

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 358**

51 Int. Cl.:

G01N 27/62 (2006.01)

G01N 21/49 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2014 PCT/EP2014/054053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14135488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2014 E 14707415 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2965088**

54 Título: **Marcador de pronóstico para determinar el riesgo de preeclampsia de inicio precoz**

30 Prioridad:

04.03.2013 US 201361772501 P
10.06.2013 EP 13171331

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2019

73 Titular/es:

IQ PRODUCTS B.V. (100.0%)
Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen, NL

72 Inventor/es:

SCHUITEMAKER, JOOST, HENRIC, NICOLAAS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 711 358 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

Marcador de pronóstico para determinar el riesgo de preeclampsia de inicio precoz

Campo de la invención

5 La invención versa acerca de la predicción, especialmente en una etapa temprana de la gestación, y del diagnóstico, en las etapas posteriores de la gestación, de la preeclampsia.

Antecedentes de la invención

10 En la técnica se conocen procedimientos para diagnosticar la preeclampsia. El documento WO2013071703, por ejemplo, describe un medio para detectar rápidamente adipina para diagnosticar la preeclampsia que comprende una almohadilla de adsorción de agua, una membrana de nitrocelulosa, una almohadilla de marcado con oro y una almohadilla de muestreo, estando ambas unidas sucesivamente de arriba abajo y fijadas en la placa base. La almohadilla de muestreo solapa parcialmente a la almohadilla de marcado con oro. Sobre la membrana de nitrocelulosa se proporciona una línea de detección recubierta con anticuerpo policlonal de adipina antihumana de conejo, o anticuerpo policlonal de adipina antihumana de cabra, o anticuerpo policlonal de adipina antihumana de ratón y una línea de control recubierta con anticuerpo policlonal de IgG antirratón de cabra. La línea de detección está situada aguas abajo y separada de la línea de control. La almohadilla de marcado con oro está hecha de un material que adsorbe el agua, y está recubierta con anticuerpo monoclonal de adipina antihumana de ratón marcado con oro. Un equipo de reactivos de ensayo para detectar rápidamente adipina para el diagnóstico de la preeclampsia comprende un alojamiento externo y dichos medios en el mismo. El procedimiento de preparación de dichos medios de detección comprende: 1) el recubrimiento de la línea de detección y la línea de control; 2) la preparación de la almohadilla de marcado con oro; 3) la combinación.

15 El documento WO2014001244 describe un procedimiento para diagnosticar si una hembra embarazada no sufre riesgo de preeclampsia en una ventana temporal breve que comprende a) determinar la cantidad de al menos un biomarcador de angiogénesis seleccionado del grupo que consiste en sFlt-1, endoglina y P1GF en una muestra de dicha hembra, y b) comparar la cantidad con una referencia, con lo que se diagnostica que una hembra no sufre riesgo de desarrollar preeclampsia en un periodo de tiempo breve si la cantidad es idéntica a la referencia, o menor, en los casos de sFlt-1 y endoglina e idéntica o mayor en el caso de P1GF, permitiendo dicha referencia hacer el diagnóstico con un valor predictivo negativo de al menos aproximadamente el 98%. El documento US20050170444 describe procedimientos de diagnóstico de la preeclampsia y la eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia detectando los niveles del factor de crecimiento placentario en un sujeto.

20 25 30 Sara Cross et al. describen en "Endocan (ESM-1): a novel soluble endothelial cell injury marker in preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR)" (33^{er} encuentro anual / Encuentro sobre embarazo de la Sociedad de Medicina Fetal Maternal (SMFM), San Francisco, California, EE. UU.; vol. 208, 20 de diciembre de 2012, página S276) que las mujeres con sPE prematura tienen niveles elevados de ESM-1 en suero, lo que probablemente refleja un grado avanzado de activación y lesiones endoteliales en una GA anterior. La expresión potenciada en sitios de lesiones placentarias importantes sugiere que la ESM-1 puede desempeñar un papel en la fisiopatología de la lesión por trofoblastos en la RCIU.

35 40 El documento WO2004021978 describe compuestos no codificantes, composiciones y procedimientos para modular la expresión de la molécula endotelial específica-1 (ESM-1). Las composiciones comprenden compuestos no codificantes, en particular oligonucleótidos no codificantes, dirigidos a ácidos nucleicos que codifican la ESM-1. Se describen procedimientos de uso de estos compuestos para la modulación de la expresión de la ESM-1 y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de la ESM-1.

45 El documento WO2004003172 versa sobre un ácido nucleico y su polipéptido codificado ESM-1, cuya expresión es modulada en la angiogénesis y la oncogénesis. La aplicación también versa sobre anticuerpos que tienen especificidad hacia dicho polipéptido, moléculas no codificantes, y sobre procedimientos útiles para tratar o modular la angiogénesis en mamíferos necesitados de tal efecto biológico.

Sumario de la invención

50 La preeclampsia es un síndrome que se caracteriza por una elevada presión arterial (>140/90) y cantidades significativas de proteína en la orina (>300 mg/24 horas de orina) predominantemente durante las últimas semanas del embarazo. Clínicamente, se reconocen dos formas: la preeclampsia de inicio precoz, que aparece antes de la 34^a semana de edad de gestación (GA), y la preeclampsia de inicio tardío, que aparece después de la 34^a semana de GA. Si no se trata, la afección podría dar lugar, para la madre y el niño, a efectos a largo plazo e incluso a una situación que supone un peligro para la vida. Y aunque algunas mujeres se benefician de una dosis baja de suplementos de aspirina o pueden ser estabilizadas con sulfato magnésico intravenoso, los mejores tratamientos para la eclampsia o la preeclampsia avanzada son el aborto o el parto. Esto hace de la monitorización de la preeclampsia de inicio precoz y su tratamiento aún más importantes, dado que esto aumenta las posibilidades para la madre y el niño, simplemente debido al hecho de que el parto se retrasa todo el tiempo posible. Se realiza mucha

investigación para encontrar el mecanismo que da lugar a este síndrome. En esta investigación, se han hallado varios factores que podrían desempeñar un papel en la etiología de la enfermedad. El sistema inmunitario materno y el hecho de si se construye de manera efectiva la tolerancia inmunitaria gestacional parecen desempeñar una parte importante. La actual interpretación del síndrome es que es un proceso en dos etapas. La carencia inicial de tolerancia inmunitaria gestacional de los citotrofblastos placentarios puede llevar a arterias espirales remodeladas de forma inadecuada y a una implantación superficial, lo cual, a su vez, lleva posteriormente a la hipoxia. Esta hipoxia de la placenta parece ser un factor importante, dado que es seguida por la liberación de factores solubles en la circulación materna. Algunos factores solubles, como la tirosina quinasa-1 de tipo Fms soluble (sFlt-1 o sVEGFR-1) y la endoglina soluble (sEng), han sido descritos como marcadores que son expresados de manera diferente en embarazos preeclámpticos después de la semana 20 de gestación en comparación con los embarazos sanos. Estos factores son usados actualmente para la exploración durante el embarazo y las concentraciones dan indicaciones de la gravedad de la enfermedad.

Una desventaja de las soluciones actuales para detectar la preeclampsia o la eclampsia y otros síndromes relacionados con el embarazo, tales como HELLP (hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia) y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) es que esos síndromes son detectables a finales del embarazo. Esto impide tomar medidas de manera precoz durante el embarazo para prevenir la incidencia o reducir la gravedad del síndrome. Saber temprano durante el embarazo que la mujer embarazada desarrollará tal síndrome también reduciría medidas preventivas innecesarias, tales como, por ejemplo, el uso estándar de aspirina. En la presente memoria, la hembra es especialmente una mujer.

En 1996, Lassalle et al. descubrieron un nuevo marcador para células endoteliales (J. Biol. Chem. 1996, 271:20458-20464). Este proteoglicano de 50 kD recibió la denominación de molécula específica a las células endoteliales-1 (ESM-1) y también recibe el nombre de endocán. La expresión y la secreción de ESM-1 es regulada al alza por moléculas proinflamatorias, tales como TNF alfa, y en presencia de factores proangiogénicos tales como VEGF. Se ha descrito que la molécula es regulada al alza en afecciones inflamatorias como la sepsis, pero también en el cáncer.

Según se ha indicado anteriormente, la ESM-1 desempeña un papel en la regulación de la angiogénesis y es liberada por células endoteliales activadas. Se realizó un ensayo para comprobar si la ESM-1 aumenta en la preeclampsia (PE). Se recogieron a intervalos regulares muestras de plasma de embarazos de alto riesgo divididas en 23 embarazos sanos (CON), 11 con PE grave de inicio precoz (SE) y 7 con PE grave de inicio tardío (SL) entre la semana 8 y el parto. La ESM-1 fue medida por ELISA. Entre la semana 24 de GA y el parto, las concentraciones de ESM-1 aumentaron significativamente en la preeclampsia de inicio tanto precoz como tardío con respecto a los controles (Mann Whitney, $p < 0,05$). Sorprendentemente, la concentración de ESM-1 también difirió entre los tres grupos en las semanas 12 y 16. Las concentraciones de ESM-1 en embarazos sanos (media \pm EEM: 1857 \pm 861 pg/ml) y en los que desarrollaron PE grave de inicio tardío (1298 \pm 371 pg/ml) son comparables, pero en los embarazos que desarrollan PE grave de inicio precoz, la concentración (410 \pm 355 pg/ml) es significativamente menor que en los embarazos sanos. Por ende, las concentraciones de ESM-1 aumentan durante la preeclampsia grave de inicio precoz y tardío, lo que puede deberse a la activación de las células endoteliales en estas condiciones. Sorprendentemente, dado que la ESM-1 disminuye en las semanas 12-16 en pacientes que posteriormente desarrollan PE grave de inicio precoz, podría ser un marcador de pronóstico que puede determinar el riesgo de que las mujeres desarrollen PE grave de inicio precoz ya en las semanas 1-20, tal como en las semanas 8-20, especialmente las semanas 8-16, aún más especialmente las semanas 12 a 16 de la gestación.

Por ende, en un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para diagnosticar si una hembra embarazada tiene o no preeclampsia, eclampsia, o HELLP, o tiene o no predisposición a desarrollarlas, comprendiendo dicho procedimiento la determinación de la cantidad de ESM-1 en una muestra de dicha hembra. Especialmente, la invención proporciona en un primer aspecto un procedimiento (*in vitro*) para identificar, a partir de una muestra biológica de una hembra embarazada, un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en la preeclampsia, la eclampsia y HELLP (hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia), incluyendo el procedimiento (i) (el uso de un ensayo específico a la ESM-1 y) la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica, siendo la muestra biológica (especialmente, una muestra de líquido biológico) de una hembra embarazada que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 9-16, aún más especialmente entre las semanas 12-16; y (ii) la comparación de dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, según se define adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas. El procedimiento, según se ha indicado anteriormente, puede comprender especialmente, además, (iii) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con el valor de referencia. Con la presente invención, ya antes de la semana 24, incluso antes de la semana 20, puede detectarse la probabilidad de desarrollar tal síndrome o incluso su presencia. Por ende, en una etapa muy temprana, puede iniciarse un tratamiento o una terapia de prevención. Por ende, la frase "medición de la cantidad de ESM-1" también se puede referir a la medición de un equivalente de ESM-1 o la medición de un metabolito de ESM-1. En una realización, dicha ESM-1 es el nivel de ESM-1 libre, ESM-1 enlazada, un metabolito de ESM-1 o ESM-1 total. Especialmente, dicha cantidad de ESM-1 es el nivel de ESM-1 libre en la muestra biológica. El valor de referencia puede ser, especialmente, un valor de referencia medido en una muestra de una mujer que tiene un embarazo sano. Especialmente, un embarazo sano se refiere a un embarazo de la hembra que no tiene ni desarrolla

ninguno de los síndromes relacionados con el embarazo indicados en la presente memoria (durante todo el embarazo). Esto puede indicar especialmente que el valor de referencia sea tal valor de ESM-1 de una muestra de una hembra embarazada que posteriormente pareció no desarrollar ni tener tal síndrome relacionado con el embarazo. Tal valor de referencia puede ser especialmente un valor medio de un grupo de hembras embarazadas cuya totalidad pareció no tener ni desarrollar tal síndrome relacionado con el embarazo. Según se ha indicado anteriormente (y se indica también posteriormente), se realizó la llamativa observación de que las hembras embarazadas que ya tenían el síndrome relacionado con el embarazo o después parecieron desarrollar tal síndrome tenían valores de ESM-1 sustancialmente menores en las muestras biológicas de estas hembras tomadas en la semana 20 (desde el inicio de la gestación) o con anterioridad. Por ende, en una realización específica, el procedimiento comprende, además, (iii) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con el valor de referencia cuando dicha cantidad de ESM-1 es menor que el valor de referencia de ESM-1. Por ende, especialmente, el valor de referencia es la cantidad de ESM-1 en muestras biológicas de hembras embarazadas que tienen un embarazo sano. Especialmente, los valores de referencia pueden incluir un único valor de referencia para un periodo específico de la gestación o varios valores de referencia para varios periodos dentro del periodo de gestación. Especialmente, el valor medido de la ESM-1 se compara con un valor de referencia indicativo para el momento de la gestación en el que se toma la muestra de líquido biológico de la hembra embarazada. Por ejemplo, puede haber valores de referencia específicos para las semanas 8-12 y valores de referencia para las semanas 12-16, etc. Opcionalmente, puede haber diferentes valores de referencia para diferentes tipos de muestras. Como es sabido en la técnica, el valor de referencia puede ser un número, pero también puede ser un color, una intensidad de color o la falta de la misma, ser una cantidad de radiactividad o una cantidad de luz o la falta de la misma.

Especialmente, la muestra es una muestra de líquido; es decir, una muestra de líquido biológico. En una realización, dicha muestra es sangre, plasma, suero, orina o saliva de la hembra. Especialmente, dicha muestra biológica comprende una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero de dicha hembra embarazada. Sin embargo, la muestra también puede incluir líquido cefalorraquídeo (LCR) u otro líquido biológico. Opcionalmente, la muestra biológica puede incluir una biopsia de placenta. Aún más especialmente, dicha muestra biológica es de una hembra embarazada que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 12 a 16 de gestación. En otra realización todavía más específica, dicha muestra biológica comprende un ejemplo de plasma y se evalúa que la hembra embarazada tiene el síndrome relacionado con el embarazo cuando el valor de ESM-1 se encuentra en el intervalo de 410 ± 355 pg/ml.

En una realización específica, la cantidad de ESM-1 de la muestra biológica de la hembra embarazada es indicativa del síndrome relacionado con el embarazo cuando la cantidad es igual o menor que el 80%, especialmente igual o menor que el 70%, especialmente igual o menor que el 60%, tal como igual o menor que el 50%, como incluso más especialmente igual o menor que el 40%, de la cantidad de ESM-1 de muestras biológicas de hembras embarazadas que tienen un embarazo sano. Por supuesto, las comparaciones se efectúan entre muestras tomadas en el mismo periodo de embarazo, tal como en el periodo de gestación de las semanas 1-20, como las semanas 12-16. Por ende, la cantidad de ESM-1 de la muestra biológica de la hembra embarazada puede ser indicativa del síndrome relacionado con el embarazo cuando la cantidad es igual o menor que el 80%, especialmente igual o menor que el 70%, especialmente igual o menor que el 60%, tal como igual o menor que el 50%, como incluso más especialmente igual o menor que el 40%, de la cantidad de ESM-1 de muestras biológicas de hembras embarazadas que tienen un embarazo sano, refiriéndose la muestra biológica de la hembra embarazada y el valor de referencia a muestras en la misma semana de gestación (especialmente, seleccionadas de las semanas 1-2).

Especialmente, el ensayo es un ensayo a base de anticuerpos; es decir, el ensayo usa un anticuerpo para detectar la proteína ESM-1 (o un equivalente o un metabolito). En una realización específica, el ensayo comprende un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), un ensayo turbidimétrico, un ensayo de radioinmunoabsorción (RIST), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunofluorescencia directa o indirecta, un inmunoensayo en gel de partículas (PaGIA) o un ensayo de flujo lateral. Aún más especialmente, el ensayo comprende un ensayo ELISA. Alternativamente o además, el ensayo comprende un ensayo de flujo lateral. Alternativamente o además, el ensayo comprende un ensayo enzimático, un ensayo colorimétrico o un ensayo luminiscente. Alternativamente o además, las mediciones también pueden incluir mediciones de espectrometría de masa, especialmente de metabolitos de ESM-1. Por ende, en una realización, la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica incluye el uso de espectrometría de masa (MS).

En otra realización adicional, no se mide directamente la ESM-1, sino que se detecta el ARN que codifica la ESM-1; es decir, se detecta especialmente la cantidad de ARN que codifica la ESM-1. Por ende, en una realización específica, la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica comprende un procedimiento para realizar una cuantificación del ARN que codifica la ESM-1 en las células o del ARN libre de células en la muestra biológica, especialmente un fluido (es decir, un líquido). En otra realización adicional, la invención implica un procedimiento en el que la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica comprende un procedimiento para cuantificar la cantidad de proteína a través de la cantidad de ARN que codifica la ESM-1. Por ejemplo, en una realización, dicha cuantificación se realiza mediante RT-PCR, PCR, hibridación u otros medios de determinación de la cantidad de nucleótidos. Además de la ESM-1 marcadora, también pueden usarse uno o más marcadores adicionales. Los valores absolutos de los mismos pueden ser comparados con valores absolutos de referencia. Sin embargo,

alternativamente o además, puede usarse una proporción entre la ESM-1 marcadora y el otro marcador para compararlo con una proporción de referencia. Por ejemplo, en una realización específica, el procedimiento puede comprender, además, (iv) el uso (la selección) de un marcador secundario seleccionado del grupo que consiste en tirosina quinasa-1 de tipo Fms soluble (sFlt1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PIGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), endogлина soluble, proteína placentaria 13 (pp-13), proteína A de plasma asociada al embarazo (PAPP-A) y factor 15 de diferenciación de crecimiento (GDF-15), (v) el uso de un ensayo específico para el marcador secundario y la medición de la cantidad del marcador secundario en la muestra biológica y, opcionalmente, la comparación de dicha cantidad de dicho marcador secundario con un valor de referencia del marcador secundario. Esto puede potenciar adicionalmente la certeza del procedimiento de identificación. De forma alternativa o adicional al marcador secundario anteriormente indicado, también pueden elegirse una o más de una pikachurina y una hemopexina. La pikachurina, también denominada proteína de tipo agrina (AGRINL) y proteína contenedora de dominios de fibronectina de tipo III semejante a EGF y de laminina de tipo G (EGFLAM), es una proteína que en los seres humanos es codificada por el gen EGFLAM. La hemopexina (o HPX), también denominada beta-1B-glucoproteína, es una proteína que en los seres humanos es codificada por el gen HPX y pertenece a la familia proteínica de la hemopexina.

En una realización específica adicional, el procedimiento puede comprender, además, la identificación de que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, y en función de una comparación de la cantidad de dichos uno o más marcadores secundarios con el correspondiente valor de referencia del marcador secundario. Alternativamente o además, en una realización específica, el procedimiento puede comprender, además, la determinación de una proporción de la cantidad de ESM-1 con respecto a la cantidad del marcador secundario, la selección de un valor de referencia de la proporción, y la comparación de la proporción con el valor de referencia de la proporción. Por ende, en otra realización específica adicional, el procedimiento puede comprender, además, la identificación de que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con respecto a un valor de referencia, y en función de una comparación de la proporción entre la cantidad de ESM-1 y la cantidad del marcador secundario con respecto al valor de referencia de la proporción.

Alternativamente o además, el procedimiento puede incluir un proceso de múltiples etapas en el que pueden tomarse muestras en diferentes momentos, como antes de la semana 12 y después de la semana 16, o antes de la semana 20 y después de la semana 20, etc., y pueden ser usadas para identificar si es probable o no que la hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo. Por ende, en una realización específica, el procedimiento puede comprender (además) la provisión de una primera muestra biológica de una hembra extraída en una primera ocasión, y la provisión de una segunda muestra biológica de la hembra extraída en una segunda ocasión, el uso de un ensayo específico a la ESM-1, la medición de la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica que constituye una primera cantidad, el uso de un ensayo específico a la ESM-1, la medición de la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica y que constituye una segunda cantidad. La segunda ocasión es especialmente posterior en el tiempo con respecto a la primera ocasión. Al menos la primera muestra es tomada especialmente en la semana 20 de gestación o con anterioridad (como 12-16). Además, el procedimiento y el uso, así como la aplicación del equipo de reactivos puede incluir la extracción de una muestra biológica, dos muestras biológicas, pero también más de dos muestras biológicas. Especialmente, estas son tomadas en momentos diferentes, tales como con uno o más días entre medias, o una o más semanas entre medias. Especialmente en una realización específica, el procedimiento puede comprender, además, la identificación de que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la primera cantidad y la segunda cantidad.

En una realización específica, el procedimiento puede comprender, además, la etapa del estudio Doppler de la arteria uterina. Este estudio puede dar, ventajosamente, información adicional sobre la placentación. Es sabido que la placentación deficiente es una indicación del riesgo del desarrollo de problemas relacionados con el embarazo.

En otro aspecto adicional, la invención también proporciona un dispositivo para identificar que es probable que una hembra embarazada que se encuentre en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia, eclampsia y HELLP, comprendiendo dicho dispositivo: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 — que sea, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor (recombinante) de la ESM-1 o un aptámero— que permita la determinación de la cantidad de ESM-1; (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados los algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con un valor de referencia almacenado en una base de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP. Especialmente, en una realización el dispositivo puede comprender, además, una unidad de análisis que comprende un agente de detección de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A o GDF-15, que permite la determinación de la cantidad sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A o GDF-15, y una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados los algoritmos necesarios para comparar la cantidad de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A o GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia,

eclampsia y/o HELLP. Como estará claro para una persona experta en la técnica, las unidades de análisis y las unidades de evaluación de ESM-1 y uno o más de los demás marcadores pueden ser opcionalmente una única unidad de análisis y/o una única unidad de evaluación, respectivamente. Especialmente, en otra realización adicional la unidad de evaluación también es capaz de dar recomendaciones terapéuticas. De forma alternativa o adicional al marcador secundario anteriormente indicado, también pueden elegirse una o más de una pikachurina y una hemopexina.

En otro aspecto adicional, la invención también proporciona el uso de una evaluación de la cantidad de ESM-1 en una muestra biológica extraída de una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación para identificar si es probable que la hembra embarazada tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia, eclampsia y HELLP según se define adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas. aún más especialmente, la invención proporciona el uso *in vitro* de una muestra biológica extraída de una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación para identificar si es probable que la hembra embarazada tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia, eclampsia y HELLP, comprendiendo el uso: (a) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (b) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia; y (c) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo definido adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un equipo de reactivos para identificar si es probable que una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia, eclampsia y HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1; (b) una unidad de evaluación para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función del resultado proporcionado por la unidad de análisis, según se define adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas. Especialmente, la invención proporciona una realización del equipo de reactivos que, además, comprende un manual o una referencia a un manual, tal como un manual remoto (como una base de datos en un servidor). Aún más especialmente, la invención proporciona una realización del equipo de reactivos en la que el manual incluye instrucciones de cómo extraer una muestra biológica de una hembra embarazada y/o de cómo usar la unidad de análisis y/o de cómo usar la unidad de evaluación.

En una realización, la unidad de evaluación comprende un esquema de colores, en el que la unidad de análisis está configurada para proporcionar una reacción cromática, dependiendo el color de la cantidad de ESM-1 en una muestra biológica extraída de una hembra embarazada. Especialmente, la invención proporciona una realización del equipo de reactivos que comprende: (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP. Especialmente, la invención proporciona una realización del equipo de reactivos que comprende: (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo. En una realización específica del equipo de reactivos, dicho equipo de reactivos comprende: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 y de uno o más de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A y GDF-15. Por ende, la invención también puede proporcionar una realización del equipo de reactivos que comprende una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 y un agente de detección de uno o más de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A y GDF-15, que permite la determinación de la cantidad de ESM-1, y de uno o más de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A y GDF-15. Aún más especialmente, la invención proporciona una realización del equipo de reactivos que comprende una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 y de uno o más de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndogлина, pp-13, PAPP-A y GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo. De forma alternativa o adicional al marcador secundario anteriormente indicado, también pueden elegirse una o más de una pikachurina y una hemopexina. Según se ha indicado anteriormente, en una realización, la unidad de análisis puede comprender un ensayo. Aún más especialmente, en una realización la unidad de análisis comprende un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), un ensayo turbidimétrico, un ensayo de radioinmunoabsorción (RIST), un radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia directa o indirecta, un inmunoensayo en gel de partículas (PaGIA) o un ensayo de flujo lateral.

En una realización (del equipo de reactivos), el manual incluye información para extraer una muestra biológica de una hembra embarazada en una semana cualquiera de la gestación, especialmente entre las semanas 1 a 20 de gestación, aún más especialmente entre las semanas 12 a 16.

Alternativamente o además, la invención proporciona una realización del equipo de reactivos en la que la unidad de análisis comprende un procedimiento para realizar una cuantificación del ARN que codifica la ESM-1 en las células o del ARN libre de células en la muestra biológica, especialmente un fluido biológico, tal como un líquido corporal.

Por ende, el procedimiento, el equipo de reactivos o el dispositivo de la invención puede ser usado para predecir que es probable que una hembra embarazada en una cualquiera de las semanas 1 a 20 de gestación desarrolle después de la semana 20 preeclampsia grave de inicio precoz, en función de una medición de la cantidad de ESM-1 en una muestra de líquido biológico de la hembra embarazada, comprendiendo especialmente la muestra de líquido biológico especialmente una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero de dicha hembra embarazada. Esto ocurrirá especialmente cuando la cantidad de ESM-1 sea sustancialmente menor que la cantidad de ESM-1 en una muestra (de una hembra embarazada al mismo tiempo, especialmente en aproximadamente la misma semana de gestación) de una hembra embarazada sana.

Según se lo usa en la presente memoria, el término "ESM-1" o "endocán" tiene su significado general en la técnica, y se refiere a la molécula específica a las células endoteliales-1, que es un proteoglicano de sulfato de dermatán de 50 kDa expresado por las células endoteliales del pulmón y el riñón, entre otros tipos de células y puede ser detectado en la sangre humana. Según se la usa en la presente memoria, la expresión "muestra de sangre" se refiere a sangre entera, suero o a una muestra de plasma. Normalmente, la muestra de sangre es extraída/recogida de un paciente por un médico o una enfermera y procesada en el laboratorio del hospital. Los ensayos indicados anteriormente también pueden ser usados en hospitales o clínicas secundarios y podrían incluso ser usados en general por comadronas. Una vez que se prepara la muestra de sangre de la paciente, la concentración de ESM-1 puede ser medida mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Remitirse, por ejemplo, al documento WO2012098219. Por ejemplo, la concentración de ESM-1 puede ser medida usando técnicas estándar electroforéticas e inmunodiagnósticas, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competencia, de reacción directa o de fase doble. Tales ensayos incluyen, sin limitación, electroinmunotransferencias; ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y arbitrados por enzimas, tales como los ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; Inmunolectroforesis; inmunoprecipitación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía por exclusión de tamaños, afinidad en fase sólida, etc. Según también se describe en el documento WO2012098219, tales procedimientos pueden comprender la puesta de la muestra de sangre en contacto con un ligando capaz de interactuar selectivamente con la ESM-1 presente en la muestra de sangre. Generalmente, el ligando puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. Los anticuerpos policlonales dirigidos contra la ESM-1 pueden ser suscitados según procedimientos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un anfitrión animal seleccionado, por ejemplo, entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Para potenciar la producción de anticuerpos pueden usarse diversos adyuvantes conocidos en la técnica. Aunque los anticuerpos útiles en la puesta en práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra la ESM-1 pueden ser preparados y aislados usando cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, sin limitación, la técnica del hibridoma, descrita originalmente en el documento WO2012098219 y en las referencias citadas en el mismo. Los anticuerpos útiles en la puesta en práctica de la presente invención también incluyen fragmentos anti-ESM-1 que incluyen, sin limitación, fragmentos F(ab')₂, que pueden ser generados por digestión con pepsina de una molécula intacta de anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden ser generados reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv (Fv monocatenario) para permitir la identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada hacia la ESM-1. Puede usarse, por ejemplo, la visualización de anticuerpos en fagos. En tal procedimiento, los fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o Fab son expresados en la superficie de un bacteriófago adecuado; por ejemplo, M13. Sucintamente, se retiran los esplenocitos de un anfitrión adecuado —por ejemplo, un ratón— que ha sido inmunizado con una proteína. Se obtienen las regiones codificantes de las cadenas VL y VH de las células que producen el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones codificantes son fusionadas entonces con un terminal de una secuencia de fagos. Una vez que el fago es insertado en un portador adecuado —por ejemplo, bacterias—, el fago muestra el fragmento de anticuerpo. La visualización de anticuerpos en fagos también puede ser proporcionada mediante procedimientos combinatorios conocidos por los expertos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos presentados por un fago pueden ser usados entonces como parte de un inmunoensayo. Hay anticuerpos monoclonales anti-ESM-1 disponibles comercialmente, por ejemplo, en Lunginnov (Lille, Francia); véase también el documento WO2012098219.

En otra realización, el ligando puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con capacidad de reconocer casi cualquier clase de moléculas diana con gran afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden ser aislados mediante una evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, según se describe en el documento WO2012098219 y en las referencias citadas en el mismo. La biblioteca de secuencias aleatorias es obtenible por síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, modificado químicamente en último término, de una secuencia única. En el documento WO2012098219 y en las referencias citadas en el mismo se han indicado y descrito modificaciones posibles, usos y ventajas de esta clase de moléculas. Los ligandos de la invención, tales como anticuerpos o aptámeros, pueden ser marcados con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otra marca conocida en la técnica. En la técnica se conocen marcas que generalmente proporcionan (ya sea directa o indirectamente) una señal.

La PE grave de inicio precoz, especialmente, pertenece a los síndromes relacionados con el embarazo (tales como la preeclampsia) descritos en la presente memoria. Según es usado en la presente memoria, se prevé que el término “marcado”, con respecto al anticuerpo, abarque el marcado directo del anticuerpo o el aptámero acoplado (es decir, enlazando físicamente) al anticuerpo o al aptámero una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)), así como el marcado indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o un aptámero de la invención puede ser marcado con una molécula radiactiva mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las moléculas radiactivas incluyen, por ejemplo, sin limitación, ¹¹²³I, ¹¹²⁴I, ¹¹¹In, ⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re. Según se indica también el documento WO2012098219, los ensayos anteriormente mencionados generalmente implican la unión del ligando (es decir, el anticuerpo o el aptámero) en un soporte sólido. Los soportes sólidos que se pueden usar en la puesta en práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas sensibles al magnetismo y similares.

Más en particular, puede usarse un procedimiento ELISA en el que se recubran los pocillos de una placa de microtitulación con un conjunto de anticuerpos contra la ESM-1. A continuación, se añade una muestra de sangre que contiene o se sospecha que contiene ESM-1 a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la o las placas pueden ser lavadas para eliminar restos no unidos y añadirse una molécula secundaria de unión marcada de manera detectable. Se deja que la molécula secundaria de unión reaccione con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula secundaria de unión usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Normalmente, hay disponible comercialmente un equipo de reactivos ELISA en Lunginnov (Lille, Francia) o en otras fuentes, tales como las descritas en el documento WO2012098219 y en las referencias citadas en el mismo. La medición de la concentración de ESM-1 (con o sin procedimientos basados en inmunoensayos) también puede incluir la separación de las proteínas: centrifugación, basada en el peso molecular de la proteína; electroforesis, basada en la masa y la carga; HPLC, basada en la hidrofobicidad; cromatografía por exclusión de tamaños, basada en el tamaño; y la afinidad en fase sólida, basada en la afinidad de la proteína hacia la fase sólida particular que se use. Una vez separada, la ESM-1 puede ser identificada en función del “perfil de separación” conocido —por ejemplo, el tiempo de retención— para esa proteína y ser medida usando técnicas estándar. Alternativamente, las proteínas separadas pueden ser detectadas y medidas, por ejemplo, por un espectrómetro de masas. Por ende, la presencia y la cuantificación del analito puede ser mostrada y realizada usando técnicas generalmente aceptadas como, por ejemplo, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ya sea en una configuración de fase doble o competitiva, un procedimiento de flujo lateral, un ensayo a base de partículas (perlas) magnéticas o fluorescentes e inmunoelectrotransferencia, etc.

En una realización, se determina en una muestra la cantidad de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15, o una combinación de estos marcadores, además de la cantidad de ESM-1 y se comparan sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15, o una combinación de estos marcadores, con una cantidad de referencia de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15 para diagnosticar el riesgo de experimentar preeclampsia, eclampsia o HELLP. En una realización, la proporción entre ESM-1 y cualquiera de dichos marcadores o de una combinación de dichos marcadores en una muestra es usada para determinar la predisposición o no de una hembra embarazada a desarrollar preeclampsia, eclampsia o HELLP. En una realización, dicha muestra es sangre, plasma, suero, orina o saliva de la hembra. En un ejemplo, dicha muestra se deriva de una hembra que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 1 a 20 de gestación. En un ejemplo, dicha muestra se deriva de una hembra que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 20 a 36 de gestación. En una realización, dichos niveles de medición se realizan en una o más ocasiones, y un cambio en dichos niveles es un valor diagnóstico para el desarrollo o no de preeclampsia, eclampsia o HELLP. En una realización, dicha medición se efectúa usando un ensayo inmunológico. En un aspecto adicional, la invención proporciona un dispositivo para determinar la predisposición o no de una hembra embarazada a desarrollar preeclampsia, eclampsia o HELLP, comprendiendo dicho dispositivo: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 que permite la determinación de la cantidad de ESM-1; (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos para determinar la predisposición o no de una mujer embarazada a desarrollar preeclampsia, eclampsia o HELLP.

En una realización, la invención proporciona, además, un dispositivo para determinar la predisposición o no de una hembra embarazada a desarrollar preeclampsia, eclampsia o HELLP, comprendiendo dicho dispositivo: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15, que permite la determinación de la cantidad de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15; (y/o) (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar la predisposición o no de una mujer embarazada a

desarrollar preeclampsia, eclampsia o HELLP. En una realización, la invención proporciona, además, un dispositivo en el que dicha unidad de evaluación es también capaz de dar recomendaciones terapéuticas. En otro aspecto adicional, la invención también proporciona un equipo de reactivos para determinar la predisposición o no de una hembra embarazada a desarrollar preeclampsia, eclampsia o HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos al menos el agente de detección de la ESM-1 y, preferentemente, estándares que reflejen las cantidades de referencia derivados de una hembra embarazada o de un grupo de las mismas que se sabe que no padecen preeclampsia, eclampsia o HELLP ni tienen predisposición a desarrollarlas.

La cantidad de ESM-1 en la muestra biológica o líquido biológico de la hembra embarazada es comparada especialmente con un valor de referencia derivado de una muestra biológica o líquido biológico de hembras embarazadas que tienen un embarazo sano, habiéndose producido las muestras biológicas (es decir, las muestras de referencia y la muestra biológica de la hembra embarazada) de la misma manera (mismo tipo de muestra) y en la misma semana.

En la presente memoria, el término “sustancialmente”, tal como en “consiste sustancialmente”, será entendido por la persona experta en la técnica. El término “sustancialmente” también puede incluir realizaciones con “totalmente”, “completamente”, “la totalidad”, etc. Por ende, en las realizaciones también puede eliminarse el adverbio sustancialmente. Cuando sea aplicable, el término “sustancialmente” también puede referirse al 90% o más, tal como 95% o más, especialmente 99% o más, incluso más especialmente 99,5% o más, incluyendo el 100%. El término “comprender” también incluye realizaciones en las que el término “comprende” significa “consiste en”. El término “y/o” se refiere especialmente a uno o más de los elementos mencionados antes y después de “y/o”. Por ejemplo, una frase “elemento 1 y/o elemento 2” y frases similares pueden referirse a uno o más del elemento 1 y el elemento 2. La expresión “que comprende” puede referirse, en una realización, a “que consiste en”, pero en otra realización también puede referirse a “que contiene al menos las especies definidas y, opcionalmente, una o más especies adicionales”. Además, los términos primero, segundo, tercero y similares, en la descripción y en las reivindicaciones, son usados para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Ha de entenderse que los términos así usados son intercambiables en unas circunstancias apropiadas y que otras realizaciones de la invención descritas en la presente memoria son susceptibles de operación en otras secuencias distintas de las descritas o ilustradas en la presente memoria. Sin embargo, los términos primero y segundo, etc., también pueden indicar una relación en tiempo. Por ejemplo, una primera muestra puede ser extraída en el tiempo anteriormente a una segunda muestra. Esto se aplica especialmente, a las expresiones “primera ocasión” y “segunda ocasión”. En función de los valores medidos, puede realizarse un diagnóstico.

Los dispositivos de la presente memoria pueden ser descritos, entre otros modos, durante la operación. Como estará claro para la persona experta en la técnica, la invención no está limitada a procedimientos de operación o a dispositivos en operación. Debería hacerse notar que las realizaciones mencionadas anteriormente ilustran la invención sin limitarla, y que los expertos en la técnica serán capaces de diseñar muchas realizaciones alternativas sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, no se interpretará que ningún signo de referencia puesto entre paréntesis limite la reivindicación. El uso del verbo “comprender” y sus conjugaciones no excluye la presencia de elementos o etapas distintos de los enumerados una reivindicación. El artículo “un” o “una” delante de un elemento no excluye la presencia de varios elementos de ese tipo. La invención puede ser implementada por medio de un soporte físico que comprende varios elementos diferenciados, y por medio de un ordenador programado de manera adecuada. En la reivindicación de un dispositivo que enumere varios medios, varios de estos medios pueden ser implementados por un único elemento de soporte físico. El mero hecho de que se enumeren ciertas medidas en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que no pueda usarse con ventaja una combinación de estas medidas. La invención se aplica, además, a un dispositivo que comprende uno o más rasgos característicos descritos en la descripción y/o mostrados en los dibujos adjuntos. La invención se refiere, además, a un procedimiento o proceso que comprende uno o más rasgos característicos descritos en la descripción y/o mostrados en los dibujos adjuntos.

Los diversos aspectos expuestos en esta patente pueden ser combinados para proporcionar ventajas adicionales. Además, algunas de las características pueden formar la base para una o más solicitudes divisionarias.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Concentración de la ESM-1 en plasma durante el último trimestre de embarazo de mujeres embarazadas sanas (P) (n=32), de mujeres con preeclampsia grave de inicio precoz (SE) (n=52), y de mujeres con preeclampsia grave de inicio tardío (SL) (n=8) y de mujeres no embarazadas (NP) (n=25). Significación calculada por el ensayo de Mann Whitney: **** = $p < 0,0001$, *** = $p < 0,001$, y NS = no significativo; y Figura 2: Concentraciones de ESM-1 en plasma durante el embarazo (semana 12 hasta el parto) de mujeres embarazadas sanas (CON; n=23), con preeclampsia grave de inicio precoz (SE; n=11) y preeclampsia grave de inicio tardío (SL; n=7). La significación entre embarazos sanos y preeclámpticos es calculada por el ensayo de Mann Whitney: * = $p < 0,05$. El tiempo de gestación se indica con “ge” en semanas (w).

Descripción detallada de las realizaciones

Dado que la ESM-1 desempeña un papel en la regulación de la angiogénesis, los inventores emitieron la hipótesis de que la expresión de la ESM-1 durante el embarazo sería diferente entre los embarazos sanos y las dos formas, de inicio precoz y tardío, de preeclampsia. Se recogieron a intervalos regulares entre la semana 8 y el parto un total de 290 muestras de plasma en EDTA de 23 embarazos sanos y de control con GA coincidente (CON), 11 de PE grave de inicio precoz (SE) y 7 de PE grave de inicio tardío (SL). En estas muestras de plasma, la ESM-1 fue medida por ELISA. Por razones de conveniencia, se determinó la media de los valores de periodos de 4 semanas: de la 9 a la 12 se expresa como semana 12, las semanas 13 a 16 se expresan como semana 16, etc. Durante el periodo entre la semana 24 de GA y el parto, las concentraciones de ESM-1 aumentaron significativamente en la preeclampsia de inicio tanto precoz como tardío en comparación con los controles durante el mismo periodo. Sorprendentemente, la concentración de ESM-1 también difirió entre los tres grupos en las semanas 12 y 16. Las concentraciones de ESM-1 en embarazos sanos (media de 1857 pg/ml) y en los que desarrollan PE grave de inicio tardío (media de 1298 pg/ml) son comparables, pero en los embarazos que desarrollan PE grave de inicio precoz, la concentración (media de 410 pg/ml) es significativamente menor (Figura 1). Estos resultados indican que la ESM-1 es un marcador de pronóstico que puede determinar el riesgo de que las mujeres desarrollen PE grave de inicio precoz ya en las semanas 12 a 16 de la gestación (Figura 2).

Las pacientes con preeclampsia de inicio precoz y las de control con embarazos sanos fueron reclutadas de la sala prenatal y las mujeres no embarazadas fueron reclutadas del personal del hospital y entre estudiantes. Los criterios de exclusión para todos los grupos fueron hipertensión, diabetes mellitus, vasculitis, enfermedad renal, enfermedad autoinmunitaria, neoplasias malignas preexistentes o mujeres que hubieran tenido recientemente un traumatismo o cirugía. La preeclampsia se definió según los estándares de la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP): presión arterial diastólica de 90 mmHg o más en dos o más ocasiones consecutivas separadas más de 4 horas y proteinuria de más de 300 mg/24 horas. Se incluyó a mujeres con preeclampsia de inicio precoz, definida como el inicio de la preeclampsia antes de las 34 semanas. Se tomaron muestras de sangre de mujeres no embarazadas y de pacientes con preeclampsia y mujeres embarazadas sanas entre la semana 12 del embarazo y el parto.

Se recogieron muestras de sangre materna de mujeres embarazadas tanto sanas como preeclámpticas durante un muestreo rutinario de sangre. Las muestras de sangre fueron extraídas introduciéndolas en tubos de 10 mL que contenían EDTA (Venoject, Terumo Europe NV, Lovaina, Bélgica). De estas muestras se recogió el plasma y se lo congeló (-80°C) en partes alícuotas hasta que los ensayos pudieran llevarse a cabo simultáneamente. Se determinaron los niveles plasmáticos de todos los analitos usando reactivos disponibles comercialmente. Estos reactivos estaban presentes en conjuntos o equipos de reactivos para llevar a cabo ensayos ELISA de fase doble. sFlt, sEng, PIGF y HGF fueron medidos mediante ensayos ELISA Quantikine (R&D Systems Inc., Minneapolis, EE. UU.). La ESM-1 fue medida usando la combinación de anticuerpos y el estándar de Lunginnov (Lille, Francia).

Sucintamente, se inmovilizó en una microplaca ELISA un primer anticuerpo mono o policlonal específico para el analito. Tras su incubación durante la noche, la placa fue lavada y bloqueada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía un 0,1% de albúmina de suero bovino. Tras una incubación posterior, la placa fue lavada con tampón de lavado que contenía un 0,1% de Tween-20. A partir de una solución madre que contenía una concentración conocida del analito, se preparó una curva estándar mediante una dilución 1 a 1. Se incubaron partes alícuotas de 100 µL de la curva estándar de la muestra de plasma en los diferentes pocillos de la placa ELISA. Después de la incubación, se volvió a lavar la placa, seguido por la incubación con un segundo anticuerpo mono o policlonal específico para el analito y conjugado con biotina. Antes de incubar el ensayo con estreptavidina-poli-HRPO, la placa fue lavada nuevamente. Después de la incubación con estreptavidina-poli-HRPO el ensayo fue incubado con una solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La enzima HRPO presente en el pocillo hará azul la solución incolora en proporción al analito presente. Se detuvo el revelado del color y se midió la intensidad del color. Pueden encontrarse detalles adicionales en los prospectos de los respectivos paquetes. Según se ha indicado anteriormente, se recogieron a intervalos regulares entre la semana 8 y el parto un total de 290 muestras de plasma en EDTA de 23 embarazos sanos y de control con GA coincidente (CON), 11 de PE grave de inicio precoz (SE) y 7 de PE grave de inicio tardío (SL). En estas muestras de plasma, la ESM-1 fue medida por ELISA. Durante el periodo entre la semana 24 de GA y el parto, las concentraciones de ESM-1 aumentaron significativamente en la preeclampsia de inicio tanto precoz como tardío en comparación con los controles durante el mismo periodo. Sorprendentemente, la concentración de ESM-1 también difirió entre los tres grupos en las semanas 12 y 16. Las concentraciones de ESM-1 en embarazos sanos (media de 1857 pg/ml) y en los que desarrollan PE grave de inicio tardío (media de 1298 pg/ml) son comparables, pero en los embarazos que desarrollan PE grave de inicio precoz, la concentración (media de 410 pg/ml) es significativamente menor (Figura 1). Estos resultados indican que la ESM-1 es un marcador de pronóstico que puede determinar el riesgo de que las mujeres desarrollen PE grave de inicio precoz ya en las semanas 12 a 16 de la gestación (Figura 2). En función de la medición de la concentración de ESM-1 en sangre puede determinarse el riesgo de que una mujer embarazada desarrolle preeclampsia posteriormente en su embarazo. Este riesgo es más elevado cuando la concentración de ESM-1 es menor que la de las mujeres que no desarrollarán preeclampsia o preeclampsia de inicio tardío.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para identificar que es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP (hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia) que comprende las etapas de: (a) extraer una muestra biológica de una hembra; (b) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; y (c) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia; y (d) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar que es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP (hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia) que comprende las etapas de: (a) extraer una muestra biológica de una hembra; (b) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; y (c) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia; y (d) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando dicha cantidad de ESM-1 es mayor que el valor de referencia.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) extraer una muestra biológica de una hembra; (b) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (c) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia de ESM-1; y (d) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en tirosina quinasa-1 de tipo Fms soluble (sFlt1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PlGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), endoglina soluble, proteína placentaria 13 (pp-13), proteína A de plasma asociada al embarazo (PAPP-A) y factor 15 de diferenciación de crecimiento (GDF-15); e) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la muestra biológica; (f) para cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios, seleccionar un valor de referencia del marcador secundario, y comparar dicha cantidad de dicho marcador secundario con el valor de referencia del marcador secundario; y (g) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, y en función de una comparación de la cantidad de dichos uno o más marcadores secundarios con el correspondiente valor de referencia del marcador secundario.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) extraer una muestra biológica de una hembra; (b) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (c) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia de ESM-1; y (d) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en tirosina quinasa-1 de tipo Fms soluble (sFlt1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PlGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), endoglina soluble, proteína placentaria 13 (pp-13), proteína A de plasma asociada al embarazo (PAPP-A) y factor 15 de diferenciación de crecimiento (GDF-15); e) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la muestra biológica; (f) para cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios, seleccionar un valor de referencia del marcador secundario, y comparar dicha cantidad de dicho marcador secundario con el valor de referencia del marcador secundario; y (g) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando dicha cantidad de ESM-1 es mayor que el valor de referencia de ESM-1, y cuando dicha cantidad de cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios es mayor que su correspondiente valor de referencia del marcador secundario.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) extraer una muestra biológica de una hembra; (b) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (c) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (d) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la muestra biológica; (e) para cada uno de los marcadores secundarios: (i) determinar la proporción entre la cantidad de ESM-1 y la cantidad del marcador secundario; y (ii) seleccionar un valor de referencia de la proporción; (iii) comparar la proporción con el valor de referencia de la proporción; y (f) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, especialmente en función de una comparación con la proporción de referencia, tal como cuando, para cada uno de los marcadores secundarios, dicha proporción es mayor que el valor de referencia de la proporción.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) extraer una primera muestra biológica de una hembra en una primera ocasión; (b) extraer una segunda muestra biológica de una hembra en una segunda ocasión; (c) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica que constituye una primera cantidad; (d) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica que constituye una segunda cantidad; y (e) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP especialmente en función de

una comparación entre la primera cantidad y la segunda cantidad, tal como cuando la segunda cantidad es mayor que la primera cantidad en un valor de referencia predefinido. En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) extraer una primera muestra biológica de una hembra; (b) extraer una segunda muestra biológica de una hembra; (c) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica que constituye una primera cantidad de ESM-1; (d) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica que constituye una segunda cantidad de ESM-1; (e) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (f) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la primera muestra biológica, que constituyen un conjunto de primeras cantidades de los marcadores secundarios; (g) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la segunda muestra biológica, que constituyen un conjunto de segundas cantidades de los marcadores secundarios; (h) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP especialmente en función de (i) una comparación entre la primera cantidad de ESM-1 y la segunda cantidad ESM-1 y/o en función de (ii) una comparación entre la segunda cantidad del marcador secundario y la primera cantidad, tal como cuando la segunda cantidad de ESM-1 es mayor que la primera cantidad de ESM-1 en un valor de referencia de ESM-1 predefinido y, para cada uno de los marcadores secundarios, la segunda cantidad del marcador secundario es mayor que la primera cantidad del marcador secundario en un valor de referencia predefinido para ese marcador secundario.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) extraer una primera muestra biológica de una hembra; (b) extraer una segunda muestra biológica de una hembra; (c) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica que constituye una primera cantidad de ESM-1; (d) usando un ensayo específico a la ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica que constituye una segunda cantidad de ESM-1; (e) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (f) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la primera muestra biológica, que constituyen un conjunto de primeras cantidades de los marcadores secundarios; (g) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la segunda muestra biológica, que constituyen un conjunto de segundas cantidades de los marcadores secundarios; (h) para cada uno de los marcadores secundarios: (1) determinar la proporción entre la primera cantidad de ESM-1 y la primera cantidad del marcador secundario, que constituye una primera proporción; (2) determinar la proporción entre la segunda cantidad de ESM-1 y la segunda cantidad del marcador secundario, que constituye una segunda proporción; (3) comparar la primera proporción con la segunda proporción; e (i) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, especialmente cuando, para cada uno de los marcadores secundarios, la segunda proporción es mayor que la primera proporción en un valor de referencia predefinido.

En una realización, el procedimiento comprende, además, la etapa de un estudio Doppler de la arteria uterina. En una realización, dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se efectúan usando uno o más ensayos inmunológicos, especialmente un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), un ensayo turbidimétrico, un ensayo de radioinmunoabsorción (RIST), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunofluorescencia directa o indirecta, un inmunoensayo en gel de partículas (PaGIA), espectrometría de masa (MS) o un ensayo de flujo lateral. En una realización, dicho ensayo inmunológico o dichos ensayos inmunológicos son un ensayo ELISA. En una realización, dicho ensayo inmunológico o dichos ensayos inmunológicos son un ensayo de flujo lateral. En una realización, dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se realizan usando uno o más ensayos colorimétricos enzimáticos. En una realización, dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se realizan usando espectrometría de masa (MS). En una realización, dicha cantidad de ESM-1 es el nivel de ESM-1 libre, ESM-1 enlazada, un metabolito de ESM-1 o ESM-1 total.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un dispositivo para identificar a una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y HELLP, comprendiendo dicho dispositivo: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 que es, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor (recombinante) de la ESM-1 o un aptámero, que permite la determinación de la cantidad de ESM-1; (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP. En otro aspecto adicional, la invención proporciona un dispositivo para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, comprendiendo dicho dispositivo: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1, sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15 que permite la determinación de la cantidad de ESM-1, sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15; (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para

comparar la cantidad de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP. En una realización, dicha unidad de evaluación también es capaz de dar recomendaciones terapéuticas. En otro aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una evaluación de la cantidad de ESM-1 en una muestra biológica extraída de una hembra embarazada para identificar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP.

En otra realización adicional, la invención proporciona el uso *in vitro* de una muestra biológica extraída de una hembra embarazada si es probable que la hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, comprendiendo el uso: (a) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (b) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia; y (c) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia. En un ejemplo, el uso adicional comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU cuando dicha cantidad de ESM-1 es mayor que el valor de referencia, especialmente cuando la muestra biológica procede de una hembra embarazada en una semana cualquiera de la gestación entre la semana 26 de gestación o posteriormente.

En otra realización adicional, la invención proporciona el uso *in vitro* de una muestra biológica extraída de una hembra embarazada para identificar si es probable que la hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, comprendiendo el uso: (a) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (b) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia de ESM-1; y (c) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (d) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la muestra biológica; (e) para cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios, seleccionar un valor de referencia del marcador secundario, y comparar dicha cantidad de dicho marcador secundario con el valor de referencia del marcador secundario; y (f) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP.

En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, y en función de una comparación de la cantidad de dichos uno o más marcadores secundarios con el correspondiente valor de referencia del marcador secundario. En un ejemplo, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU cuando dicha cantidad de ESM-1 es mayor que el valor de referencia de ESM-1, especialmente cuando la muestra biológica procede de una hembra embarazada en una semana cualquiera de gestación entre la semana 26 de gestación o posteriormente. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando dicha cantidad de cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios es mayor que su correspondiente valor de referencia del marcador secundario.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un uso *in vitro* de una muestra biológica extraída de una hembra embarazada para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, que comprende las etapas de: (a) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica; (b) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (c) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir la cantidad de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la muestra biológica; (d) para cada uno de los marcadores secundarios: (i) determinar la proporción entre la cantidad de ESM-1 y la cantidad del marcador secundario; y (ii) seleccionar un valor de referencia de la proporción; (iii) comparar la proporción con el valor de referencia de la proporción; y (e) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP.

En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación para cada uno de los marcadores secundarios con el valor de referencia de la proporción. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando, para cada uno de los marcadores secundarios, dicha proporción es mayor que el valor de referencia de la proporción. En una realización dicha muestra se deriva de una hembra que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 1 a 20 de gestación, especialmente entre las semanas 12 a 16, y se identifica que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando dicha cantidad de ESM-1 es menor que el valor de referencia de ESM-1.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un uso *in vitro* de muestras biológicas extraídas de una hembra embarazada para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, usando una primera muestra biológica de una hembra extraída en una primera ocasión y

usando una segunda muestra biológica de una hembra extraída en una segunda ocasión, que comprende las etapas de: (a) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica, que constituye una primera cantidad; (b) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica, que constituye una segunda cantidad; y (c) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación entre la segunda cantidad y la primera cantidad. En un ejemplo, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU cuando la segunda cantidad es mayor que la primera cantidad en un valor de referencia predefinido, especialmente cuando la muestra biológica procede de una hembra embarazada en una semana cualquiera de gestación entre la semana 26 de gestación o posteriormente. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando la segunda cantidad es menor que la primera cantidad en un valor de referencia predefinido cuando la muestra biológica procede de una hembra embarazada en una semana cualquiera de gestación antes de la semana 26, especialmente antes de la semana 20, aún más especialmente en cualquier semana de gestación entre las semanas de gestación 12 y 16.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un uso *in vitro* de muestras biológicas extraídas de una hembra embarazada para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, usando una primera muestra biológica de una hembra extraída en una primera ocasión y usando una segunda muestra biológica de una hembra extraída en una segunda ocasión, que comprende las etapas de: (a) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica, que constituye una primera cantidad de ESM-1; (b) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica, que constituye una segunda cantidad de ESM-1; (c) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (d) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la primera muestra biológica, que constituyen un conjunto de primeras cantidades de los marcadores secundarios; (e) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la segunda muestra biológica, que constituyen un conjunto de segundas cantidades de los marcadores secundarios; (f) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP.

En un ejemplo, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU cuando la segunda cantidad es mayor que la primera cantidad en un valor de referencia predefinido, especialmente cuando la muestra biológica procede de una hembra embarazada en una semana cualquiera de gestación entre la semana 26 de gestación o posteriormente. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando la segunda cantidad es menor que la primera cantidad en un valor de referencia predefinido cuando la muestra biológica procede de una hembra embarazada en una semana cualquiera de gestación antes de la semana 26, especialmente antes de la semana 20, aún más especialmente en cualquier semana de gestación entre las semanas de gestación 12 y 16.

En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación de cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios con su correspondiente valor de referencia del marcador secundario. En un ejemplo, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU cuando dicha cantidad de cada uno de dichos uno o más marcadores secundarios (también) es mayor que su correspondiente valor de referencia del marcador secundario.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un uso *in vitro* de muestras biológicas extraídas de una hembra embarazada para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, usando una primera muestra biológica de una hembra extraída en una primera ocasión y usando una segunda muestra biológica de una hembra extraída en una segunda ocasión, que comprende las etapas de: (a) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica, que constituye una primera cantidad de ESM-1; (b) usando un ensayo específico a ESM-1, medir la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica, que constituye una segunda cantidad de ESM-1; (c) seleccionar uno o más marcadores secundarios del grupo que consiste en sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (d) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la primera muestra biológica, que constituyen un conjunto de primeras cantidades de los marcadores secundarios; (e) usando ensayos específicos para cada uno de los uno o más marcadores secundarios, medir las cantidades de cada uno de los uno o más marcadores secundarios en la segunda muestra biológica, que constituyen un conjunto de segundas cantidades de los marcadores secundarios; (f) para cada uno de los marcadores secundarios: (i) determinar la proporción entre la primera cantidad de ESM-1 y la primera cantidad del marcador secundario, que constituye una primera proporción; (ii) determinar la proporción entre la segunda cantidad de ESM-1 y la segunda cantidad del marcador secundario, que constituye una segunda proporción; (iii) comparar la primera proporción con la segunda proporción; y (g) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP.

En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP en función de una comparación de la proporción de cada proporción de cada uno de los marcadores secundarios con un valor de referencia predefinido. En una realización, el uso comprende (además) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP cuando, para cada uno de los marcadores secundarios, la segunda proporción es mayor que la primera proporción en un valor de referencia predefinido. En una realización, dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se realizan usando uno o más ensayos inmunológicos. En una realización, dicho ensayo inmunológico o dichos ensayos inmunológicos son un ensayo ELISA. En una realización, dicho ensayo inmunológico o dichos ensayos inmunológicos son un ensayo de flujo lateral. En una realización, dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se realizan usando uno o más de un ensayo enzimático o colorimétrico o luminiscente. En una realización, dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se realizan usando espectrometría de masa (MS). En una realización, dicha cantidad de ESM-1 es el nivel de ESM-1 libre, ESM-1 enlazada, un metabolito de ESM-1 o ESM-1 total.

En una realización, una o más de dicha primera muestra biológica y dicha segunda muestra biológica, especialmente tanto la primera muestra biológica como la segunda muestra biológica, son sangre, plasma, suero, orina o saliva de la hembra. En una realización, una o más de dicha primera muestra biológica y dicha segunda muestra biológica, especialmente tanto la primera muestra biológica como la segunda muestra biológica, se derivan de una hembra que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 1 a 20 de gestación, especialmente entre las semanas 12 a 16. En un ejemplo adicional, una o más de dicha primera muestra biológica y dicha segunda muestra biológica, especialmente tanto la primera muestra biológica como la segunda muestra biológica, se derivan de una hembra que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas de gestación 20 a 36.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un equipo de reactivos para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1; (b) una unidad de evaluación para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, en función de un resultado proporcionado por la unidad de análisis. En una realización, el equipo de reactivos puede comprender, además, un manual o una referencia a un manual (remoto). En una realización, el manual incluye instrucciones de cómo extraer una muestra biológica de una hembra embarazada y/o de cómo usar la unidad de análisis y/o de cómo usar la unidad de evaluación. En una realización, la unidad de evaluación comprende un esquema de colores, estando configurada la unidad de análisis para proporcionar una reacción cromática, dependiendo el color de la cantidad de ESM-1 en una muestra biológica extraída de una hembra embarazada. En una realización, el equipo de reactivos comprende (además): (a) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP. En una realización, el equipo de reactivos comprende (además): (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un equipo de reactivos para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15. En otro aspecto adicional, la invención proporciona un equipo de reactivos, según se describe en la presente memoria, para identificar a una hembra embarazada que es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y/o HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15, que permite la determinación de la cantidad de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un equipo de reactivos, según se describe en la presente memoria, comprendiendo dicho equipo de reactivos (además): (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1, sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia, HELLP y/o RCIU. En una realización, dicha unidad de evaluación también es capaz de dar recomendaciones terapéuticas. En una realización, la unidad de análisis comprende un ensayo. En una realización, la unidad de análisis comprende un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), un ensayo turbidimétrico, un ensayo de radioinmunoabsorción (RIST), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunofluorescencia directa o indirecta, un inmunoensayo en gel de partículas (PaGIA), espectrometría de masa (MS) o un ensayo de flujo lateral. En una realización, el manual incluye información para extraer una muestra biológica de una hembra embarazada en una semana cualquiera de la gestación, especialmente entre las semanas 1 a 20 de gestación, aún más especialmente entre las semanas 12 a 16. El procedimiento y el uso, así como la aplicación del equipo de reactivos, pueden incluir la toma de varias muestras a lo largo de un periodo de tiempo y la determinación, con el ensayo específico a la ESM-1, la o las

5 cantidades de ESM-1 o de valores derivados de la misma, como proporciones de valores. De manera alternativa o adicional, la cuantificación de una cuantificación indirecta; por ejemplo, por una reacción cromática que puede depender de la concentración (cantidad). En función del color, puede hacerse una predicción sobre una hembra embarazada de si es probable que tenga o desarrolle preeclampsia, eclampsia y HELLP (hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia) y/o restricción del crecimiento intrauterino (RCIU).

10 Además, o alternativamente, pueden determinarse o proporcionarse valores de referencia —por ejemplo, en un manual (en Internet)— en función de los cuales pueda determinarse si la hembra embarazada tiene o es probable que desarrolle uno de los síndromes anteriormente mencionados. Cuando se compara el valor obtenido de la hembra con un valor de referencia, o varios valores de referencia cuando se determina más de un parámetro, puede predecirse el estado de la probabilidad. Por ende, el manual y/o los datos de referencia pueden ser remotos, estando, por ejemplo, en Internet. El usuario puede derivar los datos de Internet.

15 La medición puede realizarse usando un procedimiento para cuantificar la cantidad de proteína a través de la cantidad de ARN que codifica dicha proteína. Por ende, en una realización dicha etapa de medición o dichas etapas de medición se efectúan usando un procedimiento para cuantificar la cantidad de proteína a través de la cantidad de ARN que codifica dicha proteína. Además, adicional o alternativamente, dicha cuantificación puede realizarse a través de RT-PCR, PCR, hibridación u otros medios para determinar la cantidad de nucleótidos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* para identificar, a partir de una muestra de líquido biológico de una hembra embarazada, un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado entre el grupo que consiste en la preeclampsia de inicio precoz, la eclampsia y hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia (HELLP), incluyendo el procedimiento
- (i) medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica, procediendo la muestra biológica de la hembra embarazada en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación;
- (ii) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, y
- 10 (iii) identificar, en función de la comparación de la cantidad de ESM-1 con el valor de referencia, si es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo,
- comprendiendo dicha muestra de líquido biológico una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero de dicha hembra embarazada.
2. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el valor de referencia es la cantidad de ESM-1 en las muestras biológicas de hembras embarazadas que tienen un embarazo sano.
- 15 3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicha muestra de líquido biológico procede de una hembra embarazada que se encuentra en una semana cualquiera de gestación entre las semanas 12 a 16 de gestación, y en el que dicha muestra de líquido biológico comprende una muestra de plasma y en el que se evalúa que la hembra embarazada tiene el síndrome relacionado con el embarazo cuando el valor de ESM-1 se encuentra en el intervalo de 410 ± 355 pg/ml.
- 20 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la cantidad de ESM-1 de la muestra de líquido biológico de la hembra embarazada es indicativa del síndrome relacionado con el embarazo cuando la cantidad es igual o menor que el 70% de la cantidad de ESM-1 en muestras de líquidos biológicos de hembras embarazadas que tienen un embarazo sano.
- 25 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que, además, comprende el uso de un ensayo específico a la ESM-1, en el que el ensayo comprende un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), un ensayo turbidimétrico, un ensayo de radioinmunoabsorción (RIST), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunofluorescencia directa o indirecta, un inmunoensayo en gel de partículas (PaGIA) o un ensayo de flujo lateral, especialmente en el que el ensayo comprende uno o más de un ensayo ELISA, un ensayo de flujo lateral, un ensayo enzimático, un ensayo colorimétrico y un ensayo
- 30 luminiscente, y/o en el que la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica incluye el uso de espectrometría de masa (MS); comprendiendo el procedimiento, además, la etapa del estudio Doppler de la arteria uterina y de deducir del mismo información sobre la placentación.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicha cantidad de ESM-1 es el nivel de ESM-1 libre en la muestra biológica.
- 35 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que una o más de (a) la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica comprende un procedimiento para realizar una cuantificación del ARN que codifica la ESM-1 en células o del ARN libre de células en la muestra biológica, y (b) la medición de la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica comprende un procedimiento para cuantificar la cantidad de proteína a través de la cantidad de ARN que codifica la ESM-1; y en el que dicha cuantificación es mediante RT-PCR, PCR, hibridación u otros medios de determinación de la cantidad de nucleótidos.
- 40 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que, además, comprende:
- (iv) usar un marcador secundario seleccionado del grupo que consiste en tirosina quinasa-1 de tipo Fms soluble (sFit1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PIGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), endoglina soluble, proteína placentaria 13 (pp-13), proteína A de plasma asociada al embarazo (PAPP-A), factor 15 de diferenciación de crecimiento (GDF-15), pikachurina y una hemopexina,
- 45 (v) usar opcionalmente un ensayo específico para el marcador secundario y medir la cantidad de marcador secundario en la muestra biológica y, opcionalmente, comparar dicha cantidad de dicho marcador secundario con un valor de referencia del marcador secundario,
- 50 comprendiendo el procedimiento, además, la identificación de que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, y en función de una comparación de la cantidad de dichos uno o más marcadores secundarios con el correspondiente valor de referencia del marcador secundario, y comprendiendo el procedimiento, además, la determinación de una proporción entre la cantidad de ESM-1 y la cantidad del
- 55 marcador secundario, la selección de un valor de referencia de proporción, y la comparación de la proporción

con el valor de referencia de proporción, y comprendiendo el procedimiento, además, la identificación de que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación de la cantidad de ESM-1 con un valor de referencia, y en función de una comparación de la proporción entre la cantidad de ESM-1 y la cantidad del marcador secundario con la proporción del valor de referencia.

- 5
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el procedimiento la provisión de una primera muestra biológica de una hembra extraída en una primera ocasión, y la provisión de una segunda muestra biológica de la hembra extraída en una segunda ocasión, usando un ensayo específico a la ESM-1, la medición de la cantidad de ESM-1 en la primera muestra biológica que constituye una primera cantidad, el uso de un ensayo específico a la ESM-1, la medición de la cantidad de ESM-1 en la segunda muestra biológica y que constituye una segunda cantidad, y comprendiendo el procedimiento, además, identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función de una comparación entre la primera cantidad y la segunda cantidad.
10. Un dispositivo para identificar a una hembra embarazada que se encuentre en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación que es probable que tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en la preeclampsia de inicio precoz, la eclampsia y HELLP, comprendiendo dicho dispositivo (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 que sea, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor (recombinante) de la ESM-1 o un aptámero que permita la determinación de la cantidad de ESM-1; (b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados los algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con un valor de referencia almacenado en una base de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia de inicio precoz, eclampsia y/o HELLP.
11. El dispositivo según la reivindicación 10 que, además, comprende una unidad de análisis que comprende un agente de detección de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15, que permite la determinación de la cantidad de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15, y una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementados los algoritmos necesarios para comparar la cantidad de sFlt1, VEGF, PlGF, HGF, sEndoglin, pp-13, PAPP-A o GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle preeclampsia de inicio precoz, eclampsia y/o HELLP, y en el que dicha unidad de evaluación es también capaz de dar recomendaciones terapéuticas.
12. El uso de una evaluación de la cantidad de ESM-1 en una muestra de líquido biológico extraída de una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación para identificar si es probable que la hembra embarazada tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia de inicio precoz, eclampsia y HELLP, en el que dicha muestra de líquido biológico comprende una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero de dicha hembra embarazada.
13. El uso *in vitro* de muestra de líquido biológico extraída de una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación para identificar si es probable que la hembra embarazada tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia de inicio precoz, eclampsia y HELLP, comprendiendo el uso: (a) medir la cantidad de ESM-1 en la muestra biológica, usando especialmente un ensayo específico a la ESM-1; (b) comparar dicha cantidad de ESM-1 con un valor de referencia; y (c) identificar que es probable que la hembra tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo, en el que dicha muestra de líquido biológico comprende una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero de dicha hembra embarazada.
14. Un equipo de reactivos para identificar si es probable que una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia de inicio precoz, eclampsia y HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1; (b) una unidad de evaluación para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo en función del resultado proporcionado por la unidad de análisis, comprendiendo la unidad de evaluación un procesador de datos que tiene implementados los algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo.
15. Un equipo de reactivos para identificar si es probable que una hembra embarazada que se encuentra en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación tenga o desarrolle un síndrome relacionado con el embarazo seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia de inicio precoz, eclampsia y HELLP, comprendiendo dicho equipo de reactivos: (a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 y de

- 5 uno o más de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15; (b) una unidad de evaluación para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo, en función de un resultado proporcionado por la unidad de análisis, comprendiendo la unidad de evaluación un procesador de datos que tiene implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1, y de uno o más de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos y calcular la proporción entre los marcadores medidos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo.
- 10 **16.** El equipo de reactivos según una cualquiera de las reivindicaciones 14-15 que, además, comprende un manual o una referencia a un manual, incluyendo el manual instrucciones de cómo extraer una muestra de líquido biológico de una hembra embarazada y/o de cómo usar la unidad de análisis y/o de cómo usar la unidad de evaluación, incluyendo el manual información para extraer una muestra de líquido biológico de una hembra embarazada en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación, especialmente las semanas 12-16 de gestación, y en el que la unidad de evaluación comprende un esquema de colores, en el que la unidad de análisis está configurada para proporcionar una reacción cromática, dependiendo el color de la cantidad de ESM-1 en una muestra biológica extraída de una hembra embarazada, en el que dicha muestra de líquido biológico comprende una muestra de sangre, una muestra de plasma, o una muestra de suero de dicha hembra embarazada.
- 15 **17.** El equipo de reactivos según una cualquiera de las reivindicaciones 15-16 que comprende
- 20 (i) una unidad de análisis que comprende un agente de detección de la ESM-1 y de uno o más de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15, comprendiendo la unidad de análisis, especialmente, un agente de detección de la ESM-1 y un agente de detección de uno o más de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A y GDF-15, que permite la determinación de la cantidad de ESM-1, y de uno o más de sFlt1, VEGF, PIGF, HGF, sEndoglina, pp-13, PAPP-A o GDF-15, en el que
- 25 (a) la unidad de análisis comprende un ensayo, comprendiendo especialmente la unidad de análisis un ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), un ensayo turbidimétrico, un ensayo de radioinmunoabsorción (RIST), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunofluorescencia directa o indirecta, un inmunoensayo en gel de partículas (PaGIA) o un ensayo de flujo lateral; o
- 30 (b) la unidad de análisis comprende un procedimiento para realizar una cuantificación del ARN que codifica la ESM-1 en células o del ARN libre de células en la muestra biológica, y
- 35 (ii) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo, especialmente un procesador de datos que tenga implementados algoritmos necesarios para comparar la cantidad de ESM-1 determinada con valores de referencia almacenados en una base de datos para determinar si es probable que una hembra embarazada tenga o desarrolle el síndrome relacionado con el embarazo.
- 40 **18.** El uso de un equipo de reactivos según una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para predecir que una hembra embarazada en una cualquiera de las semanas 9-16 de gestación va a desarrollar, después de la semana 20, preeclampsia de inicio precoz severa, en función de una medición de la cantidad de ESM-1 en una muestra de líquido biológico de la hembra embarazada, en el que la muestra de líquido biológico comprende una muestra de sangre, una muestra de plasma, o una muestra de suero de dicha hembra embarazada.

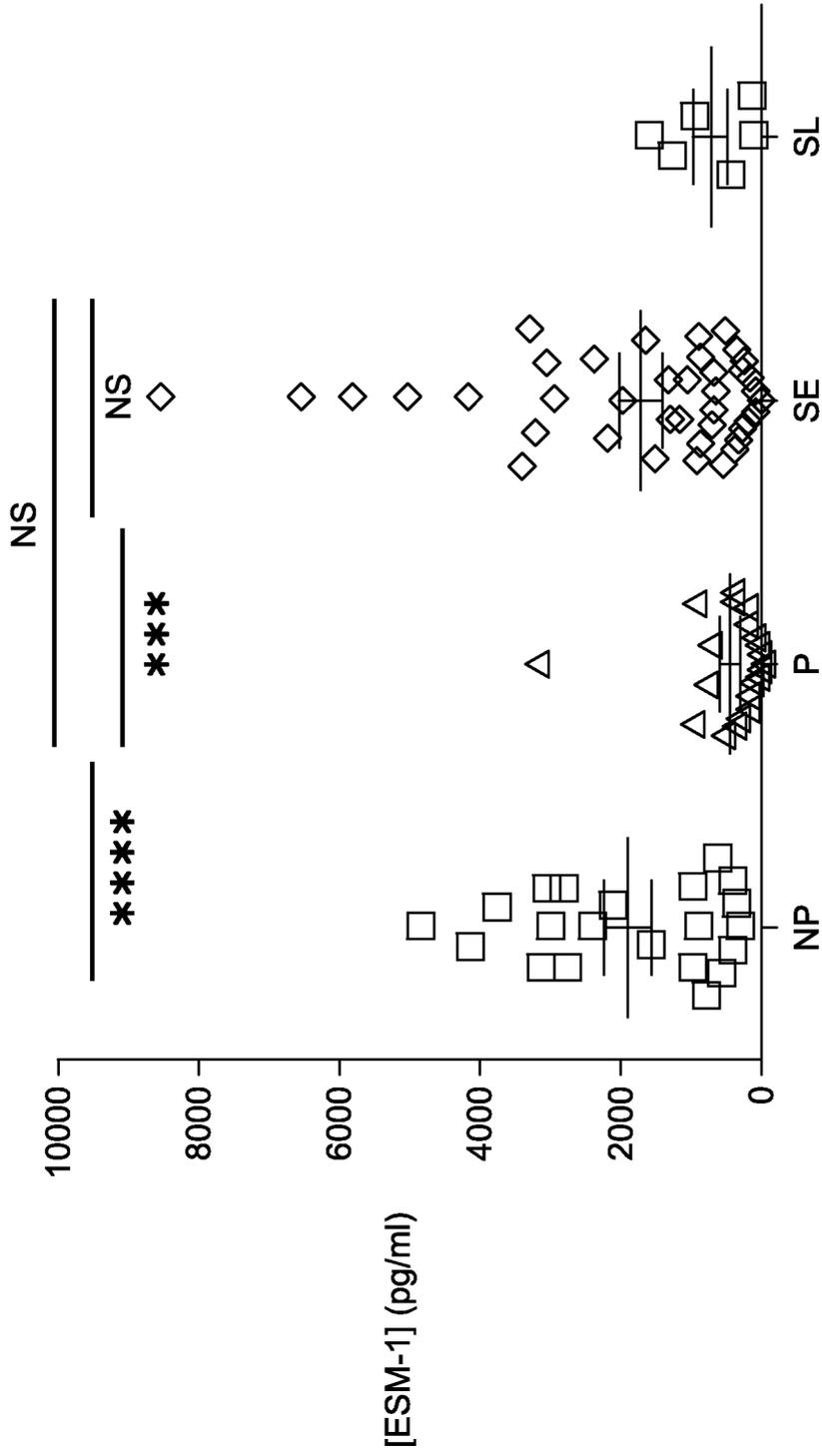


FIG. 1

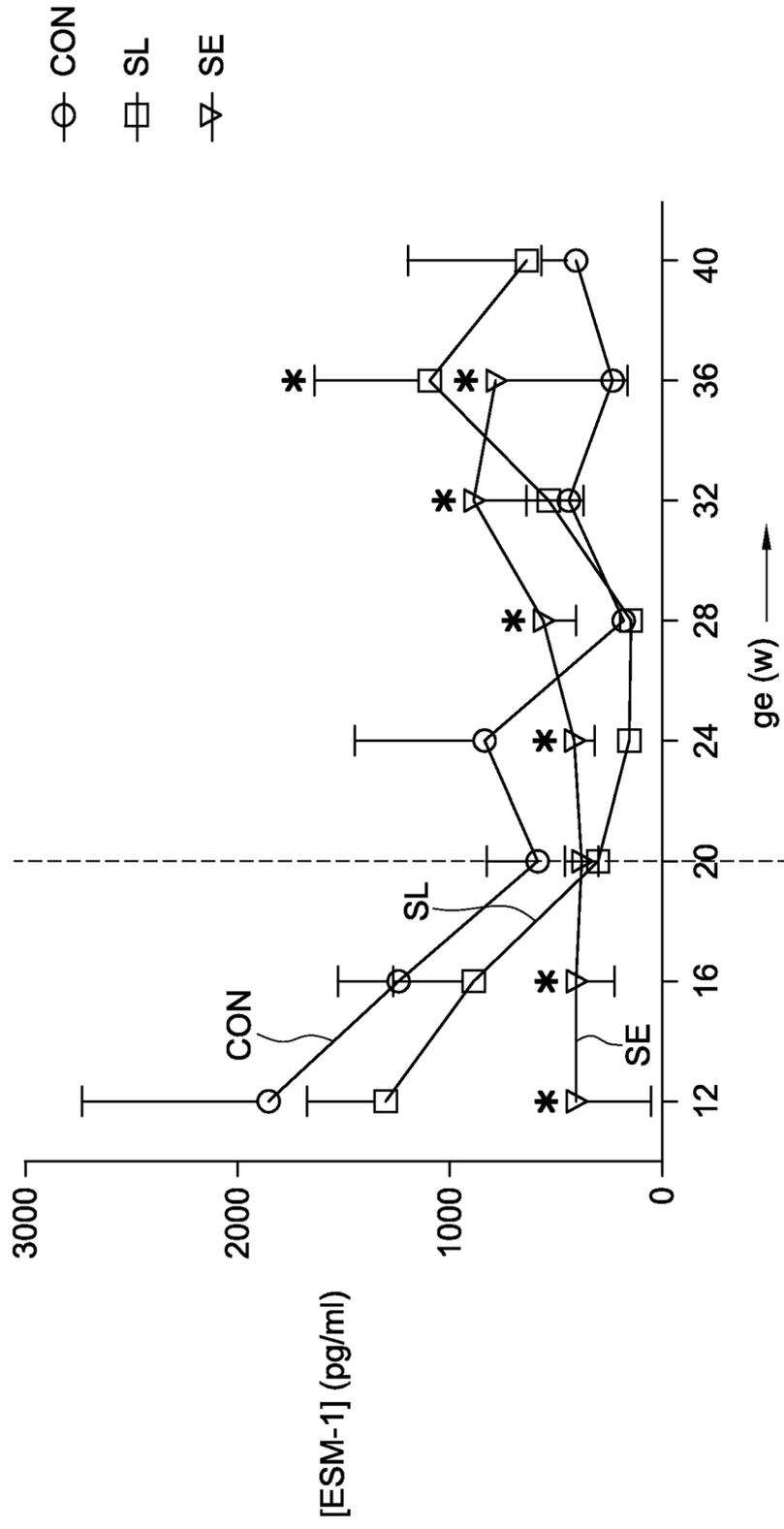


FIG. 2