

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 238**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2013 PCT/EP2013/063115**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2013 E 13732878 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2867670**

54 Título: **Medios y métodos de aplicación de la relación sFlt-1/PlGF o Endoglina/PlGF para descartar la aparición de preeclampsia en un cierto periodo de tiempo**

30 Prioridad:

27.06.2012 EP 12173886
07.09.2012 EP 12183508

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HUND, MARTIN y
SCHOEDL, MARIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 681 238 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

Medios y métodos de aplicación de la relación sFlt-1/PIGF o Endoglina/PIGF para descartar la aparición de preeclampsia en un cierto periodo de tiempo

5 La presente invención concierne al campo de las pruebas diagnósticas de diagnóstico prenatal de la preeclampsia.

10 En particular, se describe un método para diagnosticar si un sujeto embarazado no está en riesgo de preeclampsia en una corta ventana de tiempo que comprende a) determinar la cantidad de al menos un bioindicador de angiogénesis seleccionado del grupo que consiste en sFlt-1, Endoglina y PIGF en una muestra de dicho sujeto, y b) comparar la cantidad con una referencia, por lo cual se diagnostica un sujeto que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo si la cantidad es idéntica o reducida en comparación con la referencia en los casos de sFlt-1 y Endoglina e idéntica o incrementada en el caso de PIGF, en el que dicha referencia permite realizar el diagnóstico con un valor predictivo negativo de al menos aproximadamente el 98 %. Además se contemplan dispositivos y kits para llevar a cabo dicho método.

20 El embarazo se puede complicar de diferentes maneras, por un lado está asociado con la mortalidad relacionada con el embarazo de la mujer embarazada y, por otro lado, también asociado con la incrementada morbilidad y mortalidad del recién nacido. La mortalidad materna a una tasa de 14,5 por 100.000 nacimientos vivos es más frecuente en mujeres embarazadas por encima de los 39 años de edad y puede estar causada por hemorragia, embolismo pulmonar trombótico, infecciones, cardiomiopatía y afecciones cardiovasculares y no cardiovasculares así como trastornos hipertensivos entre los cuales la preeclampsia es el más frecuente (Berg 2010, *Obstetrics and Gynecology*:116:1.302–1.309).

25 La preeclampsia complica aproximadamente el 2 a 8 por ciento de todos los embarazos y es un contribuidor importante para la mortalidad materna y fetal mundial (Duley 2009, *Semin Perinatol*: 33:130-37). La preeclampsia generalmente se define como hipertensión y proteinuria asociada o inducida por el embarazo con aparición después de la semana 20 de gestación. La hipertensión se define en este contexto como la presión sanguínea de 140 mmHg (sistólica) y/o 90 mmHg (diastólica) o más en dos mediciones independientes, en la que dichas dos mediciones se han realizado al menos con 6 horas de separación. La proteinuria está indicada por 300 mg de proteína o más en una muestra de orina de 24 horas. Sin embargo, las definiciones de la preeclampsia son asuntos por debatir y pueden diferir entre sociedades. Los detalles también se encuentran en los libros de texto convencionales de medicina y las directrices de diversas sociedades clínicas, por ejemplo, "ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician – Gynecologists", n°: 33, enero de 2002 o "Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen" de la "Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.", agosto de 2008, "NICE Clinical Guideline Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy", agosto de 2010 (reedición revisada enero de 2011).

40 La patogénesis de la preeclampsia se conoce en gran parte. Sin embargo, se cree que es causada por función placentaria alterada asociado con el remodelado alterado de la arteria espiral. Los defectos de flujo que se dan en el proceso de desarrollo de la preeclampsia están asociados con isquemia que por último da como resultado la liberación de los factores anti-angiogénicos en la circulación como sFlt-1 y Endoglina.

45 El único tratamiento de preeclampsia hasta hoy en día es la interrupción del embarazo o bien por parto vaginal prematuro o por cesárea. Como se discutió anteriormente los riesgos maternos y la viabilidad fetal están significativamente afectados en el caso de preeclampsia antes de la semana gestacional 34. Por consiguiente, los intentos se deberían hacer para retrasar el parto y para mejorar de ese modo la supervivencia del recién nacido.

50 El diagnóstico temprano y fiable de la preeclampsia y, en particular, el descarte de preeclampsia que se da tan temprano como a las 20 a 40 semanas de gestación es decisivo para el tratamiento clínico de la enfermedad. Se entenderá que las hembras embarazadas que padecen preeclampsia necesitan especial cuidado tal como monitorización minuciosa, medidas terapéuticas de apoyo y, en el caso de progresión en preeclampsia grave, hospitalización en hospitales especializados que tienen unidades de cuidados intensivos maternofetales (UCIMF).

55 En particular, la preeclampsia de aparición temprana es un desafío para los médicos en vista de los efectos secundarios graves y los resultados adversos asociados a la misma. Además, el diagnóstico temprano y fiable de la preeclampsia así como la predicción de preeclampsia es decisivo para la planificación de los estudios de intervención preventiva o terapéutica (Ohkuchi 2011, *Hypertension* 58:859-866). Por otro lado, los pacientes que pertenecen a un grupo de riesgo para el cual se puede descartar un riesgo incrementado de preeclampsia en una cierta ventana de tiempo, necesitará menos cuidados especiales, generalmente, se puede tratar en el ambulatorio (sin internación del paciente).

65 Se ha aplicado ultrasonografía Doppler para identificar pacientes con perfusión uterina anormal y se ha sugerido que aquellos pacientes que presentan perfusión anormal identificada por la ultrasonografía Doppler están en riesgo de desarrollar preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP (Stepan 2007, *Hypertension*, 49:818-824; Stepan 2008,

Am. J. Obstet. Gynecol. 198:175.e1-1). Un inconveniente de la ultrasonografía Doppler es, sin embargo, que se requieren médicos altamente especializados para llevar a cabo y evaluar los resultados.

Recientemente, se ha sugerido que los factores angiogénicos y los factores anti-angiogénicos son indicadores para la preeclampsia. En particular, se ha publicado que el factor del crecimiento placentario (PIGF), la Endogлина y la tirosina quinasa 1 tipo fsm soluble (sFlt-1) están alterados en pacientes que padecen de preeclampsia. A pesar del informe de los factores individuales y sus cambios en los individuos sanos y pacientes que padecen de preeclampsia o pacientes que están en riesgo de desarrollar preeclampsia (véase, por ejemplo, Rana 2007, *Hypertension* 50:137-142; documento WO2004/008946), se han publicado las relaciones de sFlt-1 y PIGF o Endogлина y PIGF como parámetros de diagnóstico o pronóstico (véase Young 2010, *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 23(5):366-370; Hagmann 2012, *Clinical Chemistry* 58(5):1-9).

Se ha publicado una relación sencilla para sFlt-1 y PIGF como factor de inclusión pronóstico para la preeclampsia en embarazo temprano (Crispi 2008, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31:303-309). Además, las relaciones individuales de sFlt-1 y PIGF en diferentes momentos del embarazo se han correlacionado individualmente con un riesgo de preeclampsia (DeVivo 2008, *Acta Obstetricia et Gynecologica* 87:837-842; Ohkuchi 2011, *loc cit.*; Kusanovic 2009, *J. of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 22(11):1.021-1.038, Chaiworapongsa 2011, *J. Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 24(10):1.187-1.207; Benton 2011, *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 205:1.e1). Además, se ha investigado el grado de los cambios con respecto al pronóstico de preeclampsia (Kusanovic 2009, *loc cit.*) o el riesgo de un parto inminente (Verlohren 2012, *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 206(1):58.e1-58.e8).

La técnica anteriormente mencionada, sin embargo, principalmente concierne al diagnóstico de inclusión de preeclampsia inminente o predicción de la misma. Se sabe menos con respecto al descarte de preeclampsia inminente en una cierta ventana de tiempo. Hay informes generales adicionales que basándose en una cierta relación de sFlt-1 y PIGF podrían descartar la preeclampsia en el día de la presentación del paciente (Stepan 2010, *Z Geburtsh Neonatol* 214:234-238). Una revisión de indicadores de la preeclampsia es proporcionada por Grill y col. (2009), *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:70.

Sin embargo, una prueba fiable para el descarte de preeclampsia en un cierto periodo de tiempo en una hembra embarazada aparentemente sana aún no está disponible pero no obstante es altamente deseada.

El problema técnico subyacente de la presente invención se puede ver como la provisión de medios y métodos para cumplir con las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y más adelante en el presente documento.

La presente invención se refiere a un método para diagnosticar si un sujeto embarazado no está en riesgo de preeclampsia según la reivindicación 1.

El método de la presente invención es un método *ex vivo*. Además, puede comprender etapas además de las explícitamente mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden relacionarse con los pretratamientos o la evaluación de la muestra de los resultados obtenidos por el método. El método se puede llevar a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a), (b) y/o (c) se puede asistir total o en parte por automatización, por ejemplo, por un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a), un algoritmo de cálculo implementado por ordenador en un dispositivo de procesamiento de datos y/o algoritmo de comparación y/o diagnóstico en un dispositivo de procesamiento de datos en la etapa (c).

El término "preeclampsia" como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad que se caracteriza por hipertensión y proteinuria. La preeclampsia se da en sujetos femeninos embarazados y la hipertensión también es referida como hipertensión inducida por embarazo. Preferentemente, la hipertensión inducida por embarazo se identifica que está presente en un sujeto por dos mediciones de la presión sanguínea de 140 mmHg (sistólica) y/o 90 mmHg (diastólica) o más, en la que dicha dos mediciones se han hecho al menos con 6 horas de separación. La proteinuria, preferentemente, se identifica que está presente por 300 mg de proteína 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 ataques tónicos-clónicos o condiciones de coma. Los síntomas asociados con preeclampsia grave son oliguria o menos de 500 ml en 24 horas, perturbación cerebral o visual, edema pulmonar o cianosis, dolor del cuadrante superior derecho o epigástrico, función renal alterada, trombocitopenia, restricción del crecimiento fetal.

Los sujetos que padecen de preeclampsia con implicación hepática además pueden desarrollar el síndrome de HELLP. Por consiguiente, un sujeto según la invención que está en riesgo de desarrollar preeclampsia, preferentemente, está también potencialmente en riesgo de desarrollar el síndrome de HELLP. El síndrome de HELLP está asociado con un alto riesgo de resultados adversos tales como desprendimiento prematuro de la placenta, fallo renal, hematoma hepático subcapsular, preeclampsia recurrente, parto prematuro, o incluso muerte materna y/o fetal. Detalles adicionales de la preeclampsia y los síntomas acompañantes así como la monitorización de enfermedades tales como síndrome de HELLP o eclampsia se encuentran en los libros de texto convencionales de medicina o las Directrices de las sociedades médicas relevantes. Los detalles se pueden encontrar, por ejemplo,

en “ACOG Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists”, nº: 33, enero de 2002 o “Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen” de la “Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.”, agosto de 2008, “NICE Clinical Guideline Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy”, agosto de 2010 (reimpresión revisada enero de 2011). La preeclampsia se da en hasta el 10 % de los embarazos normalmente en el segundo o tercer trimestre. Sin embargo, algunas hembras desarrollan preeclampsia tan temprano como en la semana 20 de gestación.

Dentro de la semana 20 a 34 de gestación, la preeclampsia también se denomina preeclampsia de aparición temprana mientras que la preeclampsia que se da después de la semana 34 de gestación también se califica preeclampsia de aparición tardía. Se entenderá que la preeclampsia de aparición tardía, normalmente, está acompañada de efectos secundarios más graves y resultados adversos en comparación con la normalmente preeclampsia de aparición tardía relativamente leve.

La frase “no estar en riesgo de desarrollar preeclampsia” se refiere a un sujeto embarazado que no desarrollará preeclampsia en una ventana de tiempo pronóstica en el futuro con una probabilidad significativamente incrementada de manera estadística en comparación con un sujeto embarazado que está en riesgo de desarrollar preeclampsia o en comparación con la prevalencia para la preeclampsia dentro de una población que incluye el sujeto a analizar.

El término “sujeto” como se usa en el presente documento se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, seres humanos. El sujeto según la presente invención será un sujeto embarazado, es decir, una hembra embarazada. Preferentemente, el sujeto según la presente invención no padecerá de preeclampsia manifiesta, eclampsia o síndrome de HELLP. Preferentemente, el sujeto según la presente invención es un sujeto el cual se ha identificado que tiene perfusión uterina anormal y, más preferentemente, puede ser un sujeto que ya se ha identificado que está en riesgo de desarrollar preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP por otras técnicas de diagnóstico. Más preferentemente, el sujeto se ha identificado que está en riesgo de desarrollar preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP mediante resultados de ultrasonografía Doppler de útero anormales.

Preferentemente, la ultrasonografía Doppler se ha realizado transabdominal (véase, por ejemplo, Albaiges 2000, *Obstet. Gynecol* 96:559-564). En particular, los índices de pulsatilidad (IP) de las arterias uterina se pueden medir y se calcularía una media para ambas arterias (mIP-AUt) y se pueden comparar con umbrales que permiten distinguir entre los resultados normales y anormales.

El sujeto embarazado según la presente invención está entre aproximadamente la semana 20 y aproximadamente la semana 40 de gestación, preferentemente, entre aproximadamente la semana 24 y aproximadamente la semana 40 de gestación. Por consiguiente, la preeclampsia a descartar por el presente método de la invención puede ser preeclampsia de aparición temprana o preeclampsia de aparición tardía dependiendo de la semana de gestación cuando se ha tomado la muestra del sujeto.

El método de la presente invención se puede usar en planteamientos de cribado rutinarios 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 mayor prevalencia para la preeclampsia. Los sujetos embarazados que padecen de adiposidad, hipertensión, enfermedades autoinmunes tales como Lupus eritematoso, trombofilias o diabetes mellitus tienen una prevalencia incrementada para desarrollar preeclampsia en general. Lo mismo se aplica a sujetos que padecieron de preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP en un embarazo previo. Además, hembras de edad que están embarazadas por primera vez también presentan una predisposición para el desarrollo de preeclampsia. La probabilidad de desarrollar preeclampsia, sin embargo, está descendiendo con el número de embarazados.

El término “diagnóstico” como se usa en el presente documento significa valorar si un sujeto no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo. Dicho corto periodo de tiempo es un periodo de 2 semanas.

Como entenderán los expertos en la técnica, tal valoración normalmente no intenta ser correcta para el 100 % de los sujetos a diagnosticar. Sin embargo, el término, requiere que la valoración sea correcta con un valor predictivo negativo como se muestra en otra parte en el presente documento para cierta parte de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). El riesgo de desarrollar o no desarrollar preeclampsia en una cierta ventana de tiempo en el futuro se puede diagnosticar mediante un ensayo tal como el método de la invención con una estadística resumen que describe la realización del ensayo con respecto a valoraciones falso positivo/negativo y verdadero positivo/negativo. Un alto valor predictivo negativo indica un nivel alto de confianza en una valoración negativa hecha por una prueba diagnóstica. El valor predictivo negativo se puede expresar como el número de resultados verdaderos negativos divididos por la suma de los resultados verdaderos negativos y los resultados falsos negativos (es decir, todos los resultados negativos determinados por la prueba diagnóstica). En principio, un valor predictivo negativo se puede calcular dependiendo de la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica y la prevalencia para una enfermedad o afección en cierta cohorte. Específicamente, el valor predictivo negativo es
$$\frac{((\text{especificidad})(1-\text{prevalencia}))}{((\text{especificidad})(1-\text{prevalencia})+(1-\text{sensibilidad})(\text{prevalencia}))}$$
. Las predicciones de

prevalencia se pueden obtener a partir de los estudios de cohorte mientras que el caso de los estudios control pueden producir sensibilidad y/o especificidad para la prueba. En particular, el valor predictivo negativo del diagnóstico establecido por el método de la presente invención será de al menos aproximadamente 98 %, más preferentemente, al menos aproximadamente 99 % y, lo más preferentemente, 100 %. Detalles adicionales sobre las estadísticas están descritos en los libros de ensayos convencionales, tales como Dowdy y Wearden, "Statistics for Research", John Wiley & Sons, Nueva York 1983, o se encuentran en otra parte del presente documento.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Las muestras de tejido u órgano se pueden obtener de cualquier tejido u órgano por, por ejemplo, biopsia. Las células separadas se pueden obtener de los fluidos corporales o los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación celular. Preferentemente, las muestras de célula, tejido u órgano se obtienen de las células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos referidos en el presente documento.

El término "sFlt-1" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que es una forma soluble de la tirosina quinasa 1 tipo fms. El polipéptido también es referido como receptor de VEGF 1 soluble (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 vena umbilical humana. El receptor de sFlt1 endógeno es cromatográficamente e inmunológicamente similar a sFlt1 humano recombinante y se une a [125I] VEGF con una afinidad alta comparable. Se demuestra que sFlt1 humano forma un complejo estabilizado por VEGF con el dominio extracelular de KDR/Flk-1 *in vitro*. Preferentemente, sFlt1 se refiere a sFlt1 humano como se describe en Kendall 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226(2):324-328; para las secuencias de aminoácidos, véase, por ejemplo, también los números de acceso de Genebank P17948, GI: 125361 para humano y BAA24499.1, GI: 2809071 para sFlt-1 de ratón (Genebank está disponible en el NCBI, EE.UU. bajo www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez). El término también abarca variantes de los polipéptidos de sFlt-1 humana anteriormente mencionada. Tales variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que el polipéptido de sFlt-1 anteriormente mencionada. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos referidos en esta memoria, por ejemplo, por ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de sFlt-1. Además, hay que entender que una variante como se refiere de acuerdo con la presente invención tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución de aminoácido, delección y/o adición en la que la secuencia de aminoácidos de la variante es todavía, preferentemente, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido sFlt-1 específico, preferentemente sobre la longitud entera de la sFlt-1 humana, respectivamente. El grado de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el grado de identidad es para ser determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el resto de los aminoácidos idénticos se da en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede conducir por el algoritmo de homología local descrito por Smith 1981, *Add. APL. Math.* 2:482, por el algoritmo de alineación por homología de Needleman 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, por la investigación para el método de similitud de Pearson 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2.444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FAST, PASTA, y TFASTA en el paquete de programas genéticos del "Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG)", 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, se emplean preferentemente GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, así, el grado de identidad. Preferentemente, 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 referidas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parólogo u ortólogo específico a especie. Las variantes referidas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parólogo u ortólogo específico a especie. Además, las variantes referidas en el presente documento incluyen fragmentos o subunidades de los polipéptidos de sFlt-1 específicos o los tipos anteriormente mencionados de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales referidas 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 son detectables por los mismos ensayos específicos referidos en esta memoria, por ejemplo, por ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de sFlt-1. Un ensayo preferido está descrito en los Ejemplos acompañantes. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. sFlt-1 se puede detectar en forma unida o libre o como cantidad de sFlt-1 total en una muestra.

El término "Endoglina" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene un peso molecular de 180 kDa no reducido, 95 kDa después de la reducción y 66 kDa en su forma reducida y N-desglicosilada. El polipéptido es capaz de formar dímeros y unirse a TGF-β y receptores de TGF-β.

5 Preferentemente, la Endoglina se refiere a una Endoglina humana. Más preferentemente, la Endoglina humana tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Genebank AAC63386.1, GI: 3201489. Se han descrito dos isoformas de Endoglina, S-Endoglina y L-Endoglina. La L-Endoglina consiste en el total de 633 aminoácidos con una cola citoplasmática de 47 aminoácidos mientras que S-Endoglina consiste en 600 aminoácidos con una cola citoplasmática de 14 aminoácidos. Preferentemente, la Endoglina como se usa en el presente documento es Endoglina soluble. La Endoglina soluble como se refiere en el presente documento está preferentemente descrita en el documento EP 1 804 836 B1. Además, hay que entender que una variante como se refiere de acuerdo con la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución de aminoácido, deleción y/o adición en la que la secuencia de aminoácidos de la variante es todavía, preferentemente, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Endoglina específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas, variantes de corte y empalme o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico a especie. Además, las variantes referidas en el presente documento incluyen fragmentos de la Endoglina específica o los tipos anteriormente mencionados de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se refirieron 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 son detectables por los mismos ensayos específicos referidos en esta memoria, por ejemplo, por los ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de Endoglina. Un ensayo preferido está descrito en los Ejemplos acompañantes. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. La Endoglina se puede detectar en forma unida o libre o como cantidad de Endoglina total en una muestra.

El término "PIGF" (Factor del crecimiento placentario) 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 igual al factor de crecimiento derivado de plaqueta del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF). Igualmente 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 sometidas a transfección revelaron que es una proteína secretada dimérica glicosilada que es capaz de estimular el crecimiento celular endotelial *in vitro* (Maqilone 1993, *Oncogene* 8(4):925-31). Preferentemente, P1GF se refiere a PIGF humano, más preferentemente, a PIGF humano que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso de Genebank P49763, GI: 17380553. El término abarca las 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 son detectables por los mismos ensayos específicos referidos en esta memoria, por ejemplo, por ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos de PIGF. Un ensayo preferido está descrito en los Ejemplos acompañantes. Además, se entiende que una variante como se refiere de acuerdo con la presente invención tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución de aminoácido, deleción y/o adición en la que la secuencia de aminoácidos de la variante es todavía, preferentemente, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de PIGF específicos. El grado de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por algoritmos bien conocidos en la técnica y descritos en otra parte en el presente documento. Las variantes referidas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico a especie. Además, las variantes referidas en el presente documento incluyen fragmentos de los polipéptidos de PLGF específicos o los tipos anteriormente mencionados de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se refirió anteriormente. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación o variantes de corte y empalme de polipéptidos de PLGF. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. El PIGF se puede detectar en forma unida o libre o como cantidad de PIGF total en una muestra.

Determinar la cantidad de cualquier péptido o polipéptido referido en esta memoria se refiere a medir la cantidad o concentración, preferentemente, semi-cuantitativamente o cuantitativamente. La medición se puede hacer directamente o indirectamente. La medición directa se refiere a medir la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene del propio péptido o polipéptido y la intensidad de la cual se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Tal señal, algunas veces referida en el presente documento como señal de intensidad, se puede obtener, 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 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 enzimáticos.

De acuerdo con la presente invención, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido se puede conseguir mediante todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos de inmunoensayo y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo tipo sándwich, de competición u otros. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la fuerza de la señal puede, preferentemente, correlacionarse directamente o indirectamente (por ejemplo, proporcional inversa) 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, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masa, analizadores de RMN, o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos basados en ELISA de microplaca, inmunoensayos completamente 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 (disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™).

Preferentemente, determinar la cantidad de una péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de suscitar 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 las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada, preferentemente, se añade 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.

También preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible del péptido o polipéptido en la muestra. Como se describió anteriormente, tal señal puede ser la intensidad de señal observada en una m/z variable específica para el péptido o polipéptido observada en los espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede, preferentemente, comprender las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) preferentemente separar el 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 la 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 una 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 sus fragmentos que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácido nucleico o péptido. Métodos para preparar tales ligando son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también es ofrecida por proveedores comerciales. El experto en la técnica está familiarizado con métodos para desarrollar derivados de tales ligandos con afinidad o especificidad mayor. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones aleatorias dentro de los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Entonces, estos derivados, se pueden ensayar para la unión según los procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo, exposición de fago. Los anticuerpos como se refieren en el presente documento incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unir antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que presenta una especificidad a antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes normalmente incluirán al menos los restos de aminoácidos que se unen a antígeno del donante pero pueden comprender también otros restos de aminoácidos estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Tales híbridos se pueden preparar por varios métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o el agente se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica según la presente invención significa que el ligando o el agente no se deberían unir básicamente a, es decir, reaccionar de manera cruzada con, otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido específicamente unido se debería unir con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferentemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferentemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si aún se puede distinguir y medir inequívocamente, por ejemplo, según su tamaño en una transferencia Western, o por su abundancia relativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. Las técnicas adecuadas adicionales para la determinación de un péptido o polipéptido se describe en lo siguiente.

Primero, la unión de un ligando se puede medir directamente, por ejemplo, por RMN o resonancia de plasmón de superficie. Segundo, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido

de interés, se puede medir un producto de la reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa se puede medir mediante la medición de la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en una transferencia Western).

Alternativamente, el ligando puede presentar por sí mismo propiedades enzimáticas y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando que se unió por el péptido o polipéptido, respectivamente, se puede poner en contacto con un sustrato adecuado que permite la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de los productos de la reacción enzimática, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también se puede marcar con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad de producto detectable, preferentemente medible. En lugar de medir la cantidad de producto, se pueda medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo, detectable) de producto. Tercero, el ligando se puede acoplar covalentemente o no covalentemente a un marcador que permite la detección y la medición del ligando. La marcación se puede hacer por métodos directos o indirectos. La marcación directa implica el acoplamiento del marcador directamente (covalentemente o no covalentemente) al ligando. La marcación indirecta implica la unión (covalentemente o no covalentemente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debería unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario se puede acoplar con un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) del ligando terciario que se une al ligando secundario. El uso de los ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se usa con frecuencia para incrementar 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 el sustrato también se puede "etiquetar" con una o más etiquetas conocidas en la técnica.

Después tales etiquetas pueden ser dianas para ligandos de orden superior. Las etiquetas adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta de His, Glutación-S-Transferasa, FLAG, GFP, etiqueta de myc, hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta está preferentemente en el terminal N y/o el terminal C. Los marcadores adecuados son cualquier marcador detectable por un método de detección apropiado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridina, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radioactivos, marcadores magnéticos ("por ejemplo, perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y sus derivados. Sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (4-nitrocloruro de tetrazolio azul y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponibles como solución madre preparada de Roche Diagnostics), CDPStar™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreada, fluorescencia o quimioluminiscencia, lo cual se puede medir según los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Para medir la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican de manera análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Rojo Texas, Fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Marcadores fluorescentes adicionales están disponibles por ejemplo en Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Marcadores radiactivos típicos incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Un marcador radiactivo se puede detectar mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o una cámara de fósforo. Los métodos de medición adecuados según la presente invención también incluyen precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos enzimáticos tipo sándwich, inmunoensayos tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFA), ensayo centelleo de proximidad (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría aumentada por látex o nefelometría, o inmunoensayos de fase sólida. Métodos adicionales conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferencia Western y espectrometría de masas), se pueden usar solos o en combinación con la marcación u otros métodos de detección como se describió anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido se puede determinar, también preferentemente, como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido, (b) preferentemente separar el péptido o polipéptido no unido así como el material de muestra restante y (c) medir la cantidad de péptido o polipéptido que está unida al soporte. El ligando, preferentemente, se elige del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros y, preferentemente, está presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para la producción de soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metal coloidal, chips de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracytes, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos vehículos diferentes. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen, vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas,

poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser o bien soluble o insoluble con los fines de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matrices de suspensión" como matrices según la presente invención (Nolan 2002, *Trends Biotechnol.* 20(1):9-12). En tales matrices de suspensión, el vehículo, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que llevan diferentes ligandos. Los métodos de producción de tales matrices, por ejemplo, basados en grupos protectores de química en fase sólida y fotolábiles, son generalmente conocidos (documento US 5.744.305).

La medición de la unión de un ligando, según las realizaciones preferidas, se realiza mediante una unidad analizadora de un sistema descrito en el presente documento. A partir de entonces, una cantidad de la unión medida se puede calcular mediante un dispositivo informático de un sistema descrito en el presente documento.

El término "cantidad" 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 se pueda derivar de la misma. Tales valores o parámetros comprenden los valores de señal de intensidad a partir de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Además, abarca todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otro lugar en esta descripción, por ejemplo, niveles de respuesta determinados a partir de los sistemas de lectura biológica en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas a partir de los ligandos específicamente unidos. Hay que entender que los valores que se correlacionan con las cantidades anteriormente mencionadas o parámetros también se pueden obtener mediante todas las operaciones matemáticas convencionales. Según las realizaciones preferidas de la presente invención, la determinación de una "cantidad" se realiza mediante el sistema de la invención, por lo cual un dispositivo informático determina la "cantidad" basándose en las etapas de puesta en contacto y medición realizadas mediante una o más unidades analizadoras de dicho sistema.

El término "comparar" como se usa en el presente documento abarca comparar la cantidad determinada para al menos un bioindicador de angiogénesis como se refiere en el presente documento con una referencia. Hay que entender que comparar como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de comparación hecha entre el valor para la cantidad con la referencia. Si se determina un valor idéntico o reducido para la cantidad en comparación con la referencia en los casos de sFlt-1 y Endoglin y un valor idéntico o incrementado en el caso de PlGF, el sujeto embarazado no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en la corta ventana de tiempo ("descarte" para preeclampsia).

La comparación referida en la etapa (c) del método de la presente invención se puede llevar a cabo manualmente o asistida por ordenador. El valor de la cantidad y la referencia, por ejemplo, se puede comparar una con otra y dicha comparación se puede llevar a cabo automáticamente mediante un programa informático que ejecuta un algoritmo para la comparación. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la valoración deseada en el formato de salida adecuado. Preferentemente, la unidad de evaluación del dispositivo de la presente descripción o el dispositivo informático del sistema de la presente descripción se puede usar para llevar a cabo dicha comparación. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la valoración deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede evaluar además el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la valoración deseada en un formato de salida adecuado. Basándose en la comparación de la cantidad determinada y la cantidad de referencia, es posible realizar la valoración deseada. Por ejemplo, un resultado de una comparación se puede dar como datos sin procesar (cantidades absolutas o relativas), y en algunos casos como un indicador en forma de una palabra, frase, símbolo o valor numérico que puede ser indicativo de un diagnóstico particular.

El término "referencia" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad o valor de referencia que representa un corte para realizar el diagnóstico con un valor predictivo negativo de al menos aproximadamente el 98 %. Preferentemente, el valor predictivo negativo previsto en este contexto es de aproximadamente el 99 % o, lo más preferentemente, 100 %. Una cantidad o valor de corte adecuado, preferentemente, se puede determinar como se discutió anteriormente basándose en la sensibilidad, especificidad y prevalencia esperada, conocida (por ejemplo, en la bibliografía) o estimada (por ejemplo, basándose en un estudio de cohorte prospectivo) para la preeclampsia en una cierta población de sujetos a investigar. Un valor o cantidad de corte a usar como referencia se puede determinar mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Preferentemente, se pueden usar las características operativas del receptor (ROC) para determinar los valores o cantidades de corte (véase especialmente Zweig 1993, *Clin. Chem.* 39:561-577). El gráfico de curvas ROC es un gráfico de todos los pares de sensibilidad y especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión (es decir, el valor de corte) por el intervalo entero de datos observado. La realización clínica de un método de diagnóstico depende de su precisión, es decir, su capacidad de asignar correctamente sujetos a un cierto pronóstico o diagnóstico. El gráfico de curvas ROC indica el solapamiento

entres las dos distribuciones (los resultados del grupo afectado y el no afectado) mediante el trazado de la sensibilidad en función de la 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales adecuados para realizar una distinción. Sobre el eje "y" es la sensibilidad, o la fracción verdadera-positiva, la cual se define como la relación del número de resultados del ensayo verdaderos-positivos y la suma del número de resultados del ensayo verdaderos-positivos y el número de falsos-negativos. Esto también se ha referido como positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. Sobre el eje "x" está la fracción falsa-positiva, o 1-especificidad, la cual se define como la relación del número de resultados falsos-positivos y la suma del número de resultados verdaderos-negativos y el número de falsos-positivos. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones verdaderas- y falsas-positivas se calculan completamente por separado, usando los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de curvas ROC es independiente de la prevalencia del suceso en la cohorte. Cada punto en el gráfico de curvas ROC representa un par de sensibilidad y especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (no solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene un gráfico de curvas ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, en la que la fracción verdadera-positiva es 1,0 o 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción falsa-positiva es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45 °C desde la esquina izquierda inferior hasta la esquina derecha superior. La mayoría de los gráficos caen entre estos dos extremos. Si el gráfico de curvas ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45 °C, esto se remedia fácilmente invirtiendo el criterio para "positividad" desde "mayor que" a "menor que" o viceversa. Cualitativamente, cuanto más cerca está el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor precisión total del ensayo. Se puede derivar un valor de corte a partir de la curva ROC permitiendo el diagnóstico o la predicción de un suceso dado con un balance apropiado de sensibilidad y especificidad, respectivamente. Por consiguiente, se pueda generar la referencia a usar para el método anteriormente mencionado de la presente invención, es decir, un valor de corte que permite discriminar entre sujetos que no están en riesgo, preferentemente, estableciendo una ROC para dicha cohorte como se describió anteriormente y derivando un valor de corte de la misma. Dependiente de una sensibilidad y especificidad preseleccionadas deseadas o límites correspondientes de confianza para un método de diagnóstico, el gráfico de curvas ROC permite derivar valores de corte adecuados. Se entenderá que la sensibilidad y la especificidad se ajustan de manera que el grupo de falsos negativos es mínimo para excluir un sujeto de estar en riesgo incrementado eficazmente (es decir, un descarte) mientras que la sensibilidad y la especificidad se ajustan de manera que el grupo de falsos positivos es mínimo para que un sujeto se valore como que está en un riesgo incrementado eficazmente (es decir, una inclusión). Además, los valores del área bajo la curva (ABC) se pueden derivar de los gráficos de curvas ROC dando una indicación para el corte independiente, funcionamiento global del bioindicador. Además, cada punto de la curva ROC representa un par de sensibilidad y especificidad a un cierto valor de corte.

El término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención significa +/-20 %, +/-10 %, +/-5 %, +/-2 % o +/-1 % a partir de los parámetros o valores indicados. Esto también puede tomar en cuenta las desviaciones normales causadas por las técnicas de medición y similares. El término, sin embargo, también incluye los parámetros o valores indicados precisamente.

De manera ventajosa, se ha encontrado en los estudios subyacentes de la presente invención que las cantidades de sFit-1, Endoglina o PIGF así como las relaciones de los mismos (véase también más adelante), es decir la relación sFit1/PIGF o Endoglina/PIGF, en un sujeto embarazado que muestra síntomas clínicamente aparentes limitados de preeclampsia, eclampsia o síndrome de HELLP o no los muestra en el momento cuando se han tomado las muestras que se investigan sirven como indicadores para un descarte de una preeclampsia inminente, es decir, el desarrollo de la preeclampsia y/o síndrome de HELLP inminente en un periodo corto de 2 semanas. En particular, las cantidades o valores de corte para los bioindicadores individuales se pueden establecer con un valor predictivo negativo alto cuando se usan los indicadores anteriormente mencionados. Además, se ha encontrado que las relaciones de sFLt-1/PIGF de aproximadamente 46 o incluso de aproximadamente 33 o menos son indicadores valiosos particulares que permiten un valor predictivo negativo del método de la presente invención de casi el 100 %.

También, se ha encontrado que una relación de sFLt-1/PIGF de aproximadamente 38 es de valor particular, como se describe en detalle en los ejemplos, en particular el Ejemplo 4 y la Figura 8. Por consiguiente, el método de la presente invención funciona con un alto nivel particular de confianza con respecto al diagnóstico de descarte a establecer. Además, se encontró que el método de la presente invención se podía usar fiablemente no solamente con muestras tomadas en la primera visita de un sujeto sino también con cada muestra tomada en una visita posterior. Además, el método según la presente invención se puede usar para identificar sujetos que se han diagnosticado falsamente positivos por estar en riesgo de desarrollar preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP mediante otras técnicas diagnósticas y, en particular, por ultrasonografía Doppler uterina. Al aplicar el método de la presente invención a sujetos que se han diagnosticado por investigaciones por ultrasonografía Doppler como que está en riesgo de desarrollar preeclampsia, eclampsia y/o síndrome de HELLP, los sujetos para los cuales el diagnóstico es falsamente positivo se pueden descartar eficientemente y fiablemente en una corta ventana de tiempo.

Gracias a la presente invención, es posible descartar más fiablemente un riesgo de preeclampsia inminente. Además, las medidas diagnósticas que requieren tiempo, caras e incómodas tales como los sistemas de puntuación actuales o investigaciones por ultrasonografía Doppler que requieren médicos bien entrenados se pueden evitar cuando se aplica el método de la invención como una ayuda para el diagnóstico. En este contexto, hay que indicar que al contrario que, por ejemplo, las investigaciones por ultrasonografía Doppler, el método según la invención incluso se puede llevar a cabo automáticamente o por personal de soporte médico en lugar de requerir médicos altamente especializados. La administración de la asistencia sanitaria se beneficiará en gran parte a partir del método de la presente invención puesto que la necesidad de cuidado intensivo y especial requerido, tal como monitorización minuciosa y también hospitalización, para mujeres embarazadas que padecen de o que están en riesgo de desarrollar preeclampsia se puede estimar mejor y tener en cuenta para fines de administración de asistencia médica.

Hay que entender que las definiciones y explicaciones de los términos realizadas anteriormente y más adelante se aplican por consiguiente para todas las realizaciones descritas en esta especificación y las reivindicaciones acompañantes.

En una realización preferida del método de la presente invención, dicho método comprende en la etapa a) determinar las cantidades de los bioindicadores sFlt-1 y PIGF en la muestra de dicho sujeto y en la etapa c) comparar el valor de la relación de las cantidades de los bioindicadores sFlt-1 y PIGF en la muestra de dicho sujeto con un valor de referencia, por lo cual se diagnostica un sujeto que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo si el valor de la relación es idéntico o reducido en comparación con el valor de referencia. Más preferentemente, dicho método comprende antes de la etapa b) la etapa adicional de cálculo de una relación de dichas cantidades de sFlt-1 y PIGF determinadas en la muestra en la etapa a).

El término "calcular una relación" como se refiere en el presente documento se refiere a calcular una relación de la cantidad de sFlt-1 y la cantidad de PIGF dividiendo dichas cantidades o llevando a cabo cualquier otro cálculo matemático comparable que pone dentro de una relación la cantidad de sFlt-1 con respecto a la cantidad de PIGF.

Preferentemente, la cantidad de sFlt-1 se divide por la cantidad de PIGF para calcular la relación, es decir, la relación es, preferentemente, la cantidad de sFlt-1 dividida por la cantidad de PIGF (también referida como sFlt-1/PIGF).

El término "comparar" como se usa en el presente documento abarca comparar la relación con la referencia como se define en otra parte. Hay que entender que comparar como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de comparación realizada entre la relación y la referencia. Se ha encontrado que un riesgo reducido o no incrementado de desarrollar preeclampsia en los estudios subyacentes de la presente invención se correlaciona con una relación determinada para sFlt-1 y PIGF que es idéntica o reducida en comparación con el valor de referencia.

Más preferentemente, dicho valor de referencia para la relación es aproximadamente 46, aproximadamente 45, aproximadamente 40, o aproximadamente 35 o menos y, preferentemente, es aproximadamente 33 o menos. Incluso más preferentemente, dicho valor de referencia para la relación determinada para sFlt-1 y PIGF es aproximadamente 38 o menos; lo más preferentemente, dicho valor de referencia para la relación determinada para sFlt-1 y PIGF es aproximadamente 38. Los valores de corte anteriormente mencionados difieren considerablemente en comparación con aquellos referidos para otros planteamientos de descarte (no específicos) para el diagnóstico en el día de la presentación en la técnica anterior (véase, por ejemplo, Stepan *loc cit.*) y alcanzan un valor predictivo negativo sorprendentemente alto para la predicción cuando se aplica en el método de la invención.

En una realización preferida adicional del método de la presente invención, dicho método comprende además recomendar una medida de tratamiento del paciente basada en el diagnóstico.

El término "recomendar" como se usa en el presente documento significa establecer una propuesta para una medida de tratamiento del paciente o combinaciones de la misma que se puede aplicar al sujeto o que no se debe aplicar al sujeto. Sin embargo, en una realización particular, hay que entender que la aplicación de la medida de tratamiento actual, cualquiera que sea, no está comprendida por el término. Las medidas de tratamiento del paciente, como se usa en el presente documento, se refiere a todas las medidas que se pueden aplicar a los sujetos que padecen de preeclampsia para curar, evitar o tratar dicha enfermedad. Por ejemplo, las medidas de tratamiento del paciente incluyen el grado de monitorización (por ejemplo, monitorización minuciosa, regular o débil), hospitalización o cuidado ambulatorio, aplicar o abstenerse de tratamiento con fármaco, o recomendaciones de estilo de vida.

Preferentemente, dicha medida de tratamiento del paciente (i) se selecciona del grupo de las siguientes medidas si el sujeto no está diagnosticado como que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia: monitorización minuciosa, hospitalización, administración de agentes reductores de la presión sanguínea y recomendaciones de estilo de vida, y (ii) es monitorización ambulatoria si el sujeto se diagnostica como que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia.

La presente descripción se refiere además a un método de tratamiento de un sujeto que se supone que padece de preeclampsia que comprende las etapas del método para diagnosticar si un sujeto embarazado no está en riesgo de preeclampsia en una corta ventana de tiempo referida en el presente documento anteriormente y la etapa adicional de tratamiento del sujeto según el diagnóstico establecido. Preferentemente, dicho tratamiento incluye cuidado ambulatorio del sujeto, monitorización regular o débil, abstención de administración de fármaco y, en particular, administración de agentes reductores de la presión sanguínea o corticoesteroides antenatales (por ejemplo, betametasona), aplicándose éstos para acelerar la maduración del pulmón fetal en mujeres en riesgo de parto prematuro.

La presente descripción también se refiere al uso de al menos uno de los bioindicadores sFlt-1, Endoglina y PIGF o al menos un agente de detección para los mismos que se une específicamente a los mismos en una muestra de un sujeto embarazado para diagnosticar si dicho sujeto no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo. La presente invención también incluye el uso de al menos uno de los bioindicadores sFlt-1, Endoglina y PIGF o al menos un agente de detección para los mismos que se une específicamente a los mismos en una muestra de un sujeto embarazado para recomendar una medida de tratamiento del paciente como se muestra en otra parte del presente documento.

También la presente descripción contempla el uso de al menos uno de los bioindicadores sFlt-1, Endoglina y PIGF o al menos un agente de detección para los mismos que se une específicamente a los mismos en una muestra de un sujeto embarazado para la producción de una entidad o composición de diagnóstico o farmacéutica para diagnosticar si dicho sujeto no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo. La presente descripción también incluye el uso de al menos uno de los bioindicadores sFlt-1, Endoglina y PIGF o al menos un agente de detección para los mismos que se une específicamente a los mismos en una muestra de un sujeto embarazado para la producción de una entidad o composición de diagnóstico o farmacéutica para recomendar una medida de tratamiento del paciente mostrada en otra parte en el presente documento.

La presente descripción se refiere a un dispositivo adaptado para diagnosticar si un sujeto embarazado no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo llevando a cabo el método de la presente invención que comprende:

- a) una unidad analizadora que comprende al menos un agente de detección que se une específicamente a al menos un bioindicador de angiogénesis seleccionado del grupo que consiste en: sFlt-1, Endoglina y P1GF, estando dicha unidad adaptada para determinar la cantidad de sFlt-1, Endoglina y PIGF en una muestra de un sujeto embarazado; y
- b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para comparar la cantidad con una referencia, por lo cual se diagnostica un sujeto que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo si la cantidad es idéntica o reducida en comparación con la referencia en los casos de sFlt-1 y Endoglina e idéntica o incrementada en el caso de P1GF, en la que dicha referencia permite hacer el diagnóstico con un valor previsto negativo de al menos aproximadamente el 98 %.

El término "dispositivo" como se usa en el presente documento se refiere a un sistema que comprende las unidades anteriormente mencionadas unidas de manera operable unas con otras para permitir el diagnóstico según los métodos de la invención. Los agentes de detección preferidos que se pueden usar para la unidad analizadora se describen en otra parte en el presente documento. La unidad analizadora, preferentemente, comprende dichos agentes de detección en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que se pone en contacto con la muestra que comprende los bioindicadores cuya cantidad es a determinar. Además, la unidad analizadora también puede comprender un detector que determina la cantidad del agente de detección que se une específicamente a los bioindicador(es). La cantidad determinada se puede transmitir 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 las relaciones, una comparación de dichas relaciones calculadas y una evaluación del resultado de la comparación mediante la implementación de un algoritmo informatizado que lleva a cabo las etapas del método de la presente invención mostradas en otra parte en el presente documento en detalle. Los resultados se pueden dar como salida de datos sin procesar diagnósticos paramétricos. Hay que entender que estos datos normalmente necesitarán interpretación por parte del médico. Sin embargo, también se prevén dispositivos de sistema expertos en los que la salida comprende datos sin procesar diagnósticos procesados cuya interpretación no requiere un médico especializado.

En una descripción adicional del dispositivo, dicha unidad analizadora comprende agentes de detección para determinar las cantidades de los bioindicadores sFlt-1 o Endoglina y PIGF en la muestra de dicho sujeto y en la que dicho algoritmo implementado en la unidad de evaluación compara el valor de la relación de la cantidad de sFlt-1 o Endoglina y PIGF con un valor de referencia, por lo cual se diagnostica un sujeto que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo si el valor de la relación es idéntico o reducido en comparación con el valor de referencia. Preferentemente, dicho algoritmo implementado en la unidad de evaluación calcula además una relación de la cantidad de sFlt-1 o Endoglina y P1GF.

En una descripción adicional, dicha unidad de evaluación comprende además un algoritmo implementado que hace una recomendación para una medida de tratamiento del paciente basada en el diagnóstico como se muestra en otra parte en el presente documento.

5 De lo anterior se deduce que según alguna descripción, partes de algunas etapas de los métodos revelados y descritos en el presente documento se pueden realizar mediante un dispositivo informático. Un dispositivo informático puede ser un ordenador de uso general o un dispositivo informático portátil, por ejemplo. Se debería entender que múltiples dispositivos informáticos se pueden usar juntos, tal como por una red u otros métodos de transferencia de datos, para realizar una o más etapas de los métodos descritos en el presente documento.
10 Dispositivos informáticos como ejemplo incluyen ordenadores de sobremesa, portátiles, asistentes de datos personales ("PDA"), tales como dispositivos de la marca BLACKBERRY, celulares, tabletas, servidores y similares. En general, un dispositivo informático que comprende un procesador capaz de ejecutar una pluralidad de instrucciones (tal como un programa informático).

15 Un dispositivo informático tiene acceso a una memoria. Una memoria es un medio legible por ordenador y puede comprender un dispositivo de almacenamiento único o múltiples dispositivos de almacenamiento, localizados o bien localmente con el dispositivo informático o accesible al dispositivo informático a través de una red, por ejemplo. Los soportes informáticos de lectura pueden ser cualquier medio disponible que se pueda acceder mediante el dispositivo informático e incluye tanto medios permanentes como no permanentes. Además, los soportes
20 informáticos de lectura pueden ser uno o ambos de medios renovables y no renovables. A modo de ejemplo, y no de limitación, los soportes informáticos de lectura pueden comprender medios de almacenamiento del ordenador. Soportes informáticos de almacenamiento como ejemplo incluyen, pero no se limitan a, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash o cualquier otra tecnología de memoria, CD-ROM, Disco versátil digital (DVD), u otro almacenamiento en disco óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de
25 almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que se pueda usar para almacenar una pluralidad de instrucciones a las que se pueda acceder por el dispositivo informático y se puedan ejecutar por el procesador del dispositivo informático.

30 Según la descripción adicional, el programa informático puede incluir instrucciones que, cuando se ejecutan mediante un procesador del dispositivo informático, puede realizar una o más etapas de los métodos descritos en el presente documento. Algunas de las instrucciones se pueden adaptar para producir señales que controlan el funcionamiento de otras máquinas y así pueden funcionar a través de esas señales control para transformar los materiales aislados del propio ordenador. Estas descripciones y representaciones son los medios usados por los expertos en la técnica de procesamiento de datos, por ejemplo, para transmitir lo más eficazmente el material de su
35 trabajo a otros expertos en la técnica.

La pluralidad de instrucciones también puede comprender un algoritmo que generalmente se concibe que es una secuencia autoconsistente de etapas que conducen a un resultado deseado. Estas etapas son aquellas que requieren de manipulaciones físicas de cantidades físicas. Normalmente, aunque no necesariamente, estas
40 cantidades toman la forma de pulsos o señales eléctricas o magnéticas capaces de ser almacenadas, transferidas, transformadas, combinadas, comparadas y de otra manera manipuladas. Resulta conveniente a veces, principalmente por razones de uso común, referirse a estas señales como valores, caracteres, datos de representación, números o similares como una referencia a los artículos físicos o manifestaciones en las que tales señales se plasman o expresan. Sin embargo, se debería tener en mente que todos estos términos similares están
45 asociados con las cantidades físicas apropiadas y se usan simplemente como se usa aquí como marcadores convenientes aplicados a estas cantidades. Según alguna descripción, un algoritmo para llevar a cabo una comparación entre una cantidad determinada de uno o más indicadores descritos en el presente documento, y una referencia adecuada, se incorpora y realiza mediante la ejecución de las instrucciones. Los resultados se pueden dar como salida de datos sin procesar diagnósticos paramétricos o como cantidades absolutas o relativas. Según
50 diversas descripciones del sistema descrito en el presente documento, se puede proporcionar un "diagnóstico" mediante el dispositivo informático de un sistema descrito en el presente documento basado en dicha comparación de la "cantidad" calculada con una referencia o un umbral. Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede proporcionar un indicador, en forma de una palabra, símbolo, o valor numérico que es indicativo de un diagnóstico particular.

55 El dispositivo informático también puede tener acceso a un dispositivo de salida. Dispositivos de salida como ejemplo incluyen máquinas de fax, monitores, impresoras y ficheros, por ejemplo. Según alguna descripción, un dispositivo informático puede realizar una o más etapas de un método descrito en el presente documento, y a partir de entonces proporcionar una salida, por un dispositivo de salida, que se refiere a un resultado, relación u otro factor del método.
60

La descripción se refiere además a un sistema para establecer una ayuda para diagnosticar si un sujeto embarazado no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo llevando a cabo el método de la presente invención que comprende:
65

- a) una unidad analizadora configurada para poner en contacto la muestra con un agente de detección (agentes de detección) que se une(n) específicamente a dicho al menos un indicador seleccionado del grupo que consiste en sFlt-1, Endoglin y PIGF durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y el al menos un indicador de la muestra,
- b) una unidad analizadora configurada para medir la cantidad del complejo formado, en la que dicha cantidad del complejo formado es proporcional a la cantidad del al menos un indicador presente en la muestra,
- c) un dispositivo informático que tiene un procesador y en comunicación operable con dichas unidades de análisis, y
- d) un medio legible de maquina no transitorio que incluye una pluralidad de instrucciones ejecutables por el procesador, las instrucciones, cuando se ejecutan, transforman la cantidad del complejo formado en una cantidad de al menos un indicador que refleja la cantidad del al menos un indicador presente en la muestra, comparan dicha cantidad con una referencia, y establecen una ayuda para optimizar una valoración de riesgo basada en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos que están en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo basándose en el resultado de dicha comparación con dicha referencia.

Una descripción adicional incluye un sistema para optimizar una valoración de riesgo basada en una regla de predicción clínica para clasificar sujetos con riesgo de desarrollar preeclampsia. Ejemplos de sistemas incluyen analizadores de química clínica, analizadores de química de coagulación, analizadores de inmunoquímica, analizadores de orina, analizadores de ácido nucleico, usados para detectar el resultado de las reacciones químicas o biológicas o para hacer un seguimiento del proceso de las reacciones químicas o biológicas. Más específicamente, sistemas como ejemplo de la presente descripción pueden incluir analizadores de inmunoensayo de Roche Elecsys™ Systems y Cobas® e , Analizadores de Abbott Architect™ y AxSYM™, Analizadores de Siemens Centaur™ y Immulite™, y analizadores de Beckman Coulter UniCel™ y Access™, o similares.

Las descripciones del sistema pueden incluir una o más unidades analizadoras utilizadas para poner en práctica la descripción objeto. Las unidades analizadoras del sistema descrito en el presente documento están en comunicación operable con el dispositivo informático descrito en el presente documento a través de cualquier conexión por cables, Bluetooth, LANS, o señal inalámbrica conocida. Además, según la presente descripción, una unidad analizadora puede comprender un aparato autónomo, o módulo dentro de un instrumento mayor, que realiza una o ambas de la detección, por ejemplo, evaluación cualitativa y/o cuantitativa de muestras para fin diagnóstico.

Por ejemplo, una unidad analizadora puede realizar o ayudar con el pipeteado, dosificación, mezclado de muestras y/o reactivos. Una unidad analizadora puede comprender una unidad de retención de reactivo para retener los reactivos para realizar los ensayos. Los reactivos se pueden disponer, por ejemplo, en forma de envases o módulos que contienen reactivos individuales o grupo de reactivos, colocados en receptáculos apropiados o posiciones dentro de un compartimento de almacenamiento o cinta transportadora. Los reactivos de detección también pueden estar en forma inmovilizada sobre un soporte que está en contacto con la muestra. Además, una unidad analizadora puede incluir un proceso y/o componente de detección que es optimizable para el análisis específico.

Según alguna descripción, una unidad analizadora puede estar configurada para la detección óptica de un analito, por ejemplo un indicador, con una muestra. Una unidad analizadora como ejemplo configurada para la detección óptica comprende un dispositivo configurado para convertir la energía electromagnética en una señal eléctrica, que incluye tanto detectores ópticos sencillos como multielementos o de matriz. Según la presente descripción, un detector óptico es capaz de hacer un seguimiento de una señal electromagnética y proporcionar una señal de salida eléctrica o señal de respuesta relativa a una señal base indicativa de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra que está localizada en una trayectoria óptica. Tales dispositivos también pueden incluir, por ejemplo, fotodiodos, incluyendo fotodiodos de avalancha, fototransistores, detectores fotoconductivos, matrices de sensores lineales, detectores CCD, detectores CMOS, incluyendo detectores de matriz CMOS, fotomultiplicadores y matrices de fotomultiplicadores. Según cierta descripción, un detector óptico, tal como un fotodiodo o fotomultiplicador, puede contener compuestos electrónicos de acondicionamiento o procesamiento de señal adicionales. 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, transimpedancia y ganancia de corriente (espejo de corriente).

Además, una o más unidades analizadoras según la presente descripción pueden comprender una fuente de luz para emitir luz. Por ejemplo, una fuente de luz de una unidad analizadora puede consistir en al menos un elemento emisor de luz (tal como un diodo emisor de luz, una fuente de radiación con alimentación eléctrica tal como una lámpara incandescente, una lámpara electroluminiscente, una lámpara de descarga de gas, una lámpara de descarga de alta intensidad, un láser) para medir las concentraciones de analito con una muestra que se ensaya o para permitir una transferencia de energía (por ejemplo, a través de transferencia de energía de resonancia fluorescente o catalizando una enzima).

Además, una unidad analizadora del sistema puede incluir una o más unidades de incubación (por ejemplo, para mantener una muestra o un reactivo a una temperatura específica o intervalo de temperatura). En alguna descripción, una unidad analizadora puede incluir un termociclador, incluir un termociclador a tiempo real, para

someter una muestra a ciclos de temperatura repetida y hacer un seguimiento de un cambio en la cantidad de un producto de amplificación con la muestra.

5 Además, una unidad analizadora del sistema descrito en el presente documento puede comprender, o conectarse de manera operable a, una unidad de alimentación de vaso o cubeta de reacción. Las unidades de alimentación como ejemplo incluyen unidades de procesamiento de líquido, tales como una unidad de pipeteado, para administrar muestras y/o reactivos a los vasos de reacción. La unidad de pipeteado puede comprender una aguja lavable reutilizable, por ejemplo, una aguja de acero, o puntas de pipetas desechables. La unidad analizadora además puede comprender una o más unidades de mezcla, por ejemplo, un agitador para agitar una cubeta que comprende un líquido, o una pala de mezcla para mezclar líquidos en una cubeta, o envase de reactivo.

15 La presente descripción también se refiere a un kit adaptado para llevar a cabo el método de la presente invención que comprende al menos un agente de detección para determinar la cantidad de un bioindicador de angiogénesis seleccionado del grupo que consiste en: sFlt-1, Endogлина y P1GF, así como las instrucciones para llevar a cabo dicho método.

20 El término "kit" como se usa en el presente documento se refiere a una colección de los componentes anteriormente mencionados, preferentemente, proporcionados por separado o dentro de un envase único. El envase también comprende instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención. Estas instrucciones pueden estar en forma de un manual o se pueden proporcionar por un código de programa informático que es capaz de llevar a cabo los cálculos y las comparaciones referidas en los métodos de la presente invención y por consiguiente establecer un diagnóstico cuando se implementa en un ordenador o un dispositivo de procesamiento de datos. El código de programa informático se puede proporcionar en un medio o dispositivo 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, preferentemente, comprender cantidades patrones para los bioindicadores como se describe en otra parte en el presente documento para fines de calibración.

25 En una descripción adicional del kit, dicho kit comprende un agente de detección para determinar la cantidad de sFlt1 y/o Endogлина y un agente de detección para determinar la cantidad de PIGF en una muestra de un sujeto embarazado.

35 En alguna descripción, un kit descrito en el presente documento incluye al menos un componente o una combinación empaquetada de componentes para poner en práctica un método descrito. Por "combinación empaquetada" se quiere decir que los kits proporcionan un paquete único que contiene una combinación de uno o más componentes, tales como sondas (por ejemplo, un anticuerpo), controles, tampones, reactivos (por ejemplo, conjugado y/o sustrato), instrucciones, y similares, como se describe en el presente documento. Un kit que contiene un recipiente único también está incluido dentro de la definición de "combinación empaquetada". En alguna descripción, los kits incluyen al menos una sonda, por ejemplo, un anticuerpo (que tiene afinidad específica para un epítipo de un bioindicador como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los kits pueden incluir un anticuerpo que está marcado con un fluoróforo o un anticuerpo que es un miembro de una proteína de fusión. En el kit, la sonda puede estar inmovilizada, y puede estar inmovilizada en una conformación específica. Por ejemplo, se puede proporcionar una sonda inmovilizada en un kit para unir específicamente la proteína diana, para detectar la proteína diana en una muestra, y/o para separar la proteína diana de una muestra.

45 Según alguna descripción, los kits incluyen al menos una sonda, que puede estar inmovilizada, en al menos un envase. Los kits también pueden incluir sondas múltiples, opcionalmente inmovilizadas, en uno o más envases. Por ejemplo, las sondas múltiples pueden estar presentes en un envase único en envases separados, por ejemplo, en los que cada envase contiene una sonda múltiple.

50 En alguna descripción, un kit puede incluir una o más sondas no inmovilizadas y uno o más soportes sólidos que incluyen o no una sonda inmovilizada. Alguna descripción puede comprender alguno o todos los reactivos y suministros necesarios para inmovilizar una o más sondas al soporte sólido, o alguno o todos los reactivos y suministros necesarios para unir las sondas inmovilizadas a proteínas específicas dentro de una muestra.

55 En cierta descripción, una sonda única (incluyendo copias múltiples de la misma sonda) pueden estar inmovilizadas sobre un soporte sólido único y proporcionadas en un envase único. En otra descripción, dos o más sondas, cada una específica para una proteína diana diferente o una forma diferente de una proteína diana única (tal como un epítipo específico), se proporcionan en un envase único. En alguna descripción, se puede proporcionar una sonda inmovilizada en múltiples envases diferentes (por ejemplo, en forma de uso único), o se pueden proporcionar sondas inmovilizadas múltiples en múltiples envases diferentes. En la descripción adicional, las sondas pueden estar inmovilizadas sobre múltiples tipos diferentes de soportes sólidos. Se contempla que se puede seleccionar cualquier combinación de sonda(s) inmovilizada(s) y envase(s) para los kits descritos en el presente documento, y cualquier combinación de los mismos para conseguir un kit adecuado para un uso deseado.

Un envase de los kits puede ser un envase que es adecuado para empaquetar y/o contener uno o más componentes descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, sondas (por ejemplo, un anticuerpo), controles, tampones y reactivos (por ejemplo, conjugado y/o sustrato). Los materiales adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio, plástico, cartón u otro producto de papel, madera, metal y cualquier aleación del mismo. En alguna descripción, el envase puede encerrar completamente una sonda(s) inmovilizada(s) o puede simplemente cubrir la sonda para minimizar la contaminación por polvo, aceites, etc., y exposición a la luz. En alguna descripción adicional, los kits pueden comprender un envase único o recipientes múltiples, y cuando los envases múltiples están presentes, cada envase puede ser igual a todos los otros envases, diferente de los otros, o diferente de alguno pero no todos los otros envases.

En un aspecto de la descripción, se contempla un método para establecer una ayuda para descartar la preeclampsia en una corta ventana de tiempo, comprendiendo dicho método:

- a) determinar la cantidad de al menos un bioindicador de angiogénesis referido en el presente documento en una muestra de un sujeto embarazado, dicha determinación comprende (i) poner en contacto la muestra con un agente de detección que se une específicamente a dicho al menos un bioindicador de angiogénesis durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y el bioindicador de la muestra, (ii) medir la cantidad del complejo formado, en el que dicha cantidad del complejo formado es proporcional a la cantidad del al menos un bioindicador presente en la muestra, y (iii) transformar la cantidad del complejo formado en una cantidad del al menos un bioindicador que refleja la cantidad del al menos un bioindicador presente en la muestra;
- b) comparar dicha cantidad con una referencia; y
- c) establecer una ayuda para descartar la preeclampsia en una corta ventana de tiempo basándose en el resultado de la comparación hecha en la etapa b).

Un agente de detección adecuado puede ser, en un aspecto, un anticuerpo que se une específicamente a al menos un bioindicador de angiogénesis en una muestra de un sujeto a investigar mediante el método de la invención. Otro agente de detección que se puede aplicar, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente a al menos un bioindicador de angiogénesis en la muestra. En otro aspecto, la muestra se separa del complejo formado entre el agente de detección y el al menos un bioindicador de angiogénesis antes de la medición de la cantidad de complejo formado. Por consiguiente, en un aspecto, el agente de detección se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. En otro aspecto, la muestra se puede separar del complejo formado sobre el soporte sólido aplicando una solución de lavado. El complejo formado será proporcional a la cantidad del al menos un bioindicador de angiogénesis presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o sensibilidad del agente de detección a aplicar define el grado de proporción de al menos un bioindicador de angiogénesis comprendido en la muestra que es capaz de unirse específicamente. Detalles adicionales de cómo se puede llevar a cabo la determinación también se encuentran en otra parte del documento. La cantidad de complejo formado se transformará en una cantidad de al menos un bioindicador de angiogénesis que refleja la cantidad de verdad presente en la muestra. Tal cantidad, en un aspecto, puede ser básicamente la cantidad presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, una cantidad que es una cierta proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.

En otro aspecto del método anteriormente mencionado, la etapa a) se puede llevar a cabo mediante una unidad analizadora, en un aspecto, una unidad analizadora como se define en otra parte en el presente documento. En otros aspectos, alguna o todas las etapas a) a c) se pueden llevar a cabo mediante una unidad analizadora como se define en otra parte en el presente documento.

En un aspecto del método descrito, la cantidad determinada en la etapa a) se compara con una referencia. En un aspecto, la referencia es una referencia como se define en otra parte en el presente documento. En aún otro aspecto, la referencia tiene en cuenta la relación proporcional entre la cantidad medida del complejo y la cantidad presente en la muestra original. Por tanto, las referencias aplicadas según esta descripción son referencias artificiales que se adoptan para reflejar las limitaciones del agente de detección que se ha usado. En otro aspecto, dicha relación también se tiene en cuenta cuando se lleva a cabo la comparación, por ejemplo, incluyendo una etapa de normalización y/o cálculo de corrección para la cantidad determinada antes de la comparación real del valor de la cantidad determinada y la referencia. De nuevo, la etapa de normalización y/o cálculo de corrección para la cantidad determinada adopta la etapa de comparación de manera que las limitaciones del agente de detección que se han usado se reflejan apropiadamente. En un aspecto, la comparación se lleva a cabo automáticamente, por ejemplo, asistida por un sistema informático o similares.

La ayuda para diagnosticar se establece basándose en la comparación llevada a cabo en la etapa b) asignando inequívocamente el sujeto dentro del grupo de sujetos que no están en riesgo de desarrollar preeclampsia en una corta ventana de tiempo o excluyéndolo ambiguamente de dicho grupo. Como ya se discutió en otra parte en el presente documento, la asignación del sujeto investigado no debe ser correcta en el 100 % de los casos investigados. Los grupos de sujetos dentro de los cuales se asigna el sujeto investigado son grupos artificiales en que se establecen basándose en las consideraciones estadísticas, es decir, un cierto grado preseleccionado de

probabilidad basado en el cual el método de la investigación funcionaría. Por tanto, el método puede establecer una ayuda de diagnóstico que puede, en un aspecto, requerir consolidación adicional del diagnóstico por otras técnicas.

5 En un aspecto de la descripción, la ayuda para el diagnóstico se establece automáticamente, por ejemplo, asistido por un sistema informático o similares.

En un aspecto del método anteriormente mencionado, las etapas b) y/o c) se llevan a cabo mediante una unidad de evaluación como se muestra en otra parte en el presente documento.

10 Figuras

15 La Figura 1 muestra la relación de sFlt-1/PIGF en diferentes semanas de gestación. Los círculos en blanco representan casos en los que se ha determinado no preeclampsia (PE) en 1 semana después de que se haya tomado la muestra (visita), los círculos grises son casos con preeclampsia (PE). (A) n=94, por debajo de un corte de 46, casos de no PE en los que se detecta; (B) n=269; por debajo de un corte de 38, solamente pocos casos de PE en los que se detecta.

20 La Figura 2 muestra la relación de sFlt-1/PIGF en diferentes semanas de gestación. Los círculos en blanco representan casos en los que se ha determinado no preeclampsia (PE) en 2 semanas después de que se haya tomado la muestra (visita). Los círculos grises representan casos con preeclampsia (PE). Por debajo de un corte de 46, casos no PE en los que se detecta. (A) n=94, por debajo de un corte de 46, casos no PE en los que se detecta; (B) n=269; por debajo de un corte de 38, solamente pocos casos PE en los que se detecta.

25 La Figura 3 (A) muestra un análisis de distribución bivalente de las relaciones sFlt-1/PIGF y los días hasta la aparición de la preeclampsia (PE); (B) igual que en (A), pero con una cohorte mayor.

30 La Figura 4 (A) muestra una curva ROC y su análisis estadístico para no aparición de preeclampsia (PE) en 1 semana después de que se haya tomado la muestra (visita). Un ABC (área bajo la curva) de 1,0 cualifica una prueba diagnóstica perfecta, un ABC de 0,5 uno inútil. El intervalo de confianza para el ABC refleja la precisión de lo estimado basado en los datos presentes; n=94; (B) igual que en (A), pero n=269.

35 La Figura 5 (A) muestra una curva ROC y su análisis estadístico para no aparición de preeclampsia (PE) en 2 semanas después de que se haya tomado la muestra (visita). Un ABC (área bajo la curva) de 1,0 califica una prueba diagnóstica perfecta, un ABC de 0,5 uno inútil. El intervalo de confianza para el ABC refleja la precisión de lo estimado basado en los datos presentes; n=94; (B) igual que en (A), pero n=269.

40 La Figura 6 muestra gráficos de diagrama de cajas que usa la relación sFlt-1/PIGF (A) y la relación Endoglina/PIGF (B); n=94 durante 1 semana PE, n=88 durante 4 semanas PE. El lado izquierdo de cada gráfico muestra mediciones de pacientes con resultados de sonografía Doppler anormal (mIP-AUt>percentil 95.), el lado derecho muestra mediciones de pacientes con resultados normales. Además, las mediciones se separan para pacientes que desarrollan PE/HELLP (cajas rojas) o no (cajas verdes) en una semana (gráfico izquierdo) y cuatro semanas (gráfico derecho), respectivamente. Los gráficos muestran que la relación sFlt-1/PIGF y la relación Endoglina/PIGF ambas tienen potencial para predecir si un paciente desarrollará una PE o no tanto en una semana como en cuatro semanas, especialmente en pacientes con resultados de sonografía Doppler anormales. La relación sFlt-1/PIGF parece distinguir más precisamente que la relación Endoglina/PIGF especialmente para la predicción de PE/HELLP en cuatro semanas.

50 La Figura 7 muestra gráficos de diagrama de cajas que usan la relación sFlt-1/PIGF (gráficos de diagrama de cajas mostrados, n=269). El lado izquierdo de cada gráfico muestra mediciones de pacientes con resultados de sonografía Doppler anormal (mIP-AUt> percentil 95), el lado derecho muestra mediciones de pacientes con resultados normales. Además, las mediciones se separan para pacientes que desarrollan PE/HELLP o no en una semana (A), dos semanas (B) y cuatro semanas (C), respectivamente. Los gráficos muestran que la sFlt-1/PIGF tiene potencial para predecir si un paciente desarrollará una PE o no tanto en una semana, en dos semanas como en cuatro semanas, especialmente en pacientes con resultados de sonografía Doppler anormales.

55 La Figura 8: Para el estudio de pronóstico (con 500 pacientes), el corte para la relación sFlt1-PIGF de preeclampsia en cuatro semanas se determinó junto con la realización de este corte. Para evitar sobreajuste (*overfitting*), se aplicó un método de validación cruzada, denominado una validación cruzada Monte Carlo. Para esto, todos los datos se dividieron en dos subgrupos discontinuos – grupo de entrenamiento y grupo de estudio – con una relación de 2 a 1. Después de esta división el modelo se determinó en el conjunto de entrenamiento y la predicción se valoró en el conjunto de estudio. Este procedimiento se repitió 1999 veces sobre divisiones de grupo de entrenamiento-grupo de estudio elegidas al azar. La consecuencia fue 1999 modelos de predicción con 1999 cortes, reflejado por el diagrama de cajas con, por ejemplo, una media de aproximadamente 38. Este es el mismo corte encontrado en la cohorte grande para descartar la preeclampsia durante una semana (Ejemplo 4).

65

Ejemplos

Los siguientes ejemplos simplemente ilustrarán la invención. No se interpretarán, en absoluto, para limitar el ámbito de la invención.

5 Ejemplo 1: Determinación de los niveles en sangre de sFlt-1, Endoglina y PIGF

Los niveles en sangre de sFlt-1, PIGF y Endoglina se determinaron usando los inmunoensayos comercialmente disponibles. En particular se han usado los siguientes ensayos.

10 sFlt-1 se determinó con inmunoensayos tipo sándwich usando analizadores de la serie de Roche Elecsys™ o cobas e™. El ensayo comprende dos anticuerpos monoclonales específicos para el respectivo polipéptido. El primero de estos anticuerpos se somete a biotinylation y el segundo se marca con un complejo de Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II).

15 En una primera etapa de incubación se incuban ambos anticuerpos con la muestra. Se forma un complejo tipo sándwich que comprende el péptido a determinar y los dos anticuerpos diferentes. En una próxima etapa de incubación se añaden perlas revestidas con estreptavidina a este complejo. Las perlas se unen a los complejos tipo sándwich. La mezcla de reacción, a continuación, se aspira dentro de una célula de medición en la que las perlas se capturan magnéticamente sobre la superficie de un electrodo. A continuación, la aplicación de un voltaje induce una emisión quimioluminiscente a partir del complejo de rutenio que se mide por un fotomultiplicador. La cantidad emitida de luz es dependiente de la cantidad de complejos tipo sándwich en el electrodo. El ensayo de sFlt-1 está comercialmente disponible en Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania. Detalles adicionales sobre el ensayo se encuentran en el folleto. El intervalo de medición de sFlt-1 incluye cantidades entre 10 y 85.000 pg/ml.

25 La Endoglina se midió usando el inmunoensayo de Endoglina/CD105 humana Quantikine™ que está comercialmente disponible en R&D Systems, Inc, Minneapolis, US. Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal específico para la Endoglina se ha revestido previamente sobre una microplaca. Los patrones y las muestras se pipetearon en los pocillos y cualquier Endoglina presente se une mediante el anticuerpo inmovilizado. Después de separar por lavado cualquier sustancia no unida, se añade un anticuerpo monoclonal ligado a enzima específico para Endoglina a los pocillos. Después de un lavado para separar cualquier reactivo de enzima a anticuerpo no unido, se añade una solución de sustrato a los pocillos y desarrolla color en proporción a la cantidad de Endoglina unida en la etapa inicial. El desarrollo de color se para y se mide la intensidad del color. Detalles adicionales sobre el ensayo se encuentran en el folleto. El intervalo de medición de la Endoglina incluye cantidades entre 0,001 ng/l y 10 ng/ml.

35 Se ensayó P1GF usando dos anticuerpos específicos de PIGF en un inmunoensayo tipo sándwich que se lleva a cabo en un analizador de serie de Elecsys™ o cobas e™ (véase anteriormente para detalles). El ensayo de P1GF está comercialmente disponible en Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania. Detalles adicionales sobre el ensayo se encuentran en el folleto. El intervalo de medición de P1GF incluye cantidades de 3 a 10.000 pg/ml.

40 Ejemplo 2: Análisis de la preeclampsia como resultado en 1 semana

45 En las tablas que se usaron para producir la curva ROC, uno puede seleccionar los valores de corte con el VPN objeto y estimar la sensibilidad, especificidad y VPP en este corte. Para todas estas proporciones los intervalos de confianza están disponibles basados en el tamaño de muestra actual.

50 Para pacientes entre la semana 24+/-0 y la semana 40+/-0 después de la gestación, un corte de 45 para la relación sFlt-1/PIGF determinada en una muestra obtenida en la primera visita produjo un VPN del 100 % (límite inferior de confianza del 95 % 96,58 %) para predecir la preeclampsia, con una sensibilidad estimada del 100 % (LIC95 66,37 %) y una especificidad estimada del 82,92 % (LIC95 73,13 %). El VPP estimado es del 26,47 % (LIC95 12,88 %). Se ensayaron 34 frente a 106 sujetos positivos/negativos en este corte, se espera que 9 de los 34 desarrollen PE, no ninguno de los 106.

55 Para pacientes entre la semana 24+/-0 y la semana 40+/-0 después de la gestación, un corte de 45 para la relación sFlt-1/PIGF determinada en muestras obtenidas en visitas múltiples produjo un VPN del 99,43 % (límite inferior de confianza del 95 % 97,96 %) que es estimado, con una sensibilidad estimada del 86,67 % (LIC95 63,66 %) y una especificidad estimada del 80,60 % (LIC95 76,56 %). El VPP estimado es del 13,40 % (LIC95 7,33 %). Se ensayaron 97 frente a 351 sujetos positivos/negativos en este corte, 13 de las 94 visitas precedieron una PE, pero 2 de los 351.

60

Los resultados también se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1: valores de ABC, LIC95 y LSC95

Respuesta	Bioindicador	ABC	LIC95	LSC95
PE en 1 semana	relación sFlt 1 PIGF	0,9211	0,8703	0,9719
PE en 1 semana	relación endogl PIGF	0,9118	0,8448	0,9788
PE en 1 semana	tst res sFlt 1 pg ml	0,933	0,8889	0,9771
PE en 1 semana	tst res PIGF pg ml	0,8482	0,7608	0,9356
PE en 1 semana	endogl ng ml	0,9254	0,8615	0,9892
PE en 1 semana – todas las visitas	relación sFlt 1 PIGF	0,9108	0,8689	0,9528
PE en 1 semana – todas las visitas	relación endogl PIGF	0,8949	0,8493	0,9405
PE en 1 semana – todas las visitas	tst res sFlt 1 pg ml	0,9087	0,849	0,9684
PE en 1 semana – todas las visitas	tst res PIGF pg ml	0,8618	0,8112	0,9124
PE en 1 semana – todas las visitas	endogl ng ml	0,8928	0,8419	0,9437
PE en 2 semanas	relación sFlt 1 PIGF	0,9262	0,8788	0,9735
PE en 2 semanas	relación endogl PIGF	0,9108	0,8487	0,9729
PE en 2 semanas	tst res sFlt 1 pg ml	0,9438	0,9041	0,9836
PE en 2 semanas	tst res PIGF pg ml	0,8485	0,7681	0,9288
PE en 2 semanas	endogl ng ml	0,9238	0,865	0,9827
PE en 2 semanas – todas las visitas	relación sFlt 1 PIGF	0,8978	0,8566	0,939
PE en 2 semanas – todas las visitas	relación endogl PIGF	0,873	0,8305	0,9155
PE en 2 semanas – todas las visitas	tst res sFlt 1 pg ml	0,8897	0,8356	0,9437
PE en 2 semanas – todas las visitas	tst res PIGF pg ml	0,8568	0,8116	0,9021
PE en 2 semanas – todas las visitas	endogl ng ml	0,8615	0,8161	0,9069
PE en 4 semanas	relación sFlt 1 PIGF	0,89	0,8355	0,9445
PE en 4 semanas	relación endogl PIGF	0,8608	0,7977	0,9239
PE en 4 semanas	tst res sFlt 1 pg ml	0,9034	0,8447	0,9621
PE en 4 semanas	tst res PIGF pg ml	0,8331	0,7663	0,8999
PE en 4 semanas	endogl ng ml	0,8651	0,801	0,9293
PE en 4 semanas – todas las visitas	relación sFlt 1 PIGF	0,8655	0,8261	0,9049
PE en 4 semanas – todas las visitas	relación endogl PIGF	0,8369	0,797	0,8768
PE en 4 semanas – todas las visitas	tst res sFlt 1 pg ml	0,861	0,8168	0,9053
PE en 4 semanas – todas las visitas	tst res PIGF pg ml	0,8262	0,7806	0,8717
PE en 4 semanas – todas las visitas	endogl ng ml	0,8233	0,7801	0,8666

- 5 Ejemplo 3: Comparación de la realización diagnóstica de las relaciones de bioindicador sFlt-1/PIGF y Endoglina/PIGF con resultados de ultrasonografía Doppler en mujeres embarazadas para la predicción de PE/HELLP en una corta ventana de tiempo

- 10 La comparación de mIP-AUt, relación sFlt-1/PIGF y relación Endoglina/PIGF como clasificadores (usando valores de corte) si un paciente desarrolla PE/síndrome de HELLP en una/cuatro semanas después de la visita. La población aquí son mujeres embarazadas con resultado de sonografía Doppler disponible:

Tabla 2: Comparación de mIP-AUt, relación sFlt-1/PIGF y relación Endoglina/PIGF como clasificadores

Criterio de valoración	Resultado positivo si:	Proporción	[%]	95 % IC	Abs [N]
Diagnóstico de PE/HELLP en una semana después de la visita	mIP-AUt >Percentil 95.	Sensibilidad	75,0	19,4-99,4	3/4
		Especificidad	53,3	42,5-63,9	48/90
	Relación sFlt-1/PIGF ≥46	Sensibilidad	100,0	39,8-100,0	4/4
		Especificidad	80,0	70,2-87,7	72/90
	Relación Endoglina/PIGF ≥0,2	Sensibilidad	75,0	19,4-99,4	3/4
		Especificidad	76,7	66,6-84,9	69/90
Diagnóstico de PE/HELLP en cuatro semanas después de la visita	mIP-AUt >Percentil 95.	Sensibilidad	55,6	21,2-86,3	5/9
		Especificidad	51,9	40,4-63,3	41/79
	Relación sFlt-1/PIGF ≥46	Sensibilidad	77,8	40,0-97,2	7/9
		Especificidad	82,3	72,1-90,0	65/79
	Relación Endoglina/PIGF ≥0,2	Sensibilidad	55,6	21,2-86,3	5/9
		Especificidad	78,5	67,8-86,9	62/79

- 15 Ambas relaciones parecen ser superiores para ambas tareas de predicción a la sonografía Doppler. La relación sFlt-1/PIGF parece realizarse mejor (con los cortes elegidos) que la relación Endoglina/PIGF.

La relación sFlt-1/PIGF y la relación Endoglina/PIGF como clasificadores (usando los valores de corte) de si un paciente desarrolla PE en una/cuatro semanas después de la visita. La población aquí son todas mujeres embarazadas con un resultado de sonografía Doppler anormal:

5 Tabla 3: relación sFlt-1/PIGF y relación Endoglina/PIGF como clasificadores

Criterio de evaluación	Resultado positivo si:	Proporción	[%]	95 % IC	Abs [N]
Diagnóstico de PE/HELLP en una semana después de la visita	Relación sFlt-1/PIGF ≥ 46	Sensibilidad	100,0	29,2-100,0	3/3
		Especificidad	81,0	65,9-91,4	34/42
	Relación Endoglina/PIGF $\geq 0,2$	Sensibilidad	100,0	29,2-100,0	3/3
		Especificidad	76,2	60,5-87,9	32/42
Diagnóstico de PE/HELLP en cuatro semanas después de la visita	Relación sFlt-1/PIGF ≥ 46	Sensibilidad	80,0	28,4-99,5	4/5
		Especificidad	81,6	65,7-92,3	31/38
	Relación Endoglina/PIGF $\geq 0,2$	Sensibilidad	60,0	14,7-94,7	3/5
		Especificidad	76,3	59,8-88,6	29/38

La relación sFlt-1/PIGF parece ser superior a la relación Endoglina/PIGF especialmente sobre la tarea de predicción a las cuatro semanas.

10 Tabla 4: estadísticas de asociación de ROC para los valores suministrados en la Figura 4A

Estadísticas de asociación de ROC							
Modelo de ROC	Mann-Whitney				D de Somers (Gini)	Gamma	Tau-a
	Área	Error estándar	Límites de confianza de Wald del 95 %				
relación sFlt_1_PIGF	0,9211	0,0259	0,8703	0,9719	0,8422	0,8422	0,1021
relación_endogl_PIGF	0,9118	0,0342	0,8448	0,9788	0,8236	0,8236	0,0998
tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,9330	0,0225	0,8889	0,9771	0,8660	0,8660	0,1049
tst_res_PIGF_pg_ml	0,8482	0,0446	0,7608	0,9356	0,6964	0,6964	0,0844
endogl_ng_ml	0,9254	0,0326	0,8615	0,9892	0,8507	0,8507	0,1031

Tabla 5: estadísticas de asociación de ROC para los valores suministrados en la Figura 5A

Estadísticas de asociación de ROC							
Modelo de ROC	Mann-Whitney				D de Somers (Gini)	Gamma	Tau-a
	Área	Error estándar	Límites de confianza de Wald del 95 %				
relación sFlt_1_PIGF	0,9262	0,0241	0,8788	0,9735	0,8523	0,8523	0,1139
relación_endogl_PIGF	0,9108	0,0317	0,8487	0,9729	0,8215	0,8215	0,1098
tst_res_sFlt_1_pg_ml	0,9438	0,0203	0,9041	0,9836	0,8877	0,8877	0,1186
Estadísticas de asociación de ROC							
Modelo de ROC	Mann-Whitney				D de Somers (Gini)	Gamma	Tau-a
	Área	Error estándar	Límites de confianza de Wald del 95 %				
tst_res_PIGF_pg_ml	0,8485	0,0410	0,7681	0,9288	0,6969	0,6969	0,0931
endogl_ng_ml	0,9238	0,0300	0,8650	0,9827	0,8477	0,8477	0,1133

Ejemplo 4: Análisis de la preeclampsia como resultado en 1 semana, cohorte grande (n=269)

15 En las tablas que se usaron para producir la curva ROC, uno puede seleccionar los valores de corte con el VPN objeto y estimar la sensibilidad, especificidad y el VPP en este corte. Para todas estas proporciones los intervalos de confianza están disponibles basados en el tamaño de muestra actual.

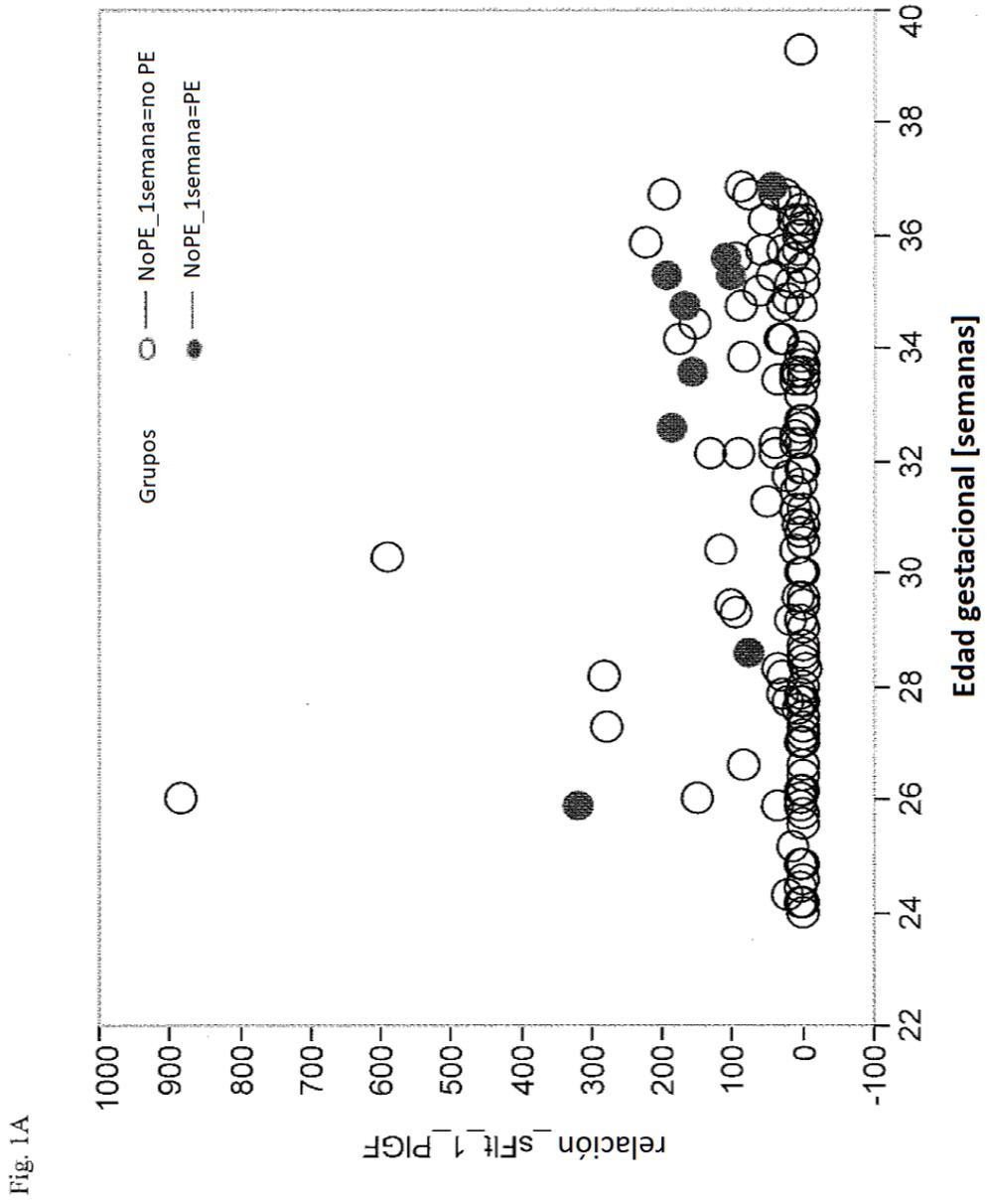
20 Para pacientes entre la semana 24+/-0 y semana 40+/-0 después de la gestación, un corte de 38 para la relación sFlt-1/PIGF determinada en una muestra obtenida en la primera visita produjo un VPN del 98,9 % (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de dos lados (LIC95): 97,3 %) para predecir preeclampsia, con una sensibilidad estimada de 88,2 % (LIC95: 72,6 %) y una especificidad estimada del 79,8 % (LIC95: 75,9 %). El VPP estimado es del 24,4 % (LIC95 17,1 %). Se ensayaron 123 frente a 372 sujetos positivos/negativos en este corte, se espera que
 25 30 de los 123 positivos del ensayo desarrollaren PE y 4 de los 372 negativos de ensayo. Los resultados también se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5: valores de ABC, LIC95 y LSC95, cohorte grande

Respuesta	Bioindicador	ABC	LIC95	LSC95
PE en 1 semana después de la visita 1	sFit_1	0,9026	0,8417	0,9634
PE en 1 semana después de la visita 1	PIGF	0,8343	0,7697	0,8989
PE en 1 semana después de la visita 1	Endoglina	0,8702	0,811	0,9293
PE en 1 semana después de la visita 1	relación_sFit_1_PIGF	0,897	0,8349	0,9591
PE en 1 semana después de la visita 1	relación_Endogl_PIGF	0,8693	0,8122	0,9264
PE en 2 semanas después de la visita 1	sFit_1	0,8435	0,777	0,9101
PE en 2 semanas después de la visita 1	PIGF	0,8036	0,739	0,8682
PE en 2 semanas después de la visita 1	Endoglina	0,849	0,7888	0,9093
PE en 2 semanas después de la visita 1	relación_sFit_1_PIGF	0,848	0,7817	0,9142
PE en 2 semanas después de la visita 1	relación_Endogl_PIGF	0,8445	0,784	0,9049
PE en 4 semanas después de la visita 1	sFit_1	0,8513	0,7967	0,9058
PE en 4 semanas después de la visita 1	PIGF	0,8204	0,7699	0,8709
PE en 4 semanas después de la visita 1	Endoglina	0,8476	0,7986	0,8966
PE en 4 semanas después de la visita 1	relación_sFit_1_PIGF	0,8598	0,8077	0,912
PE en 4 semanas después de la visita 1	relación_Endogl_PIGF	0,8512	0,8037	0,8987

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar si un sujeto embarazado no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en una corta ventana de tiempo, en el que una corta ventana de tiempo es 2 semanas, que comprende:
- 10 a) determinar las cantidades de los bioindicadores de angiogénesis sFlt-1 y PIGF en una muestra de dicho sujeto;
b) calcular una relación de dichas cantidades de sFlt-1 y PIGF determinadas en la muestra en la etapa a) y
c) comparar la relación con un valor de referencia, por lo cual se diagnostica un sujeto que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia en un corto periodo de tiempo si el valor de la relación es idéntico o reducido en comparación con el valor de referencia, en el que dicho valor de referencia permite realizar el diagnóstico con un valor predictivo negativo de al menos el 98 %,
- 15 en el que dicho sujeto embarazado está entre la semana 20 y la semana 40 de gestación y en el que dicho valor de referencia es 45 o menos.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho valor de referencia es 33.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho valor de referencia es 38 ± 20 %, preferentemente es 38 ± 20 %.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho valor de referencia es 38.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra es una muestra de sangre, plasma, suero u orina.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho método comprende además la recomendación de una medida de tratamiento del paciente basándose en el diagnóstico.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha medida de tratamiento del paciente (i) se selecciona del grupo de las siguientes medidas si el sujeto no está diagnosticado como que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia: monitorización minuciosa, hospitalización, administración de agentes reductores de la presión sanguínea y recomendaciones de estilo de vida, y (ii) es monitorización ambulatoria si el sujeto está diagnosticado como que no está en riesgo de desarrollar preeclampsia.
- 35 8. El método de una cualquier de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho sujeto se ha identificado por estar en riesgo de desarrollar preeclampsia, eclampsia, y/o síndrome de HELLP basándose en los resultados de ultrasonografía Doppler anormal.



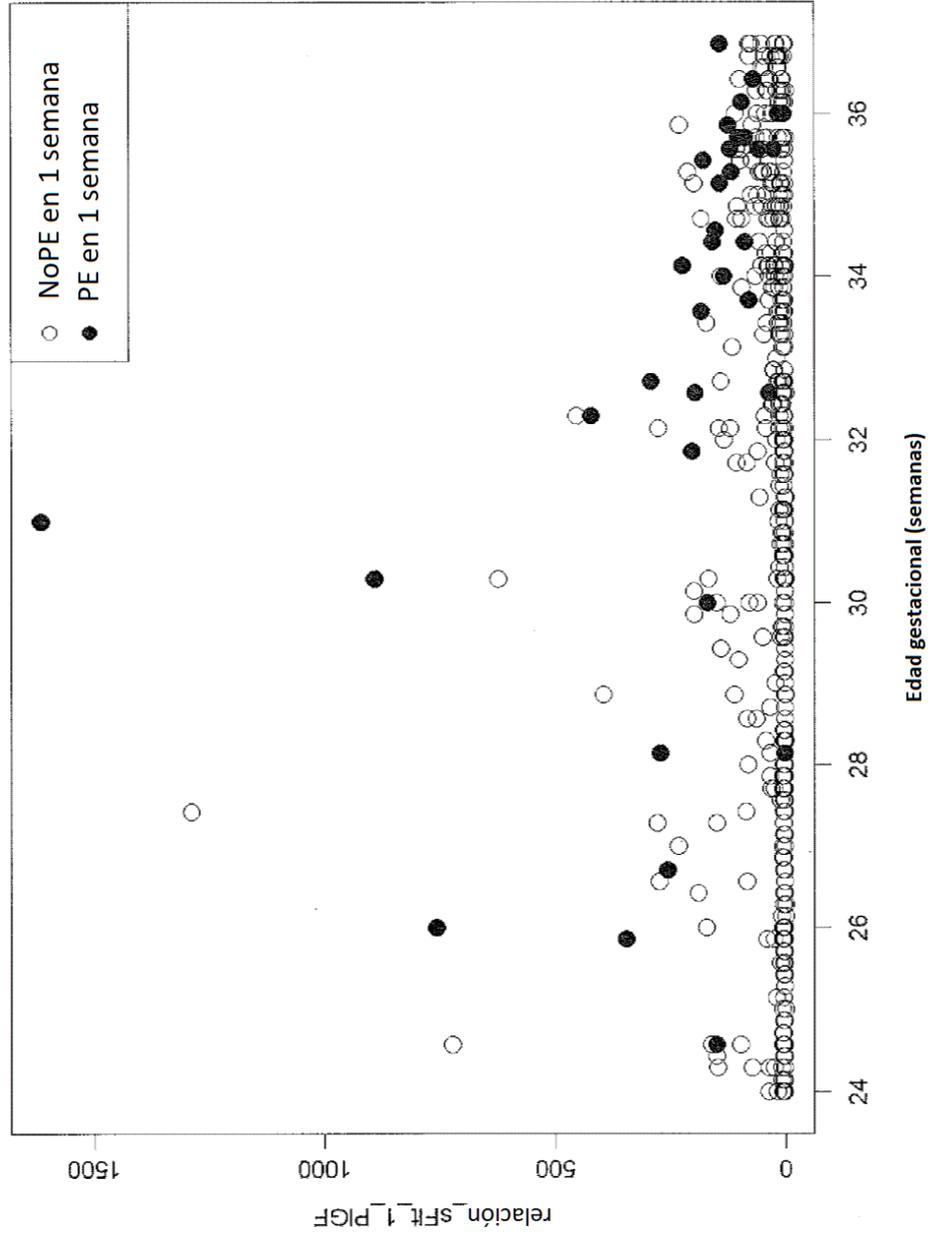


Fig. 1B

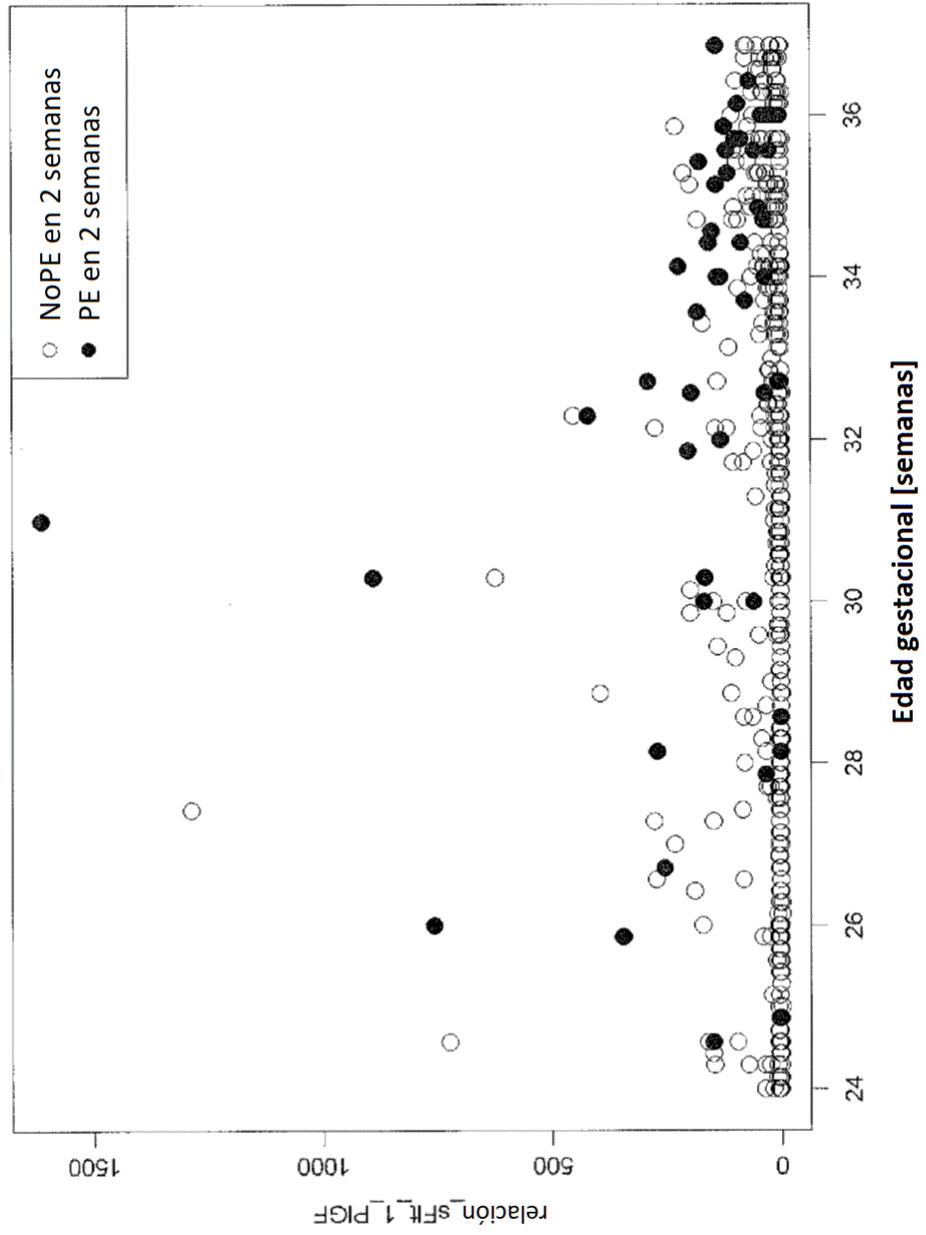
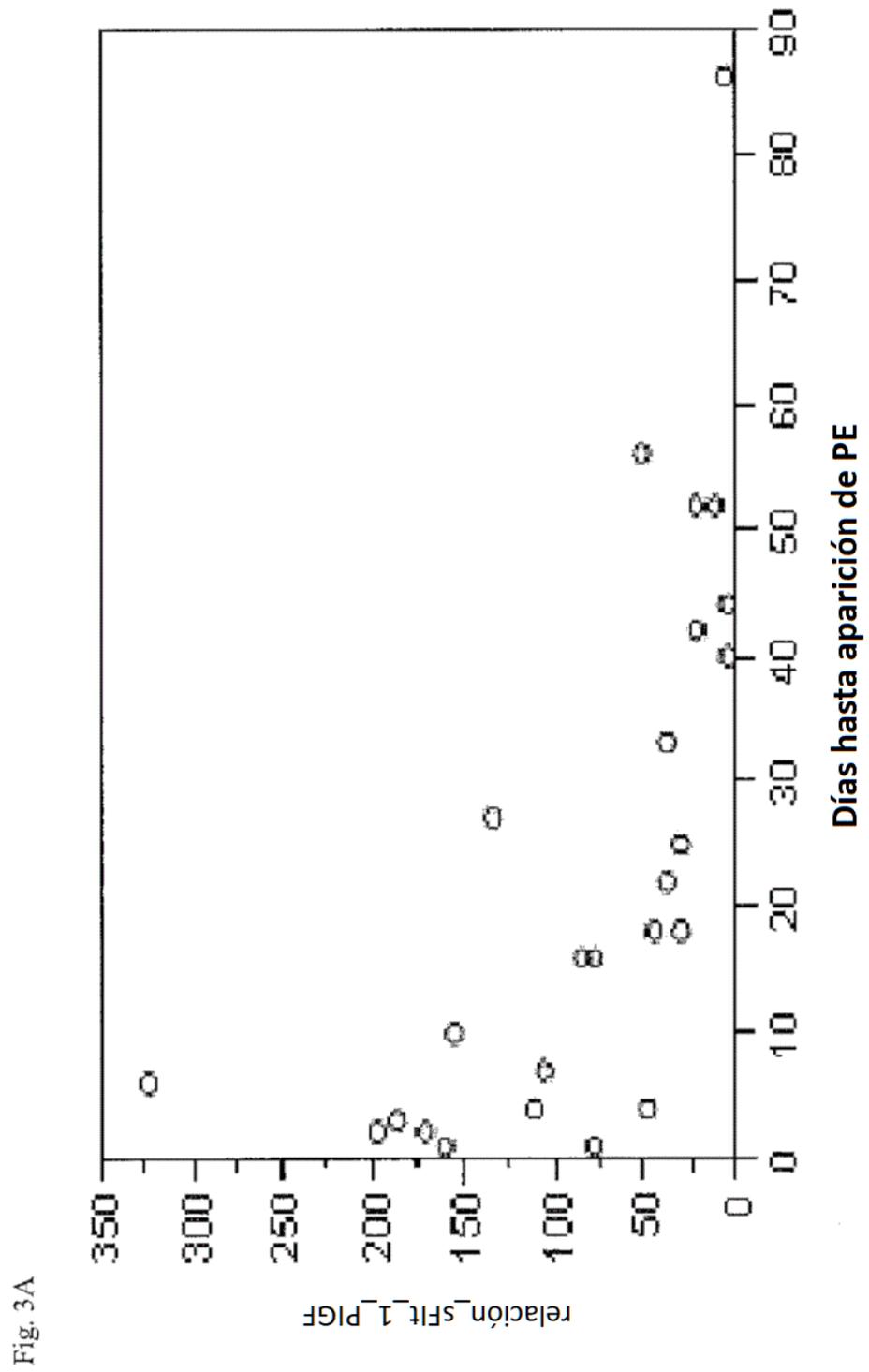


Fig. 2B



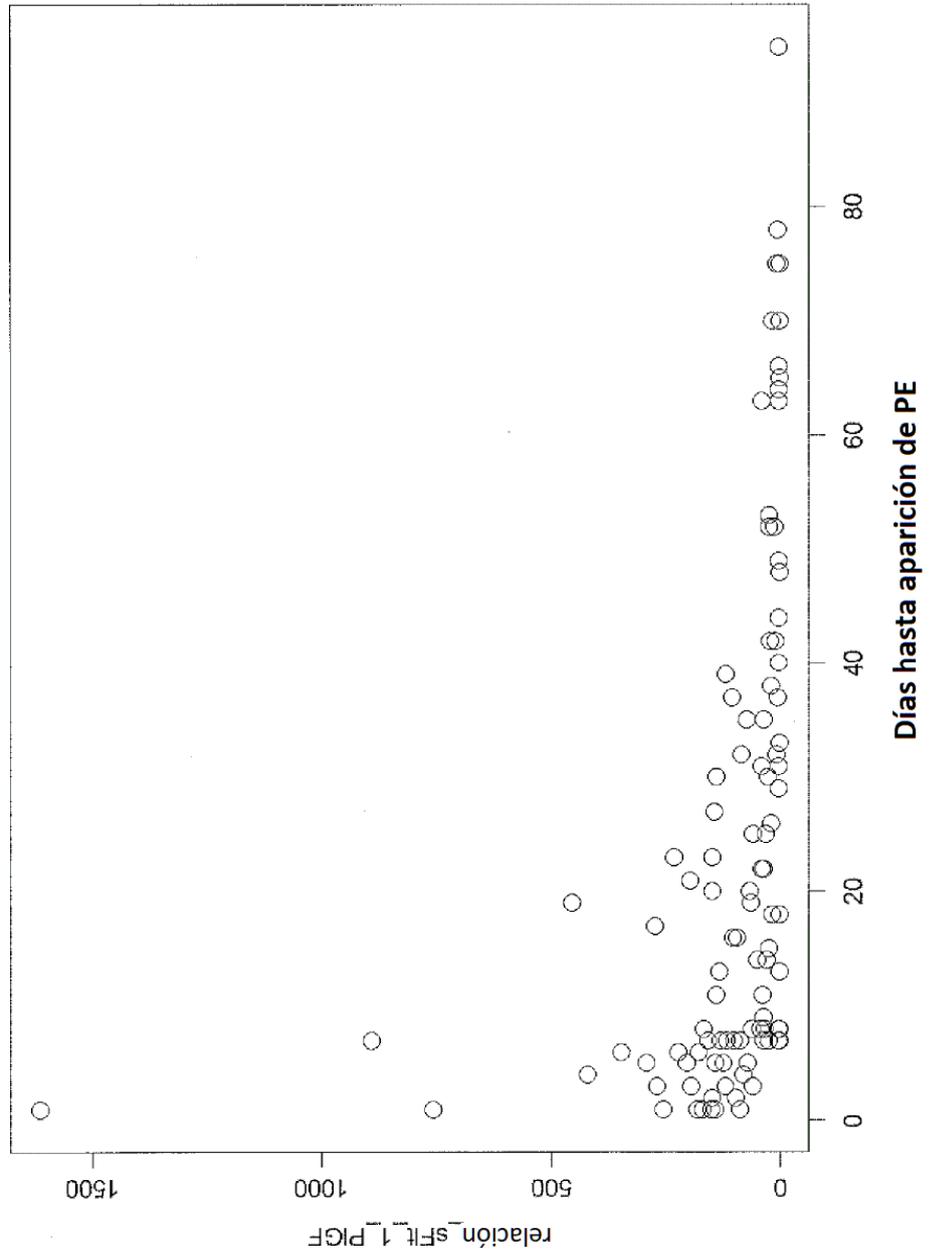


Fig. 3B

Fig. 4A

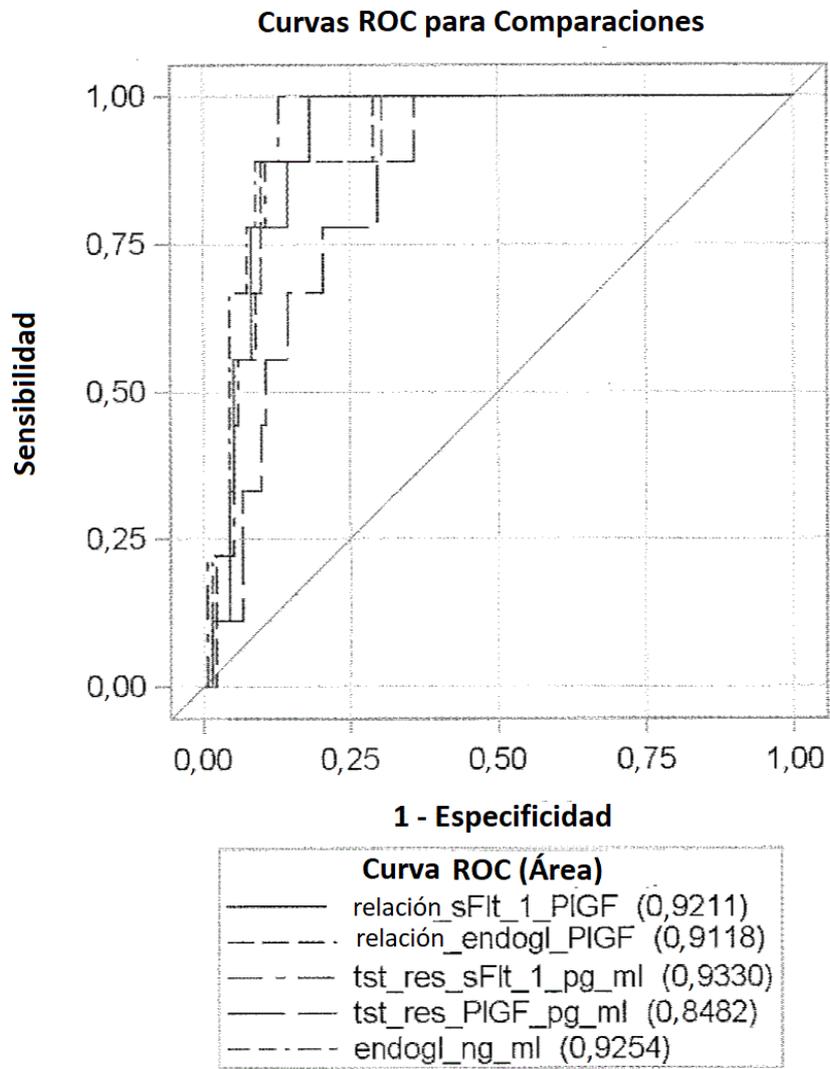


Fig. 4B

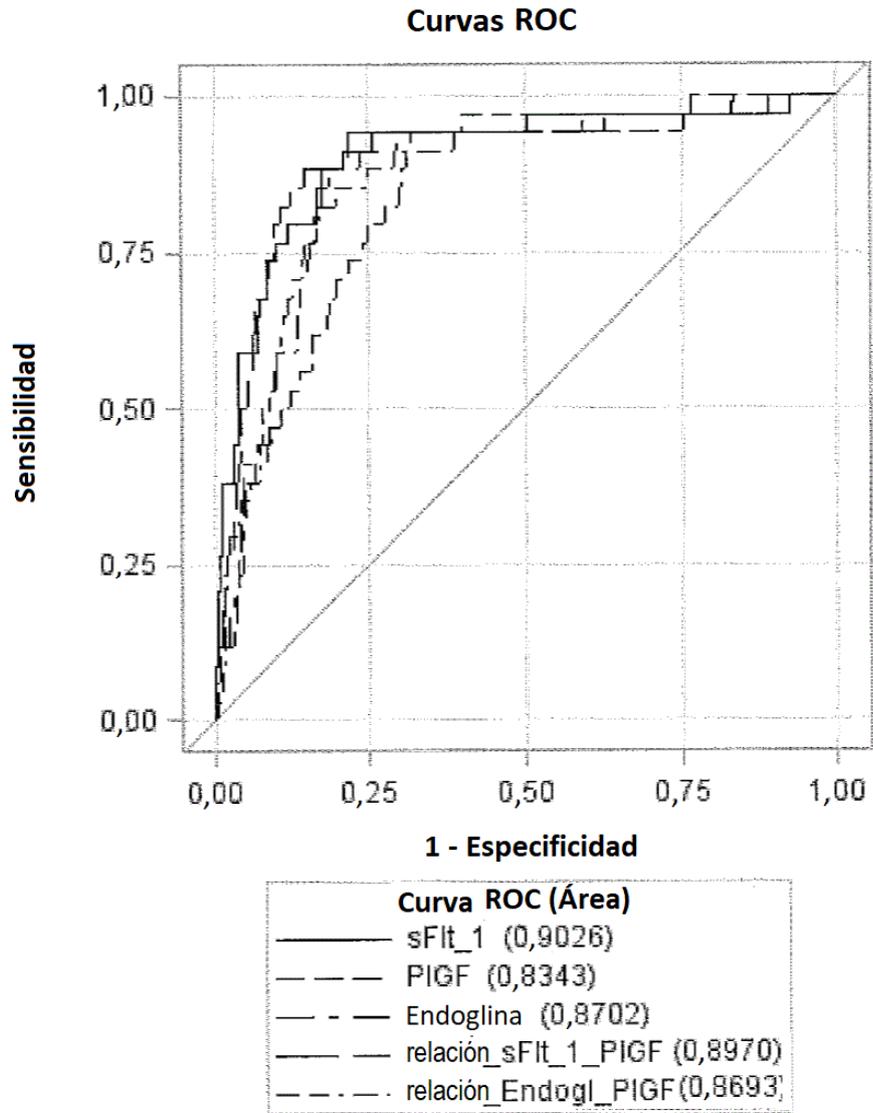


Fig. 5A

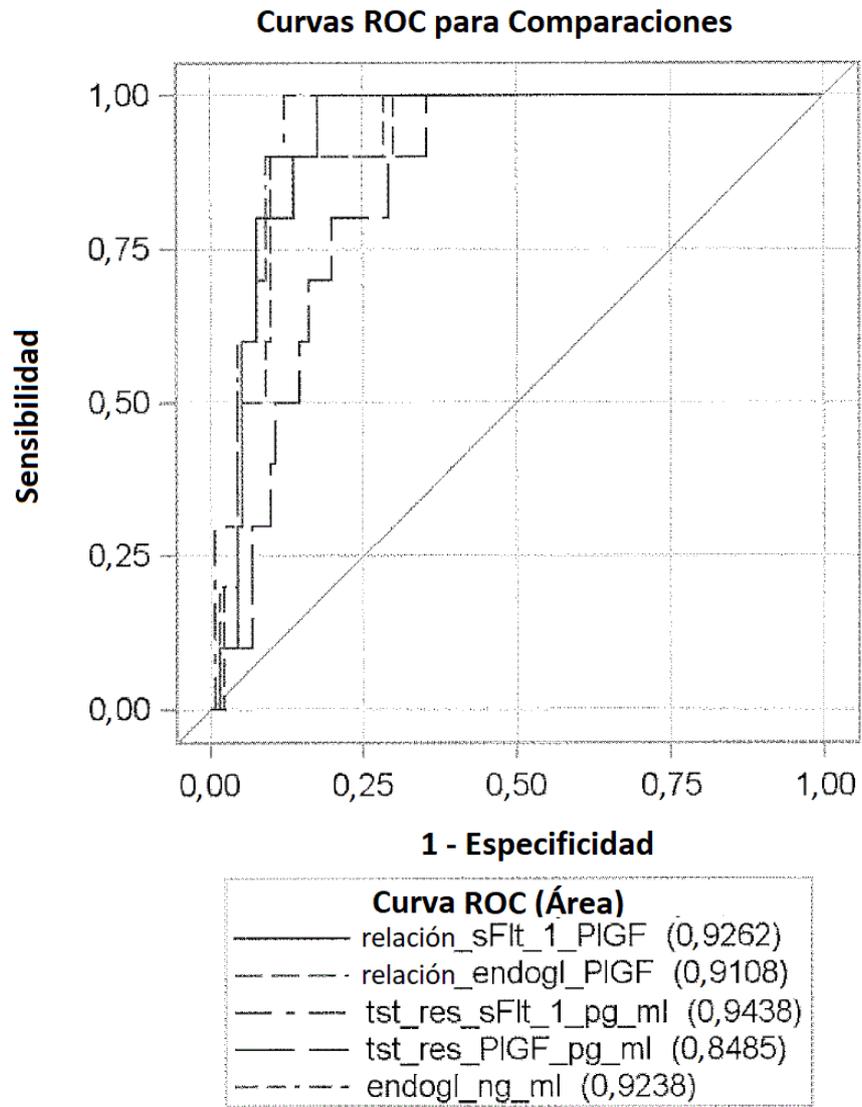
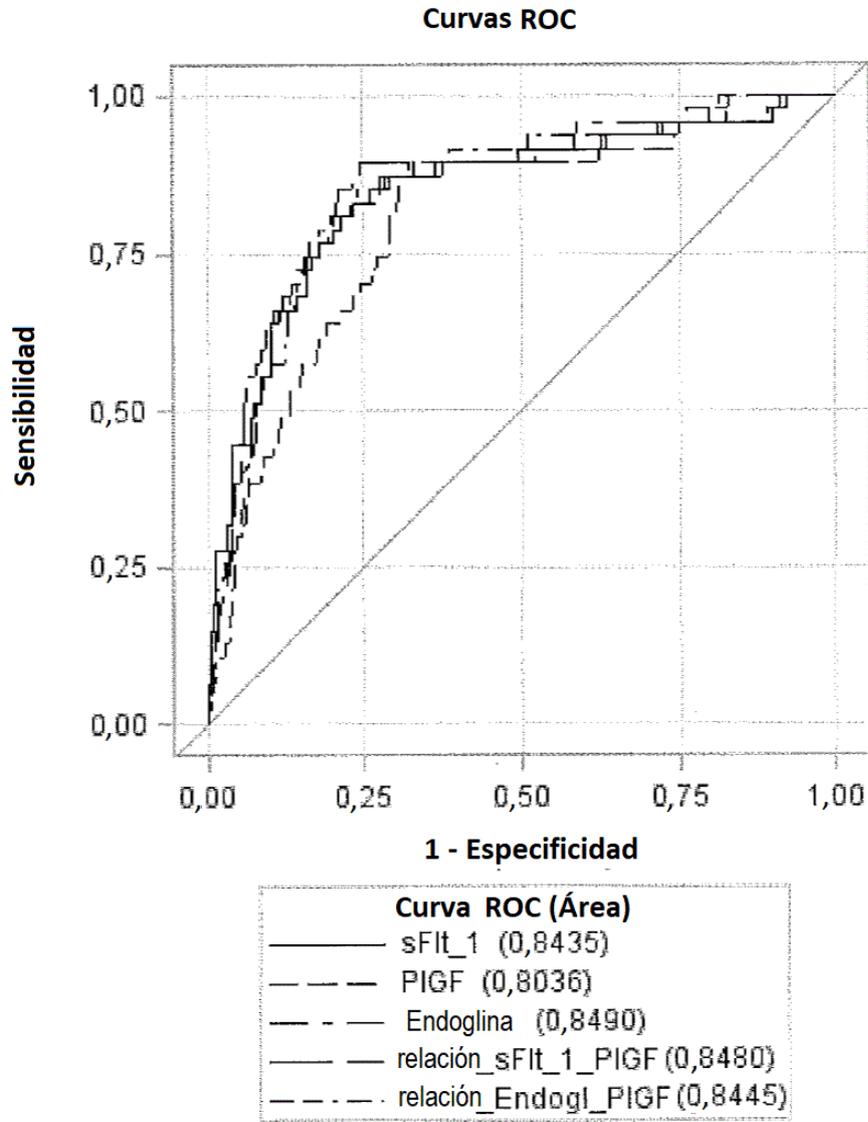


Fig. 5B



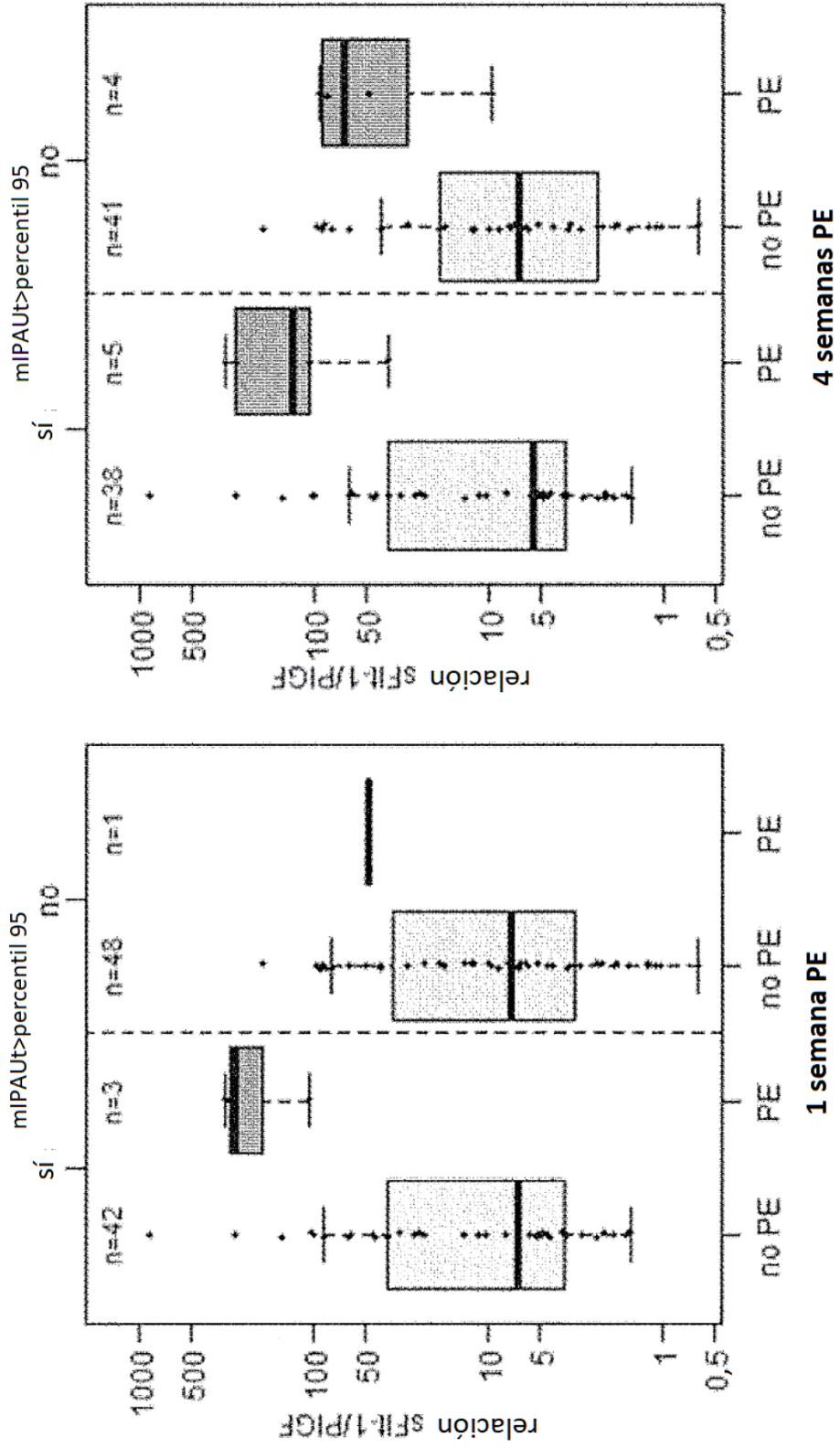


Fig. 6A

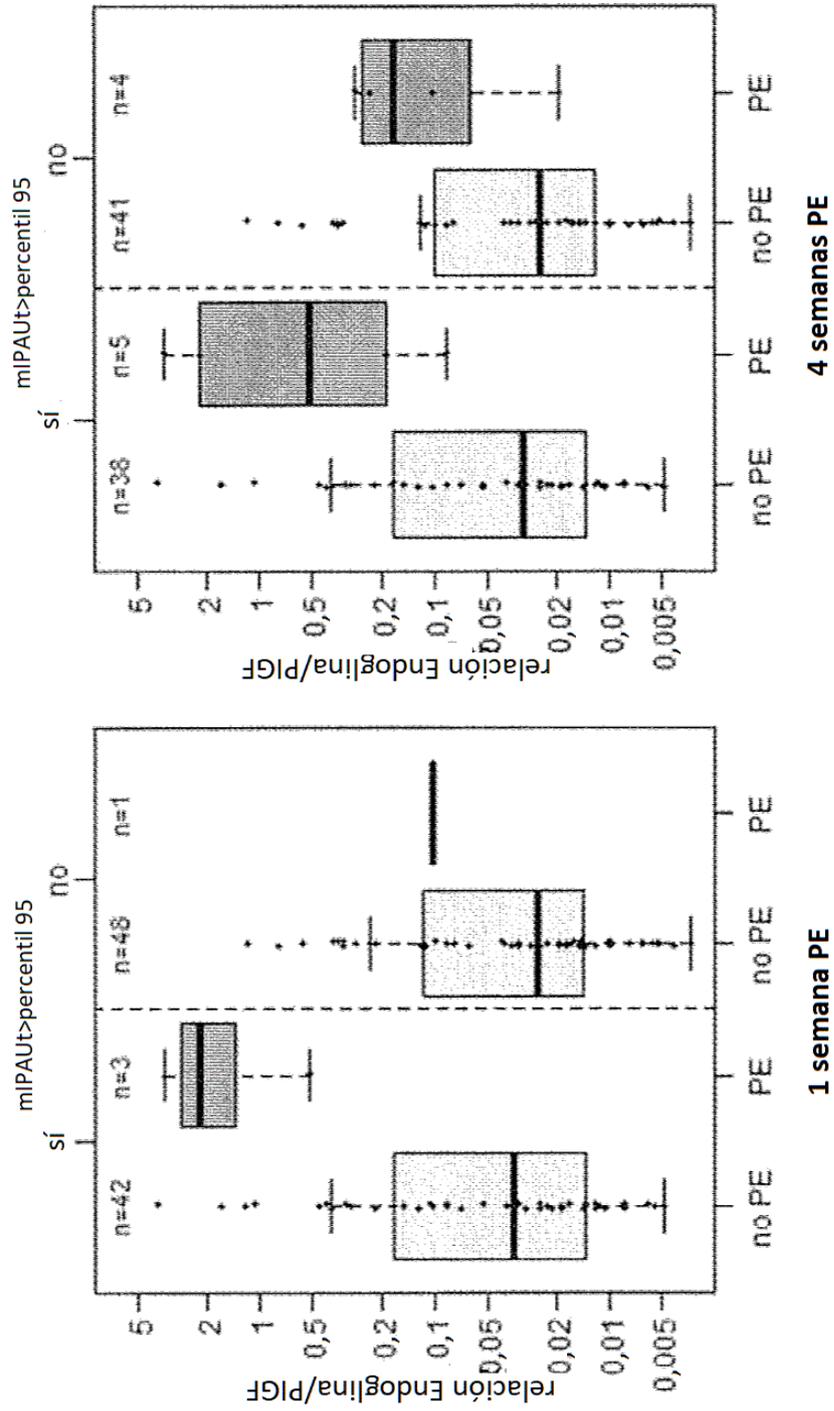


Fig. 6B

Fig. 7A

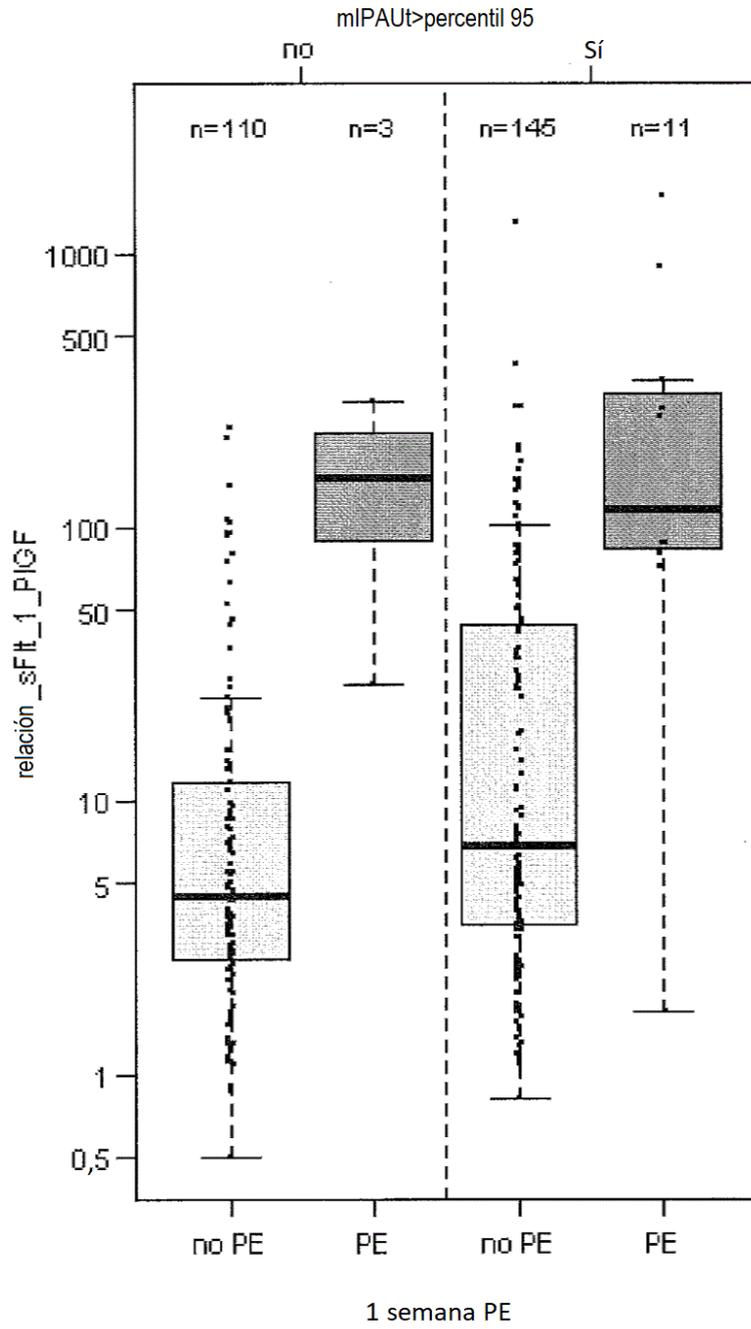


Fig. 7B

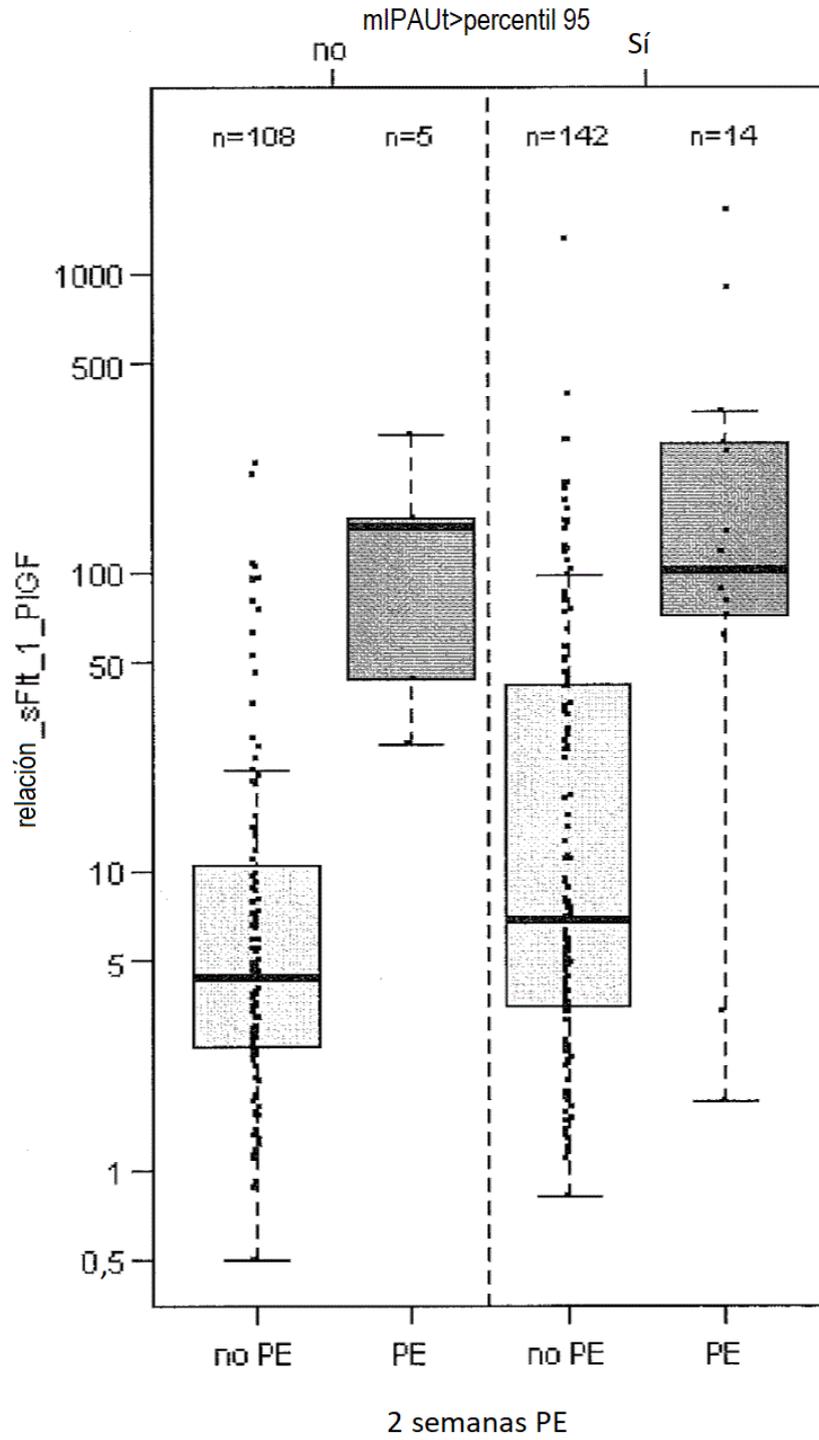
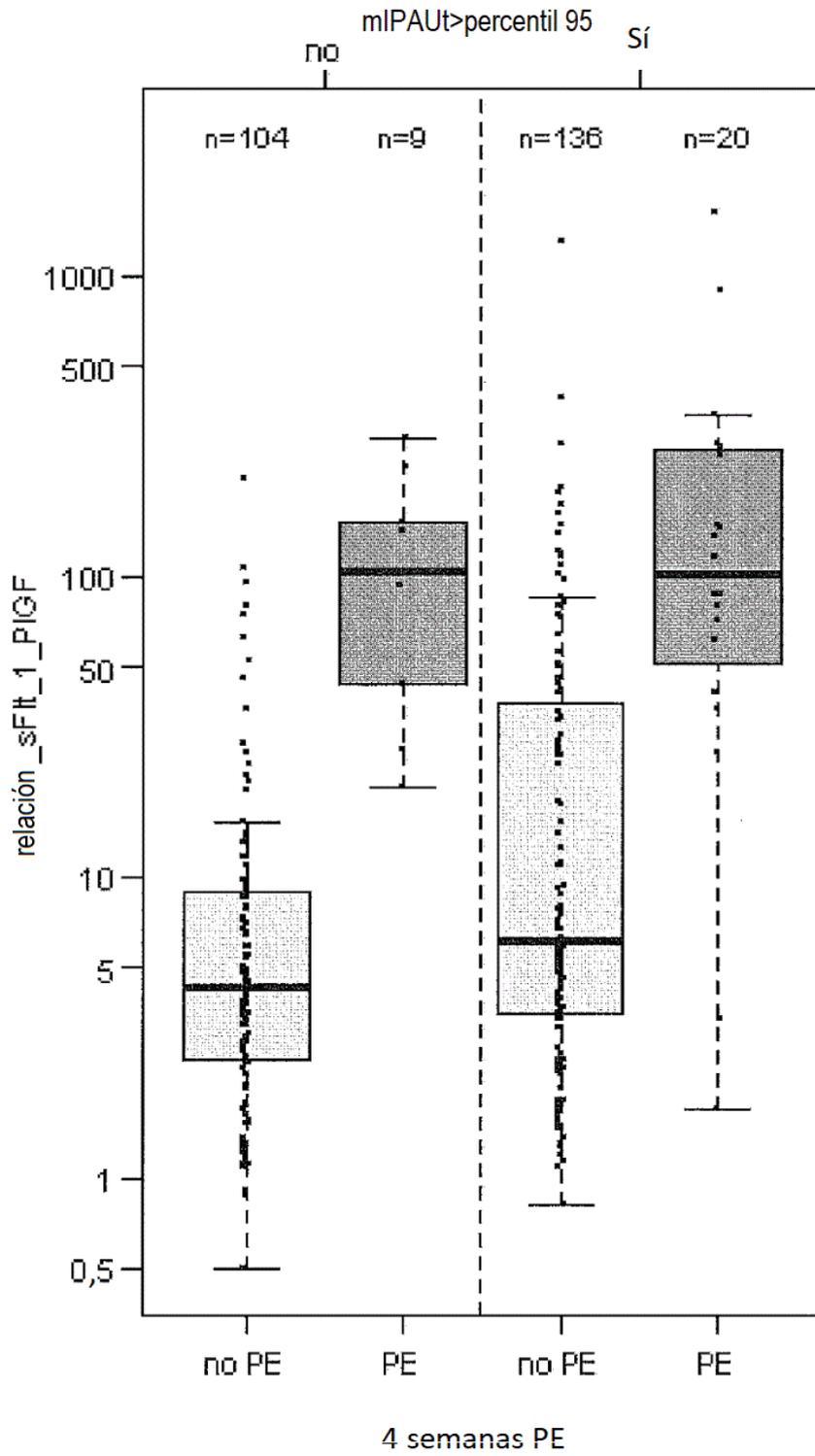


Fig. 7C



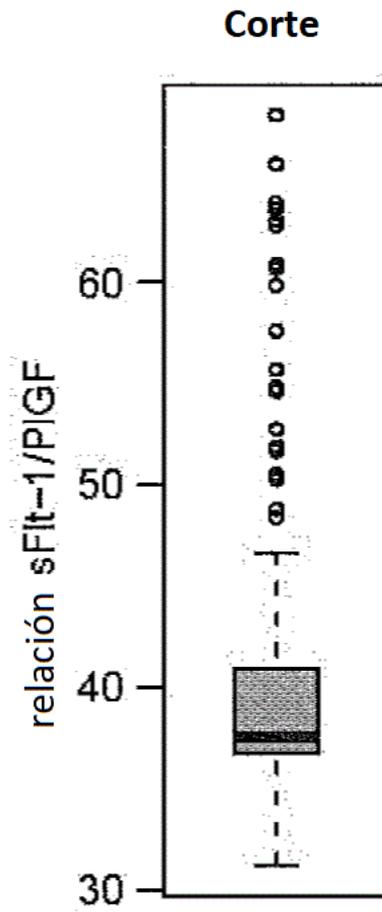


Fig. 8