

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.07.21	(73) Titular(es): BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER 330 BROOKLINE AVENUE BOSTON, MA 02215 US
(30) Prioridade(s): 2002.07.19 US 397481 P 2003.03.03 US 451796 P 2003.05.02 US 467390 P	(72) Inventor(es): ANANTH S.KARUMANCHI US SHARON MAYNARD US VIKAS P. SUKHATME US
(43) Data de publicação do pedido: 2005.09.21	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2013.10.02 005/2014	

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO E O TRATAMENTO DE PRÉ-ECLÂMPsia OU ECLÂMPsia**

(57) Resumo:

SÃO AQUI REVELADOS MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE PRÉ-ECLÂMPsia E ECLÂMPsia. TAMBÉM SÃO AQUI REVELADOS MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE PRÉ-ECLÂMPsia E ECLÂMPsia UTILIZANDO COMPOSTOS QUE AUMENTAM OS NÍVEIS DE VEGF OU PIGF OU COMPOSTOS QUE REDUZEM OS NÍVEIS DE SFLT-1. TAMBÉM SÃO REVELADOS COMPOSTOS QUE INIBEM A LIGAÇÃO DE VEGF OU PIGF A SFLT-1, PARA O TRATAMENTO DE PRÉ-ECLÂMPsia E ECLÂMPsia.

RESUMO

"MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO E O TRATAMENTO DE PRÉ-ECLÂMPsia OU ECLÂMPsia"

São aqui revelados métodos para o diagnóstico de pré-eclâmpsia e eclâmpsia. Também são aqui revelados métodos para o tratamento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia utilizando compostos que aumentam os níveis de VEGF ou PlGF ou compostos que reduzem os níveis de sFlt-1. Também são revelados compostos que inibem a ligação de VEGF ou PlGF a sFlt-1, para o tratamento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO E O TRATAMENTO DE PRÉ-ECLÂMPسيا OU ECLÂMPسيا"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à detecção e ao tratamento de pacientes que sofrem de pré-eclâmpسيا ou eclâmpسيا.

Antecedentes da Invenção

Pré-eclâmpسيا é um síndrome de hipertensão edema e proteinúria que afeta 5 a 10% das gravidezes e resulta numa substancial morbidez e mortalidade materna e fetal. A pré-eclâmpسيا é responsável por no mínimo 200.000 mortes maternas mundialmente por ano. Os sintomas da pré-eclâmpسيا aparecem tipicamente depois da 20^a semana de gravidez e são geralmente detetados através da monitoração de rotina da pressão sanguínea e da urina da mulher. No entanto estes métodos de monitoração são ineficazes para o diagnóstico do síndrome num estágio inicial, o que poderia reduzir o risco para a paciente ou para o feto em desenvolvimento, caso estivesse disponível um tratamento eficaz.

Atualmente não existem curas conhecidas para a pré-eclâmpسيا. A pré-eclâmpسيا pode variar de gravidade leve até risco de vida. Uma forma leve da pré-eclâmpسيا pode ser tratada com repouso e monitoração frequente. Para casos moderados a graves, é recomendado a hospitalização e é prescrita medicação para pressão sanguínea ou medicações anticonvulsivas para evitar ataques. Se a condição vier a apresentar risco para a vida da mãe ou do bebé, a gravidez é terminada e o parto do bebé é realizado antes do termo.

O desenvolvimento adequado do feto e da placenta é mediado por vários fatores de crescimento. Um destes fatores de crescimento é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é um mitógeno específico das células endoteliais, um indutor angiogénico e um mediador da permeabilidade vascular. Também foi demonstrado que o VEGF é importante para a restauração capilar glomerular. O VEGF liga-se, como um homodímero, a um de dois recetores homólogos da tirosina quinase estendendo sobre a membrana, a tirosina quinase semelhante a *fms* (Flt-1, N.T. em inglês, fms-like tyrosine kinase) e o recetor do domínio quinase (KDR, N.T. em inglês, kinase domain recetor), os quais são expressos diferencialmente em células endoteliais obtidas de muitos tecidos diferentes. Flt-1, mas não KDR, é altamente expressa por células de trofoblastos, as quais contribuem para a formação placentária. O fator de crescimento placentário (PlGF) é um membro da família de VEGF que também está envolvido no desenvolvimento placentário. O PlGF é expresso por citotrofoblastos e sincitiotrofoblastos e é capaz de induzir a proliferação, migração e ativação de células endoteliais. O PlGF liga-se como um homodímero ao recetor Flt-1, mas não ao recetor KDR. Tanto PlGF quanto VEGF contribuem para a atividade mitogénica e a angiogénese que são cruciais para a placenta em desenvolvimento.

Uma forma solúvel do recetor Flt-1 (sFlt-1) foi recentemente identificada em meio de cultura de células endoteliais da veia umbilical humana e a expressão *in vivo* foi em seguida demonstrada em tecido placentário. sFlt-1 é uma variante de união do recetor Flt-1 a qual carece dos domínios transmembrana e citoplásmico. sFlt-1 liga-se a VEGF com uma elevada afinidade mas não estimula a mitogénese de células endoteliais. Acredita-se que sFlt-1 atue como um "dissipador fisiológico" para regular para

baixo os caminhos de sinalização de VEGF. A regulação dos níveis de sFlt-1 funciona através da modulação de VEGF e a sinalização de VEGF. A cuidadosa regulação dos caminhos de sinalização VEGF e PlGF é crucial para a manutenção de proliferação, migração e angiogénese apropriadas por células de trofoblastos na placenta em desenvolvimento. Existe a necessidade de métodos para diagnosticar de modo preciso em pacientes em risco para ou tendo pré-eclâmpsia, particularmente antes do início dos sintomas mais graves. Também é necessário um tratamento.

Vuorela et al. revelam que pré-eclâmpsia está associada com níveis aumentados de sVEGFR, ou seja, sFlt-1 no fluido amniótico no terceiro trimestre ("Amniotic Fluid-Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Preeclampsia", OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol.95, no. 3, Março 2000 (2000-03), páginas 353-357).

Zhou et al. revelam que os citotrofoblastos de placentas de mulheres com pré-eclâmpsia grave libertam, aproximadamente, o dobro da quantidade de sFlt-1 em relação aos controlos ("Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome." AM J PHATOL, vol. 160, no. 4, Abril 2002 (2002-04), páginas 1405-1423).

Polliotti et al. revelam que PlGF no soro, no segundo trimestre da gravidez, é menor em pré-eclâmpsia do que nos controlos ("Second trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, earlyonset preeclampsia" OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 101, no. 6, Junho 2003 (2003-06), páginas 1266-1274).

Taylor et al. revelam que os níveis de PIGF livre no soro diminuem em pré-eclâmpsia, logo cedo, nas 15-19 semanas de gestação ("Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: Evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 188, no.1, 1 Janeiro 2003 (2003-01-01), páginas 177- 182)

Sumário da Invenção

Foi descoberto um meio para o diagnóstico e o tratamento de modo eficaz de pré-eclâmpsia e eclâmpsia antes do desenvolvimento de sintomas.

Utilizando a análise da expressão genética, foi descoberto que os níveis de sFlt-1 estão acentuadamente elevados em amostras de tecido placentário de mulheres grávidas que estejam a sofrer de pré-eclâmpsia. Sabe-se que, a sFlt-1 antagoniza VEGF e PlGF atuando como um "dissipador fisiológico" e em mulheres pré-eclâmpticas ou eclâmpticas, sFlt-1 pode estar a esgotar a placenta das quantidades necessárias destes fatores essenciais angiogénicos e mitogénicos. O excesso de sFlt-1 também pode levar a eclâmpsia a romper as células endoteliais que mantêm a barreira sanguínea do cérebro e/ou células endoteliais, que revestem o plexo coróide do cérebro, deste modo levando a um edema cerebral e aos ataques vistos na eclâmpsia. Na presente invenção, os compostos que aumentam os níveis de VEGF e PlGF são administrados a uma paciente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia opondo-se aos efeitos de elevada sFlt-1. Além disso, os anticorpos orientados para sFlt-1 são utilizados para inibir competitivamente a ligação de VEGF ou PlGF a sFlt-1, aumentando deste modo os níveis de VEGF e PlGF livres. ARN de interferência e oligómeros de nucleobase anti-sentido também são utilizados

para reduzir os níveis de sFlt-1. Finalmente, a presente invenção proporciona a aplicação e a monitoração de sFlt-1, VEGF e PlGF como ferramentas de detecção para o diagnóstico e o tratamento precoces de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, ou uma predisposição para as mesmas.

Por conseguinte, num aspeto, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente, administrando à paciente um composto capaz de ligar a sFlt-1, onde a administração é durante um tempo e uma quantidade suficiente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente.

Num aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente, administrando à paciente um composto (por exemplo, nicotina, teofilina, adenosina, Nifedipina, Minoxidil, ou Sulfato de Magnésio) que aumenta o nível de um fator de crescimento capaz de se ligar a sFlt-1, onde a administração é durante um tempo e numa quantidade suficiente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente.

Noutro aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente, administrando um anticorpo sFlt-1 purificado ou fragmento de ligação antigénica do mesmo à paciente durante um tempo e numa quantidade suficiente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente.

Ainda noutro aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente, administrando à paciente um oligómero de nucleobase anti-sentido complementar a, no mínimo, uma porção de uma sequência de ácidos nucleicos sFlt-1, onde a

administração é suficiente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. Numa modalidade, o oligómero de nucleobase anti-sentido tem 8 a 30 nucleotídeos de comprimento.

Noutro aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. O método envolve a etapa de administrar à paciente um ARN de cadeia dupla (dsARN) que contém, no mínimo, uma porção de uma sequência de ácidos nucleicos sFlt-1, onde a administração é suficiente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia na paciente. Numa modalidade, o ARN de cadeia dupla é processado em pequenos ARNs interferentes (siARNs) de 19 a 25 nucleotídeos de comprimento.

Em várias formas de realização dos aspetos acima, o composto candidato é um fator de crescimento, tal como, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inclusive todas as isoformas, tais como, VEGF189, VEGF121, ou VEGF165; fator de crescimento placentário (PlGF), inclusive todas as isoformas; ou fragmentos dos mesmos. Em formas de realização preferenciais, o composto candidato é um anticorpo que se liga a sFlt-1. Noutras formas de realização dos aspetos acima, o método envolve adicionalmente administrar a uma paciente um composto anti-hipertensivo. Em ainda outras formas de realização dos aspetos acima, a paciente é uma mulher grávida, uma mulher em pós-parto, ou é não-humana (por exemplo, uma vaca, uma égua, uma ovelha, uma porca, uma cabra, uma cadela, ou uma gata).

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. O método envolve administrar a uma paciente, que necessite de semelhante

tratamento, uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo VEGF ou PlGF. Numa forma de realização, a composição contém um polipeptídeo VEGF. Noutra forma de realização, a composição contém um polipeptídeo PlGF.

Num aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Este método envolve administrar a uma paciente que necessite de semelhante tratamento uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula de ácido nucléico codificando VEGF ou PlGF. Numa forma de realização, a composição contém uma molécula de ácido nucléico VEGF. Noutra forma de realização, a composição contém uma molécula de ácido nucléico PlGF.

Noutro aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. O método envolve a etapa de administrar à paciente um composto (por exemplo, composto químico, polipeptídeo, peptídeo, anticorpo, ou um fragmento do mesmo) que inibe a ligação do fator de crescimento a um polipeptídeo sFlt-1, onde a administração é suficiente para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. Numa forma de realização, o composto liga-se a sFlt-1 e bloqueia a ligação do fator de crescimento.

Em várias formas de realização dos aspetos acima, o método envolve, adicionalmente, a etapa de administrar a uma paciente um composto anti-hipertensivo (por exemplo, adenosina, Nifedipina, Minoxidil e Sulfato de Magnésio). Noutras formas de realização dos aspetos acima, a paciente é uma mulher grávida, uma mulher no pós-parto, ou não é humana (por exemplo, uma vaca, uma égua, uma ovelha, uma porca, uma cabra, uma cadela, ou uma gata).

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para diagnosticar uma paciente como tendo, ou tendo uma tendência a desenvolver, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, o método envolve medir o nível de polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF numa amostra da paciente.

Num aspeto relacionado, a invenção proporciona um método para diagnosticar uma paciente como tendo, ou tendo uma tendência a desenvolver, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, determinando os níveis de, no mínimo, dois dos polipeptídeos sFlt-1, VEGF, ou PlGF numa amostra de uma paciente e calculando a relação entre os níveis de sFlt-1 VEGF ou PlGF utilizando uma métrica, onde uma alteração na amostra da paciente com relação a uma referência diagnostica pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. Numa forma de realização, a métrica é um índice antiangiogénico de pré-eclâmpsia (PAAI): $[sFlt-1/VEGF + PlGF]$, onde o PAAI é utilizado como um indicador de atividade antiangiogénica. Numa forma de realização, um PAAI maior do que 20 é indicativo de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Noutra forma de realização, os níveis de polipeptídeo sFlt-1, VEGF ou PlGF são determinados por um ensaio imunológico, tal como, ELISA.

Em várias formas de realização dos aspetos acima, a amostra é um fluido corporal, tal como, soro ou urina. Numa forma de realização, um nível de sFlt-1 maior do que 2 ng/mL é indicativo de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Em formas de realização preferenciais dos aspetos acima, o nível de polipeptídeo sFlt-1 medido é o nível de polipeptídeo sFlt-1 livre, ligado ou total. Noutras formas de realização preferenciais dos aspetos acima, o nível de VEGF ou PlGF é o nível de VEGF ou PlGF livres.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para diagnosticar uma paciente como tendo, ou tendo uma tendência a desenvolver, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Este método envolve medir o nível de molécula de ácido nucleico sFlt-1, VEGF ou PlGF numa amostra da paciente e comparar a mesma com uma amostra de referência, onde uma alteração nos níveis diagnostica pré-eclâmpsia ou eclâmpsia na paciente, ou diagnostica uma tendência a desenvolver pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para diagnosticar uma paciente como tendo, ou tendo uma tendência a desenvolver, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Este método envolve determinar a sequência de ácidos nucleicos de um gene sFlt-1, VEGF ou PlGF numa paciente e comparar a mesma com uma sequência de referência, onde uma alteração na sequência de ácidos nucleicos da paciente que muda o nível de produto genético na paciente diagnostica a paciente com pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, ou uma tendência a desenvolver pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Numa forma de realização, a alteração é um polimorfismo na sequência de ácidos nucleicos.

Em várias formas de realização dos aspetos acima, a amostra é um fluido corporal (por exemplo, urina, líquido amniótico, soro, plasma, ou fluido cerebrospinal) da paciente na qual o sFlt-1, VEGF, ou PlGF é normalmente detetável. Em formas de realização adicionais, a amostra é um tecido ou uma célula. Exemplos não-limitantes incluem tecido placentário ou células placentárias, células endoteliais e leucócitos (por exemplo, monócitos). Noutras formas de realização dos aspetos acima, a paciente é uma mulher não-grávida, uma mulher grávida, ou uma mulher em pós-parto. Noutras formas de realização dos aspetos acima, a paciente é não-humana (por exemplo, uma vaca, uma égua,

uma ovelha, uma porca, uma cabra, uma cadela, ou uma gata). Noutras formas de realização dos aspetos acima, no mínimo, um dos níveis medido é o nível de sFlt-1 (livre, ligado, ou total). Noutras formas de realização dos aspetos acima, quando o nível de VEGF é medido então o nível de sFlt-1 ou PlGF também é medido. Em várias formas de realização dos aspetos acima, um aumento no nível de ácido nucleico ou polipeptídeo sFlt-1 com relação a uma referência é um indicador diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Noutras formas de realização dos aspetos acima, uma redução no nível de ácido nucleico VEGF ou polipeptídeo VEGF livre com relação a uma referência é um indicador diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Noutras formas de realização dos aspetos acima, uma redução no nível de ácido nucleico PlGF ou polipeptídeo PlGF livre com relação a uma referência é um indicador diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Em formas de realização adicionais dos aspetos acima, os níveis são medidos em duas ou mais ocasiões e uma alteração nos níveis entre as medições é um indicador diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Numa forma de realização preferencial, o nível de sFlt-1 aumenta da primeira medição para a medição seguinte. Noutra forma de realização preferencial, o nível de VEGF ou PlGF diminui da primeira medição para a medição seguinte.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um kit de diagnóstico para o diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos, ou fragmento da mesma, selecionada entre o grupo consistindo em molécula de ácido nucleico sFlt-1, VEGF e PlGF, ou uma sequência complementar à mesma, ou qualquer combinação das mesmas. Numa forma de realização preferencial, o kit compreende no mínimo duas sondas para a

deteção de uma molécula de ácido nucléico sFlt-1, VEGF, ou PlGF.

Num aspeto relacionado, a invenção proporciona um kit para o diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente compreendendo um meio de deteção de um polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF e qualquer combinação dos mesmos. Numa forma de realização, o meio de deteção é selecionado entre o grupo consistindo num ensaio imunológico, um ensaio enzimático e um ensaio colorimétrico. Noutras formas de realização dos aspetos acima, o kit diagnostica uma tendência a desenvolver pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente grávida ou uma não-grávida. Em formas de realização preferenciais dos aspetos acima, o kit deteta sFlt-1 ou PlGF. Noutras formas de realização preferenciais dos aspetos acima, quando o kit deteta VEGF, então sFlt-1 ou PlGF também é detetado.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para identificar um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, o método envolve uma célula que expressa uma molécula de ácido nucléico sFlt-1, VEGF, ou PlGF em contato com um composto candidato e a comparação do nível de expressão da molécula de ácido nucléico na célula que está em contato com o composto candidato com o nível de expressão numa célula de controlo que não está em contato com o composto candidato, onde uma alteração na expressão da molécula de ácido nucléico sFlt-1, VEGF, ou PlGF identifica o composto candidato como um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Numa forma de realização, a alteração é uma redução no nível de sFlt-1. Noutras formas de realização, a alteração é um aumento no nível de VEGF ou PlGF. Noutras formas de realização, a alteração é na transcrição ou na translação.

Noutra forma de realização, quando o método identifica um composto candidato que aumenta a expressão de VEGF, o composto candidato também aumenta a expressão de PlGF ou reduz a expressão de sFlt-1.

Noutro aspeto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica incluindo um polipeptídeo VEGF ou PlGF ou porção do mesmo, formulada num veículo farmaceuticamente aceitável.

Num aspeto relacionado, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula de ácido nucléico PlGF, ou porção do mesmo, formulada num veículo farmaceuticamente aceitável. Numa forma de realização, a composição adicionalmente contém uma molécula de ácido nucléico VEGF, ou porção do mesmo.

Noutro aspeto, a invenção proporciona uma composição compreendendo um anticorpo purificado ou fragmento de ligação antigénica do mesmo que se liga, especificamente, a sFlt-1. Numa forma de realização preferencial, o anticorpo evita a ligação de um fator de crescimento a sFlt-1. Noutra forma de realização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Noutras formas de realização preferenciais, o anticorpo ou fragmento de ligação antigénica do mesmo é um anticorpo humano ou humanizado. Noutras formas de realização, o anticorpo carece de uma porção Fc. Em ainda outras formas de realização, o anticorpo é um $F(ab')_2$, um Fab, ou uma estrutura Fv. Noutras formas de realização, o anticorpo ou fragmento de ligação antigénica do mesmo está presente num veículo farmaceuticamente aceitável.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para identificar um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Este método envolve uma célula que expressa um

polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF em contato com um composto candidato e comparar o nível de expressão do polipeptídeo na célula que está em contato com o composto candidato, com o nível de polipeptídeo de expressão numa célula de controlo que não está em contato com o composto candidato, onde uma alteração na expressão do polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF identifica o composto candidato como um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Numa forma de realização, a alteração na expressão é testada utilizando um ensaio imunológico, um ensaio enzimático, ou um imunoensaio. Numa forma de realização, a alteração na expressão é uma redução no nível de sFlt-1. Noutra forma de realização, a alteração na expressão é um aumento no nível de VEGF ou PlGF.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para identificar um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. O método envolve uma célula que expressa um polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF em contato com um composto candidato e comparar a atividade biológica do polipeptídeo na célula que está em contato com o composto candidato com o nível de atividade biológica numa célula de controlo que não está em contato com o composto candidato, onde um aumento na atividade biológica do polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF identifica o composto candidato como um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Numa forma de realização, o aumento na atividade biológica é testado utilizando um ensaio imunológico, um ensaio enzimático, ou um imunoensaio. Numa forma de realização, a alteração na expressão é uma redução na atividade de sFlt-1. Noutra forma de realização, a alteração na expressão é um aumento na atividade de VEGF ou PlGF.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para identificar um composto que melhora pré-eclâmpsia ou

eclâmpsia. O método envolve a deteção da ligação entre um polipeptídeo sFlt-1 e um fator de crescimento na presença de um composto candidato, onde uma redução na ligação, com relação à ligação entre o polipeptídeo sFlt-1 e o fator de crescimento na ausência do composto candidato identifica o composto candidato, como um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Numa forma de realização, o fator de crescimento é VEGF. Noutra forma de realização, o fator de crescimento é PlGF.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para identificar um polipeptídeo, ou fragmento da mesma, que evita a ligação entre um polipeptídeo sFlt-1 e um fator de crescimento. O método envolve detetar ligação entre um polipeptídeo sFlt-1 e um fator de crescimento na presença do polipeptídeo candidato, onde uma redução na ligação, com relação à ligação entre o polipeptídeo sFlt-1 e o fator de crescimento na ausência do polipeptídeo candidato identifica o polipeptídeo candidato como um polipeptídeo que evita a ligação entre um polipeptídeo sFlt-1 e um fator de crescimento. Numa forma de realização, o fator de crescimento é VEGF. Noutra forma de realização, o fator de crescimento é PlGF.

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para identificar um composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, compreendendo a deteção da ligação de um polipeptídeo sFlt-1 e um composto candidato, onde um composto que liga o polipeptídeo sFlt-1 melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Num aspeto relacionado, a invenção proporciona um composto identificado de acordo com o aspeto anterior, onde o composto é um polipeptídeo que se liga especificamente a um polipeptídeo sFlt-1 e evita que o polipeptídeo sFlt-1 ligue

a VEGF ou PlGF. Numa forma de realização preferencial, o polipeptídeo é um anticorpo. Noutra forma de realização preferencial, o polipeptídeo é um fragmento de sFlt-1, VEGF, ou PlGF.

Em formas de realização preferenciais dos aspetos acima, o composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia reduz os níveis de expressão ou atividade biológica de sFlt-1. Em formas de realização preferenciais dos aspetos acima, o composto que melhora pré-eclâmpsia ou eclâmpsia aumenta os níveis de expressão ou atividade biológica de VEGF ou PlGF.

Para os fins da presente invenção, as abreviações e termos seguintes são definidos abaixo.

Por "alteração" é indicada uma mudança (aumento ou redução) nos níveis de expressão de um gene ou polipeptídeo conforme detetado por métodos conhecidos na área técnica, tais como os descritos acima. Conforme aqui utilizado, um aumento ou redução inclui uma mudança de 10% nos níveis de expressão, preferencialmente uma mudança de 25%, mais preferencialmente uma mudança de 40% e ainda mais preferencialmente uma mudança de 50% ou mais, nos níveis de expressão. "Alteração" também pode indicar uma alteração (aumento ou redução) na atividade biológica de quaisquer dos polipeptídeos da invenção (por exemplo, sFlt-1, VEGF, ou PlGF). Exemplos de atividade biológica para PlGF ou VEGF incluem ligação a recetores conforme medido por imunoensaios, testes de ligação de ligante ou análise de plotagem de Scatchard e indução de proliferação ou migração celular conforme medido por marcação BrdU experimentos de contagem celular, ou testes quantitativos para síntese de ADN, tais como, incorporação de ³H-timidina. Exemplos de atividade biológica para sFlt-1 incluem ligação a PlGF e VEGF conforme medido por imunoensaios, testes de ligação de

ligante, ou análise de plotagem de Scatchard. Exemplos adicionais de atividade biológica para cada um dos polipeptídeos são aqui descritos. Conforme aqui utilizado, um aumento ou redução inclui uma mudança de 10% na atividade biológica, preferencialmente uma mudança de 25%, mais preferencialmente uma mudança de 40% e ainda mais preferencialmente uma mudança de 50% ou mais na atividade biológica.

Por "oligómero de nucleobase anti-sentido" é indicado um oligómero de nucleobase, independente do comprimento, que é complementar à cadeia codificante ou ARNm de um gene sFlt-1. Por um "oligómero de nucleobase" é indicado um composto que inclui uma cadeia de, no mínimo, oito nucleobases, preferencialmente, no mínimo, doze e ainda mais preferencialmente, no mínimo, dezesses bases, unidas por grupamentos de ligação. Incluídos nesta definição estão oligonucleotídeos naturais e não-naturais, tanto modificados quanto não-modificados, bem como, oligonucleotídeos miméticos, tais como, ácidos nucléicos de proteínas, ácidos nucléicos travados (*locked*) e ácidos arabinonucleicos. Numerosas nucleobases e grupamentos de ligação podem ser empregues nos oligómeros de nucleobases da invenção, inclusive os descritos nos pedidos de Patente U.S. N^{os}. 20030114412 e 20030114407. O oligómero de nucleobase também pode ser orientado para os locais de início e de paragem translacional. Preferencialmente, o oligómero de nucleobase anti-sentido compreende a partir de cerca de 8 a 30 nucleotídeos. O oligómero de nucleobase anti-sentido também pode conter no mínimo 40, 60, 85, 120, ou mais nucleotídeos consecutivos que são complementares ao ARNm ou ADN de sFlt-1 e pode ser tão comprido quanto o gene ou ARNm de comprimento total.

Por "composto" indica-se qualquer pequena molécula, composto químico, anticorpo, molécula de ácido nucléico, ou polipeptídeo, ou fragmentos dos mesmos.

Por "anticorpo quimérico" indica-se um polipeptídeo compreendendo no mínimo a porção de ligação de antígeno de uma molécula de anticorpo encadeada a no mínimo parte de outra proteína (tipicamente um domínio constante de imunoglobulina).

Por "ARN de cadeia dupla (dsARN)" indica-se uma molécula de ácido ribonucléico consistindo em tanto uma cadeia de sentido quanto uma de anti-sentido. dsARNs são tipicamente utilizados para mediar interferência de ARN.

Por "expressão" indica-se a detecção de um gene ou polipeptídeo por métodos conhecidos na técnica de rotina. Por exemplo, a expressão do polipeptídeo é frequentemente detetada por *Western blotting*, a expressão do ADN é frequentemente detetada por *Southern blotting* ou reação de cadeia polimerase (PCR) e a expressão do ARN é frequentemente detetada por *Northern blotting*, PCR, ou testes de proteção de ARNse.

Por "fragmento" indica-se uma porção de um polipeptídeo ou molécula de ácido nucléico. Esta porção contém, preferencialmente, no mínimo 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, ou 60% de todo o comprimento da molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo de referência. Um fragmento pode conter 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, ou 1000 nucleotídeos ou aminoácidos.

Por "homólogo" indica-se qualquer gene ou sequência de proteína que possui no mínimo 30% de homologia, mais

preferencialmente 40%, 50%, 60%, 70%, 80% e ainda mais preferencialmente 90% ou mais de homologia a um gene ou sequência de proteína conhecidos sobre o comprimento da sequência de comparação. Uma proteína "homóloga" também pode ter, no mínimo, uma atividade biológica da proteína de comparação. Para os polipeptídeos, o comprimento das sequências de comparação geralmente será de, no mínimo, 16 aminoácidos, preferencialmente, no mínimo, 20 aminoácidos, mais preferencialmente, no mínimo, 25 aminoácidos e ainda mais preferencialmente 35 aminoácidos ou mais. Para os ácidos nucleicos, o comprimento das sequências de comparação geralmente será de, no mínimo, 50 nucleotídeos, preferencialmente, no mínimo, 60 nucleotídeos, mais preferencialmente, no mínimo, 75 nucleotídeos e ainda mais preferencialmente, no mínimo, 110 nucleotídeos. "Homologia" também pode ser referir-se a uma substancial similaridade entre um epítotope utilizado para produzir anticorpos e a proteína ou o fragmento da mesma ao qual os anticorpos são dirigidos. Neste caso, homologia refere-se a uma similaridade suficiente para provocar a produção de anticorpos que podem reconhecer especificamente a proteína em questão.

Por "anticorpo humanizado" indica-se uma variante de sequência de aminoácidos de imunoglobulina ou fragmento da mesma que é capaz de ligar-se a um predeterminado antígeno. Normalmente, o anticorpo conterà tanto a cadeia leve, bem como, no mínimo, o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, de articulação, CH2, CH3, ou CH4 da cadeia pesada. O anticorpo humanizado compreende uma região de estrutura (FR) tendo substancialmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e uma região determinante de complementaridade (CDR) tendo substancialmente a sequência

de aminoácidos de uma imunoglobulina não-humana (as sequências de "importação").

De modo geral, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos aminoácidos introduzidos no mesmo, de uma fonte que é não-humana. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de, no mínimo, um e tipicamente dois, domínios variáveis (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) nos quais todos ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às regiões de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as regiões de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado otimamente compreenderá no mínimo uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a região constante de uma imunoglobulina humana.

Por "região determinante de complementaridade (CDR)" indica-se as três sequências hipervariáveis nas regiões variáveis dentro de cada uma das cadeias leve e pesada da imunoglobulina.

Por "região de estrutura (FR)" indica-se as sequências de aminoácidos localizadas em qualquer lado das três sequências hipervariáveis (CDR) das cadeias leve e pesada da imunoglobulina.

As regiões FR e CDR do anticorpo humanizado não precisam corresponder precisamente às sequências parentais, por exemplo, o CDR de importação ou o FR de consenso podem ser mutagenizados por substituição, inserção ou eliminação de, no mínimo, um resíduo de modo que o resíduo CDR ou FR neste local não corresponde ao anticorpo de importação ou ao de consenso. As mutações referidas, no entanto, não serão extensivas. Geralmente, no mínimo 75%, preferencialmente

90% e ainda mais preferencialmente, no mínimo, 95% dos resíduos de anticorpos humanizados corresponderão aos de sequências parentais FR e CDR.

Por "hibridizar" indica-se paridade para formar uma molécula de cadeia dupla entre sequências de polinucleotídeos complementares, ou porções da mesma, sob várias condições de estringência. (Ver, por exemplo, Wahl e Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, *Methods Enzymol.* 152:507, 1987.) Por exemplo, a concentração salina estrigente normalmente terá menos de cerca de 750 mM de NaCl e 75 mM de citrato trissódico, preferencialmente menos de cerca de 500 mM de NaCl e 50 mM de citrato trissódico e ainda mais preferencialmente menos de cerca de 250 mM de NaCl e 25 mM de citrato trissódico. Pode ser obtida hibridização de baixa estringência na ausência de solvente orgânico, por exemplo, formamida, enquanto hibridização de alta estringência pode ser obtida na presença de, no mínimo, cerca de 35% de formamida e ainda mais preferencialmente no mínimo cerca de 50% de formamida. Condições de temperatura estridentes normalmente incluirão temperaturas de, no mínimo, cerca de 30°C, mais preferencialmente de, no mínimo, cerca de 37°C e ainda mais preferencialmente de, no mínimo, cerca de 42°C. Parâmetros adicionais variáveis, tais como, tempo de hibridização, a concentração de detergente, por exemplo, dodecil sulfato de sódio (SDS) e a inclusão ou exclusão de ADN de veículo, são de conhecimento geral daqueles utilizados na técnica. Vários níveis de estringência são conseguidos combinando estas várias condições conforme necessário. Numa forma de realização preferencial, ocorrerá hibridização a 30°C em 750 mM de NaCl, 75 mM de citrato trissódico e 1% de SDS. Numa forma de realização mais preferencial, ocorrerá hibridização a 37°C e, 500 mM de NaCl, 50 mM de citrato trissódico, 1% de SDS, 35% de formamida e 100 µg/mL de ADN

de espermatozoides de salmão desnaturado (ssADN). Numa forma de realização ainda mais preferencial, ocorrerá hibridização a 42°C em 250 mM de NaCl, 25 mM de citrato trissódico, 1% de SDS, 50% de formamida e 200 µg/mL de ssADN. Variações úteis destas condições serão prontamente evidentes para os peritos na especialidade.

Para a maioria das aplicações, as etapas de lavagem que seguirão a hibridização também variarão em estringência. As condições de estringência de lavagem podem ser definidas pela concentração salina e pela temperatura. Como acima, a estringência de lavagem pode ser aumentada reduzindo a concentração salina ou aumentando a temperatura. Por exemplo, uma concentração salina estrigente para as etapas de lavagem serão preferencialmente menos de cerca de 30 mM de NaCl e 3 mM de citrato trissódico e ainda mais preferencialmente menos de cerca de 15 mM de NaCl e 1,5 mM de citrato trissódico. Condições de temperatura estrigente para as etapas de lavagem geralmente incluirão uma temperatura de, no mínimo, cerca de 25°C, mais preferencialmente de, no mínimo, cerca de 42°C e ainda mais preferencialmente de, no mínimo, cerca de 68°C. Numa forma de realização preferencial, as etapas de lavagem ocorrerão a 25°C em 30 mM de NaCl, 3 mM de citrato trissódico e 0,1% de SDS. Numa forma de realização mais preferencial, as etapas de lavagem ocorrerão a 42°C em 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trissódico e 0,1% de SDS. Numa forma de realização ainda mais preferencial, as etapas de lavagem ocorrerão a 68°C em 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trissódico e 0,1% de SDS. Variações adicionais destas condições serão prontamente evidentes para os peritos na especialidade. As técnicas de hibridização são de conhecimento geral dos peritos na especialidade e são descritas, por exemplo em Benton e Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein e Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*

72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger e Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, New York); and Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Por "atraso do crescimento intrauterino (RCIU)" indica-se um síndrome que resulta num peso ao nascer o qual é menor do que 10 por cento do peso fetal previsto para a idade de gestação do feto. O critério corrente da Organização Mundial de Saúde para o baixo peso ao nascer é um peso menor que 2500 g (5 libras e 8 onças) ou abaixo do 10º percentil para a idade de gestação, de acordo com as tabelas U.S. de peso ao nascer para idade de gestação por raça, paridade e sexo do bebé (Zhang e Bowes, *Obstet. Gynecol.* 86:200-208, 1995). Estes bebés de baixo peso ao nascer também são referidos como "pequenos para a idade de gestação (N.T. em inglês, SGA)". Pré-eclâmpsia é uma condição que se sabe que está associada com RCIU ou SGA.

Por "métrica" indica-se uma medida. Pode ser usada uma métrica, por exemplo, para comparar os níveis de uma molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo de interesse. Métricas típicas incluem, mas não estão limitadas a, fórmulas matemáticas ou algoritmos, tais como, proporções. A métrica a ser utilizada é a que melhor discrimina entre níveis de sFlt-1, VEGF, ou PlGF numa paciente tendo pré-eclâmpsia ou eclâmpsia e uma paciente de controlo normal. Dependendo da métrica que é utilizada, o indicador diagnóstico de eclâmpsia ou pré-eclâmpsia pode estar significativamente acima ou abaixo de um valor de referência (por exemplo, de uma paciente controlo não tendo pré-eclâmpsia ou eclâmpsia).

O nível de sFlt-1 é determinado medindo a quantidade de sFlt-1 livre, ligado (isto é, ligado a fator de crescimento), ou total (ligado + livre). Os níveis de VEGF ou PlGF são determinados medindo a quantidade de PlGF livre ou de VEGF livre (isto é, não ligados a sFlt-1). Uma métrica típica é $[sFlt-1/(VEGF + PlGF)]$, também referida como o índice antiangiogénico pré-eclâmpsia (PAAI).

Por "índice antiangiogénico pré-eclâmpsia (PAAI)" indica-se a proporção de sFlt-1/VEGF + PlGF utilizada como um indicador da atividade antiangiogênica. Um PAAI maior do que 20 é considerado indicativo de pré-eclâmpsia ou risco de pré-eclâmpsia.

Por "ligado operavelmente" indica-se que um gene e uma ou mais sequências regulatórias estão ligadas, de tal maneira, de modo a permitir a expressão genética quando as moléculas apropriadas (por exemplo, proteínas ativadoras transcricionais) são ligadas à sequência ou às sequências regulatórias.

Por "veículo farmacologicamente aceitável" indica-se um veículo que é fisiologicamente aceitável para o mamífero tratado ao mesmo tempo que retendo as propriedades terapêuticas do composto com o qual é administrado. Uma substância típica de veículo farmacologicamente aceitável é salina fisiológica. Outros veículos fisiologicamente aceitáveis e suas formulações são de conhecimento das pessoas versadas na técnica e estão descritos, por exemplo em Remington's Pharmaceutical Sciences, (20th edition) ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Por "placentário fator de crescimento (PlGF)" indica-se um fator de crescimento mamífero que é homólogo à proteína

definida pelo número de acesso do GenBank P49763 e que tem atividade biológica de PlGF. PlGF é um homodímero glicosilado pertencente à família VEGF e pode ser encontrado em duas isoformas distintas através de mecanismos de união alternativos. PlGF é expresso por citotrofoblastos na placenta e atividades biológicas de PlGF incluem indução de proliferação, migração e ativação de células endoteliais, particularmente células trofoblásticas.

Por "pré-eclâmpsia" indica-se o distúrbio multi-sistema que se caracteriza por hipertensão com proteinúria ou edema, ou ambas, disfunção glomerular edema cerebral edema hepático, ou anormalidades da coagulação devidas a gravidez ou a influência de uma gravidez recente. Geralmente pré-eclâmpsia ocorre depois da 20^a semana de gestação. A pré-eclâmpsia é geralmente definida como alguma combinação dos seguintes sintomas: (1) uma pressão sanguínea sistólica (BP) >140 mm Hg e uma pressão sanguínea diastólica (BP) >90 mm Hg depois de 20 semanas de gestação (geralmente medida em duas ocasiões, com 4-168 horas de diferença), (2) novo início de proteinúria (1+ por dipstick na análise urinária, >300mg de proteína numa coleta de urina de 24 horas, ou uma única amostra de urina aleatória tendo uma proporção de proteína/creatinina >0,3) e (3) resolução da hipertensão e da proteinúria por volta de 12 semanas pós-parto. A pré-eclâmpsia severa é geralmente definida como (1) uma pressão sanguínea diastólica BP > 110 mmHg (geralmente medida em duas ocasiões, com 4-168 horas de diferença) ou (2) proteinúria caracterizada por uma medição de 3,5 g ou mais de proteína numa coleta de urina de 24 horas ou duas amostras de urina aleatória com no mínimo 3+ proteína por "dipstick". Na pré-eclâmpsia, geralmente ocorre hipertensão e proteinúria dentro de sete dias uma da outra. Na pré-eclâmpsia severa, hipertensão severa, proteinúria severa e

síndrome de HELLP (hemólise enzimas hepáticas elevadas, baixo teor de plaquetas) ou eclâmpsia podem ocorrer simultaneamente ou somente um sintoma de cada vez. Ocasionalmente, a pré-eclâmpsia severa pode levar ao desenvolvimento de ataques. Esta forma grave de síndrome é referida como "eclâmpsia." Eclâmpsia também pode incluir disfunção ou lesão de vários órgãos ou tecidos, tais como, o fígado (por exemplo, lesão hepatocelular, necrose periportal) e o sistema nervoso central (por exemplo edema cerebral e hemorragia cerebral). Acredita-se que a etiologia dos ataques seja secundária ao desenvolvimento de edema cerebral e espasmo focal de pequenos vasos sanguíneos no rim.

Por "proteína" ou "polipeptídeo" ou "fragmento de polipeptídeo" indica-se qualquer cadeia de mais de dois aminoácidos, independente de modificação pós-translacional (por exemplo, glicosilação ou fosforilação), constituindo todo ou parte de um polipeptídeo ou peptídeo que não-ocorre naturalmente, ou constituindo um polipeptídeo ou peptídeo que não-ocorre naturalmente.

Por "reduzir ou inibir" indica-se a capacidade para causar uma redução global preferencialmente de 20% ou mais, mais preferencialmente de 50% ou mais e ainda mais preferencialmente de 75% ou mais, no nível de proteína ou ácido nucléico, detetada pelos testes supracitados (ver a "expressão"), quando comparado a amostras não-tratadas com oligómeros de nucleobase anti-sentido ou dsARN utilizados para interferência de ARN.

Por "pequenos ARNs interferentes (siARNs)" indica-se uma molécula de dsARN isolada, preferencialmente maior do que 10 nucleotídeos de comprimento, mais preferencialmente maior do que 15 nucleotídeos de comprimento e e mais

preferencialmente maior do que 19 nucleotídeos de comprimento que é utilizada para identificar o gene alvo ou ARNm a ser degradado. Um alcance de 19 a 25 nucleotídeos é o tamanho mais preferencial para siARNs. siARNs também podem incluir ARNs de grampo curto nos quais ambas as cadeias de um siARN duplex estão incluídas dentro de uma única molécula de ARN. siARN inclui qualquer forma de dsARN (produtos clivados proteoliticamente de dsARN maior, ARN parcialmente purificado, ARN essencialmente puro, ARN sintético, ARN produzido de modo recombinante) bem como ARN alterado que difere de ARN que ocorre naturalmente pela adição eliminação, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleotídeos. As alterações referidas podem incluir a adição de material não-nucleotídeo, tal como, a extremidade ou extremidades do ARN 21 a 23 nt ou internamente (em um ou mais nucleotídeos do ARN). Numa forma de realização preferencial, as moléculas de ARN contêm um grupo 3'hidroxila. Os nucleotídeos nas moléculas de ARN da presente invenção também podem compreender nucleotídeos não de rotina, inclusive nucleotídeos que não ocorrem naturalmente ou deoxirribonucleotídeos. Coletivamente, todos os referidos ARNs alterados são referidos como análogos de ARN. Os siARNs da presente invenção somente precisam ser suficientemente semelhantes ao ARN natural pelo fato de terem a capacidade de mediar ARN de interferência (ARNi). Conforme aqui utilizado, ARNi refere-se à clivagem orientada ATP-dependente e degradação de uma molécula de ARNm específica através da introdução de pequenos ARNs ou dsARNs interferentes numa célula ou um organismo. Conforme aqui utilizado "mediar ARNi" refere-se à capacidade para distinguir ou identificar quais ARNs serão degradados.

Por "Flt-1 solúvel (sFlt-1)" (também conhecido como sVEGF-R1) indica-se a forma solúvel do recetor Flt-1, que é

homólogo à proteína definida pelo número de acesso no GenBank U01134 e que tem atividade biológica de sFlt-1. A atividade biológica de um polipeptídeo sFlt-1 pode ser avaliada utilizando qualquer método de rotina, por exemplo, avaliando a ligação de sFlt-1 a VEGF. sFlt-1 carece do domínio transmembrana e do domínio de tirosina quinase citoplásmico do recetor Flt-1. sFlt-1 pode ligar-se a VEGF e PlGF ligam-se com alta afinidade, mas não pode induzir proliferação ou angiogénese e portanto é funcionalmente diferente dos recetores Flt-1 e KDR. sFlt-1 foi inicialmente purificado a partir de células endoteliais umbilicais humanas e posteriormente foi demonstrado que é produzido por células de trofoblasto *in vivo*. Conforme aqui utilizado, sFlt-1 inclui qualquer membro ou isoforma da família sFlt-1.

Por "liga-se especificamente" indica-se um composto ou anticorpo o qual reconhece e liga-se um polipeptídeo da invenção mas que não reconhece substancialmente e liga-se a outras moléculas numa amostra, por exemplo, uma amostra biológica, a qual naturalmente inclui um polipeptídeo da invenção. Num exemplo, um anticorpo que liga-se especificamente a sFlt-1 não se liga a Flt-1.

Por "indivíduo" indica-se um mamífero, inclusive, mas não limitado a, um mamífero humano ou não-humano, tal como um bovino equino, canino, ovino, ou felini. Incluídos nesta definição estão mamíferas grávidas, no pós-parto e não-grávidas.

Por "essencialmente idêntica" indica-se uma sequência de aminoácidos a qual difere somente por substituições de aminoácidos conservadoras, por exemplo, substituição de um aminoácido por outro da mesma classe (por exemplo, valina por glicina, arginina por lisina e etc.) ou por uma ou mais

substituições não-conservadoras, eliminações ou inserções localizadas em posições da sequência de aminoácidos as quais não destróem a função da proteína. Preferencialmente, a sequência de aminoácidos é, no mínimo, 70%, mais preferencialmente, no mínimo, cerca de 80% e ainda mais preferencialmente, no mínimo, cerca de 90% homóloga a outra sequência de aminoácidos. Métodos para determinar identidade estão disponíveis em programas de computador publicamente disponíveis. Métodos de programa de computador para determinar identidade entre duas sequências incluem, mas não estão limitados a, o pacote de programa GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)). Também pode ser utilizado o algoritmo de Smith Waterman conhecido de modo geral para determinar identidade. O programa BLAST está disponível publicamente na NCBI e noutras fontes (*BLAST Manual*, Altschul et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD 20894; BLAST 2.0 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Estes programas de software combinam sequências semelhantes atribuindo graus de semelhança a várias substituições eliminações e outras modificações. Substituições conservadoras tipicamente incluem substituições dentro dos seguintes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; e fenilalanina, tirosina.

Por "sintomas de pré-eclâmpsia" indica-se qualquer um dos seguintes: (1) uma pressão sanguínea sistólica (BP) >140 mmHg e uma pressão sanguínea diastólica BP >90 mmHg depois de 20 semanas de gestação, (2) novo início de proteinúria (1+ por dipstik na análise urinária, >300mg de proteína numa coleta de urina de 24 horas, ou proporção de proteína/creatinina na urina aleatória >0,3) e (3) resolução de hipertensão e proteinúria por volta de 12

semanas após o parto. Os sintomas de pré-eclâmpsia também podem incluir disfunção renal e endoteliose ou hipertrofia glomerular. Por "sintomas de eclâmpsia" indica-se o desenvolvimento de qualquer um dos seguintes sintomas devido a gravidez ou à influência de uma gravidez recente: ataques, coma, trombocitopenia edema hepático edema pulmonar e edema cerebral.

Por "quantidade terapêutica" indica-se uma quantidade que quando administrada a uma paciente que esteja sofrendo de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia é suficiente para causar uma redução qualitativa ou quantitativa nos sintomas de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia conforme aqui descrito. Uma "quantidade terapêutica" também pode significar uma quantidade que quando administrada a uma paciente que esteja sofrendo de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia é suficiente para causar uma redução nos níveis de expressão de sFlt-1 ou um aumento nos níveis de expressão de VEGF ou PlGF conforme medido pelos testes aqui descritos.

Por "tratar" indica-se administrar um composto ou uma composição farmacêutica para fins profiláticos e/ou terapêuticos. "Tratar doença" ou usar para "tratamento terapêutico" refere-se a administrar tratamento a uma paciente que já esteja sofrendo de uma doença para melhorar a condição da paciente. Preferencialmente, a paciente é diagnosticada como sofrendo de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia com base na identificação de qualquer um dos sintomas característicos descritos abaixo ou na aplicação dos métodos diagnósticos aqui descritos. "Prevenir doença" refere-se a tratamento profilático de uma paciente que ainda não esteja doente, mas que seja suscetível a, ou de outro modo em risco de, desenvolver uma doença em particular. Preferencialmente uma paciente é determinada como estando em risco de desenvolver pré-eclâmpsia ou

eclâmpsia utilizando os métodos diagnósticos aqui descritos. Portanto, nas reivindicações e formas de realização, tratar é a administração a um mamífero ou para fins terapêuticos ou profiláticos.

Por "trofoblasto" indica-se a camada de células mesectodérmicas cobrindo o blastocisto que erode a mucosa uterina e através da qual o embrião recebe nutrição da mãe; as células contribuem para a formação da placenta.

Por "fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)" indica-se um fator de crescimento mamífero que é homólogo ao fator de crescimento definido nas Patentes U.S. N^{os} 5.332.671; 5.240.848; 5.194.596; e Charnock-Jones et al. (*Biol. Reproduction*, 48: 1120-1128, 1993) e tem atividade biológica de VEGF. VEGF existe como um homodímero glicosilado e inclui no mínimo quatro isoformas diferentes alternativamente unidas. A atividade biológica de VEGF nativo inclui a promoção do crescimento seletivo de células endoteliais vasculares ou células endoteliais da veia umbilical e indução de angiogénese. Conforme aqui utilizado, VEGF inclui qualquer membro ou isoforma da família de VEGF (por exemplo, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF189, VEGF165, ou VEGF 121). Preferencialmente, VEGF é a isoforma VEGF121 ou VEGF165 (Tischer et al., *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954, 1991; Neufed et al. *Cancer Metastasis* 15:153-158, 1996), a qual é descrita nas Patentes U.S. N^{os}. 6.447.768; 5.219.739; e 5.194.596. Também são incluídas formas mutantes de VEGF, tais como, a VEGF KDR-seletiva e VEGF Flt-seletiva descritas em Gille et al. (*J. Biol. Chem.* 276:3222-3230, 2001). Embora seja preferencial VEGF humana, a invenção não está limitada a formas humanas e pode incluir outras formas

animais de VEGF (por exemplo, camundongo, rato, cachorro, ou frango).

Por "vetor" indica-se uma molécula de ADN, geralmente derivada de um plasmídeo ou bacteriófago, na qual fragmentos de ADN podem ser inseridos ou clonados. Um vetor recombinante conterá um ou mais sítios únicos de restrição e pode ser capaz de replicação autônoma num organismo de veículo ou hospedeiro definido de tal modo que a sequência clonada é reproduzível. Um vetor contém um promotor ligado operavelmente a um gene ou região codificante de tal modo que, na transfecção para uma célula recetora, é expresso um ARN.

Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição das formas de realização preferenciais da mesma e das reivindicações.

Descrição Resumida dos Desenhos

A Figura 1 mostra expressão de ARNm e de proteína sFlt-1 na pré-eclâmpsia. A Figura 1A mostra expressão de ARNm de sFlt-1 placentário de três pacientes com pré-eclâmpsia (P1, P2, P3) e três mulheres grávidas normotensas a termo (N1, N2, N3) conforme determinado por meio de análise *Northern blot*. A maior banda (7,5 kb) é o ARNm flt-1 de comprimento total e a menor banda e mais abundante (3,4 kb) é o ARNm de sFlt-1 alternativamente unido. GAPDH é incluído como um controlo e a ponta da seta indica ARN 28S. As pacientes P1 e P2 tinham pré-eclâmpsia severa, ao passo que a paciente P3 tinha pré-eclâmpsia leve. A Figura 1B é um gráfico que mostra os níveis de sFlt-1 no soro de pacientes com pré-eclâmpsia leve (PE leve), pacientes com pré-eclâmpsia severa (PE severa) e mulheres grávidas normotensas a termo

(normal). Os níveis de sFlt-1 foram medidos por um ELISA realizado para sFlt-1 utilizando um kit disponível comercialmente (R & D Systems, Minneapolis, MN). Pacientes com partos pré-termo por outros motivos (pré-termo) foram incluídas como controlos adicionais para excluir alterações específicas da idade de gestação. O número de pacientes testadas é apresentado entre parênteses no eixo X. Foram colhidas amostras antes do parto ($t=0$) e 48 horas depois do parto ($t=48$). A Figura 1C é um gráfico mostrando proporções do índice anti-angiogénese ($PAAI = sFlt-1 / (VEGF + PlGF)$) proporções por ocasião do parto ($t=0$) conforme determinado por ELISA para todas as pacientes descritas na Figura 1B.

As Figuras 2A-2F são fotomicrografias mostrando o efeito antiangiogénico do excesso de sFlt-1 na pré-eclâmpsia. Foram realizados testes de tubo endotelial utilizando soro de quatro controlos de grávidas normais e quatro pacientes com pré-eclâmpsia. É mostrada uma experiência representativa de uma paciente controlo normal e uma paciente com pré-eclâmpsia. As Figuras 2A, 2B e 2C mostram testes realizados utilizando soro de uma paciente normal enquanto as Figuras 2D, 2E e 2F mostram testes realizados utilizando soro de uma paciente com pré-eclâmpsia. Na Figura 2A, $t=0$ (10% do soro de uma mulher grávida normal a termo); na Figura 2B, $t=48$ (10% do soro de mulher grávida normal 48 horas depois do parto); na Figura 2C, $t=0$ + sFlt-1 exógeno (10 ng/mL); na Figura 2D, $t=0$ (10% do soro de mulher pré-eclâmpica antes do parto); na Figura 2E, $t=48$ (10% do soro de mulher pré-eclâmpica 48 horas depois do parto); e na Figura 2F, $t=0$ + VEGF exógeno (10 ng/mL) + PlGF (10 ng/mL). O teste de tubo foi quantificado e o comprimento médio do tubo $\pm$ SEM é apresentado em pixeis na parte de baixo de cada painel.

As Figuras 3A e 3B são gráficos mostrando que a inibição de VEGF e PlGF induziu vasodilatação de microvasos renais por sFlt-1. A Figura 3A mostra que o aumento nas reações de relaxamento de arteríolas renais de rato para sFlt-1 (S), VEGF (V), PlGF (P) foi medida em três doses diferentes. V+ e P+ representam reações vasodilatadoras dos reagentes individuais na presença de sFlt-1 a 100 ng/mL. Todas as experiências foram realizadas em 6 microvasos renais de ratos dissecados diferentes e os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. O * representa a importância estatística com $p < 0,01$ comparados com reagentes individuais somente. A Figura 3B mostra o aumento nas reações de relaxamento em doses fisiológicas: VEGF 100 pg/mL (V), PlGF 500 pg/mL (P), sFlt-1 10 ng/mL (S), VEGF (100 pg/mL) + PlGF 500 pg/mL (V +P) ou VEGF (100 pg/mL) + PlGF 500 pg/mL + sFlt-1 10 ng/mL (V + P + S). Todas as experiências foram realizadas em 6 microvasos renais de ratos dissecados diferentes e os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. O * representa a importância estatística com $p < 0,05$ comparados com V+P.

As Figuras 4A e 4B mostram indução por sFlt-1 de endoteliose glomerular. A Figura 4A é uma fotomicrografia mostrando tingimento com hematoxilina e eosina (H & E) numa oclusão capilar nos animais tratados com sFlt-1 com glomérulos dilatados e citoplasma inchado comparados com controlos. "Endoteliose glomerular" com citoplasma bolhoso é mostrada nos animais tratados com sFlt-1 em tintura com *schiff* de ácido periódico (PAS). Todas as fotografias de microscopia ótica foram tiradas a 60X, ampliação original. A Figura 4B é uma micrografia eletrónica de glomérulos tratados com sFlt-1 que confirma o crescimento citoplasmático das células endocapilares. A imunofluorescência (IF) para fotografias de fibrina foram tiradas a 40X e as fotografias de EM foram tiradas a 2400X,

ampliação original. Todas as figuras foram reproduzidas em ampliações idênticas.

As Figuras 5A-5C mostram os níveis de sFlt-1 medidos antes e depois do início da pré-eclâmpsia por idade de gestação. A Figura 5A é um gráfico mostrando as concentrações séricas médias em pg/mL para pacientes controles normotensas (linha mais clara com triângulos abertos), casos antes da pré-eclâmpsia (círculos cheios) e casos depois da pré-eclâmpsia - amostras de "desfecho" - (quadrados cheios) dentro de janelas de 4-5 semanas de idade de gestação antes do início do trabalho de parto. Os parênteses indicam erro padrão da média. Asterísticos indicam diferenças significantes com respeito a amostras de controle dentro da mesma janela de idade de gestação depois de transformação logarítmica: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. A Figura 5B é um gráfico mostrando as concentrações séricas médias de sFlt1 em pg/mL para casos antes e depois do início da pré-eclâmpsia dentro de intervalos de semanas antes da pré-eclâmpsia. PE indica a média aritmética de 43 amostras de desfecho (obtidas em ou após o início da pré-eclâmpsia). A idade de gestação média (em dias) é indicada dentro de parênteses abaixo de cada intervalo de tempo. A linha horizontal indica o nível nas amostras de desfecho. As linhas verticais demarcam o período ≤ 5 semanas antes da pré-eclâmpsia. A Figura 5C é um gráfico mostrando as concentrações séricas médias de sFlt-1 em pg/mL por janelas de idade de gestação para pacientes controles normotensas e casos antes da pré-eclâmpsia, depois excluindo amostras obtidas dentro de 5 semanas do início da pré-eclâmpsia. Não há diferenças importantes.

As Figuras 6A-6C mostram os níveis de PlGF antes e depois da pré-eclâmpsia por idade de gestação. A Figura 6A é um gráfico mostrando os níveis de PlGF em todas as amostras obtidas antes do trabalho de parto e do parto. Os

parênteses indicam erro padrão da média. Asteriscos indicam diferenças significativas com respeito a amostras de controlo dentro do mesmo intervalo depois de transformação logarítmica: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. A Figura 6B é um gráfico mostrando as concentrações séricas médias de PlGF em pg/mL para casos antes e depois do início da pré-eclâmpsia dentro de intervalos de semanas antes da pré-eclâmpsia. PE indica a média aritmética de 43 amostras de desfecho (obtidas em ou depois do início da pré-eclâmpsia). A idade média gestacional (em dias) é indicada dentro de parênteses abaixo de cada intervalo de tempo. A linha horizontal indica o nível nas amostras de desfecho. As linhas verticais demarcam o período ≤ 5 semanas antes da pré-eclâmpsia. A Figura 6C é um gráfico mostrando as concentrações séricas médias de PlGF em pg/mL por janelas de idade de gestação para pacientes controlos normotensas e casos de início da pré-eclâmpsia.

As Figuras 7A e 7B mostram os níveis de sFlt-1 e PlGF por condição pré-eclâmpsia e severidade. A Figura 7A é um gráfico mostrando a média aritmética das concentrações séricas de sFlt-1 (barras pretas) e PlGF (barras brancas) em 23-32 semanas de gestação em controlos e casos (antes do início da doença clínica) com pré-eclâmpsia leve, pré-eclâmpsia severa, pré-eclâmpsia com início < 37 semanas, pré-eclâmpsia com um bebé pequeno para a idade de gestação (SGA) e pré-eclâmpsia com início < 34 semanas. Os números das amostras são registrados abaixo de cada par de colunas. O ajuste para a idade de gestação e índice de massa corporal resultou em alterações menores sem nenhum efeito sobre o nível de significância. A Figura 7B é um gráfico que mostra a média aritmética das concentrações séricas de sFlt-1 (barras pretas) e PlGF (barras brancas) em 33-41 semanas de gestação em controlos e casos (antes do início da doença clínica) com pré-eclâmpsia leve, pré-eclâmpsia

severa, pré-eclâmpsia com início <37 semanas e pré-eclâmpsia com um bebê pequeno para a idade de gestação. Os números das amostras são registrados abaixo de cada par de colunas. O ajuste para a idade de gestação e o índice de massa corporal resultou em alterações menores sem nenhum efeito sobre o nível de significância.

Descrição Detalhada

Foi descoberto que os níveis de sFlt-1 estão elevados em amostras de soro sanguíneo tiradas de mulheres pré-eclâmpticas. sFlt-1 liga-se a VEGF e PlGF com alta afinidade e bloqueia a atividade mitogénica e angiogénica destes fatores do crescimento. Deste modo, sFlt-1 é um excelente marcador de diagnóstico para a pré-eclâmpsia e VEGF e PlGF podem ser utilizados para tratar pré-eclâmpsia.

Além disso, descobrimos agentes terapêuticos que interferem com a ligação de sFlt-1 a VEGF ou PlGF purificado, ou agentes que aumentam os níveis de VEGF ou PlGF biologicamente ativos, podem ser utilizados para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. Os agentes referidos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos para sFlt-1, oligonucleotídeos para anti-sentido ou ARNi que reduzem os níveis de sFlt-1, compostos que aumentam os níveis de VEGF ou PlGF e pequenas moléculas que ligam-se a sFlt-1 e bloqueiam o local de ligação do fator de crescimento. A invenção também se caracteriza por métodos para a medição dos níveis de fatores do crescimento; os métodos podem ser utilizados como ferramentas diagnósticas para deteção precoce de pré-eclâmpsia ou um aumento do risco para desenvolver pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Apesar da descrição detalhada aqui apresentada se referir especificamente a sFlt-1, VEGF, ou PlGF, será evidente para um perito na especialidade que a descrição detalhada também pode ser aplicada a membros das famílias de sFlt-1, VEGF, ou PlGF, isoformas e/ou variantes e a fatores do crescimento que seja demonstrado que ligam-se a sFlt-1. Os exemplos seguintes são para fins de ilustração da invenção e não devem ser considerados como limitativos.

Exemplo 1.

Aumento dos níveis de proteína e ARNm de sFlt-1 em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia

Numa tentativa de identificação de novos fatores secretados que desempenham um papel patológico na pré-eclâmpsia, foi realizado o perfil da expressão genética de tecido placentário de mulheres com e sem pré-eclâmpsia utilizando *microarray chips* Affymetrix U95A. Foi descoberto que o gene para sFlt-1 estava regulado para cima em mulheres com pré-eclâmpsia.

De modo a confirmar a regulação para cima de sFlt-1 na pré-eclâmpsia, foram realizados *Northern blots* para analisar os níveis placentários de ARNm de sFlt-1 (Figura 1A) e testes ELISA para medir os níveis séricos de proteína sFlt-1 (Figure 1B) em mulheres grávidas pré-eclâpticas comparadas com mulheres grávidas normotensas. A pré-eclâmpsia foi definida como (1) uma pressão sanguínea sistólica (BP) >140 mm Hg e uma pressão sanguínea diastólica >90 mm Hg depois 20 semanas de gestação, (2) novo início de proteinúria (1+ por dipstik na análise urinária, >300mg de proteína numa coleta de urina de 24 horas, ou proporção urinária aleatória de proteína/creatinina >0,3 e (3) resolução da hipertensão e da proteinúria por volta de 12 semanas pós-

parto. Pacientes com hipertensão subjacente, proteinúria, ou doença renal foram excluídas. As pacientes foram divididas em pré-eclâmpsia leve e severa com base na presença ou na ausência de proteinúria de alcance nefrítico ($>3\text{g}$ de proteína numa coleta de urina de 24 horas ou proporção urinária de proteína/creatinina maior do que 3,0). As proporções urinárias médias de proteína/creatinina no grupo com pré-eclâmpsia leve foram de $0,94 \pm 0,2$ e no grupo com pré-eclâmpsia severa foram de $7,8 \pm 2,1$. As idades gestacionais médias dos vários grupos foram como se segue: normal $38,8 \pm 0,2$ semanas, pré-eclâmpsia leve $34 \pm 1,2$ semanas, pré-eclâmpsia severa $31,3 \pm 0,6$ semanas e pré-termo $29,5 \pm 2,0$ semanas. Foram obtidas amostras placentárias imediatamente depois do parto. Foram colhidas quatro amostras aleatórias de cada placenta, dispostas na solução de estabilização ARNlater (Ambion, Austin, TX) e armazenadas a -70°C . Foi realizado isolamento de ARN utilizando Qiagen ARNeasy Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Foi detetado um aumento tanto no ARNm de sFlt-1 placentário quanto na proteína sFlt-1 do soro materno em mulheres grávidas pré-eclâmplicas comparadas com mulheres grávidas normotensas. O nível sérico médio de sFlt-1 foi quase quatro vezes maior nas pacientes com pré-eclâmpsia severa comparadas com mulheres grávidas de controlo normal. Para excluir a possibilidade de que este efeito seja devido à idade de gestação precoce dos casos de pré-eclâmpsia, foram medidos os níveis de sFlt-1 em mulheres normotensas combinando as idades gestacionais que tiveram parto prematuramente por outras razões (idades gestacionais 23-36 semanas) e não foi descoberta diferença significativa neste grupo comparado com gravidezes a termo de normotensas. As sondas utilizadas para *Northern blots* foram obtidas por PCR e incluíram um fragmento de 500 bp na região codificante de

ADNc de *flt-1* humano pUC 118 e um ADNc de GAPDH que foi utilizado como controlo de normalização.

Na gravidez normal há um equilíbrio entre fatores pró- e antiangiogénicos secretados pela placenta que é necessário para desenvolvimento placentário adequado. Foi sugerida a hipótese de que na pré-eclâmpsia, o aumento da produção de sFlt-1 e diminuição da produção de VEGF e PlGF muda o equilíbrio em favor da anti-angiogénese. Para tratar da atividade antiangiogénica pura foram medidos os níveis séricos de VEGF e PlGF e foi descoberto que os níveis séricos de PlGF e VEGF foram menores em pacientes com pré-eclâmpsia comparadas com pacientes de controlo normal (PlGF médio, 235,3 +/- 45,3 pg/mL versus 464 +/- 116,6 pg/mL) conforme foi descrito (Tidwell et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 184:1267-1272, 2001). Quando foram incorporados os níveis de sFlt-1, VEGF e PlGF num índice antiangiogénico, ou PAAI, como um indicador da atividade antiangiogénica pura, foi descoberto que poderia claramente separar as pacientes pré-eclâmpicas das normais e que o PAAI parecia se correlacionar com a gravidade da pré-eclâmpsia (Figura 1C). Este PAAI pode ser utilizado como ferramenta diagnóstica para a deteção de pré-eclâmpsia em mulheres grávidas.

Exemplo 2.

Soro de mulheres com pré-eclâmpsia inibe a angiogénese num teste de tubo endotelial *in vitro*

Foi sugerido a hipótese de que o excesso de sFlt-1 circulante em pacientes com pré-eclâmpsia causa disfunção endotelial e leva a um estado antiangiogénico. Para tratarmos disto, foi utilizado um teste de tubo endotelial como um modelo *in vitro* de angiogénese. Matrigel reduzido

com fator de crescimento (7 mg/mL, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) foi colocado em cavidades (100 µl/cavidade) de uma lâmina de cultura de células de 48 cavidades pré-gelada e incubado a 37° C por 25-30 minutos para permitir polimerização. Células endoteliais da veia umbilical humana (30.000 + em 300 µl de meio basal endotelial sem soro, Clonetics, Walkersville, MD) em passagens 3-5 foram tratadas com 10% de soro da paciente, laminadas sobre as células revestidas com Matrigel e incubadas a 37° C por 12-16 horas. A formação do tubo foi em seguida avaliada através de um microscópio de contraste de fase invertida a 4X (Nikon Corporation, Tokyo, Japão) e analisada quantitativamente (área do tubo e comprimento total) utilizando o programa de análise do estudo por imagens Simple PCI.

As condições do teste de formação do tubo foram ajustadas de modo que células endoteliais da veia umbilical humana normal formam tubos somente na presença de fatores do crescimento exógenos, tais como, VEGF. Sob estas condições, foi descoberto que enquanto o soro de mulheres normotensas induziu células endoteliais a formarem estruturas semelhantes a tubos regulares, o soro de mulheres com pré-eclâmpsia inibiu a formação de tubo (Figura 2). Notavelmente, por volta de 48 horas pós-parto este efeito antiangiogénico tinha desaparecido sugerindo que a inibição dos tubos mencionados com o soro de pacientes com pré-eclâmpsia foi provavelmente devida a um fator circulante liberado pela placenta. Quando sFlt-1 foi adicionado ao soro de pacientes normotensas em doses semelhantes às encontradas em pacientes com pré-eclâmpsia, não ocorreu a formação de tubo, simulando os efeitos vistos com o soro de mulheres pré-eclâmpticas. Quando VEGF e PlGF exógenos foram adicionados ao teste utilizando soro de pacientes pré-eclâmpticas, foi restaurada a formação de tubo (Figura 2).

Foram utilizados para estes testes VEGF humano recombinante, PlGF humano e Flt-1Fc humano. Estes resultados sugeriram que as propriedades antiangiogênicas do soro pré-eclâmtico foram devidas ao antagonismo de VEGF e PlGF por sFlt-1 endógeno. Estes resultados também sugeriram que a adição de VEGF e/ou PlGF purificados pode reverter ou reduzir a condição pré-eclâmtica e pode ser utilizada terapeuticamente.

Exemplo 3.

sFlt-1 inibe a vasodilatação de microvasos renais induzida por VEGF e PlGF

O papel causal de sFlt-1 na vasoconstrição foi determinado utilizando um ensaio de reatividade microvascular *in vitro*. Foram feitos ensaios de reatividade microvascular conforme descrito previamente utilizando microvasos renais de rato (Sato et al., *J. Surg. Res.*, 90:138-143, 2000). Microvasos da artéria renal (70-170 μ m de diâmetro interno) foram dissecados de rins de rato utilizando um microscópio de dissecação de 10x a 60x (Olympus Optical, Tokyo, Japão). Os microvasos foram colocados numa câmara de microvasos isolada, canulada com micropipetas de vidro duplas medindo 30-60 μ m de diâmetro e fixada com uma sutura de monofilamento de nylon 10-0 (Ethicon, Somerville, NJ). Solução tampão de Krebs oxigenada (95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono) aquecida a 37° C foi circulada continuamente através da câmara de vasos e um reservatório contendo um total de 100 ml da solução. Os vasos foram pressurizados a 40 mm Hg num estado não-escoável utilizando um manómetro de burette enchido com uma solução tampão de Krebs. Com um microscópio invertido (40x a 200x; Olympus CK2, Olympus Optical) conetado a câmara de vídeo, a imagem dos vasos foi projetada num monitor de televisão preto e

branco. Um analisador dimensional eletrônico (Living System Instrumentation, Burlington, VT) foi utilizado para medir o diâmetro da luz interna. As medições foram registradas com um gravador de diagrama de fita (Graphtec, Irvine, CA). Os vasos foram deixados em banho dentro da câmara de microvasos por, no mínimo, 30 minutos antes de qualquer intervenção. Em todos os grupos experimentais, as reações de relaxamento dos microvasos renais foram examinadas depois da pré-contracção dos microvados com U46619 (agonista de tromboxano) para 40-60% de seu diâmetro basal numa pressão de distensão de 40 mm Hg. Uma vez que foi atingido o estado estacionário, foram examinadas as reações a vários reagentes tais como VEGF, PlGF e sFlt-1. Foram utilizados para estes testes VEGF de rato recombinante, PlGF de camundongo e Flt-1Fc de camundongo. Todos os fármacos foram aplicados extraluminalmente. As medições foram feitas quando a reação tinha estabilizado (geralmente 2-3 minutos depois do fármaco ter sido administrado). Uma a quatro intervenções foram realizadas em cada vaso. Os vasos foram lavados com uma solução tampão de Krebs e deixados para equilibrar numa solução tampão de Krebs livre de fármacos por 20-30 minutos entre as intervenções.

Foi descoberto que sFlt-1 sozinho não causa vasoconstricção significativa, no entanto bloqueou o aumento, responsivo ao fármaco, na vasodilatação induzida por VEGF ou PlGF (Figura 3A). Além disso, foi descoberto que VEGF e PlGF em níveis fisiológicos vistos na gravidez, induziram importante relaxamento arteriolar dose-dependente e que este efeito foi bloqueado pela adição de 10 ng/mL de sFlt-1, uma concentração observada em mulheres gravemente pré-eclâmpicas (Figura 3B). Este resultado sugeriu que sFlt-1 circulante em pacientes com pré-eclâmpsia pode antagonizar vasorrelaxamento, deste modo contribuindo para a hipertensão. Estes resultados corroboram a conclusão de que

sFlt-1 é responsável por muitos dos sintomas clínicos e patológicos da pré-eclâmpsia, inclusive hipertensão. A inibição de sFlt-1, através do uso de anticorpos dirigidos, por exemplo, poderia reverter os efeitos da proteína em mulheres pré-eclâmpticas e os inibidores de sFlt-1 referidos poderiam potencialmente ser utilizados como um agente terapêutico.

Exemplo 4.

Efeitos de sFlt-1 num modelo animal de pré-eclâmpsia

Com base nos resultados acima, foi sugerido a hipótese de que a adição de sFlt-1 exógeno produziria hipertensão e proteinúria num modelo animal. Foi demonstrado que adenovírus expressando sFlt-1 produzem níveis de sFlt-1 sistêmicos sustentados associados com importante atividade anti-tumoral (Kuo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:4605-4610, 2001). Este adenovírus recombinante codificando sFlt-1 murino foi injetado na veia da cauda de ratas Sprague-Dawley no dia 8-9 da gestação. Adenovírus codificando Fc murino e sFlk1-Fc (proteína de fusão de 1 ectodomínio Flk1 recetor de VEGF de camundongo e proteína Fc) em doses equivalentes foram utilizados como controlos. Foi demonstrado que Flk1 liga-se a VEGF, mas não PlGF. Deste modo, sFlk-1Fc foi escolhido como um controlo para ajudar a discriminar entre a atividade anti-VEGF e a anti-PlGF de sFlt1.

Tanto as ratas Sprague-Dawley grávidas quanto as não grávidas foram injetadas com 1×10^9 pfu de Ad Fc, Ad sFlt-1, ou Ad sFlk-1Fc por meio de injeções na veia da cauda. Estes adenovírus foram descritos previamente (Kuo et al., *supra*) e foram produzidos no *Harvard Vector Core Laboratory*. Ratas foram injetadas com os adenovírus no dia

8-9 da gravidez (início do segundo trimestre) e foi medida a pressão sanguínea no dia 16-17 da gravidez (início do terceiro trimestre). Em animais não grávidas, as pressões sanguíneas foram medidas no dia 8 depois da injeção dos adenovírus. As pressões sanguíneas foram medidas nas ratas depois de anestesia com sódio pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). A artéria carótida foi isolada e canulada com um cateter microtip 3-Fr de alta fidelidade conectado a um transdutor de pressão (Millar Instruments, Houston, TX). O cateter Millar Mikro-Tip foi introduzido dentro da artéria para registrar a pressão sanguínea. A pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram registradas por gravador de diagrama de fita (modelo 56-1X 40-006158, Gould Instrument Systems, Cleveland, OH) e foi feita a média durante um período de 10 minutos. Em seguida foram obtidas amostras de sangue, tecido e urina antes da eutanásia. A albumina urinária foi medida por dipstick padrão e quantificada por imunoenensaio ligado a enzima competitivo (ELISA) conforme foi descrito (Cohen et al., *Kidney Intl.*, 45: 1673-1679, 1994). A creatinina urinária foi medida por um kit de procedimento colorimétrico com ácido pícrico (Sigma, St. Louis, MO). Foram medidas as pressões sanguíneas intrarteriais no início do terceiro trimestre da gestação para simular a patologia natural da pré-eclâmpsia. Estes ensaios também foram realizados em ratos fêmeas não grávidas Sprague-Dawley para determinar se os efeitos de sFlt-1 é direto ou indireto através de seus efeitos sobre a placenta. Foi confirmado por meio de análise *Western blot* que os níveis sistêmicos de sFlt-1 no dia da medição da pressão sanguínea estavam dentro do alcance de 25-350 ng/mL nos vários animais tratados com sFlt-1 no dia das medições da pressão sanguínea. A pressão sanguínea e a proteinúria nos diferentes grupos experimentais é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Pressão Sanguínea e Proteinúria em Ratas

	N	MAP (mmHg)	Proporção de alb:cr na urina
Fc (P)	5	75,6 ± 11,1	62 ± 21
sFlt-1 (P)	4	109,0 ± 19,3*	6923 ± 658*
sFlk-1Fc (P)	4	72,8 ± 14,7	50 ± 32
Fc (NP)	5	89,3 ± 5,7	138 ± 78
sFlt-1 (NP)	6	117,9 ± 12,9*	12947 ± 2776*
sFlk-1Fc (NP)	4	137,3 ± 2,3*	2269 ± 669*

Ratas grávidas (P) e não grávidas (NP) foram administradas com adenovírus expressando proteína Fc (controle), sFlt-1, ou sFlk-1Fc. A pressão sanguínea arterial média (MAP = diastólica + 1/3 da pressão diferencial em mmHg) ± S.E.M e proporção de albumina:Cr na urina (mg de albumina por grama de creatinina) ± S.E.M foram medidas oito dias depois, correspondendo ao terceiro trimestre inicial nas ratas grávidas. N = o número de animais em cada grupo experimental. O * representa impotência estatística com $p < 0,01$ quando comparado com o grupo de controle (Fc).

Ratas grávidas tratadas com sFlt-1 tiveram uma importante hipertensão e albuminúria em faixa nefrótica comparadas com controles com Fc. Ratas não grávidas administradas com sFlt1 também desenvolveram hipertensão e proteinúria. Notavelmente, as ratas não grávidas tratadas com sFlk-Fc desenvolveram hipertensão e proteinúria, ao passo que as ratas grávidas tratadas com sFlk-Fc não desenvolveram. Portanto, na gravidez, o antagonismo de VEGF sozinho é insuficiente para produzir pré-eclâmpsia, possivelmente devido à presença de altos níveis de PlGF. No estado não grávido, onde PlGF está virtualmente ausente, o antagonismo

de VEGF sozinho é suficiente para romper o equilíbrio pró/antiangiogénico e produzir patologias renais semelhantes às associadas com a pré-eclâmpsia. Várias técnicas de tingimento foram utilizadas para examinar a lesão renal que foi observada em todas as ratas tratadas com sFlt-1 (Figura 4). Os rins colhidos das ratas foram fixados em solução de Bouin, seccionados e corados com pigmentos de H&E e PAS. Para microscopia electrónica, o tecido renal foi fixado em glutaraldeído embutido em mistura de araldite-epon e seções renais ultrafinas (1 µm) foram cortadas, coradas com azul de Tolueno e avaliadas utilizando um Zeiss EM 10 em várias ampliações. Foi feita imunofluorescência para depósitos de fibrina dentro dos glomérulos utilizando anticorpo policlonal anti-fibrina (ICN, Suíça). Endoteliose glomerular difusa e global foi a lesão renal observada universalmente nas ratas tratadas com sFlt-1. Foi detetado dilatação glomerular com oclusão das alças capilares por inchamento e hipertrofia das células endocapilares. Foram vistas numerosas gotículas de ressorção de proteínas evidentes nas células epiteliais glomerulares. Não foi observada glomerulosclerose segmentar. Foram vistos "contornos duplos" isolados e deposição focal de fibrina dentro dos glomérulos. Este achado de deposição de fibrina na ausência de interposição mesangial importante é similar ao que foi descrito como típico do estágio pré-parto da doença humana (Kincaid-Smith, *Am. J. Kidney Dis.*, 17:144-148, 1991). Imunofluorescência para fibrina apresentou focos de deposição de fibrina dentro dos glomérulos de animais tratados com sFlt-1 mas não de animais tratados com Fc. As ratas não grávidas tratadas com sFlk1 desenvolveram a mesma lesão. De facto, quando sFlk1 foi utilizado nos mesmos níveis que sFlt-1, a lesão renal foi mais grave nas ratas não grávidas, uma vez que há menos moléculas pro-angiogénicas circulantes para o sFlt-1 antagonizar. Estes

resultados sugeriram que elevados níveis de sFlt-1 podem ser responsáveis pela endoteliose glomerular associada com a pré-eclâmpsia, mas que este efeito foi independente da placenta uma vez que as alterações glomerulares foram detetadas em ratos não grávidas bem como grávidas. Estes resultados também sugeriram que o antagonismo tanto de VEGF quanto de PlGF é importante na patologia da pré-eclâmpsia, uma vez que ocorreram hipertensão e proteinúria em camundongos não grávidas tratados com sFlk-1 mas não em camundongos grávidas tratados com sFlk-1 onde os níveis de PlGF estão elevados.

O modelo animal aqui criado pode ser utilizado como um modelo experimental para testar novos compostos terapêuticos. Tanto a eficácia de compostos terapêuticos potenciais quanto a farmacologia e a toxicidade podem ser estudadas utilizando este modelo animal.

Exemplo 5.

Efeitos de sFlt-1 num modelo animal de eclâmpsia

Ratas grávidas no início de seu segundo trimestre de gestação são injetadas com sFlt-1 exógeno. As ratas são então monitoradas e testadas durante o início de seu terceiro trimestre para o desenvolvimento de eclâmpsia. Os testes utilizados para detecção de eclâmpsia podem incluir MRI dos cérebros das ratas para o desenvolvimento de edema, EEG dos cérebros das ratas para o desenvolvimento de ataques e histologia dos cérebros das ratas para determinar se ocorreu lesão endotelial ao longo da barreira sanguínea cerebral e do plexo coróide utilizando marcadores endoteliais específicos.

O modelo animal aqui criado pode ser utilizado como um modelo experimental para testar novos compostos

terapêuticos. Tanto a eficácia de compostos terapêuticos potenciais quanto a farmacologia e a toxicidade podem ser estudadas utilizando este modelo animal.

Exemplo 6:

Proporção de PlGF/creatinina na urina para o diagnóstico de pré-eclâmpsia

Foram obtidas amostras de urina de 10 mulheres às 16 semanas de gestação (cinco normais, quatro pré-eclâmpticas leves e uma pré-eclâmptica severa). Estas amostras foram fornecidas pelo Dr. Ravi Thadhani no Hospital Geral de Massachusetts. As proporções médias de PlGF/creatinina livres urinárias (pg de PlGF por mg de creatinina) para as mulheres grávidas normais foram de 78 +/- 10,7 e para as quatro pré-eclâmpticas leves foram de 33 +/- 5,0 e para a paciente pré-eclâmptica severa foi de 17. Deste modo, uma alteração na proporção de PlGF para creatinina na urina é útil como um indicador diagnóstico para pré-eclâmpsia numa paciente.

Exemplo 7:

Níveis de proteína sFlt-1 e PlGF como um indicador de diagnóstico de pré-eclâmpsia e eclâmpsia em mulheres

Para este estudo foram utilizadas amostras arquivadas do estudo de Cálcio para Prevenção de Pré-eclâmpsia de modo a analisar os padrões gestacionais de sFlt-1 circulante, PlGF livre e VEGF livre em gestações normotensas e pré-eclâmpticas. *Calcium for Pre-eclampsia Prevention*, ou CPEP, foi um estudo clínico duplo-cego aleatório conduzido durante 1992-1995 para avaliar os efeitos da suplementação diária com 2 g de cálcio elemental ou placebo sobre a incidência e a gravidade da pré-eclâmpsia (Levine et al.,

N. Engl. J. Med. 377:69-76, 1997; Levine et al., *Control Clin. Trials* 17:442-469, 1996). Mulheres nulíparas saudáveis com gestações únicas foram registradas entre 13 e 21 semanas de gestação em cinco centros médicos participantes dos Estados Unidos e acompanhadas até 24 horas pós-parto utilizando um protocolo comum e formas idênticas de coleta de dados. No registro, todas as participantes do CPEP tinham pressão sanguínea < 135/85 mm Hg e nenhuma tinha disfunção renal ou proteinúria. A idade de gestação foi determinada através de exame de ultrassom. Foram obtidas amostras de soro das participantes antes do registro no estudo (13-21 semanas), às 26-29 semanas, às 36 semanas caso ainda grávida e quando foram observadas hipertensão ou proteinúria. "Amostras de desfecho" foram amostras obtidas em ou depois do início dos sinais e sintomas de pré-eclâmpsia, mas antes do trabalho de parto e do parto conforme descrito (Levine et al., 1996, *supra*). Foram obtidas amostras de sangue arquivadas do estudo CPEP através de colaboração com o Dr. Richard Levine no NIH.

Participantes

Foram selecionados pacientes tendo completa informação do prognóstico, amostras de soro obtidas em <22 semanas e um bebê do sexo masculino nascido vivo. De 4.589 participantes do CPEP, foram excluídos 253 perdidos durante o seguimento, 21 cuja gravidez havia encerrado antes de 20 semanas, 13 em que faltavam dados do prognóstico materno ou perinatal, 4 sem história de fumar, 9 com hipertensão não verificada por equipes de revisão de quadro e 32 outras com natimortos, deixando 4.257 mulheres com informações adequadas e bebês vivos. Entre estas 2.156 tiveram bebês do sexo masculino. Depois de excluir uma mulher cujo bebê teve uma anormalidade cromossômica, 381 com hipertensão gestacional

e 43 numa amostra de soro basal, restaram 1.731 mulheres. Destas, 175 desenvolveram pré-eclâmpsia e 1.556 permaneceram normotensas durante toda a gravidez.

Como a suplementação de cálcio não teve nenhum efeito sobre o risco e a gravidade da pré-eclâmpsia e não foi relacionada com as concentrações de moléculas pró- e antiangiogénicas, os casos e os controlos foram escolhidos independentemente do tratamento do CPEP. Para cada caso de pré-eclâmpsia foi selecionada uma normotensa de controlo, combinada por local de registo, idade de gestação na coleta da primeira amostra de soro (dentro de uma semana) e tempo de armazenagem a -70°C (dentro de 12 meses). 120 pares combinados ("casos" e "controlos") foram escolhidos aleatoriamente para análise de todas as 657 amostras de soro obtidas antes do trabalho de parto (Tabela 2, abaixo). A idade de gestação média na coleta da primeira amostra de soro foi de 112,8 e 113,6 dias nos casos e controlos, respectivamente; a duração média de armazenagem no congelador a -70°C foi de 9,35 e 9,39 anos.

TABELA 2: Características dos casos e dos controles no registro do CPEP e de seus bebês recém-nascidos

Característica	Casos (n=120)	Controles (n=120)
Idade (anos)	20,8 ± 4,5	20,2 ± 3,6
Altura (cm)	161,0 ± 6,7	163,0 ± 6,9*
Peso (kg)	71,0 ± 19,4	66,8 ± 17,1
Índice de massa corporal	27,3 ± 6,8	25,1 ± 6,1 **
Pressão sanguínea sistólica (mm Hg)	109,5 ± 8,8	105,7 ± 9,0 **
Pressão sanguínea diastólica (mm Hg)	62,0 ± 7,9	59,4 ± 7,4 **
Perda de gravidez anterior [n (%)]	23 (19,2)	25 (20,8)
Fumante atual [n (%)]	9 (7,5)	13 (10,8)
Seguro saúde privado [n (%)]	8 (6,7)	13 (10,8)
Casada (N.T.: <i>Ever married</i>) [n (%)]	25 (20,8)	24 (20,0)
Raça/etnia	24 (20,0)	35 (29,2)
Branca, não-Hispânica [n (%)]		
Branca, Hispânica [n (%)]	21 (17,5)	14 (11,7)
Afro-Americana [n (%)]	69 (57,5)	68 (56,7)
Outra, desconhecida [n (%)]	6 (5,0)	3 (2,5)
Peso ao nascer (g)	3100 ± 796	3255 ± 595
Parto <37 semanas [n (%)]	29 (24,2)	9 (7,5) **
Pequeno para idade de gestação (<10º percentil) [n (%)]	18 (15,0)	4 (3,3) **
Média ± desvio padrão a menos que indicado * p<0,05		
** p<0,01		

Para este estudo, a hipertensão foi definida como uma pressão sanguínea diastólica de, no mínimo, 90 mm Hg em duas ocasiões com 4-168 horas de diferença. A hipertensão severa foi definida como uma pressão sanguínea diastólica de, no mínimo, 110 mm Hg em duas ocasiões com 4-168 horas de diferença, ou numa ocasião se a mulher tivesse recebido terapia anti-hipertensiva. A proteinúria foi definida como 300 mg ou mais de proteína numa coleta de urina de 24 horas, duas amostras de urina aleatórias com 4-168 horas de diferença contendo, no mínimo, 1+ proteína por dipstick, uma amostra de urina única com uma proporção de proteína/creatinina de, no mínimo, 0,35, ou uma amostra de urina aleatória única contendo, no mínimo, 2+ proteína por dipstick. Foi diagnosticada proteinúria severa por uma amostra de coleta de urina de 24 horas contendo no mínimo 3,5 g proteína ou por duas amostras de urina aleatórias com no mínimo 3+ proteína por dipstick. A pré-eclâmpsia foi definida como hipertensão e proteinúria ocorrendo dentro de 7 dias uma da outra; pré-eclâmpsia severa foi definida como pré-eclâmpsia com hipertensão severa, proteinúria severa, síndrome HELLP (hemólise enzimas hepáticas elevadas, baixa contagem de plaquetas), ou eclâmpsia. O início da pré-eclâmpsia foi o momento de detecção da primeira pressão sanguínea elevada ou proteinúria na amostra de urina levando ao diagnóstico de pré-eclâmpsia.

Pequeno para a idade de gestação (SGA) foi definido como peso ao nascer menor do que o 10^o percentil para a idade de gestação de acordo com as tabelas dos Estados Unidos de peso ao nascer para a idade de gestação por raça, paridade e sexo da criança (Zhang e Bowes 1995, *supra*).

Procedimentos

Os testes foram realizados no *Beth Israel Deaconess Medical Center* pela equipa do laboratório a qual desconhecia os diagnósticos das pacientes e outras informações clínicas relevantes. As amostras foram ordenadas aleatoriamente para análise. Foram realizados testes imunossorventes ligados a enzima (ELISA) para sFlt-1 humana, PlGF livre e VEGF livre de acordo com as instruções do fabricante, utilizando kits adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN). Aliquotas de amostras de soro, as quais tinham sido armazenadas a -70°C , foram descongeladas até a temperatura ambiente, diluídas com salina tamponada com BSA/Tris e incubadas por 2 horas numa lâmina de 96 cavidades pré-revestida com um anticorpo de captura orientado contra sFlt-1, PlGF, ou VEGF. As cavidades foram em seguida lavadas três vezes, incubadas por 20 minutos com uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogénio e tetrametilbenzidina e a reação foi extinta com ácido sulfúrico a 2N. A densidade ótica foi determinada a 450 nm (correção do comprimento de onda de 550 nm). Todos os testes foram realizados em duplicado. As concentrações protéicas foram calculadas utilizando uma curva padrão derivada de concentrações conhecidas das proteínas recombinantes respetivas. Quando a diferença entre os duplicados excedeu 25%, o teste foi repetido e os resultados iniciais descartados. Os testes tiveram sensibilidades de 5, 7 e 5 pg/mL para sFlt 1, PlGF e VEGF, respectivamente, com coeficientes de variação inter- e intra-teste de 7,6% e 3,3% para sFlt 1, 11,2% e 5,4% para PlGF e 7,3% e 5,4% para VEGF.

Análise Estatística

Foram utilizados testes t e qui-quadrados em análises de características maternas ou infantis para comparar variáveis categóricas ou contínuas, respetivamente. Embora os valores da média aritmética das concentrações sejam dados no texto e nas figuras, a experimentação estatística foi realizada depois da transformação logarítmica a menos que mencionado de outro modo. Foi realizado ajuste utilizando regressão logística sobre concentrações transformadas logaritmicamente.

Resultados

Dos 120 casos, 80 desenvolveram pré-eclâmpsia leve e 40 severa, inclusive 3 com síndrome HELLP e 3 com eclâmpsia. As pacientes dos casos foram mais curtas do que pacientes de controlo, tinham um maior índice de massa corporal e maior pressão sanguínea basal (Tabela 2). Além disso maiores proporções de pacientes de casos tiveram gestações complicadas por parto pré-termo ou bebés pequenos para a idade de gestação (SGA). As pacientes dos casos contribuíram com uma média de 2,9 amostras de soro para o estudo; as pacientes controlos, com 2,6 amostras.

Foi primeiro confirmado que sFlt-1, PlGF e VEGF estavam alterados em pacientes com pré-eclâmpsia por ocasião da doença ativa comparadas com controlos combinadas por idade de gestação neste grupo de estudo do CPEP. Amostras colhidas por ocasião da pré-eclâmpsia clínica estabelecida (amostras de desfecho) tiveram níveis dramaticamente aumentados de sFlt-1, níveis reduzidos de PlGF e níveis reduzidos de VEGF comparadas com controlos com idades gestacionais (4382 vs. 1643 pg/mL de sFlt1, $p < 0,0001$; 137

vs. 669 pg/mL de PlGF, $p < 0,0001$; e 6.41 vs. 13.86 pg/mL de VEGF, $p = 0,06$) para casos e controlos, respectivamente em 23 pares combinados por idade de gestação) de modo similar aos relatórios publicados anteriormente (Maynard et al., *J. Clin. Invest.* 111:649-658, 2003).

De modo a avaliar o padrão gestacional dos níveis de sFlt-1, PlGF e VEGF, foram medidas as concentrações circulantes de sFlt-1, PlGF e VEGF de amostras de soro obtidas de pacientes de casos e pacientes de controlo dentro de várias idades gestacionais. O padrão gestacional da proteína sFlt-1 para 120 mulheres pré-eclâmplicas e 120 mulheres de controlo é apresentado na Figura 5A. Os níveis de sFlt-1 nas pacientes de controlo permaneceram constantes até 33-36 semanas, quando aumentaram cerca de 145 pg/mL por semana até o trabalho de parto e o parto. Entre as pacientes de casos e antes dos sintomas clínicos, sFlt-1 pareceu começar a aumentar em 21-24 semanas, com um aumento mais agudo e uma diferença estatisticamente significativa dos controlos em 29-32 semanas (Figura 5A). De uma forma geral, as diferenças entre pacientes de casos e controlos medidas antes do início dos sintomas clínicos foram de 17% ($p < 0,05$) na metade da gestação. As amostras de desfecho estavam significativamente elevadas comparadas com amostras colhidas antes da doença. De modo a avaliar os mecanismos de aumento de sFlt-1 antes do início da doença clínica, foi construído um gráfico com as concentrações de sFlt-1 em todas as pré-eclâmplicas por semanas antes do início da pré-eclâmpsia (Figura 5B). As concentrações médias de sFlt-1 em amostras de pacientes de casos foram representadas em gráfico por semanas completadas antes do início da pré-eclâmpsia. Iniciando em 5 semanas antes da pré-eclâmpsia, as concentrações de sFlt-1 aumentaram substancialmente até 1 semana antes do início da doença quando se aproximaram das concentrações observadas em amostras de desfecho. Os

aumentos de sFlt-1 em 4, 3, 2 e 1 semana(s) antes da pré-eclâmpsia ocorreram com pouca alteração na idade de gestação média e não podem ser explicadas por aumentos do final do último trimestre com avanço da idade de gestação. A partir de 8-6 até 5 semanas antes da pré-eclâmpsia sFlt-1 aumentou 962 pg/mL, ao passo que a idade de gestação média subiu 31 dias. Cerca de um terço deste aumento em sFlt-1 não pode ser atribuído ao avanço da gestação. Quando foi realizado gráfico da sFlt-1 por idade de gestação em controlos e em casos depois da remoção de amostras obtidas ≤ 5 semanas antes do início da pré-eclâmpsia, não foram observadas diferenças substanciais (Figura 5C). Estes dados sugerem que a maior concentração de sFlt-1 em pacientes de casos antes do início da pré-eclâmpsia é devida a aumentos agudos na sFlt-1 dentro das 5 semanas antes do início de doença clínica.

Foi em seguida realizado o gráfico do padrão gestacional da proteína PlGF no mesmo grupo de pacientes conforme mostrado na Figura 6A. As concentrações da proteína PlGF dos controlos aumentou durante os primeiros dois trimestres, teve pico nas 29-32 semanas e caiu durante o final da gestação. Entre as pacientes de casos, antes da pré-eclâmpsia, as concentrações da proteína PlGF seguiram um padrão gestacional semelhante, mas foram significativamente menores do que os controlos a partir de 13-16 semanas. De uma forma geral, as diferenças de PlGF entre as pacientes de casos e as pacientes de controlos medidas antes do início de sintomas clínicos foram de 35% ($p < 0,0001$) na metade da gestação. Os níveis de PlGF nos casos antes do início da pré-eclâmpsia é representado por semanas antes da pré-eclâmpsia (Figura 6B) e por idade de gestação depois da remoção de amostras < 5 semanas antes da pré-eclâmpsia (Figura 6C). Por volta de 1 semana antes do início da pré-eclâmpsia, as concentrações se aproximaram das

concentrações observadas depois do início da pré-eclâmpsia (Figura 6B). Comparados com controlos, os níveis de PlGF das pacientes de casos estavam moderadamente reduzidos distante do parto, com reduções mais substanciais em 5 e 3 semanas antes do parto. As concentrações das pacientes de controlo permaneceram elevadas a partir de 17-15 até 3 semanas antes do parto e em seguida caíram dramaticamente. O gráfico que mostra níveis de PlGF excluindo amostras obtidas ≤ 5 semanas antes da pré-eclâmpsia indica uma menor redução nos casos com relação aos controlos em 29-32 semanas de gestação e nenhuma nas amostras obtidas das pacientes de casos em 33-36 semanas (Figura 6C). Isto sugere que a queda nas concentrações de PlGF nas semanas antes da doença foi responsável pelos níveis dramaticamente baixos de PlGF observados no início da doença (ou amostras de desfecho apresentadas na Figura 6A).

As concentrações de VEGF durante toda a gestação foram muito baixas e semelhantes em controlos e casos antes da pré-eclâmpsia exceto por uma redução significativa em pacientes de casos em 37-41 semanas. As concentrações médias de VEGF em 23-32 semanas em casos excluindo amostras obtidas 5 semanas antes da pré-eclâmpsia não diferiram significativamente dos controlos (11,6 vs. 12,8 pg/mL) enquanto as concentrações em casos incluindo amostras ≤ 5 semanas antes do parto diferiram (5,1 vs. 12,8 pg/mL, $p < 0,01$). Em 33-41 semanas as concentrações de VEGF dos casos > 5 ou ≤ 5 semanas antes da pré-eclâmpsia foram maiores e menores do que os controlos, respectivamente (11,2 pg/mL e 8,3 vs. 9,7 pg/mL) embora estas diferenças não tenham sido significativas.

A Figura 7 representa sFlt-1 e PlGF em 23-32 semanas (Figura 7A) e 33-41 semanas (Figura 7B) por estado e gravidade da pré-eclâmpsia. Os gráficos mostram que os

aumentos de sFlt-1 e redução de PlGF antes do início da pré-eclâmpsia foram associados com a gravidade da doença, tempo de início e a presença de um bebê pequeno para a idade de gestação. Em 23-32 semanas, sFlt-1 e PlGF em pacientes de casos com um bebê pequeno para a idade de gestação antes do início da pré-eclâmpsia foram significativamente maior ou menor, respectivamente, do que concentrações correspondentes em pacientes de controle com um bebê pequeno para a idade de gestação. Além disso em comparação com pacientes de controle que tiveram parto pré-termo, pacientes de caso com parto pré-termo tiveram maior sFlt-1 e PlGF significativamente menor.

Em seguida foi determinado se poderiam ser utilizadas as concentrações circulantes de PlGF e/ou sFlt-1 durante o primeiro trimestre para identificar mulheres em risco para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia. Em 8-20 semanas, depois de ajuste por idade de gestação, índice de massa corporal e sFlt-1, pacientes de casos com PlGF no menor quartil da distribuição de valores de controle tiveram um aumento de quase 12 vezes do risco de pré-eclâmpsia em <34 semanas (Proporção de Disparidades [N.T.: em inglês, OR (Odds Ratio)] 11,7, $p < 0,05$) comparadas com casos com PlGF nos três maiores quartis (Tabela 3). O risco para pré-eclâmpsia em <34 semanas no menor quartil, comparado com o maior quartil estava aumentado quase 16 vezes (OR 15,8, $p < 0,01$).

Tabela 3: Proporções de Disparidades (OR) para Pré-eclâmpsia de Início Precoce por Quartis de Distribuição de plgf Controle em 8-20 Semanas

PlGF (pg/mL)	PE Início <34 Semanas			PE Início <37 Semanas			
	Casos (N)	Contro los (N)	OR Aj.* (95% CI)	Casos (N)	Contro los (N)	OR (95% CI)	Aj.*
Q4 >267,5	2	30	1,0 Refere nte	4	30	1,0 Referente	
Q3 >128,6- 267,5	1	30	0,7 (0,1- 8,9)	4	30	1,3 (0,3- 5,8)	(0,3- 5,8)
Q2 > 70,1- 128,6	3	30	2,3 (0,3- 19,3)	6	30	2,6 (0,6- 12,1)	(0,6- 12,1)
Q1 < 70,1	5	30	15,8 (1,5- 172,8) **	17	30	22,3 (3,7- 135,6)***	(3,7- 135,6)***
* Proporções de Disparidades ajustadas para idade de gestação, índice de massa corporal, log sFlt-1							
** p<0,01 ***p<0,001 95% CI = 95% de Limites de Confiança							

Estes resultados demonstram que os níveis de sFlt-1 começam a aumentar dramaticamente cerca de 5 semanas antes do início dos sintomas da pré-eclâmpsia. Paralelo com o aumento nos níveis de sFlt-1, os níveis de PlGF livre e de VEGF livre diminuem, sugerindo que a redução em PlGF e VEGF pode ser devida no mínimo parcialmente a antagonismo por sFlt-1 e não devida a uma redução na produção placentário

de PlGF e VEGF. Três subgrupos de pré-eclâmpsia - pré-eclâmpsia severa, início precoce da doença e bebês pequeno para a idade de gestação - tiveram maiores concentrações de sFlt-1 e menores de PlGF em 23-32 semanas e em 33-41 semanas do que controlos ou mulheres com pré-eclâmpsia leve. Foi também demonstrado uma redução pequena porém significativa em PlGF livre iniciando cedo no segundo trimestre entre mulheres destinadas a desenvolver pré-eclâmpsia. Estes resultados demonstram que uma redução nos níveis de PlGF pode ser um preditor útil de pré-eclâmpsia de início precoce.

Foi descrito aqui pela primeira vez o padrão gestacional de sFlt-1 na gestação normal, observando níveis relativamente estáveis durante toda a gestação seguidos por um aumento estável iniciando em 33-36 semanas. Este aumento corresponde à última queda gestacional em PlGF observada na gestação normal por outros (Torry et al., *J. Soc. Gynecol. Invest.* 10:178-188, 1998; Taylor et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188:177-182, 2003) e nos resultados aqui descritos. A associação temporal, junto com o conhecimento de que sFlt-1 interfere com medição por ELISA de PlGF (Maynard et al., *supra*) sugere que a queda nos níveis de PlGF livre durante o final da gestação pode ser devida ao aumento nos níveis de sFlt-1. Durante o primeiro e o segundo trimestre, quando é necessário o crescimento placentário para acompanhar as necessidades fetais crescentes, as concentrações de PlGF são altas e as concentrações de sFlt-1 são baixas, criando um estado relativamente pró-angiogénico. No final da gestação, quando o crescimento vascular placentário pode precisar ser moderado e interrompido, há um aumento na sFlt-1 antiangiogénica e redução resultante no PlGF. Em mulheres com pré-eclâmpsia, o aumento da sFlt-1 começa cedo na

gestação, aproximadamente cinco semanas antes do início dos sintomas em cerca de 29-32 semanas de gestação em média. Deste modo, na pré-eclâmpsia, os "freios" antiangiogénicos podem ser aplicados cedo e forte em demasia, resultando num exagero de um processo fisiológico normal o qual interrompe o crescimento placentário. Parece claro que as alterações placentárias patológicas que caracterizam a pré-eclâmpsia ocorrem cedo na gestação (10-14 semanas), bem antes do aumento dramático da sFlt-1. A própria isquemia placentária resultante pode aumentar a produção de sFlt-1, basicamente dando início a uma explosão de sFlt-1.

Além das grandes diferenças vistas nas cinco semanas antes do desenvolvimento de sintomas clínicos, mulheres destinadas a desenvolverem pré-eclâmpsia tiveram reduções pequenas, mas estatisticamente significantes, no PlGF livre tão cedo quanto em 13-16 semanas de gestação. Esta queda no PlGF geralmente não foi acompanhada por um aumento recíproco nos níveis de sFlt-1. No entanto, houve uma tendência para níveis ligeiramente maiores de sFlt-1 nos casos durante o primeiro trimestre embora não tenha sido estatisticamente significativa (por exemplo no intervalo de 17-20 semanas, os níveis médios de sFlt-1 nos casos foram de 865,77 pg/mL versus 795,25 nos controlos). Esta redução nos níveis de PlGF cedo na gestação pode refletir uma menor produção placentária de PlGF em gestações comprometidas por condições tais como pré-eclâmpsia ou SGA. De modo importante em pacientes com pré-eclâmpsia complicada por SGA, foi descoberto um aumento estatisticamente significativo tanto na elevação de Flt-1 quanto na queda de PlGF antes da apresentação da doença. Também é possível que não haja alteração na produção placentária de PlGF em mulheres pré-eclâmpticas e que a elevação dos níveis locais de sFlt-1 na placenta possa contribuir para a redução no PlGF livre circulante. Tal é confirmado pelo facto de que o

PlGF placentário, medido por imuno-histoquímica, não está alterado na pré-eclâmpsia (Zhou et al., *Am. J. Pathol.* 160:1405-1423, 2002).

Em resumo, foi demonstrado que sFlt-1 começa a subir na pré-eclâmpsia no mínimo 5 semanas antes do início da doença clínica, a qual é acompanhada por redução no PlGF livre circulante e VEGF livre. A redução do PlGF durante o primeiro trimestre pode servir como um preditor de pré-eclâmpsia e sFlt-1 elevada pode servir como um preditor de proximidade da doença clínica. Estes dados em conjunção com o estudo animal descrito acima demonstrando que sFlt-1 sozinho induz sintomas semelhantes a pré-eclâmpsia em roedores sugerem um provável papel etiológico para sFlt-1 na patogénese da pré-eclâmpsia. Os dados limitados sobre bebés pequenos para a idade de gestação e parto pré-termo em controlos, comparados com pacientes de casos, sugerem que o aumento das alterações nos níveis de proteínas observados em gestações pré-eclampticas com um bebé pequeno para a idade de gestação são mais substanciais do que uma diferença devida somente a restrição do crescimento intra-uterino ou parto pré-termo na ausência de pré-eclâmpsia.

Diagnóstico

A presente divulgação caracteriza-se por testes de diagnóstico para a deteção de pré-eclâmpsia ou a tendência para desenvolver pré-eclâmpsia. Os níveis de VEGF, PlGF, ou sFlt-1, quer níveis livres ou totais, são medidos numa amostra da paciente e utilizados como um indicador de pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou da tendência para desenvolver tais condições.

Numa forma de realização, é utilizada uma métrica para determinar se uma relação entre níveis de no mínimo duas

das proteínas é indicativa de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Podem ser utilizados métodos de rotina para medir os níveis de VEGF, PlGF, ou polipeptídeo sFlt-1 em qualquer fluido corporal, inclusive, mas não limitado a, urina, soro, plasma, saliva, líquido amniótico, ou líquido cerebrospinal. Os métodos referidos incluem imunoensaio, ELISA, *Western blotting* utilizando anticorpos orientados para VEGF, PlGF ou sFlt-1 e técnicas de imunoensaio enzimático quantitativo tais como as descritas em Ong et al. (*Obstet. Gynecol.* 98:608-611, 2001) e Su et al. (*Obstet. Gynecol.*, 97:898-904, 2001). Os testes ELISA são o método preferencial para medir os níveis de VEGF, PlGF, ou sFlt-1. Níveis séricos de sFlt-1 maiores do que 2 ng/mL são considerados um indicador positivo de pré-eclâmpsia. Adicionalmente, qualquer alteração detetável nos níveis de sFlt-1, VEGF, ou PlGF com relação aos níveis normais é indicativa de eclâmpsia, pré-eclâmpsia, ou da tendência a desenvolver tais condições. Preferencialmente sFlt-1 é medido, mais preferencialmente a medição de VEGF e PlGF é combinada com esta medição e ainda mais preferencialmente são medidas todas as três proteínas (ou níveis de ARNm indicativo dos níveis protéicos).

Numa outra forma de realização, a proporção PAAI (sFlt-1/VEGF + PlGF) é utilizada como um índice antiangiogénico que é diagnóstico de pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou da tendência a desenvolver tais condições. Se a proporção PAAI for maior do que 20 então a paciente é considerada como tendo pré-eclâmpsia ou estando em risco iminente de desenvolver a mesma. A proporção PAAI (sFlt-1/ VEGF + PlGF) é meramente um exemplo de uma métrica útil que pode ser utilizada como um indicador diagnóstico. Não se pretende que limite a invenção. Pode ser utilizada como um indicador diagnóstico virtualmente qualquer métrica que detete uma alteração no

índice antiangiogénico numa paciente tendo eclâmpsia com relação a um controlo normal.

Os níveis de expressão de ácidos nucleicos ou polipeptídeos particulares podem ser correlacionados com um estado de doença particular (por exemplo, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia) e portanto são úteis no diagnóstico. Oligonucleotídeos ou fragmentos mais longos derivados de uma sequência de ácidos nucleicos sFlt-1, PlGF, ou VEGF podem ser utilizados como uma sonda não somente para monitorar expressão, mas também para identificar pacientes que têm uma variação genética, mutação, ou polimorfismo numa molécula de ácido nucleico sFlt-1, PlGF, ou VEGF que são indicativos de uma predisposição para desenvolver as condições. Os polimorfismos refereridos são de conhecimento do perito na especialidade e são descritos por Parry et al. (*Eur. J Immunogenet.* 26:321-3, 1999). As alterações genéticas referidas podem estar presentes na sequência promotora, um quadro de leitura aberto, sequência intrónica, ou região 3' não-traduzida de um gene sFlt-1. Informações relacionadas com alterações genéticas podem ser utilizadas para diagnosticar uma paciente como tendo pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou uma tendência a desenvolver tais condições. Conforme mencionado do início ao fim, alterações específicas nos níveis de atividade biológica de sFlt-1, VEGF e/ou PlGF podem ser correlacionadas com a probabilidade de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, ou a predisposição para as mesmas. Em consequência, um perito na especialidade, tendo detetado uma dada mutação, pode então testar uma ou mais métricas da atividade biológica da proteína para determinar se a mutação causa ou aumenta a probabilidade de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Numa forma de realização, uma paciente tendo pré-eclâmpsia, eclâmpsia, ou uma tendência a desenvolver tais condições apresentará um aumento na expressão de um ácido nucleico

codificando sFlt-1 ou uma alteração nos níveis de PlGF ou VEGF. Os métodos para detetar semelhantes alterações são de rotina na técnica e são descritos em Ausubel et al., *supra*. Num exemplo, *northern blotting* ou PCR em tempo real é utilizado para detetar os níveis de ARNm de sFlt-1, PlGF, ou VEGF.

Noutra forma de realização, a hibridização com sondas de PCR que são capazes de detetar uma molécula de ácido nucléico sFlt-1, inclusive sequências genómicas, ou moléculas intimamente relacionadas, podem ser utilizadas para hibridizar a uma sequência de ácidos nucléicos derivada de uma paciente tendo pré-eclâmpsia ou eclâmpsia ou em risco de desenvolver tais condições. A especificidade da sonda, quer seja feita de uma região altamente específica, por exemplo, a região regulatória 5', ou de uma região menos específica, por exemplo, um motivo conservado e o rigor da hibridização ou da amplificação (máxima elevada, intermediária, ou baixa), determinam se a sonda hibridiza a uma sequência que ocorre naturalmente, variantes alélicas, ou outras sequências relacionadas. Podem ser utilizadas técnicas de hibridização para identificar mutações indicativas de uma pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa molécula de ácido nucléico sFlt-1, ou podem ser utilizadas para monitorar os níveis de expressão de um gene codificando um polipeptídeo sFlt-1 (por exemplo, por análise Northern, Ausubel et al., *supra*).

Em ainda outra forma de realização, mulheres podem ser diagnosticadas para uma tendência a desenvolver pré-eclâmpsia por meio da análise direta da sequência de uma molécula de ácido nucléico sFlt-1, VEGF, ou PlGF.

Uma paciente tendo pré-eclâmpsia ou uma tendência a desenvolver pré-eclâmpsia, mostrará um aumento na expressão

de um polipeptídeo sFlt-1. Um anticorpo que liga-se especificamente um polipeptídeo sFlt-1 pode ser utilizado para o diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia ou para identificar uma paciente em risco de desenvolver tais condições. São conhecidos uma variedade de protocolos para medir uma alteração na expressão de semelhantes polipeptídeos, inclusive métodos imunológicos (tais como ELISAs e RIAs) e proporcionam uma base para o diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia ou de um risco para desenvolver tais condições. Novamente, um aumento no nível do polipeptídeo é diagnóstico de uma paciente tendo pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou uma tendência a desenvolver tais condições.

Numa forma de realização, o nível de polipeptídeo ou ácido nucléico de sFlt-1, VEGF, ou PlGF, ou qualquer combinação dos mesmos, é medido no mínimo em duas ocasiões diferentes e uma alteração nos níveis comparados com níveis de referência normais durante o tempo é utilizada como um indicador de pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou uma tendência para desenvolver tais condições.

O nível de sFlt-1, VEGF, ou PlGF nos fluidos corporais de uma paciente tendo pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou uma tendência para desenvolver tais condições pode ser alterado por tão pouco quanto 10%, 20%, 30%, ou 40%, ou por tanto quanto 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90% com relação ao nível de sFlt-1, VEGF, ou PlGF num controlo normal. O nível de sFlt-1 presente nos fluidos corporais de uma paciente tendo pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou uma tendência para desenvolver tais condições pode ser aumentado por 1,5 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou mesmo por tanto quanto 10 vezes ou mais com relação aos níveis numa paciente de controlo normal.

Numa forma de realização, a amostra de uma paciente de um fluido corporal (por exemplo, urina, plasma, soro, líquido amniótico) é coletada no início da gravidez antes do início dos sintomas de pré-eclâmpsia. Noutro exemplo, a amostra pode ser um tecido ou célula coletados no início da gravidez antes do início dos sintomas de pré-eclâmpsia. Exemplos não-limitantes incluem tecido placentário, células placentárias, células endoteliais e leucócitos tais como monócitos. Nas mulheres, por exemplo, amostras de soro sanguíneo materno são colhidas da veia antecubital de mulheres grávidas durante o primeiro, o segundo, ou o terceiro trimestre da gestação. Preferencialmente, o teste é realizado durante o primeiro trimestre, por exemplo em 4, 6, 8, 10, ou 12 semanas, ou durante o segundo trimestre, por exemplo em 14, 16, 18, 20, 22, ou 24 semanas. Os testes referidos também podem ser conduzidos ao final do segundo trimestre ou no início do terceiro trimestre (em torno de 28 semanas). É preferencial que os níveis de sFlt-1, VEGF, ou PlGF sejam medidos duas vezes durante este período de tempo. Para o diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia pós-parto, podem ser realizados testes para sFlt-1, VEGF, ou PlGF pós-parto.

Num exemplo particular, amostras de sangue seriais podem ser recolhidas durante a gravidez e os níveis de sFlt-1 solúvel determinado por ELISA. Num estudo utilizando esta técnica, o ARNm alternativamente unido codificando sFlt-1 é altamente expresso por células trofoblásticas e a proteína foi prontamente detectável no plasma de mulheres grávidas. Foi observado que os níveis de sFlt-1 aumentaram aproximadamente 3 vezes entre 20 e 36 semanas de gestação. Foi observado que os níveis são significativamente maiores em mulheres de alto risco que em seguida passaram a desenvolver pré-eclâmpsia (Charnock-Jones *et al.*, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10(2):230, 2003).

Na prática veterinária, podem ser realizados testes a qualquer momento durante a gestação, mas, preferencialmente, são realizados no início da gestação, antes do início dos sintomas de pré-eclâmpsia. Dado que o termo das gestações varia amplamente entre as espécies, o momento do teste será determinado por um veterinário, mas geralmente corresponderá ao momento dos testes durante uma gestação humana.

Os métodos de diagnóstico aqui descritos podem ser utilizados individualmente ou em combinação com qualquer outro método diagnóstico também aqui descrito para um diagnóstico mais preciso da presença, da gravidade, ou do tempo de início estimado da pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Além disso os métodos diagnósticos aqui descritos podem ser utilizados em combinação com quaisquer outros métodos diagnósticos determinados para serem úteis para o diagnóstico acurado da presença, da gravidade, ou do tempo de início estimado da pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Os métodos diagnósticos aqui descritos também podem ser utilizados para monitorar e tratar pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. Num exemplo, caso se determine que uma paciente tem um nível sérico de proteína sFlt-1 de 10 ng/mL e um nível sérico de PlGF livre de 100 pg/mL então pode ser administrado VEGF até o nível sérico de PlGF aumentar para aproximadamente 400 pg/mL. Nesta forma de realização, os níveis de sFlt-1, PlGF e VEGF, ou qualquer um todos estes, são medidos repetidamente como um método para não somente diagnosticar doença mas monitorar o tratamento e a administração da pré-eclâmpsia e da eclâmpsia.

Kits de Diagnóstico

A invenção também proporciona um kit de teste diagnóstico. Por exemplo, um kit de teste diagnóstico pode incluir anticorpos para sFlt-1, VEGF, ou PlGF e meios para detetar e mais preferencialmente avaliar, ligação entre os anticorpos e o polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF. Para deteção, ou o anticorpo ou o polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF é marcado e ou o anticorpo ou o polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF é ligado a um substrato, de tal modo que a interação entre polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF e anticorpo pode ser estabelecida determinando a quantidade de marcador fixado ao substrato após ligação entre o anticorpo e o polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF. Um ELISA convencional é um método comum e conhecido na técnica para detetar interação entre anticorpo e substrato e pode ser proporcionado com o kit da invenção. Os polipeptídeos sFlt-1, VEGF, ou PlGF podem ser detetados em virtualmente qualquer fluido corporal inclusive, mas não limitado a urina, soro, plasma, saliva, líquido amniótico, ou líquido cerebrospinal. Um kit que determina uma alteração no nível de polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF com relação a uma referência, tal como o nível presente num controlo normal, é útil como um kit de diagnóstico nos métodos da invenção.

Testes de Triagem

Conforme discutido acima, a expressão de um ácido nucléico ou polipeptídeo sFlt-1 aumenta numa paciente tendo pré-eclâmpsia eclâmpsia, ou uma tendência a desenvolver tais condições. Com base nestas descobertas, as composições da invenção são úteis para a triagem de alta produtividade e baixo custo de compostos candidatos para identificar os que

modulam a expressão de um polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF ou molécula de ácido nucléico cuja expressão está alterada numa paciente tendo uma pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Qualquer número de métodos estão disponíveis para realizar testes de triagem para identificar novos compostos candidatos que alteram a expressão de uma molécula de ácido nucléico sFlt-1, VEGF, ou PlGF. Num exemplo de trabalho, compostos candidatos são adicionados em concentrações variáveis ao meio de cultura de células cultivadas expressando uma sequência de ácidos nucléicos de sFlt-1, VEGF, ou PlGF. Em seguida é medida a expressão genética, por exemplo, por análise de microarranjo, análise *Northern blot* (Ausubel et al., *supra*), ou RT-PCR, utilizando qualquer fragmento apropriado preparado a partir da molécula de ácido nucléico como uma sonda de hibridização. O nível de expressão genética na presença do composto candidato é comparado ao nível medido num meio de cultura de controlo carecendo do composto candidato. Um composto que estimula uma alteração tal como um aumento na expressão de um gene, molécula de ácido nucléico, ou polipeptídeo VEGF ou PlGF, ou uma redução na expressão de um gene, molécula de ácido nucléico, ou polipeptídeo sFlt-1, ou um equivalente funcional dos mesmos, é considerado útil na invenção; uma molécula semelhante pode ser utilizada, por exemplo, como um terapêutico para tratar pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente.

Noutro exemplo de trabalho, o efeito dos compostos candidatos pode ser medido ao nível da produção de polipeptídeos utilizando a mesma abordagem geral e técnicas imunológicas de rotina, tais como *Western blotting* ou imunoprecipitação com um anticorpo específico para um

polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF. Por exemplo, podem ser utilizados imunoensaios para detetar ou monitorar a expressão de, no mínimo, um dos polipeptídeos da invenção num organismo. Anticorpos policlonais ou monoclonais (produzidos conforme descrito acima) que são capazes de ligar a um polipeptídeo semelhante podem ser utilizados em qualquer formato de imunoensaio de rotina (por exemplo, ELISA, *Western blot*, ou teste RIA) para medir o nível do polipeptídeo. Em algumas formas de realização, um composto que estimula uma alteração tal como um aumento na expressão ou na atividade biológica de um polipeptídeo VEGF ou PlGF ou uma redução na expressão ou na atividade biológica de um polipeptídeo sFlt-1 é considerado particularmente útil. Novamente, uma molécula semelhante pode ser utilizada, por exemplo, como um terapêutico para retardar, melhorar, ou tratar uma pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, ou os sintomas de uma pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, numa paciente.

Em ainda outro exemplo de trabalho, compostos candidatos podem ser triados para aqueles que ligam especificamente a um polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF. A eficácia de um composto candidato semelhante é dependente de sua capacidade para interagir com um polipeptídeo semelhante ou um equivalente funcional do mesmo. Uma interação semelhante pode ser prontamente avaliada utilizando qualquer número de técnicas de ligação de rotina e testes funcionais (por exemplo, os descritos em Ausubel et al., *supra*). Numa forma de realização, um composto candidato pode ser testado *in vitro* para sua capacidade para ligar especificamente um polipeptídeo da invenção. Noutra forma de realização, um composto candidato é testado para sua capacidade para reduzir a atividade biológica de um polipeptídeo sFlt-1 reduzindo a ligação de um polipeptídeo sFlt-1 e um fator de crescimento, tal como VEGF ou PlGF.

Noutro exemplo de trabalho, um ácido nucléico de sFlt-1, VEGF, ou PlGF é expresso como uma fusão transcricional ou traducional com um repórter detectável e expresso numa célula isolada (por exemplo, célula de mamífero ou inseto) sob o controlo de um promotor heterólogo, tal como um promotor indutível. A célula expressando a proteína de fusão é em seguida posta em contato com um composto candidato e a expressão do repórter detectável nesta célula é comparada com a expressão do repórter detectável numa célula de controlo não-tratada. Um composto candidato que reduz a expressão de um repórter detectável de sFlt-1, ou que aumenta a expressão de um repórter detectável de VEGF ou PlGF é um composto que é útil para o tratamento de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Em formas de realização preferenciais, o composto candidato altera a expressão de um gene repórter fundido a um ácido nucléico ou ácido nucléico.

Num exemplo particular de trabalho, pode ser identificado um composto candidato que se liga a um polipeptídeo sFlt-1 utilizando uma técnica à base de cromatografia. Por exemplo, um polipeptídeo recombinante da invenção pode ser purificado por meio de técnicas de rotina a partir de células produzidas para expressar o polipeptídeo (por exemplo, as descritas acima) e pode ser imobilizado sobre uma coluna. Uma solução de compostos candidatos é em seguida passada através da coluna e um composto específico para o polipeptídeo sFlt-1 é identificado com base em sua capacidade para se ligar ao polipeptídeo e ser imobilizado sobre a coluna. Para isolar o composto, a coluna é lavada para remover moléculas ligadas não-especificamente e o composto de interesse é, em seguida, libertado da coluna e recolhido. Podem ser utilizados métodos semelhantes para isolar um composto ligado a uma microssérie de polipeptídeos. Compostos isolados por este método (ou

qualquer outro método apropriado), caso desejado, podem ser adicionalmente purificados (por exemplo, por meio de cromatografia líquida de alta performance). Além disso estes compostos candidatos podem ser testados para sua capacidade para reduzir a atividade de um polipeptídeo sFlt-1 ou para aumentar a atividade de um caminho de sinalização de VEGF (por exemplo, conforme aqui descrito). Os compostos isolados por esta abordagem também podem ser utilizados, por exemplo, como terapêuticos para tratar pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente humana. Compostos que são identificados como ligando a um polipeptídeo da invenção com uma constante de afinidade menor do que ou igual a 10 mM são considerados particularmente úteis na invenção. Alternativamente, pode ser utilizado qualquer sistema de detecção de interação de proteína *in vivo*, por exemplo, qualquer teste de dois híbridos para identificar compostos ou proteínas que se ligam a um polipeptídeo da invenção.

Potenciais antagonistas incluem moléculas orgânicas, peptídeos, miméticos de peptídeos, polipeptídeos, ácidos nucleicos e anticorpos que ligam a uma sequência de ácidos nucleicos sFlt-1 ou polipeptídeo sFlt-1.

Sequências de ADN de sFlt-1 também podem ser utilizadas na descoberta e no desenvolvimento de um composto terapêutico para o tratamento de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. A proteína codificada, na expressão, pode ser utilizada como um alvo para a triagem dos fármacos. Adicionalmente, as sequências de ADN codificando as regiões de terminal amino da proteína codificada ou *Shine-Delgarno* ou outras sequências de facilitação de translação do ARNm respectivo podem ser utilizadas para construir sequências que reduzem a expressão de uma sequência codificante de sFlt-1. As

sequências referidas podem ser isoladas por meio de técnicas de rotina (Ausubel et al., *supra*).

Opcionalmente, os compostos identificados em qualquer um dos testes descritos acima podem ser confirmados como úteis num teste para compostos que reduzem a atividade biológica de sFlt-1 ou que aumentam a atividade de um caminho de sinalização de VEGF.

Moléculas pequenas da invenção preferencialmente têm um peso molecular abaixo de 2.000 dáltons, mais preferencialmente entre 300 e 1.000 dáltons e ainda mais preferencialmente entre 400 e 700 dáltons. É preferencial que estas pequenas moléculas sejam moléculas orgânicas.

Terapêuticos tendo como objetivo o caminho de sinalização de VEGF

VEGF é um potente mitógeno específico para células endoteliais que estimula a angiogênese, a hiperpermeabilidade vascular e vasodilatação. Foram identificados três recetores de sinalização de tirosina-quinase para VEGF. A ligação do recetor de VEGF dispara uma cascata de sinalização que resulta na fosforilação por tirosina de fosfolipase C γ 1, levando a aumentos nos níveis intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato e aumentos no cálcio intracelular que ativa a óxido nítrico sintase para produzir óxido nítrico (NO). A formação de óxido nítrico ativa a guanilato ciclase dentro das células dos músculos lisos vasculares e das células endoteliais, provocando produção de cGMP. Imagina-se que esta cascata NO/cGMP medie os efeitos vasoativos de VEGF. Outro caminho que parece estar envolvido na mediação dos efeitos vasoativos de VEGF é o caminho de libertação da prostaciclina. VEGF induz

produção de PGI₂ através da ativação da fosfolipase A₂ como uma consequência da iniciação da cascata MAPK.

Níveis aumentados de VEGF são úteis para o tratamento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia. Compostos terapêuticos que têm como objetivo caminhos de sinalização de VEGF, ou componentes de um caminho de sinalização de VEGF e aumentam a atividade de um caminho de sinalização de VEGF também são úteis para o tratamento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia. Os compostos referidos incluem sildenafil, análogos da prostaciclina, tais como Flolan, Remodulin e Tracleer.

Compostos de teste e extratos

Em geral, compostos capazes de reduzir a atividade de um polipeptídeo sFlt-1 ou aumentar a atividade de VEGF ou PlGF são identificados a partir de grandes bibliotecas tanto de produtos naturais ou de extratos sintéticos (ou semi-sintéticos) ou bibliotecas químicas ou a partir de bibliotecas de polipeptídeos ou ácidos nucleicos, de acordo com métodos conhecidos na técnica. As pessoas versadas no campo da descoberta e do desenvolvimento de fármacos entenderão que a fonte precisa dos extratos ou compostos de teste não é crucial para o procedimento ou procedimentos de triagem da invenção. Compostos utilizados nas triagens podem incluir compostos conhecidos (por exemplo, terapêuticos conhecidos utilizados para outras doenças ou distúrbios). Alternativamente, virtualmente qualquer número de compostos ou extratos químicos desconhecidos pode ser triado utilizando os métodos aqui descritos. Exemplos de semelhantes extratos ou compostos incluem, mas não estão limitados a extratos à base de plantas, à base de fungos, à base de procarióticos ou à base de animais, caldos de fermentação e compostos sintéticos, bem como modificação de compostos existentes. Numerosos métodos também estão

disponíveis para produzir síntese aleatória ou dirigida (por exemplo, semi-síntese ou síntese total) de qualquer número de compostos químicos, inclusive, mas não limitados a, compostos à base de sacarídeos, à base de lipídeos, à base de peptídeos e à base de ácidos nucleicos. Bibliotecas de compostos sintéticos estão disponíveis comercialmente na Brandon Associates (Merrimack, NH) e Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alternativamente, bibliotecas de compostos naturais sob a forma de extratos bacterianos, fúngicos, vegetais e animais estão disponíveis comercialmente numa série de fontes, inclusive Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL) e PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA). Além disso bibliotecas naturais e produzidas sinteticamente são produzidas, caso desejado, de acordo com métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de métodos de extração e fracionamento de rotina. Além disso, caso desejado, qualquer biblioteca ou composto é prontamente modificado utilizando métodos químicos, físicos, ou bioquímicos de rotina.

Além disso, peritos na especialidade na área da descoberta e do desenvolvimento de fármacos prontamente entendem que devem ser empregues sempre que possível métodos para desreplicação (por exemplo, desreplicação taxonômica, desreplicação biológica e desreplicação química, ou qualquer combinação dos mesmos) ou a eliminação de replicatas ou repetições de materiais já conhecidos por sua atividade de ruptura de mudança de pele.

Quando se descobre que um extrato bruto reduz a atividade de um polipeptídeo sFlt-1, ou ligando a um polipeptídeo sFlt-1, é necessário adicionalmente fracionamento do extrato de ligação positivo para isolar constituintes químicos responsáveis pelo efeito observado. Deste modo, a

meta do processo de extração, fracionamento e purificação é a cuidadosa caracterização e identificação de uma entidade química dentro do extrato bruto que reduz a atividade de um polipeptídeo sFlt-1. Métodos de fracionamento e purificação de semelhantes extratos heterogêneos são conhecidos na técnica. Caso desejado, compostos que foi demonstrado serem úteis como terapêuticos para o tratamento de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa mulher são quimicamente modificados de acordo com métodos conhecidos na técnica.

Agentes Terapêuticos

A presente invenção se caracteriza por métodos para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia numa paciente. Preferencialmente o agente terapêutico é administrado durante a gravidez para o tratamento ou a prevenção de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia ou depois da gravidez para tratar pré-eclâmpsia ou eclâmpsia pós-parto. As técnicas e dosagens para administração variam dependendo do tipo de composto (vetor anticorpo, anti-sentido, ácido nucléico e etc.) e são de conhecimento geral dos peritos na especialidade ou são prontamente determinadas.

Os compostos terapêuticos da presente invenção podem ser administrados com um diluente, veículo, ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis, sob forma de unidade de dosagem. A administração pode ser parenteral, intravenosa, subcutânea, oral ou local por meio de injeção direta no líquido amniótico. A libertação intravenosa por meio de infusão contínua é o método preferencial para administração dos compostos terapêuticos da presente invenção.

A composição pode estar sob a forma de uma pílula, comprimido, cápsula, líquido, ou comprimido de libertação sustentada para administração oral; ou um líquido para

administração intravenosa, subcutânea ou parenteral; ou um polímero ou outro veículo de libertação gradual para administração local.

Métodos de conhecimento geral na técnica para preparar formulações são encontrados, por exemplo em "*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*" (20^o ed. ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Formulações para administração parenteral podem conter, por exemplo excipientes, água esterilizada, solução salina, polialquilenoglicóis tais como polietileno glicol, óleos de origem vegetal, ou naftalenos hidrogenados. Podem ser utilizados polímero de lactídeo biocompatível, biodegradável, copolímero de lactídeo/glicolídeo, ou copolímeros de polioxietileno e polioxipropileno para controlar a libertação dos compostos. Formulações nanoparticuladas (por exemplo, nanopartículas biodegradáveis, nanopartículas de lipídeos sólidos, lipossomas) podem ser utilizadas para controlar a biodistribuição dos compostos. Outros sistemas de libertação parenteral potencialmente úteis incluem partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinila, bombas osmóticas, sistemas implantáveis de infusão e lipossomas. A concentração do composto na formulação varia dependendo de uma série de fatores, inclusive a dosagem do fármaco a ser administrado e a via de administração.

O composto pode ser opcionalmente administrado como alguns sais farmaceuticamente aceitáveis, tais como sais de adição de ácido não-tóxicos ou complexos metálicos que são utilizados comumente na indústria farmacêutica. Exemplos de sais de adição de ácido incluem ácidos orgânicos tais como ácidos acético, láctico, pâmico, maléico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzóico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanossulfônico, toluenossulfônico,

ou trifluoroacético ou semelhantes; ácidos poliméricos tais como ácido tânico, carboximetil celulose, ou semelhantes; e ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ou semelhantes. Complexos metálicos incluem zinco, ferro e semelhantes.

Formulação para aplicação oral incluem comprimidos contendo o ingrediente ou ingredientes ativos numa mistura com excipientes não-tóxicos farmacologicamente aceitáveis. Estes excipientes podem ser, por exemplo, diluentes ou cargas inertes (por exemplo, sacarose e sorbitol), agentes lubrificantes, deslizantes e antiaderentes (por exemplo estearato de magnésio estearato de zinco, ácido esteárico, sílicas, óleos vegetais hidrogenados, ou talco).

Formulações para aplicação oral também podem ser proporcionadas como comprimidos mastigáveis, ou como cápsulas de gelatina duras em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte, ou como cápsulas de gelatina moles em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio oleaginoso.

A dosagem e o momento da administração do composto depende de vários fatores clínicos inclusive da saúde global da paciente e da gravidade dos sintomas da pré-eclâmpsia. Em geral, uma vez que seja detectada pré-eclâmpsia ou uma tendência a desenvolver pré-eclâmpsia, usa-se infusão contínua da proteína purificada para tratar ou prevenir progressão posterior da condição. O tratamento pode ser continuado durante um período de tempo variando de 1 a 100 dias, mais preferencialmente de 1 a 60 dias e ainda mais preferencialmente de 1 a 20 dias, ou até o encerramento da gravidez. As dosagens variam dependendo de cada composto e da gravidade da condição e são tituladas para obter uma

concentração sérica sanguínea em estado estacionário variando de 1 a 500 ng/mL de VEGF ou PlGF, ou ambos, preferencialmente de 1 a 100 ng/mL, mais preferencialmente de 5 a 50 ng/mL e ainda mais preferencialmente de 5 a 10 ng/mL de VEGF ou PlGF, ou ambos.

Métodos para aumentar a expressão da proteína VEGF ou PlGF

A presente invenção caracteriza-se por métodos para aumentar os níveis de VEGF e PlGF numa paciente diagnosticada com pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. O aumento dos níveis de VEGF ou PlGF pode ser obtido utilizando várias metodologias diferentes que estão descritas abaixo entre outras.

Proteínas purificadas

Numa forma de realização preferencial da presente invenção, as formas purificadas de VEGF ou PlGF ou ambas são administradas à paciente de modo a tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

VEGF purificadas ou proteínas semelhantes a VEGF incluem qualquer proteína com uma sequência de aminoácidos que é homóloga, mais desejavelmente, substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos de VEGF, ou qualquer membro da família de VEGF, que pode induzir angiogénese ou que é capaz de promover crescimento seletivo de células endoteliais vasculares ou de células endoteliais da veia umbilical. Um exemplo de um composto VEGF purificado é VEGF recombinante humana da Genentech, Inc. (San Francisco, CA).

PlGF purificadas ou proteínas semelhantes a PlGF incluem qualquer proteína com uma sequência de aminoácidos que é

homóloga, mais desejavelmente, substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos de PlGF, ou qualquer membro da família de PlGF, que pode induzir angiogénese ou que é capaz de promover crescimento seletivo de células endoteliais vasculares ou de células endoteliais da veia umbilical. Um exemplo de PlGF purificada disponível comercialmente é PlGF recombinante humana da R&D Systems (catálogo n° 264-PG, R&D Systems, Minneapolis, MN). ThromboGenics Ltd também está desenvolvendo uma forma purificada de PlGF para o tratamento de derrame cerebral isquêmico; presumivelmente esta forma de PlGF seria eficaz para as aplicações descritas na presente invenção.

Compostos terapêuticos que aumentam a atividade de VEGF ou PlGF

A presente invenção proporciona a aplicação de qualquer composto que se sabe que estimula ou aumenta os níveis séricos sanguíneos de VEGF ou PlGF, ou a atividade biológica destes polipeptídeos, para o tratamento ou a prevenção de pré-eclâmpsia numa paciente. Estes compostos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com as proteínas purificadas descritas acima ou qualquer um dos outros métodos utilizados para aumentar os níveis das proteínas VEGF ou PlGF aqui descritos.

Um exemplo de um composto que foi demonstrado que estimula a produção de VEGF é a nicotina. Embora o fumo apresente muitos riscos para a saúde global de uma mulher grávida e seu feto em desenvolvimento, acredita-se que a nicotina por si só seja mais segura do que cigarros e pode ser utilizada para terapia de curta duração em pacientes de alto risco. Exemplos incluem Nicorette (polacrilex de nicotina), que é um produto de goma de nicotina OTC preparado pela

SmithKline Beecham e NicoDerm CQ, que é um emplastro de nicotina OTC preparado pela Hoechst Marion Roussel Inc. (anteriormente Marion Merrell Dow). A nicotina liberada através do tabaco é especificamente excluída dos métodos da invenção onde a paciente também não foi diagnosticada utilizando os métodos da invenção.

A nicotina é administrada depois do diagnóstico de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia utilizando ou o emplastro ou a goma. As dosagens variam dependendo da gravidade da condição e da saúde global da paciente. Em geral, são seguidas as instruções do fabricante para obter um nível sérico de nicotina variando a partir de 5 até 500 ng/mL, mais preferencialmente 5 até 100 ng/mL e ainda mais preferencialmente 50 até 100 ng/mL.

Teofilina é outro exemplo de um composto adicional que pode ser utilizado para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. A teofilina é um broncodilatador o qual é frequentemente utilizado para o tratamento da asma e está disponível sob muitos nomes comerciais (por exemplo, Aerolate Sr, Asmalix, Elxophyllin e etc.) bem como a genérica. Os métodos de administração e as dosagens variam de acordo com cada fabricante e são escolhidos com base na saúde global da paciente e na gravidade da condição. Em geral, as dosagens diárias variam a partir de 1 até 500 mg, mais preferencialmente 100 até 400 mg e ainda mais preferencialmente 250 até 350 mg administradas duas vezes ao dia para obter um nível sérico de teofilina de 5 até 50 µg/mL.

Adenosina é outro exemplo de um composto adicional que pode ser utilizado para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Adenosina (Fujisawa Pharmaceutical Co.) é comumente utilizada como um fármaco anti-hipertensivo. Os

métodos de administração e as dosagens variam de acordo com cada fabricante e são escolhidos com base na saúde global da paciente e na gravidade da condição. Em geral, uma dosagem diária de 50 mg/kg administrada duas vezes ao dia é típica para a adenosina.

Nifedipina é outro exemplo de um composto adicional que pode ser utilizado para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Nifedipina (Bayer Pharmaceuticals) é comumente utilizada como um fármaco anti-hipertensivo. Os métodos de administração e as dosagens variam de acordo com cada fabricante e são escolhidos com base na saúde global da paciente e na gravidade da condição. Em geral, uma dosagem diária de 1-2 mg/kg administrada duas vezes ao dia por via oral ou por via subcutânea é típica para a nifedipina.

Minoxidil é outro exemplo de um composto adicional que pode ser utilizado para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Minoxidil (Pfizer, Inc.) é comumente utilizada como um fármaco anti-hipertensivo. Os métodos de administração e as dosagens variam de acordo com cada fabricante e são escolhidos com base na saúde global da paciente e na gravidade da condição. Em geral, uma dosagem diária de 0,25 a 1,0 mg/kg administrada duas vezes ao dia por via oral ou por via subcutânea é típica para o minoxidil.

Sulfato de magnésio é outro exemplo de um composto adicional que pode ser utilizado para tratar ou prevenir pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Sulfato de magnésio é um fármaco genérico o qual é tipicamente utilizado como um fármaco anti-hipertensivo. Os métodos de administração e as dosagens variam de acordo com cada fabricante e são escolhidos com base na saúde global da paciente e na gravidade da condição. Em geral, uma dosagem diária de 1-2

gm administrada por via intravenosa a cada quatro horas é uma dosagem típica para o sulfato de magnésio.

Além da aplicação de compostos que podem aumentar os níveis séricos de VEGF ou PlGF, a invenção proporciona a aplicação de quaisquer medicações para hipertensão crónica utilizadas em combinação com quaisquer dos compostos dirigidos para VEGF ou PlGF. As medicações utilizadas para o tratamento da hipertensão durante a gravidez incluem metildopa, cloridrato de hidralazina, ou labetalol. Para cada uma destas medicações, os modos de administração e as dosagens são determinados pelo clínico e pelas instruções do fabricante.

Ácidos nucleicos terapêuticos

Um trabalho recente mostrou que a libertação de ácido nucleico (ADN ou ARN) capaz de expressar um mitógeno de células endoteliais tal como VEGF para o sítio de lesão de um vaso sanguíneo induzirá a proliferação e a reendotelialização do vaso lesionado. Apesar da presente invenção não se referir à lesão de vaso sanguíneo, as técnicas para a libertação de ácido nucleico codificando mitógenos de células endoteliais tais como VEGF e PlGF utilizados nestes estudos também podem ser empregadas na presente invenção. Estas técnicas são descritas nas Patentes U.S. N^{os} 5.830.879 e 6.258.787 e são aqui incorporadas, por meio de referência.

Na presente invenção o ácido nucleico pode ser qualquer ácido nucleico (ADN ou ARN) inclusive ADN genómico, ADNc e ARNm, codificando VEGF ou PlGF ou quaisquer membros das famílias VEGF ou PlGF. O ácido nucleico também pode incluir qualquer ácido nucleico o qual codifica uma proteína que foi demonstrado que se liga ao recetor de sFlt-1. Os ácidos

nucléicos codificando a proteína desejada podem ser obtidos utilizando procedimentos de rotina na técnica, por exemplo, ADN recombinante, amplificação por PCR.

Ácidos nucleicos terapêuticos que inibem a expressão de sFlt-1

A presente invenção também se caracteriza pela aplicação de oligómeros de nucleobase anti-sentido para regular para baixo a expressão de ARNm de sFlt-1 diretamente. Ao ligar à sequência de ácidos nucleicos complementar (o filamento de sentido ou codificante), os oligómeros de nucleobase anti-sentido são capazes de inibir a expressão protéica presumivelmente através da clivagem enzimática do filamento de ARN por ARNase H. Preferencialmente o oligómero de nucleobase anti-sentido é capaz de reduzir a expressão da proteína sFlt-1 numa célula que expressa excesso dos níveis de sFlt-1. Preferencialmente, a redução na expressão da proteína sFlt-1 é de no mínimo 10% com relação a células tratadas com um oligonucleotídeo de controlo, mais preferencialmente de 25% e ainda mais preferencialmente de 50% ou mais. Os métodos para selecionar e preparar oligómeros de nucleobase anti-sentido são de conhecimento geral na técnica. Para um exemplo da aplicação dos oligómeros de nucleobase anti-sentido para regular para baixo a expressão de VEGF veja a Patente U.S. N° 6.410.322, aqui incorporada, por meio de referência. Os métodos para testar os níveis de expressão de proteína também são de conhecimento geral na técnica e incluem *Western blotting*, imunoprecipitação e ELISA.

A presente invenção também se caracteriza pela aplicação de ARN de interferência (ARNi) para inibir a expressão de sFlt-1. ARN de interferência (ARNi) é um mecanismo

descoberto recentemente de silenciamento genético pós-transcricional (PTGS) no qual ARN de cadeia dupla (dsARN) correspondente a um gene ou ARNm de interesse é introduzido num organismo resultando na degradação do ARNm correspondente. Na reação de ARNi, tanto os filamentos de sentido quanto anti-sentido de uma molécula de dsARN são processados em pequenos fragmentos de ARN ou segmentos variando de comprimento de 21 a 23 nucleotídeos (nt) e tendo caudas 3' de 2 nucleotídeos. Alternativamente, dsARNs sintéticos, os quais têm 21 a 23 nt de comprimento e têm caudas 3' de 2 nucleotídeos, podem ser sintetizados, purificados e utilizados na reação. Estes dsARNs de 21 a 23 nt são conhecidos como "ARNs guia" ou "ARNs curtos interferentes" (siARNs).

Os dúplexes de siARN em seguida ligam-se a um complexo de nuclease composto de proteínas que visam e destróem ARNms endógenos tendo homologia para o siARN dentro do complexo. Embora a identidade das proteínas dentro do complexo permaneça incerta, a função do complexo é orientar a molécula de ARNm homóloga através de interações de pareamento de bases entre um dos filamentos de siARN e o ARNm endógeno. O ARNm é então clivado aproximadamente 12 nt do terminal 3' do siARN e degradado. Desta maneira, genes específicos podem ser visados e degradados, deste modo resultando numa falta de expressão de proteína do gene visado.

As exigências específicas e modificações de dsARN são descritas no pedido de patente internacional PCT N° WO01/75164. Enquanto as moléculas de dsARN podem variar de comprimento, é mais preferencial usar moléculas de siARN as quais são dsARNs de 21 a 23 nucleotídeos com extremidades de projeções 3' de 2 a 3 nucleotídeos características tipicamente ou (2'-desóxi)timidina ou uracila. As siARNs

tipicamente compreendem um grupo hidroxila 3'. Também pode ser utilizado siARN de filamento único bem como formas de dsARN de extremidade cega. De modo a aumentar adicionalmente a estabilidade do ARN, as projeções 3' podem ser estabilizadas contra degradação. Numa forma de realização semelhante, o ARN é estabilizado incluindo nucleotídeos purina, tais como adenosina ou guanosina. Alternativamente, substituição de nucleotídeos pirimidina por análogos modificados, por exemplo, substituição de projeções de 2 nucleotídeos uridina por (2'-desóxi)timida é tolerada e não afeta a eficiência de ARNi. A ausência de um grupo 2' hidroxila significativamente aumenta a resistência a nuclease da projeção em meio de cultura de tecido.

Alternativamente, siARN pode ser preparado utilizando qualquer um dos métodos determinados no pedido de patente internacional PCT N° WO01/75164 ou utilizando procedimentos de rotina para procedimentos de transcrição *in vitro* de ARN e recozimento de dsARN conforme descrito em Elbashir et al. (*Genes & Dev.*, 15:188-200, 2001). siARNs também são obtidos conforme descrito em Elbashir et al. por meio de incubação de dsARN que corresponde a uma sequência do gene alvo num lisado de *Drosophila* livre de células de embriões de *Drosophila* do blastoderma sincicial sob condições nas quais o dsARN é processado para produzir siARNs de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos, os quais são então isolados utilizando técnicas de conhecimento de peritos da especialidade. Por exemplo eletroforese de gel pode ser utilizada para separar os ARNs de 21-23 nt e os ARNs podem ser em seguida eluídos das fatias de gel. Além disso cromatografia (por exemplo, cromatografia por exclusão de tamanho), centrifugação de gradiente de glicerol e purificação por afinidade com anticorpo podem ser utilizadas para isolar os ARNs de 21 a 23 nt.

Na presente invenção, o dsARN, ou siARN, é complementar à sequência de ARNm de um ARNm de sFlt-1 e pode reduzir ou inibir a expressão de sFlt-1. Preferencialmente, a redução na expressão da proteína sFlt-1 é de no mínimo 10% com relação a células tratadas com um siARN ou dsARN de controle, mais preferencialmente 25% e ainda mais preferencialmente no mínimo 50%. Métodos para avaliar os níveis de expressão de proteína também são de conhecimento geral na técnica e incluem *Western blotting*, imunoprecipitação e ELISA.

Na presente invenção, os ácidos nucleicos utilizados incluem qualquer modificação que aumente a estabilidade ou a função do ácido nucleico de qualquer modo. Exemplos incluem modificação para estrutura principal de fosfato, a ligação internucleotídeo, ou para a porção de açúcar.

Para simplificar a manipulação e o tratamento do ácido nucleico codificando a proteína de ligação de sFlt-1, o ácido nucleico é preferencialmente inserido numa cassete onde é ligado operavelmente a um promotor. O promotor deve ser capaz de orientar a expressão da proteína de ligação de sFlt-1 na célula hospedeira alvo desejada. A seleção de promotores apropriados pode ser realizada prontamente. Preferencialmente, se usaria um promotor de alta expressão. Um exemplo de um promotor adequado é o promotor do citomegalovírus (CMV) de 763 pares de bases. Também podem ser utilizados os promotores do vírus do sarcoma Rous (RSV) (Davis et al., *Hum. Gene Ther.* 4:151-159, 1993) e do vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV). Algumas proteínas podem ser expressas utilizando seu promotor nativo. Outros elementos que podem aumentar a expressão também podem ser incluídos (por exemplo, reforçadores ou um sistema que resulta em maiores níveis de expressão tal como um gene *tat* e elemento *tar*). O vetor recombinante pode ser um vetor de

plasmídeo tal como pUC118, pBR322, ou outros vetores de plasmídeo conhecidos, que incluem, por exemplo, uma origem de replicação de *E. coli* (ver, *Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989*). O vetor de plasmídeo também pode incluir um marcador selecionável tal como o gene β lactamase para resistência a ampicilina, contanto que o polipeptídeo marcador não afete de modo adverso o metabolismo do organismo que está sendo tratado. O cassete também pode ser ligado a uma porção de ligação de ácido nucléico num sistema de libertação sintético, tal como o sistema revelado no pedido de patente internacional PCT N° WO95/22618.

O ácido nucléico pode ser introduzido nas células por quaisquer meios apropriados para o vetor empregado. Muitos dos métodos referidos são de conhecimento geral na técnica (*Sambrook et al., supra* e *Watson et al., "Recombinant ADN", Capítulo 12, 2ª edição, Scientific American Books, 1992*). Vetores recombinantes podem ser transferidos por meio de métodos tais como precipitação de fosfato de cálcio eletroporação, transfecção mediada por lipossoma, pistola de gene, microinjeção, transferência mediada por capsídeo viral, transferência mediada por polibreno, ou fusão de protoplastos. Para uma revisão dos procedimentos para preparação de lipossomas, direcionamento e libertação de conteúdo, veja *Mannino e Gould-Fogerite, (Bio Techniques, 6:682-690, 1988)*, *Felgner e Holm, (Bethesda Res. Lab. Focus, 11:21, 1989)* e *Maurer (Bethesda Res. Lab. Focus, 11:25, 1989)*.

A transferência do vetor recombinante (ou vetor de plasmídeo ou vetores virais) pode ser realizada através de

injeção direta no líquido amniótico ou libertação intravenosa.

Também pode ser utilizada libertação de gene utilizando vetores adenovirais (AAV) ou adeno-associados. Adenovírus estão presentes num grande número de espécies animais, não são muito patogênicos e podem se duplicar igualmente bem em células em divisão e quiescentes. Como regra geral, os adenovírus utilizados para libertação de gene estão carecendo de um ou mais genes necessários para replicação viral. Vetores adenovirais recombinantes defeituosos para replicação utilizados para a libertação de VEGF, PlGF ou qualquer proteína de ligação de sFlt-1, podem ser produzidos de acordo com técnicas conhecidas na técnica (ver Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584, 1992; Stratford-Perricadet et al., *J. Clin. Invest.*, 90:626-630, 1992; e Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155, 1992). Para um exemplo da aplicação da terapia genética *in utero* veja a Patente U.S. N° 6.399.585.

Estão disponíveis uma variedade de métodos para transfecção, ou introdução, de dsARN ou oligonucleotídeos em células de mamíferos. Por exemplo, há vários reagentes de transfecção comercialmente disponíveis incluindo mas não limitados a: TransIT-TKO[®] (Mirus, Cat. N° MIR 2150), Transmessenger[®] (Qiagen, Cat. No. 301525) e Oligofectamine[®] (Invitrogen, Cat. N° MIR 12252-011). Os protocolos para cada reagente de transfecção estão disponíveis nos fabricantes.

Uma vez transferido, o ácido nucléico é expresso pelas células no local da lesão durante um período de tempo suficiente para aumentar os níveis séricos sanguíneos de VEGF, PlGF, ou qualquer outra proteína de ligação de sFlt-

1. Como os vetores contendo o ácido nucléico não são normalmente incorporados no genoma das células, a expressão da proteína de interesse ocorre somente por um tempo limitado. Tipicamente, a proteína é expressa em níveis terapêuticos durante cerca de dois dias até várias semanas, preferencialmente durante cerca de uma a duas semanas. Pode ser utilizada a reaplicação do ADN para proporcionar períodos adicionais de expressão da proteína terapêutica. Exemplos recentes de terapia genética utilizando VEGF para o tratamento de doença vascular em mamíferos podem ser encontrados em Deodato et al. (*Gene Ther.*, 9:777-785, 2002); Isner et al. (*Human Gene Ther.*, 12:1593-1594, 2001); Lai et al. (*Gene Ther.*, 9:804-813, 2002); e revisados em Freedman e Isner (*Ann. Intern. Med.*, 136:54-71, 2002) e Isner JM (*Nature*, 415:234-239, 2002).

Testes para expressão genética e protéica

Os métodos seguintes podem ser utilizados para avaliar a expressão protéica ou genética e determinar a eficácia para qualquer um dos métodos mencionados acima para aumentar os níveis de VEGF, PlGF ou qualquer outra proteína de ligação de sFlt-1, ou para reduzir os níveis de proteína sFlt-1.

O soro sanguíneo da paciente é medido para níveis de VEGF, PlGF, ou qualquer ligante protéico conhecido por ligar a sFlt-1. Os métodos utilizados para medir os níveis séricos de proteínas incluem ELISA, *Western blotting*, ou imunoensaios utilizando anticorpos específicos. Além disso podem ser realizados testes de angiogénese *in vitro* para determinar se o sangue da paciente foi convertido de um estado antiangiogénico para um estado pró-angiogénico. Os testes referidos são descritos acima no Exemplo 2. Um resultado positivo é considerado um aumento de no mínimo

20%, preferencialmente 30%, mais preferencialmente no mínimo 50% e ainda mais preferencialmente no mínimo 60% nos níveis séricos de VEGF, PlGF, ou qualquer ligante protéico que se saiba que ligue a sFlt-1. Um resultado positivo também pode ser considerado conversão de um estado antiangiogénico para um estado pró-angiogénico utilizando o teste de angiogénese *in vitro*.

Existem vários métodos conhecidos na técnica para testar a expressão genética. Alguns exemplos incluem a preparação de ARN das amostras sanguíneas da paciente e a aplicação do ARN para *Northern blotting*, amplificação à base de PCR, ou testes de proteção de ARNse.

Utilização de anticorpos para o tratamento terapêutico

Os elevados níveis de sFlt-1 encontrados nas amostras de soro tiradas de mulheres grávidas sofrendo de pré-eclâmpsia sugere que sFlt-1 tem ação como um "dissipador fisiológico" para ligar a e esgotar as células trofoblásticas e células endoteliais maternas de VEGF e PlGF funcionais. A aplicação de compostos, tais como anticorpos, para ligar a sFlt-1 e bloquear a ligação de VEGF ou PlGF, pode ajudar a prevenir ou tratar pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, produzindo um aumento em VEGF ou PlGF livres. Um aumento semelhante possibilitaria um aumento da proliferação de trofoblastos, migração e angiogénese necessária para o desenvolvimento placentário e a nutrição fetal e para a saúde sistémica das células endoteliais maternas.

A presente invenção proporciona anticorpos que se ligam especificamente ao domínio de ligação de ligante de sFlt-1. Os anticorpos são utilizados para inibir sFlt-1 e acredita-se que o mecanismo mais eficaz seja através do bloqueio

direto dos locais de ligação para VEGF ou PlGF, no entanto, outros mecanismos não podem ser excluídos. São descritos métodos para a preparação e a aplicação de anticorpos para fins terapêuticos em várias patentes inclusive nas Patentes U.S. Números 6.054.297; 5.821.337; 6.365.157; e 6.165.464. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais; são preferenciais anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais, particularmente os derivados de roedores inclusive camundongos, têm sido utilizados para o tratamento de várias doenças; no entanto, há limitações para sua aplicação inclusive a indução de uma resposta de imunoglobulina humana anticamundongo que causa rápido clearance e uma redução na eficácia do tratamento. Por exemplo, uma importante limitação na aplicação clínica dos anticorpos monoclonais de roedores é uma reação antiglobulina durante a terapia (Miller et al., *Blood*, 62:988-995 1983; Schroff et al., *Cancer Res.*, 45:879-885, 1985).

A técnica tem tentado superar este problema construindo anticorpos "quiméricos" nos quais um domínio variável de ligação de antígeno animal é acoplado a um domínio constante humano (Patente U.S. N° 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855, 1984; Boulianne et al., *Nature*, 312:643-646, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 314:268-270, 1985). A produção e a aplicação de semelhantes anticorpos quiméricos estão descritas abaixo.

A inibição competitiva de ligação de ligante a sFlt-1 é útil para a prevenção ou o tratamento de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Anticorpos orientados para sFlt-1 podem bloquear a ligação de VEGF ou PlGF a sFlt-1 resultando em aumento

dos níveis de VEGF ou PlGF. Um aumento semelhante pode resultar num resgate da disfunção endotelial e uma mudança no equilíbrio de fatores pró-angiogénicos/antiangiogénicos em direção à angiogénese.

Um *coktail* dos anticorpos monoclonais da presente invenção pode ser utilizado como um tratamento eficaz para pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. O *coktail* pode incluir tão pouco quanto dois, três, ou quatro diferentes anticorpos ou tantos quanto seis, oito, ou dez diferentes anticorpos. Além disso os anticorpos da presente invenção podem ser combinados com um fármaco anti-hipertensivo (por exemplo, metildopa, cloridreto de hidralazina, ou labetalol) ou qualquer outra medicação utilizada para tratar pré-eclâmpsia, eclâmpsia, ou os sintomas associados com pré-eclâmpsia ou eclâmpsia.

Preparação de Anticorpos

Os anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao recetor sFlt-1 podem ser produzidos por meio de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem o método imunológico descrito por Kohler e Milstein (*Nature*, 256: 495-497, 1975) e Campbell ("*Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas*" em Burdon et al., Eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, 1985), bem como por meio do método de ADN recombinante descrito por Huse et al. (*Science*, 246, 1275-1281, 1989).

Anticorpos monoclonais podem ser preparados a partir de sobrenadantes de culturas de células de hibridoma ou a partir de ascites induzida por inoculação intraperitoneal

de células de hibridoma em camundongos. A técnica do hibridoma descrita originalmente por Kohler e Milstein (*Eur. J. Immunol*, 6, 511-519, 1976) tem sido amplamente aplicada para produzir linhagens de células híbridas que secretam altos níveis de anticorpos monoclonais contra muitos antígenos específicos.

A via e o esquema de imunização do animal hospedeiro ou cultura de células produtoras de anticorpos dos mesmos são geralmente de acordo com técnicas estabelecidas e convencionais para estimulação e produção de anticorpos. Tipicamente, são utilizados camundongos como o modelo de teste, no entanto, qualquer paciente mamífero inclusive pacientes humanas ou células produtoras de anticorpos dos mesmos podem ser manipuladas de acordo com os processos desta invenção para servir como a base para produção de linhagens de células híbridas de mamífero, inclusive ser humano.

Depois da imunização, as células linfóides imunes são fundidas com células de mieloma para gerar uma linhagem celular híbrida que pode ser cultivada e subcultivada indefinidamente, para produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais. Para os fins desta invenção, as células linfóides imunes selecionadas para fusão são linfócitos e sua progênie diferenciada normal, tomada ou de tecido de linfonodos ou de tecido esplênico de animais imunizados. A aplicação de células esplênicas é preferencial, uma vez que oferece uma fonte mais concentrada e conveniente de células produtoras de anticorpos com respeito ao sistema do camundongo. As células de mieloma proporcionam a base para propagação contínua do híbrido fundido. Células de mieloma são células tumorais derivadas de células plasmáticas. Linhagens de células de mieloma murino podem ser obtidas, por exemplo, da *American Type*

Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Também foram descritas linhagens de células de mieloma humano e de heteromieloma de camundongo-humano (Kozbor et al., *J. Immunol.*, 133:3001-3005, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63, 1987).

As linhagens de células híbridas podem ser mantidas *in vitro* em meios de cultura celular. Uma vez que a linhagem de células de hibridoma seja estabelecida, pode ser mantida numa variedade de meios nutricionalmente adequados tais como meio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). Além disso, as linhagens de células híbridas podem ser armazenadas e preservadas em qualquer número de modos convencionais, inclusive congelamento e armazenamento sob nitrogênio líquido. Linhagens de células congeladas podem ser revividas e cultivadas indefinidamente com síntese resumida e secreção de anticorpo monoclonal. O anticorpo secretado é recuperado do sobrenadante da cultura de tecido por meio de métodos convencionais tais como precipitação, cromatografia de permuta iônica, cromatografia por afinidade, ou semelhantes.

O anticorpo pode ser preparado em qualquer mamífero, inclusive camundongos, ratos, coelhos, cabras e seres humanos. O anticorpo pode ser um membro de uma das seguintes classes de imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE e as subclasses das mesmas e preferencialmente é um anticorpo de IgG.

Apesar do animal preferencial para produção de anticorpos monoclonais ser o camundongo, a invenção não está limitada ao mesmo; de fato, podem ser utilizados anticorpos humanos e podem se comprovar preferenciais. Os anticorpos referidos

podem ser obtidos utilizando hibridomas humanos (Cole et al., "*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*", Alan R. Liss Inc., p. 77-96, 1985). Na presente invenção, podem ser utilizadas técnicas desenvolvidas para a produção de anticorpos quiméricos unindo os genes de uma molécula de anticorpo de camundongo de apropriada especificidade antigénica junto com genes de uma molécula de anticorpo humano (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda et al., *Nature* 314, 452-454, 1985); os anticorpos referidos estão dentro do âmbito desta invenção e são descritos abaixo.

Como outra alternativa para a técnica de fusão celular, células B imortalizadas do vírus Epstein-Barr (EBV) são utilizadas para produzir os anticorpos monoclonais da presente invenção (Crawford D. et al., *J. of Gen. Virol.*, 64:697-700, 1983; Kozbor e Roder, *J. Immunol.*, 4:1275-1280, 1981; Kozbor et al., *Methods in Enzymology*, 121:120-140, 1986). Em geral, o procedimento consiste em isolar o vírus Epstein-Barr de uma fonte adequada, geralmente uma linhagem de células infectadas e expor as células secretoras de anticorpos alvos a sobrenadantes contendo o vírus. As células são lavadas e cultivadas num meio de cultura celular apropriado. Subsequentemente, células transformadas viralmente presentes na cultura celular podem ser identificadas pela presença do antígeno nuclear viral Epstein-Barr e células secretoras de anticorpos transformadas podem ser identificadas utilizando métodos de rotina conhecidos na técnica. Outros métodos para produção de anticorpos monoclonais, tais como ADN recombinante, também são incluídos dentro do âmbito da invenção.

Preparação de Imunógenos sFlt-1

sFlt-1 podem ser utilizados por si só como um imunógeno, ou podem ser fixados a uma proteína de veículo ou a outros objetos, tais como contas de sefarose. sFlt-1 podem ser purificados a partir de células que se sabe que expressam a proteína endógena tais como células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC; Kendall et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 226:324-328, 1996). Adicionalmente, moléculas de ácido nucléico que codificam sFlt-1, ou porções da mesma, pode ser inserida em vetores conhecidos para expressão em células hospedeiras utilizando técnicas de ADN recombinante de rotina. Células hospedeiras adequadas para expressão de sFlt-1 incluem células de baculovírus (por exemplo, células Sf9), células bacterianas (por exemplo, *E. coli*) e células de mamíferos (por exemplo, células NIH3T3).

Além disso, peptídeos podem ser sintetizados e utilizados como imunógenos. Os métodos para preparar anticorpo para peptídeos são de conhecimento geral na técnica e geralmente requerem acoplamento do peptídeo a uma molécula de veículo adequada, tal como albumina sérica. Peptídeos incluem qualquer sequência de aminoácidos que seja substancialmente idêntica a qualquer parte da sequência de aminoácidos sFlt-1 correspondente ao número de acesso no GenBank U01134. Os peptídeos podem ter qualquer comprimento, preferencialmente 10 aminoácidos ou mais, mais preferencialmente 25 aminoácidos ou mais e ainda mais preferencialmente 40, 50, 60, 70, 80, ou 100 aminoácidos ou mais. Preferencialmente, as sequências de aminoácidos são no mínimo 60%, mais preferencialmente 85% e, ainda mais preferencialmente 95% idênticas à sequência de U01134. Os peptídeos podem ser obtidos comercialmente ou preparados utilizando técnicas de conhecimento geral na técnica, tais como, por exemplo, o

método de fase sólida de Merrifield (*Science*, 232:341-347, 1985). O procedimento pode usar sintetizadores comercialmente disponíveis tais como uma máquina de peptídeos automatizada Biosearch 9500, com clivagem dos aminoácidos bloqueados sendo obtida com fluoreto de hidrogênio e os peptídeos purificados por meio de HPLC do preparativo utilizando um instrumento Waters Delta Prep 3000, numa coluna de 15-20 μ m Vydac C4 PrepPAK.

Equivalentes funcionais de anticorpos

A invenção também inclui equivalentes funcionais dos anticorpos aqui descritos. Equivalentes funcionais incluem polipeptídeos com sequências de aminoácidos substancialmente idênticas à sequência de aminoácidos das regiões variáveis ou hipervariáveis dos anticorpos da invenção. Equivalentes funcionais têm características de ligação comparáveis a dos anticorpos e incluem, por exemplo, anticorpos quimerizados, humanizados e de cadeia única bem como fragmentos dos mesmos. Os métodos para produzir os equivalentes funcionais referidos são revelados na Publicação PCT N° W093/21319; no Pedido de Patente Européia N°. 239.400; na Publicação PCT N° W089/09622; no Pedido de Patente Européia N° 338.745; no Pedido de Patente Européia N° 332.424; e na Patente U.S. N° 4.816.567.

Os anticorpos quimerizados preferencialmente têm regiões constantes derivadas substancialmente ou exclusivamente de regiões constantes de anticorpos humanos e regiões variáveis derivadas substancialmente ou exclusivamente da sequência da região variável de um mamífero diferente de um ser humano. Os anticorpos humanizados referidos são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulinas ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação de antígeno de anticorpos)

os quais contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Os métodos para humanizar anticorpos não-humanos são de conhecimento geral na técnica (para revisões veja Vaswani e Hamilton, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 81:105-119, 1998 e Carter, *Nature Reviews Cancer*, 1:118-129, 2001). De modo geral, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos aminoácidos introduzidos no mesmo de uma fonte que é não-humana. Estes resíduos aminoácidos não-humanos são frequentemente referidos como resíduos de importação, os quais são tipicamente tirados de um domínio variável de importação. A humanização pode ser realizada essencialmente seguindo os métodos conhecidos na técnica (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988; e Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 1988), substituindo sequências CDRs de roedores ou outras sequências CDR pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Por conseguinte, os anticorpos humanizados referidos são anticorpos quiméricos em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana (veja por exemplo, a Patente U.S. N° 4.816.567). Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos CDR e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores (Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992).

Métodos adicionais para a preparação de anticorpos humanizados podem ser encontrados nas Patentes U.S. N°s 5.821.337 e 6.054.297 e em Carter, (*supra*) os quais são todos aqui incorporados, por meio de referência. O anticorpo humanizado é selecionado entre qualquer classe de imunoglobulinas, inclusive IgM, IgG, IgD, IgA e IgE e qualquer isótipo, inclusive IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Onde a

atividade citotóxica não é necessária, tal como na presente invenção, o domínio constante é preferencialmente da classe IgG₂. O anticorpo humanizado pode compreender sequências de mais de uma classe ou isótipo e a seleção de domínios constantes particulares para otimizar funções efetoras desejadas está dentro do conhecimento regular da técnica.

Anticorpos humanos também podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica, inclusive bibliotecas de apresentação de fago (Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991 e Winter et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-455, 1994). As técnicas de Cole et al. e Boerner et al. também são úteis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., *supra*; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86-95, 1991).

Mamíferos adequados diferentes de um ser humano incluem qualquer mamífero a partir do qual podem ser preparados anticorpos monoclonais. Exemplos de mamíferos diferentes de um ser humano incluem, por exemplo, um coelho, rato, camundongo, cavalo, cabra, ou primata; é preferencial um camundongo.

Equivalentes funcionais de anticorpos também incluem fragmentos de anticorpos de cadeia única, também conhecidos como anticorpos de cadeia única (scFvs). Os fragmentos de anticorpos de cadeia única são polipeptídeos recombinantes os quais tipicamente ligam antígenos ou recetores; estes fragmentos contêm no mínimo um fragmento de uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável de anticorpo (V_H) amarrado a no mínimo um fragmento de uma sequência cadeia leve variável de anticorpo (V_L) com ou sem um ou mais ligantes interconectantes. Um ligante semelhante pode ser um peptídeo curto e flexível selecionado para assegurar que

ocorra o apropriado dobramento tridimensional dos domínios V_L e V_H uma vez que sejam ligados de modo a manter a especificidade de ligação da molécula alvo do anticorpo inteiro do qual é derivado o fragmento de anticorpo de cadeia única. De modo geral, o terminal carboxil da sequência V_L ou V_H é ligado de modo covalente por um ligante peptídico semelhante ao terminal de aminoácido de uma sequência V_L e V_H complementar. Fragmentos de anticorpos de cadeia única podem ser produzidos por meio de clonagem molecular, biblioteca de apresentação de fagos de anticorpos ou técnicas semelhantes. Estas proteínas podem ser produzidas ou em células eucarióticas ou em células procarióticas, inclusive bactérias.

Os fragmentos de anticorpos de cadeia única contêm sequências de aminoácidos tendo, no mínimo, uma das regiões variáveis ou CDRs dos anticorpos inteiros aqui descritos, mas carecem de parte ou todos os domínios constantes destes anticorpos. Estes domínios constantes não são necessários para ligação de antígeno, mas constituem uma porção importante da estrutura dos anticorpos inteiros. Fragmentos de anticorpos de cadeia única podem portanto superar alguns dos problemas associados com o uso de anticorpos contendo parte ou todo um domínio constante. Por exemplo, fragmentos de anticorpos de cadeia única tendem a ser livres de interações indesejadas entre moléculas biológicas e a região constante de cadeia pesada, ou outra atividade biológica indesejada. Adicionalmente, fragmentos de anticorpos de cadeia única são consideravelmente menores do que os anticorpos inteiros e portanto podem ter maior permeabilidade capilar do que anticorpos inteiros, possibilitando que fragmentos de anticorpos de cadeia única localizem e liguem a sítios de ligação de antígeno alvo de modo mais eficaz. Além disso, fragmentos de anticorpos podem ser produzidos numa escala relativamente grande em

células procarióticas, deste modo facilitando sua produção. Além disso, o tamanho relativamente pequeno dos fragmentos de anticorpos de cadeia única faz com que seja menos provável que provoque uma reação imune num recetor do que anticorpos inteiros.

Equivalentes funcionais, adicionalmente, incluem fragmentos de anticorpos que têm as mesmas características de ligação ou características comparáveis às do anticorpo inteiro. Os fragmentos referidos podem conter um ou ambos os fragmentos Fab ou o fragmento $F(ab')_2$. Preferencialmente os fragmentos de anticorpos contêm todos os seis CDRs do anticorpo inteiro embora fragmentos contendo menos de todas as regiões referidas, tais como três, quatro ou cinco CDRs, também são funcionais.

Além disso, os equivalentes funcionais podem ser ou podem combinar membros de qualquer uma das classes de imunoglobulina seguintes: IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE e as subclasses das mesmas.

Preparação de Equivalentes Funcionais de Anticorpos

Equivalentes de anticorpos são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, fragmentos de anticorpos podem ser preparados enzimaticamente a partir de anticorpos inteiros. Preferencialmente equivalentes de anticorpos são preparados a partir de ADN codificando tais equivalentes. ADN codificando fragmentos de anticorpos podem ser preparados eliminando tudo exceto a porção desejada do ADN que codifica o anticorpo de comprimento total.

ADN codificante de anticorpos quimerizados podem ser preparados através da recombinação do ADN codificante,

substancialmente ou exclusivamente, de regiões constantes humanas e ADN codificante de regiões variáveis derivadas substancialmente ou exclusivamente da sequência da região variável de um mamífero diferente de um ser humano. ADN codificante de anticorpos humanizados podem ser preparados através da recombinação de ADN codificante de regiões constantes e de regiões variáveis diferentes dos CDRs derivados substancialmente ou exclusivamente das regiões de anticorpos humanos correspondentes e ADN codificante de CDRs derivados, substancialmente ou exclusivamente, de um mamífero diferente de um ser humano.

Fontes adequadas de moléculas de ADN que codificam fragmentos de anticorpos incluem células, tais como hibridomas, que expressam o anticorpo de comprimento total. Os fragmentos podem ser utilizados eles mesmos como equivalentes de anticorpos, ou podem ser recombinados em equivalentes, conforme descrito acima.

As eliminações de ADN e recombinações descritas nesta seção podem ser realizadas por meio de métodos conhecidos, tais como os descritos nos pedidos de patente publicados listados acima.

Triagem e Seleção de Anticorpos

Os anticorpos monoclonais são isolados e purificados utilizando métodos conhecidos na técnica de rotina. Por exemplo, anticorpos podem ser triados utilizando métodos conhecidos na técnica de rotina tais como ELISA contra o antígeno peptídico sFlt-1 ou análise western blot. Exemplos de semelhantes técnicas são descritas nos Exemplos II e III da Patente U.S. N° 6.365.157, aqui incorporada por meio de referência.

Aplicações Terapêuticas de Anticorpos

Quando utilizados *in vivo* para o tratamento ou a prevenção de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, os anticorpos da presente invenção são administrados à paciente em quantidades terapêuticamente eficazes. Preferencialmente, os anticorpos são administrados por via parenteral ou por via intravenosa por meio de infusão contínua. A dose e o regime de dosagem dependem da gravidade da doença e da saúde geral da paciente. A quantidade de anticorpo administrado é tipicamente dentro do alcance de cerca de 0,01 a cerca de 10 mg/kg de peso da paciente.

Para administração parenteral, os anticorpos são formulados numa forma injetável de unidade de dosagem (solução, suspensão emulsão) em associação com um veículo parenteral farmacologicamente aceitável. Os veículos referidos são inerentemente não-tóxicos e não-terapêuticos. Exemplos de semelhantes veículos são água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e albumina sérica humana a 5%. Também podem ser utilizados veículos não-aquosos tais como óleos fixos e oleato de etilo. Lipossomas podem ser utilizados como carregadores. O veículo pode conter quantidades menores de aditivos tais como substâncias que aumentam a isotonicidade e a estabilidade química, por exemplo, tampões e conservantes. Os anticorpos tipicamente são formulados em semelhantes veículos em concentrações de cerca de 1 mg/mL a 10 mg/mL.

Compostos terapêuticos que inibem sFlt-1

Dado que os níveis de sFlt-1 aumentam em pacientes tendo pré-eclâmpsia, eclâmpsia, ou tendo uma tendência a desenvolver tais condições, qualquer agente que reduz a expressão de uma molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo

sFlt-1 é útil nos métodos da invenção. Os agentes referidos incluem pequenas moléculas que podem romper a ligação de sFlt-1 a VEGF ou PlGF, oligómeros de nucleobase anti-sentido e dsARNs utilizados para mediar interferência de ARN.

Combinação de terapias

Opcionalmente, um agente terapêutico contra pré-eclâmpsia ou eclâmpsia pode ser administrado em combinação com qualquer outra terapia de rotina contra pré-eclâmpsia ou eclâmpsia; tais métodos são de conhecimento do perito na especialidade e são aqui descritos. Um agente terapêutico contra pré-eclâmpsia ou eclâmpsia da invenção pode ser administrado em combinação com qualquer composto que aumenta a atividade de um caminho de VEGF. Exemplos não-limitantes de agentes, os quais também induzem produção endógena de VEGF incluem nicotina, Minoxidil, Nifedipina, Adenosina, Sulfato de Magnésio e teofilina. Numa forma de realização, pode ser utilizada proteína PlGF em combinação com quaisquer dos agentes que induzem produção endógena de VEGF listados acima.

Monitoração da paciente

O estado de doença ou tratamento de uma paciente tendo pré-eclâmpsia, ou uma tendência a desenvolver uma condição semelhante pode ser monitorado utilizando os métodos e composições da invenção. Numa forma de realização, é monitorada a expressão de um polipeptídeo sFlt-1, VEGF, ou PlGF presente num fluido corporal, tal como, plasma. Tal monitoração pode ser útil, por exemplo, na avaliação da eficácia de um fármaco em particular numa paciente ou na avaliação da progressão da doença. Terapêuticos que reduzem a expressão de uma molécula de ácido nucléico ou

polipeptídeo sFlt-1 ou que aumentam a expressão de uma molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo VEGF ou PlGF são considerados particularmente úteis na invenção.

Lisboa, 31 de Dezembro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de diagnóstico de uma paciente humana grávida, tendo ou tendo uma tendência para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, em que o referido método compreende a medição do nível do polipéptido sFlt-1 numa amostra de uma paciente, em que a referida amostra é soro ou plasma, e a comparação do nível de sFlt-1 com o nível de sFlt-1 numa amostra de referência, em que um aumento no nível do polipeptídeo sFlt-1 em relação à referida referência é um indicador de diagnóstico de pré-eclâmpsia ou uma tendência para desenvolver pré-eclâmpsia.
2. Um método de diagnóstico de uma paciente humana grávida, tendo ou tendo uma tendência para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, através da medição dos níveis dos polipeptídeos sFlt-1, VEGF e PlGF numa amostra de uma paciente, em que a referida amostra é soro ou plasma, e através do cálculo da relação entre os referidos níveis de sFlt-1, VEGF ou PlGF numa amostra da paciente, utilizando a métrica $[sFlt-1/(PlGF+VEGF)]$, em que um aumento na relação entre os referidos níveis de uma amostra de uma paciente em relação a uma amostra de referência, diagnostica pré-eclâmpsia ou uma propensão para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia na referida paciente.
3. Um método como reivindicado na reivindicação 1 ou 2, em que um nível do polipéptido sFlt superior a 2 ng/mL é um indicador de diagnóstico de pré-eclâmpsia.
4. O método da reivindicação 1 ou 2, em que a referida paciente está no primeiro trimestre de gravidez.

5. O método da reivindicação 1 ou 2, em que a referida paciente está no segundo trimestre da gravidez.
6. O método da reivindicação 1 ou 2, em que a referida paciente está no início do terceiro trimestre de gravidez.
7. O método da reivindicação 1 ou 2 em que a referida medição é realizada utilizando um ensaio imunológico.
8. O método da reivindicação 7, em que o referido ensaio imunológico é um ensaio ELISA.
9. O método da reivindicação 1 ou 2 em que o referido sFlt-1 é o nível de sFlt-1 livre, sFlt-1 ligado ou sFlt-1 total.
10. O método de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 4, 5 ou 6, em que a amostra é soro.
11. Um método de diagnóstico de uma paciente grávida como tendo ou tendo uma tendência para desenvolver pré-eclâmpsia, o referido método que compreende a medição do nível da molécula de ácido nucleico sFlt-1 numa amostra da referida paciente e comparando-a com uma amostra de referência, em que a referida amostra da paciente é soro ou plasma, e em que um aumento do nível do ácido nucleico sFlt-1 é um indicador de diagnóstico de pré-eclâmpsia ou da tendência para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia.
12. O método da reivindicação 1, 2 ou 11, em que a referida medição de níveis é realizada em duas ou mais ocasiões e uma mudança nos referidos níveis entre

medições é um indicador de diagnóstico de pré-eclâmpsia.

13. Um método de diagnóstico uma paciente humana grávida tendo ou tendo uma tendência para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, compreendendo o referido método a medição do nível de polipéptido livre PlGF numa amostra de soro ou plasma da referida paciente, em que a referida paciente está no primeiro trimestre da gravidez e que uma diminuição estatisticamente significativa em PlGF livre é um preditor de pré-eclâmpsia.

14. Um método de diagnóstico de uma paciente humana grávida tendo pré-eclâmpsia, em que o referido método compreende a medição do nível de PlGF livre e creatinina na amostra de urina de uma paciente, em que uma diminuição na proporção de PlGF para creatinina na amostra, quando comparado a um controlo é um indicador de diagnóstico de pré-eclâmpsia.

Lisboa, 31 de Dezembro de 2013

FIG. 1

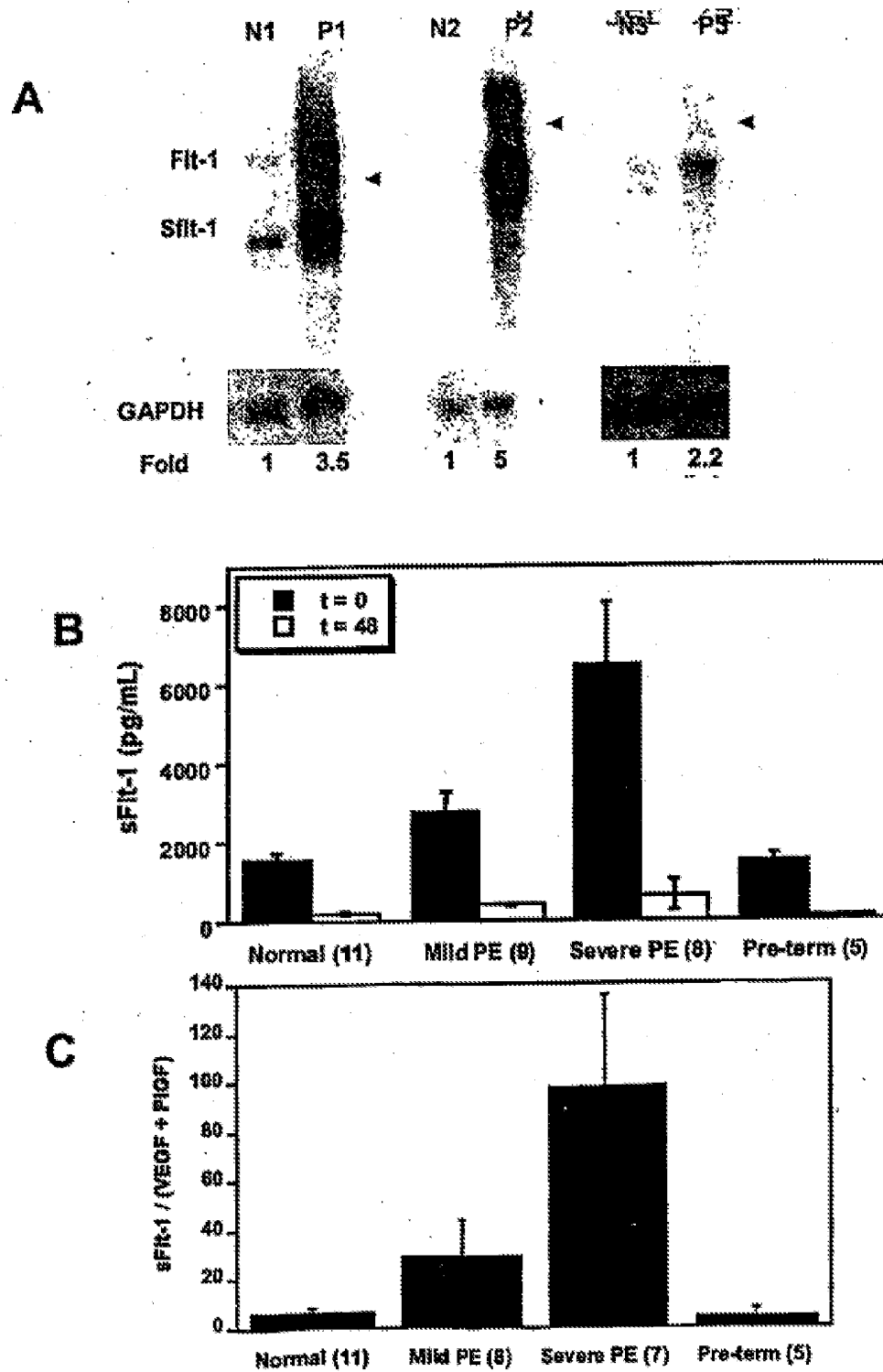


FIG. 2

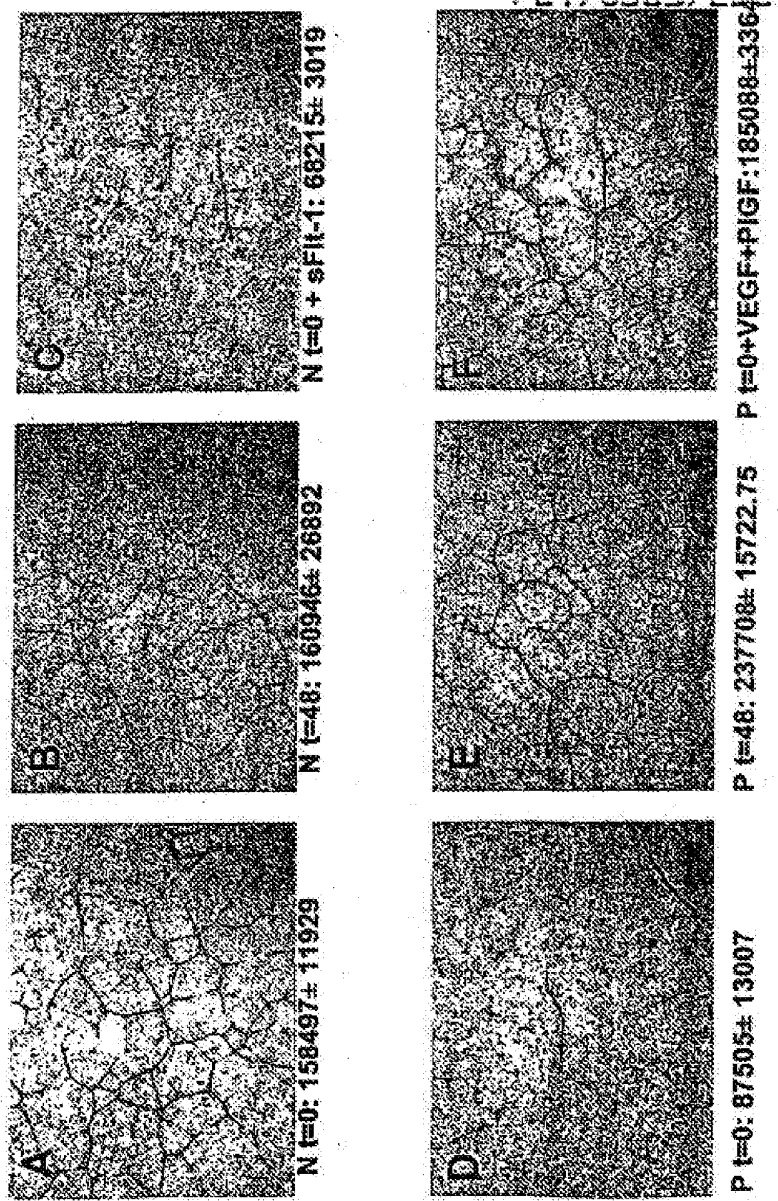


FIG. 3

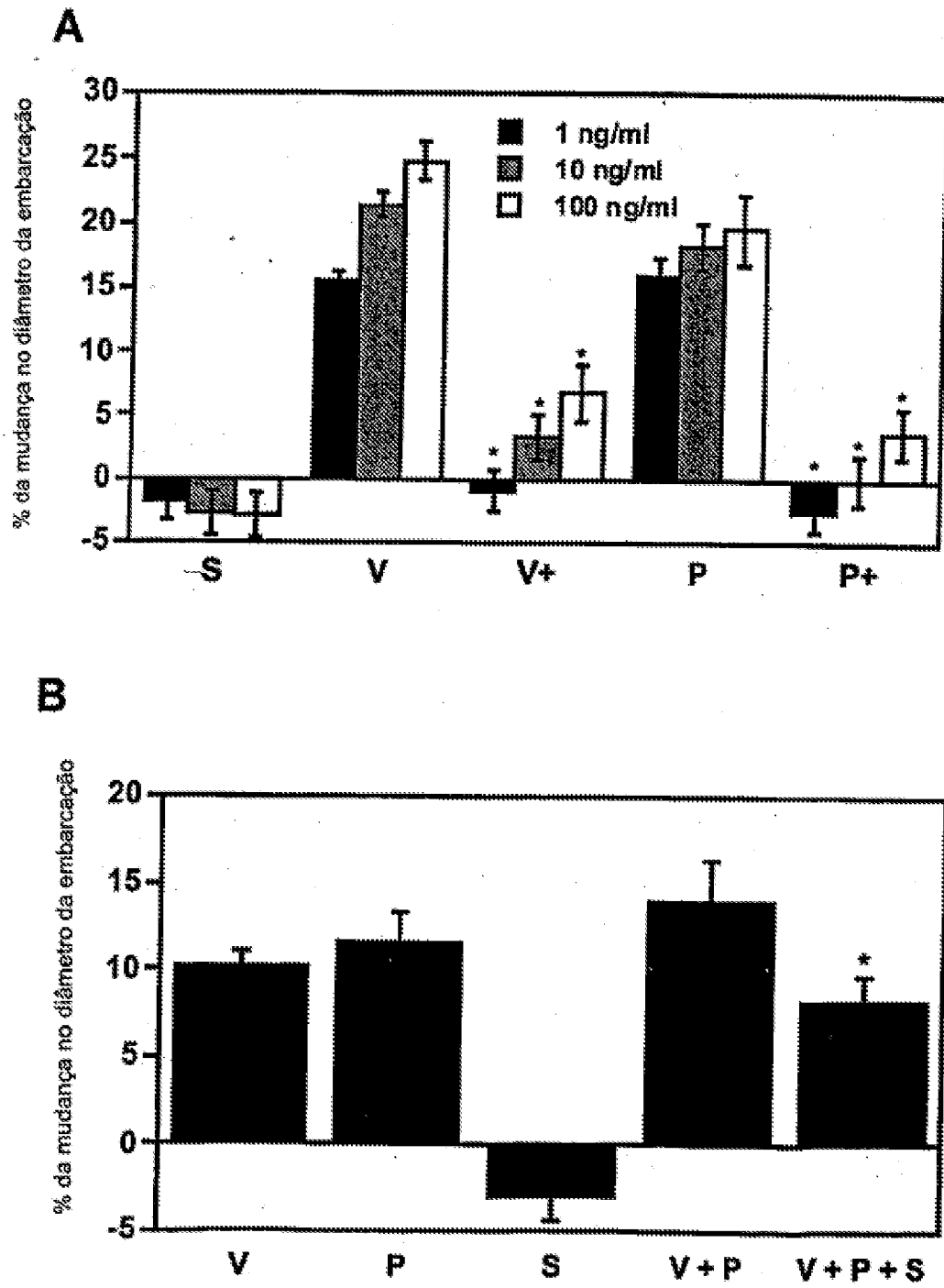


FIG. 4A

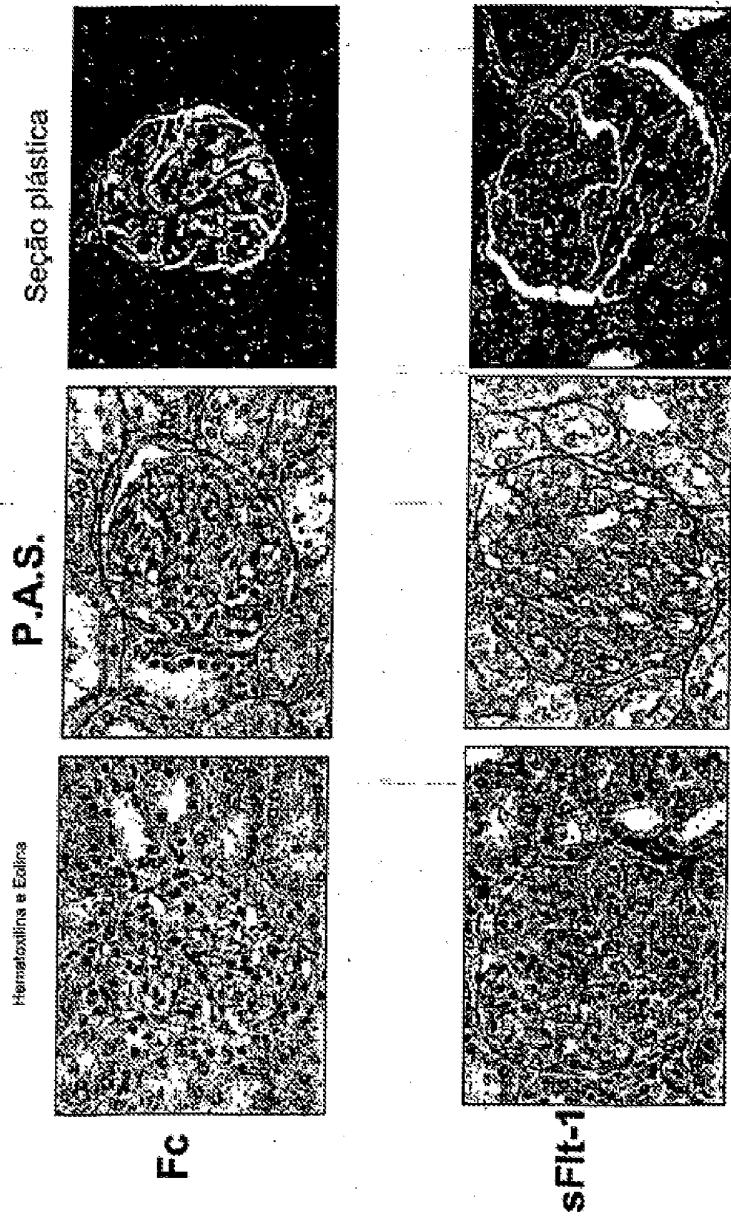


FIG. 4B

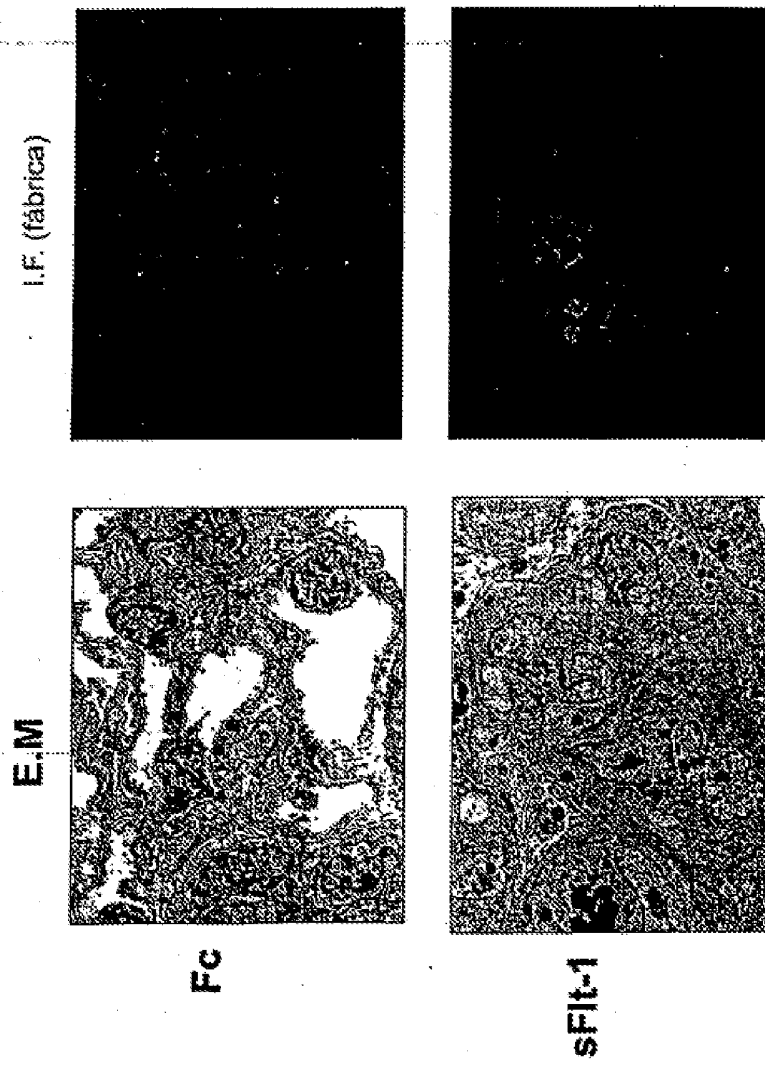


FIG. 5A

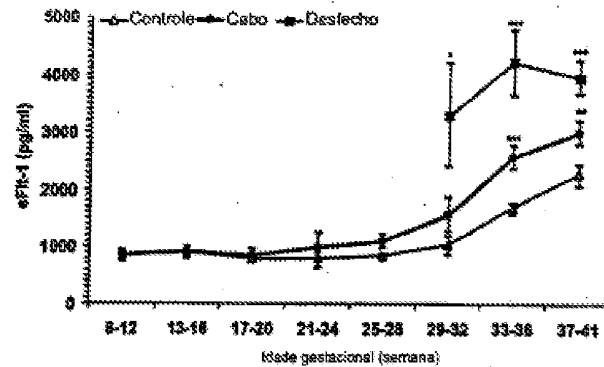


FIG. 5B

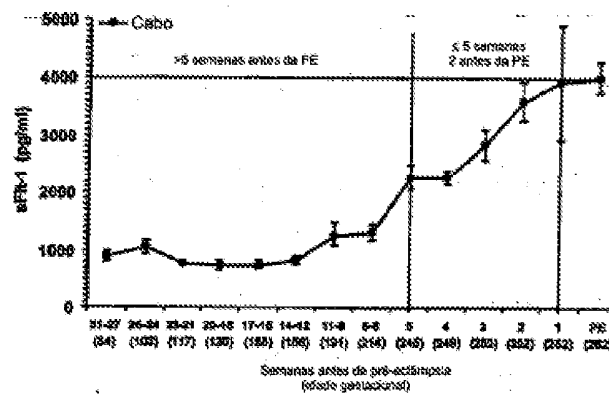


FIG. 5C

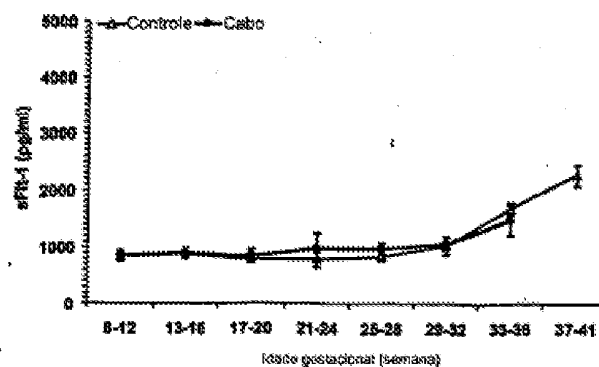


FIG. 6A

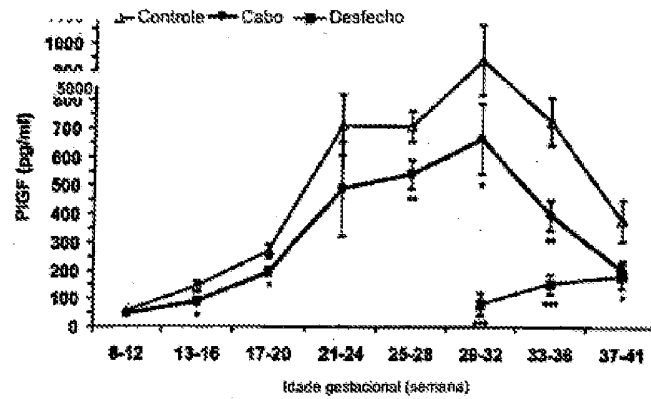


FIG. 6B

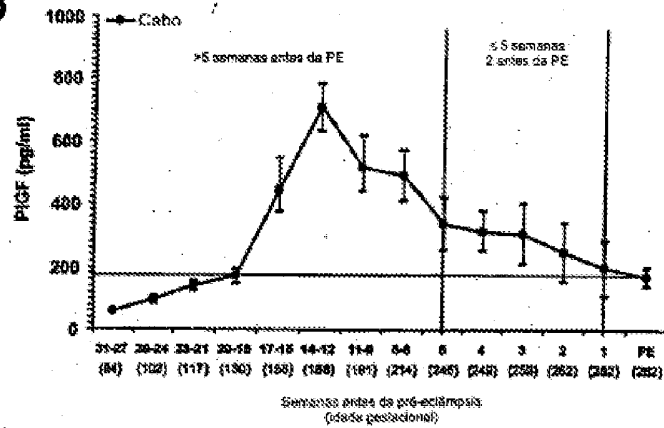


FIG. 6C

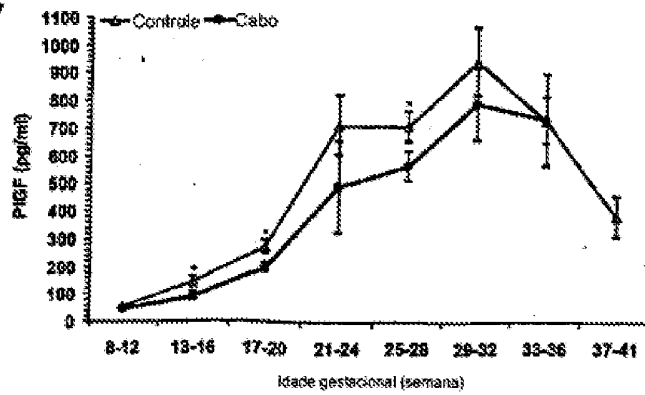


FIG. 7A

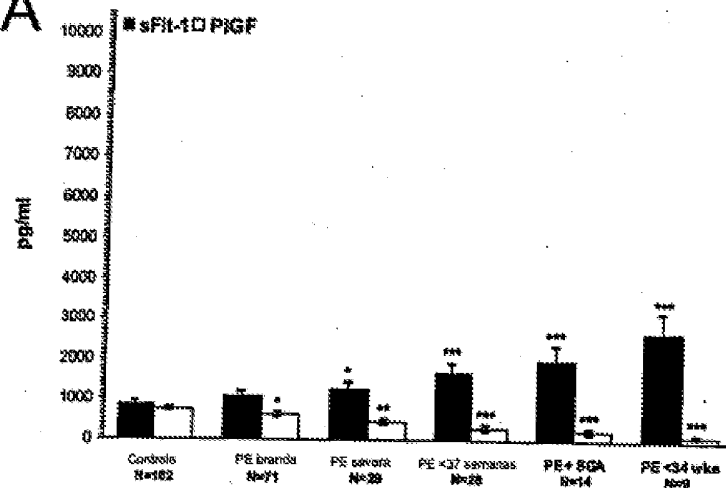


FIG. 7B

