARNm de Hb $\delta$ .

Figura 11. Hibridaciones *in situ* de placenta y muestras de lecho de placenta (panel izquierdo). Imagen de campo oscuro de la expresión de ARNm de hemoglobina en una muestra de placenta preecláptica representativa y control. Se observó especialmente expresión de ARNm de hemoglobina en y alrededor de los vasos sanguíneos (puntas de flecha). Se observan varias células dispersadas en el espacio entre las vellosidades en PE. La inmunohistoquímica (panel derecho) muestra la acumulación de hemoglobina fetal libre (flecha) en la luz (lu) de la vasculatura placentaria.

Figura 12. Concentraciones de hemoglobina total en el plasma de mujeres con embarazos preeclápticos (n=30) y embarazos normales (n=30). Se midieron las concentraciones mediante ELISA usando anticuerpos frente a hemoglobina de adulto (Hb-A), diluyendo el plasma 1000x.

Figura 13. Determinación de Hb-F mediante inmunotransferencia de tipo Western en el plasma de dos pacientes con preeclampsia (PE 1 y 2) y dos individuos control con embarazos normales (control 1 y 2). Se trataron las muestras de plasma con perlas de extracción de albúmina tal como se describe y luego se aplicaron (15  $\mu$ l), no diluidas, al procedimiento de SDS-PAGE/inmunotransferencia de tipo Western. Para permitir la estimación de las concentraciones en  $\mu$ g/ml, se aplicaron 0,1  $\mu$ g de Hb-F purificada en un carril separado ("Hb-F purificada").

Figura 14. La circulación fetal con células que sintetizan hemoglobina (óvalos blancos con un punto negro). Debido al daño a la barrera placentaria, las células fetales se escapan al espacio entre las vellosidades y por tanto a la circulación materna.

Figura 15. Concentraciones de  $\alpha_1$ m total en el plasma de mujeres con embarazos preeclápticos (n=30) y embarazos normales (n=30). Se midieron las concentraciones mediante RIA, diluyendo el plasma 500x.

Figura 16. A. Propiedades protectoras de células de  $\alpha_1$ m frente a la oxidación inducida por grupo hemo y ROS. Se marcaron células K562 con la sonda sensible a oxidación H<sub>2</sub>DCFDA, se lavaron y se incubaron con  $\alpha_1$ m (2, 5 ó 10  $\mu$ M), AGP (2, 5 ó 10  $\mu$ M) o ascorbato (10  $\mu$ M) antes de la adición de grupo hemo 10  $\mu$ M. Se incubaron las células durante 2 h y se analizaron con FACS. B. Se cultivaron células K562 con  $\alpha_1$ m (2, 5 ó 10  $\mu$ M) o una proteína control ( $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, AGP) (10  $\mu$ M) antes de la adición de grupo hemo 200  $\mu$ M y se cultivaron durante 4 h. Se recogió la suspensión de células, se mezcló con yoduro de propidio y se analizó con FACS.

Figura 17. Reducción de grupos carbonilo en colágeno oxidado mediante  $\alpha_1$ m. Se oxidó el colágeno, recubierto sobre placas de microtitulación, mediante incubación con grupo hemo 50  $\mu$ M durante 17 h. Tras lavar, se añadió  $\alpha_1$ m, ovoalbúmina o ascorbato 0,1, 0,3 ó 1  $\mu$ M, y se incubaron durante 2 h. Se midieron los grupos carbonilo mediante ELISA. Cada columna representa la media de triplicados +/- EE.

Figura 18. La eliminación de grupo hemo celular mediante  $\alpha_1$ m. Se cultivaron células eritroleucémicas humanas (K562) con o bien tampón o bien grupo hemo 10  $\mu$ M durante 30 minutos, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo nuevo. A: Entonces se incubaron las células con  $\alpha_1$ m (2 ó 10  $\mu$ M) durante 2 horas, tiempo tras el que se guardó el medio de cultivo. Se lavaron las células y se solubilizaron suspendiendo en un tampón que contiene NP-40 al 1%. Entonces se analizaron espectrofotométricamente el medio de cultivo y la suspensión celular leyendo los espectros de absorbancia (300-700 nm). B: También se analizaron visualmente los diversos cultivos. Se incubaron las células con o bien tampón o bien grupo hemo 10  $\mu$ M durante 30 min. (etapa 1), se lavaron y entonces se incubaron con tampón,  $\alpha_1$ m 10  $\mu$ M o AGP 10  $\mu$ M durante 2 horas (etapa 2), se lavaron y se solubilizaron tal como se describió anteriormente.

La figura 19 muestra la perfusión *in vitro* de una placenta "sana" durante 120 min. con una disolución de Hb-A (2 mg/ml) en el lado fetal (símbolos blancos) y tampón sólo para el lado materno (símbolos negros) ("1ª perfusión") y durante 120 min. en ambos lados con tampón sólo ("2ª perfusión"). Se tomaron muestras regularmente y se midieron las concentraciones de Hb-A mediante ELISA (diagrama izquierdo), de  $\alpha_1$ m con RIA (diagrama derecho) y de Hb-A fetal con inmunotransferencia de tipo Western (fotografía derecha).

La figura 20 muestra la SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de un complejo de hemoglobina- $\alpha_1$ m aislado del tejido de la placenta. Se homogenizó una placenta de una donante sana y se centrifugó a 100.000 G durante 60 min. Se aplicó el sobrenadante a una columna Affigel anti- $\alpha_1$ m que se enjuagó y se eluyó con glicina 0,1 M-HCl, pH 2,3. Se separó el eluato mediante SDS-PAGE que se tiñó o bien con Coomassie (dos carriles izquierdos) o se transfirió a membranas de PVDF y se inmunotransfirió con anticuerpo anti- $\alpha_1$ m o anti-Hb-A.

La figura 21 muestra el resultado del estudio en Tanzania. Se muestra la hemoglobina total ( $\mu$ g/ml) en la orina antes del parto.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la

invención no pretende limitarse a las condiciones y los detalles específicos descritos en estos ejemplos.

#### Ejemplo 1

##### 5 Detección de ARN de Hb y proteína en placenta

Se realizaron RT-PCR cuantitativa, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para analizar ARNm de Hb $\alpha$ , Hb $\beta$  y Hb $\gamma$  y la expresión de proteína en muestras de placenta en sujetos con PE frente a control.

##### 10 Recogida de muestras

Se recogió tejido placentario en el Department of Obstetrics and Gynaecology, Lund University Hospital. La toma de muestras, realizada con consentimiento por escrito, se aprobó por la Junta de Revisión del Comité Ético para estudios en sujetos humanos. Se incluyeron en el estudio tejido placentario de 10 embarazos preeclámpicos, 15 normales, 5 pacientes con incisura bilateral y 5 pacientes con incisura bilateral así como preeclampsia. También se recogieron muestras de lecho placentario (véase a continuación) de 5 de las pacientes con PE y 5 de los controles. Se definió preeclampsia como tensión arterial > 140/90 mmHg y proteinuria > 0,3 g/l. Se excluyeron pacientes con hipertensión esencial u otras enfermedades sistémicas. Se recogieron muestras de placenta en el nacimiento, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C.

##### 20 Toma de muestras y manipulación de tejido

Se recogieron muestras de la placenta inmediatamente tras el parto. Se extrajo un cubo de 10x10x10 mm de tejido veloso de la parte central de la placenta evitando áreas macroscópicas de necrosis e infarto. Se extrajeron cubos de 10x10x10 mm de tejido miometrial de mujeres que se sometieron a cesárea. Se congelaron inmediatamente las muestras en nieve carbónica, y se almacenaron a -80°C hasta que se extrajo el ARN. No se descongeló el tejido antes de la extracción de ARN o crioseccionamiento para garantizar la integridad de ARN más alta posible.

##### 30 Extracción de ARN

Se extrajo ARN total a partir de tejido congelado usando Trizol® (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se retiraron proteoglicano y polisacárido realizando una precipitación con alto contenido en sal con citrato de sodio 0,8 M y cloruro de sodio 1,2 M. Se determinó la integridad de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% desnaturizante con formalina al 6,7% y 1X tampón MOPS. Se almacenaron muestras en agua libre de ARNasa a -80°C hasta su uso. Antes del uso se precipitaron las muestras una vez más y se lavaron con etanol al 70% para eliminar residuos de Trizol.

##### 40 Amplificación mediante PCR en tiempo real

Se sintetizó ADNc con transcriptasa inversa según protocolos de Applied Biosystems. Se usó una reacción de 50  $\mu$ l que contenía 0,5  $\mu$ g de ARN total, 1X tampón TaqMan RT, MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM, dNTP 500  $\mu$ M, hexámeros al azar 2,5  $\mu$ M, inhibidor de ARNasa 0,4 U/ $\mu$ l y transcriptasa inversa MultiScribe 1,25 U/ $\mu$ l. Se incubaron las reacciones a 25°C durante 10 minutos, a 48°C durante 30 minutos y finalmente 5 minutos a 95°C. Se almacenaron las muestras a -20°C hasta el análisis.

Se sometieron a ensayo transcritos génicos por medio de PCR en tiempo real usando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems). Se diseñaron cebadores y sondas usando el programa de software Primer Express® o se ordenaron de Assays on-Design/Demand™ (Applied Biosystems). Los cebadores seleccionaron como diana diferentes exones de los genes de interés para evitar la amplificación del ADN genómico contaminante. Se llevaron a cabo reacciones en un volumen final de 25  $\mu$ l que contenía: 1 x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), sonda 0,25  $\mu$ mol/l, 0,9  $\mu$ mol/l de cebadores directo e inverso respectivamente, y 1  $\mu$ l de 10 ng/ $\mu$ l de una alícuota de ADN. Se iniciaron las condiciones de ciclación térmica mediante activación de UNG a 50°C durante 2 minutos y una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos. Entonces se ejecutaron 40 ciclos: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto. Se incluyeron dos controles negativos sin molde en cada conjunto de amplificaciones. Se usó  $\beta$ -actina como referencia para normalizar la señal de la muestra. Se logró la cuantificación realizando una curva de calibración usando diluciones de 4 veces en serie de ADN de molde (0,08-80 ng). Se expresan los resultados como razones con  $\beta$ -actina como el denominador.

##### 60 Hibridación *in situ* (ISHH)

Se realizaron las hibridaciones tal como se describió anteriormente en [Hansson *et al.*, 2005]. Se montaron por descongelación secciones de criostato en portaobjetos sialinizados, que se almacenaron a -80°C hasta que se usaron. Se empleó tejido congelado reciente para maximizar la detección de ARNm. Se fijaron las secciones, se deshidrataron, se dilipidaron y se hibridaron tal como se describió anteriormente [Bradley *et al.*, 1992]. Se llevaron a cabo hibridaciones durante 20-24 horas a 55°C con 2x10<sup>6</sup> cpm de sonda de 35S-ARNc desnaturizada por 80  $\mu$ l de

tampón de hibridación (Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, formamida al 50%, sulfato de dextrano al 10%, 1x ARNt de levadura 25 mg/ml de Denhardt, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, ARN de levadura total 250 µg/ml (fracción XI, Sigma), ditioneitol 150 mM (DTT), tiosulfato de sodio (NTS) al 0,15% y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,15%. Tras los lavados, se colocaron los portaobjetos en Kodak Hyperfilm Biomax MR durante 2 días, tras lo cual se recubrieron con emulsión nuclear (NTB-3, Kodak). Se expusieron los portaobjetos durante 3 (Hb $\alpha$ 2, Hb $\gamma$ 2) o 4 (Hb $\beta$ ) semanas respectivamente a 4°C, tras lo cual se revelaron en Dektol (Kodak), se fijaron y se contratiñeron con un tinte Giemsa.

#### Inmunohistoquímica

Se fijaron secciones congeladas recientes de 14 µm de espesor de las muestras de placenta mediante inmersión en formaldehído tamponado al 4% durante 10 min. a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las secciones en una disolución de bloqueo (Powerblock; Zymed) durante 30 minutos a TA. Tras los lavados con PBS se transfirieron las secciones a una dilución 1:500 de un anticuerpo anti-Hb fetal humana (Bethyl Laboratories) que se preparó en ovejas. Tras una hora de incubación a TA se aclararon las secciones y se transfirieron a una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti-CY3 de oveja preparado en burro (Jackson laboratories) durante una hora a TA. Entonces se aclararon las secciones, se cubrieron con Tris 0,1 M y se visualizaron con un microscopio fluorescente invertido Leica DMA 6000. Se tomaron fotografías usando el software Volocity.

#### Resultados

La figura 4 muestra la cuantificación mediante PCR en tiempo real de Hb $\alpha$ , Hb $\gamma$  y Hb $\beta$  en la placenta. Todos los valores se normalizan frente a la cantidad de  $\beta$ -actina y se presentan como gráficos de dispersión. (A) Expresión de ARNm de Hb $\alpha$  en la placenta. Se encontraron cambios significativos entre PE frente a los controles (p=0,004) y entre PE\incisura (PE con incisura) frente a los controles (p=0,03). (B) Valores de ARNm relativos a Hb $\gamma$  que muestran cambios significativos entre PE frente a los controles (p=0,003) y entre PE\incisura frente a los controles (p=0,03). (C) Hb $\beta$  mostró sobreexpresión significativa en PE frente a los controles (p=0,02) y en PE\incisura frente a los controles (p=0,04).

Para resumir, se encontró que los niveles de ARNm de Hb $\alpha$  (p=0,004), Hb $\gamma$  (p=0,003) y Hb $\beta$  (p=0,02) estaban significativamente aumentados en muestras de PE frente a los controles (figura 4 A, B, C) y también en muestras de PE con incisura en comparación con los controles (Hb $\alpha$  p=0,02, Hb $\gamma$  p=0,03 y Hb $\beta$  p=0,04). (No se representó Hb $\beta$  en la matriz, pero se examinó debido a los cambios detectados en Hb $\alpha$  y Hb $\gamma$ .)

La figura 5 muestra resultados de hibridaciones *in situ* de muestras de placenta y de lecho placentario. Muestra imágenes de la placenta humana que muestran la sección vellosa (V) de la placenta y debajo una sección de lecho placentario (M) con arterias espirales (S) entre ellos. (A) Imagen de campo claro de la expresión de ARNm de Hb $\alpha$  en una muestra de placenta preecláptica representativa. Se observó especialmente la expresión de Hb $\alpha$  en y alrededor de los vasos sanguíneos. Sin embargo, también se observan varias células dispersadas en el espacio intervelloso. (B) Imagen de campo oscuro de la misma sección. (C) Imagen de campo oscuro de la expresión de ARNm de Hb $\alpha$  de una placenta control representativa. En comparación con placentas con PE, las placentas control muestran menos células que expresan Hb $\alpha$  en el espacio intervelloso. (D) Imagen de campo claro de una muestra miometrial representativa de una paciente con PE. Sólo se observa la expresión de Hb $\alpha$  en las arterias espirales, no se observa expresión en el tejido miometrial. (E) La misma sección miometrial en el campo oscuro. (F) Una muestra miometrial de una placenta control. La expresión de ARNm de Hb $\alpha$  es similar a la expresión observada en el miometrio de PE.

Para resumir, la hibridación *in situ* reveló células que expresaban Hb $\alpha$  y Hb $\gamma$  nucleadas que estaban dispersadas por todo el espacio intervelloso tanto en muestras con PE como control. Las placentas de pacientes con PE parecían tener más células que contenían Hb que las muestras control (Hb fetal), y las señales por célula parecieron ser más intensas que en los controles. En varias de las muestras estudiadas, las células positivas para Hb estaban asociadas con las paredes de los vasos sanguíneos, con varias células libres en la luz. Se encontraron muchas células individuales en el espacio intravelloso. Basándose en su morfología, ubicación y distribución, no son trofoblastos.

La figura 6 es una imagen representativa de la expresión de la proteína Hb $\gamma$  en la placenta. Se muestra la expresión de proteína con un marcador fluorescente rojo. En la placenta con PE hay una expresión fuerte de Hb $\gamma$  en la luz (lu) vascular, pero también se expresa Hb $\gamma$  en el endotelio vascular (flecha) (A). Sin embargo, la placenta de controles normotensivos no mostró expresión de Hb $\gamma$  en la luz vascular (B) pero Hb $\gamma$  (es decir hemoglobina fetal libre) se expresa en el endotelio vascular (flecha). Las barras de escala en las imágenes son de 25 µm.

Para resumir, se detectó expresión de Hb $\gamma$  especialmente dentro de la luz de vasos sanguíneos placentarios en muestras de placenta con PE pero también cerca de las células endoteliales en las paredes vasculares. Las muestras de placenta control mostraron la expresión de Hb $\gamma$  en el endotelio vascular, sin expresión en la luz

vascular.

Discusión

5 La RT-PCR cuantitativa mostró una expresión aumentada de ARNm de Hb $\alpha$  y Hb $\gamma$  en PE frente a los controles. La hibridación *in situ* mostró un número aumentado de células que expresan Hb en muestras de la placenta con sujetos con PE frente a control. El hecho de que las células que expresan Hb estaban ubicadas en asociación con las paredes del los vasos puede indicar o bien que las células están migrando al interior o al exterior de los vasos, o bien que hay sitios de unión en las paredes de los vasos para estas células. El hecho de que los vasos miometriales son pobres en células nucleadas que expresan ARNm de Hb frente a los vasos placentarios, que son ricos en las mismas, sugiere que estas células no pueden ser de origen materno. Este hallazgo de que ARNm de Hb $\gamma$  (fetal) está presente en las células positivas para Hb placentaria, así como el número menor de células que expresan Hb en la luz de vasos sanguíneos miometriales, indica que son las células fetales las que son responsables de la expresión de Hb aumentada observada en placentas con PE y en la sangre.

15 Si las células que producen Hb fetal que se han descrito se renuevan rápidamente, pueden liberar altos niveles de grupo hemo en el espacio extravascular y los vasos sanguíneos placentarios. De hecho, la inmunohistoquímica muestra altos niveles de hemoglobina en la luz de vasos sanguíneos de placenta con PE. La placenta control, por otro lado, no mostró liberación de hemoglobina en los vasos sanguíneos. Para empeorar las cosas, la hemólisis en áreas necróticas y trombóticas de la placenta con PE puede añadirse a la cantidad de grupo hemo libre en las mismas.

20 El grupo hemo libre es un agente redox potente que puede provocar daño grave a través de la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El grupo hemo oxida varios lípidos incluyendo lipoproteínas de baja densidad (LDL), convirtiéndolas en peróxidos citotóxicos que provocan daño endotelial. Además, el grupo hemo puede dañar directamente las membranas celulares rompiéndolas y oxidando proteínas de membrana conduciendo a permeabilidad de membrana aumentada y citólisis.

25 Por tanto, la infiltración de la placenta en grandes números de células positivas para Hb (es decir células fetales) es un signo de preocupación. El grupo hemo liberado de estas células podría ser muy perjudicial y puede ser responsable de gran parte de la patología placentaria asociada con PE.

30 En conclusión, sin querer restringirse a ninguna teoría, se cree que estos hallazgos sugieren que los genes de Hb se sobreexpresan en una subpoblación de células en la placenta preecláptica. La producción de agentes que estimulan hematopoyesis mediante células placentarias en respuesta a perfusión reducida y posiblemente hipoxia local puede contribuir a la formación, reclutamiento y distribución de las células. Aunque parecen estar presentes en la placenta de sujetos que tuvieron embarazos normales, su aumento en la placenta de pacientes con PE es un motivo de preocupación. Si se renuevan rápidamente y liberan su Hb (y grupo hemo) excesivamente, pueden dañar a estructuras adyacentes incluyendo el endotelio vascular.

35 Ejemplo 2

Detección de Hb fetal en la sangre materna

40 Se realizó RT-PCR cuantitativa para analizar ARNm de Hb $\gamma$  en muestras de sangre en sujetos con PE.

PCR en tiempo real

45 Se extrajo ARN usando el minikit de ARN viral QIAamp (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezclaron 3,6 ml de tampón de AVL con 36  $\mu$ l de portador-ARN (Qiagen) invirtiendo el tubo 10 veces. Se centrifugó 1 ml de la muestra de plasma a 1150 g durante 10 minutos. Se añadieron 900  $\mu$ l del plasma y 3,6  $\mu$ l de etanol al 99% a la disolución de tampón de AVL. Se añadieron aproximadamente 650  $\mu$ l de la disolución a una columna QIAamp y se centrifugaron a 6000 g durante 1 minuto. Se repitió esto hasta que se ha añadido el volumen de plasma total a la columna. Se lavó la columna una vez con tampón AW1, entonces se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto, seguido por un lavado con tampón AW2, entonces se centrifugó a 20.000 g durante 3 minutos. Se eluyó el ARN con 50  $\mu$ l de agua libre de ARNasa.

50 Se cuantificó ARN de Hb fetal con PCR en tiempo real.

55 Resultados

60 La figura 7 muestra un gráfico de dispersión de niveles de ARNm de Hb $\gamma$  fetal en el plasma materno tomado antes del parto de mujeres con PE cuantificado mediante PCR en tiempo real. El gráfico muestra el valor de Ct en el eje izquierdo, proporcionando una estimación de la cantidad de niveles de ARNm de Hb $\gamma$  en la muestra. Esta muestra que no sólo es posible medir los niveles de proteína de hemoglobina y en muestras de sangre materna, sino también

las cantidades de ARNm.

Ejemplo 3

5 Obtención de perfiles de expresión de proteína de la placenta preecláptica usando electroforesis en gel 2D

Con el fin de examinar proteínas expresadas de manera diferencial en la placenta con PE en comparación con placentas control, se recogieron muestras de placenta en el parto de mujeres con PE (n=30) y controles sanos (n=30). Usando tecnología proteómica (electroforesis en gel bidimensional) se compararon los niveles de expresión de hemoglobina delta (Hbδ) en las diferentes muestras de placenta.

Pacientes y recogida de muestras

15 Se incluyeron 60 mujeres admitidas en el Department of Obstetrics and Gynaecology, Lund University Hospital, y se asignaron a dos grupos; PE (n=30) y control (n=30) (tabla 2). Se definió PE como tensión arterial de >140/90 mmHg y proteinuria de >0,3 g/l o aumento en la tensión arterial por encima de 20 mmHg desde el primer trimestre de embarazo. Se extrajo inmediatamente un cubo de 10x10x10 mm de tejido placentario tras la extracción de la placenta. Se congelaron las muestras inmediatamente en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C. Se excluyeron del estudio las pacientes con otras enfermedades sistémicas. El estudio se aprobó por la Junta de Revisión del Comité Ético para estudios en sujetos humanos, y todas las mujeres proporcionaron sus consentimientos informados por escrito.

Tabla 2

	Control	PE
n	30	30 ns
Edad materna (años)	31,7 ± 5,2	30,9 ± 5,3 ns
Edad gestacional (días)	271,3 ± 10,8	266,6 ± 11,2 ns
Tensión arterial sistólica (mmHg)	116,3 ± 11,3	149,8 ± 12,1†
Tensión arterial diastólica (mmHg)	67,3 ± 4,4	103,3 ± 7,9†
Proteinuria (g/L)	ND	1,4 ± 2,0†
Peso de la placenta (g)	686,8 ± 144,8	630,9 ± 128,0 ns

PE = Preeclampsia

ND = No detectado

ns – sin diferencia significativa entre los grupos

† La prueba de Mann-Whitney mostró una significancia de p < 0,0001 entre los grupos

25

Extracción de proteína

Se extrajo proteína usando Trizol® (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. En resumen, se homogenizó tejido placentario en Trizol en hielo y entonces se centrifugó a 12000 g durante 10 min. a 4°C. Se separó la fracción de proteína usando cloroformo y se precipitó usando 2-propanol. Se lavó el sedimento de proteína tres veces en 1,5 ml de clorhidrato de guanidina 0,3 M y una vez en 1,5 ml de etanol al 75%. Se disolvieron los sedimentos de urea 0,8 M y chaps al 2% y se midió la concentración de proteína usando un procedimiento espectrofotométrico. Se almacenaron las proteínas a -20°C hasta su uso.

35 Precipitación de proteína

Antes del isoelectroenfoque (IEF), se precipitaron muestras con acetona para inactivar enzimas proteolíticas, para retirar sal y las sustancias de interferencia. Se mezcló la proteína extraída de cada placenta, 400 µg, con acetona enfriada con hielo hasta concentración final de acetona al 80%. Se incubaron las muestras durante 1 h a -20°C seguido por centrifugación a 9000 x g durante 2 min. Se retiró la acetona y se dejaron secar al aire los sedimentos de proteína.

Electroforesis en gel bidimensional

45 Se rehidrataron tiras secas Immobiline (180 x 3 x 0,5 mm, pH 3-10 NL, GE Healthcare Life Sciences) en 350 µl de la disolución de solubilización que contenía urea 8 M, CHAPS al 2%, ditiotretol 10 mM (DTT) y tampón IPG 3-10 al 2% junto con 400 u 800 µg de muestras a temperatura ambiente durante la noche. Se realizó la etapa de IEF a 20°C usando un sistema Multiphor II y se ejecutó según el siguiente programa: (1) 150 V durante 1 h, (2) 300 V durante 3 h y (3) 3000 V hasta que se alcanzaron aproximadamente 60.000 vhrs. Se equilibraron las tiras durante 10 min. en una disolución que contenía DTT 65 mM, urea 6 M, glicerol al 30% (p/v), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% (p/v) y Tris-HCl 50 mM pH 8,8. También se llevó a cabo una segunda etapa de equilibrio durante 10 min. en la misma disolución excepto por DTT, que se reemplazó por yodoacetamida 259 mM. Se empaparon las tiras en tampón de electroforesis (base Tris 24 mM, glicina 0,2 M y SDS al 0,1%) justo antes de la segunda dimensión. Se aplicaron las

50

tiras a gel de plano Duracryl homogéneo al 12,5% (240 x 190 x 1 mm, o 290 x 245 x 1 mm). Se recubrieron las tiras con una disolución de agarosa al 1% en tampón de electroforesis (mantenido a 60°C). Se llevó a cabo la electroforesis o bien usando un aparato de gel Hoefer DALT (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EE.UU.) a 20°C y 80 V constantes durante 19 h o bien usando un aparato de gel usando el mismo tampón de electroforesis que anteriormente y ejecutando a 20°C a 18 mA hasta que el frente del tinte alcance la parte inferior del gel. El tiempo de ejecución fue de aproximadamente 17 h.

#### Tinción del gel

Se tiñeron los geles con plata, y tras la tinción se secaron los geles usando un secador de geles (Slab gel Dryer SGD2000, Savant)

#### Análisis de puntos

Se barrieron los geles usando CanoScan 9950F (Canon). Se realizó el análisis de puntos usando el sistema de análisis de gel bidimensional PDQUEST (versión 7.1.0) (Bio-Rad discovery series, Bio-Rad Laboratories, Sundbyberg, Suecia).

#### Identificación por espectrometría de masas

Se lavaron los puntos de interés con 0,5 ml de agua Milli-Q durante 1 h seguido por cuatro lavados de 0,5 ml de acetonitrilo (ACN) al 40% en bicarbonato de amonio 25 mM durante 30 minutos cada uno. Entonces se secaron los trozos de gel en un concentrador SpeedVac antes de que se degradasen las proteínas en fragmentos característicos con tripsina (calidad para secuenciación, Promega) en bicarbonato de amonio 25 mM durante la noche a 37°C. Se terminó la digestión mediante la adición de 20 µl de ácido trifluoroacético al 2%, lo que también extrajo los péptidos del gel. Tras 2 horas a temperatura ambiente se purificaron los péptidos a partir del tampón de digestión usando C18 Ziptips (Millipore). En resumen, se condicionó la fase sólida usando 2 x 10 µl de ACN al 50%, TFA al 0,1% en agua Milli-Q. Se eliminó el disolvente orgánico mediante lavado con dos lavados de 10 µl de TFA al 0,1%. Se aspiraron las muestras y se dispensaron varias veces seguido por dos lavados de TFA al 0,1% para eliminar las sales y el material no unido. Se eluyeron los péptidos purificados directamente sobre la diana de muestra (Anchorchip target, Bruker Daltonik) en la que se habían añadido 0,7 µl de matriz, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (3 mg/ml en ACN al 30%). Se registraron espectros de masa de iones cargados positivamente en un instrumento Bruker Reflex III (Bruker Daltonik) que se hizo funcionar en el modo reflector. Se acumuló un total de 160 - 210 espectros de disparo individual de cada muestra. Se usaron los paquetes de software XMASS 5.0 y MS Biotools proporcionados por los fabricantes para el procesamiento de datos. Se usaron los productos de auto-proteólisis conocidos de la tripsina para la calibración interna.

#### Análisis de EM/EM

A partir de cada uno de los extractos peptídicos, se transfirieron 0,5 µl directamente sobre una diana MALDI de acero inoxidable y se dejaron secar. Se añadieron 0,5 µl de una disolución de matriz que contenía ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico 5 mg/ml, acetonitrilo al 50%, TFA al 0,1% y ácido cítrico 50 mM y se dejaron secar. Se adquirieron espectros MALDI-TOF-EM y EM/EM usando un espectrómetro de masas 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, CA, EE.UU.) en modo reflector positivo. Se calibraron internamente los espectros EM obtenidos usando dos péptidos de autoproteólisis de tripsina con los valores de m/z 842,51 y 2211,097. Se realizó la identificación de proteína usando el software GPS Explorer, con un motor de búsqueda Mascot interno (Matrix Science, Londres, RU) {Perkins, 1999 n.º 132} buscando en la base de datos no redundante de NCBI. Los parámetros especificados en la búsqueda fueron: taxón, mamíferos; ausencia de escisiones, 1; tolerancia de masa de péptido, +/- 30 ppm; tolerancia de masa de iones de fragmento, +/- 0,15 Da; modificaciones variables, ninguna.

#### Búsqueda en base de datos

Para la identificación de proteína, se buscaron secuencias de proteínas humanas en la base de datos de NCBI usando los software ProFound Peptide Mapping (versión 4.10.5, The Rockefeller University Edition) y Mascot (Matrix Science Ltd).

#### Inmunotransferencia de tipo Western

Se ejecutó inmunotransferencia de tipo Western en geles Bis-Tris al 12% (Invitrogen, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se cargaron 20 µg de proteína con 2,5 ml de tampón de muestra de LDS (Invitrogen, EE.UU.) en el gel y se ejecutó durante 50 min. a 200 V en 1x tampón de ejecución MOPS. Tras la electroforesis se transfirió el gel a una membrana de PDVF (Bio-Rad, EE.UU.) durante 1 h a 30V, tras lo cual se incubó la membrana con solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía Tween20® al 0,1% (ICN Biomedicals Inc., Ohio, EE.UU.) y leche en polvo al 2% (Bio-Rad, EE.UU.) durante la noche a 4°C.

Se incubó la transferencia con anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón primario (anti-H<sub>β</sub> humana (diluido 1:8000 en TBST con leche en polvo al 2%)) (Nordic Biosite AB, Suecia) durante 1 h, tras lo cual se lavó la membrana una vez durante 15 min. en TBST y 3x5 min. en TBS-T. Tras los lavados, se incubó la transferencia con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG1 de ratón-HRP (diluido 1:5000 en TBS-T) (SDS Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) durante 1 h, tras lo cual se lavó la membrana como anteriormente. Posteriormente, se expuso la membrana a quimioluminiscencia potenciada ECL+ (GE Healthcare Biosciences, RU) durante 3 min. Se aplicó una película autorradiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham, EE.UU.) a la transferencia durante 1 minuto para obtener una exposición satisfactoria.

#### 10 Extracción de ARN

Se extrajo ARN total según las instrucciones del fabricante usando RNEasy (Qiagen) de 10 muestras con PE y 10 muestras control de las mismas pacientes que anteriormente. En resumen, se homogenizaron las muestras de placenta usando TissueLyzer en un tampón de lisis RNEasy (RLTbuffert y β-mercaptoetanol) (Qiagen). Se precipitaron las muestras en etanol al 70% y entonces se separaron usando mini columnas RNEasy según el protocolo del fabricante. Se eluyeron muestras en 50 μl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa.

#### PCR en tiempo real (igual que anteriormente)

20 Se sintetizó ADNc usando transcriptasa inversa según el protocolo del fabricante (Applied Biosystems). En resumen, se usó una mezcla de reacción de 50 μl (0,5 μg de ARN total, 1 x tampón TaqMan RT, MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM, dNTP 500 μM, hexámeros al azar 2,5 μM, inhibidor de ARNasa 0,4 U/μl y transcriptasa inversa MultiScribe 1,25 U/μl). Se incubaron las reacciones a 25°C (10 min.), a 48°C (30 min.) y finalmente a 95°C (5 min). Se almacenaron las muestras a -20°C hasta el análisis.

25 Se cuantificaron transcritos génicos adquiridos por medio de RT-PCR cuantitativa usando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems). Se ordenaron cebadores y sondas para TF (ID de ensayo: Hs00169070m1) y Hbδ (ID de ensayo: Hs00426283m1) de Assays-on-Demand™ (Applied Biosystems). Los cebadores recubrieron al menos un límite de exón para evitar la amplificación de ADN genómico contaminante. Se llevaron a cabo las reacciones en un volumen final de 25 μl que contenía concentraciones finales: 1x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), sonda 0,25 μmol/l, 0,9 μmol/l de cebadores directo e inverso respectivamente, y 2,2 μl de alícuota de ADN. Se inició la ciclación térmica mediante activación de UNG a 50°C durante 2 minutos y una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos. Tras la desnaturalización, se ejecutaron 40 ciclos: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto. Se incluyeron dos controles negativos, que no contenían molde, en cada conjunto de amplificaciones. Se usó β-actina como referencia para normalizar la señal de la muestra. Se logró la cuantificación haciendo una curva de calibración usando diluciones en 4 veces en serie del ADN de molde (0,08-80 ng). Se expresan los resultados como razones con β-actina como denominador.

#### Hibridación *in situ* (igual que anteriormente)

40 Se realizó la hibridación *in situ* en 18 muestras de PE y 19 muestras control. Se montaron por descongelación secciones de criostato en portaobjetos sialinizados, que se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se usó el tejido congelado reciente con el fin de maximizar la detección de ARNm. Se fijaron las secciones, se deshidrataron, se dilipidaron y se hibridaron. Se llevó a cabo la hibridación durante 20-24 horas en 55°C con 2x10<sup>6</sup> cpm de sonda de 35S-ARNc desnaturalizada por 80 μl de tampón de hibridación (Tris 20 mM-HCl (pH 7,4), EDTA 1 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, formamida al 50%, sulfato de dextrano al 10%, 1x ARNt de levadura 25 mg/ml de Denhardt, ADN de esperma de salmón 100 μg/ml, ARN de levadura total 250 μg/ml (fracción XI, Sigma), DTT 150 mM, tiosulfato de sodio (NTS) al 0,15% y SDS al 0,15%. Tras los lavados, se colocaron los portaobjetos en Kodak Hyperfilm Biomax MR durante 2 días, tras lo cual se recubrieron con emulsión nuclear (NTB, Kodak). Se expusieron portaobjetos durante 4 semanas a 4°C, tras lo cual se revelaron en Dektol (Kodak), se fijaron y se contratiñeron con un tinte Giemsa.

#### Resultados

55 Se separaron las proteínas de placenta extraída mediante 2D-PAGE para estudiar las diferencias en la expresión de proteína entre pacientes con PE y controles sanos. En la primera configuración experimental, se cargaron 400 μg de las muestras a la tira IPG y se ejecutó la segunda dimensión usando el aparato de gel Hoefer DALT. Sólo un punto se presentó de manera diferencial entre los dos grupos. Con el fin de identificar el punto, se cargaron 800 μg de muestras en los geles, y se ejecutaron un total de cuatro muestras, dos muestras de PE y dos de control. Para el análisis cualitativo se ejecutó la segunda dimensión. Al hacer esto, se detectó a simple vista un segundo punto expresado de manera diferencial en las muestras de PE (figura 8). Se extrajeron los dos puntos de proteína de interés mediante perforación de los geles, se digirieron enzimáticamente y se identificaron usando MALDI-TOF EM. Se identificó la primera proteína como transferrina y la segunda como hemoglobina.

65 No fue posible establecer la subclase de hemoglobina con los datos de MALDI. Por tanto se sometió adicionalmente

este punto a análisis de secuencia usando análisis de EM-EM. Los datos de EM-EM mostraron que las secuencias obtenidas pertenecían a la cadena delta de hemoglobina (Hb $\delta$ ). De acuerdo con el análisis de proteína, la PCR en tiempo real también mostró una expresión génica significativamente aumentada para Hb $\delta$  en las placentas con PE ( $p=0,04$ ) frente a los controles (figura 9).

La hibridación *in situ* mostró células individuales que expresaban ARNm de Hb $\delta$  en todo el espacio intravelloso. Se observaron particularmente células que expresaban ARNm de Hb $\delta$  en y alrededor de vasos sanguíneos de la placenta. Las placentas con PE parecían tener células más dispersadas fuera de los vasos que expresaban ARNm de Hb $\delta$  que los controles. No se detectó ninguna señal en las células de trofoblastos. Se ocultó la morfología celular de las células que expresaban Hb $\delta$  mediante los granos plateados que recubrían las células positivas (figura 10).

#### Discusión

Los presentes hallazgos soportan la hematopoyesis placentaria, demostrando en el presente documento la expresión aumentada de proteína Hb $\delta$ , así como la correspondiente expresión génica, en PE.

En la placenta, los niveles aumentados de ARNm de Hb $\delta$  se traducen en la proteína que en el presente documento se muestra que se acumula en la placenta con PE. Sin embargo, no es cierto que las cadenas de Hb que se producen se dispongan en moléculas de Hb funcionales con anillos de porfirina unidos e ión Fe. El transporte y la captación celular de hierro se facilita mediante transferrina (TF). Estos geles 2D en este caso también muestran que la placenta con PE carece de TF intracelular. Esta falta de proteína TF en la placenta con PE puede reflejar un transporte de hierro alterado en la población celular que expresa Hb $\delta$ . Por tanto, las células que producen Hb pueden por lo tanto ser deficientes en su suministro de hierro, conduciendo a la acumulación de cadenas de Hb y/o moléculas de Hb disfuncionales en la placenta con PE. De manera interesante, no hubo acumulación de hemoglobina en las placentas control aunque la hibridación *in situ* mostró la expresión de ARNm para Hb $\delta$ . La placenta sana, a diferencia de la placenta con PE, puede regular la producción de Hb o bien mediante la regulación de la traducción de ARNm, degradación de proteína, o simplemente por ser un sitio extramedular de hematopoyesis. La síntesis de Hb defectuosa puede conducir a eritroblastos defectuosos, estos serán entonces menos resistentes y se separarán más fácilmente, lo que a su vez conduce a más Hb libre.

#### Ejemplo 4

##### Detección de la expresión de ARN de HLA-DPA1

Se realizó RT-PCR cuantitativa para analizar la expresión de ARN de HLA-DPA1.

Se realizó la recogida de muestras; la toma de muestras y manipulación de tejido; la extracción de ARN; y la amplificación mediante PCR en tiempo real tal como se describió en el ejemplo 1 con modificaciones necesarias.

#### Resultados

El complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP alfa 1 (HLA-DPA1) estaba regulado por incremento de manera significativa en el grupo con incisura en comparación con todos los demás grupos ( $p = 0,01$  frente a PE sin incisura,  $p = 0,02$  frente a PE con incisura, y  $p = 0,01$  frente al control) (véase la figura 4 D).

#### Discusión

Las mujeres con diagnóstico de incisura corren un riesgo más alto de desarrollar PE posteriormente en sus embarazos. Sin embargo, el hecho de que no todas las mujeres con incisura desarrollan PE implica que pueden expresar genes que protegen o reprimen los genes que las dañan. Tanto la micromatriz como qPCR mostraron expresión aumentada de HLA-DPA1 en el grupo con incisura frente a todos los demás grupos. HLA-DPA1 es parte de la familia del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, miembros de la cual son responsables de presentar antígenos foráneos como parte de la respuesta inmunitaria adaptativa. Sólo moléculas de CMH de clase I, tipos G y E de HLA, se expresan en células de trofoblastos. Se piensa que se alteran la respuesta inmunitaria materna en el límite feto-madre, que protege al feto de una respuesta inmunitaria materna. Por tanto HLA-DPA1, una molécula de CMH de clase II, puede no prepararse por trofoblastos. En vez de eso, puede ser una reacción materna a la presencia de células fetales en la placenta.

Se sabe que las células fetales entran en la circulación materna durante el embarazo, y sus niveles aumentan en el transcurso de un embarazo normal lo que sugiere un flujo continuo de células fetales a través de la barrera placentaria y al interior del sistema materno. En PE, el número de células fetales en la circulación materna está aumentado frente a los embarazos normotensivos. Tal como se observó anteriormente, la expresión aumentada de HLA-DPA1 en el grupo con incisura sugiere que el sistema inmunitario materno puede estar reaccionando frente a antígenos "foráneos" en la placenta, específicamente, las células fetales en la misma. Por tanto, HLA-DPA1 puede contribuir a la construcción de una barrera inmunológica que previene que entren células fetales en los sistemas

maternos identificando las células y marcándolas para su destrucción. Si las células que expresan Hb observadas en los experimentos son de origen fetal, HLA-DPA1 también puede prevenir que estas células se escapen al interior de la placenta, protegiendo de ese modo la placenta frente a una producción en exceso de hemoglobina y grupo hemo libre.

5

### Ejemplo 5

Concentraciones de hemoglobina y  $\alpha_1$ -microglobulina en plasma y orina. antioxidación mediante  $\alpha_1$ -microglobulina y perfusión de placenta *in vitro*

10

#### Materiales y métodos

##### Hemoglobina

15 Se adquirió hemoglobina de Sigma. Se preparó oxihemoglobina-A en el laboratorio tal como sigue. Se aislaron glóbulos rojos de 50 ml de sangre humana mediante centrifugación (1200 xg, 10 minutos) y se lavaron 4 veces con 10 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato 10 mM, pH 7,4; NaCl 120 mM y KCl 3 mM). Entonces se lisaron las células sanguíneas mediante resuspensión en tampón hipotónico (20 volúmenes de H<sub>2</sub>O:1 volumen de PBS) en hielo. Se separaron las membranas del citosol mediante centrifugación (14000 xg, 20 minutos) y se dializó el sobrenadante 3 veces frente a Tris-HCl 15 mM, pH 8,0 a 4°C. Se empaquetaron doscientos ml de DEAE-Sephadex A-50 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) en una columna y se aplicó el sobrenadante dializado al gel y se separó mediante un gradiente que consistía en Tris-HCl 15 mM, pH 8,0 y Tris-HCl 15 mM, pH 8,0 + NaCl 0,2 M. Se recogieron fracciones y se midió la absorbancia a 280 nm, 577 nm y 630 nm para identificar y determinar la concentración de oxihemoglobina-A. Se preparó oxihemoglobina F a partir de sangre de cordón umbilical humano usando el mismo protocolo.

25

##### Proteínas y anticuerpos

30 Se expresó  $\alpha_1$ -microglobulina ( $\alpha_1$ m) humana recombinante en *E.coli*, se purificó y se replegó tal como se describe [Kwasek *et al.*, 2007]. Se adquirieron inmunoglobulina de conejo anti-ratón, anticuerpo de conejo anti-hemoglobina e inmunoglobulina porcina anti-conejo-fosfatasa alcalina (ALP) de Dako (Dinamarca). Se adquirió anticuerpo monoclonal de ratón anti-cadena gamma de hemoglobina de Santa Cruz Biotechnologies Inc (n.º de cat. sc-21756). Se prepararon anticuerpo de conejo anti- $\alpha_1$ m humana e inmunoglobulina de cabra anti-conejo tal como se describe, respectivamente [Elbashir *et al.* 1990, Björck *et al.* 1977]. Se prepararon anticuerpos de ratón monoclonales frente a  $\alpha_1$ m humana (BN11.10) tal como se describe [Babiker-Mohamed *et al.*, 1991].

35

##### Marcaje con yodo

40 Se marcaron las proteínas con <sup>125</sup>I (Bio-Nuclear AB, Estocolmo, Suecia) usando el método cloramina-T [Greenwood *et al.*, 1963]. Se separaron las proteínas marcadas de yoduro libre mediante filtración de gel en columna Sephadex G-25 (PD-10, GE Healthcare). Las actividades específicas fueron de aproximadamente 0,3 MBq por  $\mu$ g de proteína para  $\alpha_1$ m y 0,5 MBq por  $\mu$ g de proteína para inmunoglobulinas.

40

##### Pacientes y toma de muestras

45 Se recogieron muestras de placenta y sangre de mujeres admitidas en el Lund University Hospital (30 controles, 30 con PE). Se tomaron muestras con consentimiento por escrito y se aprobó por la Junta de Revisión del Comité Ético de Suecia. Se definió preeclampsia como una tensión arterial por encima de 140/90 mmHg y proteinuria por encima de 0,3 g/l [Milne, 2005 n.º 89]. Sólo se tomaron muestras de pacientes con incisura bilateral para el grupo con incisura sin PE. Se extrajo un cubo de 10x10x10 mm de tejido veloso tras el parto y se colocó inmediatamente en nieve carbónica. Se almacenaron las muestras a -80°C hasta su uso. Se recogieron muestras de sangre antes del parto y se almacenaron usando sistema de ARN de sangre Paxgene (Qiagen, Valencia, EE.UU.) a -20°C hasta su uso. Se describen diversos parámetros de estos grupos en la tabla 2, páginas 37-38. Además, se investigaron muestras de las 10 pacientes y 10 sujetos control del estudio en Tanzania en los ejemplos 5 (véase la tabla 1, páginas 14-15).

55

##### ELISA

60 Se midieron concentraciones de hemoglobina-A usando ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) competitivo tal como se describe para radioinmunoensayo en fase sólida (SPRIA) y usando tampones, procedimiento de lavado y veces de incubación tal como se describe [Nilson *et al.*, 1986]. Se recubrió hemoglobina (Sigma) a 4  $\mu$ g/ml, se lavaron las placas y se incubaron con una mezcla de anticuerpo de conejo anti-hemoglobina y o bien oxihemoglobina-A convencional o bien muestras desconocidas, se lavaron, se incubaron con IgG porcina anti-conejo-ALP (Dako), se lavaron y finalmente se incubaron con sustrato. Se titularon por separado diluciones apropiadas de cada etapa y reactivo. Se leyó la absorbancia a 415 nm (Bio-Rad Model 550, lector de microplacas). El volumen usado para cada etapa de incubación fue de 100  $\mu$ l. Se prepararon todos los experimentos por triplicado.

65

RIA

Se determinaron concentraciones de  $\alpha_1m$  mediante radioinmunoensayo (RIA) tal como se describe [Plesner *et al.* 1975; Akerström, 1985]. En resumen, se mezcló antisuero de cabra frente a  $\alpha_1m$  humana (0,2 ml, dil. 1:6000) con  $\alpha_1m$  marcada con  $^{125}I$  (0,1 ml, aprox. 0,05 pg/ml) y muestras desconocidas o concentraciones de  $\alpha_1m$  convencionales (0,2 ml). Se prepararon las diluciones en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 + BSA al 0,1% (tampón de RIA). Tras la incubación durante la noche a temperatura ambiente, se precipitó  $\alpha_1m$  unida a anticuerpo añadiendo 0,3 ml de suero bovino y 1,6 ml de polietilenglicol al 15% en tampón de RIA, centrifugando a 1500xG durante 40 min. y analizando la actividad de  $^{125}I$  de los sedimentos en un contador gamma Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer Life Sciences).

Determinación de concentraciones de Hb-F

Se determinaron las concentraciones en plasma de hemoglobina F mediante inmunotransferencia de tipo Western tras la retirada de albúmina de plasma usando el kit de depleción de albúmina Montage (n.º de cat. LSKAD0024; Millipore). En resumen, se combinaron las perlas de diez columnas en un lote, se lavaron con PBS y se separaron en 50 alícuotas idénticas. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante de cada alícuota y se añadieron 40  $\mu$ l de plasma (diluido 1:1 con PBS) y se incubaron dos veces durante 1 h a TA. Se centrifugaron los tubos, se guardó el sobrenadante y se lavaron las perlas secuencialmente con 1 ml de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,3 y 1 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Tras la centrifugación y retirada del sobrenadante, se añadió el plasma y se incubó de nuevo durante 1 h a TA. Tras la centrifugación y descarte del sedimento, se separaron 10  $\mu$ l del plasma así sometido a depleción de albúmina mediante SDS-PAGE (T=13,5%; C=3,3%) y se transfirieron con anticuerpo de ratón anti-cadena F/ $\gamma$  de Hb humana, diluida 600x, seguido por Ig de conejo anti-ratón (1  $\mu$ g/ml) y la IgG de cabra anti-conejo marcada con  $^{125}I$  tal como se describe a continuación. Se logró la cuantificación de hemoglobina F mediante densitometría de las bandas positivas usando el software Image Gauge V4.0 (Fuji, Tokio, Japón) y hemoglobina F convencional (15 y 75 ng/pocillo). Se determinaron las concentraciones en orina de hemoglobina F usando el mismo protocolo, pero omitiendo las etapas con el kit de depleción de albúmina Montage.

Inmunotransferencia de tipo Western

Se realizó SDS-PAGE (T = 12%, C = 3,3%) tal como se describe [Laemmli, 1970]. Se ejecutaron los geles en condiciones de reducción usando un patrón de alto peso molecular (Rainbow markers, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Se transfirieron las proteínas separadas a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) tal como se describe [Matsudaira, 1987]. Entonces se incubaron las membranas con los anticuerpos apropiados y se realizó inmunotransferencia de tipo Western usando inmunoglobulinas de cabra secundarias anti-conejo marcadas con  $^{125}I$  tal como se describió anteriormente por Wester *et al* [1997], y revelando las imágenes en las membranas usando el sistema de obtención de imágenes con fósforo Fuji FLA 3000 (Fujifilm Suecia AB, Estocolmo, Suecia).

Extracción y preparación de tejido placentario de moléculas de  $\alpha_1m$ 

Se purificaron moléculas que contenían  $\alpha_1m$  de tejido placentario tal como se describe [Berggård *et al.*, 1999]. Se homogenizaron aproximadamente 200 g de una placenta humana a término aparentemente normal, tomados en el plazo de 3 horas tras el parto, en 200 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, sacarosa 0,25 M, EDTA 2 mM, pepstatina, 1 mg/l, antipaína, 5 mg/l, y leupeptina, 10 mg/l, usando un aparato Potter-Elvehjem con una mano de almirez de teflón de ajuste hermético. Se centrifugó el homogeneizado a 10.000 G durante 10 min. Se lavó ese sedimento mediante suspensión repetida 1:1 en el tampón de homogenización y recentrifugación a 10.000 G durante 10 min. Se centrifugó el sobrenadante a 100.000 G durante 90 min. Se disolvió este sedimento, que contenía las membranas de la placenta y proteínas unidas a la membrana, en 40 ml de tampón de homogenización que contenía también Nonidet P-40 al 0,5% (p/v) (BDH Chemicals) y se centrifugó a 20.000 G durante 30 min. para retirar el material particulado. Se realizaron todas las etapas en hielo o a 4°C. Se realizó cromatografía de afinidad por inmovilización con anticuerpo de ratón monoclonal anti- $\alpha_1m$ , BN11.10, inmovilizado en Affigel Hz (20 mg/ml) según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE.UU.).

Perfusión de placenta *in vitro*

Hasta la fecha no hay modelos animales adecuados para PE. Con el fin de estudiar los efectos de hemoglobina libre está estableciéndose el modelo de perfusión placentaria dual en colaboración con Henning Schneider, Greifswald, Alemania. La perfusión de placenta dual es un modelo bien establecido para estudiar el flujo de sangre placentaria *in vitro* [Schneider *et al.*, 1985]. Recientemente, se usó el modelo para imitar PE induciendo la formación de ROS con xantina y xantina-oxidasa [Di Santo *et al.*, 2007]. Datos muy recientes indican que las placentas perfundidas con xantina tienen un perfil génico similar a placentas con PE.

Se perfunde artificialmente placenta humana con medios oxigenados. Se perfunde la circulación tanto materna como

fetal (por tanto "dual") usando bombas peristálticas. Se monitorizan los medios de los dos circuitos separados para detectar fugas. Se analizan los medios y tejido placentario con la tecnología mencionada anteriormente.

Ejemplo 5.1

La hemoglobina-A está elevada en el plasma preecláptico

Resultados

Se muestran los resultados en las figuras 11-12. La determinación de concentraciones de hemoglobina total en el plasma de 30 pacientes con preeclampsia y 30 embarazos control mediante ELISA mostró un aumento de casi dos veces en el grupo de preeclampsia. El valor medio +/- DE en las pacientes fue de 3,01 +/- 0,39 ug/ml y en el grupo control de 4,44 +/- 1,0. Esta diferencia es significativa (P<0,05).

Ejemplo 5.2

La hemoglobina-F está elevada en la orina y plasma preecláptico

Se observó hemoglobina fetal en plasma y orina con inmunotransferencia de tipo Western como una banda de 15 kDa que reaccionaba con anticuerpo anti-cadena gamma. La figura 13 muestra un ejemplo del método de inmunotransferencia de tipo Western aplicado al plasma de dos pacientes (PE 1 y 2) y dos sujetos control (control 1 y 2). El límite de detección del método fue aproximadamente de 5 ug/ml en plasma y 1 ug/ml en orina. Se estimaron las concentraciones de Hb-F mediante densitometría y la tabla 1 muestra las frecuencias de Hb-F en las muestras de plasma y orina de los grupos con PE y control. Se observó la banda en el plasma de 9 pacientes, mientras que ninguno de los individuos control fue positivo. Por tanto, 9 pacientes y ninguna mujer control tuvieron más de 5 ug/ml de hemoglobina fetal en plasma. Suponiendo que las concentraciones en plasma de las mujeres control fueron de 0,04 ug/ml como sugiere el estudio de Turpeinen *et al.*, es decir la concentración en plasma normal, los resultados muestran un aumento de 125 veces de hemoglobina fetal en el 20% de las pacientes con PE. La orina de 8 pacientes contenía la banda y 2 de los controles (tabla 3). Se encontraron estos dos individuos control entre las mujeres de Tanzania, con alta incidencia de infecciones por malaria. Se observó una banda débilmente positiva a 67 kDa, que representa lo más probablemente la albúmina en intensidad igual en todas las muestras.

Tabla 3. Frecuencias de individuos con > 5 ug/ml de Hb-F en plasma y >1 ug/ml en orina.

Plasma		Orina	
Preeclampsia	Control	Preeclampsia	Control
%	%	%	%
19,6	0	20	5
(9/46)	(0/39)	(8/40)	(2/39)

Ejemplo 5.3

Dependencia del tiempo de hemoglobina-A y F en plasma

Un factor patogénico temprano posible de preeclampsia es hipoxia, provocada por ejemplo por perfusión alterada, implantación anómala o inanición. La hipoxia puede regular por incremento la expresión de Hb-F en células progenitoras y madre hematopoyéticas adultas y fetales [Narayan *et al.*, 2005]. Junto con la lesión en las barreras físicas de la placenta, esto puede conducir a fuga de células fetales así como Hb-F libre en la circulación materna entre las fases 1 y 2 (véase la figura 15). A medida que la enfermedad progresa el número aumentará, lo que puede monitorizarse como niveles aumentados de hemoglobina fetal libre. Cuando se dañan las paredes vasculares maternas mediante hemoglobina fetal libre, las células sanguíneas maternas también empezarán a morir. Esto conducirá a niveles aumentados de hemoglobina materna libre, impulsando adicionalmente la espiral negativa de la enfermedad. La hipótesis es que Hb-F precede a la Hb total.

Ejemplo 5.4

$\alpha_1m$  está elevada en la orina y plasma preecláptico

La proteína tisular y de plasma pequeña,  $\alpha_1$ -microglobulina ( $\alpha_1m$ ), es una molécula de unión a grupo hemo [Allhorn *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2004] y eliminador de radicales [Åkerström *et al.* 2007] y una forma de degradación de grupo hemo, t- $\alpha_1m$ , se induce mediante retirada proteolítica de un tetrapéptido C-terminal, LIPR, cuando se mezcla  $\alpha_1m$  con hemoglobina libre [Allhorn *et al.*, 2002]. La hemoglobina libre y especies reactivas de oxígeno provocan una producción aumentada de  $\alpha_1m$  en células hepáticas y células sanguíneas [Allhorn *et al.*, 2002]. Por tanto,  $\alpha_1m$  es un posible antagonista de grupo hemo y hemoglobina que puede proteger frente al daño inducido por grupo hemo y hemoglobina a células y componentes tisulares.

De acuerdo con esta hipótesis, se ha encontrado que las concentraciones de  $\alpha_1m$  están elevadas en el plasma y la orina de pacientes con preeclampsia en comparación con embarazos control con una significancia de  $P < 0,01$  tanto en el plasma como en la orina (figura 15). La concentración de  $\alpha_1m$  en plasma media (+/- DE) en pacientes fue de 19,1 (+/- 5,5)  $\mu\text{g/ml}$  y en controles de 16,1 (+/- 3,7)  $\mu\text{g/ml}$ . La concentración de  $\alpha_1m$  en orina media (+/- DE) en pacientes fue de 9,4 (+/- 5,5)  $\mu\text{g/ml}$  y en controles de 5,3 (+/- 4,6)  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados indican 1) que el organismo responde al ataque preeclámptico aumentando la producción de  $\alpha_1m$  elevando de ese modo la concentración en plasma y 2) que la hemoglobina, grupo hemo, hierro y/o ROS son componentes del ataque ya que  $\alpha_1m$  se regula por incremento en células mediante hemoglobina, grupo hemo, hierro y/o ROS aumentados. Por tanto, lo más probablemente  $\alpha_1m$  es una reacción de defensa del organismo frente al ataque preeclámptico. Por consiguiente, el aumento de las concentraciones de  $\alpha_1m$  a niveles incluso más altos, por ejemplo 32  $\mu\text{g/ml}$ , que es dos veces la concentración normal, debe tener efectos anti-preeclámpticos, y por tanto  $\alpha_1m$  es un posible fármaco para el tratamiento de la enfermedad.

### 15 Ejemplo 5.5

#### $\alpha_1m$ protege las células y los componentes tisulares mediante anti-oxidación y unión a grupo hemo

Las propiedades de anti-oxidación de  $\alpha_1m$  se ilustran en las figuras 16 y 17. En primer lugar, se mostró que  $\alpha_1m$  añadida de manera extracelular puede reducir la carga redox de citosol celular y grupos tiol de proteínas de citosol, e inhiben la oxidación de estos componentes mediante grupo hemo y ROS.  $\alpha_1m$  añadida de manera extracelular también inhibe la lisis celular (es decir muerte celular) inducida por grupo hemo (figura 16). La modificación oxidativa de colágeno y lipoproteínas de baja densidad (LDL) participan en la patogénesis de muchas enfermedades y también pueden ser dianas de oxidación inducida por Hb en preeclampsia.  $\alpha_1m$  inhibió la oxidación inducida por grupo hemo y ROS de colágeno, LDL, lípidos de la membrana y células completas.  $\alpha_1m$  también eliminó los productos de oxidación formados previamente en el colágeno y LDL (figura 17). Un posible mecanismo para estas acciones puede ser las propiedades reductasa de  $\alpha_1m$ , que reduce los oxidantes, las modificaciones de oxidación, o ambos.

Para estudiar los mecanismos del efecto citoprotector de  $\alpha_1m$ , se realizó una serie de experimentos que intentan analizar las interacciones entre la proteína y grupo hemo unido a célula. En primer lugar, se incubaron células con grupo hemo 10  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos, se eliminó por lavado el grupo hemo en exceso y se añadió  $\alpha_1m$  o proteínas control hasta una concentración de 2 ó 10  $\mu\text{M}$  y se incubó durante 2 h. Se guardaron los medios de cultivo, se lavaron las células y se solubilizaron, y se analizaron tanto los medios como las células solubilizadas mediante espectrofotometría (figura 18A) y visualmente (figura 18B). Se observó grupo hemo como una fuerte coloración de color marrón de las células y el espectro de absorbancia típico con un pico no nítido alrededor de 400 nm. Cuando se añadió  $\alpha_1m$ , se eliminó casi completamente el grupo hemo de las células y en su lugar se encontró en el medio. La lipocalina AGP control no tuvo ningún efecto sobre el grupo hemo unido a célula. Se espera que los niveles de grupo hemo libre en preeclampsia puedan alcanzar 10  $\mu\text{M}$  y más, al menos localmente, y que las células afectadas por los efectos tóxicos de grupo hemo libre incluyen células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos.

Tal como se describió en varias ocasiones anteriormente, se cree que los ataques oxidativos por hemoglobina libre, grupo hemo libre y ROS producidos mediante autooxidación de hemoglobina y grupo hemo constituyen factores patológicos principales del progreso de preeclampsia. El colágeno y las membranas de células endoteliales y citosoles son por supuesto dianas importantes de los ataques oxidativos. Los resultados en este ejemplo hacen probable que  $\alpha_1m$  pueda inhibir y reparar el daño realizado por la hemoglobina libre, grupo hemo y ROS también *in vivo*, y por tanto puede actuar como un agente terapéutico en preeclampsia.

### 50 Ejemplo 5.6

#### La perfusión *in vitro* con hemoglobina induce fuga de placenta y regulación por incremento de $\alpha_1m$

Se estudió preeclampsia usando un modelo de perfusión de placenta *in vitro* con dos sistemas de circulación separados, en los lados fetal y materno, respectivamente. En primer lugar se aclararon ambos sistemas de circulación. Entonces se perfundió la placenta durante 120 min. con una disolución de Hb-A (2 mg/ml) en el lado fetal y tampón sólo para en el lado materno durante 120 min. ("1ª perfusión") y durante 120 min. en ambos los lados con tampón sólo ("2ª perfusión"). Se tomaron regularmente pequeñas alícuotas de ambas circulaciones y se midieron las concentraciones de Hb-A, Hb-F y  $\alpha_1m$ . Tal como se muestra en la figura 19 (lado izquierdo), Hb-A apareció rápidamente en el lado materno durante la 1ª perfusión y, en un menor grado, durante la 2ª perfusión. Esto puede ser el resultado de fuga o producción endógena de Hb-A en el tejido placentario, o ambos. También apareció  $\alpha_1m$  en el lado materno durante ambos periodos de perfusión en la figura 19 (lado derecho). Esto sugiere que se produce  $\alpha_1m$  en el tejido placentario como resultado de la perfusión de hemoglobina. Finalmente, Hb-F apareció en la circulación materna al final de la 1ª perfusión (120 min.), lo más probablemente como resultado de la producción en la placenta y fuga al interior de la circulación materna.

Por tanto, el modelo de perfusión *in vitro* por lo tanto puede usarse para estudiar el efecto de hemoglobina libre en la circulación fetal sobre la función de barrera placentaria, los efectos protectores de  $\alpha_1m$  y la respuesta celular protectora del tejido.

5

Ejemplo 5.7

Una nueva molécula en la placenta que consiste en  $\alpha_1m$  y hemoglobina unidas entre sí

10 Se mostró previamente que  $\alpha_1m$  puede “robar” el grupo hemo de la hemoglobina cuando se mezclan las dos moléculas en disolución [Allhorn *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2004]. Para lograr esto *in vivo*, las moléculas de hemoglobina y  $\alpha_1m$  deben estar unidas. Se observaron evidencias de una molécula de  $\alpha_1m$ -hemoglobina de ese tipo en extractos de placenta, tras el aislamiento de especies moleculares que contenían  $\alpha_1m$ , seguido por análisis con inmunotransferencia con anticuerpos anti-Hb (figura 20). Una banda de proteína de 43 kDa reaccionó con anticuerpos frente tanto a  $\alpha_1m$  como a Hb-A. Se mostró mediante mapeo de péptido Maldi-EM que la banda contenía  $\alpha_1m$  y las cadenas tanto alfa como beta-globina (no mostradas). El tamaño de la molécula sugiere que la molécula está compuesta por una cadena de cada una de  $\alpha_1m$  y otra cadena que puede ser o bien Hb $\alpha$  o bien Hb $\gamma$ . No pudo observarse la banda tras la adición de mercaptoetanol, lo que indica que las cadenas se mantienen juntas mediante un enlace disulfuro.

20

Referencias

Åkerström B. J. Biol. Chem. 260 (1985) 4839-4844.

25 Åkerström B, Maghzal G, Winterbourn CC, Kettle AJ. J Biol Chem. 282 (2007) 31493-31503.

Allhorn M, Berggård T, Nordberg J, Olsson ML, Åkerström B. Blood. 99 (2002) 1894-1901.

Babiker-Mohamed H, Forsberg M, Olsson ML, Winqvist O, Nilson BHK, Lögdberg L, Åkerström B. Scand J Immunol 34 (1991) 655-666.

30 Berggård T, Enghild JJ, Badve S, Salafia CM, Lögdberg L, Åkerström B. Am J Repr Immunol 41 (1999) 52-60.

Björck L, Cigen R, Berggård B, Löw B, Berggård I. Scand J Immunol 6 (1977)1063-1069. Bradley DJ *et al.* J Neurosci 12 (1992) 2288-2302

35 J. J. Brosens, R. Pijnenborg, I. A. Brosens, Am J Obstet Gynecol. 187, 1416 (2002).

Coligan JE. (ed) Current Protocols in Immunology. Wiley Interscience.

40 C. J. M. de Groot, R. N. Taylor, Annals of Medicine 25, 243 (1993).

Di Santo S, Sager R, Andres AC, Guller S, Schneider H. Placenta (2007).

45 Douglas and Redman, Br Med J 309 (1994)1395-1400

Elbashir MI, Nilson B, Akesson P, Björck L, Åkerström, B. J Immunol Methods 135 (1990) 171-179.

J. P. Granger, B. T. Alexander, W. A. Bennett, R. A. Khalil, Am J Hypertens. 14, 178S (2001).

50 Greenwood FC, Hunter WM, Glover J S. Biochem. J, 89 (1963) 114-123.

S. R. Hansson *et al.*, Mol Human Reproduction, (2005).

55 T. H. Hung, J. N. Skepper, D. S. Charnock-Jones, G. J. Burton, Circ Res 90, 1274 (28 de junio de 2002).

Kajita A, Taniguchi K, Shukuya K. Biochim Biophys Acta 175 (1969) 41-48.

Kwasek A, Osmark P, Allhorn M, Lindqvist A, Åkerström B, Wasylewski Z. Protein Expr. Purif. 53 (2007) 145-152.

60 Laemmli UK. Nature 227 (1970) 680-685.

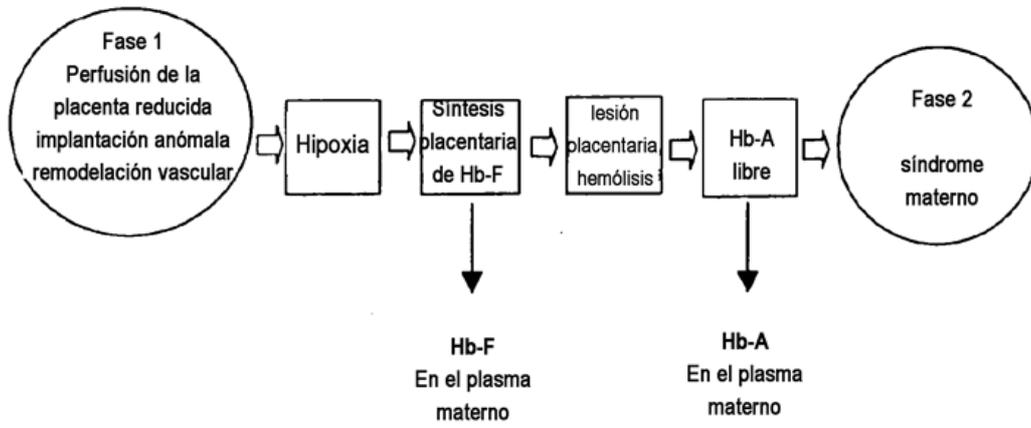
Larsson J, Allhorn M, Åkerström B. Arch Biochem. Biophys. 432 (2004) 196-204.

65 H. Lipstein, C. C. Lee, R. S. Crupi, Am J Emerg Med. 21, 223 (mayo de 2003).

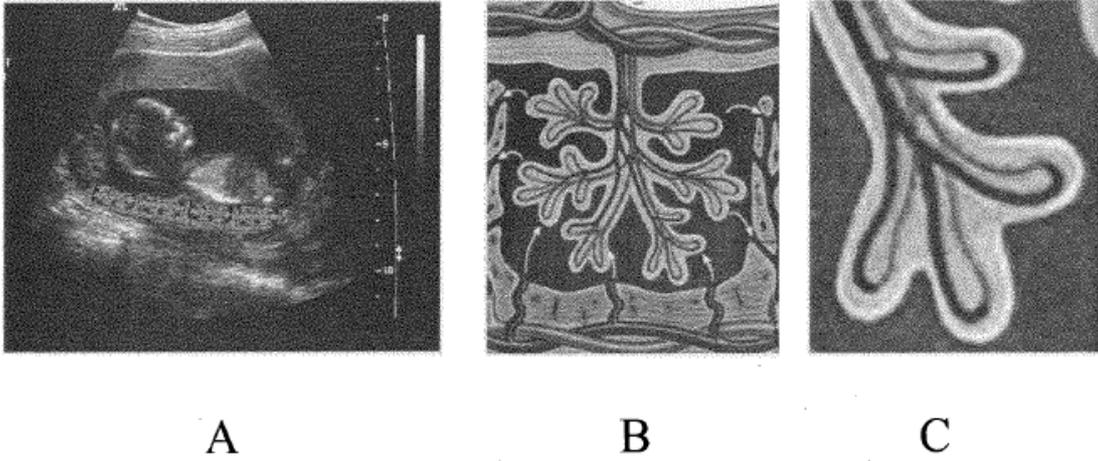
- Matsudaira P. J. Biol. Chem. 262 (1987) 10035-10038.
- 5 Motterlini *et al.*, Am J Physiol 269 (1995) 648-655.
- Narayan AD., Ersek A., Campbell TA., Colón DM, Pixley JS, Zanjani ED. Br J Haematol 128 (2005) 562-570.
- Nilson B, Björck L and Åkerström B. J Immunol Methods 91 (1986) 275-281.
- 10 Noble RW. J Biol Chem 246 (1971) 2972-2976.
- Olsson MG, Allhorn M, Olofsson T, Åkerström B. Free Rad Biol Med 42 (2007) 842-851.
- E. W. Page, Am J Obstet Gynecol. 37, 291 (1939).
- 15 Plesner T, Nørgaard-Pedersen B, Boenisch T. Scand J Clin Lab Invest 35 (1975) 729-735.
- J. M. Roberts *et al.*, Am J Obstet Gynecol 161, 1200 (1989).
- 20 J. M. Roberts, C. A. Hubel, Lancet 354, 788 (4 de setiembre de 1999).
- J. M. Roberts, D. W. Cooper, Lancet 357, 53 (2001).
- Schneider H, Huch A, Contrib Gynecol Obstet 13 (1985) 40.
- 25 A. H. Shennan, L. Poston, L. C. Chappell, P. T. Seed, Lancet 357, 1534 (2001/5/12, 2001).
- J. M. Stevens, Med J Aust. 2, 949 (20-27 de diciembre de 1975).
- 30 H. Strevens *et al.*, Br J Obstet Gynaecol. 110, 831 (septiembre de 2003)
- Svistunenko *et al.*, J Biol Chem 272 (1997) 7114-7121
- Turpeinen U, Stenman U-H. Determination of fetal hemoglobin by time-resolved immunofluorometric assay. Clin Chem 38 (1992) 2013-2018.
- 35 Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. Methods Enzymol. 186 (1990) 265-272.

**REIVINDICACIONES**

1. Alfa-1-microglobulina para su uso en la profilaxis o el tratamiento de preeclampsia.
- 5 2. Composición farmacéutica que comprende alfa-1-microglobulina para su uso en la profilaxis o el tratamiento de preeclampsia.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que la composición farmacéutica es para uso parenteral.
- 10 4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que la composición farmacéutica es para uso oral.
- 15 5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en la que la vía de administración es una vía parenteral seleccionada de la lista que consiste en inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular y subcutánea.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 3 ó 5 en forma de una composición líquida o una composición sólida diseñada para reconstituirse por ejemplo con agua antes de su administración.
7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, que comprende además un anticuerpo, una célula madre o una célula recombinante que dirige dicha alfa-1-microglobulina a la placenta.
- 25 8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que la composición está en forma sólida, semisólida o líquida.
9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que la composición es una forma farmacéutica sólida, polvos, gránulos, grageas, perlas, jarabes, mezclas, suspensiones o emulsiones.
- 30 10. Composición farmacéutica que comprende alfa-1-microglobulina para su uso como medicamento.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

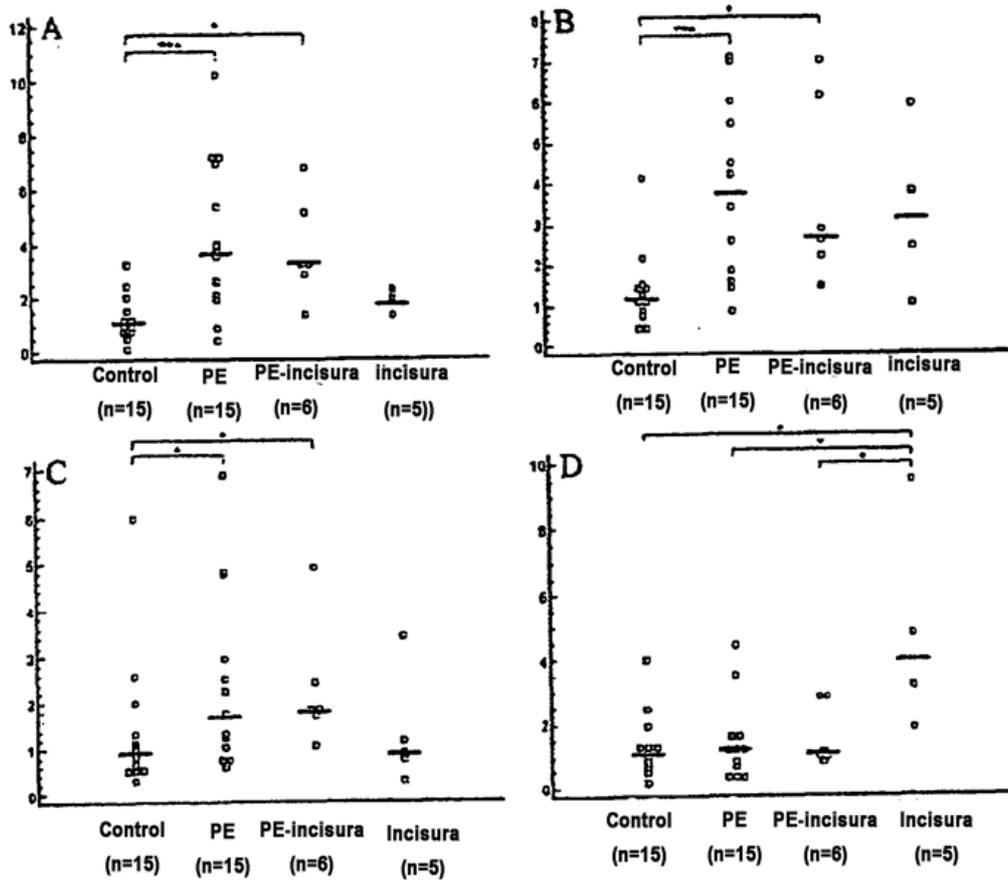


A

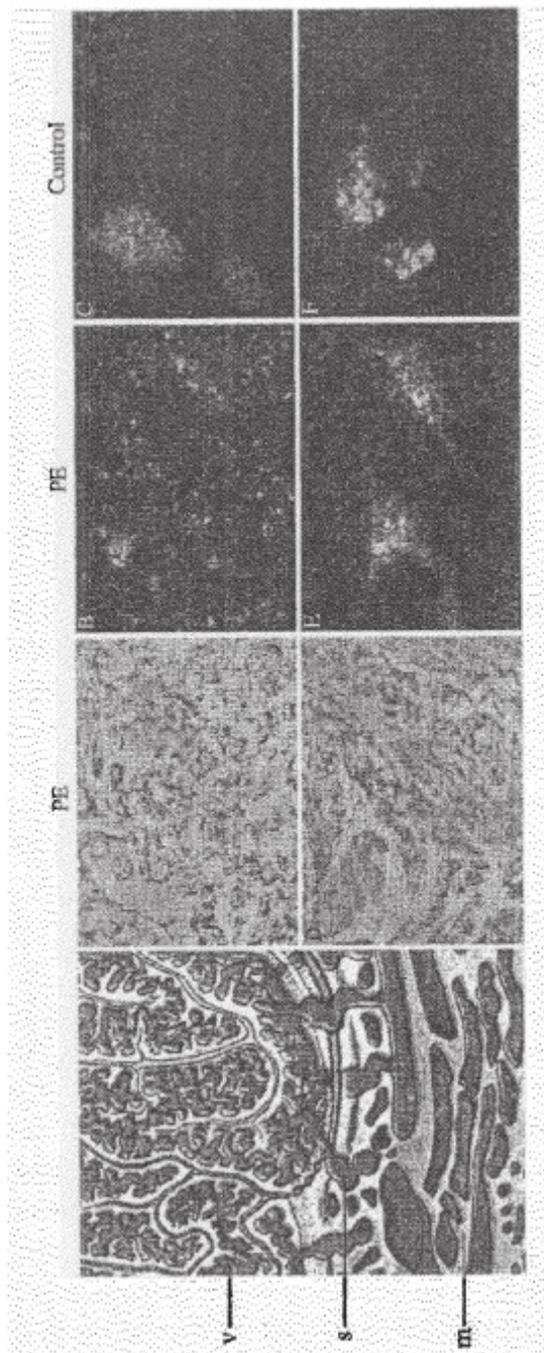
B

C

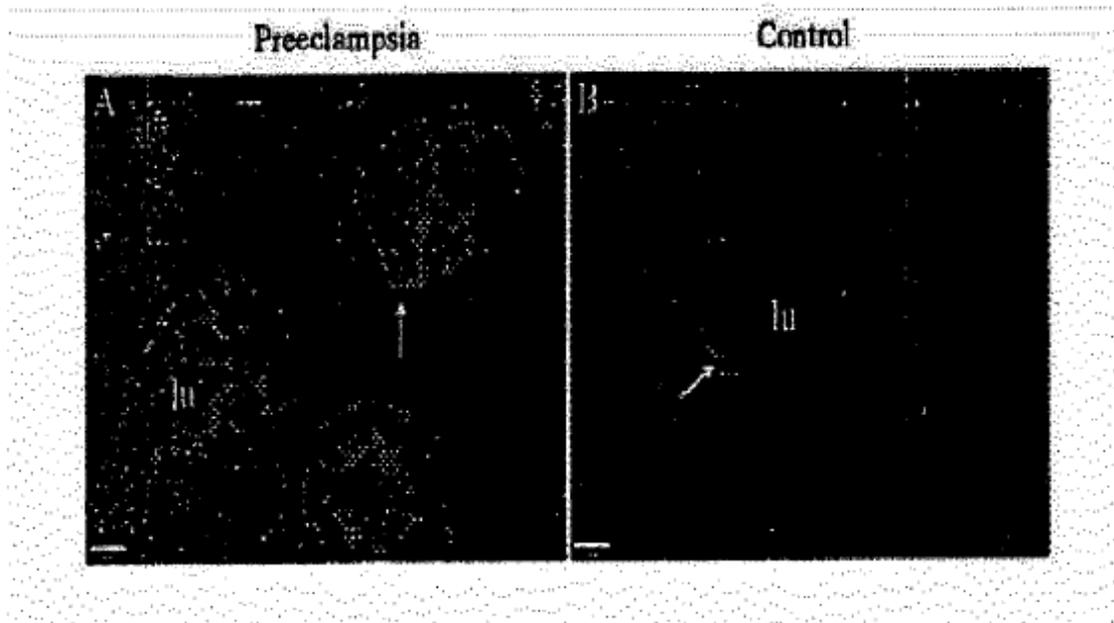
**Fig. 3**



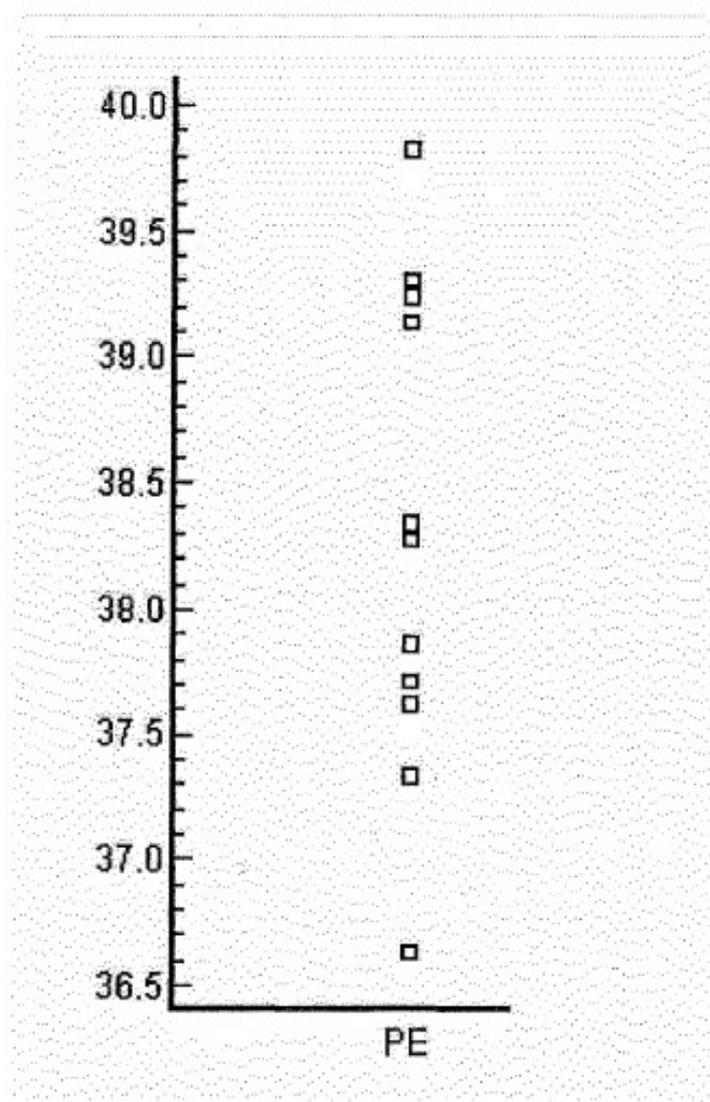
**Fig. 4**



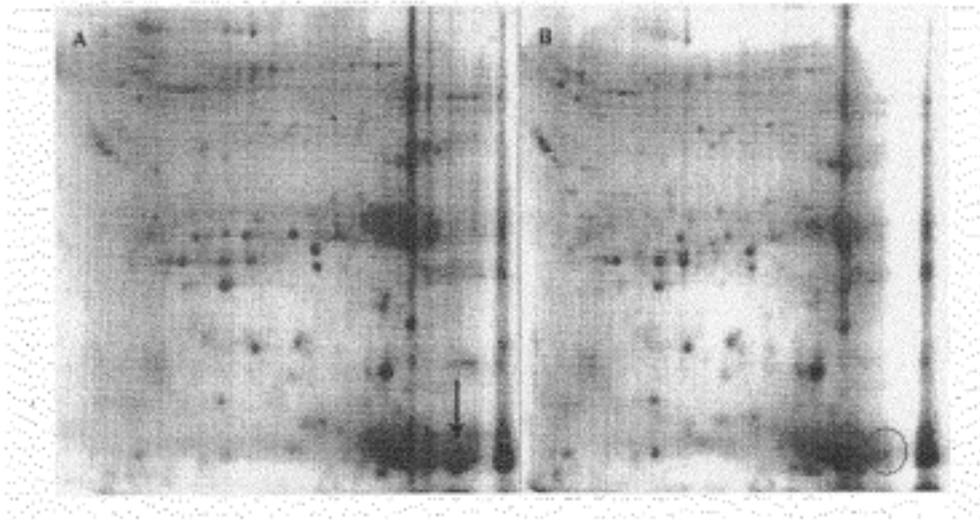
**Fig. 5**



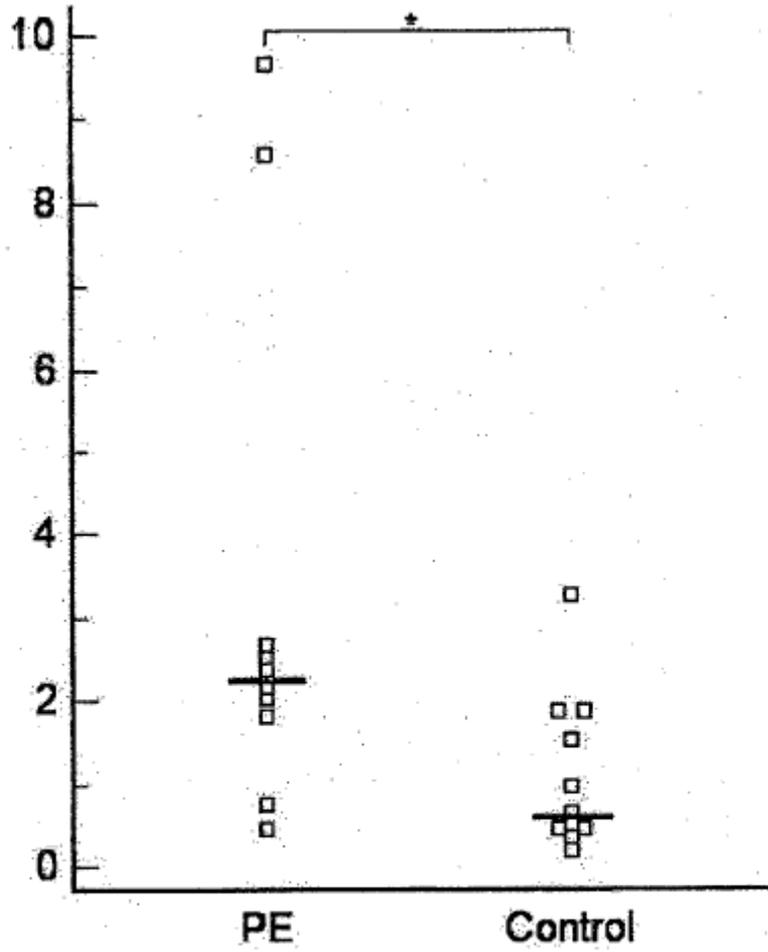
**Fig. 6**



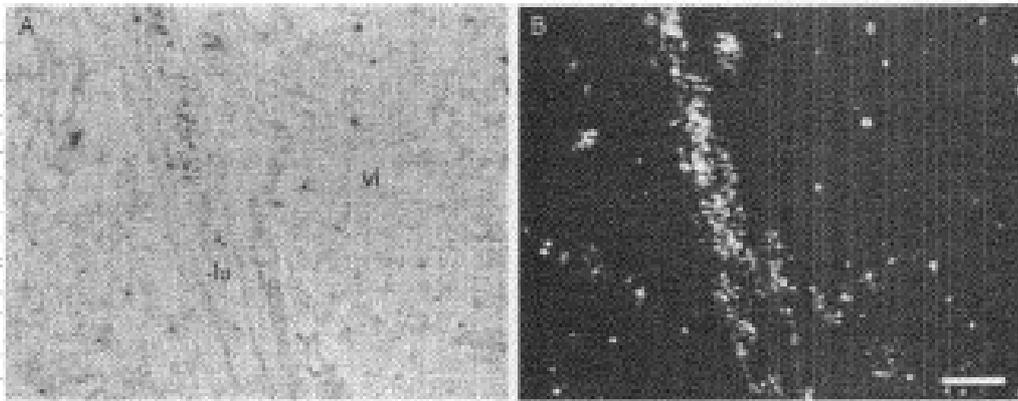
**Fig. 7**



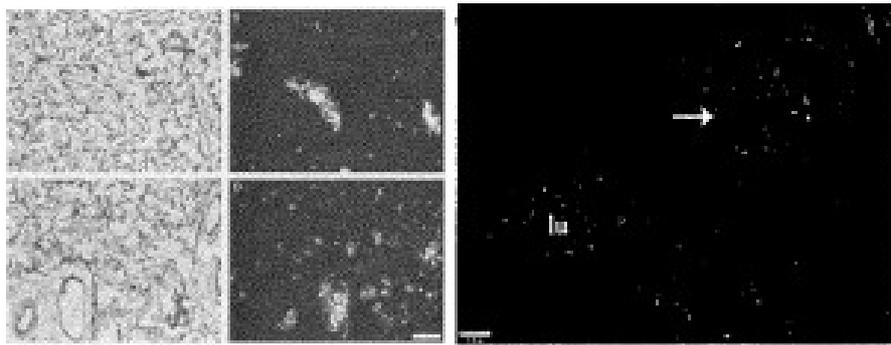
**Fig. 8**



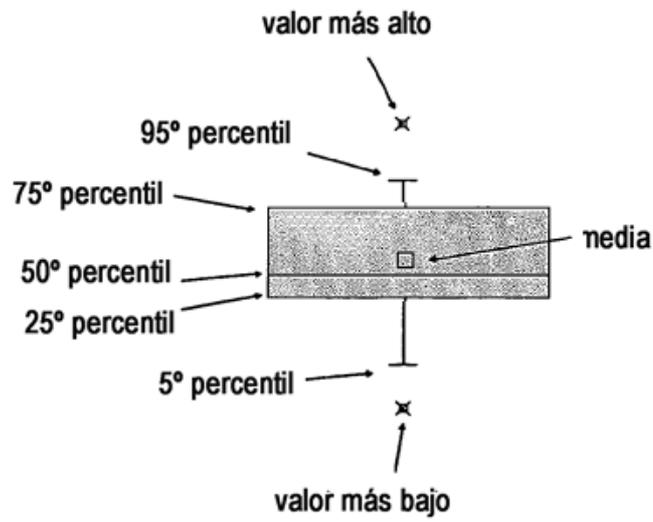
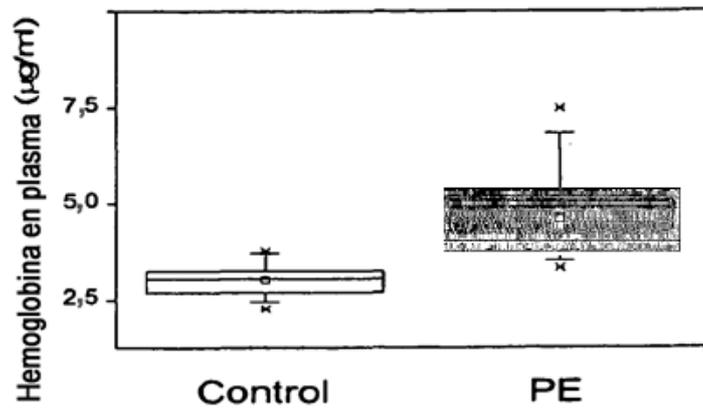
**Fig. 9**



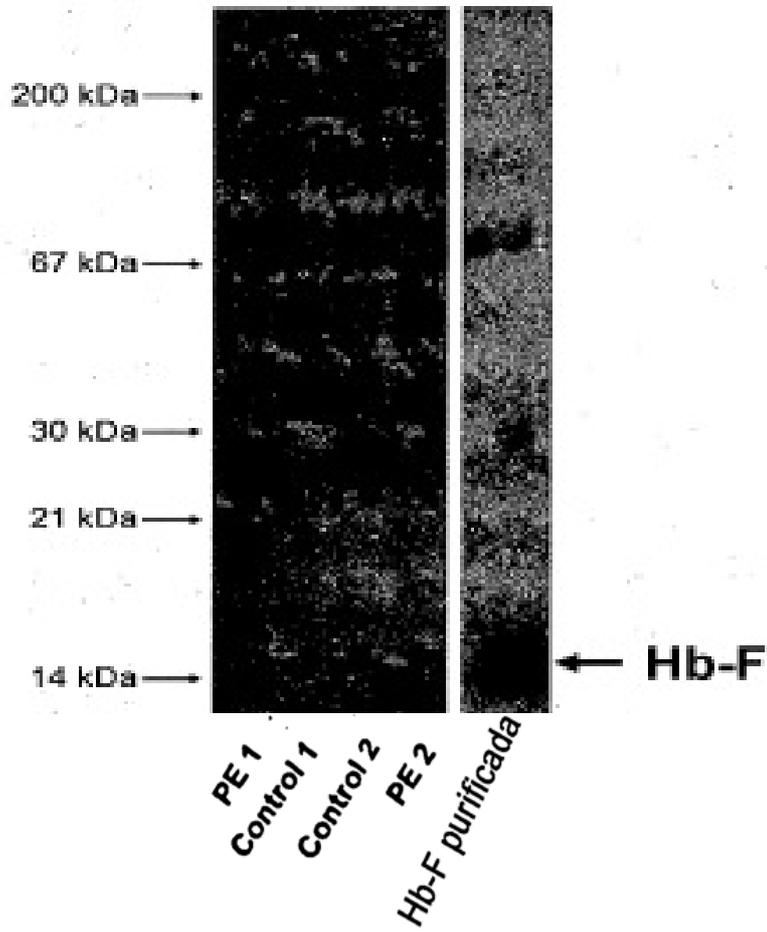
**Fig. 10**



**Fig. 11**



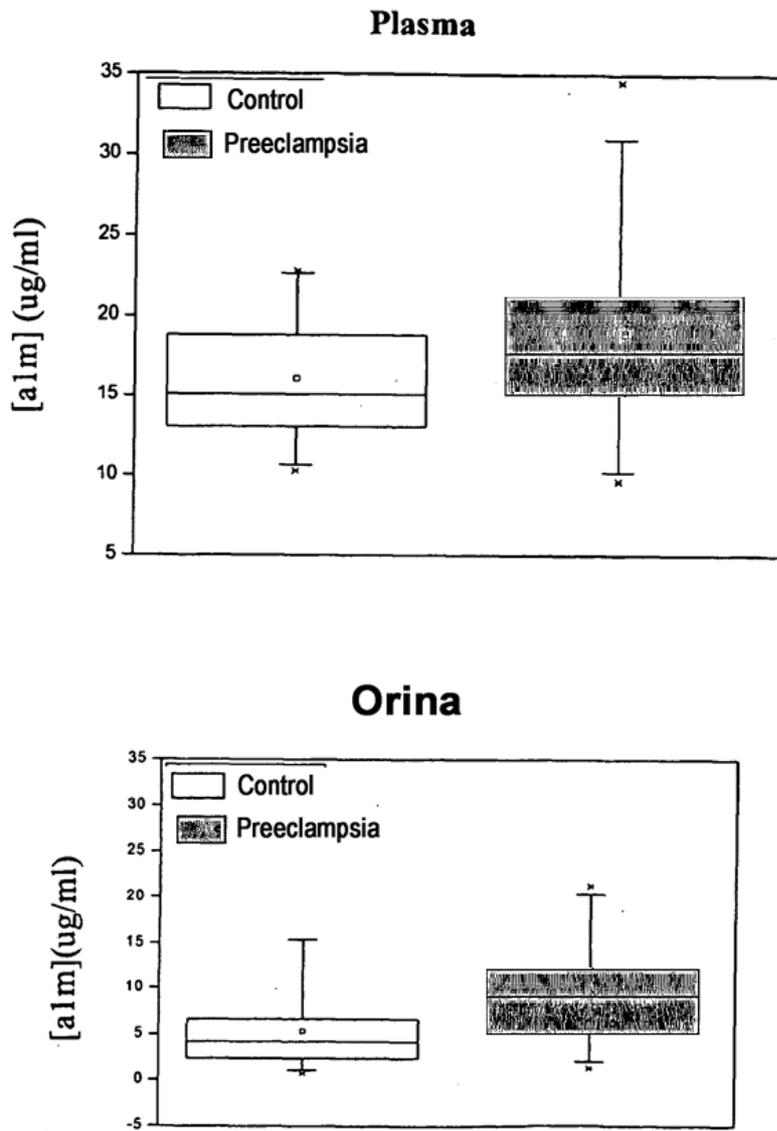
**Fig. 12**



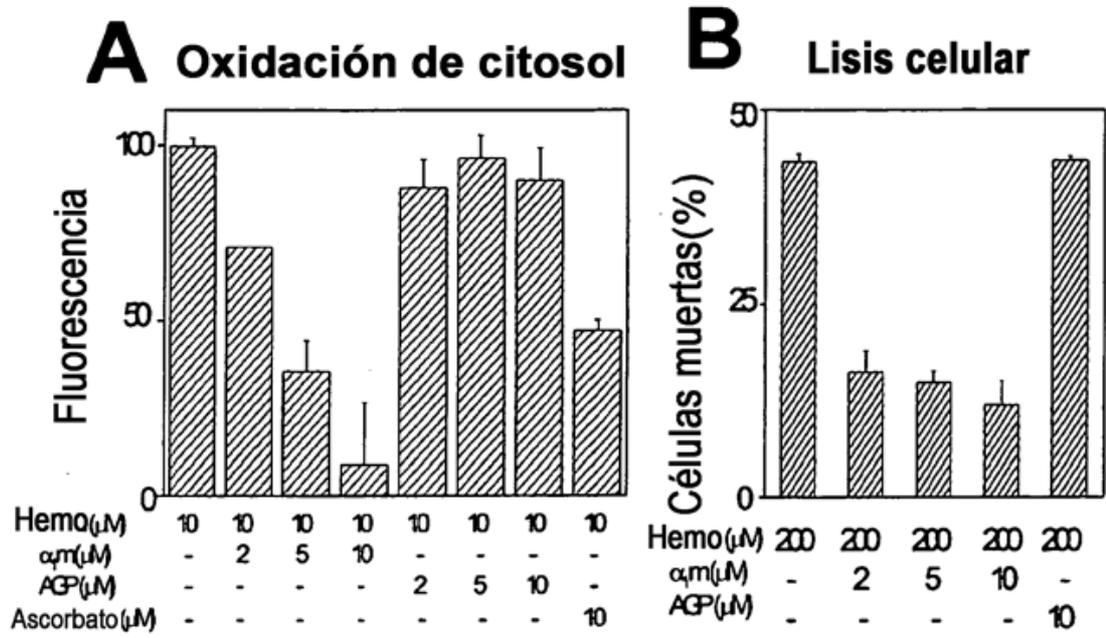
**Fig. 13**



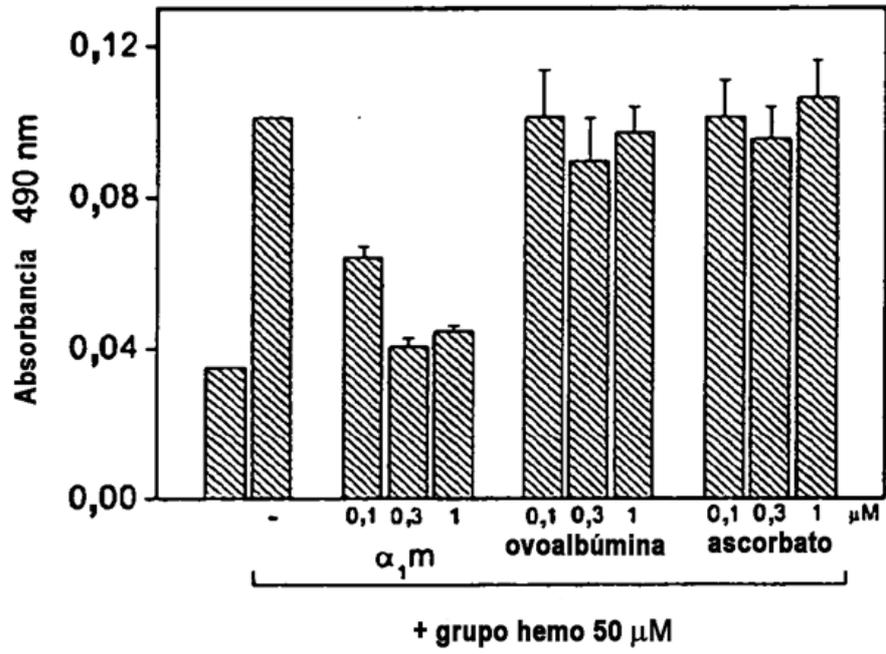
**Fig. 14**



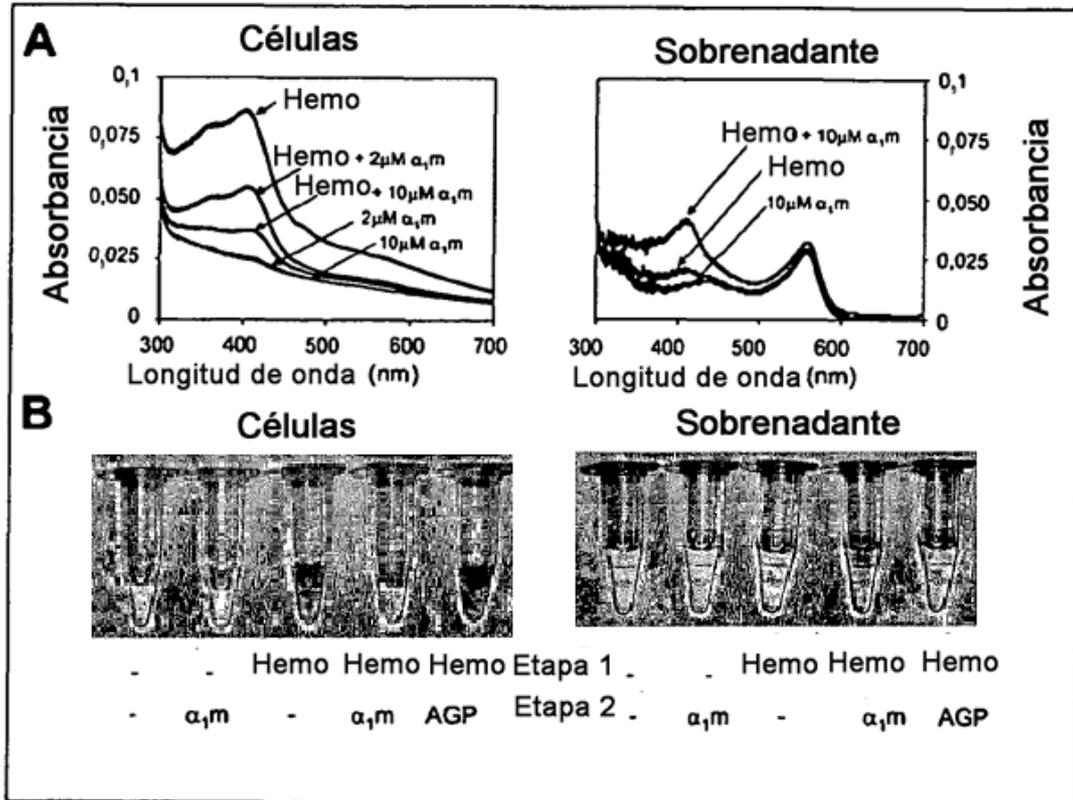
**Fig. 15**



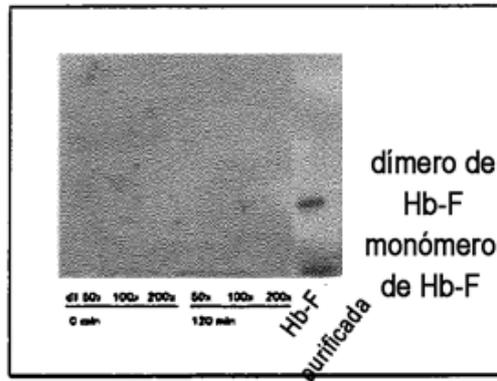
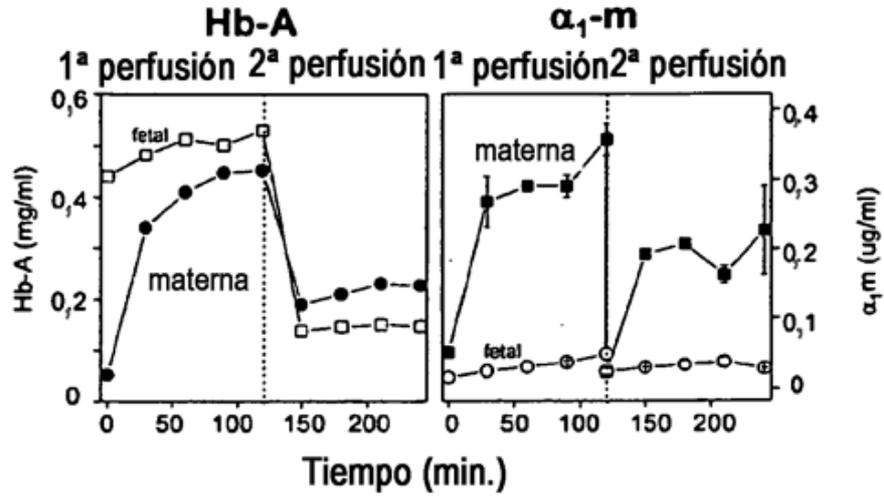
**Fig. 16**



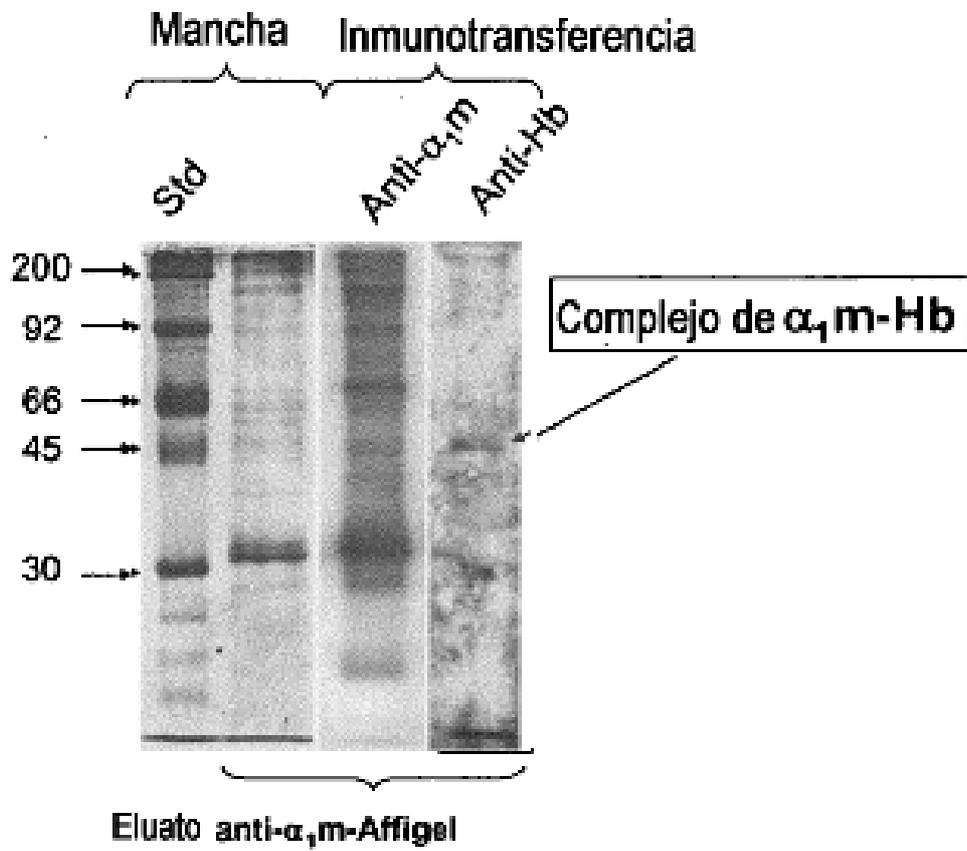
**Fig. 17**



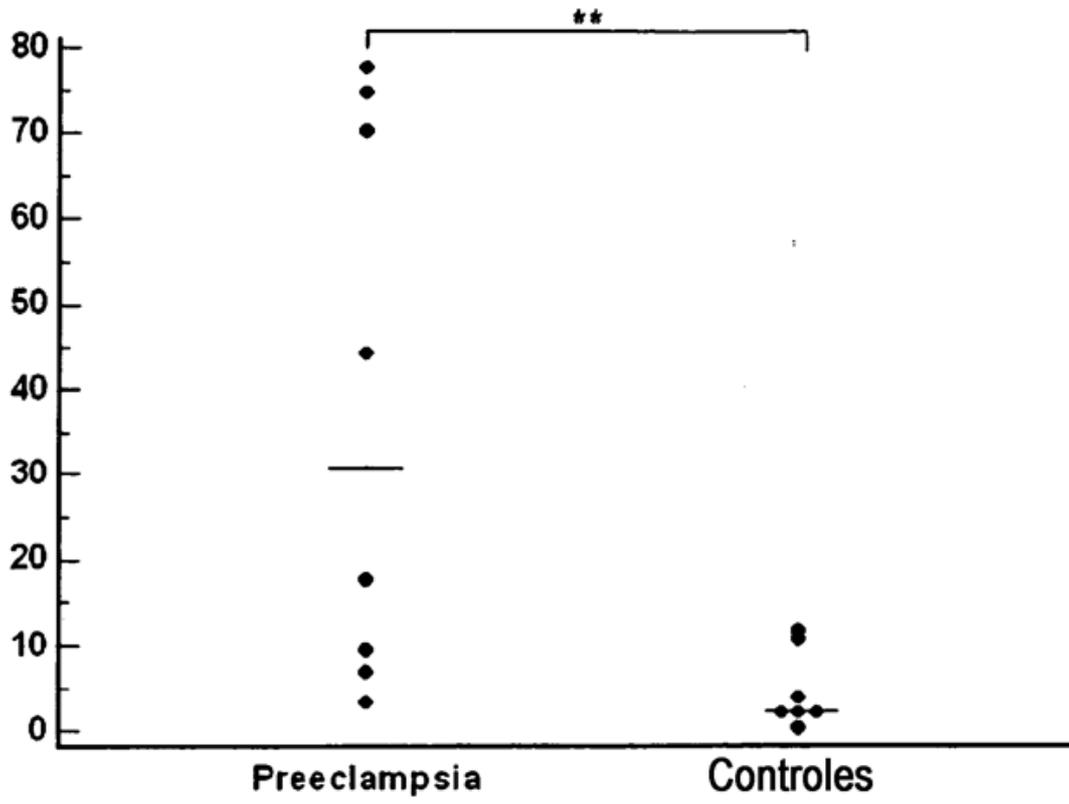
**Fig. 18**



**Fig. 19**



**Fig. 20**



**Fig. 21**