

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 263**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/EP2012/072157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12784579 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2776839**

54 Título: **Dinámica de la razón de SFLT-1 o endoglina/PLGF como indicador para preeclampsia inminente y/o síndrome de HELLP**

30 Prioridad:

09.11.2011 EP 11188422

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DENK, BARBARA y
HUND, MARTIN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 650 263 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

Dinámica de la razón de sFlt-1 o endoglina/PLGF como indicador para preeclampsia inminente y/o síndrome de HELLP

5 La invención se refiere a herramientas y métodos de diagnóstico. Específicamente, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar si un sujeto embarazado corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto que comprende: (a) determinar las cantidades de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y P1GF en una primera y una segunda muestra de dicho sujeto, en el que dicha primera muestra se ha obtenido antes
10 que dicha segunda muestra, (b) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y P1GF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y P1GF determinadas en la segunda muestra y (c) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en
15 un factor de al menos $3 \pm 20\%$. La presente invención se refiere además a un método para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana. Además, la invención abarca dispositivos para llevar a cabo estos métodos. La presente divulgación se refiere a un sistema para realizar una evaluación optimizada de riesgo de desarrollar preeclampsia tal como se da a conocer en el presente documento y a reactivos y
20 kits usados en la realización de los métodos dados a conocer en el presente documento.

El embarazo puede complicarse de diferentes maneras, por un lado está asociado con la mortalidad relacionada con el embarazo de la mujer embarazada, y por otro lado también está asociado con la morbilidad aumentada del recién nacido. La mortalidad materna, a una tasa de 14,5 por 100.000 nacimientos vivos, es más frecuente en
25 mujeres embarazadas de más de 39 años de edad y puede estar provocada por hemorragia, embolia pulmonar trombótica, infecciones, cardiomiopatía y estados cardiovasculares y no cardiovasculares así como trastornos hipertensivos entre los cuales la preeclampsia es el más frecuente (Berg 2010, Obstetrics and Gynecology: 116: 1302 - 1309).

30 La preeclampsia complica aproximadamente del 2 al 8 por ciento de todos los embarazos y es un factor de contribución principal a la mortalidad materna y fetal a nivel mundial (Duley 2009, Semin Perinatol: 33: 130-37). La preeclampsia se define generalmente como hipertensión asociada o inducida por el embarazo. Está caracterizada por hipertensión y proteinuria. La hipertensión se define en este contexto como tensión arterial de 140 mmHg (sistólica) a 90 mmHg (diastólica) o más en dos medidas independientes, en la que dichas dos medidas se han
35 realizado con al menos 6 horas de separación. La proteinuria se indica mediante proteína a 300 mg/dl o más en una muestra de orina de 24 horas. Sin embargo, las definiciones de preeclampsia están sujetas a debate y pueden diferir entre sociedades. También se encuentran detalles en los libros de texto convencionales de medicina y las directrices de las diversas sociedades clínicas, por ejemplo, ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, n.º: 33, enero de 2002 o Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen de la Deutschen
40 Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., agosto de 2008.

La patogénesis de la preeclampsia se desconoce en gran medida. Sin embargo, se cree que está provocada por una función placentaria alterada asociada con remodelación alterada de la arteria espiral. Defectos del flujo que se producen en el proceso del desarrollo de preeclampsia están asociados con isquemia, que en última instancia da
45 como resultado la liberación de factores antiangiogénicos en la circulación tales como sFlt-1 y endoglina.

El único tratamiento de preeclampsia hasta ahora es la interrupción del embarazo mediante parto prematuro o bien vaginal o bien por cesárea. Tal como se comentó anteriormente, los riesgos para la madre y la viabilidad fetal se ven
50 significativamente alterados en caso de preeclampsia antes de la semana 34 de gestación. Por consiguiente, deben realizarse intentos por retrasar el parto y de ese modo mejorar la supervivencia del recién nacido.

El diagnóstico temprano y fiable de preeclampsia y, en particular, el tipo de aparición temprana de preeclampsia que se produce desde las 20 a 34 semanas de gestación, es decisivo para el tratamiento clínico de la enfermedad. Se entenderá que los sujetos femeninos embarazados que padecen preeclampsia necesitan cuidados especiales tal
55 como monitorización estrecha, medidas terapéuticas de apoyo y, en el caso de progresión hacia preeclampsia grave, hospitalización en hospitales especializados que tienen unidades de cuidados intensivos materno-fetales (UCIMF). En particular, la preeclampsia de aparición temprana presenta desafíos para los médicos a la vista de los efectos secundarios graves y los desenlaces adversos habituales asociados con la misma. Además, el diagnóstico temprano y fiable de preeclampsia así como la predicción de preeclampsia es decisivo para la planificación de
60 estudios de intervención preventiva o terapéutica (Ohkuchi 2011, Hypertension 58: 859-866).

Recientemente, se ha sugerido que factores angiogénicos y antagonistas de los mismos son indicadores para preeclampsia. En particular, se ha notificado que factor de crecimiento placentario (P1GF), endoglina y la tirosina cinasa de tipo fsm soluble 1 (sFlt-1) están alterados en pacientes que padecen preeclampsia. Además, la
65 notificación de los factores individuales y sus cambios en individuos sanos y pacientes que padecen preeclampsia o pacientes que corren el riesgo de desarrollar preeclampsia (véase, por ejemplo, Rana 2007, Hypertension 50: 137-

142; documento WO2004/008946), se han notificado las razones de sFlt-1 y P1GF o endoglina y PIGF como parámetros de diagnóstico o pronóstico.

El documento EP 2 037 278 A1 da a conocer un método para diagnosticar el estado angiogénico de un sujeto que padece infarto de miocardio que comprende determinar las cantidades de PLGF, sFLT1 y endoglina en una primera muestra de un sujeto obtenida tras el infarto de miocardio y en una segunda muestra de dicho sujeto obtenida tras dicha primera muestra y comparar dichas cantidades en la primera muestra con aquellas en la segunda muestra mediante lo cual se diagnostica el estado angiogénico. Levine *et al.* (2005), JAMA 293: 77-85 enseñan con respecto al factor de crecimiento placentario urinario y el riesgo de preeclampsia. Además, Levine *et al.* (2006), NEJM 355: 992-1005 se refiere a endoglina soluble y otros factores antiangiogénicos circulantes en preeclampsia. Además, Chen (2008), The Open Clinical Chemistry Journal 2:1-6 dio a conocer sFlt-1 como factor angiogénico novedoso para predecir preeclampsia. Ouyang *et al.* (2008), Archives of Gynecology and Obstetrics 280:91-97 dieron a conocer que la razón de sFlt-1 con respecto a PIGF en plasma está correlacionada con el estrés inflamatorio, pero no el oxidativo, en mujeres chinas con preeclampsia. Además, Simas *et al.* (2007), American Journal of Obstetrics & Gynecology 197:244.E1-244.E8 se refiere a factores angiogénicos para la predicción de preeclampsia en mujeres con alto riesgo. El documento WO 2011/067597 enseña un método para identificar si un sujeto embarazado tiene un riesgo aumentado de aborto espontáneo que comprende medir la concentración de al menos uno de receptor de factor de crecimiento endotelial vascular soluble (sFlt-1), factor de crecimiento placentario (PIGF) y proteínas C reactivas en una muestra biológica obtenida del sujeto, mientras que el documento WO 2006/034507 proporciona métodos para diagnosticar un trastorno de hipertensión relacionado con el embarazo o una propensión a desarrollar un trastorno de hipertensión relacionado con el embarazo midiendo el nivel o la actividad biológica de endoglina soluble, y el documento US 2007/0104707 enseña métodos para tratar un trastorno de hipertensión relacionado con el embarazo, tal como preeclampsia y eclampsia, usando combinaciones de compuestos que alteran los niveles de expresión o la actividad biológica de endoglina soluble y sFlt-1.

Se ha notificado una única razón para sFlt-1 y P1GF como factor de pronóstico para preeclampsia en la fase temprana del embarazo (Crispi 2008, Ultrasound Obstet Gynecol 31: 303-309). Además, se han correlacionado individualmente razones individuales de sFlt-1 y P1GF en diferentes puntos de tiempo del embarazo con un riesgo de preeclampsia (DeVivo 2008, Acta Obstetricia et Gynecologica 87: 837-842; Ohkuchi 2011, anteriormente citado; Kusanovic 2009, J of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 22(11): 1021-1038). Además, se ha investigado el grado de los cambios con respecto al pronóstico de preeclampsia (Kusanovic 2009, anteriormente citado).

Sin embargo, las razones investigadas hasta ahora no pudieron distinguir entre el tipo de aparición temprana y de aparición tardía de preeclampsia (DeVivo 2008, anteriormente citado). Aunque se ha notificado que pendientes de las razones de endoglina y P1GF determinadas en el segundo trimestre del embarazo están correlacionadas con el desarrollo de preeclampsia de aparición temprana en general, en la técnica anterior no ha habido ninguna notificación de un indicador para una preeclampsia inminente en sujetos femeninos embarazados aparentemente sanos.

Por tanto, aún no está disponible, pero no obstante se desea altamente, un ensayo fiable para identificar sujetos femeninos embarazados aparentemente sanos que corren el riesgo de desarrollar preeclampsia inminente y, en particular, preeclampsia de aparición temprana inminente.

Puede considerarse que el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios y métodos para cumplir con las necesidades mencionadas anteriormente. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación en el presente documento.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar si un sujeto embarazado corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto que comprende:

a) determinar las cantidades de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF en una primera y una segunda muestra de dicho sujeto, en el que dicha primera muestra se ha obtenido antes que dicha segunda muestra;

b) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra;

c) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm 20\%$.

El método de la presente invención es, preferiblemente, un método *ex vivo*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas anteriormente de manera explícita. Por ejemplo, etapas adicionales pueden referirse a tratamientos previos de muestra o evaluación de los resultados obtenidos mediante el método. El método puede llevarse a cabo de manera manual o asistida mediante automatización. Preferiblemente, la etapa (a), (b) y/o (c) puede realizarse total o parcialmente de manera asistida mediante automatización, por ejemplo, mediante un equipo

sensor o robótico adecuado para la determinación en la etapa (a), un algoritmo de cálculo implementado por ordenador en un dispositivo de procesamiento de datos en la etapa (b) o un algoritmo de comparación y/o diagnóstico en un dispositivo de procesamiento de datos en la etapa (c).

5 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un sistema para optimizar una evaluación de riesgo basándose en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados, que comprende

10 a) una unidad de analizador configurada para poner en contacto, *in vitro*, una parte de una segunda muestra de un sujeto embarazado con un ligando que comprende afinidad de unión específica por sFlt-1 y/o endoglina y configurada para poner en contacto, *in vitro*, una parte de una muestra de un sujeto embarazado con un ligando que comprende afinidad de unión específica por PIGF,

15 b) una unidad de analizador configurada para detectar una señal de las partes de la muestra del sujeto puestas en contacto con los ligandos,

c) un dispositivo de cálculo que tiene un procesador y en comunicación operativa con dichas unidades de análisis, y

20 d) unos medios legibles por ordenador no transitorios que incluyen una pluralidad de instrucciones ejecutables por un procesador, las instrucciones, cuando se ejecutan, calculan una cantidad de sFlt-1 y/o endoglina, calculan una cantidad de PIGF, calculan una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la muestra y comparan la razón así calculada con una primera razón obtenida a partir de una primera muestra, optimizando así la evaluación de riesgo basándose en la regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados.

25 El término "preeclampsia" tal como se usa en el presente documento se refiere a un estado médico que se caracteriza por hipertensión y proteinuria. La preeclampsia se produce en sujetos femeninos embarazados y la hipertensión también se denomina hipertensión inducida por el embarazo. Preferiblemente, se identifica que la hipertensión inducida por el embarazo está presente en un sujeto mediante dos medidas de tensión arterial de 140 mmHg (sistólica) a 90 mmHg (diastólica) o más, en la que dichas dos medidas se han realizado con al menos 30 6 horas de separación. Preferiblemente, se identifica que está presente proteinuria mediante proteína a 300 mg/dl o más en una muestra de orina de 24 horas. La preeclampsia puede progresar a eclampsia, un trastorno potencialmente mortal caracterizado por la aparición de convulsiones tónicas-clónicas o estados de coma. Síntomas asociados con preeclampsia grave son oliguria de menos de 500 ml en un plazo de 24 horas, alteración cerebral o visual, edema pulmonar o cianosis, dolor epigástrico o en el cuadrante superior derecho, función hepática alterada, 35 trombocitopenia, restricción del crecimiento fetal. Los sujetos que padecen preeclampsia con afectación hepática pueden desarrollar adicionalmente el síndrome de HELLP. Por consiguiente, un sujeto según la invención que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia, preferiblemente, también corre posiblemente el riesgo de desarrollar el síndrome de HELLP. El síndrome de HELLP está asociado con un riesgo alto de desenlaces adversos tales como desprendimiento placentario, insuficiencia renal, hematoma hepático subcapsular, preeclampsia recurrente, parto 40 prematuro o incluso muerte materna y/o fetal. Pueden encontrarse detalles adicionales de preeclampsia y los síntomas asociados así como las enfermedades posteriores tales como síndrome de HELLP o eclampsia en libros de texto de medicina convencionales o directrices de las sociedades médicas relevantes. Por ejemplo, pueden encontrarse detalles en ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician - Gynecologists, n.º: 33, enero de 2002 o Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen de la Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., agosto de 2008. Se produce preeclampsia en hasta el 10% de los embarazos habitualmente 45 en el segundo o el tercer trimestre. Sin embargo, algunos sujetos femeninos ya desarrollan preeclampsia en la semana 20 de gestación.

50 Dentro de las semanas 20 a 34 de gestación, la preeclampsia también se denomina preeclampsia de aparición temprana mientras que la preeclampsia que se produce después de la semana 34 de gestación también se denomina preeclampsia de aparición tardía. Se entenderá que la preeclampsia de aparición temprana está acompañada, habitualmente, por desenlaces adversos y efectos secundarios más graves en comparación con la preeclampsia de aparición tardía que habitualmente es relativamente leve.

55 La frase "corre el riesgo de desarrollar preeclampsia" se refiere a un sujeto embarazado que desarrollará preeclampsia dentro de un intervalo de tiempo de pronóstico en el futuro con una probabilidad aumentada de manera estadísticamente significativa en comparación con un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia. Preferiblemente, la probabilidad es de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o hasta el 100%. En otras partes en el 60 presente documento se encuentran detalles adicionales sobre la estadística.

65 El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y, más preferiblemente, seres humanos. El sujeto según la presente invención será un sujeto embarazado, es decir un sujeto femenino embarazado. Preferiblemente, el sujeto según la presente invención no mostrará síntomas de preeclampsia. Tales síntomas de preeclampsia son preferiblemente síntomas clínicos de preeclampsia tal como se especifica en otra parte en el presente documento. Más preferiblemente, dichos síntomas comprenden al menos un

síntoma seleccionado del grupo que consiste en: dolor epigástrico, cefalea, alteración visual y edema. Sin embargo, el sujeto según la presente invención también puede mostrar al menos uno de los síntomas mencionados anteriormente y, por tanto, puede sospecharse ya que padece preeclampsia.

- 5 Más preferiblemente, el sujeto embarazado según la presente invención está entre aproximadamente la semana 15 y aproximadamente la semana 34 de gestación, preferiblemente, entre aproximadamente la semana 15 y aproximadamente la semana 30 de gestación.

10 El método de la presente invención puede usarse en enfoques de examen de rutina de sujetos embarazados aparentemente sanos. Sin embargo, el sujeto embarazado previsto por la presente invención también puede pertenecer a un grupo de riesgo que tiene una prevalencia superior de preeclampsia. Sujetos embarazados que padecen adiposidad, hipertensión, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso, trombofilias o diabetes mellitus tienen una prevalencia aumentada para el desarrollo de preeclampsia en general. Lo mismo se aplica para sujetos que han padecido preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP en un embarazo anterior.

15 Además, sujetos femeninos ancianos que se quedan embarazados por primera vez también muestran una predisposición a desarrollar preeclampsia. Sin embargo, la probabilidad de desarrollar preeclampsia disminuye con el número de embarazos.

20 El término "diagnosticar" tal como se usa en el presente documento significa evaluar si un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto o no. Preferiblemente, dicho periodo de tiempo corto es un periodo de tiempo de menos de 4 semanas, preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 semanas, y, más preferiblemente, un periodo de tiempo de aproximadamente 16 días. Tal como entenderán los expertos en la técnica, habitualmente no se pretende que una evaluación de este tipo sea correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse. Sin embargo, el término requiere que la evaluación sea

25 correcta para una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la técnica puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin dificultad excesiva usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Intervalos de confianza preferidos son de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el

30 99%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 ó 0,0001.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Pueden obtenerse muestras de líquidos corporales mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferiblemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferiblemente, muestras de sangre, plasma o suero. Pueden obtenerse muestras de tejido u órgano a partir de cualquier tejido u órgano, por ejemplo, mediante biopsia. Pueden obtenerse células separadas a partir de los líquidos corporales o los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación celular. Preferiblemente, se obtienen muestras de células, tejidos u órganos a partir de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos mencionados en el presente documento.

35 40

La "primera muestra" según el método de la presente invención se ha obtenido antes que la "segunda muestra". Se entenderá que la primera muestra y la segunda muestra son muestras del mismo tipo de material de muestra, es decir, son del mismo tipo de líquido corporal, células, tejido u órgano. Además, la primera muestra se ha obtenido antes que la segunda muestra, preferiblemente, en dos investigaciones médicas habituales consecutivas durante el embarazo en las que la primera muestra se ha tomado en una investigación más temprana y la segunda muestra se ha tomado en una investigación posterior.

45

Preferiblemente, dicha primera muestra se ha obtenido de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 15 semanas, preferiblemente, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 6 semanas y, más preferiblemente, de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 semanas antes que dicha segunda muestra.

50

El término "sFlt-1" tal como se usa en el presente documento se refiere a polipéptido que es una forma soluble de la tirosina cinasa de tipo fms 1. El polipéptido también se denomina receptor de VEGF soluble 1 (sVEGF R1) en la técnica (véase, por ejemplo, Sunderji 2010, *Am J Obstet Gynecol* 202: 40e1-7). Se identificó en medio de cultivo acondicionado de células endoteliales de la vena umbilical humana. El receptor de sFlt1 endógeno es similar desde el punto de vista cromatográfico e inmunológico a sFlt1 humana recombinante y se une a [¹²⁵I]VEGF con una afinidad alta comparable. Se muestra que sFlt1 humana forma un complejo estabilizado por VEGF con el dominio extracelular de KDR/Flk-1 *in vitro*. Preferiblemente, sFlt1 se refiere a sFlt1 humana tal como se describe en Kendall 1996, *Biochem Biophys Res Commun* 226(2): 324-328; para secuencias de aminoácidos, véase también, por ejemplo, los números de registro de Genebank P17948, GI: 125361 para sFlt-1 humana y BAA24499.1, GI: 2809071 para sFlt-1 de ratón (Genebank está disponible de NCBI, EE.UU. en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez). El término también abarca variantes de los polipéptidos de sFlt-1 humana mencionados anteriormente. Tales variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que el polipéptido de sFlt-1 mencionado anteriormente. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si pueden detectarse mediante los mismos ensayos específicos mencionados en esta memoria descriptiva, por ejemplo,

55 60 65

mediante ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de sFlt-1. Además, debe entenderse que una variante, tal como menciona según la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácido en la que la secuencia de aminoácidos de la variante todavía es idéntica, preferiblemente, en al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 92%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a la secuencia de amino del polipéptido de sFlt-1 específico, preferiblemente a lo largo de toda la longitud de la sFlt-1 humana, respectivamente. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el grado de identidad debe determinarse comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de un intervalo de comparación, en el que el fragmento de secuencia de aminoácidos en el intervalo de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o proyecciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para una alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en el intervalo de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local tal como se da a conocer por Smith 1981, Add. APL. Math. 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman 1970, J. Mol. Biol. 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FAST, PASTA, y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para su comparación, preferiblemente se emplean GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, por tanto, el grado de identidad. Preferiblemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para el peso de hueco y 0,30 para la longitud de peso de hueco. Las variantes mencionadas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específicos de especie.

Las variantes mencionadas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específicos de especie. Además, las variantes mencionadas en el presente documento incluyen fragmentos o subunidades de los polipéptidos de sFlt-1 específicos o los tipos mencionados anteriormente de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales tal como se mencionó anteriormente. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de los polipéptidos de sFlt-1. Se considera que las variantes comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si pueden detectarse mediante los mismos ensayos específicos mencionados en esta memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de sFlt-1. En los ejemplos adjuntos se describe un ensayo preferido. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. Puede detectarse sFlt-1 en forma unida o libre o como cantidad de sFlt-1 total en una muestra.

El término "endoglina" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene un peso molecular de 180 kDa en forma no reducida, 95 kDa tras la reducción y 66 kDa en su forma reducida y N-desglicosilada. El polipéptido puede formar dímeros y se une a TGF- β y receptores de TGF- β . Preferiblemente, endoglina se refiere a endoglina humana. Más preferiblemente, la endoglina humana tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el número de registro de Genbank AAC63386.1, GI: 3201489. Se han descrito dos isoformas de endoglina, S-endoglina y L-endoglina. L-endoglina consiste en total en 633 aminoácidos con una cola citoplasmática de 47 aminoácidos mientras que S-endoglina consiste en 600 aminoácidos con una cola citoplasmática de 14 aminoácidos. Preferiblemente, endoglina tal como se usa en el presente documento es endoglina soluble. La endoglina soluble tal como se menciona en el presente documento se describe preferiblemente en el documento EP 1 804 836 B1. Además, debe entenderse que una variante tal como se menciona según la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácido en la que la secuencia de aminoácidos de la variante todavía es idéntica, preferiblemente, en al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 92%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a la secuencia de amino de la endoglina específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas, variantes de corte y empalme o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específicos de especie. Además, las variantes mencionadas en el presente documento incluyen fragmentos de la endoglina específica o los tipos mencionados anteriormente de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales tal como se mencionó anteriormente. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de endoglina. Se considera que las variantes comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si pueden detectarse mediante los mismos ensayos específicos mencionados en esta memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de endoglina. En los ejemplos adjuntos se describe un ensayo preferido. Se incluyen adicionalmente variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. Puede detectarse endoglina en forma unida o libre o como cantidad de endoglina total en una muestra.

El término "PIGF (factor de crecimiento placentario)" tal como se usa en el presente documento se refiere a un factor de crecimiento derivado de placenta que es un polipéptido que tiene 149 aminoácidos de longitud y que es

altamente homólogo a la región de tipo factor de crecimiento derivado de plaquetas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano. Al igual que VEGF, PIGF tiene actividad angiogénica *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la caracterización bioquímica y funcional de PIGF derivado de células COS-1 transfectadas reveló que es una proteína secretada dimérica glicosilada que puede estimular el crecimiento celular endotelial *in vitro* (Maqllione 1993, Oncogene 8(4):925-31). Preferiblemente, PIGF se refiere a PIGF humano, más preferiblemente, a PIGF humano que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el número de registro de Genebank P49763, GI: 17380553. El término abarca variantes de dicho PIGF humano específico. Tales variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que el polipéptido de PIGF específico. Se considera que las variantes comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si pueden detectarse mediante los mismos ensayos específicos mencionados en esta memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de PIGF. En los ejemplos adjuntos se describe un ensayo preferido. Además, debe entenderse que una variante tal como se menciona según la presente invención tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácido en la que la secuencia de aminoácidos de la variante todavía es idéntica, preferiblemente, en al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 92%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a la secuencia de amino de los polipéptidos de PIGF específicos. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos en la técnica y descritos en otra parte en el presente documento. Las variantes mencionadas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogos específicos de especie. Además, las variantes mencionadas en el presente documento incluyen fragmentos de los polipéptidos de PLGF específicos o los tipos mencionados anteriormente de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales tal como se mencionó anteriormente. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación o variantes de corte y empalme de los polipéptidos de PLGF. Se incluyen adicionalmente variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. Puede detectarse PIGF en forma unida o libre o como cantidad de PIGF total en una muestra.

Determinar la cantidad de cualquier péptido o polipéptido mencionado en esta memoria descriptiva se refiere a medir la cantidad o concentración, preferiblemente, de manera semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede realizarse directa o indirectamente. La medición directa se refiere a medir la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene a partir del propio péptido o polipéptido y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Una señal de este tipo (algunas veces denominada en el presente documento señal de intensidad) puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares medibles, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimática.

Según la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede lograrse mediante todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos y métodos de inmunoensayo que pueden usar moléculas marcadas en diversos formatos de tipo sándwich, de competición u otros formatos de ensayo. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de señal puede correlacionarse, preferiblemente, de manera directa o indirecta (por ejemplo inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Los métodos adecuados adicionales comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido tal como su masa molecular precisa o espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferiblemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo de unión a cobalto enzimático disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™), y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™).

Preferiblemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula que puede provocar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferiblemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen indicador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido. Según una realización preferida, dichas etapas de puesta en contacto, retirada y medición pueden realizarse mediante una unidad de analizador del sistema dado a conocer en el presente documento. Según algunas realizaciones, dichas etapas pueden realizarse mediante una única unidad de analizador de dicho sistema o mediante más de una unidad de analizador en comunicación operativa entre sí. Por ejemplo, según una realización específica, dicho sistema dado a conocer en el presente documento puede incluir una primera unidad de analizador para realizar dichas etapas de puesta en contacto y retirada y una segunda unidad de analizador, conectada operativamente a dicha primera unidad de analizador mediante una unidad de transporte (por ejemplo, un brazo

robótico), que realiza dicha etapa de medición.

También preferiblemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica que puede obtenerse a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Tal como se describió anteriormente, una señal de este tipo puede ser la intensidad de señal observada a una m/z variable específica para el péptido o polipéptido observada en espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

Determinar la cantidad de un péptido o polipéptido puede comprender, preferiblemente, las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) preferiblemente retirar ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión según la presente invención incluye tanto unión covalente como no covalente. Un ligando según la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o parejas de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácido nucleico o péptido. En la técnica se conocen bien métodos para preparar tales ligandos. Por ejemplo, proveedores comerciales también ofrecen la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados. El experto en la técnica está familiarizado con métodos para desarrollar derivados de tales ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Entonces pueden someterse a prueba estos derivados para determinar la unión según procedimientos de examen conocidos en la técnica, por ejemplo presentación en fagos. Los anticuerpos tal como se mencionan en el presente documento incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que pueden unirse a antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donador no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo de aceptor humano. Las secuencias de donador incluirán habitualmente al menos los residuos de aminoácido de unión a antígeno del donador pero también pueden comprender otros residuos de aminoácido estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donador. Tales híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica según la presente invención significa que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente a, es decir reaccionar de manera cruzada con, otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que va a analizarse. Preferiblemente, el péptido o polipéptido unido de manera específica no debe unirse con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferiblemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferiblemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si todavía puede distinguirse y medirse de manera inequívoca, por ejemplo según su tamaño en una inmunotransferencia de tipo Western, o mediante su abundancia relativamente superior en la muestra. La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen técnicas adecuadas adicionales para la determinación de un polipéptido o péptido.

En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo mediante RMN o resonancia de plasmón superficial. La medición de la unión de un ligando, según realizaciones preferidas, se realiza mediante una unidad de analizador de un sistema dado a conocer en el presente documento. Posteriormente, puede calcularse una cantidad de la unión medida mediante un dispositivo de cálculo de un sistema dado a conocer en el presente documento. En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede medirse midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo en una inmunotransferencia de tipo Western). Alternativamente, el propio ligando puede mostrar propiedades enzimáticas y puede ponerse en contacto el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando que se unió al péptido o polipéptido, respectivamente, con un sustrato adecuado que permite la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, preferiblemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también puede estar marcado con un marcador detectable antes de la reacción. Preferiblemente, se pone en contacto la muestra con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para producir una cantidad detectable, preferiblemente medible, de producto. En vez de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo detectable) de producto. En tercer lugar, el ligando puede acoplarse de manera covalente o no covalente con un marcador que permite la detección y medición del ligando. El marcaje puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcador directamente (de manera covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) de unión de ligando terciario al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se usa con frecuencia para aumentar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema de estreptavidina-biotina bien conocido (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas tal como se conoce en la técnica. Entonces tales etiquetas pueden ser dianas para ligandos

de orden superior. Las etiquetas adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta de His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta de myc, hemaglutinina (HA) del virus influenza A, proteína de unión a maltosa, y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta está preferiblemente en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal. Marcadores adecuados son cualquier marcador detectable mediante un método de detección apropiado.

5 Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (“por ejemplo, perlas magnéticas”, incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para detección incluyen di-amino-bencidina (DAB),
 10 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro-tetrazolio azul y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como disolución madre preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse según métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). En cuanto a la medición de la reacción enzimática, los criterios facilitados anteriormente se aplican de manera análoga. Los marcadores
 15 fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo de Texas, fluoresceína y los colorantes de Alexa (por ejemplo Alexa 568). Hay marcadores fluorescentes adicionales disponibles, por ejemplo, de Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Un marcador radiactivo puede detectarse mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película sensible a la luz o un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad. Los métodos de medición adecuados según la presente invención también incluyen precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada eléctricamente), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), pruebas inmunitarias enzimáticas de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de
 25 electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por disociación (DELFLIA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada por látex, o pruebas inmunitarias en fase sólida. Pueden usarse métodos adicionales conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, SDS-electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), inmunotransferencia de tipo Western y espectrometría de masas), solos o en combinación con marcaje u otros
 30 métodos de detección tal como se describió anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido puede determinarse, también preferiblemente, de la siguiente manera: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido tal como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido, (b) preferiblemente retirar péptido o
 35 polipéptido no unido así como material de muestra restante y (c) medir la cantidad péptido o polipéptido que está unido al soporte. El ligando se elige preferiblemente del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros y, preferiblemente, está presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. En la técnica se conocen bien materiales para fabricar soportes sólidos e incluyen, entre otros, materiales de columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas,
 40 partículas metálicas coloidales, superficies y chips de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, Duracyte, pocillos y paredes de bandeas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos portadores diferentes. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser o bien soluble o bien insoluble para los
 45 fines de la invención. Se conocen bien los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando e incluyen, pero no se limitan a, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla usar “matrices en suspensión” como matrices según la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En tales matrices en suspensión, el portador, por ejemplo una micropelícula o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes micropelículas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos.
 50 De manera general se conocen métodos de producción de tales matrices, por ejemplo basadas en química de fase sólida y grupos protectores fotolábiles (documento US 5.744.305).

El término “cantidad” tal como se usa en el presente documento abarca la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad o concentración relativa de dicho polipéptido o péptido así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con la misma o puede derivarse a partir de la misma. Tales valores o parámetros comprenden valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidos a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Además, quedan abarcados todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otra parte en esta descripción, por ejemplo, niveles de respuesta determinados a partir de sistemas de lectura biológica en respuesta a los péptidos o las señales de intensidad obtenidos a partir de ligandos unidos de
 60 manera específica. Debe entenderse que también pueden obtenerse valores que se correlacionan con las cantidades o los parámetros mencionados anteriormente mediante todas las operaciones matemáticas convencionales. Según realizaciones preferidas de la invención objeto, la determinación de una “cantidad” se realiza mediante el sistema dado a conocer, mediante lo cual un dispositivo de cálculo determina la “cantidad” basándose en etapas de puesta en contacto y de medición realizadas por una o más unidades de analizador de dicho sistema.
 65

El término “calcular una primera razón” o “calcular una segunda razón” tal como se menciona en el presente documento se refiere a calcular una razón de la cantidad de sFlt-1 o endoglina y la cantidad de P1GF dividiendo dichas cantidades o llevando a cabo cualquier otro cálculo matemático comparable que pone en una relación la cantidad de sFlt-1 o endoglina con respecto a la cantidad de P1GF. Preferiblemente, se divide la cantidad de sFlt-1 o endoglina entre la cantidad de P1GF con el fin de calcular la razón. Este cálculo se lleva a cabo para las cantidades respectivas determinadas en dicha primera y dicha segunda muestra proporcionando por separado la primera y la segunda razón, respectivamente.

El término “comparar” tal como se usa en el presente documento abarca comparar la primera razón con la segunda razón tal como se definió anteriormente. Debe entenderse que comparar tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier clase de comparación realizada entre el valor calculado para la primera razón y el valor calculado para la segunda razón. Se ha encontrado que un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia en los estudios subyacentes a la presente invención se correlaciona con un aumento del valor de la primera razón en un factor de aproximadamente 3 o para el valor de la segunda razón. La comparación mencionada en el método de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o mediante un dispositivo de cálculo (por ejemplo, de un sistema dado a conocer en el presente documento).

La comparación mencionada en la etapa (c) del método de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o de manera asistida por ordenador. El valor de las razones puede, por ejemplo, compararse uno con otro y dicha comparación puede llevarse a cabo de manera automática mediante un programa informático que ejecuta un algoritmo para la comparación. Como resultado de la comparación de los valores, se obtiene un valor de pendiente que indica el factor en el que difiere el valor de la segunda razón con respecto al valor de la primera razón. En una etapa adicional de la comparación, se determina si dicho valor de pendiente es igual, superior o inferior al factor de 3. Si el valor de pendiente es de aproximadamente 3 o mayor (es decir, cuando se observa un aumento de aproximadamente el 200% o más), se diagnosticará un riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto (“aceptar”). De manera similar, un valor de pendiente por debajo de un factor de 3 (es decir, cuando se observa un aumento de menos del 200%, un valor esencialmente sin alterar o una disminución) indicará que se diagnosticará que el sujeto no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto (“descartar”). Dicha evaluación del resultado de la comparación de los valores de primera y segunda razón también puede llevarse de manera automática. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Por ejemplo, un resultado de una comparación puede proporcionarse como datos en bruto (cantidades absolutas o relativas), y en algunos casos como indicador en forma de una palabra, frase, símbolo o valor numérico que puede ser indicativo de un diagnóstico particular. Dicho diagnóstico de aceptación y/o descarte puede proporcionarse por el dispositivo de cálculo de un sistema dado a conocer en el presente documento basándose en dicha comparación de la razón calculada con una primera o segunda razón tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un dispositivo de cálculo de un sistema puede proporcionar un indicador, en forma de una palabra, símbolo o valor numérico que es indicativo de un diagnóstico de aceptación o descarte.

El término “aproximadamente” en el contexto de la presente invención significa +/- 20%, +/- 10%, +/- 5%, +/- 2% o +/- 1% con respecto a los parámetros o valores indicados. Esto también tiene en cuenta desviaciones habituales provocadas por técnicas de medición y similares.

Ventajosamente, se ha encontrado en los estudios subyacentes a la presente invención que un fuerte aumento de la razón de las cantidades de sFlt-1 o endoglina y P1GF (razón de sFlt1/P1GF o endoglina/P1GF) en un sujeto embarazado que no muestra síntomas clínicamente evidentes de preeclampsia o muestra síntomas clínicamente evidentes de preeclampsia limitados en el momento en el que tomaron las muestras que se investigan es un indicador de una preeclampsia inminente, es decir el desarrollo de preeclampsia, en el plazo de un periodo corto de unas pocas semanas, y/o síndrome de HELLP inminente. Además, se ha encontrado que la preeclampsia desarrollada por dichos sujetos que corren el riesgo es habitualmente preeclampsia del tipo de preeclampsia de aparición temprana más grave. En particular, se encontró que un aumento en un factor de aproximadamente 3 o más es un indicador fiable y predictivo para la preeclampsia inminente mencionada anteriormente que funciona con una sensibilidad razonable y una especificidad de más del 98%. Sin embargo, un aumento más débil no se correlacionó muy bien con el desarrollo de preeclampsia inminente. De manera notable, el fuerte aumento tal como se especificó anteriormente fue predictivo independientemente de las cantidades absolutas reales o razones de los biomarcadores.

Gracias a la presente invención, es posible diagnosticar de manera más fiable el riesgo de preeclampsia inminente, en particular, preeclampsia de aparición temprana inminente, basándose en un indicador fiable que parece ser independiente de las cantidades absolutas reales de los biomarcadores mencionados anteriormente encontrados en un sujeto. Además, las medidas de diagnóstico que requieren mucho tiempo, caras y molestas tales como los sistemas de puntuación actuales pueden evitarse cuando se aplica el método de la invención como ayuda para el diagnóstico. La gestión de la atención sanitaria se beneficiará en gran medida del método de la presente invención ya que la necesidad de cuidados intensivos y especiales para sujetos femeninos embarazados que padecen preeclampsia puede estimarse mejor y tenerse en cuenta con fines de gestión de la atención sanitaria.

Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos realizadas anteriormente y a continuación se aplican en consecuencia para todas las realizaciones descritas en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas.

- 5 En una realización preferida del método de la presente invención, dicha preeclampsia es preeclampsia de aparición temprana.

10 Por consiguiente, el método de la invención permite diagnosticar si un sujeto corre un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia de aparición temprana en el plazo de un periodo de tiempo corto, en particular si el sujeto embarazado está entre la semana 15 y la semana 30 de gestación. Tal como se comentó anteriormente, la preeclampsia de aparición temprana tiene habitualmente consecuencias más graves que la preeclampsia de aparición tardía y los sujetos que padecen la misma necesitan medidas de apoyo con el fin de mejorar las consecuencias de la preeclampsia. Por ejemplo, los sujetos que corren riesgo pueden ingresarse en un hospital con unidad de cuidados intensivos maternofoetal en un estadio temprano.

15 En otra realización preferida del método de la presente invención, dicho método comprende además recomendar al menos una medida de apoyo para preeclampsia, si se diagnostica que el sujeto corre un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto.

20 El término "recomendar" tal como se usa en el presente documento significa establecer una propuesta de una medida de apoyo o combinaciones de las mismas que pueden aplicarse al sujeto. Sin embargo, debe entenderse que aplicar la terapia real, sea cual sea, no queda comprendido por el término.

25 Tal como se comentó anteriormente, un sujeto que padece preeclampsia requiere atención médica particular. Por tanto, si a un sujeto se le diagnostica que corre riesgo de desarrollar preeclampsia, tal diagnóstico puede ayudar a establecer medidas de apoyo adecuadas para el sujeto por adelantado, es decir antes de que la preeclampsia pase a ser clínicamente evidente. Preferiblemente, dicha al menos una medida de apoyo se selecciona del grupo que consiste en: monitorización estrecha, hospitalización, administración de agentes hipotensores y/o recomendaciones sobre el estilo de vida. Con respecto al feto, también puede recomendarse la administración de betametasona con el fin de mejorar las funciones respiratorias en el recién nacido en caso de un parto prematuro posterior.

30 La presente invención se refiere además a un método para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana que comprende:

35 a) determinar las cantidades de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF en una primera y una segunda muestra de dicho sujeto, en el que dicha primera muestra se ha obtenido antes que dicha segunda muestra;

40 b) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra;

45 c) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm$ el 20%.

Preferiblemente, dicha preeclampsia de aparición temprana se desarrolla en el plazo de un periodo de tiempo corto tal como se expone en detalle en otra parte en el presente documento.

50 También preferiblemente, dicha segunda muestra se ha obtenido no más tarde de aproximadamente la semana 30 de gestación, es decir antes de, o en, la semana 30 de gestación.

55 Tal como ya se comentó anteriormente, la identificación fiable de sujetos que corren el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana es una tarea decisiva en la gestión sanitaria. En particular, se requieren cuidados especiales para sujetos femeninos embarazados que padecen preeclampsia y, gracias a la presente invención, la necesidad de tales cuidados puede estimarse mejor y tenerse en cuenta con fines de gestión de la atención sanitaria. En particular, el método mencionado anteriormente permite incluso identificar un tipo de aparición temprana de preeclampsia si la segunda muestra se obtiene aproximadamente en la semana 30 de gestación. Se entenderá que preeclampsia en un sujeto que no muestra síntomas de preeclampsia o que sólo muestra síntomas de preeclampsia limitados hasta la semana 30 de gestación, es decir cuando se ha tomado la segunda muestra, se diagnosticará con toda probabilidad como preeclampsia que no es de aparición temprana ya que la preeclampsia clínicamente evidente se produce normalmente después de la semana 34 de gestación. Dado que el método mencionado anteriormente tiene en cuenta la dinámica de biomarcadores, permite diagnosticar de manera más fiable el tipo apropiado de preeclampsia.

65 La presente divulgación contempla, en general, el uso de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF o agentes de

detección que se unen específicamente a los mismos en una primera y una segunda muestra de un sujeto embarazado para diagnosticar si dicho sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto.

- 5 Preferiblemente, los biomarcadores o agentes de detección para los mismos pueden usarse, tal como se indica en el método mencionado anteriormente, para diagnosticar si dicho sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto en un sujeto embarazado. Más preferiblemente, se calcularán razones de sFlt-1 o endoglina y PIGF para la primera y la segunda muestra y posteriormente se compararán las razones entre sí con el fin de determinar el factor de aumento o alteración entre las dos razones, en el que un aumento en un factor de aproximadamente 3 o más va a usarse como indicador para un sujeto que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto.

15 Además, la presente divulgación también contempla, en general, el uso de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF o agentes de detección que se unen específicamente a los mismos en una primera y una segunda muestra de un sujeto embarazado para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana.

20 Preferiblemente, los biomarcadores o agentes de detección para los mismos pueden usarse tal como se indica en el método mencionado anteriormente para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana. Más preferiblemente, se calcularán razones de sFlt-1 o endoglina y PIGF para la primera y la segunda muestra y posteriormente se compararán las razones entre sí con el fin de determinar el factor de aumento o alteración entre las dos razones, en el que un aumento en un factor de aproximadamente 3 o más va a usarse como indicador para un sujeto que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana.

25 En un aspecto de la presente divulgación, se contempla un método para establecer una ayuda para optimizar una evaluación de riesgo basándose en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados, comprendiendo dicho método:

30 a) obtener una primera razón mediante (i) poner una primera muestra en contacto con un agente de detección (agentes de detección) que se une(n) específicamente a sFlt-1, endoglina y/o PIGF durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y los marcadores de la muestra, (ii) medir la cantidad del/de los complejo(s) formado(s), en el que dicha cantidad del/de los complejo(s) formado(s) es proporcional a la cantidad de los marcadores presentes en la muestra, (iii) transformar la cantidad del/de los complejo(s) formado(s) en cantidades de los marcadores que reflejan las cantidades de los marcadores presentes en la muestra, y (iv) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en dicha primera muestra;

40 b) obtener una segunda razón mediante (i) poner una segunda muestra en contacto con un agente de detección (agentes de detección) que se une(n) específicamente a sFlt-1, endoglina y/o PIGF durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y los marcadores de la muestra, (ii) medir la cantidad del/de los complejo(s) formado(s), en el que dicha cantidad del/de los complejo(s) formado(s) es proporcional a la cantidad de los marcadores presentes en la muestra, (iii) transformar la cantidad del/de los complejo(s) formado(s) en cantidades de los marcadores que reflejan las cantidades de los marcadores presentes en la muestra, y (iv) calcular una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en dicha segunda muestra;

50 c) comparar dicha primera razón con una segunda razón; y

d) establecer una ayuda para optimizar una evaluación de riesgo basándose en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados basándose en el resultado de la comparación realizada en la etapa c).

55 En otro aspecto de la presente divulgación, se contempla un sistema para establecer una ayuda para optimizar una evaluación de riesgo basándose en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados, que comprende:

60 a) una unidad de analizador configurada para poner en contacto, *in vitro*, una parte de una segunda muestra de un sujeto embarazado con un ligando que comprende afinidad de unión específica por sFlt-1 y/o endoglina y configurada para poner en contacto, *in vitro*, una parte de una muestra de un sujeto embarazado con un ligando que comprende afinidad de unión específica por PIGF,

65 b) una unidad de analizador configurada para detectar una señal de las partes de la muestra del sujeto puestas en contacto con los ligandos,

c) un dispositivo de cálculo que tiene un procesador y en comunicación operativa con dichas unidades de análisis, y

d) unos medios legibles por ordenador no transitorios que incluyen una pluralidad de instrucciones ejecutables por un procesador, las instrucciones, cuando se ejecutan, calculan una cantidad de sFlt-1 y/o endoglina, calculan una cantidad de PIGF, calculan una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la muestra y comparan la razón así calculada con una primera razón obtenida a partir de una primera muestra, optimizando así la evaluación de riesgo basándose en la regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados.

Un agente de detección adecuado puede ser, en un aspecto, un anticuerpo que se une específicamente al al menos un marcador, es decir un agente de detección que se une a sFlt-1, a endoglina o a PIGF, en una muestra de un sujeto que va a investigarse mediante el método de la invención. Otro agente de detección que puede aplicarse, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente al al menos un marcador en la muestra. En aún otro aspecto se retira la muestra del complejo formado entre el agente de detección y el al menos un marcador antes de la medición de la cantidad de complejo formado. Por consiguiente, en un aspecto, el agente de detección puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido. En aún otro aspecto, la muestra puede retirarse del complejo formado sobre el soporte sólido aplicando una disolución de lavado. El complejo formado será proporcional a la cantidad del al menos un marcador presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o sensibilidad del agente de detección que va a aplicarse define el grado de proporción de al menos un marcador comprendido en la muestra que puede unirse de manera específica. En otra parte en el presente documento también se encuentran detalles adicionales sobre cómo puede llevarse a cabo la determinación. La cantidad de complejo formado se transformará en una cantidad de al menos un marcador que refleja la cantidad realmente presente en la muestra. Una cantidad de este tipo, en un aspecto, puede ser esencialmente la cantidad presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, una cantidad que es una determinada proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.

En aún otro aspecto del método mencionado anteriormente, la etapa a) puede llevarse a cabo mediante una unidad de analizador, en un aspecto, una unidad de analizador tal como se define en otra parte en el presente documento.

La ayuda para optimizar una evaluación de riesgo se establece basándose en la comparación llevada a cabo en la etapa d) asignando el sujeto a un grupo de sujetos que tienen o bien un riesgo aumentado o bien un riesgo reducido tal como se expone en otra parte en el presente documento. Tal como ya se comentó en otra parte en el presente documento, la asignación del sujeto investigado puede no ser correcta en el 100% de los casos investigados. Además, los grupos de sujetos a los que se asigna el sujeto investigado son grupos artificiales en cuanto a que se establecen basándose en consideraciones estadísticas, es decir un determinado grado preseleccionado de probabilidad en base al cual funcionará el método de la invención. En un aspecto de la invención, la ayuda para optimizar una evaluación de riesgo se establece de manera automática, por ejemplo, de manera asistida por un dispositivo de cálculo o similar, tal como se describe y se da a conocer en el presente documento.

En un aspecto del método de la invención, dicho método comprende además una etapa de recomendar y/o tratar al sujeto según el resultado establecido en la etapa d) tal como se expone en detalle en otra parte en el presente documento, y/o adaptar la intensidad de la monitorización de la enfermedad.

En otro aspecto de la presente divulgación, se contempla un sistema para establecer una ayuda para optimizar una evaluación de riesgo basándose en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos con neumonía, que comprende:

a) una unidad de analizador configurada para poner en contacto, *in vitro*, una parte de una segunda muestra de un sujeto embarazado con un ligando que comprende afinidad de unión específica por sFlt-1 y/o endoglina y configurada para poner en contacto, *in vitro*, una parte de una muestra de un sujeto embarazado con un ligando que comprende afinidad de unión específica por PIGF,

b) una unidad de analizador configurada para detectar una señal de las partes de la muestra del sujeto puestas en contacto con los ligandos,

c) un dispositivo de cálculo que tiene un procesador y en comunicación operativa con dichas unidades de análisis, y

d) unos medios legibles por ordenador no transitorios que incluyen una pluralidad de instrucciones ejecutables por un procesador, las instrucciones, cuando se ejecutan, calculan una cantidad de sFlt-1 y/o endoglina, calculan una cantidad de PIGF, calculan una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la muestra y comparan la razón así calculada con una primera razón obtenida a partir de una primera muestra, optimizando así la evaluación de riesgo basándose en la regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados.

Un aspecto adicional de la presente divulgación incluye un sistema para optimizar una evaluación de riesgo basándose en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos embarazados. Los ejemplos de sistemas incluyen analizadores químicos clínicos, analizadores químicos de coagulación, analizadores de inmunoquímica,

analizadores de orina, analizadores de ácido nucleico, usados para detectar el resultado de reacciones químicas o biológicas o para monitorizar el progreso de reacciones químicas o biológicas. Más específicamente, los sistemas a modo de ejemplo de la presente divulgación pueden incluir analizadores Roche Elecsys™ Systems and Cobas® y de inmunoensayos, analizadores Abbott Architect™ y AxSYM™, analizadores Siemens Centaur™ e Immulite™, y analizadores Beckman Coulter UniCel™ y Access™, o similares.

La divulgación a modo de ejemplo del sistema puede incluir una o más unidades de analizador usadas para poner en práctica la divulgación objeto. Las unidades de analizador del sistema dado a conocer en el presente documento están en comunicación operativa con el dispositivo de cálculo dado a conocer en el presente documento mediante cualquiera de una conexión por cable, Bluetooth, LANS o señal inalámbrica, tal como se conoce. Adicionalmente, según la presente divulgación, una unidad de analizador puede comprender un aparato independiente o módulo dentro de un instrumento más grande, que realiza una o ambas de las detecciones, por ejemplo evaluación cualitativa y/o cuantitativa de muestras con fines de diagnóstico. Por ejemplo, una unidad de analizador puede realizar o ayudar con el pipeteo, dosificación, mezclado de muestras y/o reactivos. Una unidad de analizador puede comprender una unidad de contención de reactivos para contener reactivos para realizar los ensayos. Los reactivos pueden estar dispuestos, por ejemplo, en forma de recipientes o casetes que contienen reactivos individuales o grupo de reactivos, colocados en receptáculos o posiciones apropiados dentro de un compartimento de almacenamiento o transportador. Los reactivos de detección también pueden estar en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que se pone en contacto con la muestra. Además, una unidad de analizador puede incluir un componente de procesamiento y/o detección que puede optimizarse para análisis específicos.

Según una divulgación adicional, una unidad de analizador puede configurarse para la detección óptica de un analito, por ejemplo un marcador, con una muestra. Una unidad de analizador a modo de ejemplo configurada para la detección óptica comprende un dispositivo configurado para convertir energía electromagnética en una señal eléctrica, que incluye detectores ópticos tanto de un solo como de múltiples elementos o en matriz. Según la presente divulgación, un detector óptico puede monitorizar una señal electromagnética óptica y proporcionar una señal de salida eléctrica o señal de respuesta relativa a una señal de referencia indicativa de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra que se ubica en una trayectoria óptica. Tales dispositivos también pueden incluir, por ejemplo, fotodiodos, incluyendo fotodiodos de avalancha, fototransistores, detectores fotoconductores, matrices de sensores lineales, detectores de CCD, detectores de CMOS, incluyendo detectores de matriz de CMOS, fotomultiplicadores y matrices de fotomultiplicadores. Según determinadas divulgaciones, un detector óptico, tal como un fotodiodo o fotomultiplicador, puede contener electrónica de acondicionamiento o procesamiento de señales adicional. Por ejemplo, un detector óptico puede incluir al menos un preamplificador, filtro electrónico o circuito integrado. Los preamplificadores adecuados incluyen, por ejemplo, preamplificadores de integración, de transimpedancia y de ganancia de corriente (espejo de corriente).

Adicionalmente, una o más unidades de analizador según la presente divulgación pueden comprender una fuente de luz para emitir luz. Por ejemplo, una fuente de luz de una unidad de analizador puede consistir en al menos un elemento emisor de luz (tal como un diodo emisor de luz, una fuente de radiación activada por electricidad tal como una bombilla incandescente, una bombilla electroluminiscente, una bombilla de descarga de gas, una bombilla de descarga de alta intensidad, un láser) para medir concentraciones de analito en una muestra que está sometida a prueba o para permitir una transferencia de energía (por ejemplo, mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente o catalizando una enzima).

Además, una unidad de analizador del sistema puede incluir una o más unidades de incubación (por ejemplo, para mantener una muestra o un reactivo a una temperatura o un intervalo de temperatura especificado). En algunas divulgaciones, una unidad de analizador puede incluir un termociclador, incluyendo un termociclador en tiempo real, para someter una muestra a ciclos de temperatura repetidos y monitorizar un cambio en la cantidad de un producto de amplificación en la muestra.

Adicionalmente, una unidad de analizador del sistema dado a conocer en el presente documento puede comprender, o estar operacionalmente conectada a, una unidad de alimentación de cubeta o recipiente de reacción. Las unidades de alimentación a modo de ejemplo incluyen unidades de procesamiento de líquidos, tales como una unidad de pipeteado, para suministrar muestras y/o reactivos a los recipientes de reacción. La unidad de pipeteado puede comprender una aguja lavable reutilizable, por ejemplo una aguja de acero, o puntas de pipeta desechables. La unidad de analizador puede comprender además una o más unidades de mezclado, por ejemplo un agitador para agitar una cubeta que comprende un líquido, o una pala de mezclado para mezclar líquidos en una cubeta o recipiente de reactivo.

La presente divulgación se refiere además a un dispositivo adaptado para diagnosticar si un sujeto embarazado corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto llevando a cabo el método mencionado anteriormente que comprende:

a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección que se une específicamente a sFlt-1 y/o endoglina y un agente de detección que se une específicamente a PIGF, estando dicha unidad adaptada para determinar la cantidad de sFlt-1 y/o endoglina y la cantidad de PIGF en una primera y una segunda muestra de un sujeto

embarazado; y

b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para llevar a cabo las siguientes etapas de:

- 5
- i) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra; y
 - 10 ii) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos aproximadamente 3.

15 El término "dispositivo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sistema que comprende las unidades mencionadas anteriormente unidas operativamente entre sí para permitir el diagnóstico según los métodos de la invención. En otra parte en el presente documento se dan a conocer agentes de detección preferidos que pueden usarse para la unidad de análisis. La unidad de análisis (o unidad de analizador) comprende, preferiblemente, dichos agentes de detección en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que va a ponerse en contacto con la muestra que comprende los biomarcadores cuya cantidad va a determinarse. Además, la unidad de

20 análisis también puede comprender un detector que determina la cantidad de agente de detección que se une de manera específica al/a los biomarcador(es). La cantidad determinada puede transmitirse a la unidad de evaluación. Dicha unidad de evaluación comprende un elemento de procesamiento de datos, tal como un ordenador, con un algoritmo implementado para llevar a cabo un cálculo de razones, una comparación de dichas razones calculadas y una evaluación del resultado de la comparación mediante implementación de un algoritmo basado en ordenador que

25 lleva a cabo las etapas del método de la presente invención expuestas en detalle en otra parte en el presente documento. Los resultados pueden facilitarse como salida de datos en bruto de diagnóstico paramétrico. Debe entenderse que estos datos necesitarán habitualmente interpretación por parte del médico. Sin embargo, también se consideran dispositivos de sistema experto en los que la salida comprende datos en bruto de diagnóstico procesados cuya interpretación no requiere un médico especializado.

30 Según algunos aspectos de la presente divulgación, un algoritmo para llevar a cabo una comparación entre una primera razón y una segunda razón dado a conocer en el presente documento se implementa y realiza mediante ejecución de las instrucciones. Los resultados pueden facilitarse como salida de datos en bruto de diagnóstico paramétrico o como cantidades absolutas o relativas. Según diversos aspectos del sistema dado a conocer en el

35 presente documento, puede proporcionarse un "diagnóstico" por el dispositivo de cálculo de un sistema dado a conocer en el presente documento basándose en dicha comparación de las razones calculadas. Por ejemplo, un dispositivo de cálculo de un sistema puede proporcionar un indicador, en forma de una palabra, símbolo o valor numérico que es indicativo de un diagnóstico particular.

40 La presente invención se refiere además a un dispositivo adaptado para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana llevando a cabo el método mencionado anteriormente que comprende:

45 a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección que se une específicamente a sFlt-1 y/o endoglina y un agente de detección que se une específicamente a PIGF, estando dicha unidad adaptada para determinar la cantidad de sFlt-1 y/o endoglina y la cantidad de PIGF en una primera y una segunda muestra de un sujeto embarazado; y

50 b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para llevar a cabo las siguientes etapas de:

- 55
- i) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra; y
 - 60 ii) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm$ el 20%.

65 Además, se da a conocer un kit adaptado para llevar a cabo el método mencionado anteriormente para diagnosticar si un sujeto embarazado corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto que comprende agentes de detección para determinar las cantidades de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF así como instrucciones para llevar a cabo dicho método.

El término "kit" tal como se usa en el presente documento se refiere a una colección de los componentes

mencionados anteriormente, preferiblemente, proporcionados por separado o dentro de un único recipiente. El recipiente también comprende instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención. Estas instrucciones pueden estar en forma de un manual o pueden proporcionarse mediante un código de programa informático que puede llevar a cabo los cálculos y las comparaciones mencionados en los métodos de la presente invención y establecer un diagnóstico en consecuencia cuando se implementa en un ordenador o un dispositivo de procesamiento de datos. El código de programa informático puede dotarse de un dispositivo o medio de almacenamiento de datos tal como un medio de almacenamiento óptico (por ejemplo, un disco compacto) o directamente en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos. Además, el kit puede comprender, preferiblemente, cantidades de patrones para los biomarcadores tal como se describe en otra parte en el presente documento con fines de calibración.

La divulgación abarca además un kit adaptado para llevar a cabo el método mencionado anteriormente para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana que comprende agentes de detección para determinar las cantidades de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF así como instrucciones para llevar a cabo dicho método.

Figuras

La figura 1 muestra la distribución de la semana de gestación para los sujetos individuales en el estudio para el grupo de pacientes con desenlace de preeclampsia (PE) y los controles sanos. La primera visita, segunda visita y la diferencia de tiempo en días entre las visitas se muestran en los gráficos de cajas.

La figura 2 muestra razones de sFlt-1/PIGF para el grupo de PE y los controles sanos en diferentes visitas en escalas normal y logarítmica.

La figura 3 muestra diferencias de razones de sFlt-1/PIGF en comparación con edad gestacional y el punto de tiempo de la medición.

La figura 4 muestra un tiempo hasta el diagnóstico de PE/HELLP frente a ambos valores del gráfico de razón de sFlt-1/PIGF (izquierda) y las pendientes entre las razones de sFlt-1/PIGF a la primera y segunda visita de pacientes del grupo de PE/HELLP.

La figura 5 muestra razones de sFlt-1/PIGF a diferentes semanas de gestación (A) y razones de endoglina (sEng)/PIGF a diferentes semanas de gestación (B).

La figura 6 muestra razones de sEng/PIGF para el grupo de PE y los controles sanos en diferentes visitas en escalas normal y logarítmica.

La figura 7 muestra diferencias de razones de sEng/PIGF en comparación con la edad gestacional y el punto de tiempo de medición.

La figura 8 muestra un tiempo hasta el diagnóstico de PE/HELLP frente a ambos valores del gráfico de razón de sEng/PIGF (izquierda) y las pendientes entre las razones de sEng/PIGF en la primera y segunda visita de pacientes del grupo de PE/HELLP.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos meramente ilustrarán la invención. No deben interpretarse que limitan el alcance de la invención de ningún modo.

Ejemplo 1: Medición de niveles en sangre de PIGF, sFLT1 y endoglina

Se determinaron los niveles en sangre de sFLT1, PIGF y endoglina usando los inmunoensayos comercialmente disponibles. En particular, se usaron los siguientes ensayos.

Se determinó sFlt1 con inmunoensayos de tipo sándwich usando analizadores de la serie Roche Elecsys™, o cobas e™. El ensayo comprende dos anticuerpos monoclonales específicos para el polipéptido respectivo. El primero de estos anticuerpos está biotinilado y el segundo está marcado con un complejo de Tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II). En una primera etapa de incubación se incuban ambos anticuerpos con la muestra. Se forma un complejo de tipo sándwich que comprende el péptido que va a determinarse y los dos anticuerpos diferentes. En una etapa de incubación posterior, se añaden perlas recubiertas con estreptavidina a este complejo. Las perlas se unen a los complejos de tipo sándwich. Después se aspira la mezcla de reacción en una célula de medición en la que las perlas se capturan magnéticamente sobre la superficie de un electrodo. Después, la aplicación de una tensión induce una emisión quimioluminiscente a partir del complejo de rutenio que se mide mediante un fotomultiplicador. La cantidad de luz emitida depende de la cantidad de complejos de tipo sándwich en el electrodo. La prueba de sFlt-1 está

comercialmente disponible de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania. En el prospecto se encuentran detalles adicionales sobre el ensayo. El intervalo de medición de sFlt1 incluye cantidades de entre 10 y 85.000 pg/ml.

5 Se midió endoglina usando el inmunoensayo de endoglina humana/CD105 Quantikine™ que está comercialmente disponible de R&D Systems, Inc, Minneapolis, EE.UU. Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático de tipo sándwich cuantitativo. Se recubre previamente un anticuerpo monoclonal específico para endoglina sobre una microplaca. Se pipetea patrones y muestras en los pocillos y cualquier endoglina presente se une al anticuerpo inmovilizado. Tras eliminar mediante lavado cualquier sustancia no unida, se añade a los pocillos un anticuerpo monoclonal específico para endoglina unido a enzima. Tras un lavado para eliminar cualquier reactivo de anticuerpo-enzima no unido, se añade una disolución de sustrato a los pocillos y se desarrolla color en proporción a la cantidad de endoglina unida en la etapa inicial. Se detiene el desarrollo de color y se mide la intensidad del color. En el prospecto se encuentran detalles adicionales sobre el ensayo. El intervalo de medición de endoglina incluye cantidades de entre 0,001 ng/l y 10 ng/ml.

15 Se sometió a prueba PIGF usando dos anticuerpos específicos para PIGF en un inmunoensayo de tipo sándwich que se llevó a cabo en un analizador de la serie Elecsys™, o cobas e™, (véase más arriba para detalles). La prueba de PIGF está comercialmente disponible de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania. En el prospecto se encuentran detalles adicionales sobre el ensayo. El intervalo de medición de PIGF incluye cantidades de 3 a 10.000 pg/ml.

Ejemplo 2: Análisis de los biomarcadores sFlt-1 y PIGF en pacientes con desenlace que desarrollaron preeclampsia y en controles sanos

25 Se investigó un número total de 286 pacientes incluidos en diferentes centros en Europa. En el estudio se incluyeron mujeres embarazadas a una edad gestacional de al menos 15+0 y como máximo 30+0 semanas. Habitualmente los valores de referencia para la razón de sFlt-1/PIGF disminuyen ligeramente hasta aproximadamente la semana 28, por tanto no se esperaba un aumento fisiológico de valores en este intervalo de tiempo. El diagnóstico en cada visita de paciente incluida en el estudio era “sin preeclampsia o HELLP (PE/HELLP)” o “PE/HELLP sospechada”. El diagnóstico en el desenlace de estos pacientes puede ser PE/HELLP y en este caso se analizó si los valores crecientes son un indicador para un diagnóstico inminente de PE/HELLP. Todas las mujeres contribuyeron con dos visitas: su última visita antes de la semana 30+0 (visita 2) y una visita anterior (visita 1). En el caso de más de una opción para la visita 1, se selecciona la que está más próxima a 3 semanas antes de la visita 2.

35 Se determinaron los niveles en sangre de PIGF y sFlt-1 tal como se describió en el ejemplo 1 anterior y se evaluaron. En las siguientes tablas 1 a 11 se resumen los resultados:

Tabla 1: Diagnóstico en el desenlace final

	PE/HELLP	sin PE/HELLP
N	37	249

40

Tabla 2: Edad gestacional en la visita 1

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	16,14	20,00	21,71	24,57	28,00	21,83	3,43	37
sin PE/HELLP	15,00	20,29	21,86	24,14	28,57	21,70	3,02	249

45

Tabla 3: Edad gestacional en la visita 2

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	20,29	26,71	27,86	28,86	30,00	27,27	2,52	37
sin PE/HELLP	19,14	25,57	27,14	28,71	30,00	26,78	2,41	249

Tabla 4: Días entre visitas

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	14,00	28,00	34,00	47,00	90,00	38,11	17,33	37
sin PE/HELLP	5,00	28,00	32,00	41,00	96,00	35,53	14,40	249

50

Tabla 5: Razón de sFlt-1/PIGF en la visita 1

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	0,81	5,10	10,46	19,70	225,23	24,36	45,37	37
sin PE/HELLP	0,50	3,10	5,24	8,68	41,38	6,74	5,53	249

Tabla 6: Razón de sFlt-1/PIGF en la visita 2

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	1,48	4,58	9,77	88,96	856,23	72,86	155,23	37
sin PE/HELLP	0,44	1,85	3,25	5,30	40,67	4,94	5,72	249

5

Tabla 7: Cambio absoluto de la razón de sFlt-1/PIGF entre visitas

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	-17,94	-2,16	0,09	40,25	742,25	48,50	131,27	37
sin PE/HELLP	-21,40	-3,39	-1,59	-0,36	25,60	-1,81	4,61	249

Tabla 8: Ganancia en porcentaje de la razón de sFlt-1/PIGF

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	-75,84	-36,34	5,72	245,74	1691,91	182,84	372,92	37
sin PE/HELLP	-92,11	-51,93	-35,04	-10,63	309,43	-24,14	49,77	249

10

Tabla 9: Lista de pacientes con una ganancia de la razón de sFlt-1/PIGF del 100% o más

razón 1	razón 2	ganancia	visita 1	visita 2	PE/HELLP
10,13	20,42	101,7%	25 s + 4 d	29 s + 4 d	no
16,58	33,89	104,5%	26 s + 0 d	28 s + 6 d	no
4,69	9,77	108,5%	20 s + 4 d	28 s + 2 d	sí
156,22	340,90	118,2%	16 s + 6 d	20 s + 6 d	sí
5,82	13,06	124,2%	17 s + 1 d	30 s + 0 d	sí
8,00	18,31	128,7%	19 s + 6 d	27 s + 6 d	sí
6,28	14,39	129%	24 s + 6 d	29 s + 0 d	no
2,34	5,43	131,9%	23 s + 1 d	27 s + 4 d	sí
9,85	23,02	133,8%	24 s + 1 d	29 s + 1 d	no
3,39	8,04	137,1%	24 s + 1 d	28 s + 1 d	no
1,21	3,76	210,3%	24 s + 3 d	28 s + 5 d	no
5,59	18,20	225,4%	24 s + 0 d	27 s + 6 d	sí
37,29	128,92	245,7%	26 s + 0 d	29 s + 1 d	sí
1,71	5,95	247,2%	24 s + 3 d	28 s + 3 d	no
13,62	53,87	295,5%	28 s + 0 d	30 s + 0 d	sí
8,27	33,97	309,4%	23 s + 6 d	29 s + 6 d	no
20,60	88,96	331,9%	25 s + 5 d	29 s + 4 d	sí
32,30	144,39	347%	25 s + 1 d	29 s + 1 d	sí
30,24	138,30	357,4%	24 s + 4 d	28 s + 4 d	sí
113,98	856,23	651,2%	25 s + 1 d	27 s + 6 d	sí
19,70	167,62	750,8%	24 s + 5 d	28 s + 0 d	sí
13,86	124,57	799%	20 s + 0 d	27 s + 1 d	sí
20,99	239,20	1039,8%	25 s + 6 d	29 s + 6 d	sí
0,81	14,50	1691,9%	21 s + 0 d	27 s + 0 d	sí

15

Tabla 10: Ganancia clasificada en categorías de la razón de sFlt-1/PIGF frente al desenlace final

	PE/HELLP	[%]	sin PE/HELLP	[%]
ganancia < 0%	17	45,9	201	80,7
ganancia 0-100%	4	10,8	40	16,1
ganancia 100-200%	5	13,5	5	2,0
ganancia > 200%	11	29,7		1,2
Suma	37	100,0	249	100,0

Tabla 11: Sens./espec. dependiendo de la ganancia como punto de corte

punto de corte al 100%	Sensibilidad	43,2	%
	Especificidad	96,8	%
punto de corte al 200%	Sensibilidad	29,7	%
	Especificidad	98,8	%

20 El presente estudio europeo de PE permite la observación de que un fuerte aumento de la razón de sFlt-1/PIGF (en esta propuesta, de tres veces o más) parece ser un claro indicador de PE/HELLP inminente.

Ejemplo 3: Análisis de los biomarcadores endoglina y PIGF en pacientes con desenlace que desarrollaron preeclampsia y en controles sanos

- 5 Se investigaron muestras de pacientes similares a las mencionadas en el ejemplo 2 para determinar los niveles en sangre de PIGF y endoglina (s-Eng) y se evaluaron. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 12: Razón de sEng/PIGF en la visita 1

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	0,00	0,02	0,06	0,12	0,30	0,08	0,08	21
sin PE/HELLP	0,01	0,01	0,02	0,03	0,09	0,02	0,02	16

10

Tabla 13: Razón de sEng/PIGF en la visita 2

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	0,00	0,02	0,08	0,75	2,76	0,45	0,68	21
sin PE/HELLP	0,01	0,01	0,01	0,02	0,07	0,02	0,02	16

Tabla 14: Cambio absoluto de la razón de sEng/PIGF entre visitas

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	-0,09	-0,00	0,08	0,61	2,45	0,36	0,62	21
sin PE/HELLP	-0,06	-0,02	-0,00	-0,00	0,06	-0,01	0,02	16

15

Tabla 15: Ganancia en porcentaje de la razón de sEng/PIGF

	Mín.	Cu. 25	Mediana	Cu. 75	Máx.	Media	DE	N
PE/HELLP	-71,51	-19,28	117,78	641,20	1200,02	300,11	405,51	21
sin PE/HELLP	-81,01	-51,63	-37,34	-21,20	372,91	1,33	119,40	16

20

Tabla 16: Lista de pacientes con una ganancia de la razón de sEng/PIGF del 100% o más

razón 1	razón 2	ganancia	visita 1	visita 2	PE/HELLP
0,09	0,20	117,8%	26 s + 0 d	29 s + 1 d	sí
0,01	0,02	215,5%	24 s + 3 d	28 s + 3 d	no
0,10	0,34	236%	25 s + 5 d	29 s + 4 d	sí
0,04	0,13	245,8%	24 s + 0 d	27 s + 6 d	sí
0,17	0,65	269,9%	28 s + 0 d	30 s + 0 d	sí
0,02	0,07	372,9%	23 s + 6 d	29 s + 6 d	no
0,14	0,75	419,7%	25 s + 1 d	29 s + 1 d	sí
0,18	1,33	641,2%	24 s + 4 d	28 s + 4 d	sí
0,10	0,81	688,1%	24 s + 5 d	28 s + 0 d	sí
0,30	2,76	809,1	25 s + 1 d	27 s + 6 d	sí
0,12	1,15	830,9%	20 s + 0 d	27 s + 1 d	sí
0,08	0,96	1051,8%	25 s + 6 d	29 s + 6 d	sí
0,01	0,08	1200%	21 s + 0 d	27 s + 0 d	sí

Tabla 17: Ganancia clasificada en categorías de la razón de sEng/PIGF frente al desenlace final

	PE/HELLP	[%]	sin PE/HELLP	[%]
ganancia < 0%	7	33,3	14	87,5
ganancia 0-100%	3	14,3	0	0,0
ganancia 100-200%	1	4,8	0	0,0
ganancia > 200%	10	47,6	2	12,5
Suma	21	100,0	16	100,0

- 25 Usando el 100% / el 200% de ganancia como punto de corte, esto puede convertirse en términos de sensibilidad / especificidad clínicas:

Tabla 18: Sens./espec. dependiendo de la ganancia como punto de corte

punto de corte al 100%	Sensibilidad	52,4	%
	Especificidad	87,5	%
punto de corte al 200%	Sensibilidad	47,6	%
	Especificidad	87,5	%

5 Las diferentes razones determinadas para sFlt-1 y PlGF en diferentes punto de tiempos de gestación para pacientes con preeclampsia y controles sanos también se indican gráficamente en la figura 5A. Se ha mostrado el mismo gráfico para las razones de endoglina/PlGF; figura 5B. Resulta evidente que las razones de sFlt-1/PlGF y endoglina/PlGF muestran una distribución similar y, por tanto, son factores de predicción similares para el desarrollo de preeclampsia.

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar si un sujeto embarazado corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto que comprende:
- 5
- a) determinar las cantidades de los biomarcadores tirosina cinasa de tipo fms soluble 1 (sFlt-1) o endoglina y factor de crecimiento placentario (PIGF) en una primera y una segunda muestra de dicho sujeto, en el que dicha primera muestra se ha obtenido antes que dicha segunda muestra;
- 10
- b) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra;
- 15
- c) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm 20\%$.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha primera muestra se ha obtenido de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 semanas antes que dicha segunda muestra.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho sujeto embarazado está entre aproximadamente la semana 15 y aproximadamente la semana 34 de gestación, preferiblemente, entre aproximadamente la semana 15 y aproximadamente la semana 30 de gestación.
- 25
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho periodo de tiempo corto es un periodo de tiempo de menos de 4 semanas, preferiblemente, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 semanas.
- 30
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha preeclampsia es preeclampsia de aparición temprana.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho método comprende además recomendar al menos una medida de apoyo para preeclampsia, si se diagnostica que el sujeto corre un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto.
- 35
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha al menos una medida de apoyo se selecciona del grupo que consiste en: monitorización estrecha, hospitalización, administración de agentes hipotensores y/o recomendaciones sobre el estilo de vida.
- 40
8. Método para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana que comprende:
- 45
- a) determinar las cantidades de los biomarcadores sFlt-1 o endoglina y PIGF en una primera y una segunda muestra de dicho sujeto, en el que dicha primera muestra se ha obtenido antes que dicha segunda muestra;
- 50
- b) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra;
- 55
- c) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm 20\%$.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha primera muestra se ha obtenido de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 semanas antes que dicha segunda muestra.
- 60
10. Método según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicho sujeto embarazado está entre aproximadamente la semana 15 y aproximadamente la semana 34 de gestación, preferiblemente, entre aproximadamente la semana 15 y aproximadamente la semana 30 de gestación.
- 65
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha primera y dicha segunda muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.
12. Dispositivo adaptado para diagnosticar si un sujeto embarazado corre el riesgo de desarrollar preeclampsia

en el plazo de un periodo de tiempo corto llevando a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 11 que comprende:

5 a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección que se une específicamente a sFlt-1 y/o endoglina y un agente de detección que se une específicamente a PIGF, estando dicha unidad adaptada para determinar la cantidad de sFlt-1 y/o endoglina y la cantidad de PIGF en una primera y una segunda muestra de un sujeto embarazado; y

10 b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para llevar a cabo las siguientes etapas de:

15 i) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra; y

20 ii) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia en el plazo de un periodo de tiempo corto si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm 20\%$.

25 13. Dispositivo adaptado para diferenciar entre un sujeto embarazado que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana y un sujeto embarazado que no corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana llevando a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 que comprende:

30 a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección que se une específicamente a sFlt-1 y/o endoglina y un agente de detección que se une específicamente a PIGF, estando dicha unidad adaptada para determinar la cantidad de sFlt-1 y/o endoglina y la cantidad de PIGF en una primera y una segunda muestra de un sujeto embarazado; y

b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para llevar a cabo las siguientes etapas de:

35 i) calcular una primera razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la primera muestra y una segunda razón a partir de dichas cantidades de sFlt-1 o endoglina y PIGF determinadas en la segunda muestra; y

40 ii) comparar el valor de dicha primera y dicha segunda razón, mediante lo cual se diagnostica que un sujeto corre el riesgo de desarrollar preeclampsia de aparición temprana si el valor de la segunda razón está aumentado en comparación con el valor de la primera razón en un factor de al menos $3 \pm 20\%$.

Fig. 1

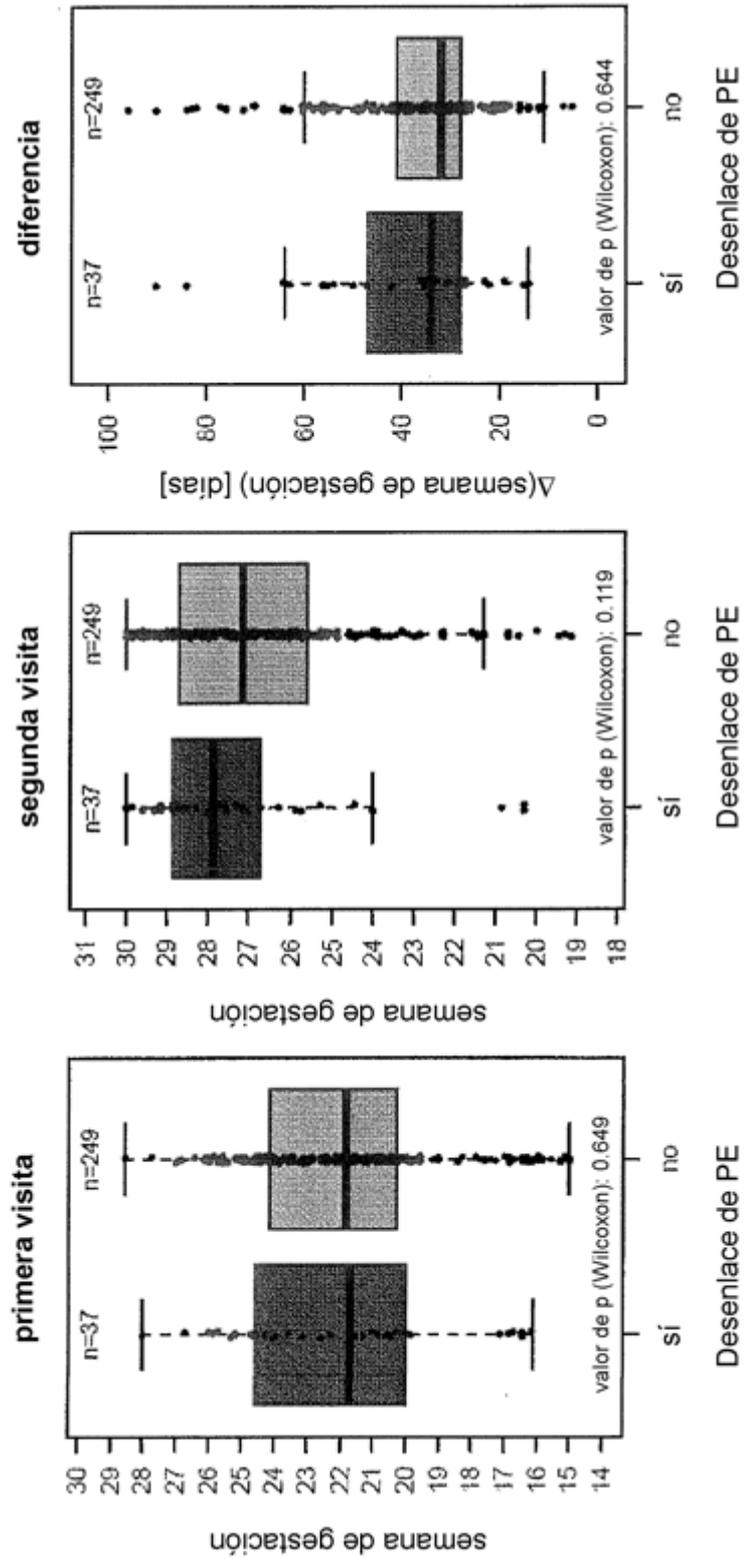


Figura 1: Edad gestacional en las visitas y diferencia

Fig. 2

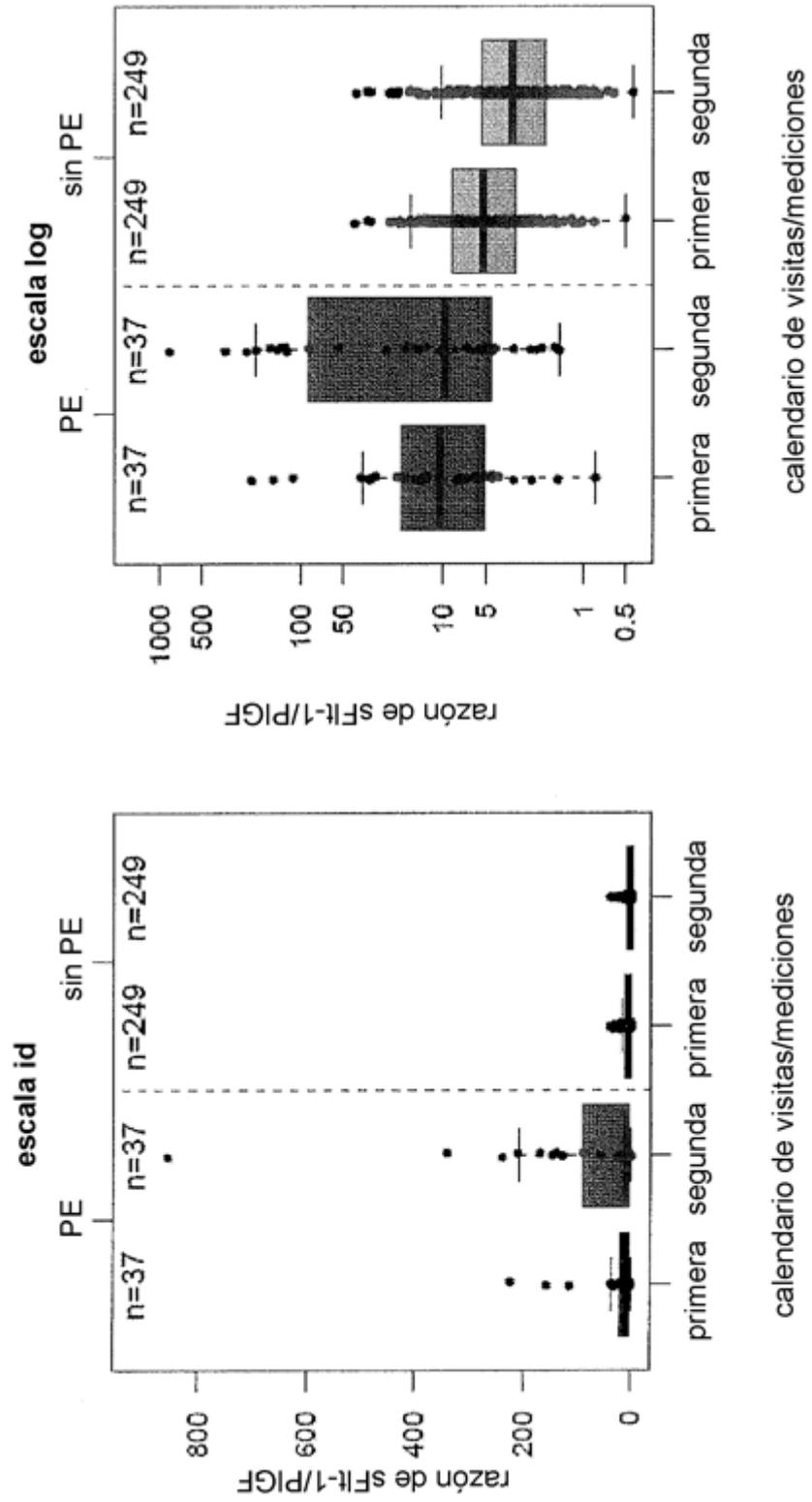


Figura 2: Razón de sFit-1/PIGF por visita y PE/HELLP

Fig. 3

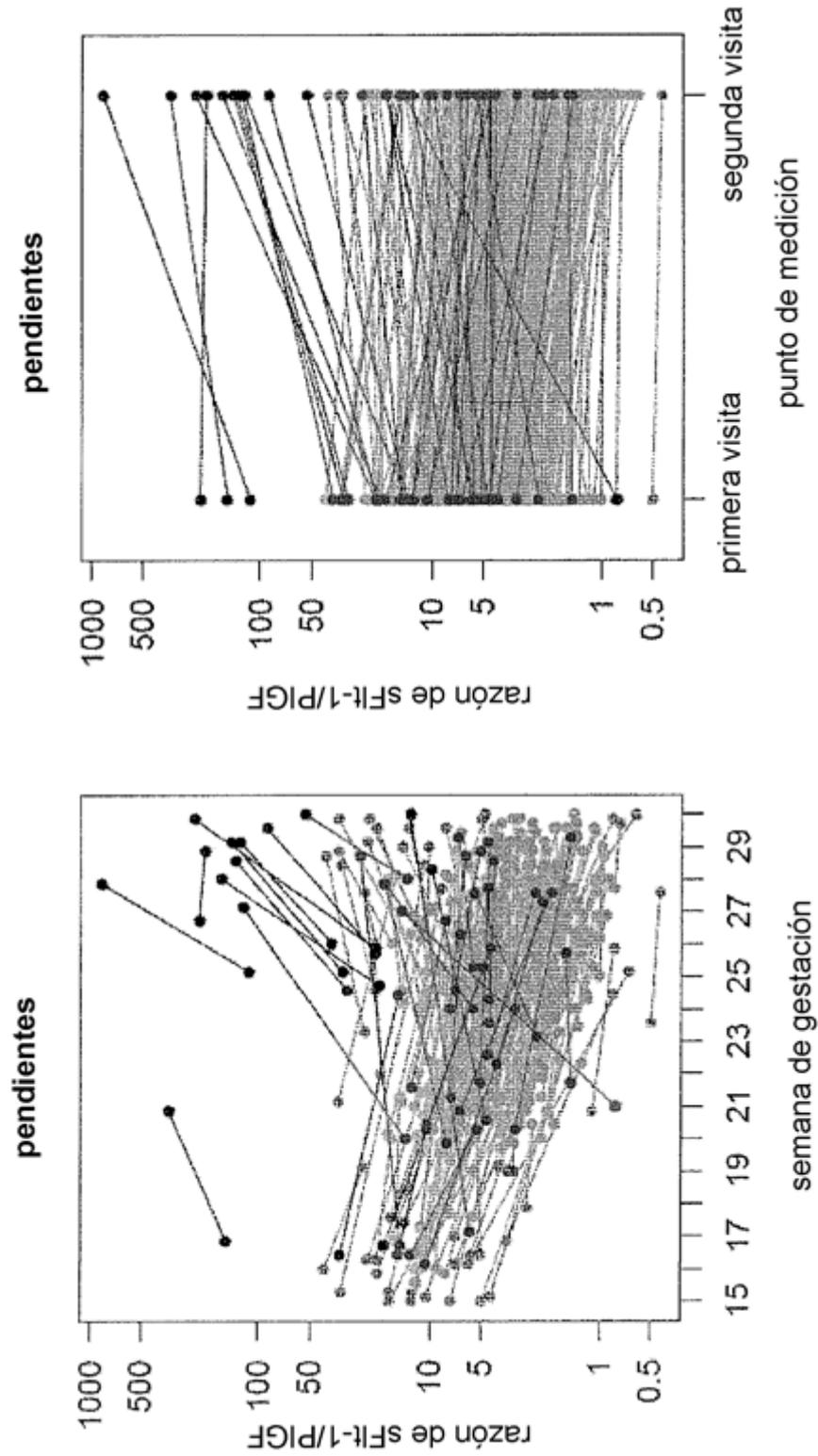


Figura 3: Diferencias de la razón de sFlt-1/PIGF frente a la edad gestacional / punto de medición

Fig. 4

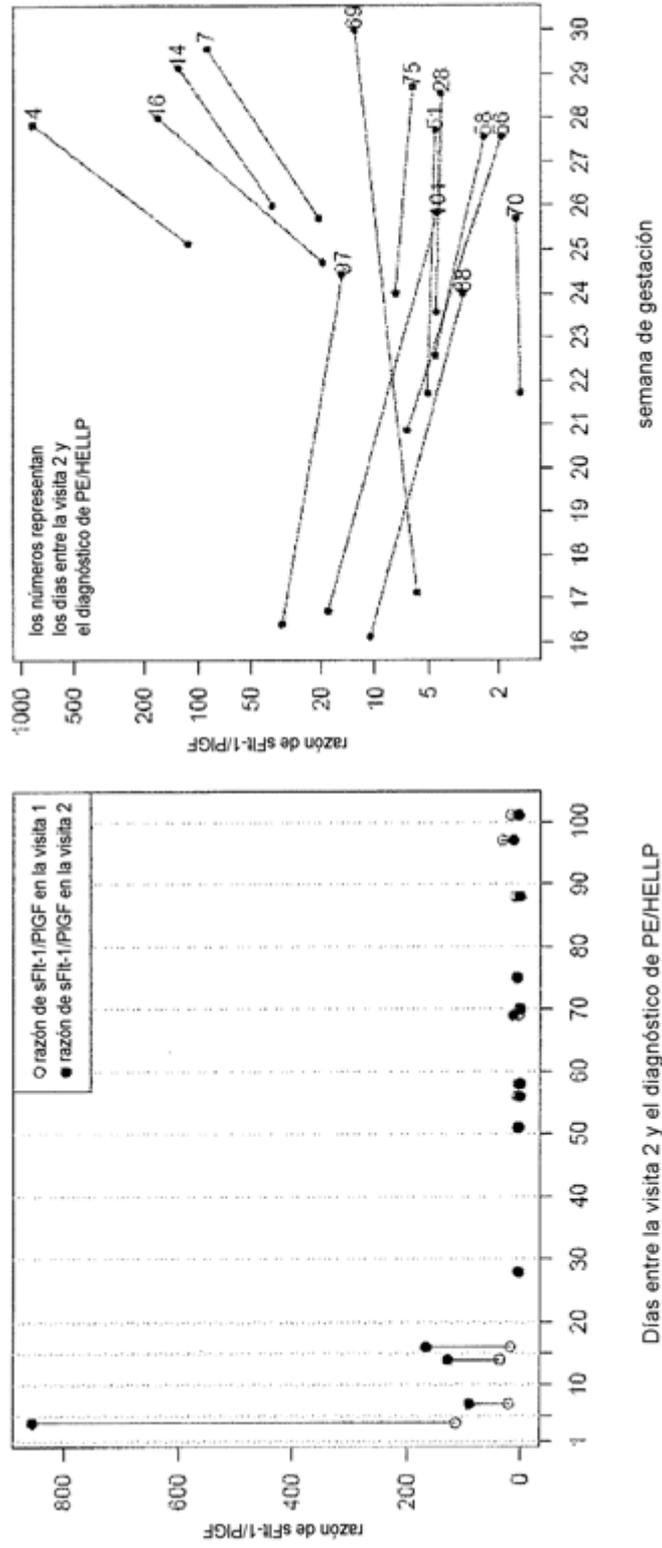


Figura 4: izquierda: tiempo hasta el diagnóstico de PE/HELLP frente a ambos valores de la razón de sFit-1/PIGF, derecha: pendientes sólo de pacientes con fecha de diagnóstico de PE/HELLP disponible

Fig. 5A

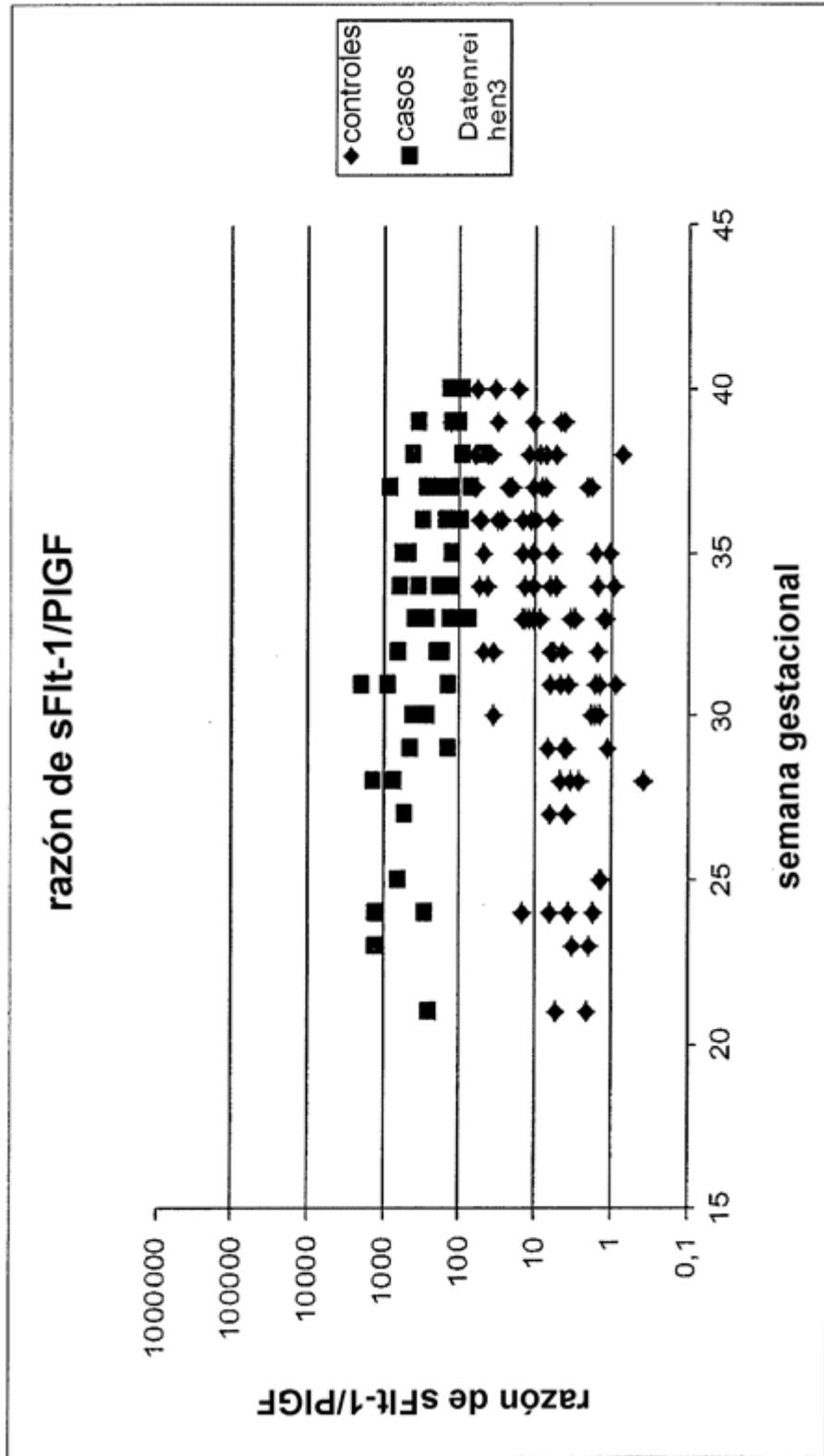


Fig. 5B

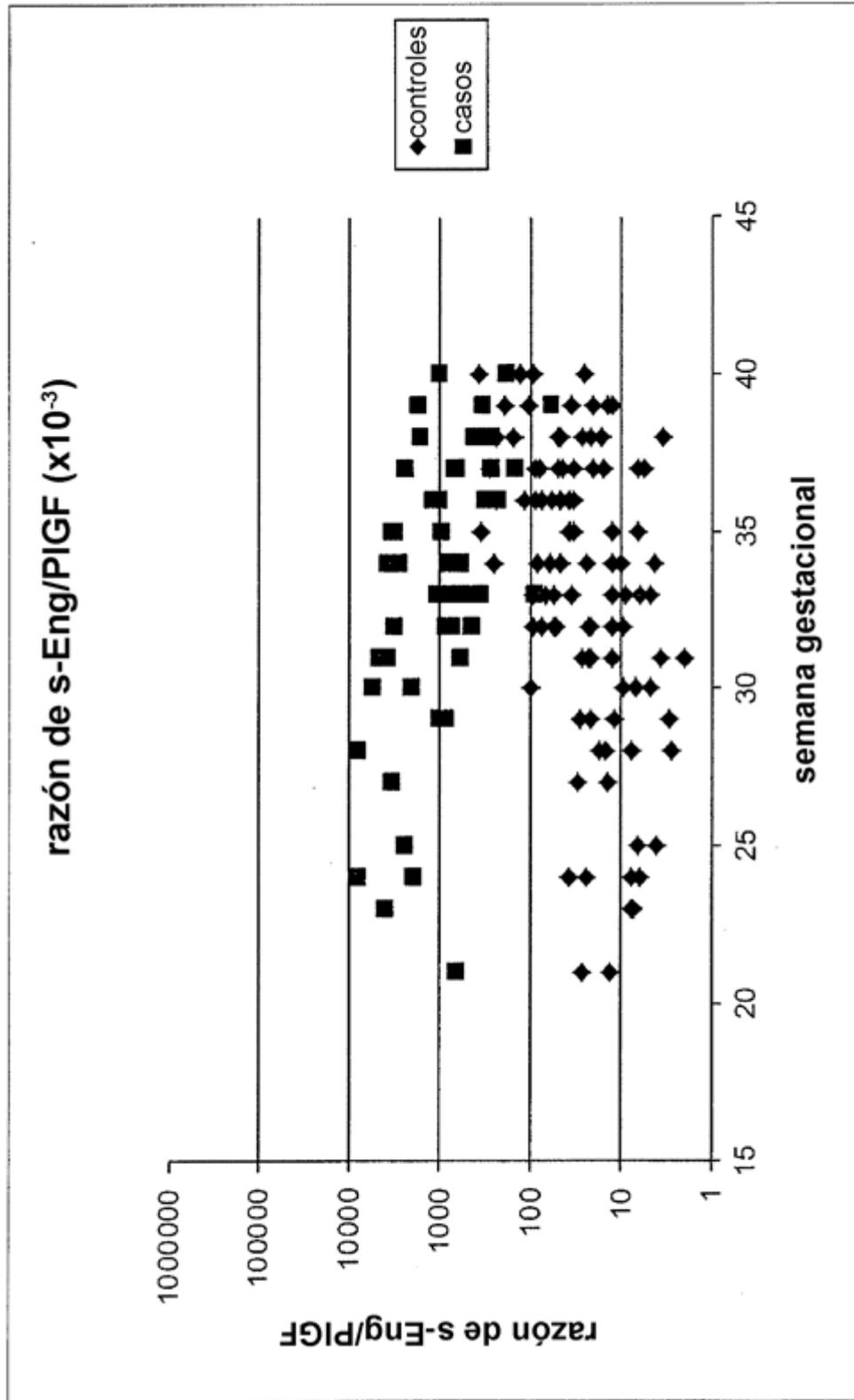


Fig. 6

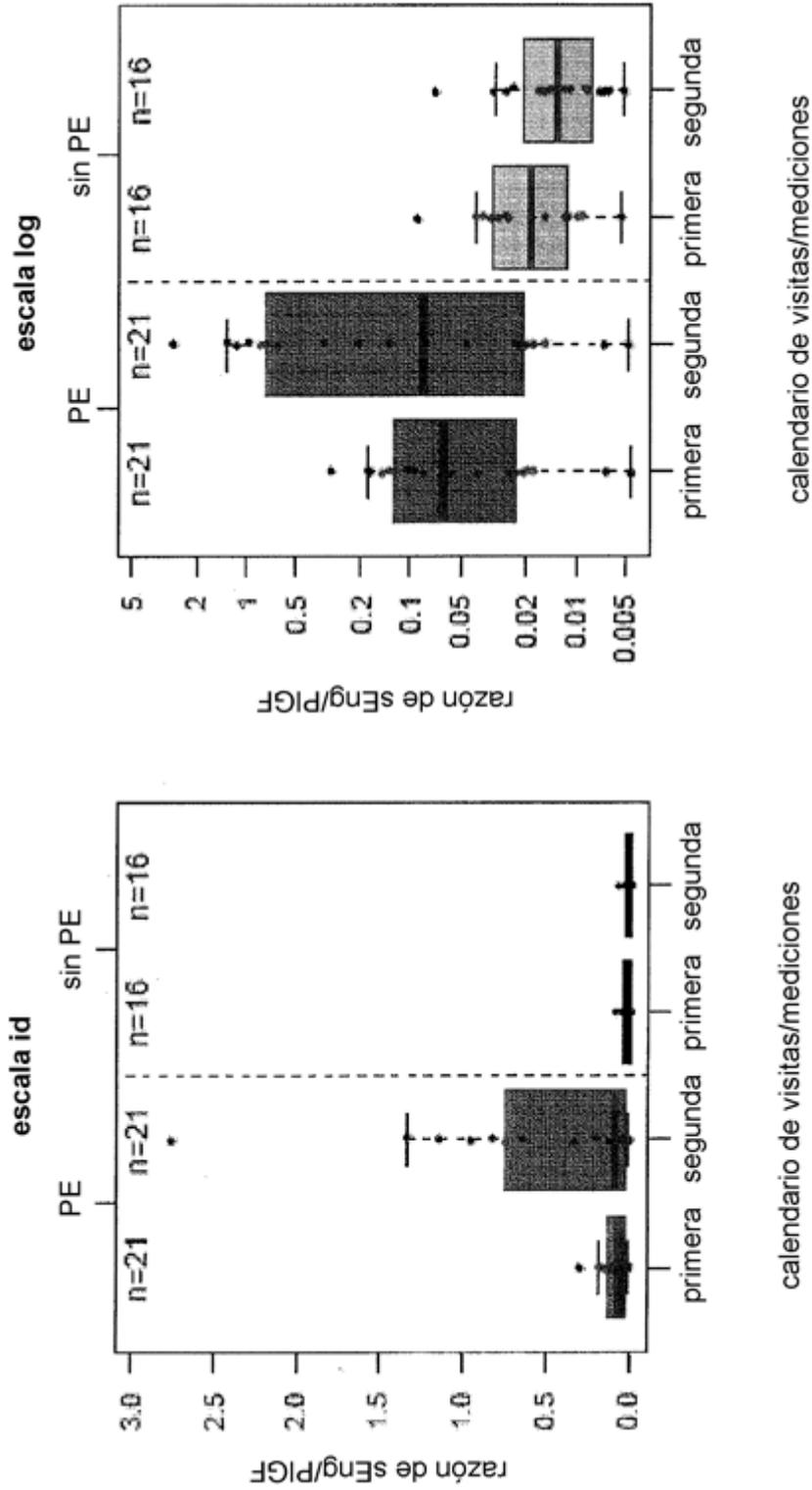


Figura 6: Razón de sEng/PIGF por visita y PE/HELLP

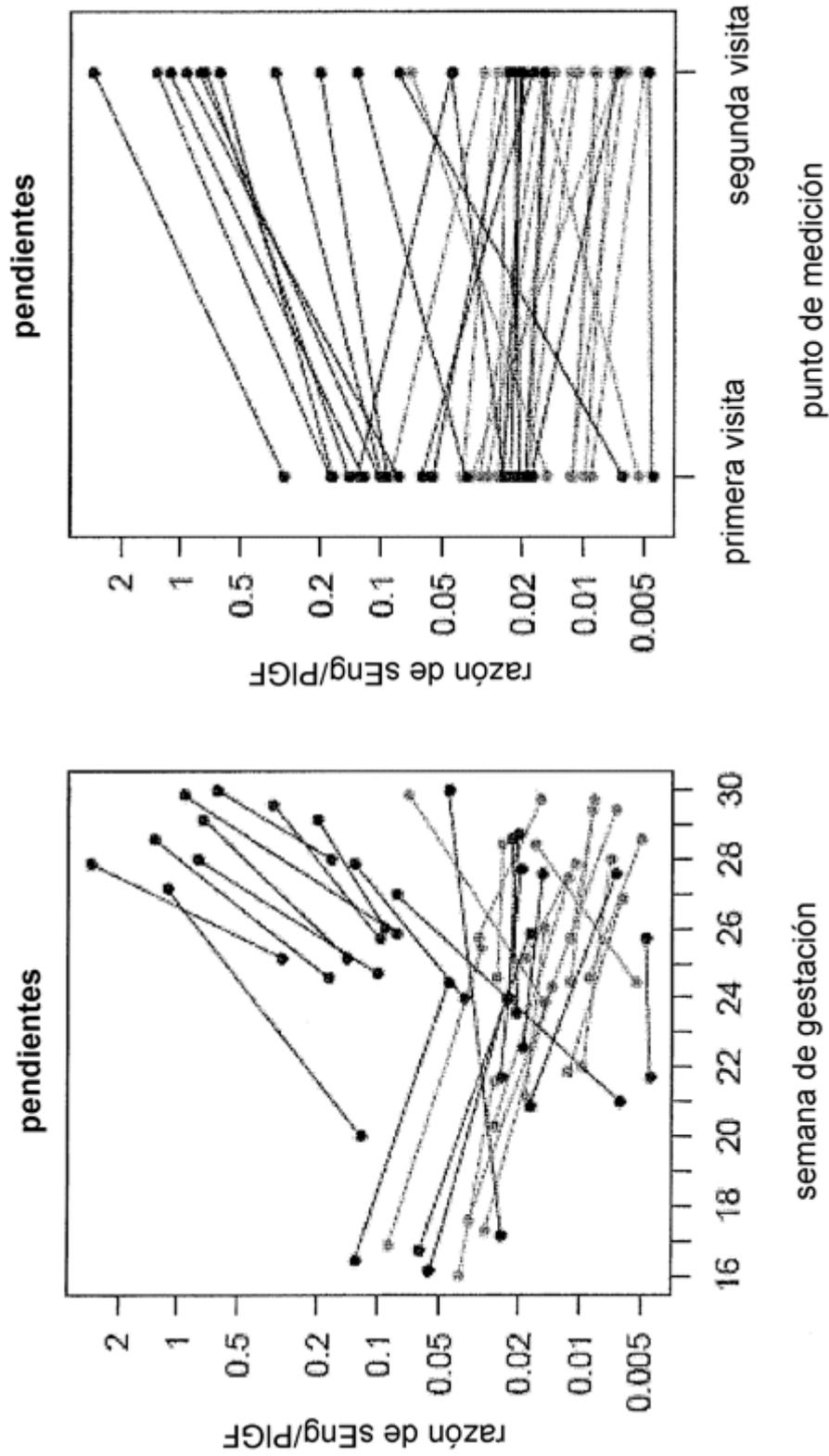


Fig. 7

Figura 7: Diferencias de la razón de sEng/PIGF frente a la edad gestacional / punto de medición

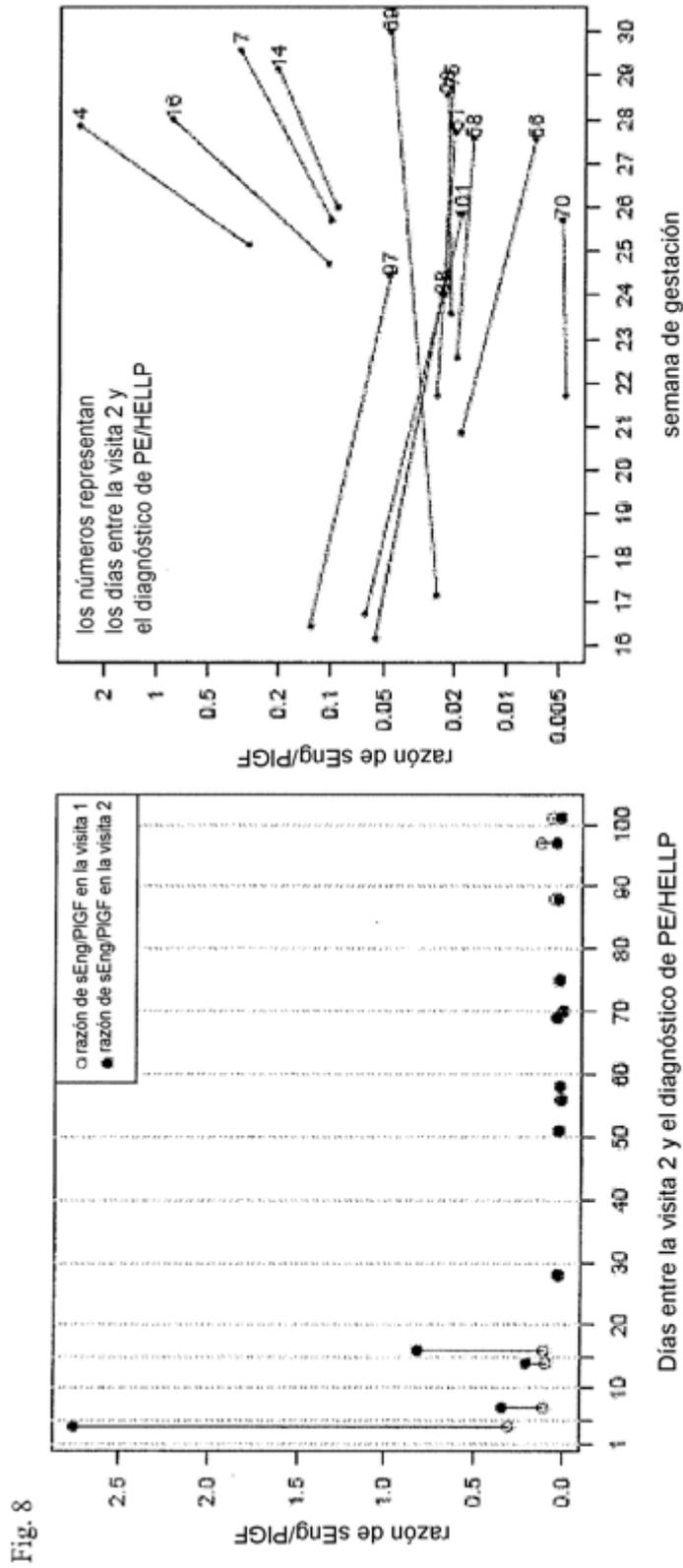


Figura 8: izquierda: tiempo hasta el diagnóstico de PE/HELLP frente a ambos valores de la razón de sEng/PIGF, derecha: pendientes sólo de pacientes con fecha de diagnóstico de PE/HELLP disponible