

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 059**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2012** **PCT/US2012/028934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012** **WO2012125641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2012** **E 12757314 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016** **EP 2686681**

54 Título: **Biomarcador de diagnóstico para predecir las mujeres en riesgo de parto prematuro**

30 Prioridad:

17.03.2011 US 201161453765 P

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

29.05.2017

73 Titular/es:

CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, California 90048, US

72 Inventor/es:

EQUILS, OZLEM O. y
SIMMONS, JR., CHARLES F.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 614 059 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

Biomarcador de diagnóstico para predecir las mujeres en riesgo de parto prematuro

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al parto prematuro. Más específicamente, la invención proporciona biomarcadores y métodos de uso de biomarcadores para determinar el riesgo de parto prematuro.

Antecedentes

10 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es una admisión que cualquiera de la información proporcionada en este documento sea de la técnica anterior o relevante para la invención actualmente reivindicada, o que cualquier publicación referida de forma específica o implícita sea de la técnica anterior.

15 El parto prematuro es uno de los problemas de salud fetal más importantes en los Estados Unidos de la actualidad. Aproximadamente uno de cada ocho recién nacidos es de parto prematuro y la incidencia de prematuridad no ha disminuido en los últimos 20 años. La mayoría de los bebés prematuros, si sobreviven, a menudo tienen problemas cardíacos, neurológicos, oftálmicos y gastrointestinales que pueden extenderse incluso más allá de la infancia y tal vez conducir a enfermedades de adultos tales como la aterosclerosis. Actualmente, hay pocos, si es que existen biomarcadores de diagnóstico disponibles que identifiquen efectivamente a las mujeres que van a tener partos prematuros. Los biomarcadores que sean capaces de identificar a estas mujeres en riesgo serían útiles en el despliegue de estrategias de prevención/tratamiento y para evaluar la efectividad de estos tratamientos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos diagnósticos que puedan identificar a las mujeres que tendrán partos prematuros. Especialmente, biomarcadores de diagnóstico que pueden detectarse en mujeres no embarazadas o en mujeres durante el primer trimestre. Los biomarcadores también se pueden utilizar más adelante en el embarazo para evaluar la eficacia de las estrategias de tratamiento y/o prevención.

Resumen de la invención

25 La invención proporciona un método ex vivo para identificar una mujer en riesgo o diagnosticar la susceptibilidad de una mujer para un parto prematuro, que comprende:

- (a) estimular células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") de una mujer utilizando un antígeno y/o estimulante;
- (b) determinar el nivel de secreción de una combinación de citoquinas de las PBMC estimuladas, en donde al menos dos citoquinas en la combinación se seleccionan entre IL-10, IL-13 e IL-1RA;
- 30 (c) comparar el nivel de secreción de la combinación medida en (b) con el nivel de secreción de la misma combinación de citoquinas de PBMC de control aisladas de mujeres que tuvieron un parto a término y estimuladas utilizando el mismo antígeno y/o estimulante;
- (d) determinar si el nivel de secreción medido en (b) es más alto o más bajo que el nivel de secreción de las PBMC de control;

identificando así si la mujer está en riesgo de parto prematuro.

35 Las siguientes realizaciones y aspectos de la misma se describen e ilustran conjuntamente con composiciones y métodos que están destinados a ser ejemplares e ilustrativos, no limitativos de alcance.

40 Se describe un método que comprende: obtener una muestra biológica de una mujer que desea una evaluación de su riesgo de parto prematuro; exponer la muestra biológica ex vivo a un antígeno y/o un estimulante; y la evaluación de una respuesta inmune para predecir si la mujer está en riesgo de parto prematuro. En diversas realizaciones, la muestra biológica puede ser sangre entera.

En diversas realizaciones, el método puede comprender además la separación de células sanguíneas de la muestra y la exposición de las células sanguíneas separadas al antígeno.

En diversas realizaciones, la exposición de la muestra biológica ex vivo al antígeno o al estimulante puede consistir en recoger la muestra biológica en un recipiente revestido con el antígeno y/o estimulante.

45 En diversas realizaciones, el método puede comprender además eliminar plasma de la muestra biológica y ensayar el plasma para evaluar la respuesta inmune. En diversas realizaciones, la eliminación del plasma de la muestra biológica puede comprender centrifugar el tubo que comprende la muestra biológica y recoger el plasma.

En diversas realizaciones, el antígeno y/o estimulante puede ser cortisol, LPS, fitohemaglutinina, un antígeno de histocompatibilidad materna, un antígeno de histocompatibilidad paterno, un antígeno de histocompatibilidad fetal, un antígeno microbiano, una citoquina, un éster de forbol, un agente capaz de inducir la diferenciación de tipo Th1 o Th2 de linfocitos o una combinación de los mismos.

5 En diversas realizaciones; la evaluación de la respuesta inmune puede comprender el ensayo de un nivel de expresión de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina, antagonista del receptor de quimioquina, o combinaciones de los mismos. En diversas realizaciones, la citoquina, el receptor de citoquina, el antagonista del receptor de citoquina, la quimioquina, el receptor de quimioquina, el antagonista del receptor de quimioquina o combinaciones de los mismos se pueden seleccionar del grupo que consiste en IL-10, IL-13, 1L-1RA y combinaciones de los mismos.

10 En diversas realizaciones, un nivel de expresión más alto o más bajo de la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina en comparación con un control puede indicar que la mujer tiene un riesgo aumentado de parto prematuro. En diversas realizaciones, el nivel de expresión más alto o más bajo de la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina puede ser al menos una o tres veces superior o inferior en comparación con los niveles del control. En diversas realizaciones, el nivel de la expresión más alto o más bajo de la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina puede ser indicativo de un riesgo bajo, medio o alto de parto prematuro. En diversas realizaciones, una expresión estadísticamente significativa o más alta de la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina en comparación con un control puede indicar que la mujer presenta un riesgo aumentado de parto prematuro.

15 En diversas realizaciones, la evaluación de la respuesta inmune puede comprender el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas de puntos (ELISpot), un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de microarrays, un BCP cuantitativo, un ensayo de transferencia Northern, ensayo de transferencia Southern, ensayo de transferencia Western, ensayo inmunohistoquímico, ensayo de unión y combinaciones de los mismos.

20 Se describe un kit, que comprende: un recipiente que comprende un antígeno y/o un estimulante; instrucciones para usar el recipiente para recoger una muestra biológica de una mujer para detectar una respuesta inmune; e instrucciones para determinar el riesgo de parto prematuro de la mujer. El kit puede comprender además un reactivo para detectar la respuesta inmune. El kit puede comprender además un control positivo y/o un control negativo.

30 Se describe un método que comprende: obtener una muestra de sangre entera de una mujer que desea una evaluación de su riesgo de parto prematuro; exponer la muestra ex vivo a un antígeno y/o un estimulante recogiendo la muestra en un recipiente recubierto con el antígeno y/o estimulante; y la evaluación de una respuesta inmune para predecir si la mujer está en riesgo de parto prematuro. En diversas realizaciones, el antígeno y/o estimulante puede ser Cortisol, LPS, fitohemaglutinina, o combinaciones de los mismos. En diversas realizaciones, la evaluación de la respuesta inmune puede comprender el ensayo de un nivel de expresión de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina, antagonista del receptor de quimioquina, o combinaciones de los mismos, en donde un nivel de expresión estadísticamente significativo más alto o más bajo de la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina en comparación con un control indica que la mujer presenta un riesgo aumentado de parto prematuro. En diversas realizaciones, la citoquina, el receptor de citoquina, el antagonista del receptor de citoquina, la quimioquina, el receptor de quimioquina, el antagonista del receptor de quimioquina, o combinaciones de los mismos se pueden seleccionar del grupo que consiste en IL-10, IL-13, IL-1RA y combinaciones de los mismos.

45 Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunción con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, diversas características de las realizaciones de la invención.

Breve descripción de las figuras

50 Las realizaciones de ejemplo se ilustran en figuras referenciadas. Se pretende que las realizaciones y las figuras descritas en este documento se consideren ilustrativas más que restrictivas.

Las figuras 1A y 1B representan la representación gráfica de los niveles de expresión de diversos biomarcadores de individuos prematuros en comparación con individuos a término de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. Se presentan los medios empíricos y los errores estándar para cada citoquina y grupo de tratamiento.

Descripción de la invención

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en el arte al que pertenece esta invención.

Múltiples factores conducen al parto prematuro; sin embargo, se piensa que la activación inmune es la vía efectora final que conduce a la ruptura prematura de membranas y contracciones. Estudios familiares y genéticos sugieren que la prematuridad se presenta en las familias y la historia de parto prematuro previo aumenta el riesgo de futuros partos prematuros. Los inventores creían que estas observaciones pueden ser explicadas por las diferencias inherentes en las respuestas inmunitarias de las mujeres que presentan parto prematuro en comparación con las que presentan el parto a término y que estas diferencias pueden ser detectadas incluso en el estado no embarazado. Los inventores creyeron que mediante la detección de estas diferencias se puede ser capaz de identificar a las mujeres que están en riesgo de tener partos prematuros incluso antes de quedar embarazadas. Los inventores creían que, para ver las diferencias, las células inmunes del paciente tenían que ser estresadas.

Los inventores son los primeros que han descubierto un ensayo de biomarcador que proporciona a los médicos una herramienta para identificar a las mujeres que están en riesgo de parto prematuro, incluso antes de quedar embarazadas o durante el embarazo, utilizando una prueba inmunológica no específica. La identificación de las mujeres en riesgo permite al médico centrarse mejor en las estrategias preventivas en estas mujeres y mejorar el resultado del embarazo. En una realización, la prueba se puede hacer en pequeñas cantidades de muestra de sangre obtenida del sujeto, siendo así mínimamente invasiva para el feto. La sangre puede ser extraída directamente en un tubo de prueba revestido con un estimulante; alternativamente la sangre puede ser enviada a un laboratorio para ser procesada y estimulada en el laboratorio. Además, la prueba puede repetirse muchas veces durante el curso del embarazo. Por lo tanto, proporciona una evaluación dinámica del riesgo de parto prematuro bajo la influencia de factores ambientales/fisiológicos cambiantes, así como requiere habilidades mínimas para extraer sangre en lugar de obtener líquido amniótico.

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

Como se utiliza en este documento, el término "parto prematuro" se refiere a un parto prematuro o afecciones asociadas con un parto prematuro, incluyendo, por ejemplo, un parto del niño antes de las 34 semanas de gestación.

"Biomarcador", "biomarcador de diagnóstico" o "biomarcador de parto prematuro" se refiere a un indicador molecular que está asociado con un estado patológico o fisiológico particular. El "biomarcador" como se utiliza en este documento es un indicador de riesgo de parto prematuro. El indicador puede ser una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina, antagonista del receptor de quimioquina o un agente inmunomodulador, incluyendo interleucinas e interferones. Ejemplos de "biomarcadores" incluyen, pero no se limitan a IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN-g, and TNF-a. Los biomarcadores de la presente invención incluyen IL-10, IL-13 y/o IL-1RA. Un "biomarcador" de la presente invención se puede detectar en una muestra.

"Muestra" o "una muestra biológica" se refiere a células o partes componentes, o una fracción o porción de los mismos de fluidos corporales, que incluyen, pero no se limitan a sangre (por ejemplo, sangre entera), líquido amniótico o sangre de cordón umbilical. Una "muestra" o "muestra biológica" se refiere además a plasma, suero, y/o células mononucleares de sangre periférica (PMBC).

Se describe un método para diagnosticar la susceptibilidad para el parto prematuro en mujeres no embarazadas o en mujeres embarazadas, que comprende obtener una muestra de la mujer y analizar la muestra para la presencia o ausencia de uno o más biomarcadores de diagnóstico, donde la presencia o ausencia de uno o más biomarcadores de diagnóstico es indicativa de susceptibilidad para el parto prematuro en la mujer.

En otra realización, la muestra comprende sobrenadante de PMBC. En otra realización, la muestra comprende sangre entera. En otra realización, la muestra comprende suero. En otra realización, el uno o más biomarcadores de diagnóstico comprenden un componente microbiano lipopolisacárido (LPS) u otra citoquina inducida por un estimulante inmune, un receptor de citoquina, un antagonista del receptor de citoquina, un receptor de quimioquina, un receptor de quimioquina y/o un perfil de expresión de antagonista del receptor de quimioquina. En otra realización, el uno o más biomarcadores de diagnóstico comprenden citoquina inflamatoria y/o anti-inflamatoria. En otras realizaciones, el uno o más biomarcadores de diagnóstico comprenden un receptor de citoquina, un antagonista del receptor de citoquina, una quimioquina, un receptor de quimioquina y/o un antagonista del receptor de quimioquina. En otra realización, los biomarcadores de diagnóstico se analizan en presencia de cortisol. En otra realización, la concentración de cortisol está en el intervalo de 1 µg/ml a 500 µg/ml, con un intervalo preferido de 1 µg/ml a 150 µg/ml. En otra realización, el uno o más biomarcadores de diagnóstico comprenden una expresión baja de IL-10, IL-13 y/o IL-1RA. En otra realización, la expresión baja de IL-10, IL-13 y/o IL-1RA comprende una disminución de 1 a 3 veces en la expresión en comparación con los niveles ordinariamente encontrados en un individuo sano.

Existen muchas técnicas fácilmente disponibles en el campo para detectar la presencia o ausencia de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina u otros biomarcadores, incluyendo microarrays de proteínas. Por ejemplo, algunos de los paradigmas de detección que pueden emplearse para este fin incluyen métodos ópticos, métodos electroquímicos

(técnicas de voltimetría y amperometría), microscopía de fuerza atómica y métodos de radiofrecuencia, por ejemplo, espectroscopia de resonancia magnética. Ilustrativos de métodos ópticos, además de microscopía, además de la microscopía, tanto confocal como no confocal, son detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas de acoplador de rejilla o interferometría) tal como ELISPOT.

De manera similar, hay cualquier número de técnicas que se pueden emplear para aislar y/o fraccionar biomarcadores. Por ejemplo, una citoquina, un receptor de citoquina, un antagonista del receptor de citoquina, una quimioquina, un receptor de quimioquina y/o un antagonista del receptor de quimioquina se pueden capturar utilizando reactivos de captura biospecíficos, tales como anticuerpos, aptámeros o anticuerpos que reconocen el biomarcador y las formas modificadas de la misma. Este método también podría resultar en la captura de interactores de proteínas que están unidos a las proteínas o que de otro modo son reconocidos por los anticuerpos y que ellos mismos pueden ser biomarcadores. Los reactivos de captura biospecíficos también pueden estar unidos a una fase sólida. A continuación, las proteínas capturadas pueden ser detectadas por espectrometría de masas SELDI o eluyendo las proteínas del reactivo de captura y detectando las proteínas eluidas por MALDI tradicional o por SELDI. Un ejemplo de SELDI se llama "espectrometría de masas por captura de afinidad", "captura de afinidad mejorada por superficie" o "SEAC", que implica el uso de sondas que tienen un material sobre la superficie de la sonda que captura analitos a través de una interacción de afinidad no covalente (adsorción) entre el material y el analito. Algunos ejemplos de espectrómetros de masas son el tiempo de vuelo, el sector magnético, el filtro cuadrupolar, la trampa de iones, la resonancia de ciclotrones iónicos, el analizador de sectores electrostáticos y los híbridos de estos.

Alternativamente, por ejemplo, se puede detectar la presencia de biomarcadores tales como una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina utilizando técnicas de inmunoensayo tradicionales. El inmunoensayo requiere reactivos de captura biospecíficos, tales como anticuerpos, para capturar los analitos. El ensayo también se puede diseñar para distinguir específicamente proteínas y formas modificadas de proteína, lo que puede hacerse empleando un ensayo en sándwich en el que un anticuerpo captura más de una forma y los segundos, anticuerpos claramente marcados, se unen específicamente y proporcionan una detección distinta de, las diversas formas. Los anticuerpos se pueden producir inmunizando animales con las biomoléculas. Los inmunoensayos tradicionales también pueden incluir inmunoensayos sándwich incluyendo ELISA o inmunoensayos basados en fluorescencia, así como otros inmunoensayos enzimáticos.

Antes de la detección, también se puede fraccionar una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina para aislarlos de otros componentes en una solución o de sangre que puedan interferir con la detección. El fraccionamiento puede incluir el aislamiento de los glóbulos blancos de otros componentes sanguíneos, el fraccionamiento subcelular de los componentes de glóbulos blancos y/o el fraccionamiento de la citoquina deseada, el receptor de citoquina, el antagonista del receptor de citoquina, la quimioquina, el receptor de quimioquina y/o el antagonista del receptor de quimioquina de otras biomoléculas encontradas en glóbulos blancos utilizando técnicas tales como cromatografía, purificación por afinidad, cartografía 1D y 2D, y otras metodologías para la purificación conocidas para los expertos en el arte. En una realización, se analiza una muestra por medio de un biochip. Los biochips comprenden generalmente sustratos sólidos y tienen una superficie generalmente plana, a la que está unido un reactivo de captura (también llamado un adsorbente o un reactivo de afinidad). Frecuentemente, la superficie de un biochip comprende una pluralidad de posiciones direccionables, cada una de las cuales tiene el reactivo de captura unido allí.

Alternativamente, por ejemplo, la presencia de biomarcadores tales como una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina se puede detectar utilizando técnicas de PCR o citometría de flujo. Se pueden usar todas las técnicas disponibles para la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o detección del antagonista del receptor de quimioquina.

Ensayos de diagnóstico de la invención

La invención proporciona diversos ensayos/pruebas de diagnóstico para predecir si las mujeres están en riesgo de parto prematuro.

Como se ha descrito anteriormente, en una instancia de la divulgación, la prueba de diagnóstico comprende extraer sangre de un paciente, separar las células sanguíneas (por ejemplo, separar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)), exponer las células separadas a un antígeno (por ejemplo, LPS) y la evaluación de la respuesta inmune.

En otra realización, la sangre entera puede estimularse ex vivo sin separar las células sanguíneas. Por ejemplo, la estimulación de sangre entera se puede llevar a cabo extrayendo sangre del sujeto a tubos de recolección recubiertos con un antígeno y/o estimulante y permitiendo que se incube a 37 grados Celsius, durante un tiempo deseado (por ejemplo, 16-24 horas). La respuesta inmune se puede evaluar posteriormente utilizando diversas técnicas conocidas en

la técnica. En una realización, después de recoger la sangre del sujeto e incubar con ella con el antígeno y/o el estimulante, los tubos de recogida se centrifugan, se recoge el plasma y se analiza la respuesta inmune.

En un caso, la sangre del sujeto es aspirada en tubos de recolección revestidos con antígenos, así como en tubos de recogida de control positivo y negativo. Los antígenos y/o estimulantes inducen una respuesta inmune, por ejemplo, induciendo la expresión de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina. Los antígenos o estimulantes que inducen la expresión de una citoquina, un receptor de citoquina, un antagonista del receptor de citoquina, una quimioquina, un receptor de quimioquina y/o un antagonista del receptor de quimioquina incluyen pero no se limitan a LPS, cortisol, fitohemaglutinina, antígenos de histocompatibilidad materna, antígenos de histocompatibilidad fetal, otros antígenos microbianos, citoquinas, ésteres de forbol (por ejemplo, acetato de miristato de forbol (PMA)), agentes que inducen la diferenciación del tipo Th1 o Th2 de linfocitos solos o combinación de los mismos.

En una realización adicional, la respuesta inmune inducida por los antígenos y/o estimulantes se puede evaluar ensayando la expresión de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina. Se pueden usar diversas técnicas para evaluar la respuesta inmune incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima en puntos (ELISpot), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo de microarrays, PCR cuantitativa, ensayo de transferencia Northern, ensayo de transferencia Southern, ensayo de transferencia Western, ensayo inmunohistoquímico o ensayo de unión. En una realización preferida, ELISpot se usa para evaluar la expresión de citoquinas y/o expresión de quimioquinas. Estos ensayos se pueden realizar en el sitio de la cama/consultorios médicos, en un laboratorio o durante el transporte al laboratorio. Para evaluar una respuesta inmune se pueden utilizar anticuerpos contra diversas citoquinas, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina. Estos anticuerpos pueden ser cualquiera de uno o más de un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, un anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y un anticuerpo de cadena única. En una realización, los anticuerpos se pueden conjugar con un radiomarcador, una enzima, un cromóforo o un fluoróforo para la detección de respuesta inmune.

Para determinar si una mujer presenta un riesgo aumentado de parto prematuro, los ensayos antes mencionados se llevan a cabo utilizando muestras de sangre de sujetos de ensayo que son mujeres no embarazadas y/o mujeres embarazadas. Los resultados obtenidos (por ejemplo, la respuesta inmune inducida que se mide en función de la expresión de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina) de los sujetos de ensayo se comparan con los resultados obtenidos de los sujetos control. En una realización, los sujetos de control son mujeres que tuvieron un parto a término. En otra realización, si el nivel de expresión de una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina en sujetos de ensayo es mayor o menor que el intervalo del nivel de expresión de la citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina en los sujetos de control, el sujeto de ensayo tiene un riesgo aumentado de parto prematuro.

La descripción proporciona además un kit de diagnóstico que comprende un tubo de recolección recubierto con un antígeno y/o estimulante, un tubo de recogida de control positivo y/o un tubo de recogida de control negativo. El kit comprende además reactivos para detectar una respuesta inmune (por ejemplo anticuerpos que se unen a una citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina y/o antagonista del receptor de quimioquina expresado), por ejemplo, anticuerpos para detectar la citoquina, receptor de citoquina, antagonista del receptor de citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina, y/o antagonista, soluciones reguladoras e instrucciones del receptor de quimioquina.

Se describen métodos para identificar una mujer no embarazada en riesgo de parto prematuro, que comprende: obtener una muestra de la mujer no embarazada, determinar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en la muestra y comparar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores con el nivel de expresión de biomarcadores de los observados en las mujeres que tuvieron un parto a término (controles). Dado que existe una variación individual, los valores de control constituirán un intervalo. Si el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en la muestra es mayor o menor que el nivel de expresión de los mismos biomarcadores en mujeres que tuvieron un parto a término (fuera del rango), entonces es indicativo que la mujer no embarazada está en riesgo de parto prematuro. Dependiendo de cuánto los valores del biomarcador del paciente están fuera del rango de los controles estándar, el riesgo de parto prematuro se puede determinar como "bajo, medio o alto". Los biomarcadores incluyen, pero no se limitan a IL-10, IL-13 y/o IL-1RA. La muestra puede comprender sobrenadante de PBMC/sangre entera estimulada (en presencia o ausencia de cortisol). Alternativamente, la muestra puede comprender suero.

Se describen métodos para diagnosticar la susceptibilidad del parto prematuro en una mujer, que comprende: obtener una muestra de la mujer, determinar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de diagnóstico en la muestra y comparar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores con el nivel de expresión de biomarcadores de mujeres que tuvieron un parto a término (rango normal). Si el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de diagnóstico en la muestra es mayor o menor que el nivel de expresión de los mismos biomarcadores de diagnóstico en las mujeres que

- 5 tuvieron un parto a término (rango normal), entonces es indicativo que la mujer está en riesgo para el parto prematuro. Los biomarcadores de diagnóstico pueden ser citoquinas inflamatorias y/o anti-inflamatorias. En otras realizaciones, los biomarcadores de diagnóstico pueden ser un receptor de citoquina, un antagonista del receptor de citoquina, un receptor de quimioquina y/o un antagonista del receptor de quimioquina. Los biomarcadores de diagnóstico seleccionados incluyen, pero no se limitan a IL-10, IL-13 y/o IL-1RA. Los niveles de expresión de biomarcadores que son al menos una a tres veces menos que (o mayores que, para otros biomarcadores) los niveles de expresión de un biomarcador de control son indicativos de parto prematuro. La muestra puede comprender sobrenadante de PBMC/sangre entera estimulada (en presencia o ausencia de cortisol). Alternativamente, la muestra puede comprender suero. Las mujeres pueden no estar embarazadas o embarazadas.
- 10 La presente divulgación también está dirigida a un kit para uso para determinar los riesgos de parto prematuro. El kit es útil para practicar el método inventivo para determinar el riesgo de parto prematuro de mujeres no embarazadas o embarazadas. El kit es un ensamblaje de materiales o componentes, incluyendo un bioensayo de diagnóstico de la presente divulgación.
- 15 La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit descrito depende de su propósito previsto. Por ejemplo, algunos kits están configurados con el propósito de diagnosticar la susceptibilidad de las mujeres para el parto prematuro. En un caso, el kit se configura particularmente con el propósito de determinar el riesgo de parto prematuro de mujeres no embarazadas. En otro caso, el kit se configura particularmente con el propósito de diagnosticar la susceptibilidad de las mujeres para el parto prematuro de mujeres embarazadas o no embarazadas.
- 20 Las instrucciones de uso pueden incluirse en el kit. Las "instrucciones para el uso" incluyen por lo general una expresión tangible que describe la técnica a emplear en el uso de los componentes del kit para lograr un resultado deseado, como determinar los riesgos de parto prematuro. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como tubos de ensayo especialmente preparados, diluyentes, soluciones reguladoras, portadores farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteado o de medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil como serán fácilmente reconocidos por aquellos expertos en el arte.
- 25 Los materiales o componentes ensamblados en el kit se pueden proporcionar al médico almacenado de cualquier manera conveniente y apropiada que preserve su operabilidad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; se pueden suministrar a temperatura ambiente, refrigerada o congelada. Los componentes están por lo general contenidos en material(es) de embalaje apropiado(s). Como se emplea en este documento, la frase "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para alojar el contenido del kit, tales como composiciones de la invención y similares. El material de embalaje se construye por métodos bien conocidos, preferiblemente para proporcionar un ambiente estéril, libre de contaminantes. Como se utiliza en este documento, el término "envase" se refiere a una matriz o material sólido apropiado tal como vidrio, plástico, papel, papel de plata y similares, capaz de sostener los componentes individuales del kit. Así, por ejemplo, un envase puede ser un tubo de recubrimiento recubierto con un antígeno y/o un estimulante para su uso para recoger y estimular una muestra biológica de una mujer. El material de embalaje tiene generalmente una etiqueta externa que indica el contenido y/o el propósito del kit y/o sus componentes.
- 30
- 35

Ejemplos

- Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente a efectos ilustrativos y no pretende limitar la invención.
- 40

Ejemplo 1

Ensayo de biomarcador

- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mujeres no embarazadas (al menos 5-6 años después del parto) con antecedentes de parto prematuro o a término, además del perfil de expresión de citoquinas inducido por lipopolisacárido (LPS) microbiano fueron examinados. Las PBMC se separaron de sangre entera utilizando gradiente de Ficoll. Se contaron las células y se sembró un número igual de células en placas de 24 pozos. Las PBMC se trataron con cortisol (50 o 300 µg/ml) o medio durante 1 hora antes de la estimulación con LPS (0, 1 o 100 µg/ml) durante 24 horas. Las PBMC se lisaron y el sobrenadante se examinó para detectar la expresión de citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias utilizando la tecnología Bioplex (Bio-rad). Los inventores descubrieron que, durante el estado no embarazado, la expresión de IL10, IL13 e IL1Ra era más baja en las PBMC obtenidas de mujeres que tenían parto prematuro previo y que esos biomarcadores pueden medirse para identificar mujeres que estaban en riesgo de parto prematuro en el futuro.
- 45
- 50

- En este estudio, dos pacientes fueron prematuros y cuatro fueron a término. Hubo 9 muestras por paciente (diseño 3x3) y todas las muestras de cada paciente se analizaron dos veces para las concentraciones de citoquinas con la excepción de un sujeto a término que sólo tenía un análisis de cada muestra. Como resultado, hay un total de 99 observaciones
- 55

para cada citoquina medida. El ensayo midió simultáneamente concentraciones de 11 marcadores inflamatorios: IL-1ra (antagonista del receptor de ILI), IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN-g, y TNF-a.

Ejemplo 2

Establecimiento de puntos de corte

- 5 Muchas muestras estuvieron por encima o por debajo de la detección para algunos de los puntos extremos. Se establecieron puntos de corte para cada citoquina medida (Tabla 1). Si una muestra estaba fuera del rango de detección, se asignó un valor predeterminado a la muestra como se indica a continuación.

Tabla 1. El establecimiento de puntos de corte para valores fuera de rango.

Citoquina	Límite de detección	Fuera de valor ajustado de rango	Fracción de muestras fuera del rango de detección
IL-1ra	todas las muestras dentro de los niveles de detección	n/a	0/99
IL-2	LL = 0.50	0.25	10/99
IL-4	LL = 0.14	0.08	6/99
IL-5	LL = 0.90	0.5	82/99
IL-8	UL = 95,000	100,000	79/99
IL-10	todas las muestras dentro de los niveles de detección	n/a	0/99
IL-12	LL = 0.33	0.15	19/99
IL-13	LL = 0.17	0.08	8/99
GM-CSF	LL = 1.18	0.60	11/99
IFN-g	LL = 1.21	0.60	5/99
TNF-a	todas las muestras dentro de los niveles de detección	n/a	0/99
LL = Límite inferior; UL = Límite superior			

- 10 Todas las muestras que estaban por debajo del intervalo de detección de IL-2, IL-4, IL-13 e IFN-g fueron de los dos sujetos con antecedentes de parto prematuro. De las 11 muestras ensayadas que estaban por debajo de los límites de detección de GM-CSF, sólo 1 era de un sujeto con un parto a término, mientras que el resto eran de sujetos con historias de partos prematuros.

Ejemplo 3

- 15 Análisis estadístico

Se presentan en este documento medios empíricos y errores estándar para cada citoquina y grupo de tratamiento. En este documento, los promedios de las medidas de repetición se calcularon primero para cada sujeto. A continuación, se tomaron la media y la SEM en cada grupo de tratamiento.

- 20 Todos los datos sin procesar se ensayaron a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos siguieron una distribución normal. Se realizaron transformaciones Log para todos los datos en los que se encontró una distribución no normal antes de más análisis estadístico. Para cada citoquina, un modelo de efectos mixtos se utilizó para examinar todos los datos de efectos significativos con la variable de resultado como la concentración de citoquinas; las variables predictoras fijas como la concentración de LPS, la concentración de cortisol y el estado del parto (prematuro o a término); y el efecto aleatorio debido a los puntos de datos replicados. Para probar la interacción de las

tres variables predictoras fijas en la concentración de citoquinas, tanto las interacciones de primer como de segundo nivel añadidas a cada modelo de citoquinas. La prueba post-hoc se realizó utilizando la prueba t de Student.

Ejemplo 4

Concentraciones de cortisol y LPS

- 5 Las 99 observaciones se usaron inicialmente en el análisis para determinar en primer lugar qué concentraciones de LPS y cortisol indujeron el efecto más robusto. Para todas las citoquinas medidas no hubo diferencias significativas entre los efectos de 1 µg/ml y 100 µg/ml de LPS. Para diversas citoquinas (IL-1ra, IL-10 e IL-13), 300 µg/ml de cortisol tuvo un efecto más significativo para suprimir los niveles de citoquinas que 50 µg/ml.
- 10 Como resultado de los hallazgos, los inventores se centraron en los datos con 0 o 300 µg/ml de pretratamiento de cortisol cruzado con 0 o 1 µg/ml de LPS. Esto da como resultado 4 muestras por sujeto, cada una de las cuales se analiza dos veces (con excepción de las muestras del sujeto a término que sólo tienen un análisis de cada muestra). Con 8 mediciones por sujeto (con la excepción del sujeto a término que sólo tiene 4 mediciones) esto da como resultado un conjunto de datos con 44 mediciones para cada una de las citoquinas.

Ejemplo 5

- 15 Análisis de las pruebas de diferencias de citoquinas entre los grupos

Utilizando la misma regresión de modelo mixto, se calcularon las medias de grupo estimadas y los errores estándar. Las diferencias entre los embarazos prematuro y a término fueron consideradas significativas cuando $p < 0.10$.

- 20 Basándose en los resultados del modelado estadístico, el cortisol suprimió la secreción de IL-13 e IL-1ra; LPS aumentó la secreción de IL-4, IL-10, IL-13, TNF-a e IL-1ra; y las mujeres que tuvieron partos prematuros tuvieron niveles de secreción de IL-10, IL-13 e IL-1ra en general más bajos (Tabla 2).

Tabla 2: Efectos globales del cortisol, LPS, y parto prematuro en los niveles de secreción de citoquinas en PBMC basado en los resultados de modelado mixto.

Citoquina	Efecto de cortisol	Efecto LPS	Efecto prematuro
IL-2	n/c, $p = .80$	n/c, $p = .50$	n/c, $p = .17$
IL-4	n/c, $p = .26$	aumento, $p = .07$	n/c, $p = .59$
IL-10	n/c, $p = .12$	aumento, $p = .01$	disminución, $p = .01$
IL-13	disminución, $p = .01$	aumento, $p = .04$	disminución, $p = .02$
IFN-g	n/c, $p = .10$	n/c, $p = .17$	n/c, $p = .22$
TNF-a	n/c, $p = .41$	aumento, $p = .04$	n/c, $p = .75$
GM-CSF	n/c, $p = .51$	n/c, $p = .19$	n/c, $p = .17$
IL-1ra	disminución, $p = .03$	aumento, $p = .09$	disminución, $p = .01$
n/c = Sin cambio			

- 25 Las mujeres que tuvieron partos prematuros tuvieron una expresión de IL-10, IL-13 e IL-1Ra basal más baja en comparación con aquellas que tuvieron un parto a término. No hubo diferencias en la producción de citoquinas entre las PBMC estimuladas con LPS de las mujeres que tuvieron un parto prematuro en comparación con las mujeres con partos a término. En otras palabras, ajustando los niveles de secreción no estimulada, la concentración de citoquinas liberadas de las estimuladas con LPS no fue diferente entre los dos grupos de mujeres. En presencia de PBMC de cortisol de mujeres que tuvieron partos prematuros produjeron menor expresión de IL-13 e IFN-g, en comparación con la de mujeres con partos a término.
- 30

Referencias

- Hutzel CE, Boyle EM, Kenyon SL, Nash JV, Winsor 5, Taylor DJ, Kirpalani H. Use of antibiotics for the treatment of preterm parturition and prevention of neonatal morbidity: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Dec; 199(6):620.e1-8. Epub 2008 Oct 30.
- 5 Swamy GK, Ostbye T, Skjaerven R. Association of preterm birth with long-term survival, reproduction, and next-generation preterm birth. *JAMA.* 2008 Mar 26;299(12):1429-36. Erratum in: *JAMA.* 2008 Jul 9;300(2):170-1.
- DeFranco E, Teramo K, Muglia L. Genetic influences on preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007 Jan;25(1):40-51.
- Plunkett J, Muglia LJ. Genetic contributions to preterm birth: implications from epidemiological and genetic association studies. *Ann Med.* 2008;40(3): 167-95.
- 10 Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008 Jan 5;371(9606):75-84.
- Blank V, Hirsch E, Challis JR, Romero R, Lye SJ. Cytokine signaling, inflammation, innate immunity and preterm labour - a workshop report. *Placenta.* 2008 Mar;29 Suppl A:S102-4.
- Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Pineles BL, Gotsch F, Mittal P, Than NG, Espinoza J, Hassan SS. Recurrent preterm birth. *Semin Perinatol.* 2007 Jun;31(3):142-58.
- 15 Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007 Jan;25(1):21-39.
- Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct; 11(5):317-26.
- 20 Luu TM, Ment LR, Schneider KC, Katz KH, Allan WC, Vohr BR. Lasting effects of preterm birth and neonatal brain hemorrhage at 12 years of age. *Pediatrics.* 2009 Mar;123(3):1037-44.
- Morse SB, Zheng H, Tang Y, Roth J. Early school-age outcomes of late preterm infants. *Pediatrics.* 2009 Apr;123(4):e622-9.
- Kamholz KL, Cole CH, Gray JE, Zupancic JA. Cost-effectiveness of early treatment for retinopathy of prematurity. *Pediatrics.* 2009 Jan; 123(1):262-9.
- 25 Limperopoulos C, Bassan H, Sullivan NR, Soul JS, Robertson RL Jr, Moore M, Ringer SA, Volpe JJ, du Plessis AJ. Positive screening for autism in ex-preterm infants: prevalence and risk factors. *Pediatrics.* 2008 Apr;121(4):758-65.
- Jacobs SE, O'Brien K, Inwood S, Kelly EN, Whyte HE. Outcome of infants 23-26 weeks of gestation pre and post surfactant. *Acta Paediatr* 2000; 89(8):959-965.
- 30 Hack M, Flannery DJ, Schluchter M, et al. Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 2002; 346(3):149-157.
- Genç, MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Jul;187(1):157-63.
- Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Dec 2;1:122.
- 35 Kalish RB, Vardhana S, Gupta M, Perni SC, Witkin SS, Interleukin-4 and -10 gene polymorphisms and spontaneous preterm birth in multifetal gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):702-6.
- Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Espinoza J, Kim CJ, Vaisbuch E, Than NG, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Mazar M, Yoon BH, Edwin S, Gomez R, Mittal P, Hassan SS, Sharma S. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: a role for interleukin-10. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008 Aug;21(8):529-47.
- 40 Berghella V, Hayes E, Visintine J, Baxter JK. Fetal fibronectin testing for reducing the risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8;(4):CD006843.
- Herbst A, Nilsson C. Diagnosis of early preterm labour. *BJOG.* 2006 Dec;113 Suppl 3:60-7. Review. Erratum in: *BJOG.* 2008 Apr;115(5):674-5.
- 45 Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, Casal D, Shah KD, Thung SN, Jones L, Deligdisch L, Garite TJ. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med.* 1991 Sep 5;325(10):669-74.

Honest H, Bachmann LM, Gupta JK, Kleijnen J, Khan KS. Accuracy of cervicovaginal fetal fibronectin test in predicting risk of spontaneous preterm birth: systematic review. *BMJ*. 2002 Aug 10;325(7359):301.

Most O, Langer O, Kerner R, David GB, Calderon I. Can myometrial electrical activity identify patients in preterm labor? *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Oct;199(4):378.e1-6.

- 5 Menon R, Camargo MC, Thorsen P, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-6 increase is an indicator of spontaneous preterm birth in white but not black Americans. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Jan;198(1):77.e1-7.

Vogel I, Goepfert AR, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Curry AH, Cliver S, Andrews WW. Early secondtrimester inflammatory markers and short cervical length and the risk of recurrent preterm birth. *J Reprod Immunol*. 2007 Oct;75(2):133-40. Epub 2007 Apr 17.

- 10 Kim KW, Romero R, Park HS, Park CW, Shim SS, Jun JK, Yoon BH. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Sep;197(3):292.e1-5.

Spong CY. Prediction and prevention of recurrent spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol*. 2007 Aug;110(2 Pt 1):405-15. Review.

- 15 Ghosh G, Breborowicz A, Brazert M, Maczkiewicz M, Kobelski M, Dubiel M, Gudmundsson S. Evaluation of third trimester uterine artery flow velocity indices in relationship to perinatal complications. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006 Sep; 19(9):551-5.

Leitch H. Secondary predictors of preterm labour. *BJOG*. 2005 Mar; 112 Suppl 1 :48-50. Review.

- 20 Challis JR. Maternal corticotropin-releasing hormone, fetal growth, and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Oct; 191 (4): 1059-60.

Heine RP, McGregor JA, Goodwin TM, Artal R, Hayashi RH, Robertson PA, Varner MW. Serial salivary estriol to detect an increased risk of preterm birth. *Obstet Gynecol*. 2000 Oct;96(4):490.

- 25 A menos que se indique específicamente, los inventores tienen la intención de que las palabras y frases en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones tengan los significados ordinarios y acostumbrados para los expertos en el arte aplicable.

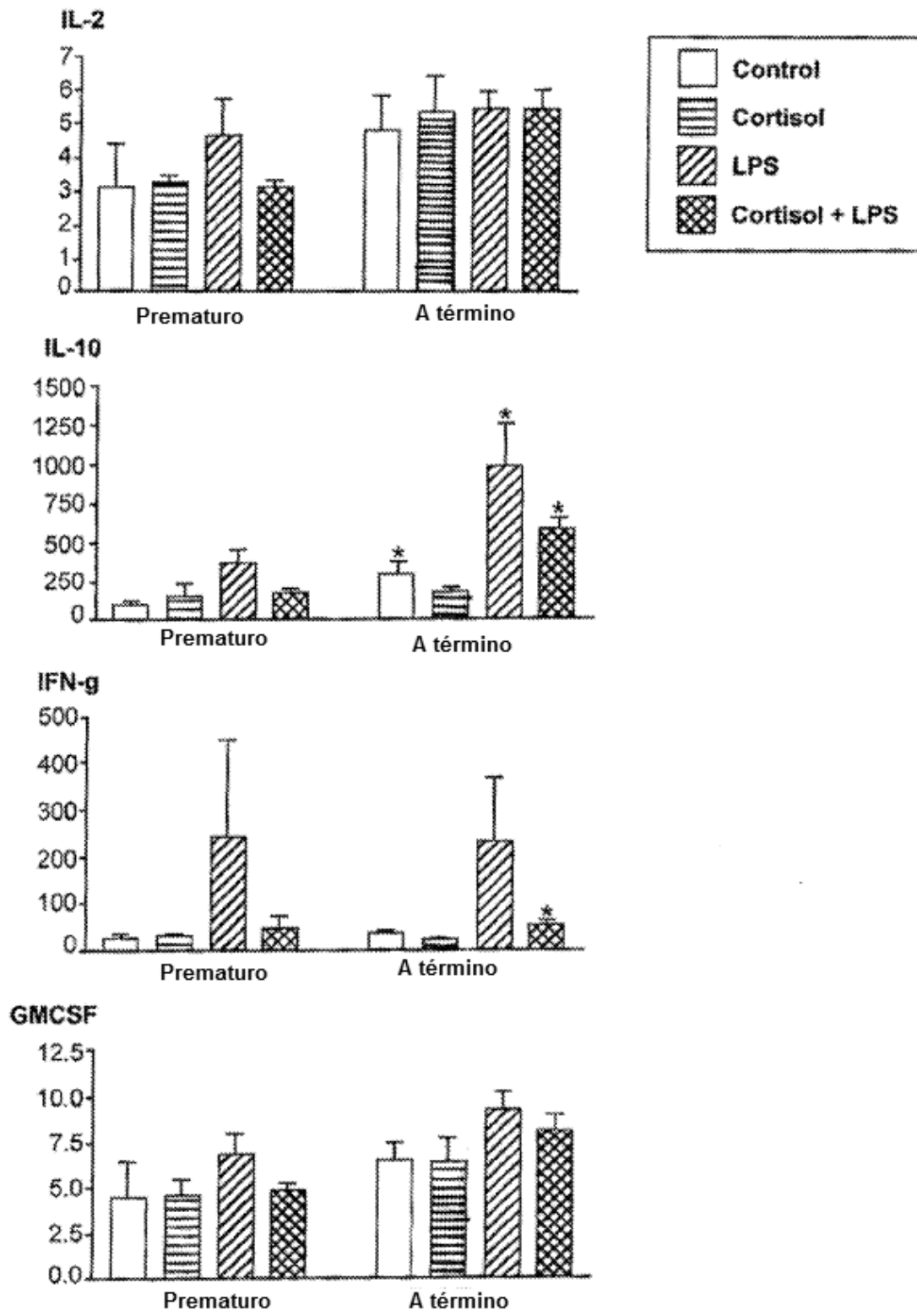
Se entenderá por los expertos en el arte que, en general, los términos utilizados en este documento se entienden generalmente como términos "abiertos" (por ejemplo, el término "incluyendo" debe interpretarse como "incluyendo, pero sin limitarse a," el término "teniendo" debe interpretarse como "teniendo al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye, pero sin limitarse a," etc.).

30

Reivindicaciones

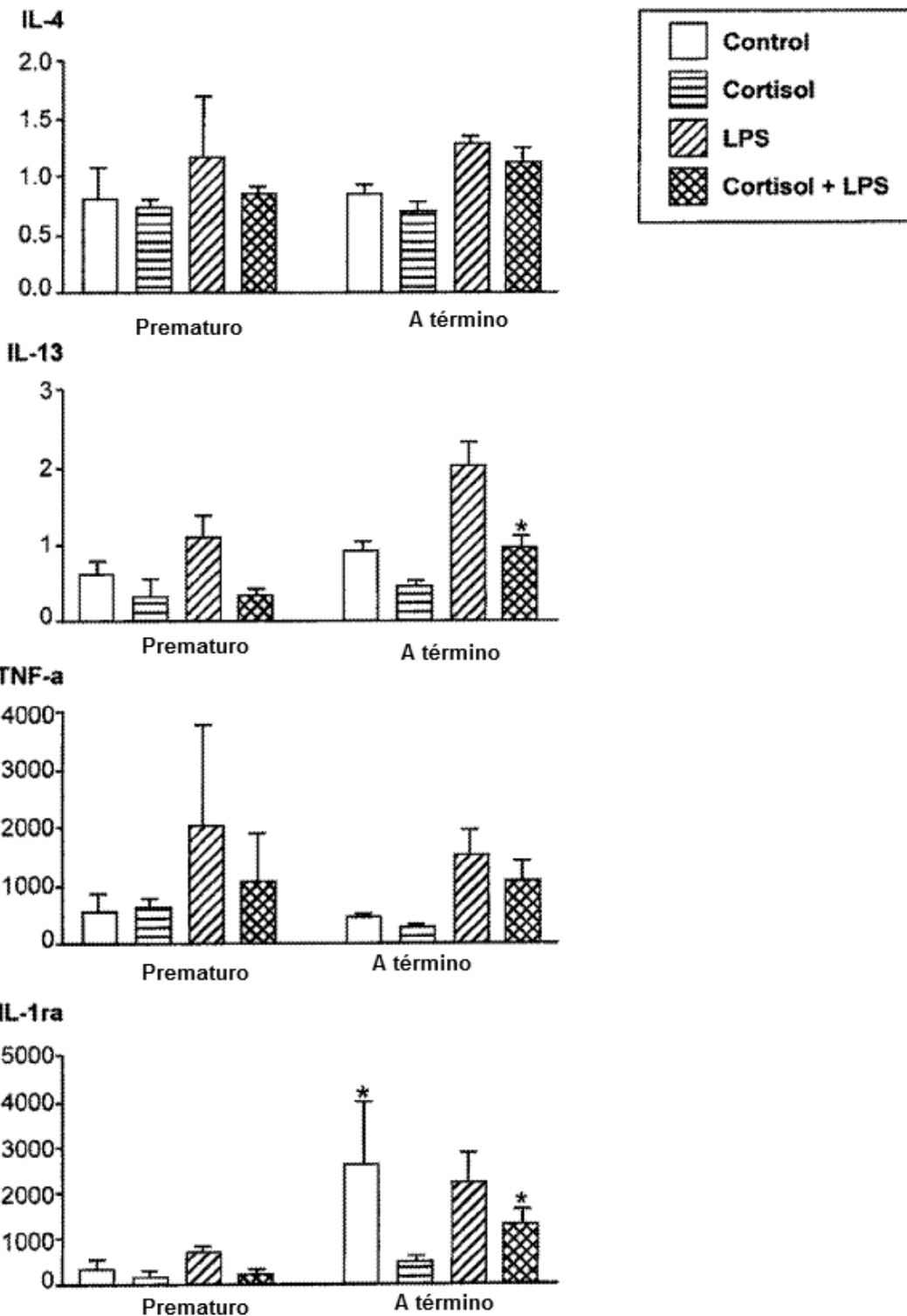
1. Un método ex vivo para identificar a una mujer en riesgo o diagnosticar la susceptibilidad de una mujer para parto prematuro, que comprende:
 - (a) estimular las células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") de una mujer, utilizando un antígeno y/o estimulante;
 - (b) determinar el nivel de secreción de una combinación de citoquinas de las PBMC estimuladas, en donde al menos dos citoquinas en la combinación se seleccionan entre IL-10, IL-13 e IL-1RA;
 - (c) comparar el nivel de secreción de la combinación medida en (b) con el nivel de secreción de la misma combinación de citoquinas de PBMC de control aisladas de mujeres que tuvieron un parto a término y estimuladas utilizando el mismo antígeno y/o estimulante;
 - (d) determinar si el nivel de secreción medido en (b) es más alto o más bajo que el nivel de secreción de las PBMC de control;identificando así si la mujer está en riesgo de parto prematuro.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la combinación comprende IL-1RA.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la combinación comprende dos de IL-10, IL-13 e IL-1RA.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la combinación comprende los tres de IL-10, IL-13 e IL-1RA.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antígeno y/o estimulante es fitohemaglutinina.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las PBMC se estimulan adicionalmente con un antígeno y/o estimulante distinto de la fitohemaglutinina.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la mujer no está embarazada.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la mujer está embarazada.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además repetir las etapas (a) a (d) múltiples veces durante el transcurso del embarazo de la mujer.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el nivel de secreción se determina utilizando un inmunoensayo.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las PBMC se aíslan de una muestra de sangre entera de la mujer antes de la estimulación.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las PBMC se estimulan en una muestra de sangre entera de la mujer.

FIG. 1A



* Diferencia significativa entre el grupo pretérmino tratado de forma similar ($p < 0.10$)

FIG. 1B



* Diferencia significativa entre el grupo pretérmino tratado de forma similar ($p < 0.10$)