



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-40125

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR PREECLAMPSIA O
ECLAMPSIA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER

DOMICILIO

MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

FW 24-04-2007

801, (colón)

(FORMA P-10)

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040125-00000-0000

Fecha: 2007-04-23 16:08:08

Tra. 11 PATENTEIYI

Act 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 211**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE****PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:****1**☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.**2****SOLICITANTE
(71)**Nombre: **BETH ISRAEL DEACONESS
MEDICAL CENTER**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estados de Massachusetts,
Estados Unidos de América.Dirección: 330 Brookline Avenue,
Boston,
Massachusetts 02215,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Boston,
Massachusetts 02215,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

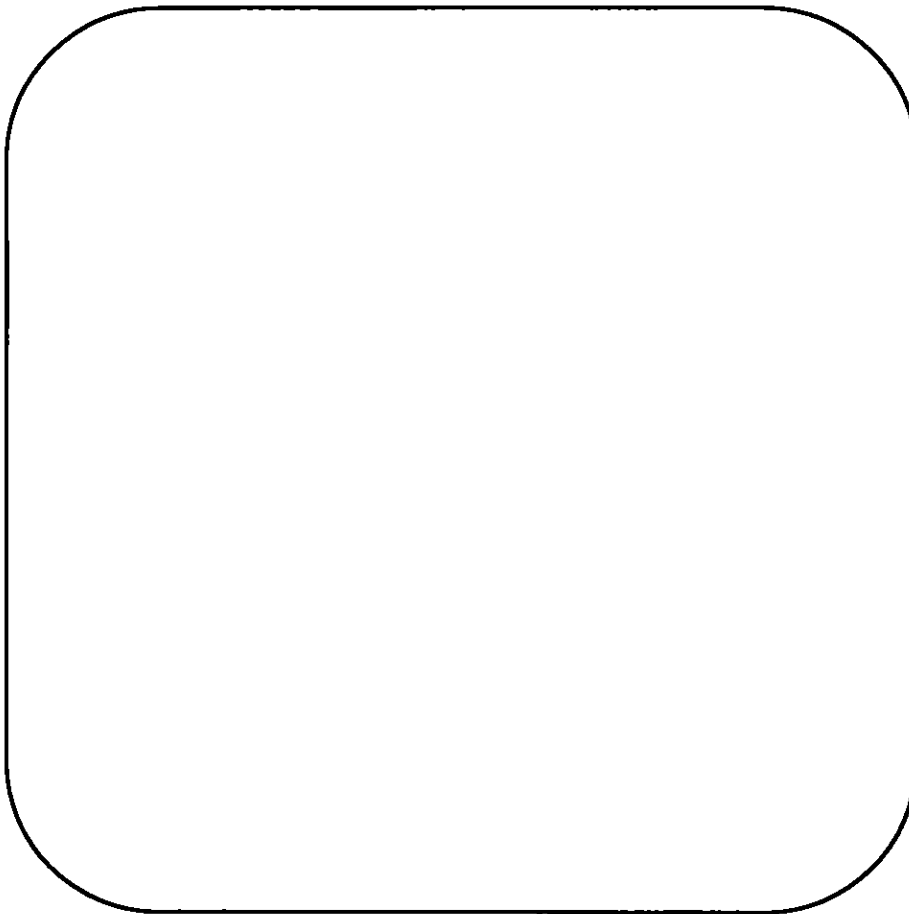
Número 438.019 T.P 31.929**4****INVENTOR (ES)
(72)**1. **Ananth KARUMANCHI**
117 Woodcliff Road,
Chestnut Hill,
Massachusetts 02467,
Estados Unidos de América2. **Vikas SUKHATME**
36 Sky View Circle,
Newton,
Massachusetts 02459,
Estados Unidos de América**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/US2005/034483Fecha: 26 de septiembre de 2005Publicación Internacional No. WO 2006/034507 A2Fecha: 30 de marzo de 2006**6****Título (54)****METODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR PREECLAMPSIA
O ECLAMPSIA****7****Clasificación Internacional (51) A61K 39/395****8****Prioridad****(33) País de Origen****(32) Fecha****(31) Número de Solicitud**SI ☒ NO ☐US24 de septiembre de 200460/613.170**9****C mprobante de pago No.: 07-28.128****Fecha: 9 de abril de 2007**

10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

MSM

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/034507 A2

Descripción:

Páginas 73 en el idioma original

Páginas 92 en español

Reivindicaciones: Número (s) 93

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 March 2006 (30.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/034507 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/455 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01) A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/523 (2006.01) A61K 31/513 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/034483

(22) International Filing Date:

26 September 2005 (26.09.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/613,170 24 September 2004 (24.09.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BETH ISRAEL - DEACONESS MEDICAL CENTER [US/US]; 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KARUMANCHI, S., Amnith [US/US]; 117 Woodcliff Road, Chestnut Hill, MA 02467 (US). SUKHATME, Vikas [US/US]; 36 Sky View Circle, Newton, MA 02459 (US).

(74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina, Ph., D.; Clark & Biebing LLP, 101 Federal Street, Boston, MA 02110 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/034507 A2

(54) Title: METHODS OF DIAGNOSING AND TREATING COMPLICATIONS OF PREGNANCY

(57) Abstract: Disclosed herein are methods for diagnosing a pregnancy related hypertensive disorder or a propensity to develop a pregnancy related hypertensive disorder by measuring the level or biological activity of soluble endoglin. Also disclosed herein are methods for treating a pregnancy related hypertensive disorder, such as pre-eclampsia and eclampsia, using compounds that alter soluble endoglin levels or biological activity.

5 **METHODS OF DIAGNOSING AND TREATING
 PRE-ECLAMPSIA OR ECLAMPSIA**

Statement as to Federally Sponsored Research

 This invention was made in part with support from the Government through
10 NIH Grant No. DK 064255. The Government has certain rights in the invention.

Field of the Invention

 In general, this invention relates to the detection and treatment of subjects
having pre-eclampsia or eclampsia.

15

Background of the Invention

 Pre-eclampsia is a syndrome of hypertension, edema, and proteinuria that
affects 5 to 10% of pregnancies and results in substantial maternal and fetal
morbidity and mortality. Pre-eclampsia accounts for at least 200,000 maternal
20 deaths worldwide per year. The symptoms of pre-eclampsia typically appear after
the 20th week of pregnancy and are usually detected by routine measuring of the
woman's blood pressure and urine. However, these monitoring methods are
ineffective for diagnosis of the syndrome at an early stage, which could reduce the
risk to the subject or developing fetus, if an effective treatment were available.

25 Currently there are no known cures for pre-eclampsia. Pre-eclampsia can
vary in severity from mild to life threatening. A mild form of pre-eclampsia can
be treated with bed rest and frequent monitoring. For moderate to severe cases,
hospitalization is recommended and blood pressure medication or anticonvulsant
medications to prevent seizures are prescribed. If the condition becomes life
30 threatening to the mother or the baby the pregnancy is terminated and the baby is
delivered pre-term.

6

The proper development of the fetus and the placenta is mediated by several growth factors or angiogenic factors. One of these angiogenic factors is endoglin, also known as CD105. Endoglin is a homodimeric cell membrane glycoprotein that is predominantly expressed on endothelial cells such as syncytiotrophoblasts, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and on vascular endothelial cells. Endoglin shares sequence identity with betaglycan, a transforming growth factor (TGF)- β receptor type III. Endoglin has been shown to be a regulatory component of the TGF- β receptor complex, which modulates angiogenesis, proliferation, differentiation, and apoptosis. Endoglin also binds several other members of the TGF- β superfamily including activin-A, bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7. In particular, endoglin binds TGF- β 1 and TGF- β 3 with high affinity and forms heterotrimeric associations with the TGF- β signaling receptors types I and II. Mutations in the coding region of the endoglin gene are responsible for haemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1), a dominantly inherited vascular disorder characterized by multisystemic vascular dysplasia and recurrent hemorrhage. A soluble form of endoglin has also been identified and found to be present at increased levels in patients with metastatic breast and colorectal cancer; however, the exact functional role of the soluble endoglin in the pathogenesis of cancer is unclear. Soluble endoglin production has not been reported to be associated with pre-eclampsia or normal pregnancy.

Several factors have been reported to have an association with fetal and placental development and, more specifically, with pre-eclampsia. They include vascular endothelial growth factor (VEGF), soluble form of the Flt-1 receptor (sFlt-1), and placental growth factor (PlGF). VEGF is an endothelial cell-specific mitogen, an angiogenic inducer, and a mediator of vascular permeability. VEGF has also been shown to be important for glomerular capillary repair. VEGF binds as a homodimer to one of two homologous membrane-spanning tyrosine kinase receptors, the *fms*-like tyrosine kinase (Flt-1) and the kinase domain receptor (KDR), which are differentially expressed in endothelial cells obtained from many

different tissues. Flt-1, but not KDR, is highly expressed by trophoblast cells which contribute to placental formation. PlGF is a VEGF family member that is also involved in placental development. PlGF is expressed by cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts and is capable of inducing proliferation, migration, and activation of endothelial cells. PlGF binds as a homodimer to the Flt-1 receptor, but not the KDR receptor. Both PlGF and VEGF contribute to the mitogenic activity and angiogenesis that are critical for the developing placenta.

sFlt-1, which lacks the transmembrane and cytoplasmic domains of the receptor, was recently identified in a cultured medium of human umbilical vein endothelial cells and *in vivo* expression was subsequently demonstrated in placental tissue. sFlt-1 binds to VEGF with a high affinity but does not stimulate mitogenesis of endothelial cells.

Careful regulation of angiogenic and mitogenic signaling pathways is critical for maintaining appropriate proliferation, migration, and angiogenesis by trophoblast cells in the developing placenta.

There is a need for methods of accurately diagnosing subjects at risk for or having pre-eclampsia or eclampsia, particularly before the onset of the most severe symptoms. A treatment is also needed.

Summary of the Invention

We have discovered a means for diagnosing and effectively treating pre-eclampsia and eclampsia prior to the development of symptoms.

Using gene expression analysis, we have discovered that levels of soluble endoglin are markedly elevated in placental tissue samples from pregnant women suffering from pre-eclampsia. Endoglin is a part of the TGF- β receptor complex that acts to regulate angiogenesis. Endoglin can bind with high affinity to TGF- β family members that are ligands for TGF- β receptors. In affected individuals, excess soluble endoglin may be depleting the placenta of necessary amounts of essential angiogenic and mitogenic factors. In the present invention, compounds

that bind to or neutralize soluble endoglin are used to reduce the levels of elevated soluble endoglin. In addition, antibodies directed to soluble endoglin as well as RNA interference and antisense nucleobase oligomers directed to lowering the levels of biologically active soluble endoglin are also provided. Finally, the present invention provides for the measuring of soluble endoglin as a detection tool for early diagnosis and management of pre-eclampsia or eclampsia, or a predisposition thereto.

Accordingly, in one aspect, the invention provides a method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject by administering to the subject a compound capable of binding to soluble endoglin, where the administering is for a time and in an amount sufficient to treat or prevent at least one symptom of pre-eclampsia or eclampsia in the subject. In a preferred embodiment, the compound is a purified soluble endoglin antibody or antigen-binding fragment thereof. In another preferred embodiment, the compound is a growth factor, such as a TGF- β family member (e.g., TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP-2, and BMP-7) or a fragment thereof capable of binding soluble endoglin.

In another preferred embodiment, the method also includes administering a compound, such as a purified sFlt-1 antibody, an anti-sFlt-1 antigen-binding fragment, nicotine, theophylline, adenosine, nifedipine, minoxidil, magnesium sulfate, vascular endothelial growth factor (VEGF), including all isoforms such as VEGF189, VEGF121, or VEGF165, or fragments thereof; placental growth factor (PlGF), including all isoforms and fragments thereof, where the administering is for a time and in an amount sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia in a subject.

In another aspect, the invention features a method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject by administering to the subject a compound (e.g., chemical compound, polypeptide, peptide, antibody, or a fragment thereof) that increases the level of a growth factor capable of binding to soluble endoglin. The compound is administered for a time and in an amount

sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia. In preferred embodiments, the compound increases the level of a TGF- β family member (e.g., TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP-2, and BMP-7) and fragments thereof. Non-limiting examples of such compounds include cyclosporine, alpha tocopherol, methysergide, bromocriptine, and aldomet.

In another related aspect, the invention features a method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject by administering to the subject a compound (e.g., chemical compound, polypeptide, peptide, antibody, or a fragment thereof) that inhibits growth factor binding to a soluble endoglin polypeptide. The compound is administered for a time and in an amount sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia. In preferred embodiments, the compound binds to soluble endoglin and prevents growth factor binding. Non-limiting examples of such compounds include antibodies and small-molecule compounds obtained through screening.

In another aspect, the invention provides a method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject by administering to the subject a compound capable of reducing soluble endoglin expression or biological activity, where the administering is sufficient to treat or prevent said pre-eclampsia or eclampsia in a subject. In preferred embodiments, the compound is a compound that inhibits the enzymatic activity of a proteolytic enzyme selected from the group consisting of: a matrix metalloproteinase (MMP), a cathepsin, or an elastase. MMPs include any one of MMP 1-26, preferably MMP9.

In one example, the compound is a compound that inhibits the biological activity of soluble endoglin as measured by an angiogenesis assay. In this example, pre-eclamptic serum is used in a matrigel tube formation assay to induce an anti-angiogenic state. The compound is then added and a reduction in the anti-angiogenic state by 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more is indicative of a therapeutically effective compound.

In yet another aspect, the invention provides a method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject by administering to the subject an antisense nucleobase oligomer having at least one strand that is at least 80%, preferably 85%, 90%, 95%, 99%, or 100% complementary to at least a portion of the sequence of soluble endoglin, where the administering is sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia in a subject. In one embodiment, the antisense nucleobase oligomer is complementary to at least 10, preferably 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, or more consecutive nucleotides of soluble endoglin and can reduce or inhibit the expression or biological activity of soluble endoglin.

10 Desirably, the antisense nucleobase oligomer is 8 to 30 nucleotides in length.

In another aspect, the invention provides a method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject that involves the step of administering to the subject a double stranded RNA (dsRNA) molecule having at least one strand that is at least 80%, preferably 85%, 90%, 95%, 99%, or 100% complementary to at least a portion of the sequence of a soluble endoglin nucleic acid molecule, where the administering is sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia in the subject. In one embodiment, the double stranded RNA is an small interfering RNA (siRNA) that is 19 to 25 nucleotides in length and can reduce or inhibit the expression or biological activity of soluble endoglin. In additional preferred embodiments, the dsRNA is an siRNA molecule having 100% nucleic acid identity to at least 18, preferably 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 35, 45, 50 or more consecutive nucleotides of the nucleic acid sequence of a soluble endoglin molecule.

15
20

In various embodiments of the above aspects, the method further involves the step of administering to a subject an anti-hypertensive compound (e.g., adenosine, nifedipine, minoxidil, and magnesium sulfate). In other embodiments of the above aspects, the subject is a pregnant human, a post-partum human, or a non-human (e.g., a cow, a horse, a sheep, a pig, a goat, a dog, or a cat). In various embodiments of the above aspects, the method can be combined with the

25

diagnostic methods of the invention to monitor the subject during therapy or to determine effective therapeutic dosages.

Any of the therapeutic aspects of the invention can be used alone or in combination with one or more additional methods of the invention. In one example, an MMP inhibitor and an antibody can be used in combination to neutralize the soluble endoglin that is present and to block the further production of soluble endoglin by cleavage of the membrane bound form.

In another aspect, the invention provides a composition comprising a purified antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically binds soluble endoglin. In one preferred embodiment, the antibody prevents binding of a growth factor to soluble endoglin. In another embodiment, the antibody is a monoclonal antibody. In other preferred embodiments, the antibody or antigen-binding fragment thereof is a human or humanized antibody. In other embodiments, the antibody lacks an Fc portion. In still other embodiments, the antibody is an F(ab')₂, an Fab, or an Fv structure. In other embodiments, the antibody or antigen-binding fragment thereof is present in a pharmaceutically acceptable carrier.

In another aspect, the invention provides a method of diagnosing a subject as having, or having a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia, involving measuring the level of soluble endoglin polypeptide in a sample from the subject. In preferred embodiments the level of soluble endoglin is the level of free, bound, or total soluble endoglin. The diagnosis of or a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia can result from an alteration (e.g., an increase) in the relative level of soluble endoglin as compared to a reference sample or a detection of an absolute level of soluble endoglin that is above a normal reference value. For example, normally, circulating serum concentrations of soluble endoglin range from 2-7 ng/ml during the non-pregnant state and from 10-20 ng/ml during normal pregnancy. For embodiments that include the measurement of the absolute levels of soluble endoglin, a level greater than 15 ng/ml, 20 ng/ml, or preferably greater

than 25 ng/ml, is considered a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia. In additional preferred embodiments, the method further includes measuring the level of at least one of sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptide in a sample from a subject. The method can also include measuring the level of at least two of sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptide in a sample from a subject and calculating the relationship between the levels of sFlt-1, VEGF, or PlGF using a metric, where an alteration in the subject sample relative to a reference sample diagnoses pre-eclampsia or eclampsia, or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia in a subject. In preferred embodiments, the method also includes determining the body mass index (BMI), the gestational age (GA) of the fetus, or both and including the BMI or GA or both in the metric. In one embodiment, the metric is a pre-eclampsia anti-angiogenic index (PAAI): $[sFlt-1/VEGF + PlGF]$, where the PAAI is used as an indicator of anti-angiogenic activity. In one embodiment, a PAAI greater than 10, more preferably greater than 20, is indicative of pre-eclampsia or eclampsia. In another embodiment, the level of sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptide is determined by an immunological assay, such as an ELISA. In another example, a level of soluble endoglin greater than 20, preferably greater than 25 ng/ml, alone or in combination with increased sFlt-1 and decreased free PlGF or VEGF is used for the diagnosis of preeclampsia.

In various embodiments of the above aspects, the sample is a bodily fluid, such as serum or urine. In one embodiment, an increase in the level of soluble endoglin is indicative of pre-eclampsia or eclampsia or the propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia. In one embodiment, a level of sFlt-1 greater than 2 ng/ml is indicative of pre-eclampsia or eclampsia. In preferred embodiments of the above aspects, the level of sFlt-1 polypeptide measured is the level of free, bound, or total sFlt-1 polypeptide. In additional embodiments, the sFlt-1 polypeptide can also include sFlt-1 fragments, degradation products, or enzymatic cleavage products. In other preferred embodiments of the above aspects, the level of VEGF or PlGF is the level of free VEGF or PlGF.



In another aspect, the invention provides a method of diagnosing a subject as having, or having a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia that includes measuring the level of soluble endoglin nucleic acid molecule (e.g., mRNA) in a sample from the subject and comparing it to a reference sample, where an alteration (e.g., an increase) in the levels relative to a reference sample diagnoses pre-eclampsia or eclampsia in the subject, or diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia. In additional embodiments, the method can further include measuring the level of a sFlt-1, VEGF, or PlGF nucleic acid molecule (e.g., mRNA) in a sample from the subject and comparing it to a reference sample, where an alteration (e.g., a decrease in the level of VEGF or PlGF or an increase in the level of sFlt-1) in the levels relative to the reference sample diagnoses pre-eclampsia or eclampsia in the subject, or diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

In additional embodiments of the above aspects, the levels are measured on two or more occasions and a change in the levels between measurements is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia. In one preferred embodiment, an increase (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or greater) in the level of soluble endoglin from the first measurement to the next measurement is used to diagnose pre-eclampsia or eclampsia. In another embodiment an increase (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or greater) in the level of soluble endoglin as compared to a normal reference sample is indicative of pre-eclampsia or eclampsia.

In another aspect, the invention provides a method of diagnosing a subject as having, or having a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia that includes determining the nucleic acid sequence of a soluble endoglin gene in a subject and comparing it to a reference sequence, where an alteration in the subject's nucleic acid sequence that changes the level or the biological activity of the gene product in the subject diagnoses the subject with pre-eclampsia or eclampsia, or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia. In one

M

embodiment, the alteration is a polymorphism in the nucleic acid sequence. In another embodiment, the nucleic acid sequence of sFlt-1, VEGF, or PlGF, or any combination thereof, gene is also determined and compared to a reference sequence. An alteration in any one or more of these sequences that changes the level or the biological activity of the gene product in the subject diagnoses the subject with pre-eclampsia or eclampsia, or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

In another aspect, the invention provides a kit for the diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia in a subject comprising a nucleic acid sequence useful for detecting soluble endoglin, or fragment thereof, or a sequence complementary thereto. In a preferred embodiment, the nucleic acid sequence hybridizes to a nucleic acid encoding soluble endoglin, or a fragment thereof. In a preferred embodiment, the kit further comprises a nucleic acid sequence for detecting sFlt-1, VEGF, or PlGF.

In a related aspect, the invention provides a kit for the diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia in a subject that includes components for detecting a soluble endoglin polypeptide. In one embodiment, the component is an immunological assay, an enzymatic assay, or a colorimetric assay. In other embodiments of the above aspects, the kit diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia in a pregnant or a non-pregnant subject. In preferred embodiments of the above aspects, the kit also includes a component for detecting sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptide. In additional preferred embodiments, the kit is used to detect soluble endoglin and to further detect VEGF, sFlt-1 and PlGF and determine the PAAI of the sample.

In preferred embodiments, the diagnostic kits include a label or instructions for the intended use of the kit components. In one embodiment, the diagnostic kit is labeled or includes instructions for use in the diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia, or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia in a subject. In a preferred embodiment, the diagnostic kit includes a label or instructions for the

25

use of the kit to determine the levels of soluble endoglin of the subject sample and to compare the soluble endoglin levels to a reference sample value. It will be understood that the reference sample values will depend on the intended use of the kit. For example, the sample can be compared to a normal soluble endoglin reference value, wherein an increase in the soluble endoglin levels is indicative of pre-eclampsia or eclampsia, or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

In a related aspect, the invention features a device for diagnosing a subject as having or having a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia by providing components for measuring and/or comparing the levels of soluble endoglin polypeptide or nucleic acid to a reference sample, wherein an alteration in the levels of soluble endoglin compared to a normal reference value diagnoses pre-eclampsia or eclampsia or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia in the subject. The device can also include components for comparing the levels of soluble endoglin and at least one of sFlt-1, VEGF, and PlGF nucleic acid molecules or polypeptides in a sample from a subject relative to a reference sample, wherein an alteration in the levels of soluble endoglin, and at least one of sFlt-1, VEGF, and PlGF nucleic acid molecules or polypeptides diagnoses pre-eclampsia or eclampsia or a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia in the subject. In a preferred embodiment the device includes components for a metric to compare the levels of soluble endoglin, and at least one of sFlt-1, VEGF, and PlGF polypeptides.

In various embodiments of the above aspects, the sample is a bodily fluid (e.g., urine, amniotic fluid, serum, plasma, or cerebrospinal fluid) of the subject in which the soluble endoglin and the sFlt-1, VEGF, or PlGF is normally detectable. In additional embodiments, the sample is a tissue or a cell (e.g., placental tissue or placental cells, endothelial cells, leukocytes, and monocytes). In other embodiments of the above aspects, the subject is a non-pregnant human, a pregnant human, or a post-partum human. In other embodiments of the above

aspects, the subject is a non-human (e.g., a cow, a horse, a sheep, a pig, a goat, a dog, or a cat). In one embodiment, the subject is a non-pregnant human and the method is used to diagnose a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia. In additional embodiments, the BMI or GA or both is also measured. In various embodiments of the above aspects, an increase in the level of soluble endoglin nucleic acid or polypeptide relative to a reference is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia. In various embodiments of the above aspects, an increase in the level of sFlt-1 nucleic acid or polypeptide relative to a reference is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia. In other embodiments of the above aspects, a decrease in the level of free VEGF polypeptide or VEGF nucleic acid relative to a reference is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia. In other embodiments of the above aspects, a decrease in the level of free PlGF polypeptide or PlGF nucleic acid relative to a reference is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia.

Any of the diagnostic methods and kits described herein can also be used to monitor a subject already diagnosed as having or being at risk for having pre-eclampsia or eclampsia in order to monitor the subject during therapy or to determine effective therapeutic dosages. In one example, a kit used for therapeutic monitoring can have a reference soluble endoglin value that is indicative of pre-eclampsia or eclampsia, wherein a decrease in the soluble endoglin value of the subject sample relative to the reference sample can be used to indicate therapeutic efficacy or effective dosages of therapeutic compounds. In preferred embodiments, the kit is labeled or includes instructions for use in therapeutic monitoring or therapeutic dosage determination and the therapeutic compound can be included in the kit. The level of soluble endoglin protein or nucleic acid is measured alone or in combination with the levels of sFlt-1, VEGF, or PlGF protein or nucleic acids, or any combination thereof. In additional preferred embodiments, the level of soluble endoglin is compared to a reference sample that is indicative of pre-eclampsia or eclampsia and an alteration (e.g., a decrease) in

the levels of soluble endoglin relative to the reference sample is indicative of therapeutic efficacy or an effective dosage of a therapeutic compound. In one example, a decrease (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more) in the level of soluble endoglin polypeptide or nucleic acid measured during or after administering therapy relative to the value before therapy indicates an improvement in the pre-eclampsia or eclampsia. In another example, the absolute levels of soluble endoglin are measured and used for monitoring the therapeutic efficacy of that compound. For example, a therapeutic compound is preferably administered in a dose such that the level of soluble endoglin is less than 25 ng/ml, preferably less than 20 ng/ml.

In embodiments of the above therapeutic monitoring aspects that include the measurement of sFlt-1, a decrease in the level of sFlt-1 polypeptide or nucleic acid indicates an improvement in the pre-eclampsia or eclampsia. In another embodiment, a therapeutic compound is administered in a dose such that the level of sFlt-1 polypeptide is less than 2 ng/ml. In embodiments that include the measurement of VEGF or PlGF, an increase in the level of VEGF or PlGF polypeptide or nucleic acid measured during or after administering therapy relative to the value before therapy indicates an improvement in the pre-eclampsia or eclampsia. In embodiments that include the measurement of sFlt-1, VEGF, or PlGF in addition to the measurement of soluble endoglin, the method can include calculating the relationship between the levels of sFlt-1, VEGF, or PlGF using a metric, wherein an alteration in the relationship between said levels in the subject sample relative to a reference sample, is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia. One example of such a metric is the PAAI. In this example, a decrease in the PAAI value of a subject (e.g., less than 20, preferably less than 10) indicates an improvement in the pre-eclampsia or eclampsia. A decrease in the PAAI (e.g., less than 20, preferably less than 10) can also indicate an effective dosage of a therapeutic compound. In preferred embodiments of the aspects relating to diagnosis or monitoring of therapeutic treatments, polypeptides are measured

using an immunological assay such as ELISA or western blot. The level of soluble endoglin can be the level of free, bound (i.e., bound to a ligand), or total (i.e., free + bound) soluble endoglin, as well as the level of soluble endoglin resulting from degradation or enzymatic cleavage. For any of the monitoring methods, the measuring of levels can be done on two or more occasions and a change in the levels between measurements is a diagnostic indicator or pre-eclampsia or eclampsia.

In another aspect, the invention provides a method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia that involves contacting a cell that expresses a soluble endoglin nucleic acid molecule with a candidate compound, and comparing the level of expression of the nucleic acid molecule in
5 the cell contacted by the candidate compound with the level of expression in a control cell not contacted by the candidate compound, where an alteration in expression of soluble endoglin nucleic acid molecule identifies the candidate compound as a compound that may be useful to ameliorate pre-eclampsia or eclampsia.

10 In another aspect, the invention provides a method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia that involves contacting a cell that expresses a soluble endoglin polypeptide with a candidate compound, and comparing the level of expression of the polypeptide in the cell contacted by the candidate compound with the level of polypeptide expression in a control cell not
15 contacted by the candidate compound, where an alteration in the expression of the soluble endoglin polypeptide identifies the candidate compound as a compound that may be useful to ameliorate pre-eclampsia or eclampsia. In one embodiment, the alteration in expression is assayed using an immunological assay, an enzymatic assay, or an immunoassay. In one embodiment, the alteration in expression is a
20 decrease in the level of soluble endoglin. The alteration in expression can result from an alteration in transcription or an alteration in translation.

In another aspect, the invention provides a method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia that involves contacting a cell that expresses a soluble endoglin polypeptide with a candidate compound, and comparing the biological activity of the polypeptide in the cell contacted by the candidate compound with the level of biological activity in a control cell not contacted by the candidate compound, where an alteration in the biological activity of the soluble endoglin polypeptide identifies the candidate compound as a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia. In one embodiment, the increase in biological activity is assayed using an immunological assay, an enzymatic assay, or an immunoassay.

In another aspect, the invention provides a method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia, comprising detecting binding of a soluble endoglin polypeptide and a candidate compound, where a compound that binds the soluble endoglin polypeptide may be useful to ameliorate pre-eclampsia or eclampsia.

In another aspect, the invention provides a method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia that involves detecting binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor in the presence of a candidate compound, where a decrease in the binding, relative to binding between the soluble endoglin polypeptide and the growth factor in the absence of the candidate compound identifies the candidate compound as a compound that may be useful to ameliorate pre-eclampsia or eclampsia. In one embodiment, the growth factor is a TGF β family member.

In another aspect, the invention provides a method of identifying a polypeptide, or fragment thereof, that prevents binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor. The method involves detecting binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor in the presence of the candidate polypeptide, where a decrease in the binding, relative to binding between the soluble endoglin polypeptide and the growth factor in the absence of

the candidate polypeptide identifies the candidate polypeptide as a polypeptide that prevents binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor. In one embodiment, the growth factor is a TGF β family member.

5 In a related aspect, the invention provides a compound identified according to the previous aspect, where the compound is a polypeptide that specifically binds a soluble endoglin polypeptide and prevents the soluble endoglin polypeptide from binding a TGF- β family member. In one preferred embodiment, the polypeptide is an antibody that binds soluble endoglin, preferably an antibody that specifically binds soluble endoglin.

10

For the purpose of the present invention, the following abbreviations and terms are defined below.

By "alteration" is meant a change (increase or decrease) in the expression levels of a gene or polypeptide as detected by standard art known methods such as those described below. As used herein, an alteration includes a 10% change in expression levels, preferably a 25% change, more preferably a 40% change, and most preferably a 50% or greater change in expression levels. "Alteration" can also indicate a change (increase or decrease) in the biological activity of any of the polypeptides of the invention (e.g., soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF).

15 20 Examples of biological activity for soluble endoglin are angiogenesis and binding assays using known ligands such as activin-A, BMP 2, BMP-7, TGF- β 1 and TGF- β 3. The biological activity of soluble endoglin can be measured by ligand binding assays, immunoassays, and angiogenesis assays that are standard in the art or are described herein. Examples of biological activity for PlGF or VEGF

25 include binding to receptors as measured by immunoassays, ligand binding assays or Scatchard plot analysis, and induction of cell proliferation or migration as measured by BrdU labeling, cell counting experiments, or quantitative assays for DNA synthesis such as ^3H -thymidine incorporation. Examples of biological activity for sFlt-1 include binding to PlGF and VEGF as measured by

immunoassays, ligand binding assays, or Scatchard plot analysis. Additional examples of assays for biological activity for each of the polypeptides are described herein. As used herein, an alteration includes a 10% change in biological activity, preferably a 25% change, more preferably a 40% change, and most preferably a 50% or greater change in biological activity.

By "antisense nucleobase oligomer" is meant a nucleobase oligomer, regardless of length, that is complementary to the coding strand or mRNA of an endoglin gene. By a "nucleobase oligomer" is meant a compound that includes a chain of at least eight nucleobases, preferably at least twelve, and most preferably at least sixteen bases, joined together by linkage groups. Included in this definition are natural and non-natural oligonucleotides, both modified and unmodified, as well as oligonucleotide mimetics such as Protein Nucleic Acids, locked nucleic acids, and arabinonucleic acids. Numerous nucleobases and linkage groups may be employed in the nucleobase oligomers of the invention, including those described in U.S. Patent Publication Nos. 20030114412 (see for example paragraphs 27-45 of the publication) and 20030114407 (see for example paragraphs 35-52 of the publication), incorporated herein by reference. The nucleobase oligomer can also be targeted to the translational start and stop sites. Preferably the antisense nucleobase oligomer comprises from about 8 to 30 nucleotides. The antisense nucleobase oligomer can also contain at least 40, 60, 85, 120, or more consecutive nucleotides that are complementary to endoglin mRNA or DNA, and may be as long as the full-length mRNA or gene.

By "body mass index" is meant a number, derived by using height and weight measurements, that gives a general indication of whether or not weight falls within a healthy range. The formula generally used to determine the body mass index is a person's weight in kilograms divided by a person's height in meters squared or weight (kg)/ (height (m))².

By "compound" is meant any small molecule chemical compound, antibody, nucleic acid molecule, or polypeptide, or fragments thereof. Particularly

useful compound of the invention can affect the levels or biological activity of soluble endoglin by at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more.

By "chimeric antibody" is meant a polypeptide comprising at least the antigen-binding portion of an antibody molecule linked to at least part of another protein (typically an immunoglobulin constant domain).

By "double-stranded RNA (dsRNA)" is meant a ribonucleic acid molecule comprised of both a sense and an anti-sense strand. dsRNAs are typically used to mediate RNA interference.

By "endoglin", also known as CD105, is meant a mammalian growth factor that has endoglin biological activity (see Fonsatti et al., *Oncogene* 22:6557-6563, 2003; Fonsatti et al., *Curr. Cancer Drug Targets* 3:427-432, 2003) and is homologous to the protein defined by any of the following GenBank accession numbers: AAH29080 and NP_031958 (mouse); AAS67893 (rat); NP_000109, P17813, VSP_004233, and CAA80673 (human); and A49722 (pig), or described in U.S.P.N. 6,562,957. Endoglin is a homodimeric cell membrane glycoprotein which is expressed at high levels in proliferating vascular cells and syncytiotrophoblasts from placentas. There are two distinct isoforms of endoglin, L and S, which differ in their cytoplasmic tails by 47 amino acids. Both isoforms are included in the term endoglin as used herein. Endoglin binds to TGF- β family members and, in the presence of TGF- β , endoglin can associate with the TGF- β signaling receptors RI and RII, and potentiate the response to the growth factors. Endoglin biological activities include binding to TGF- β family members such as activin-A, BMP 2, BMP-7, TGF- β 1 and TGF- β 3; induction of angiogenesis, regulation of cell proliferation, attachment, migration, invasion; and activation of endothelial cells. Assays for endoglin biological activities are known in the art and include ligand binding assays or Scatchard plot analysis; BrdU labeling, cell counting experiments, or quantitative assays for DNA synthesis such as ^3H -thymidine incorporation used to measure cell proliferation; and angiogenesis

- assays such as those described herein or in McCarty et al., *Intl. J. of Oncol.* 21:5-10, 2002; Akhtar et al. *Clin. Chem.* 49:32-40, 2003; and Yamashita et al, *J. Biol. Chem.* 269:1995-2001, 1994). By "soluble endoglin" is meant a circulating, non-membrane bound form of endoglin which includes at least a part of the
- 5 extracellular portion of the protein (see Figure 1). Soluble endoglin can result from the cleavage of the membrane bound form of endoglin by a proteolytic enzyme. One potential cleavage site is at amino acid 437. Although not wishing to be bound by theory, it is likely that the extracellular ligand binding domain retained by soluble endoglin would allow it to bind ligands such as TGF- β 1 and
- 10 TGF- β 3, thereby creating a resulting deficiency in TGF- β . Furthermore, since endoglin is an endothelial-specific molecule, it is likely that the TGF- β deficiencies would be maximal on endothelial cells. Soluble endoglin can also include circulating degradation products or fragments that are that result from enzymatic cleavage of endoglin and that maintain endoglin biological activity.
- 15 The biological function of soluble endoglin is unknown at the present time, but is predicted to create a deficiency of TGF- β and other known ligands. Soluble endoglin biological activity can be assayed by measuring the levels of Activin A or free TGF- β 3 or by using an angiogenesis assay known in the art or described herein.
- 20 By "endoglin" nucleic acid is meant a nucleic acid that encodes any of the endoglin proteins described above. In one example, the gene for human endoglin consists of 14 exons, where exon 1 encodes the signal peptide sequence, exons 2-12 encode the extracellular domain, exon 13 encodes the transmembrane domain, and exon 14 encodes C-terminal cytoplasmic domain (see Figures 1 and 2).
- 25 By "expression" is meant the detection of a gene or polypeptide by standard art known methods. For example, polypeptide expression is often detected by western blotting, DNA expression is often detected by Southern blotting or

24

polymerase chain reaction (PCR), and RNA expression is often detected by northern blotting, PCR, or RNase protection assays.

By "fragment" is meant a portion of a polypeptide or nucleic acid molecule. This portion contains, preferably, at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, or 90% of the entire length of the reference nucleic acid molecule or polypeptide. A fragment may contain 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, or 1000 nucleotides or amino acids.

By "gestational age" is meant a reference to the age of the fetus, counting from the first day of the mother's last menstrual period usually referred to in weeks.

By a "history of pre-eclampsia or eclampsia" is meant a previous diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia or pregnancy induced hypertension in the subject themselves or in a related family member.

By "homologous" is meant any gene or protein sequence that bears at least 30% homology, more preferably 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, and most preferably 90% or more homology to a known gene or protein sequence over the length of the comparison sequence. A "homologous" protein can also have at least one biological activity of the comparison protein. For polypeptides, the length of comparison sequences will generally be at least 16 amino acids, preferably at least 20 amino acids, more preferably at least 25 amino acids, and most preferably 35 amino acids or more. For nucleic acids, the length of comparison sequences will generally be at least 50 nucleotides, preferably at least 60 nucleotides, more preferably at least 75 nucleotides, and most preferably at least 110 nucleotides.

"Homology" can also refer to a substantial similarity between an epitope used to generate antibodies and the protein or fragment thereof to which the antibodies are directed. In this case, homology refers to a similarity sufficient to elicit the production of antibodies that can specifically recognize the protein at issue.

By "humanized antibody" is meant an immunoglobulin amino acid sequence variant or fragment thereof that is capable of binding to a predetermined

antigen. Ordinarily, the antibody will contain both the light chain as well as at least the variable domain of a heavy chain. The antibody also may include the CH1, hinge, CH2, CH3, or CH4 regions of the heavy chain. The humanized antibody comprises a framework region (FR) having substantially the amino acid sequence of a human immunoglobulin and a complementarity determining region (CDR) having substantially the amino acid sequence of a non-human immunoglobulin (the "import" sequences).

Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. By "complementarity determining region (CDR)" is meant the three hypervariable sequences in the variable regions within each of the immunoglobulin light and heavy chains. By "framework region (FR)" is meant the sequences of amino acids located on either side of the three hypervariable sequences (CDR) of the immunoglobulin light and heavy chains.

The FR and CDR regions of the humanized antibody need not correspond precisely to the parental sequences, e.g., the import CDR or the consensus FR may be mutagenized by substitution, insertion or deletion of at least one residue so that the CDR or FR residue at that site does not correspond to either the consensus or the import antibody. Such mutations, however, will not be extensive. Usually, at least 75%, preferably 90%, and most preferably at least 95% of the humanized antibody residues will correspond to those of the parental FR and CDR sequences.

By "hybridize" is meant pair to form a double-stranded molecule between complementary polynucleotide sequences, or portions thereof, under various

conditions of stringency. (See, e.g., Wahl and Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, *Methods Enzymol.* 152:507, 1987.) For example, stringent salt concentration will ordinarily be less than about 750 mM NaCl and 75 mM trisodium citrate, preferably less than about 500 mM NaCl and 50 mM trisodium citrate, and most preferably less than about 250 mM NaCl and 25 mM trisodium citrate. Low stringency hybridization can be obtained in the absence of organic solvent, e.g., formamide, while high stringency hybridization can be obtained in the presence of at least about 35% formamide, and most preferably at least about 50% formamide. Stringent temperature conditions will ordinarily include temperatures of at least about 30°C, more preferably of at least about 37°C, and most preferably of at least about 42°C. Varying additional parameters, such as hybridization time, the concentration of detergent, e.g., sodium dodecyl sulfate (SDS), and the inclusion or exclusion of carrier DNA, are well known to those skilled in the art. Various levels of stringency are accomplished by combining these various conditions as needed. In a preferred embodiment, hybridization will occur at 30°C in 750 mM NaCl, 75 mM trisodium citrate, and 1% SDS. In a more preferred embodiment, hybridization will occur at 37°C in 500 mM NaCl, 50 mM trisodium citrate, 1% SDS, 35% formamide, and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA (ssDNA). In a most preferred embodiment, hybridization will occur at 42°C in 250 mM NaCl, 25 mM trisodium citrate, 1% SDS, 50% formamide, and 200 µg/ml ssDNA. Useful variations on these conditions will be readily apparent to those skilled in the art.

For most applications, washing steps that follow hybridization will also vary in stringency. Wash stringency conditions can be defined by salt concentration and by temperature. As above, wash stringency can be increased by decreasing salt concentration or by increasing temperature. For example, stringent salt concentration for the wash steps will preferably be less than about 30 mM NaCl and 3 mM trisodium citrate, and most preferably less than about 15 mM NaCl and 1.5 mM trisodium citrate. Stringent temperature conditions for the wash

steps will ordinarily include a temperature of at least about 25°C, more preferably of at least about 42°C, and most preferably of at least about 68°C. In a preferred embodiment, wash steps will occur at 25°C in 30 mM NaCl, 3 mM trisodium citrate, and 0.1% SDS. In a more preferred embodiment, wash steps will occur at 42°C in 15 mM NaCl, 1.5 mM trisodium citrate, and 0.1% SDS. In a most preferred embodiment, wash steps will occur at 68°C in 15 mM NaCl, 1.5 mM trisodium citrate, and 0.1% SDS. Additional variations on these conditions will be readily apparent to those skilled in the art. Hybridization techniques are well known to those skilled in the art and are described, for example, in Benton and Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and 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.

By "intrauterine growth retardation (IUGR)" is meant a syndrome resulting in a birth weight which is less than 10-percent of the predicted fetal weight for the gestational age of the fetus. The current World Health Organization criterion for low birth weight is a weight less than 2,500 gm (5 lbs. 8 oz.) or below the 10th percentile for gestational age according to U.S. tables of birth weight for gestational age by race, parity, and infant sex (Zhang and Bowes, *Obstet. Gynecol.* 86:200-208, 1995). These low birth weight babies are also referred to as "small for gestational age (SGA)". Pre-eclampsia is a condition known to be associated with IUGR or SGA.

By "metric" is meant a measure. A metric may be used, for example, to compare the levels of a polypeptide or nucleic acid molecule of interest. Exemplary metrics include, but are not limited to, mathematical formulas or algorithms, such as ratios. The metric to be used is that which best discriminates between levels of soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF, or any combination

thereof, in a subject having pre-eclampsia or eclampsia and a normal control subject. Depending on the metric that is used, the diagnostic indicator of eclampsia or pre-eclampsia may be significantly above or below a reference value (e.g., from a control subject not having pre-eclampsia or eclampsia).

5 Soluble endoglin level is determined by measuring the amount of free, bound (i.e., bound to growth factor), or total (free + bound) soluble endoglin. sFlt-1 level is measured by measuring the amount of free, bound (i.e., bound to growth factor), or total sFlt-1 (bound + free). VEGF or PlGF levels are determined by measuring the amount of free PlGF or free VEGF (i.e., not bound to sFlt-1). One
10 exemplary metric is $[sFlt-1/(VEGF + PlGF)]$, also referred to as the pre-eclampsia anti-angiogenic index (PAAI).

By "pre-eclampsia anti-angiogenesis index (PAAI)" is meant the ratio of sFlt-1/VEGF + PlGF used as an indicator of anti-angiogenic activity. A PAAI greater than 10, more preferably greater than 20, is considered to be indicative of
15 pre-eclampsia or risk of pre-eclampsia.

By "operably linked" is meant that a gene and a regulatory sequence(s) are connected in such a way as to permit gene expression when the appropriate molecules (e.g., transcriptional activator proteins) are bound to the regulatory sequence(s).

20 By "pharmaceutically acceptable carrier" is meant a carrier that is physiologically acceptable to the treated mammal while retaining the therapeutic properties of the compound with which it is administered. One exemplary pharmaceutically acceptable carrier substance is physiological saline. Other physiologically acceptable carriers and their formulations are known to one skilled
25 in the art and described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

By "placental growth factor (PlGF)" is meant a mammalian growth factor that is homologous to the protein defined by GenBank accession number P49763

and that has PlGF biological activity. PlGF is a glycosylated homodimer belonging to the VEGF family and can be found in two distinct isoforms through alternative splicing mechanisms. PlGF is expressed by cyto- and syncytiotrophoblasts in the placenta and PlGF biological activities include
 5 induction of proliferation, migration, and activation of endothelial cells, particularly trophoblast cells.

By "polymorphism" is meant a genetic variation, mutation, deletion or addition in a soluble endoglin, sFlt-1, PlGF, or VEGF nucleic acid molecule that is indicative of a predisposition to develop pre-eclampsia or eclampsia. Such
 10 polymorphisms are known to the skilled artisan and are described, for example, by Raab et al. (*Biochem J.* 339:579-588, 1999) and Parry et al. (*Eur. J Immunogenet.* 26:321-3, 1999). A polymorphism may be present in the promoter sequence, an open reading frame, intronic sequence, or untranslated 3' region of a gene. Known examples of such polymorphisms in the endoglin gene include a 6 base
 15 insertion of GGGGGA in intron 7 at 26 bases beyond the 3' end of exon 7 (*Ann. Neurol.* 41:683-6, 1997).

By "pre-eclampsia" is meant the multi-system disorder that is characterized by hypertension with proteinuria or edema, or both, glomerular dysfunction, brain edema, liver edema, or coagulation abnormalities due to pregnancy or the
 20 influence of a recent pregnancy. Pre-eclampsia generally occurs after the 20th week of gestation. Pre-eclampsia is generally defined as some combination of the following symptoms: (1) a systolic blood pressure (BP) >140 mmHg and a diastolic BP >90 mmHg after 20 weeks gestation (generally measured on two occasions, 4-168 hours apart), (2) new onset proteinuria (1+ by dipstick on
 25 urinalysis, >300mg of protein in a 24-hour urine collection, or a single random urine sample having a protein/creatinine ratio >0.3), and (3) resolution of hypertension and proteinuria by 12 weeks postpartum. Severe pre-eclampsia is generally defined as (1) a diastolic BP > 110 mmHg (generally measured on two occasions, 4-168 hours apart) or (2) proteinuria characterized by a measurement of

3.5 g or more protein in a 24-hour urine collection or two random urine specimens with at least 3+ protein by dipstick. In pre-eclampsia, hypertension and proteinuria generally occur within seven days of each other. In severe pre-eclampsia, severe hypertension, severe proteinuria and HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) or eclampsia can occur simultaneously or only one symptom at a time. Occasionally, severe pre-eclampsia can lead to the development of seizures. This severe form of the syndrome is referred to as "eclampsia." Eclampsia can also include dysfunction or damage to several organs or tissues such as the liver (e.g., hepatocellular damage, periportal necrosis) and the central nervous system (e.g., cerebral edema and cerebral hemorrhage). The etiology of the seizures is thought to be secondary to the development of cerebral edema and focal spasm of small blood vessels in the kidney.

By "protein" or "polypeptide" or "polypeptide fragment" is meant any chain of more than two amino acids, regardless of post-translational modification (e.g., glycosylation or phosphorylation), constituting all or part of a naturally occurring polypeptide or peptide, or constituting a non-naturally occurring polypeptide or peptide.

By "reference sample" is meant a sample taken from a pregnant subject not having pre-eclampsia or eclampsia, a subject that is pregnant but the sample was taken early in pregnancy (e.g., in the first or second trimester or before the detection of pre-eclampsia or eclampsia), a subject that is pregnant but does not have pre-eclampsia or eclampsia and has no history of pre-eclampsia or eclampsia, or a subject that is not pregnant.

By "reduce or inhibit" is meant the ability to cause an overall decrease preferably of 20% or greater, more preferably of 50% or greater, and most preferably of 75% or greater, in the level of protein or nucleic acid, detected by the aforementioned assays (see "expression"), as compared to samples not treated

with antisense nucleobase oligomers or dsRNA or siRNA used for RNA interference.

By "small interfering RNAs (siRNAs)" is meant an isolated dsRNA molecule, preferably greater than 10 nucleotides (nt) in length, more preferably greater than 15 nucleotides in length, and most preferably greater than 19 nucleotides in length that is used to identify the target gene or mRNA to be degraded. A range of 19-25 nucleotides is the most preferred size for siRNAs. siRNAs can also include short hairpin RNAs in which both strands of an siRNA duplex are included within a single RNA molecule. siRNA includes any form of dsRNA (proteolytically cleaved products of larger dsRNA, partially purified RNA, essentially pure RNA, synthetic RNA, recombinantly produced RNA) as well as altered RNA that differs from naturally occurring RNA by the addition, deletion, substitution, and/or alteration of one or more nucleotides. Such alterations can include the addition of non-nucleotide material, such as to the end(s) of the 21 to 23 nt RNA or internally (at one or more nucleotides of the RNA). In a preferred embodiment, the RNA molecules contain a 3' hydroxyl group. Nucleotides in the RNA molecules of the present invention can also comprise non-standard nucleotides, including non-naturally occurring nucleotides or deoxyribonucleotides. Collectively, all such altered RNAs are referred to as analogs of RNA. siRNAs of the present invention need only be sufficiently similar to natural RNA that it has the ability to mediate RNA interference (RNAi). As used herein, RNAi refers to the ATP-dependent targeted cleavage and degradation of a specific mRNA molecule through the introduction of small interfering RNAs or dsRNAs into a cell or an organism. As used herein "mediate RNAi" refers to the ability to distinguish or identify which RNAs are to be degraded.

By "soluble Flt-1 (sFlt-1)" (also known as sVEGF-R1) is meant the soluble form of the Flt-1 receptor, that is homologous to the protein defined by GenBank accession number U01134, and that has sFlt-1 biological activity. The biological

activity of an sFlt-1 polypeptide may be assayed using any standard method, for example, by assaying sFlt-1 binding to VEGF. sFlt-1 lacks the transmembrane domain and the cytoplasmic tyrosine kinase domain of the Flt-1 receptor. sFlt-1 can bind to VEGF and PlGF with high affinity, but it cannot induce proliferation or angiogenesis and is therefore functionally different from the Flt-1 and KDR receptors. sFlt-1 was initially purified from human umbilical endothelial cells and later shown to be produced by trophoblast cells *in vivo*. As used herein, sFlt-1 includes any sFlt-1 family member or isoform. sFlt-1 can also mean degradation products or fragments that result from enzymatic cleavage of the Flt-1 receptor and that maintain sFlt-1 biological activity. In one example, specific metalloproteinases released from the placenta may cleave the extracellular domain of Flt-1 receptor to release the N-terminal portion of Flt-1 into circulation.

By "specifically binds" is meant a compound or antibody which recognizes and binds a polypeptide of the invention but that does not substantially recognize and bind other molecules in a sample, for example, a biological sample, which naturally includes a polypeptide of the invention. In one example, an antibody that specifically binds soluble endoglin does not bind membrane bound endoglin. In one example, an antibody that specifically binds to soluble endoglin recognizes a region within amino acids 1 to 437 of endoglin that is unique to soluble endoglin but not the full-length endoglin.

By "subject" is meant a mammal, including, but not limited to, a human or non-human mammal, such as a bovine, equine, canine, ovine, or feline. Included in this definition are pregnant, post-partum, and non-pregnant mammals.

By "substantially identical" is meant an amino acid sequence which differs only by conservative amino acid substitutions, for example, substitution of one amino acid for another of the same class (e.g., valine for glycine, arginine for lysine, etc.) or by one or more non-conservative substitutions, deletions, or insertions located at positions of the amino acid sequence which do not destroy the function of the protein. Preferably, the amino acid sequence is at least 70%, more

preferably at least about 80%, and most preferably at least about 90% homologous to another amino acid sequence. Methods to determine identity are available in publicly available computer programs. Computer program methods to determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity. The BLAST program is publicly available from NCBI and other sources (*BLAST Manual*, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD 20894; BLAST 2.0 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). These software programs match similar sequences by assigning degrees of homology to various substitutions, deletions, and other modifications. Conservative substitutions typically include substitutions within the following groups: glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and phenylalanine, tyrosine.

By "symptoms of pre-eclampsia" is meant any of the following: (1) a systolic blood pressure (BP) >140 mmHg and a diastolic BP >90 mmHg after 20 weeks gestation, (2) new onset proteinuria (1+ by dipstick on urinalysis, >300mg of protein in a 24 hour urine collection, or random urine protein/creatinine ratio >0.3), and (3) resolution of hypertension and proteinuria by 12 weeks postpartum. The symptoms of pre-eclampsia can also include renal dysfunction and glomerular endotheliosis or hypertrophy. By "symptoms of eclampsia" is meant the development of any of the following symptoms due to pregnancy or the influence of a recent pregnancy: seizures, coma, thrombocytopenia, liver edema, pulmonary edema, and cerebral edema.

By "transforming growth factor β (TGF- β)" is meant a mammalian growth factor that has TGF- β biological activity and is a member of a family of structurally related paracrine polypeptides found ubiquitously in vertebrates, and prototypic of a large family of metazoan growth, differentiation, and

morphogenesis factors (see, for review, Massague et al. *Ann Rev Cell Biol* 6:597-641 (1990); Massague et al. *Trends Cell Biol* 4:172-178 (1994); Kingsley *Gene Dev.* 8:133-146 (1994); and Sporn et al. *J Cell Biol* 119:1017-1021 (1992).) As described in Kingsley, *supra*, the TGF- β superfamily has at least 25 members, and

5 can be grouped into distinct sub-families with highly related sequences. The most obvious sub-families include the following: the TGF- β sub-family, which comprises at least four genes that are much more similar to TGF- β 1 than to other members of the TGF- β superfamily; the activin sub-family, comprising homo- or hetero-dimers or two sub-units, inhibin β A and inhibin β -B. The decapentaplegic

10 sub-family, which includes the mammalian factors BMP2 and BMP4, which can induce the formation of ectopic bone and cartilage when implanted under the skin or into muscles. The 60A sub-family, which includes a number of mammalian homologs, with osteoinductive activity, including BMP5-8. Other members of the TGF β superfamily include the ~~gross~~ differentiation factor 1 (GDF-1), GDF-

15 3/VGR-2, dorsalin, nodal, ~~mullerian-inhibiting~~ substance (MIS), and glial-derived neurotrophic growth factor (GDNF). It is noted that the DPP and 60A sub-families are related more closely to one another than to other members of the TGF β superfamily, and have often been grouped together as part of a larger collection of molecules called DVR (dpp and vg1 related). Unless evidenced from

20 the context in which it is used, the term TGF β as used throughout this specification will be understood to generally refer to members of the TGF β superfamily as appropriate. (Massague et al, *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-91, 1998; Josso et al, *Curr. Op. Gen. Dev.*, 7:371-377, 1997). TGF- β functions to regulate growth, differentiation, motility, tissue remodeling, neurogenesis, would

25 repair, apoptosis, and angiogenesis in many cell types. TGF- β also inhibits cell proliferation in many cell types and can stimulate the synthesis of matrix proteins.

By "therapeutic amount" is meant an amount that when administered to a patient suffering from pre-eclampsia or eclampsia is sufficient to cause a qualitative or quantitative reduction in the symptoms of pre-eclampsia or

eclampsia as described herein. A "therapeutic amount" can also mean an amount that when administered to a patient suffering from pre-eclampsia or eclampsia is sufficient to cause a reduction in the expression levels of endoglin or sFlt-1 or an increase in the expression levels of VEGF or PlGF as measured by the assays described herein.

By "treating" is meant administering a compound or a pharmaceutical composition for prophylactic and/or therapeutic purposes. To "treat disease" or use for "therapeutic treatment" refers to administering treatment to a subject already suffering from a disease to improve the subject's condition. Preferably, the subject is diagnosed as suffering from pre-eclampsia or eclampsia based on identification of any of the characteristic symptoms described below or the use of the diagnostic methods described herein. To "prevent disease" refers to prophylactic treatment of a subject who is not yet ill, but who is susceptible to, or otherwise at risk of, developing a particular disease. Preferably a subject is determined to be at risk of developing pre-eclampsia or eclampsia using the diagnostic methods described herein. Thus, in the claims and embodiments, treating is the administration to a mammal either for therapeutic or prophylactic purposes.

By "trophoblast" is meant the mesectodermal cell layer covering the blastocyst that erodes the uterine mucosa and through which the embryo receives nourishment from the mother; the cells contribute to the formation of the placenta.

By "vascular endothelial growth factor (VEGF)" is meant a mammalian growth factor that is homologous to the growth factor defined in U.S. Patent Nos. 5,332,671; 5,240,848; 5,194,596; and Charnock-Jones et al. (*Biol. Reproduction*, 48: 1120-1128, 1993), and has VEGF biological activity. VEGF exists as a glycosylated homodimer and includes at least four different alternatively spliced isoforms. The biological activity of native VEGF includes the promotion of selective growth of vascular endothelial cells or umbilical vein endothelial cells and induction of angiogenesis. As used herein, VEGF includes any VEGF family

member or isoform (e.g., VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF189, VEGF165, or VEGF 121). Preferably, VEGF is the VEGF121 or VEGF165 isoform (Tischer et al., *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954, 1991; Neufeld et al. *Cancer Metastasis* 15:153-158, 1996), which is described in U.S. Patent Nos. 5 6,447,768; 5,219,739; and 5,194,596, hereby incorporated by reference. Also included are mutant forms of VEGF such as the KDR-selective VEGF and Flt-selective VEGF described in Gille et al. (*J. Biol. Chem.* 276:3222-3230, 2001). As used herein VEGF also includes any modified forms of VEGF such as those described in LeCouter et al. (*Science* 299:890-893, 2003). Although human 10 VEGF is preferred, the invention is not limited to human forms and can include other animal forms of VEGF (e.g. mouse, rat, dog, or chicken).

By "vector" is meant a DNA molecule, usually derived from a plasmid or bacteriophage, into which fragments of DNA may be inserted or cloned. A recombinant vector will contain one or more unique restriction sites, and may be 15 capable of autonomous replication in a defined host or vehicle organism such that the cloned sequence is reproducible. A vector contains a promoter operably linked to a gene or coding region such that, upon transfection into a recipient cell, an RNA is expressed.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the 20 following description of the preferred embodiments thereof, and from the claims.

Brief Description of the Drawings

FIGURE 1 is a schematic showing the endoglin protein. SP: signal peptide, ZP: zona pellucida domain, CL: potential cleavage site (amino acid 437) for the 25 release of soluble endoglin, TM: transmembrane domain, Cyto: cytoplasmic domain.

FIGURE 2 shows the predicted cDNA sequence of soluble endoglin (437 amino acids).

FIGURE 3 is a Northern blot showing endoglin mRNA levels in placentas from normal pregnancies (N), placentas from mild preeclamptic pregnancies (p) and placentas from severe preeclamptic pregnancies (P).

FIGURE 4 is a Western blot showing endoglin protein levels in the placenta. Samples are from two preeclamptic patients, p32 and p36, that presented to the Beth Israel Deaconess Medical Center in 2003 and maternal serum from a pregnant woman. The Western blot was probed using a N-terminal antibody obtained from Santa Cruz, CA that shows both the 110kD band in the placenta and a smaller 63 kD band that is present in the placenta and the serum samples.

FIGURE 5 is a graph that shows the circulating concentrations of soluble endoglin in women with normal pregnancy, mild preeclampsia, severe preeclampsia and non-preeclamptic pregnancies complicated by pre-term delivery. All blood specimens were obtained within 24 hours prior to delivery. Soluble endoglin was measured using an ELISA kit from R & D Systems, MN (Cat #DNDG00). These data show that soluble endoglin levels are significantly elevated in preeclamptic patients at the time of clinical disease.

Detailed Description

We have discovered that soluble endoglin levels are elevated in blood serum samples taken from pre-eclamptic women. Soluble endoglin may be formed by cleavage of the extracellular portion of the membrane bound form by proteolytic enzymes. Excess soluble endoglin may be depleting the placenta of necessary amounts of these essential angiogenic and mitogenic factors. Thus, soluble endoglin is an excellent diagnostic marker for pre-eclampsia. Furthermore, we have discovered therapeutic agents that interfere with soluble endoglin binding to growth factors, agents that reduce soluble endoglin expression or biological activity, or agents that increase levels of growth factors, can be used to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia in a subject. Such agents include, but are not limited to, antibodies to soluble endoglin, oligonucleotides for antisense or RNAi that reduce levels of soluble endoglin, compounds that increase the levels of growth factors, compounds that prevent the proteolytic cleavage of the membrane bound form of endoglin thereby preventing the release of soluble endoglin, and small molecules that bind soluble endoglin and block the growth factor binding site. The invention also features methods for measuring levels of soluble endoglin as a detection tool for early diagnosis and management of pre-eclampsia or eclampsia.

While the detailed description presented herein refers specifically to soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF, it will be clear to one skilled in the art that the detailed description can also apply to family members, isoforms, and/or variants of soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF.

25 Diagnostics

The present invention features assays based on the detection of soluble endoglin to diagnose pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions. Levels of endoglin, either free, bound, or total levels, are measured in a subject sample and used as an indicator of pre-eclampsia, eclampsia, or the

propensity to develop such conditions. The diagnostic methods measuring soluble endoglin levels can also be combined with methods to detect levels of sFlt-1, VEGF, or PlGF. In one embodiment, a metric incorporating soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF, or any combination therein, is used to determine whether a relationship between levels of at least two of the proteins is indicative of pre-eclampsia or eclampsia.

Standard methods may be used to measure levels of soluble endoglin, VEGF, PlGF, or sFlt-1 polypeptide in any bodily fluid, including, but not limited to, urine, serum, plasma, saliva, amniotic fluid, or cerebrospinal fluid. Such methods include immunoassay, ELISA, western blotting using antibodies directed to soluble endoglin, VEGF, PlGF or sFlt-1, and quantitative enzyme immunoassay techniques such as those described in Ong et al. (*Obstet. Gynecol.* 98:608-611, 2001) and Su et al. (*Obstet. Gynecol.*, 97:898-904, 2001). ELISA assays are the preferred method for measuring levels of soluble endoglin, VEGF, PlGF, or sFlt-1. Preferably, soluble endoglin is measured. More preferably, the measurement of soluble endoglin is combined with measurement of sFlt-1, VEGF or PlGF, and most preferably all four proteins (or mRNA levels indicative of protein levels) are measured. In additional preferred embodiments, the body mass index (BMI) and gestational age of the fetus is also measured and included the diagnostic metric. Elevated serum levels of soluble endoglin is considered a positive indicator of pre-eclampsia or eclampsia. For example, if the level of soluble endoglin is increased relative to a reference sample (e.g., 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more), relative to a reference sample, this is considered a positive indicator of pre-eclampsia or eclampsia. Additionally, any detectable alteration in levels of soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF relative to normal levels is indicative of eclampsia, pre-eclampsia, or the propensity to develop such conditions. Normally, circulating serum concentrations of soluble endoglin range from 2-7 ng/ml during the non-pregnant state and from 10-20 ng/ml during normal pregnancy. Elevated serum levels, greater than 15 ng/ml, preferably greater than 20 ng/ml, and most

preferably greater than 25 ng/ml or more, of soluble endoglin is considered a positive indicator of pre-eclampsia.

In another embodiment, the PAAI (sFlt-1/ VEGF + PlGF) is used, in combination with soluble endoglin measurement, as an anti-angiogenic index that is diagnostic of pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions. If the level of soluble endoglin is increased relative to a reference sample (e.g., 1.5-fold, 2-fold, 3-fold, 4-fold, or even by as much as 10-fold or more), and the PAAI is greater than 10, more preferably greater than 20, then the subject is considered to have pre-eclampsia, eclampsia, or to be in imminent risk of developing the same. The PAAI (sFlt-1/ VEGF + PlGF) ratio is merely one example of a useful metric that may be used as a diagnostic indicator. It is not intended to limit the invention. Virtually any metric that detects an alteration in the levels of soluble endoglin, sFlt-1, PlGF, or VEGF, or any combination thereof, in a subject relative to a normal control may be used as a diagnostic indicator.

Expression levels of particular nucleic acids or polypeptides may be correlated with a particular disease state (e.g., pre-eclampsia or eclampsia), and thus are useful in diagnosis. Oligonucleotides or longer fragments derived from a soluble endoglin, sFlt-1, PlGF, or VEGF nucleic acid sequence may be used as a probe not only to monitor expression, but also to identify subjects having a genetic variation, mutation, or polymorphism in a soluble endoglin, sFlt-1, PlGF, or VEGF nucleic acid molecule that are indicative of a predisposition to develop the conditions. These polymorphisms may affect nucleic acid or polypeptide expression levels or biological activity. Such polymorphisms are known to the skilled artisan and are described, for example, by Raab et al., *supra*, and Parry et al. (*Eur. J Immunogenet.* 26:321-3, 1999). For example, polymorphisms in the endoglin gene have been described and many of these are associated with the dominant vascular disorder known as hereditary haemorrhagic telangiectasia type I (HHT1). Many of these mutations lead to the production of a soluble form of endoglin that is unstable, resulting in the decreased expression of endoglin found

in endothelial cells and monocytes of HHT patients (Raab et al., *supra*). In another example, a survey of the GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) reveals at least 330 known polymorphisms in the gene and the promoter region of Flt-1/sFlt-1. Detection of genetic variation, mutation, or polymorphism relative to a normal, reference sample can be as a diagnostic indicator of pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

Such genetic alterations may be present in the promoter sequence, an open reading frame, intronic sequence, or untranslated 3' region of a gene. Information related to genetic alterations can be used to diagnose a subject as having pre-eclampsia, eclampsia, or a propensity to develop such conditions. As noted throughout, specific alterations in the levels of biological activity of soluble endoglin, sFlt-1, VEGF, or PlGF, or any combination thereof, can be correlated with the likelihood of pre-eclampsia or eclampsia, or the predisposition to the same. As a result, one skilled in the art, having detected a given mutation, can then assay one or more of the biological activities of the protein to determine if the mutation causes or increases the likelihood of pre-eclampsia or eclampsia.

In one embodiment, a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or a propensity to develop such conditions will show an increase in the expression of a nucleic acid encoding soluble endoglin or sFlt-1, or an alteration in PlGF or VEGF levels. Methods for detecting such alterations are standard in the art and are described in Ausubel et al., *supra*. In one example northern blotting or real-time PCR is used to detect soluble endoglin, sFlt-1, PlGF, or VEGF mRNA levels.

In another embodiment, hybridization with PCR probes that are capable of detecting a soluble endoglin nucleic acid molecule, including genomic sequences, or closely related molecules, may be used to hybridize to a nucleic acid sequence derived from a subject having pre-eclampsia or eclampsia or at risk of developing such conditions. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., the 5' regulatory region, or from a less specific region, e.g., a conserved motif, and the stringency of the hybridization or amplification

(maximal, high, intermediate, or low), determine whether the probe hybridizes to a naturally occurring sequence, allelic variants, or other related sequences.

Hybridization techniques may be used to identify mutations indicative of a pre-eclampsia or eclampsia in a soluble endoglin nucleic acid molecule, or may be
5 used to monitor expression levels of a gene encoding a soluble endoglin polypeptide (for example, by Northern analysis, Ausubel et al., *supra*).

In yet another embodiment, humans may be diagnosed for a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia by direct analysis of the sequence of a soluble endoglin nucleic acid molecule.

10 A subject having pre-eclampsia, eclampsia, or a propensity to develop such conditions will show an increase in the expression of a soluble endoglin polypeptide. The soluble endoglin polypeptide can include full-length soluble endoglin, degradation products, alternatively spliced isoforms of soluble endoglin, enzymatic cleavage products of soluble endoglin, and the like. An antibody that
15 specifically binds a soluble endoglin polypeptide may be used for the diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia or to identify a subject at risk of developing such conditions. A variety of protocols for measuring an alteration in the expression of such polypeptides are known, including immunological methods (such as ELISAs and RIAs), and provide a basis for diagnosing pre-eclampsia or eclampsia or a risk
20 of developing such conditions. Again, an increase in the level of the soluble endoglin polypeptide is diagnostic of a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or a propensity to develop such conditions.

In one embodiment, the level of soluble endoglin is measured in combination with the level of sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptide or nucleic acid,
25 or any combination thereof. Methods for the measurement of sFlt-1, VEGF, and PlGF are described in PCT publication number WO 2004/008946 and U.S. Publication No. 20040126828, hereby incorporated by reference in their entirety.

The measurement of any of the nucleic acids or polypeptides described herein preferably occurs on at least two different occasions and an alteration in the

levels as compared to normal reference levels over time is used as an indicator of pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions.

The level of soluble endoglin present in the bodily fluids of a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions may be increased by as little as 10%, 20%, 30%, or 40%, or by as much as 50%, 60%, 70%, 80%, or 90% or more relative to levels in a normal control subject or relative to a previous sampling obtained from the same bodily fluids of the same subject. The level of soluble endoglin in the bodily fluids of a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions may be altered by as little as 10%, 20%, 30%, or 40%, or by as much as 50%, 60%, 70%, 80%, or 90% over time from one measurement to the next.

The level of sFlt-1, VEGF, or PlGF measured in combination with the level of soluble endoglin in the bodily fluids of a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions may be altered by as little as 10%, 20%, 30%, or 40%, or by as much as 50%, 60%, 70%, 80%, or 90% or more relative to the level of sFlt-1, VEGF, or PlGF in a normal control. The level of sFlt-1, VEGF, or PlGF measured in combination with the level of soluble endoglin in the bodily fluids of a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop such conditions may be altered by as little as 10%, 20%, 30%, or 40%, or by as much as 50%, 60%, 70%, 80%, or 90% over time from one measurement to the next.

In one embodiment, a subject sample of a bodily fluid (e.g., urine, plasma, serum, amniotic fluid, or cerebrospinal fluid) is collected early in pregnancy prior to the onset of pre-eclampsia symptoms. In another example, the sample can be a tissue or cell collected early in pregnancy prior to the onset of pre-eclampsia symptoms. Non-limiting examples of tissues and cells include placental tissue, placental cells, endothelial cells, and leukocytes such as monocytes. In humans, for example, maternal blood serum samples are collected from the antecubital vein of pregnant women during the first, second, or third trimesters of the pregnancy.

Preferably, the assay is carried out during the first trimester, for example, at 4, 6, 8, 10, or 12 weeks, or during the second trimester, for example at 14, 16, 18, 20, 22, or 24 weeks. Such assays may also be conducted at the end of the second trimester or the third trimester, for example at 26, 28, 30, 32, 34, 36, or 38 weeks.

- 5 It is preferable that levels of soluble endoglin be measured twice during this period of time. For the diagnosis of post-partum pre-eclampsia or eclampsia, assays for soluble endoglin may be carried out postpartum. For the diagnosis of a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia, the assay is carried out prior to the onset of pregnancy. In one example, for the monitoring and management of therapy, the
10 assay is carried out after the diagnosis of pre-eclampsia but during the pregnancy.

- In one particular example, serial blood samples can be collected during pregnancy and the levels of soluble endoglin determined by ELISA. In another example, a sample is collected during the second trimester and early in the third trimester and an increase in the level of soluble endoglin from the first sampling to
15 the next is indicative of pre-eclampsia or eclampsia, or the propensity to develop either.

- In veterinary practice, assays may be carried out at any time during the pregnancy, but are, preferably, carried out early in pregnancy, prior to the onset of pre-eclampsia symptoms. Given that the term of pregnancies varies widely
20 between species, the timing of the assay will be determined by a veterinarian, but will generally correspond to the timing of assays during a human pregnancy.

- The diagnostic methods described herein can be used individually or in combination with any other diagnostic method described herein for a more accurate diagnosis of the presence of, severity of, or estimated time of onset of
25 pre-eclampsia or eclampsia. In addition, the diagnostic methods described herein can be used in combination with any other diagnostic methods determined to be useful for the accurate diagnosis of the presence of, severity of, or estimated time of onset of pre-eclampsia or eclampsia.

The diagnostic methods described herein can also be used to monitor and manage pre-eclampsia or eclampsia in a subject. In one example, a therapy is administered until the serum soluble endoglin level is less than 25 ng/ml. In another example, if a subject is determined to have an increased level of soluble endoglin relative to a normal control then the therapy can be administered until the serum PlGF level rises to approximately 400 pg/mL. In this embodiment, the levels of soluble endoglin, sFlt-1, PlGF, and VEGF, or any and all of these, are measured repeatedly as a method of not only diagnosing disease but monitoring the treatment and management of the pre-eclampsia and eclampsia.

10

Diagnostic Kits

The invention also provides for a diagnostic test kit. For example, a diagnostic test kit can include antibodies to soluble endoglin and means for detecting, and more preferably evaluating, binding between the antibodies and the soluble endoglin polypeptide. For detection, either the antibody or the soluble endoglin polypeptide is labeled, and either the antibody or the soluble endoglin polypeptide is substrate-bound, such that soluble endoglin polypeptide-antibody interaction can be established by determining the amount of label attached to the substrate following binding between the antibody and the soluble endoglin polypeptide. A conventional ELISA is a common, art-known method for detecting antibody-substrate interaction and can be provided with the kit of the invention. Soluble endoglin polypeptides can be detected in virtually any bodily fluid including, but not limited to urine, serum, plasma, saliva, amniotic fluid, or cerebrospinal fluid. The invention also provides for a diagnostic test kit that includes a soluble endoglin nucleic acid that can be used to detect and determine levels of soluble endoglin nucleic acids. A kit that determines an alteration in the level of soluble endoglin polypeptide relative to a reference, such as the level present in a normal control, is useful as a diagnostic kit in the methods of the invention.

15

20

25

The diagnostic kits of the invention can also include antibodies or nucleic acids for the detection of sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptides or nucleic acids as described in PCT publication number WO 2004/008946.

Desirably, the kit will contain instructions for the use of the kit. In one example, the kit contains instructions for the use of the kit for the diagnosis of pre-eclampsia, eclampsia, or the propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia. In yet another example, the kit contains instructions for the use of the kit to monitor therapeutic treatment or dosage regimens.

10 Screening Assays

As discussed above, the expression of a soluble endoglin nucleic acid or polypeptide is increased in a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or a propensity to develop such conditions. Based on these discoveries, compositions of the invention are useful for the high-throughput low-cost screening of candidate compounds to identify those that modulate the expression of a soluble endoglin polypeptide or nucleic acid molecule whose expression is altered in a subject having a pre-eclampsia or eclampsia.

Any number of methods are available for carrying out screening assays to identify new candidate compounds that alter the expression of a soluble endoglin nucleic acid molecule. In one working example, candidate compounds are added at varying concentrations to the culture medium of cultured cells expressing a soluble endoglin nucleic acid sequence. Exemplary cell cultures include trophoblasts (e.g., BEWO, JAR, and JEG cells) and HUVECs. Cells that express high levels of the membrane bound form of endoglin can be treated with a proteinase (e.g., a matrix metalloproteinase) that cleaves the extracellular domain of endoglin to form soluble endoglin. These cells can then be used to screen for new candidate compounds. Gene expression is then measured, for example, by microarray analysis, Northern blot analysis (Ausubel et al., *supra*), or RT-PCR, using any appropriate fragment prepared from the nucleic acid molecule as a

hybridization probe. The level of gene expression in the presence of the candidate compound is compared to the level measured in a control culture medium lacking the candidate compound. A compound that promotes a decrease in the expression of a soluble endoglin gene, nucleic acid molecule, or polypeptide, or a functional equivalent thereof, is considered useful in the invention; such a molecule may be
5 used, for example, as a therapeutic to treat pre-eclampsia or eclampsia in a subject.

In another working example, the effect of candidate compounds may be measured at the level of polypeptide production using the same general approach and standard immunological techniques, such as Western blotting or
10 immunoprecipitation with an antibody specific for a soluble endoglin polypeptide. For example, immunoassays may be used to detect or monitor the expression of at least one of the polypeptides of the invention in an organism. Polyclonal or monoclonal antibodies (produced as described above) that are capable of binding to such a polypeptide may be used in any standard immunoassay format (e.g.,
15 ELISA, western blot, or RIA assay) to measure the level of the polypeptide. In some embodiments, a compound that promotes a decrease in the expression or biological activity of a soluble endoglin polypeptide is considered particularly useful. Again, such a molecule may be used, for example, as a therapeutic to delay, ameliorate, or treat a pre-eclampsia or eclampsia, or the symptoms of a pre-
20 eclampsia or eclampsia, in a subject.

In yet another working example, candidate compounds may be screened for those that specifically bind to a soluble endoglin polypeptide. The efficacy of such a candidate compound is dependent upon its ability to interact with such a polypeptide or a functional equivalent thereof. Such an interaction can be readily
25 assayed using any number of standard binding techniques and functional assays (e.g., those described in Ausubel et al., *supra*). In one embodiment, a candidate compound may be tested *in vitro* for its ability to specifically bind a polypeptide of the invention. In another embodiment, a candidate compound is tested for its ability to decrease the biological activity of a soluble endoglin polypeptide by

decreasing binding of a soluble endoglin polypeptide and a growth factor, such as TGF- β , TGF- β 3, activin-A, BMP-2 and BMP-7.

In another working example, a soluble endoglin nucleic acid is expressed as a transcriptional or translational fusion with a detectable reporter, and expressed in an isolated cell (e.g., mammalian or insect cell) under the control of a heterologous promoter, such as an inducible promoter. The cell expressing the fusion protein is then contacted with a candidate compound, and the expression of the detectable reporter in that cell is compared to the expression of the detectable reporter in an untreated control cell. A candidate compound that decreases the expression of a soluble endoglin detectable reporter is a compound that is useful for the treatment of pre-eclampsia or eclampsia. In preferred embodiments, the candidate compound alters the expression of a reporter gene fused to a nucleic acid or nucleic acid.

In one particular working example, a candidate compound that binds to a soluble endoglin polypeptide may be identified using a chromatography-based technique. For example, a recombinant polypeptide of the invention may be purified by standard techniques from cells engineered to express the polypeptide (e.g., those described above) and may be immobilized on a column. A solution of candidate compounds is then passed through the column, and a compound specific for the soluble endoglin polypeptide is identified on the basis of its ability to bind to the polypeptide and be immobilized on the column. To isolate the compound, the column is washed to remove non-specifically bound molecules, and the compound of interest is then released from the column and collected. Similar methods may be used to isolate a compound bound to a polypeptide microarray. Compounds isolated by this method (or any other appropriate method) may, if desired, be further purified (e.g., by high performance liquid chromatography). In addition, these candidate compounds may be tested for their ability to decrease the activity of a soluble endoglin polypeptide. Compounds isolated by this approach may also be used, for example, as therapeutics to treat pre-eclampsia or eclampsia

in a human subject. Compounds that are identified as binding to a polypeptide of the invention with an affinity constant less than or equal to 10 mM are considered particularly useful in the invention. Alternatively, any *in vivo* protein interaction detection system, for example, any two-hybrid assay may be utilized to identify
5 compounds or proteins that bind to a polypeptide of the invention.

Potential antagonists include organic molecules, peptides, peptide mimetics, polypeptides, nucleic acids, and antibodies that bind to a soluble endoglin nucleic acid sequence or a soluble endoglin polypeptide.

Soluble endoglin DNA sequences may also be used in the discovery and
10 development of a therapeutic compound for the treatment of pre-eclampsia or eclampsia. The encoded protein, upon expression, can be used as a target for the screening of drugs. Additionally, the DNA sequences encoding the amino terminal regions of the encoded protein or Shine-Delgarno or other translation facilitating sequences may be isolated by standard techniques (Ausubel et al.,
15 *supra*).

Optionally, compounds identified in any of the above-described assays may be confirmed as useful in an assay for compounds that decrease the biological activity of soluble endoglin.

Small molecules of the invention preferably have a molecular weight below
20 2,000 daltons, more preferably between 300 and 1,000 daltons, and most preferably between 400 and 700 daltons. It is preferred that these small molecules are organic molecules.

Test compounds and extracts

25 In general, compounds capable of decreasing the activity of a soluble endoglin polypeptide are identified from large libraries of both natural product or synthetic (or semi-synthetic) extracts or chemical libraries or from polypeptide or nucleic acid libraries, according to methods known in the art. Those skilled in the field of drug discovery and development will understand that the precise source of

test extracts or compounds is not critical to the screening procedure(s) of the invention. Compounds used in screens may include known compounds (for example, known therapeutics used for other diseases or disorders). Alternatively, virtually any number of unknown chemical extracts or compounds can be screened
5 using the methods described herein. Examples of such extracts or compounds include, but are not limited to, plant-, fungal-, prokaryotic- or animal-based extracts, fermentation broths, and synthetic compounds, as well as modification of existing compounds. Numerous methods are also available for generating random or directed synthesis (e.g., semi-synthesis or total synthesis) of any number of
10 chemical compounds, including, but not limited to, saccharide-, lipid-, peptide-, and nucleic acid-based compounds. Synthetic compound libraries are commercially available from Brandon Associates (Merrimack, NH) and Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant, and animal extracts are commercially available
15 from a number of sources, including Biotics (Sussex, UK), Xenova (Slough, UK), Harbor Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce, FL), and PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA). In addition, natural and synthetically produced libraries are produced, if desired, according to methods known in the art, e.g., by standard extraction and fractionation methods. Furthermore, if desired, any library or
20 compound is readily modified using standard chemical, physical, or biochemical methods.

In addition, those skilled in the art of drug discovery and development readily understand that methods for dereplication (e.g., taxonomic dereplication, biological dereplication, and chemical dereplication, or any combination thereof)
25 or the elimination of replicates or repeats of materials already known for their molt-disrupting activity should be employed whenever possible.

When a crude extract is found to decrease the activity of a soluble endoglin polypeptide, or to bind to a soluble endoglin polypeptide, further fractionation of the positive lead extract is necessary to isolate chemical constituents responsible

for the observed effect. Thus, the goal of the extraction, fractionation, and purification process is the careful characterization and identification of a chemical entity within the crude extract that decreases the activity of a soluble endoglin polypeptide. Methods of fractionation and purification of such heterogeneous
5 extracts are known in the art. If desired, compounds shown to be useful as therapeutics for the treatment of a human pre-eclampsia or eclampsia are chemically modified according to methods known in the art.

Therapeutics

10 The present invention features methods and compositions for treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject. Given that levels of soluble endoglin are increased in subjects having pre-eclampsia, eclampsia, or having a propensity to develop such conditions, any agent that decreases the expression levels and/or biological activity of a soluble endoglin polypeptide or nucleic acid
15 molecule is useful in the methods of the invention. Such agents include compounds such as TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, or BMP7, that can disrupt soluble endoglin binding to ligands; a purified antibody or antigen-binding fragment that specifically binds soluble endoglin; antisense nucleobase oligomers; and dsRNAs used to mediate RNA interference. Additional useful compounds can
20 alter the biological activity of soluble endoglin, for example, as measured by an angiogenesis assay. These methods are described in detail below. These methods can also be combined with methods to decrease sFlt-1 levels or to increase VEGF or PlGF levels or decrease sFlt-1 levels as described in PCT publication number WO 2004/008946 and U.S. Patent Publication No. 20040126828.

25

Therapeutics targeting the TGF- β signaling pathway

TGF- β is the prototype of a family of at least 25 growth factors which regulate growth, differentiation, motility, tissue remodeling, neurogenesis, wound repair, apoptosis, and angiogenesis in many cell types. TGF- β also inhibits cell

proliferation in many cell types and can stimulate the synthesis of matrix proteins. Unless evidenced from the context in which it is used, the term TGF β as used throughout this specification will be understood to generally refer to members of the TGF β superfamily as appropriate. Soluble endoglin binds several specific members of the TGF- β family including TGF- β 1, TGF- β 3, activin, BMP-2 and BMP-7, and may serve to deplete the developing fetus or placenta of these necessary mitogenic and angiogenic factor. The present invention features methods of increasing the levels of these ligands to bind to soluble endoglin and to neutralize the effects of soluble endoglin.

10

Purified proteins

In a preferred embodiment of the present invention, purified forms of any soluble endoglin ligand such as TGF- β family proteins, including but not limited to TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, and BMP7, are administered to the subject in order to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia.

15

Purified TGF- β family proteins include any protein with an amino acid sequence that is homologous, more desirably, substantially identical to the amino acid sequence of TGF- β 1 or TGF- β 3, or any known TGF- β family member, that can induce angiogenesis. Non-limiting examples include human TGF β 1 (Cat #240-B-002) and human TGF β 3 (Cat #243-B3-002) from R & D Systems, MN.

20

Therapeutic compounds that inhibit proteolytic cleavage of endoglin

We have identified a potential cleavage site in the extracellular domain of endoglin where a proteolytic enzyme could cleave the membrane bound form of endoglin, releasing the extracellular domain as a soluble form. Our sequence alignments of the cleavage site suggest that a matrix metalloproteinase (MMP) may be responsible for the cleavage and release of soluble endoglin. Alternatively, a cathepsin or an elastase may also be involved in the cleavage event. MMPs are also known as collagenases, gelatinases, and stromelysins and

25

there are currently 26 family members known (for a review see Whittaker and Ayscough, *Cell Transmissions* 17:1, which can be obtained from the following web site: www.sigma-aldrich.com/cellsignalling). A preferred MMP is MMP9, which is known to be up-regulated in placentas from pre-eclamptic patients (Lim et al., *Am. J. Pathol.* 151:1809-1818, 1997). The activity of MMPs is controlled through activation of pro-enzymes and inhibition by endogenous inhibitors such as the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS). Inhibitors of MMPs are zinc binding proteins. There are 4 known endogenous inhibitors (TIMP 1-4), which are reviewed in Whittaker et al., *supra*. In addition, a variety of naturally-occurring and synthetic MMP inhibitors have been identified and are also reviewed in Whittaker et al., *supra*. Examples include antibodies directed to MMPs, and various compounds including BB-2516, BB-94, CT1746, BAY 12-9566, AG3340, CGS-27023A, D2163, and Ro32-3555, some of which are currently in clinical trials. Given the potential role of MMPs, cathepsins, or elastases in the release and up-regulation of soluble endoglin levels, the present invention also provides for the use of any compound, such as those described above, known to inhibit the activity of any MMP, cathepsin, or elastase involved in the cleavage and release of soluble endoglin, for the treatment or prevention of pre-eclampsia or eclampsia in a subject.

20

Therapeutic compounds that increase soluble endoglin binding proteins

The present invention provides for the use of any compound known to stimulate or increase blood serum levels of soluble endoglin binding proteins, including but not limited to TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, and BMP7, for the treatment or prevention of pre-eclampsia in a subject. These compounds can be used alone or in combination with the purified proteins described above or any of the other methods used to increase TGF- β family proteins protein levels described herein. In one example, cyclosporine is used to stimulate TGF- β 1 production at a dosage of 100-200 mg twice a day.

25

In addition to the use of compounds that can increase serum levels of soluble endoglin binding proteins, the invention provides for the use of any chronic hypertension medications used in combination with any of the therapeutic methods described herein. Medications used for the treatment of hypertension during pregnancy include methyldopa, hydralazine hydrochloride, or labetalol. For each of these medications, modes of administration and dosages are determined by the physician and by the manufacturer's instructions.

Therapeutic compounds that alter the anti-angiogenic activity of soluble endoglin

Additional therapeutic compounds can be identified using angiogenesis assays. For example, pre-eclamptic serum added to a matrigel tube formation assay will induce an anti-angiogenic state. Test compounds can then be added to the assay and a reversion in the anti-angiogenic state by 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or more indicates that the compound can reduce the biological activity of soluble endoglin and is useful as a therapeutic compound.

Therapeutic nucleic acids

Recent work has shown that the delivery of nucleic acid (DNA or RNA) capable of expressing an endothelial cell mitogen such as VEGF to the site of a blood vessel injury will induce proliferation and reendothelialization of the injured vessel. While the present invention does not relate to blood vessel injury, these general techniques for the delivery of nucleic acid to endothelial cells can be used in the present invention for the delivery of nucleic acids encoding soluble endoglin binding proteins, such as TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2 and BMP7. These general techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,830,879 and 6,258,787 and are incorporated herein by reference.

In the present invention the nucleic acid may be any nucleic acid (DNA or RNA) including genomic DNA, cDNA, and mRNA, encoding a soluble endoglin binding proteins such as TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2 and BMP7. The

nucleic acids encoding the desired protein may be obtained using routine procedures in the art, e.g. recombinant DNA, PCR amplification.

Modes for delivering nucleic acids

5 For any of the nucleic acid applications described herein, standard methods for administering nucleic acids can be used. For example, to simplify the manipulation and handling of the nucleic acid encoding the soluble endoglin binding protein, the nucleic acid is preferably inserted into a cassette where it is operably linked to a promoter. The promoter must be capable of driving
10 expression of the soluble endoglin binding protein in the desired target host cell. The selection of appropriate promoters can readily be accomplished. Preferably, one would use a high expression promoter. An example of a suitable promoter is the 763-base-pair cytomegalovirus (CMV) promoter. The Rous sarcoma virus (RSV) (Davis, et al., *Hum. Gene Ther.* 4:151-159, 1993) and mouse mammary
15 tumor virus (MMTV) promoters may also be used. Certain proteins can be expressed using their native promoter. Other elements that can enhance expression can also be included (e.g., enhancers or a system that results in high levels of expression such as a tat gene and tar element). The recombinant vector can be a plasmid vector such as pUC118, pBR322, or other known plasmid
20 vectors, that includes, for example, an *E. coli* origin of replication (see, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989). The plasmid vector may also include a selectable marker such as the β lactamase gene for ampicillin resistance, provided that the marker polypeptide does not adversely affect the metabolism of the organism being treated. The
25 cassette can also be bound to a nucleic acid binding moiety in a synthetic delivery system, such as the system disclosed in PCT Publication No. WO95/22618.

The nucleic acid can be introduced into the cells by any means appropriate for the vector employed. Many such methods are well known in the art (Sambrook et al., *supra*, and Watson et al., "Recombinant DNA", Chapter 12, 2d

edition, Scientific American Books, 1992). Recombinant vectors can be transferred by methods such as calcium phosphate precipitation, electroporation, liposome-mediated transfection, gene gun, microinjection, viral capsid-mediated transfer, polybrene-mediated transfer, or protoplast fusion. For a review of the
 5 procedures for liposome preparation, targeting and delivery of contents, see Mannino and Gould-Fogerite, (*Bio Techniques*, 6:682-690, 1988), Felgner and Holm, (*Bethesda Res. Lab. Focus*, 11:21, 1989) and Maurer (*Bethesda Res. Lab. Focus*, 11:25, 1989).

Transfer of the recombinant vector (either plasmid vector or viral vectors)
 10 can be accomplished through direct injection into the amniotic fluid or intravenous delivery.

Gene delivery using adenoviral vectors or adeno-associated vectors (AAV) can also be used. Adenoviruses are present in a large number of animal species, are not very pathogenic, and can replicate equally well in dividing and quiescent
 15 cells. As a general rule, adenoviruses used for gene delivery are lacking one or more genes required for viral replication. Replication-defective recombinant adenoviral vectors used for the delivery of a soluble endoglin binding protein, can be produced in accordance with art-known techniques (see Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584, 1992; Stratford-Perricadet et al., *J. Clin. Invest.*, 90:626-630, 1992; and Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155, 1992). For an
 20 example of the use of gene therapy *in utero* see U.S. Patent No. 6,399,585.

Once transferred, the nucleic acid is expressed by the cells at the site of injury for a period of time sufficient to increase blood serum levels of a soluble endoglin binding protein. Because the vectors containing the nucleic acid are not
 25 normally incorporated into the genome of the cells, expression of the protein of interest takes place for only a limited time. Typically, the protein is expressed at therapeutic levels for about two days to several weeks, preferably for about one to two weeks. Re-application of the DNA can be utilized to provide additional periods of expression of the therapeutic protein.

Therapeutic nucleic acids that inhibit soluble endoglin expression

The present invention also features the use of antisense nucleobase oligomers to downregulate expression of soluble endoglin mRNA directly. By
5 binding to the complementary nucleic acid sequence (the sense or coding strand), antisense nucleobase oligomers are able to inhibit protein expression presumably through the enzymatic cleavage of the RNA strand by RNase H. Preferably the antisense nucleobase oligomer is capable of reducing soluble endoglin protein expression in a cell that expresses increased levels of soluble endoglin. Preferably
10 the decrease in soluble endoglin protein expression is at least 10% relative to cells treated with a control oligonucleotide, more preferably 25%, and most preferably 50% or greater. Methods for selecting and preparing antisense nucleobase oligomers are well known in the art. For an example of the use of antisense nucleobase oligomers to downregulate VEGF expression see U.S. Patent No.
15 6,410,322, incorporated herein by reference. Methods for assaying levels of protein expression are also well known in the art and include western blotting, immunoprecipitation, and ELISA.

The present invention also features the use of RNA interference (RNAi) to inhibit expression of soluble endoglin. RNA interference (RNAi) is a recently
20 discovered mechanism of post-transcriptional gene silencing (PTGS) in which double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to a gene or mRNA of interest is introduced into an organism resulting in the degradation of the corresponding mRNA. In the RNAi reaction, both the sense and anti-sense strands of a dsRNA molecule are processed into small RNA fragments or segments ranging in length
25 from 21 to 23 nucleotides (nt) and having 2-nucleotide 3' tails. Alternatively, synthetic dsRNAs, which are 21 to 23 nt in length and have 2-nucleotide 3' tails, can be synthesized, purified and used in the reaction. These 21 to 23 nt dsRNAs are known as "guide RNAs" or "short interfering RNAs" (siRNAs).

The siRNA duplexes then bind to a nuclease complex composed of proteins that target and destroy endogenous mRNAs having homology to the siRNA within the complex. Although the identity of the proteins within the complex remains unclear, the function of the complex is to target the homologous mRNA molecule through base pairing interactions between one of the siRNA strands and the endogenous mRNA. The mRNA is then cleaved approximately 12 nt from the 3' terminus of the siRNA and degraded. In this manner, specific genes can be targeted and degraded, thereby resulting in a loss of protein expression from the targeted gene. siRNAs can also be chemically synthesized or obtained from a company that chemically synthesizes siRNAs (e.g., Dharmacon Research Inc., Pharmacia, or ABI).

The specific requirements and modifications of dsRNA are described in PCT Publication No. WO01/75164 (incorporated herein by reference). While dsRNA molecules can vary in length, it is most preferable to use siRNA molecules which are 21- to 23- nucleotide dsRNAs with characteristic 2- to 3- nucleotide 3' overhanging ends typically either (2'-deoxy)thymidine or uracil. The siRNAs typically comprise a 3' hydroxyl group. Single stranded siRNA as well as blunt ended forms of dsRNA can also be used. In order to further enhance the stability of the RNA, the 3' overhangs can be stabilized against degradation. In one such embodiment, the RNA is stabilized by including purine nucleotides, such as adenosine or guanosine. Alternatively, substitution of pyrimidine nucleotides by modified analogs, e.g., substitution of uridine 2-nucleotide overhangs by (2'-deoxy)thymidine is tolerated and does not affect the efficiency of RNAi. The absence of a 2' hydroxyl group significantly enhances the nuclease resistance of the overhang in tissue culture medium.

Alternatively siRNA can be prepared using any of the methods set forth in PCT Publication No. WO01/75164 (incorporated herein by reference) or using standard procedures for *in vitro* transcription of RNA and dsRNA annealing procedures as described in Elbashir et al. (*Genes & Dev.*, 15:188-200, 2001).

siRNAs are also obtained as described in Elbashir et al. by incubation of dsRNA that corresponds to a sequence of the target gene in a cell-free *Drosophila* lysate from syncytial blastoderm *Drosophila* embryos under conditions in which the dsRNA is processed to generate siRNAs of about 21 to about 23 nucleotides, which are then isolated using techniques known to those of skill in the art. For example, gel electrophoresis can be used to separate the 21-23 nt RNAs and the RNAs can then be eluted from the gel slices. In addition, chromatography (e.g., size exclusion chromatography), glycerol gradient centrifugation, and affinity purification with antibody can be used to isolate the 21 to 23 nt RNAs.

10 A variety of methods are available for transfection, or introduction, of dsRNA or oligonucleotides into mammalian cells. For example, there are several commercially available transfection reagents including but not limited to: TransIT-TKO™ (Mirus, Cat. # MIR 2150), Transmessenger™ (Qiagen, Cat. # 301525), and Oligofectamine™ (Invitrogen, Cat. # MIR 12252-011). Protocols for each
15 transfection reagent are available from the manufacturer.

In the present invention, the dsRNA, or siRNA, is complementary to the mRNA sequence of soluble endoglin mRNA and can reduce or inhibit expression of soluble endoglin. Preferably, the decrease in soluble endoglin protein expression is at least 10% relative to cells treated with a control dsRNA or siRNA, more preferably 25%, and most preferably at least 50%. Methods for assaying
20 levels of protein expression are also well known in the art and include western blotting, immunoprecipitation, and ELISA.

In the present invention, the nucleic acids used include any modification that enhances the stability or function of the nucleic acid in any way. Examples
25 include modifications to the phosphate backbone, the internucleotide linkage, or to the sugar moiety.

Assays for gene and protein expression

The following methods can be used to evaluate protein or gene expression and determine efficacy for any of the above-mentioned methods for increasing soluble endoglin binding protein levels, or for decreasing soluble endoglin protein levels.

Blood serum from the subject is measured for levels of soluble endoglin, using methods such as ELISA, western blotting, or immunoassays using specific antibodies. Blood serum from the subject can also be measured for levels of TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, BMP7, or any protein ligand known to bind to soluble endoglin. Methods used to measure serum levels of proteins include ELISA, western blotting, or immunoassays using specific antibodies. In addition, *in vitro* angiogenesis assays can be performed to determine if the subject's blood has converted from an anti-angiogenic state to a pro-angiogenic state. Such assays are described above in Example 4. A positive result is considered an increase of at least 20%, preferably 30%, more preferably at least 50%, and most preferably at least 60% in the serum levels of TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, BMP7, or any protein ligand known to bind to soluble endoglin. A positive result can also be considered conversion from an anti-angiogenic state to a pro-angiogenic state using the *in vitro* angiogenesis assay.

Blood serum samples from the subject can also be measured for levels of TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, BMP7, or soluble endoglin nucleic acid levels. There are several art-known methods to assay for gene expression. Some examples include the preparation of RNA from the blood samples of the subject and the use of the RNA for northern blotting, PCR based amplification, or RNase protection assays.

Use of antibodies for therapeutic treatment

The elevated levels of soluble endoglin found in the serum samples taken from pregnant women suffering from pre-eclampsia suggests that soluble endoglin

is acting as a "physiologic sink" to bind to and deplete the trophoblast cells and maternal endothelial cells of functional growth factors required for the proper development and angiogenesis of the fetus or the placenta. The use of compounds, such as antibodies, to bind to soluble endoglin and neutralize the activity of soluble endoglin (e.g., binding to TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, BMP7), may help prevent or treat pre-eclampsia or eclampsia, by producing an increase in free TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, and BMP7. Such an increase would allow for an increase in trophoblast proliferation, migration and angiogenesis required for placental development and fetal nourishment, and for systemic maternal endothelial cell health.

The present invention provides antibodies that bind specifically to the ligand-binding domain of soluble endoglin. The antibodies are used to neutralize the activity of soluble endoglin and the most effective mechanism is believed to be through direct blocking of the binding sites for TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, or BMP7, however, other mechanisms cannot be ruled out. Methods for the preparation and use of antibodies for therapeutic purposes are described in several patents including U.S. Patent Numbers 6,054,297; 5,821,337; 6,365,157; and 6,165,464 and are incorporated herein by reference. Antibodies can be polyclonal or monoclonal; monoclonal antibodies are preferred.

Monoclonal antibodies, particularly those derived from rodents including mice, have been used for the treatment of various diseases; however, there are limitations to their use including the induction of a human anti-mouse immunoglobulin response that causes rapid clearance and a reduction in the efficacy of the treatment. For example, a major limitation in the clinical use of rodent monoclonal antibodies is an anti-globulin response during therapy (Miller et al., *Blood*, 62:988-995 1983; Schroff et al., *Cancer Res.*, 45:879-885, 1985).

The art has attempted to overcome this problem by constructing "chimeric" antibodies in which an animal antigen-binding variable domain is coupled to a human constant domain (U.S. Pat. No. 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). The production and use of such chimeric antibodies are described below.

Competitive inhibition of ligand binding to soluble endoglin is useful for the prevention or treatment of pre-eclampsia or eclampsia. Such an increase can result in a rescue of endothelial dysfunction and a shift in the balance of pro-angiogenic /anti-angiogenic factors towards angiogenesis.

A cocktail of the monoclonal antibodies of the present invention can be used as an effective treatment for pre-eclampsia or eclampsia. The cocktail may include as few as two, three, or four different antibodies or as many as six, eight, or ten different antibodies. In addition, the antibodies of the present invention can be combined with an anti-hypertensive drug (e.g., methyldopa, hydralazine hydrochloride, or labetalol) or any other medication used to treat pre-eclampsia, eclampsia, or the symptoms associated with pre-eclampsia or eclampsia.

15

Preparation of Antibodies

Monoclonal antibodies that specifically bind to the sFlt-1 receptor may be produced by methods known in the art. These methods include the immunological method described by Kohler and Milstein (*Nature*, 256: 495-497, 1975) and Campbell ("Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" in Burdon et al., Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985), as well as by the recombinant DNA method described by Huse et al. (*Science*, 246, 1275-1281, 1989).

Monoclonal antibodies may be prepared from supernatants of cultured hybridoma cells or from ascites induced by intra-peritoneal inoculation of hybridoma cells into mice. The hybridoma technique described originally by Kohler and Milstein (*Eur. J. Immunol*, 6, 511-519, 1976) has been widely applied

to produce hybrid cell lines that secrete high levels of monoclonal antibodies against many specific antigens.

The route and schedule of immunization of the host animal or cultured antibody-producing cells therefrom are generally in keeping with established and conventional techniques for antibody stimulation and production. Typically, mice
5 are used as the test model, however, any mammalian subject including human subjects or antibody producing cells therefrom can be manipulated according to the processes of this invention to serve as the basis for production of mammalian, including human, hybrid cell lines.

10 After immunization, immune lymphoid cells are fused with myeloma cells to generate a hybrid cell line that can be cultivated and subcultivated indefinitely, to produce large quantities of monoclonal antibodies. For purposes of this invention, the immune lymphoid cells selected for fusion are lymphocytes and their normal differentiated progeny, taken either from lymph node tissue or spleen
15 tissue from immunized animals. The use of spleen cells is preferred, since they offer a more concentrated and convenient source of antibody producing cells with respect to the mouse system. The myeloma cells provide the basis for continuous propagation of the fused hybrid. Myeloma cells are tumor cells derived from plasma cells. Murine myeloma cell lines can be obtained, for example, from the
20 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines have also been described (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).

The hybrid cell lines can be maintained *in vitro* in cell culture media. Once
25 the hybridoma cell line is established, it can be maintained on a variety of nutritionally adequate media such as hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium. Moreover, the hybrid cell lines can be stored and preserved in any number of conventional ways, including freezing and storage under liquid nitrogen. Frozen cell lines can be revived and cultured indefinitely with resumed

synthesis and secretion of monoclonal antibody. The secreted antibody is recovered from tissue culture supernatant by conventional methods such as precipitation, ion exchange chromatography, affinity chromatography, or the like.

The antibody may be prepared in any mammal, including mice, rats, rabbits, goats, and humans. The antibody may be a member of one of the following immunoglobulin classes: IgG, IgM, IgA, IgD, or IgE, and the subclasses thereof, and preferably is an IgG antibody.

While the preferred animal for producing monoclonal antibodies is mouse, the invention is not so limited; in fact, human antibodies may be used and may prove to be preferable. Such antibodies can be obtained by using human hybridomas (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss Inc., p. 77-96, 1985). In the present invention, techniques developed for the production of chimeric antibodies by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule can be used (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); such antibodies are within the scope of this invention and are described below.

As another alternative to the cell fusion technique, Epstein-Barr virus (EBV) immortalized B cells are used to produce the monoclonal antibodies of the present invention (Crawford D. et al., *J. of Gen. Virol.*, 64:697-700, 1983; Kozbor and Roder, *J. Immunol.*, 4:1275-1280, 1981; Kozbor et al., *Methods in Enzymology*, 121:120-140, 1986). In general, the procedure consists of isolating Epstein-Barr virus from a suitable source, generally an infected cell line, and exposing the target antibody secreting cells to supernatants containing the virus. The cells are washed, and cultured in an appropriate cell culture medium. Subsequently, virally transformed cells present in the cell culture can be identified by the presence of the Epstein-Barr viral nuclear antigen, and transformed antibody secreting cells can be identified using standard methods known in the art.

Other methods for producing monoclonal antibodies, such as recombinant DNA, are also included within the scope of the invention.

Preparation of soluble endoglin immunogens

5 Soluble endoglin may be used by itself as an immunogen, or may be attached to a carrier protein or to other objects, such as sepharose beads. Soluble endoglin may be purified from cells known to express the endogenous protein such as human umbilical vein endothelial cells (trophoblasts or HUVEC; Burrows et al., *Clin. Cancer Res.* 1:1623-1634, 1995; Fonsatti et al., *Clin. Cancer Res.* 10 6:2037-2043, 2000). Cells that express membrane bound endoglin can be treated with a proteolytic enzyme (e.g., a matrix metalloproteinase) to cleave the extracellular domain, thereby producing the soluble form. Additionally, nucleic acid molecules that encode soluble endoglin, or portions thereof, can be inserted into known vectors for expression in host cells using standard recombinant DNA 15 techniques. Suitable host cells for soluble endoglin expression include baculovirus cells (e.g., Sf9 cells), bacterial cells (e.g., *E. coli*), and mammalian cells (e.g., NIH3T3 cells).

In addition, peptides can be synthesized and used as immunogens. The methods for making antibody to peptides are well known in the art and generally 20 require coupling the peptide to a suitable carrier molecule, such as serum albumin. Peptides include any amino acid sequence that is substantially identical to any part of the soluble endoglin amino acid sequence corresponding to GenBank accession numbers AAH29080 and NP_031958 (mouse); AAS67893 (rat); NP_000109, P17813, VSP_004233, and CAA80673 (human); and A49722 (pig). Peptides can 25 be any length, preferably 10 amino acids or greater, more preferably 25 amino acids or greater, and most preferably 40, 50, 60, 70, 80, or 100 amino acids or greater. Preferably, the amino acid sequences are at least 60%, more preferably 85%, and, most preferably 95% identical to the sequence of any of the human endoglin sequences. The peptides can be commercially obtained or made using

techniques well known in the art, such as, for example, the Merrifield solid-phase method (*Science*, 232:341-347, 1985). The procedure may use commercially available synthesizers such as a Bioscarth 9500 automated peptide machine, with cleavage of the blocked amino acids being achieved with hydrogen fluoride, and
5 the peptides purified by preparative HPLC using a Waters Delta Prep 3000 instrument, on a 15-20 μ m Vydac C4 PrepPAK column.

Functional equivalents of antibodies

The invention also includes functional equivalents of the antibodies
10 described in this specification. Functional equivalents include polypeptides with amino acid sequences substantially identical to the amino acid sequence of the variable or hypervariable regions of the antibodies of the invention. Functional equivalents have binding characteristics comparable to those of the antibodies, and include, for example, chimerized, humanized and single chain antibodies as well
15 as fragments thereof. Methods of producing such functional equivalents are disclosed, for example, in PCT Publication No. WO93/21319; European Patent Application No. 239,400; PCT Publication No. WO89/09622; European Patent Application No. 338,745; European Patent Application No. 332424; and U.S. Patent No. 4,816,567; each of which is herein incorporated by reference.

20 Chimerized antibodies preferably have constant regions derived substantially or exclusively from human antibody constant regions and variable regions derived substantially or exclusively from the sequence of the variable region from a mammal other than a human. Such humanized antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as
25 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art (for reviews see Vaswani and Hamilton, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 81:105-119, 1998 and Carter, *Nature Reviews Cancer*, 1:118-129, 2001). Generally, a humanized

antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as import residues, which are typically taken from an import variable domain. Humanization can be essentially performed following the methods known in the art (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988; and Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 1988), by substituting rodent CDRs or other CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such humanized antibodies are chimeric antibodies wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species (see for example, U.S. Patent No. 4,816,567). In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies (Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992).

Additional methods for the preparation of humanized antibodies can be found in U.S. Patent Nos. 5,821,337, and 6,054,297, and Carter, (*supra*) which are all incorporated herein by reference. The humanized antibody is selected from any class of immunoglobulins, including IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including IgG₁, IgG₂, IgG₃, and IgG₄. Where cytotoxic activity is not needed, such as in the present invention, the constant domain is preferably of the IgG₂ class. The humanized antibody may comprise sequences from more than one class or isotype, and selecting particular constant domains to optimize desired effector functions is within the ordinary skill in the art.

Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries (Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991 and Winter et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-455, 1994). The techniques of Cole et al. and Boerner et al. are also useful for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole et al., *supra*; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86-95, 1991).

Suitable mammals other than a human include any mammal from which monoclonal antibodies may be made. Examples of mammals other than a human include, for example a rabbit, rat, mouse, horse, goat, or primate; a mouse is preferred.

- 5 Functional equivalents of antibodies also include single-chain antibody fragments, also known as single-chain antibodies (scFvs). Single-chain antibody fragments are recombinant polypeptides which typically bind antigens or receptors; these fragments contain at least one fragment of an antibody variable heavy-chain amino acid sequence (V_H) tethered to at least one fragment of an
- 10 antibody variable light-chain sequence (V_L) with or without one or more interconnecting linkers. Such a linker may be a short, flexible peptide selected to assure that the proper three-dimensional folding of the V_L and V_H domains occurs once they are linked so as to maintain the target molecule binding-specificity of the whole antibody from which the single-chain antibody fragment is derived.
- 15 Generally, the carboxyl terminus of the V_L or V_H sequence is covalently linked by such a peptide linker to the amino acid terminus of a complementary V_L and V_H sequence. Single-chain antibody fragments can be generated by molecular cloning, antibody phage display library or similar techniques. These proteins can be produced either in eukaryotic cells or prokaryotic cells, including bacteria.
- 20 Single-chain antibody fragments contain amino acid sequences having at least one of the variable regions or CDRs of the whole antibodies described in this specification, but are lacking some or all of the constant domains of those antibodies. These constant domains are not necessary for antigen binding, but constitute a major portion of the structure of whole antibodies. Single-chain
- 25 antibody fragments may therefore overcome some of the problems associated with the use of antibodies containing part or all of a constant domain. For example, single-chain antibody fragments tend to be free of undesired interactions between biological molecules and the heavy-chain constant region, or other unwanted biological activity. Additionally, single-chain antibody fragments are

regions and variable regions other than the CDRs derived substantially or exclusively from the corresponding human antibody regions and DNA encoding CDRs derived substantially or exclusively from a mammal other than a human.

Suitable sources of DNA molecules that encode fragments of antibodies
5 include cells, such as hybridomas, that express the full-length antibody. The fragments may be used by themselves as antibody equivalents, or may be recombined into equivalents, as described above.

The DNA deletions and recombinations described in this section may be carried out by known methods, such as those described in the published patent
10 applications listed above.

Antibody Screening and Selection

Monoclonal antibodies are isolated and purified using standard art-known methods. For example, antibodies can be screened using standard art-known
15 methods such as ELISA against the soluble endoglin peptide antigen or western blot analysis. Non-limiting examples of such techniques are described in Examples II and III of U.S. Patent No. 6,365,157, herein incorporated by reference.

Therapeutic Uses of Antibodies

When used *in vivo* for the treatment or prevention of pre-eclampsia or eclampsia, the antibodies of the subject invention are administered to the subject in therapeutically effective amounts. Preferably, the antibodies are administered parenterally or intravenously by continuous infusion. The dose and dosage
25 regimen depends upon the severity of the disease, and the overall health of the subject. The amount of antibody administered is typically in the range of about 0.001 to about 10 mg/kg of subject weight, preferably 0.01 to about 5 mg/kg of subject weight.

For parenteral administration, the antibodies are formulated in a unit dosage injectable form (solution, suspension, emulsion) in association with a pharmaceutically acceptable parenteral vehicle. Such vehicles are inherently nontoxic, and non-therapeutic. Examples of such vehicles are water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Nonaqueous vehicles such as fixed oils and ethyl oleate may also be used. Liposomes may be used as carriers. The vehicle may contain minor amounts of additives such as substances that enhance isotonicity and chemical stability, e.g., buffers and preservatives. The antibodies typically are formulated in such vehicles at concentrations of about 1 mg/ml to 10 mg/ml.

Combination therapies

Optionally, a pre-eclampsia or eclampsia therapeutic may be administered in combination with any other standard pre-eclampsia or eclampsia therapy; such methods are known to the skilled artisan

Dosages and Modes of Administration

Preferably, the therapeutic is administered during pregnancy for the treatment or prevention of pre-eclampsia or eclampsia or after pregnancy to treat post-partum pre-eclampsia or eclampsia. Techniques and dosages for administration vary depending on the type of compound (e.g., chemical compound, antibody, antisense, or nucleic acid vector) and are well known to those skilled in the art or are readily determined.

Therapeutic compounds of the present invention may be administered with a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient, in unit dosage form. Administration may be parenteral, intravenous, subcutaneous, oral or local by direct injection into the amniotic fluid. Intravenous delivery by continuous infusion is the preferred method for administering the therapeutic compounds of the present invention.

The composition can be in the form of a pill, tablet, capsule, liquid, or sustained release tablet for oral administration; or a liquid for intravenous, subcutaneous or parenteral administration; or a polymer or other sustained release vehicle for local administration.

5 Methods well known in the art for making formulations are found, for example, in "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Formulations for parenteral administration may, for example, contain excipients, sterile water, saline, polyalkylene glycols such as polyethylene glycol, oils of
10 vegetable origin, or hydrogenated naphthalenes. Biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be used to control the release of the compounds. Nanoparticulate formulations (e.g., biodegradable nanoparticles, solid lipid nanoparticles, liposomes) may be used to control the biodistribution of
15 the compounds. Other potentially useful parenteral delivery systems include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes. The concentration of the compound in the formulation varies depending upon a number of factors, including the dosage of the drug to be administered, and the route of administration.

20 The compound may be optionally administered as a pharmaceutically acceptable salts, such as non-toxic acid addition salts or metal complexes that are commonly used in the pharmaceutical industry. Examples of acid addition salts include organic acids such as acetic, lactic, pamoic, maleic, citric, malic, ascorbic, succinic, benzoic, palmitic, suberic, salicylic, tartaric, methanesulfonic,
25 toluenesulfonic, or trifluoroacetic acids or the like; polymeric acids such as tannic acid, carboxymethyl cellulose, or the like; and inorganic acid such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid phosphoric acid, or the like. Metal complexes include zinc, iron, and the like.

Formulations for oral use include tablets containing the active ingredient(s) in a mixture with non-toxic pharmaceutically acceptable excipients. These excipients may be, for example, inert diluents or fillers (e.g., sucrose and sorbitol), lubricating agents, glidants, and anti-adhesives (e.g., magnesium stearate, zinc stearate, stearic acid, silicas, hydrogenated vegetable oils, or talc).

Formulations for oral use may also be provided as chewable tablets, or as hard gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with an inert solid diluent, or as soft gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with water or an oil medium.

The dosage and the timing of administering the compound depends on various clinical factors including the overall health of the subject and the severity of the symptoms of pre-eclampsia. In general, once pre-eclampsia or a propensity to develop pre-eclampsia is detected, continuous infusion of the purified protein is used to treat or prevent further progression of the condition. Treatment can be continued for a period of time ranging from 1 to 100 days, more preferably 1 to 60 days, and most preferably 1 to 20 days, or until the completion of pregnancy. Dosages vary depending on each compound and the severity of the condition and are titrated to achieve a steady-state blood serum concentration ranging from 10 to 20 ng/ml soluble endoglin; and/or 1 to 500 ng/mL VEGF or PlGF, or both, preferably 1 to 100 ng/mL, more preferably 5 to 50 ng/mL and most preferably 5 to 10 ng/mL VEGF or PlGF, or both.

The diagnostic methods described herein can also be used to monitor the pre-eclampsia or eclampsia during therapy or to determine the dosages of therapeutic compounds. In one example, a therapeutic compound is administered and the PAAI is determined during the course of therapy. If the PAAI is less than 20, preferably less than 10, then the therapeutic dosage is considered to be an effective dosage.

Subject monitoring

The disease state or treatment of a subject having pre-eclampsia, eclampsia, or a propensity to develop such a condition can be monitored using the methods and compositions of the invention. In one embodiment, the expression of a soluble endoglin polypeptide present in a bodily fluid, such as urine, plasma, amniotic fluid, or CSF, is monitored. In another embodiment, the expression of an sFlt-1, VEGF, or PlGF polypeptide present in a bodily fluid, such as urine, plasma, amniotic fluid, or CSF, is monitored. Such monitoring may be useful, for example, in assessing the efficacy of a particular drug in a subject or in assessing disease progression. Therapeutics that decrease the expression of a soluble endoglin nucleic acid molecule or polypeptide are taken as particularly useful in the invention.

Examples

The following examples are intended to illustrate the invention. They are not meant to limit the invention in any way.

Example 1. Increased levels of endoglin mRNA and protein in pregnant women with pre-eclampsia.

In an attempt to identify novel secreted factors playing a pathologic role in pre-eclampsia, we performed gene expression profiling of placental tissue from 17 pregnant women with pre-eclampsia and 13 normal pregnant women using Affymetrix U95A microarray chips. We found that the gene for endoglin was upregulated in women with pre-eclampsia.

In order to confirm the upregulation of endoglin in pre-eclampsia, we performed Northern blots to analyze the placental endoglin mRNA levels (Figure 3) and western blot analysis to measure serum protein levels of endoglin (Figure 4) in pre-eclamptic pregnant women as compared with normotensive pregnant women. Pre-eclampsia was defined as (1) a systolic blood pressure (BP) >140

24

mmHg and a diastolic BP >90 mmHg after 20 weeks gestation, (2) new onset proteinuria (1+ by dipstick on urinalysis, >300mg of protein in a 24 hour urine collection, or random urine protein/creatinine ratio >0.3, and (3) resolution of hypertension and proteinuria by 12 weeks postpartum. Patients with underlying
5 hypertension, proteinuria, or renal disease were excluded. Patients were divided into mild and severe pre-eclampsia based on the presence or absence of nephritic range proteinuria (>3g of protein on a 24 hour urine collection or urine protein/creatinine ratio greater than 3.0). The mean urine protein/creatinine ratios in the mild pre-eclampsia group were 0.94 +/- 0.2 and in the severe pre-eclampsia
10 group were 7.8 +/- 2.1. The mean gestational ages of the various groups were as follows: normal 38.8 +/-0.2 weeks, mild pre-eclampsia 34 +/- 1.2 weeks, severe pre-eclampsia 31.3 +/-0.6 weeks, and pre-term 29.5 +/- 2.0 weeks. Placental samples were obtained immediately after delivery. Four random samples were taken from each placenta, placed in RNA later stabilization solution (Ambion,
15 Austin, TX) and stored at -70° C. RNA isolation was performed using Qiagen RNeasy Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Northern blots probed with a 400 base pair probe in the coding region of endoglin (Unigene Hs.76753) and a GAPDH probe as a normalization control showed an increase in placental endoglin mRNA. Western blots, probed with an
20 antibody to the amino terminus of endoglin, showed an increase in both placental and maternal serum levels of endoglin protein in pre-eclamptic pregnant women as compared to normotensive pregnant women.

Example 2. Demonstration of a soluble endoglin in the placentas and serum 25 of pre-eclamptic patients.

The Western blot analysis used to measure the levels of endoglin protein in placentas and serum from pre-eclamptic women suggested the presence of a smaller protein (63 kDa), that was present in the placenta and serum of pre-eclamptic pregnant women. We have demonstrated that this smaller fragment is

the extracellular domain of endoglin. This truncated version is likely to be shed from the placental syncytiotrophoblasts and endothelial cells and circulated in excess quantities in patients with pre-eclampsia. This soluble form of endoglin may be acting as an anti-angiogenic agent by binding to circulating ligands that are necessary for normal vascular health.

Example 3. Circulating concentrations of soluble endoglin in women with normal versus pre-eclamptic pregnancies.

In order to compare the levels of circulating, soluble endoglin from the serum of normal, mildly pre-eclamptic, or severely pre-eclamptic women, we performed ELISA analysis on blood samples taken from these women. Patients were divided into mild and severe pre-eclampsia based on the presence or absence of nephritic range proteinuria (>3g of protein on a 24 hour urine collection or urine protein/creatinine ratio greater than 3.0). The mean urine protein/creatinine ratios in the mild pre-eclampsia group were 0.94 +/- 0.2 and in the severe pre-eclampsia group were 7.8 +/- 2.1. (Figure 5). ELISA was performed using a commercially available ELISA kit from R & D Systems, MN (Cat # DNDG00) as previously described (Maynard et al, JCI, 2003).

Example 4. Model assay for angiogenesis

An endothelial tube assay can be used as an *in vitro* model of angiogenesis. Growth factor reduced Matrigel (7 mg/mL, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) is placed in wells (100 µl/well) of a pre-chilled 48-well cell culture plate and is incubated at 37° C for 25-30 minutes to allow polymerization. Human umbilical vein endothelial cells (30,000 + in 300 µl of endothelial basal medium with no serum, Clonetics, Walkersville, MD) at passages 3-5 are treated with 10% patient serum, plated onto the Matrigel coated wells, and are incubated at 37° C for 12-16 hours. Tube formation is then assessed through an inverted phase

contrast microscope at 4X (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) and is analyzed (tube area and total length) using the Simple PCI imaging analysis software.

Other Embodiments

5 From the foregoing description, it is apparent that variations and modifications may be made to the invention described herein to adopt it to various usages and conditions. Such embodiments are also within the scope of the following claims.

10 All publications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each independent publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. In addition, PCT publication number WO 2004/008946 and U.S. Publication No. 20040126828, are hereby incorporated by reference in their entirety.

15 What is claimed is:

Claims

1. A method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject, said method comprising the step of administering to said subject a compound capable of binding to soluble endoglin, wherein said administering is
5 for a time and in an amount sufficient to treat or prevent said pre-eclampsia or eclampsia in said subject.
2. The method claim 1, wherein said compound is a purified soluble endoglin antibody or a soluble endoglin antigen-binding fragment.
- 10 3. The method of claim 1, wherein said compound is a growth factor.
4. The method of claim 3, wherein said growth factor is selected from the group consisting of: transforming growth factor (TGF)- β 1 or TGF- β 3, activin
15 A, Bone Morphogenic Protein (BMP)-2 or BMP-7.
5. The method of claim 1, further comprising administering a compound selected from the group consisting of: a purified sFlt-1 antibody, an anti-sFlt antigen-binding fragment, nicotine, theophylline, adenosine, nifedipine,
20 minoxidil, magnesium sulfate, vascular endothelial growth factor (VEGF), and placental growth factor (PlGF).
6. The method of claim 5, wherein said VEGF is VEGF121 or VEGF
165.
- 25 7. The method of claim 1, further comprising the step of administering to a subject an anti-hypertensive compound.
8. The method of claim 1, wherein said subject is a pregnant human.

9. The method of claim 1, wherein said subject is a post-partum human.

10. The method of claim 1, wherein said subject is a non-human.

5

11. The method of claim 10, wherein said subject is selected from the group consisting of a cow, a horse, a sheep, a pig, a goat, a dog, or a cat.

10

12. The method of claim 1, wherein said method further comprises monitoring the pre-eclampsia or eclampsia in said subject, wherein said monitoring comprises measuring the level of soluble endoglin nucleic acid molecule in a sample from said subject and comparing it to a reference sample, wherein an alteration in said levels diagnoses pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

15

13. The method of claim 12, wherein a decrease in the level of soluble endoglin nucleic acid relative to a reference sample indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia.

20

14. The method of claim 12, wherein said method further comprises measuring the level of sFlt-1, VEGF, or PlGF nucleic acid in a sample from said subject.

25

15. The method of claim 14, wherein a decrease in the level of sFlt-1 nucleic acid relative to a reference indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia.

16. The method of claim 14, wherein an increase in the level of VEGF or PlGF nucleic acid relative to a reference indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia.

5 17. The method of claim 12 or 14, wherein said measuring of levels is done on two or more occasions and a change in said levels between measurements is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia.

10 18. A method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject, said method comprising the step of administering to said subject a compound that increases the level of a growth factor capable of binding to soluble endoglin, wherein said administering is in an amount and for a time sufficient to treat or prevent said pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

15 19. The method of claim 18, wherein said growth factor is selected from the group consisting of: transforming growth factor (TGF)- β 1 or TGF- β 3, Activin A, BMP-2, and BMP-7.

20 20. The method of claim 18, wherein said compound is selected from the group consisting of cyclosporine, alpha tocopherol, methysergide, bromocriptine, and aldomet.

25 21. A method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject, said method comprising the step of administering to said subject a compound that inhibits growth factor binding to a soluble endoglin polypeptide, wherein said administering is sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia in a subject.

22. The method of claim 21, wherein said compound binds to soluble endoglin and blocks growth factor binding.

23. A method of treating or preventing pre-eclampsia or eclampsia in a subject, said method comprising the step of administering to said subject a compound capable of reducing soluble endoglin expression or biological activity, wherein said administering is sufficient to treat or prevent said pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

24. The method of claim 23, wherein said compound is a compound that inhibits a proteolytic enzyme selected from the group consisting of: matrix metalloproteinase (MMP), cathepsin, or elastase.

25. The method of claim 24, wherein said MMP is MMP9.

26. The method of claim 23, said compound comprising an antisense nucleobase oligomer complementary to at least a portion of an endoglin nucleic acid sequence, wherein said administering is sufficient to treat or prevent said pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

27. The method of claim 26, wherein said antisense nucleobase oligomer is 8 to 30 nucleotides in length.

28. The method of claim 23, said compound comprising a double stranded RNA that comprises at least a portion of an endoglin nucleic acid sequence, wherein said administering is sufficient to treat or prevent pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

29. The method of claim 28, wherein said double stranded RNA is a small interfering RNAs (siRNAs) 19 to 25 nucleotides in length.

30. The method of claim 23, said compound comprising a purified
5 antibody or antigen-binding fragment that specifically binds soluble endoglin.

31. The method of claim 1, wherein said method further comprises monitoring said pre-eclampsia or eclampsia in said subject, wherein said monitoring comprises measuring the level of soluble endoglin polypeptide in a
10 sample from said subject.

32. The method of claim 31, wherein a level of soluble endoglin less than 25 ng/ml indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia.

15 33. The method of claim 32, wherein a level of soluble endoglin less than 20 ng/ml indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia.

34. The method of claim 31, wherein said measuring of levels is done on two or more occasions and an increase in said levels between measurements is a
20 diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia.

35. The method of claim 31, wherein said method further comprises monitoring said pre-eclampsia or eclampsia in said subject, wherein said monitoring comprises measuring the level of at least one of sFlt-1, VEGF, or PlGF
25 polypeptide in a sample from said subject.

36. The method of claim 31, wherein said measuring of levels is compared to a normal reference sample.

37. The method of claim 36, wherein a decrease in the level of soluble endoglin relative to said normal reference sample indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

5 38. The method of claim 31, wherein said monitoring is used to determine the therapeutic dosage of the compound.

39. The method of claim 31, wherein said measuring is done using an immunological assay.

10

40. The method of claim 31, wherein the level of soluble endoglin is the level of free, bound, or total soluble endoglin.

41. The method of claim 31, wherein the level of soluble endoglin is the
15 level of an endoglin polypeptide resulting from degradation or enzymatic cleavage.

42. The method of claim 35, further comprising calculating the relationship between said levels of sFlt-1, VEGF, or PlGF using a metric, wherein
20 an alteration in the relationship between said levels in the subject sample relative to a reference sample, is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia in said subject.

43. The method of claim 42, wherein said metric is a pre-eclampsia anti-
25 angiogenic index (PAAI): $[sFlt-1/VEGF + PlGF]$.

44. The method of claim 43, wherein a PAAI value less than 20 indicates an improvement in said pre-eclampsia or eclampsia.

45. The method of claim 43, wherein said PAAI is used to determine the dosage of the therapeutic compound.

46. The method of claim 45, wherein the therapeutic compound is
5 administered in a dose such that the PAAI is less than 20.

47. The method of claim 42, wherein said measuring of levels is done on
two or more occasions and a change in said levels between measurements is a
diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia.
10

48. A composition comprising a purified antibody or antigen-binding
fragment thereof that specifically binds soluble endoglin.

49. The composition of claim 48, wherein said antibody or antigen-
15 binding fragment prevents binding of a growth factor to soluble endoglin.

50. The composition of claim 48, wherein said antibody is a monoclonal
antibody.

20 51. The composition of claim 48, wherein said antibody or antigen-
binding fragment thereof is a human or humanized antibody.

52. The composition of claim 48, wherein said antibody lacks an Fc
portion.
25

53. The composition of claim 48, wherein said antibody is an F(ab')₂, an
Fab, or an Fv structure.

54. The composition of claim 48, wherein said antibody or antigen-binding fragment thereof is present in a pharmaceutically acceptable carrier.

55. A method of diagnosing a subject as having, or having a propensity
5 to develop, pre-eclampsia or eclampsia, said method comprising measuring the level of soluble endoglin polypeptide in a sample from said subject.

56. The method of claim 55, wherein an increase in the level of soluble endoglin polypeptide relative to reference sample is a diagnostic indicator of pre-
10 eclampsia or eclampsia or a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia.

57. The method of claim 55, wherein the level of soluble endoglin is the level of free, bound, or total soluble endoglin.

58. The method of claim 55, wherein a level of soluble endoglin greater
15 than 20 ng/ml is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia or a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia.

59. The method of claims 55, wherein said measuring is done using an
20 immunological assay.

60. The method of claim 59, wherein said immunological assay is an ELISA.

61. The method of claims 55, wherein said sample is a bodily fluid.
25

62. A method of diagnosing a subject as having, or having a propensity to develop, pre-eclampsia or eclampsia, said method comprising measuring the level of soluble endoglin nucleic acid molecule in a sample from said subject and

comparing it to a reference sample, wherein an alteration in said levels diagnoses pre-eclampsia or eclampsia in said subject, or diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

5 63. The method of claim 62, wherein said alteration in said levels is an increase.

 64. The method of claim 62, further comprising measuring the level of at least one of sFlt-1, VEGF, or PlGF nucleic acid molecule in a sample from said
10 subject and comparing it to a reference sample, wherein an alteration in said levels diagnoses pre-eclampsia or eclampsia in said subject, or diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

 65. A method of diagnosing a subject as having, or having a propensity
15 to develop, pre-eclampsia or eclampsia, said method comprising determining the nucleic acid sequence of an endoglin gene in a sample from a subject and comparing it to a reference sequence, wherein an alteration in the subject's nucleic acid sequence that is an alteration that changes the expression level of the gene product in said subject diagnoses the subject with pre-eclampsia or eclampsia, or a
20 propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

 66. The method of claim 55, 62, or 65, wherein said sample is a bodily fluid of said subject in which said soluble endoglin is normally detectable.

25 67. The method of claim 66, wherein said fluid is selected from the group consisting of urine, amniotic fluid, serum, plasma, and cerebrospinal fluid.

 68. The method of claim 55, 62, or 65, wherein said sample is a cell.

69. The method of claim 68, wherein said cell is selected from the group consisting of an endothelial cell, a leukocyte, a monocyte, or a cell derived from the placenta.

5 70. The method of claim 55, 62, or 65, wherein said sample is a tissue.

71. The method of claim 70, wherein said tissue is a placental tissue.

10 72. The method of claim 55, 62, or 65, wherein said subject is a non-pregnant human and said method diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia.

15 73. The method of claims 55, 62, or 65, wherein said subject is a pregnant human or a post-partum human.

74. The method of claims 55, 62, or 65, wherein said subject is a non-human.

20 75. The method of claim 74, wherein said non-human is selected from the group consisting of a cow, a horse, a sheep, a pig, a goat, a dog, or a cat.

25 76. The method of claims 55, 62, or 65, wherein said measuring of levels is done on two or more occasions and a change in said levels between measurements is a diagnostic indicator of pre-eclampsia or eclampsia.

77. A kit for the diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia in a subject comprising a nucleic acid sequence of soluble endoglin or a sequence complementary thereto, or any combination thereof.

78. The kit of claim 77, wherein said kit further comprises a nucleic acid sequence of VEGF, sFlt-1 or PlGF or a sequence complementary thereto, or any combination thereof.

5 79. A kit for the diagnosis of pre-eclampsia or eclampsia in a subject comprising a means of detecting a soluble endoglin polypeptide.

80. The kit of claims 79, wherein when said kit further comprises a means for detecting VEGF, sFlt-1 or PlGF polypeptide.

10

81. The kit of claim 79, wherein said means of detecting is selected from the group consisting of an immunological assay, an enzymatic assay, and a colorimetric assay.

15 82. The kit of claims 77 or 79, wherein said kit diagnoses a propensity to develop pre-eclampsia or eclampsia in a pregnant or a non-pregnant subject.

83. A method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia, said method comprising contacting a cell that expresses a soluble
20 endoglin nucleic acid molecule with a candidate compound, and comparing the level of expression of said endoglin nucleic acid molecule in said cell contacted by said candidate compound with the level of expression in a control cell not contacted by said candidate compound, wherein an alteration in expression of said soluble endoglin nucleic acid molecule identifies said candidate compound as a
25 compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia.

84. The method of claim 83, wherein said alteration is a decrease in the level of said soluble endoglin nucleic acid molecule.

85. A method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia, said method comprising contacting a cell that expresses a soluble endoglin polypeptide with a candidate compound, and comparing the level of expression of said soluble endoglin polypeptide in said cell contacted by said candidate compound with the level of polypeptide expression in a control cell not contacted by said candidate compound, wherein an alteration in the expression of said endoglin polypeptide identifies said candidate compound as a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia.

10 86. The method of claim 85, wherein said alteration in expression is assayed using an immunological assay, an enzymatic assay, or an immunoassay.

87. The method of claim 85, wherein said alteration in expression is a decrease in the level of soluble endoglin.

15

88. The method of claim 85, wherein said alteration in expression is an alteration in transcription.

89. The method of claim 85, wherein said alteration in expression is an alteration in translation.

20

90. A method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia, the method comprising contacting a cell that expresses a soluble endoglin polypeptide with a candidate compound, and comparing the biological activity of said polypeptide in said cell contacted by said candidate compound with the level of biological activity in a control cell not contacted by said candidate compound, wherein an alteration in the biological activity of said endoglin polypeptide identifies said candidate compound as a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia.

25

91. A method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia, said method comprising detecting binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor in the presence of a candidate
5 compound, wherein a decrease in said binding, relative to binding between said soluble endoglin polypeptide and said growth factor in the absence of said candidate compound identifies said candidate compound as a compound that ameliorates pre-eclampsia or eclampsia.

10 92. A method of identifying a polypeptide, or fragment thereof, that prevents binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor, said method comprising detecting binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor in the presence of said candidate polypeptide, wherein a decrease
15 in said binding, relative to binding between said soluble endoglin polypeptide and said growth factor in the absence of said candidate polypeptide identifies said candidate polypeptide as a polypeptide that prevents binding between a soluble endoglin polypeptide and a growth factor.

93. A method of identifying a compound that ameliorates pre-eclampsia
20 or eclampsia, comprising detecting binding between a soluble endoglin polypeptide and a candidate compound, wherein a compound that binds said soluble endoglin polypeptide ameliorates pre-eclampsia or eclampsia.

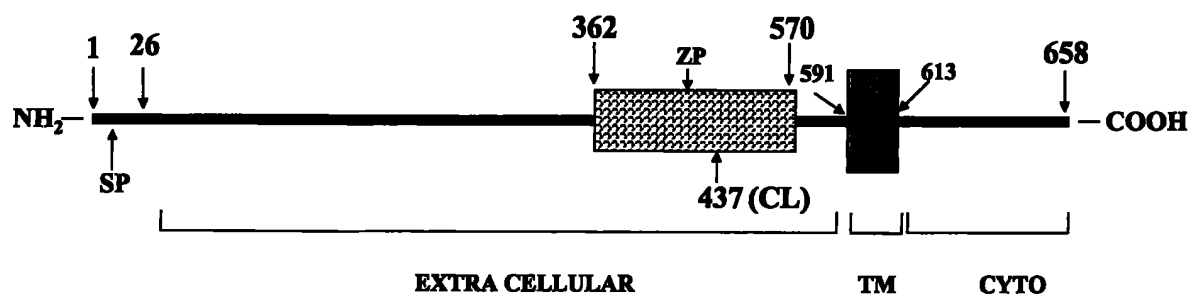
25

METHODS OF DIAGNOSING AND TREATING PRE-ECLAMPSIA OR ECLAMPSIA

Abstract of the Disclosure

5 Disclosed herein are methods for diagnosing pre-eclampsia and eclampsia
by detecting the level of or biological activity of soluble endoglin polypeptides or
nucleic acids. Also disclosed herein are methods for treating pre-eclampsia and
eclampsia using compounds that alter soluble endoglin levels or biological
activity.

10



SP- signal peptide

ZP- zona pellucida domain

CL- potential cleavage site (AA 437) that releases soluble endoglin

TM- transmembrane domain

Cyto- cytoplasmic domain

Fig 1: Schematic of Endoglin Protein

70

Title: METHODS OF DIAGNOSING AND TREATING PRE-ECLAMPSIA OR ECLAMPSIA
 Applicant(s): S. Ananth Karumanchi et al.
 Filing Date: September 24, 2004
 Page 2 of 5 Customer No.: 21559

Figure 2

Predicted cDNA sequence of soluble endoglin (437 amino acids):

```

1   atggaccgcg gcacgctccc tctggctgtt gccctgetgc tggccagctg cagcctcagc
61  cccacaagtc ttgcagaaac agtccattgt gaccttcagc ctgtgggccc cgagagggac
121 gaggtgacat ataccactag ccagggtctcg aagggtctgcg tggctcaggg ccccaatgcc
181 atccttgaag tccatgtcct ctccctggag ttcccaacgg gcccgtcaca gctggagctg
241 actctccagg catccaagca aaatggcacc tggccccgag aggtgcttct ggtcctcagt
301 gtaaacagca gtgtcttctt gcatctccag gccctgggaa tccactgca cttggcctac
361 aattccagcc tggtcacett ccaagagccc ccgggggtca acaccacaga gctgccatcc
421 ttccccaaga cccagatcct tgagtgggca gctgagaggg gccccatcac ctctgctgct
481 gagctgaatg acccccagag catcctcctc cgactgggcc aagcccaggg gtcactgtcc
541 ttctgcatgc tggaaagccag ccaggacatg ggccgcacgc tcgagtggcg gccgcgtact
601 ccagccttgg tccggggctg ccacttggaa ggcgtggccg gccacaagga ggcgcacatc
661 ctgaggggtcc tgccggggcca ctccggccggg ccccggaagg tgacgggtgaa ggtggaactg
721 agctgcgcac ccggggatct cgatgccgtc ctcatcctgc aggggtcccc ctacgtgtcc
781 tggctcatcg acgccaacca caacatgcag atctggacca ctggagaata ctcttcaag
841 atctttccag agaaaaacat tcgtggcttc aagctcccag acacacctca aggcctcctg
901 ggggagggccc ggatgctcaa tgccagcatt gtggcatcct tcgtggagct accgctggcc
961 agcattgtct cacttcatgc ctccagctgc ggtggtaggc tgcagacctc accgcaccg
1021 atccagacca ctctcccaa ggacacttgt agcccgagc tgcctcatgtc cttgatccag
1081 acaaagtgtg ccgacgacgc catgacctg gtactaaaga aagagcttgt tgcgcatattg
1141 aagtgcacca tcacgggcct gaccttctg gaccccagct gtgaggcaga ggaaggggt
1201 gacaagtgtg tcttgccgag tgcttactcc agctgtggca tgcaggtgtc agcaagtatg
1261 atcagcaatg aggcgggtgt caatatcctg tcgagctcat caccacagcg g

```

N p p N P P

BEST AVAILABLE COPY

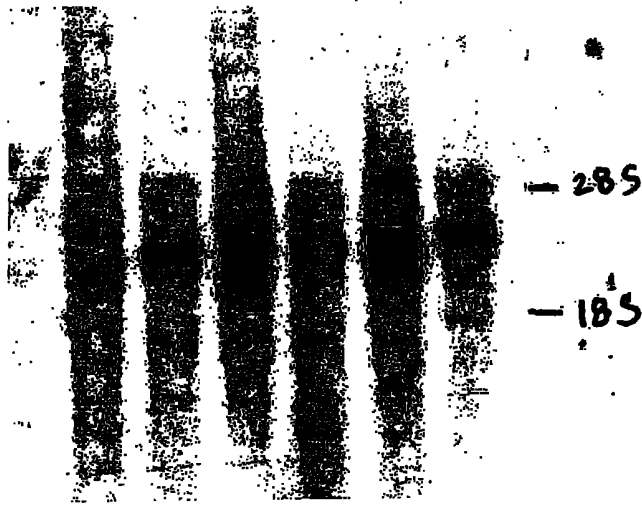


Figure 3

93

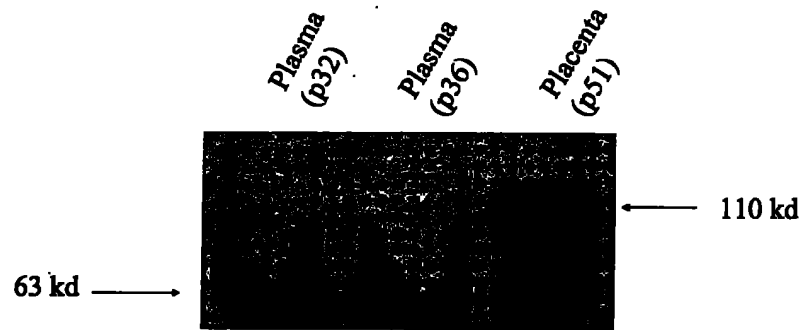
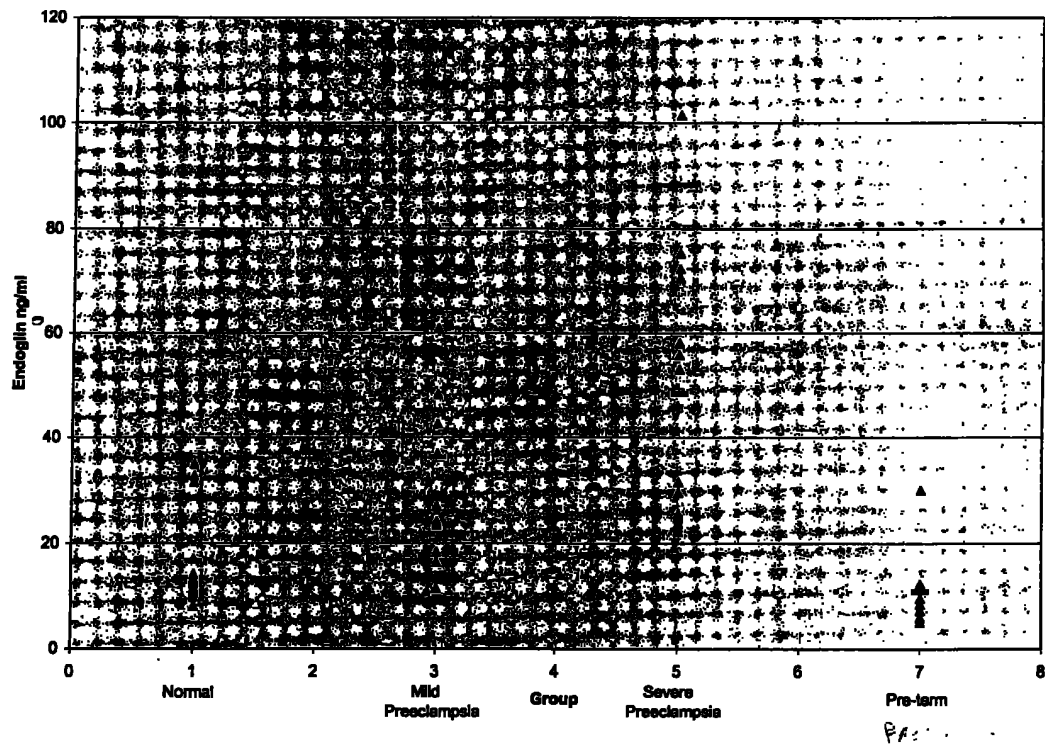


Figure 4

at

BEST AVAILABLE COPY

Figure 5: Circulating soluble endoglin in preeclampsia



Title: METHODS OF DIAGNOSING AND TREATING PRE-ECLAMPSIA OR ECLAMPSIA
Applicant(s): S. Ananth Karunachari et al.
Filing Date: September 24, 2004
Page 5 of 5
Customer No.: 21556

**MÉT. DOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR PREECLAMPSIA O
ECLAMPSIA**

Declaración de Investigación Patrocinada Federalmente

5

Esta invención se hace en parte con el apoyo del Gobierno a través del NIH No. de Concesión DK 064255. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

10

Campo de la Invención

En general, esta invención se relaciona con la detección y el tratamiento de sujetos que tienen preeclampsia o eclampsia.

15

Antecedentes de la Invención

20

La preeclampsia es un síndrome de hipertensión, edema, y proteinuria que afecta del 5 al 10% de las preñadas y resulta en morbilidad y mortalidad sustancial materna y fetal. La preeclampsia cuenta con al menos 200,000 muertes maternas a nivel mundial por año. Los síntomas de la preeclampsia aparecen típicamente después de la semana 20 de preñez y se detecta usualmente por medición de rutina de la orina y la presión sanguínea de la mujer. Sin embargo, los métodos de monitoreo son inefectivos para el diagnóstico del síndrome en una etapa temprana, que puede reducir el riesgo para el sujeto o feto que se desarrolla, si

25

existe un tratamiento efectivo disponible.

Actualmente no existe una cura conocida para la preeclampsia. La preeclampsia puede variar en severidad de suave a amenazar la vida. Una forma suave de preeclampsia se puede tratar con reposo en cama y monitoreo frecuente. Para los casos moderados a severos, se recomienda la hospitalización y medicación para presión sanguínea o se prescriben medicaciones anticonvulsionantes para evitar ataques. Si la condición llega a amenazar la vida a la madre o al bebé el embarazo se termina y el bebé nace prematuro.

El desarrollo apropiado del feto y la placenta se media por varios factores de crecimiento o factores angiogénicos. Uno de estos factores angiogénicos es la endogлина, también conocida como CD105. La endogлина es una glicoproteína de membrana celular homodimérica que se expresa predominantemente en células endoteliales tal como sincitiotrofoblastos, células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), y en células endoteliales vasculares. La endogлина comparte identidad de secuencia con el betaglican, un receptor (TGF)- β de factor de crecimiento transformante tipo III. La endogлина se ha mostrado por ser un componente regulador del complejo receptor TGF- β , que modula la angiogénesis, proliferación, diferenciación, y apoptosis. La endogлина también une varias otras membranas de la superfamilia TGF- β que incluye activin-A, proteína morfogénica de hueso (BMP)-2 y BMP-7. En particular, la endogлина une el TGF- β 1 y TGF- β 3 con alta afinidad y forma asociaciones heterotriméricas con receptores de señalización TGF- β tipos I y II. Las mutaciones en la región de codificación del gen endogлина son responsables por telangiectasia hemorrágica tipo 1 (HHT1), un trastorno vascular predominantemente hereditario caracterizado por displasia vascular multisistémica y hemorragia recurrente. Una forma soluble de endogлина también se ha identificado y encontrado que está presente en niveles incrementados en pacientes con cáncer colorectal y metástasis de mama; sin

embargo, el papel funcional exacto de la endoglina soluble en la patogénesis del cáncer no es claro. La producción de endoglina soluble no se ha reportado por estar asociada con preeclampsia o preñez normal.

5 Se han reportado varios factores por tener una asociación con el desarrollo placentario y fetal y, más específicamente, con preeclampsia. Ellas incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), forma soluble del receptor Flt-1 (sFlt-1), y factor de crecimiento placentario (PIGF). El VEGF es un mitógeno específico de célula endotelial, un inductor angiogénico, y un mediador de la

10 permeabilidad vascular. El VEGF también ha sido mostrado por ser importante para reparar la capilaridad glomerular. El VEGF se une como un homodímero a uno de dos receptores de tirosina quinasa de expansión de membrana homóloga, la quinasa tirosina similar a fms (Flt-1 por sus siglas en inglés) y el rceptor de dominio de quinasa (KDR por sus siglas en inglés) que se expresan

15 diferencialmente en células endoteliales obtenidas de muchos diferentes tejidos. El Flt-1 pero no el KDR, se expresa grandemente por las células trofoblastos que contribuyen a la formación placentaria. El PIGF es un miembro de la familia VEGF que también está involucrado en el desarrollo placentario. El PIGF se expresa por citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos y es capaz de inducir la proliferación,

20 migración, y activación de células endoteliales. El PIGF se une como un homodímero al receptor Flt-1, pero no al receptor KDR. El PIGF y el VEGF contribuyen a la actividad mitogénica y la angiogénesis que son críticas para el desarrollo de la placenta.

25 El sFlt-1, que le falta los dominios citoplásmicos y de transmembrana del receptor, fueron recientemente identificados en un medio de cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana y la expresión *in vivo* se demostró

posteriormente en el tejido placentario. El sFlt-1 se une al VEGF con una alta afinidad pero no estimula la mitogénesis de células endoteliales.

La regulación cuidadosa de las rutas de señalización mitogénica y angiogénica es crítica para mantener la proliferación apropiada, migración, y angiogénesis por células de trofoblastos en el desarrollo de la placenta.

Subsiste una necesidad para métodos de diagnóstico exacto de sujetos en riesgo de o que tienen preeclampsia o eclampsia, particularmente antes del inicio de los síntomas más severos. También es necesario un tratamiento.

Resumen de la Invención

Hemos descubierto unos medios para diagnosticar y tratar efectivamente la preeclampsia y eclampsia antes del desarrollo de los síntomas.

Utilizando análisis de expresión de gen, hemos descubierto que los niveles de endoglina son marcadamente elevados en muestras de tejido placentario de mujeres preñadas que sufren de preeclampsia. La endoglina es una parte del complejo receptor TGF- β que actúa para regular la angiogénesis. La endoglina se puede unir con alta afinidad a los miembros de la familia TGF- β que son ligandos para los receptores TGF- β . En individuos afectados, el exceso de endoglina soluble puede agotar la placenta de cantidades necesarias de factores mitogénicos y angiogénicos esenciales. En la presente invención, los compuestos que se unen a o neutralizan endoglinas solubles se utilizan para reducir los niveles de endoglina soluble elevados. Adicionalmente, también se suministran los anticuerpos dirigidos a endoglina soluble así como también oligómeros de

nucleobase antisentido y de interferencia de ARN dirigidos a reducir los niveles de endoglina soluble biológicamente activo. Finalmente, la presente invención suministra la medición de endoglina soluble como una herramienta de detección para diagnóstico temprano y manejo de preeclampsia o eclampsia, o una predisposición de estos.

De acuerdo con esto, en un aspecto, la invención suministra un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto al administrar al sujeto un compuesto capaz de unirse a la endoglina soluble, en donde la administración es durante un tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o evitar al menos un síntoma de preeclampsia o eclampsia en el sujeto. En una modalidad preferida, el compuesto es un anticuerpo de endoglina soluble purificado o fragmento de unión de antígeno de este. En otra modalidad, preferida, el compuesto es un factor de crecimiento, tal como un miembro de la familia TGF- β (por ejemplo TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP-2, y BMP-7) o un fragmento de estos capaz de unir endoglina soluble.

En otra modalidad preferida, el método también incluye administrar un compuesto, tal como un anticuerpo sFlt-1 purificado, un fragmento de unión a antígeno anti-sFlt-1, nicotina, teofilina, adenosina, nifedipina, minoxidilo, sulfato de magnesio, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que incluyen todas las isoformas tal como VEGF189, VEGF121, o VEGF165, o fragmentos de estos; el factor de crecimiento placentario (PlGF), que incluye todas las isoformas y fragmentos de estos, en donde la administración es durante un tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o evitar preeclampsia o eclampsia en un sujeto.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para tratar evitar preeclampsia o eclampsia en un sujeto al administrar al sujeto un compuesto (por ejemplo, compuesto químico, polipéptido, péptido, anticuerpo, o un fragmento de estos) que incrementa el nivel de un factor de crecimiento capaz de unirse a la endoglina soluble. El compuesto se administra durante un tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o evitar preeclampsia o eclampsia. En modalidades preferidas, el compuesto incrementa el nivel de un miembro de la familia TGF- β (por ejemplo, TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP-2, y BMP-7) y fragmentos de estos. Ejemplos no limitantes de tales compuestos incluyen ciclosporina, tocoferol alfa, metisergida, bromocriptina, y aldomet.

En otro aspecto relacionado, la invención caracteriza un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto al administrar al sujeto un compuesto (por ejemplo, compuesto químico, polipéptido, péptido, anticuerpo, o un fragmento de estos) que inhibe la unión del factor de crecimiento a un polipéptido de endoglina soluble. El compuesto se administra durante un tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia. En modalidades preferidas, el compuesto une a la endoglina soluble y evita la unión del factor de crecimiento. Ejemplos no limitantes de tales compuestos incluyen anticuerpos y compuestos de molécula pequeña obtenidos a través de selección.

En otro aspecto, la invención suministra un método para tratar o evitar preeclampsia o eclampsia en un sujeto al administrar al sujeto un compuesto capaz de reducir la actividad biológica o expresión de endoglina soluble, en donde la administración es suficiente para tratar o evitar dicha preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En modalidades preferidas, el compuesto es un compuesto que inhibe la actividad enzimática de una enzima proteolítica seleccionada del grupo

que consiste de: una matriz de metaloproteína ((MMP), una catepsina, o una elastasa. El MMP incluye una cualquiera de MMP 1-26, preferiblemente MMP9.

En un ejemplo, el compuesto es un compuesto que inhibe la actividad biológica de endoglina soluble según se mide por un ensayo de angiogénesis. En este ejemplo, se utiliza el suero preecláptico en un ensayo de formación en tubo matrigel para inducir un estado antiangiogénico. Luego se agrega el compuesto y una reducción en el estado antiangiogénico de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más es indicador de un compuesto terapéuticamente efectivo.

10

En aún otro aspecto, la invención suministra un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto al administrar al sujeto un oligómero nucleobase antisentido que tiene al menos una hebra que es al menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 99%, o 100% complementaria con al menos una porción de la secuencia de endoglina soluble, en donde la administración es suficiente para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En una modalidad, el oligómero de nucleobase antisentido es complementario con al menos 10, preferiblemente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más nucleótidos consecutivos de endoglina soluble y pueden reducir o inhibir la expresión o actividad biológica de la endoglina soluble. Es deseable, que la longitud del oligómero nucleobase antisentido sea de 80 a 30 nucleótidos.

En otro aspecto, la invención suministra un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto que involucra la etapa de administrar al sujeto una molécula de ARN de doble hélice (dsARN) que tiene al menos una hebra que es al menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95%, 99%, o 100% complementaria con al menos una porción de la secuencia de una molécula de

25

ácido nucleico de endoglina soluble, en donde la administración es suficiente para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en el sujeto. En una modalidad, el ARN de doble hélice es un ARN interfiriente (siARN) que es de 19 a 27 nucleótidos de longitud y puede reducir o inhibir la expresión o actividad biológica de endoglina soluble. En modalidades preferidas adicionales, el dsARN es una molécula siARN que tiene 100% de identidad de ácido nucleico con al menos 18, preferiblemente 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 35, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de la secuencia de ácido nucleico de una molécula de endoglina soluble.

10 En varias modalidades de los anteriores aspectos, el método involucra adicionalmente la etapa de administrar a un sujeto un compuesto anti-hipertensivo (por ejemplo adenosina, nifedipina, minoxidilo, y sulfato de magnesio). En otras modalidades de los anteriores aspectos, el sujeto es una humana preñada, un humano post parto, o no humano (por ejemplo, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato). En varias modalidades de los anteriores aspectos, el método se puede combinar con los métodos de diagnóstico de la invención para monitorear el sujeto durante la terapia o para determinar la dosis terapéutica efectiva.

20 Cualquiera de los aspectos terapéuticos de la invención se pueden utilizar solos o en combinación con uno o más métodos adicionales de la invención. En un ejemplo, un inhibidor MMP y un anticuerpo se pueden utilizar en combinación para neutralizar la endoglina soluble que está presente y bloquear la producción adicional de endoglina soluble por clivaje de la forma de unión de membrana.

25

En otro aspecto, la invención suministra una composición que comprende un anticuerpo purificado o fragmento de unión de antígeno de este que puede unir

específicamente la endoglina soluble. En una modalidad preferida, el anticuerpo evita la unión de un factor de crecimiento con endoglina soluble. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo humano o humanizado. En otras palabras, al anticuerpo le falta una porción Fc. En todavía otras modalidades, el anticuerpo es una estructura $F(ab')_2$, Fab, o Fv. En otras modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este está presente en portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención suministra un método para diagnosticar un sujeto que tiene, o tiene una propensión a desarrollar, preeclampsia o eclampsia, que involucra medir el nivel de polipéptido de endoglina soluble en una muestra del sujeto. En modalidades preferidas el nivel de endoglina soluble es el nivel de endoglina soluble libre unida, o total. El diagnóstico de o una propensión a desarrollar, preeclampsia o eclampsia pueden resultar de una alteración (por ejemplo, un incremento) en el nivel relativo de endoglina soluble comparado con una muestra de referencia o una detección de un nivel absoluto de endoglina soluble que están por encima de un valor de referencia normal. Por ejemplo, normalmente, las concentraciones de suero circulante de endoglina soluble varían de 2-7 ng/ml durante el estado de no preñez y de 10-20 ng/ml durante el estado de preñez normal. Para las modalidades que incluyen la medición de los niveles absolutos de la endoglina soluble, un nivel mayor de 15 ng/ml, 20 ng/ml, o preferiblemente mayor de 25 ng/ml, se considera un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. En modalidades preferidas adicionales, el método incluye adicionalmente medir el nivel de al menos uno de polipéptido sFlt-1, VEGF, o PIGF en una muestra de un sujeto. El método también incluye medir el nivel de la menos dos de polipéptido sFlt-1, VEGF, o PIGF en una muestra de un sujeto y

calcular la relación entre los niveles de sFlt-1, VEGF, o PlGF utilizando una métrica en donde una alteración en la muestra del sujeto con relación a una muestra de referencia diagnóstica la preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En modalidades preferidas, el método también incluye determinar el índice de masa corporal (BMI), la edad gestacional (GA) del feto, o ambos e incluir el BMI o GA o ambos en la métrica. En una modalidad, la métrica es un índice de preeclampsia antiangiogénico (PAAI): $[sFlt-1/VEGF + PlGF]$, en donde el PAAI se utiliza como un indicador de la actividad anti-angiogénica. En una modalidad, un PAAI mayor de 10, más preferiblemente mayor de 20, es indicador de preeclampsia o eclampsia. En otra modalidad, el nivel de polipéptido sFlt-1, VEGF, o PlGF se determina por un ensayo inmunológico, tal como un ELISA. En otro ejemplo, un nivel de endoglina soluble mayor de 20, preferiblemente mayor de 25 ng/ml solo o en combinación con sFlt-1 incrementado y reducido libre de PlGF o VEGF se utiliza para diagnóstico de preeclampsia.

En varias modalidades de los aspectos anteriores, la muestra es un fluido corporal, tal como suero u orina. En una modalidad, un incremento en el nivel de endoglina soluble es indicador de preeclampsia o eclampsia o la propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. En una modalidad, un nivel de sFlt-1 mayor de 2 ng/ml es indicador de preeclampsia o eclampsia. En modalidades preferidas de los anteriores aspectos, el nivel de polipéptido sFlt-1 medido es el nivel de polipéptido libre, unido, o sFlt-1 total. En modalidades adicionales, el polipéptido sFlt-1 también puede incluir fragmentos sFlt-1, productos de degradación, o productos de clivaje enzimático. En otras modalidades preferidas de los anteriores aspectos, el nivel de VEGF o PlGF es el nivel del PlGF o VEGF libre.

En otro aspecto, la invención suministra un método de diagnóstico de un sujeto que tiene, o que tiene propensión a desarrollar, preeclampsia o eclampsia que incluye medir el nivel de molécula de ácido nucleico de endoglina soluble (por ejemplo, mRNA) en una muestra del sujeto y compararla con una muestra de referencia, en donde una alteración (por ejemplo, un incremento en los niveles relativos a una muestra de referencia diagnóstica la preeclampsia o eclampsia en el sujeto, o diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. En modalidades adicionales, el método puede incluir adicionalmente medir el nivel de una molécula de ácido nucleico sFlt-1, VEGF o PlGF (por ejemplo, mRNA) en una muestra del sujeto y compararla con una muestra de referencia, en donde una alteración (por ejemplo una reducción en el nivel de VEGF o PlGF o un incremento en el nivel de sFlt-1) en los niveles con relación a la muestra de referencia diagnóstica la preeclampsia o eclampsia en el sujeto, o diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

15

En modalidades adicionales de los anteriores aspectos, los niveles se miden en dos más ocasiones y un cambio en los niveles entre mediciones es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. En una modalidad preferida, un incremento (por ejemplo 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más) en el nivel de endoglina soluble de la primer medición a la siguiente medición se utiliza para diagnosticar preeclampsia o eclampsia. En otra modalidad un incremento de (por ejemplo 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más) en el nivel de endoglina soluble según se compara con una muestra de referencia normal es indicador de preeclampsia o eclampsia.

25

En otro aspecto, la invención suministra un método para diagnosticar un sujeto que tiene, o que tiene propensión a desarrollar, preeclampsia o eclampsia

que incluye determinar la secuencia de ácido nucleico de un gen de endoglina soluble en un sujeto y compararlo con una secuencia de referencia, en donde una alteración en la secuencia de ácido nucleico del sujeto que cambia el nivel de actividad biológica del producto gen en el sujeto diagnostica al sujeto con preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. En una modalidad, la alteración es un polimorfismo en la secuencia de ácido nucleico. En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF o PIGF o cualquier combinación de estos, el gen también se determina y compara con una secuencia de referencia. Una alteración en una cualquiera o más de estas secuencias que cambia el nivel de actividad biológico o el producto gen en el sujeto diagnostica el sujeto con preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

En otro aspecto, la invención suministra un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende una secuencia de ácido nucleico útil para detectar endoglina soluble, o fragmento de esta, o una secuencia complementaria de esta. En una modalidad preferida, la secuencia de ácido nucleico hibridiza a un ácido nucleico que codifica la endoglina soluble o un fragmento de esta. En una modalidad preferida, el kit adicional comprende una secuencia de para detectar sFlt-1, VEGF o PIGF.

En un aspecto relacionado, la invención suministra un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que incluye componentes para detectar un polipéptido de endoglina soluble. En una modalidad, el componente es un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático, o un ensayo colorimétrico. En otras modalidades de los anteriores aspectos, el kit diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en un sujeto preñado o no

preñado. En modalidades preferidas de los anteriores aspectos, el kit también incluye un componente para detectar polipéptido sFlt-1, VEGF o PlGF. En modalidades preferidas adicionales, el kit se utiliza para detectar la endoglina soluble y para detectar adicionalmente VEGF, sFlt-1 y PlGF y determinar el PAAI
5 de la muestra.

En modalidades preferidas, los kit de diagnóstico incluyen una etiqueta o instrucciones para el uso propuesto de los componentes del kit. En una modalidad, el kit de diagnóstico se etiqueta o incluye instrucciones para uso en el diagnóstico
10 de preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En una modalidad preferida, el kit de diagnóstico incluye una etiqueta o instrucciones para el uso del kit para determinar los niveles de endoglina soluble de la muestra del sujeto y compara los niveles de endoglina soluble con un valor de muestra de referencia. Se entenderá que los valores de la
15 muestra de referencia dependerán del uso propuesto del kit. Por ejemplo, la muestra se puede comparar con un valor de referencia de endoglina soluble normal, en donde un incremento en los niveles de endoglina soluble es indicador de preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

20

En un aspecto relacionado, la invención caracteriza un dispositivo para diagnosticar a un sujeto que tiene o que tiene una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia al suministrar componentes para medir y/o comparar los niveles de polipéptido de endoglina soluble o ácido nucleico con una muestra de
25 referencia, en donde una alteración en los niveles de endoglina soluble comparados con un valor de referencia normal diagnóstica de preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en el sujeto.

El dispositivo también puede incluir componentes para comparar los niveles de endoglina soluble y al menos uno de polipéptidos o moléculas de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF y PlGF en una muestra de un sujeto con relación a una muestra de referencia, en donde una alteración de los niveles de endoglina soluble, y al menos uno de los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF y PlGF diagnostica preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en el sujeto. En una modalidad preferida el dispositivo incluye componentes para una métrica para comparar los niveles de endoglina soluble, y al menos uno de los polipéptidos sFlt-1, VEGF y PlGF.

10

En varias modalidades de los anteriores aspectos, la muestra es un fluido corporal (por ejemplo, orina, fluido amniótico, suero, plasma, o fluido cerebroespinal) del sujeto en el que la endoglina soluble del sFlt-1, VEGF o PlGF es normalmente detectable. En modalidades adicionales, la muestra es un tejido o una célula (por ejemplo, un tejido placentario o células placentarias, células endoteliales, leucocitos, y monocitos). En otras modalidades de los anteriores aspectos, el sujeto es un humano no preñado, un humano preñado, o un humano post-parto. En otras modalidades de los anteriores aspectos, el sujeto es no humano (por ejemplo, una vaca, caballo, oveja, cerdo, cabra, un perro o un gato).

En una modalidad, el sujeto es un humano no preñado y el método se utiliza para diagnosticar una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. En modalidades adicionales, también se mide el BMI o GA o ambos. En varias modalidades de los anteriores aspectos, un incremento en el nivel de polipéptido o ácido nucleico de endoglina soluble con relación a una referencia es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. En varias modalidades de los anteriores aspectos, un incremento en el nivel de polipéptido o ácido nucleico sFlt-1 con relación a una referencia es un indicador diagnóstico de preeclampsia o

25

eclampsia. En otras modalidades de los anteriores aspectos, una reducción en el nivel de polipéptido VEGF libre o ácido nucleico VEGF con relación a una referencia es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. En otras modalidades de los anteriores aspectos, una reducción en el nivel de polipéptido PIGF libre o ácido nucleico PIGF con relación a una referencia es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.

Cualquiera de los métodos diagnósticos y kits descritos aquí también se pueden utilizar para monitorear un sujeto ya diagnosticado por tener o estar en riesgo de tener preeclampsia o eclampsia con el fin de monitorear el sujeto durante la terapia o para determinar dosis terapéuticas efectivas. En un ejemplo, un kit utilizado para monitoreo terapéutico puede tener un valor de endoglina soluble de referencia que es indicador de preeclampsia o eclampsia, en donde una reducción en el valor de endoglina soluble de la muestra del sujeto con relación a la muestra de referencia se puede utilizar para indicar la eficacia terapéutica o dosis efectiva de compuestos terapéuticos. En modalidades preferidas, el kit se etiqueta o incluye instrucciones para uso en monitoreo terapéutico o determinación de dosis terapéutica y el compuesto terapéutico se puede incluir en el kit. El nivel de proteína de endoglina soluble o ácido nucleico se mide solo o en combinación con los niveles de ácidos nucleicos o proteína sFlt-1, VEGF o PIGF o cualquier combinación de estos. En modalidades preferidas adicionales, el nivel de endoglina soluble se compara con una muestra de referencia que es indicadora de preeclampsia o eclampsia y una alteración (por ejemplo, una reducción) en los niveles de endoglina soluble con relación a la muestra de referencia es indicadora de eficacia terapéutica o una dosis efectiva de un compuesto terapéutico. En un ejemplo, una reducción (por ejemplo 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más) en el nivel de ácido nucleico o polipéptido de endoglina soluble

medido durante o después de administrar la terapia con relación al valor antes de terapia indica una mejora en la preeclampsia o eclampsia. En otro ejemplo, los niveles absolutos de endoglina soluble se miden y utilizan para monitorear la eficacia terapéutica de ese compuesto. Por ejemplo, un compuesto terapéutico se administra preferiblemente en una dosis de tal forma que el nivel de endoglina soluble es menor de 25 ng/ml, preferiblemente menor de 20 ng/ml.

En modalidades de los aspectos de monitoreo terapéutico anteriores que incluyen la medición del sFlt-1, una reducción en el nivel de ácido nucleico o polipéptido sFlt-1 indica una mejora en la preeclampsia o eclampsia. En otra modalidad, un compuesto terapéutico se administra en una dosis de tal forma que el nivel de polipéptido sFlt-1 es menor de 2 ng/ml. En modalidades que incluyen la medición del VEGF o PlGF, un incremento en el nivel de ácido nucleico o polipéptido VEGF o PlGF medido durante o después de administrar la terapia con relación al valor anterior de la terapia indica una mejora en la preeclampsia o eclampsia. En modalidades que incluyen la medición del sFlt-1, VEGF, o PlGF en adición a la medición de endoglina soluble, el método puede incluir calcular la relación entre los niveles de sFlt-1, VEGF o PlGF utilizando una métrica, en donde una alteración en la relación entre dichos niveles en la muestra del sujeto con relación a una muestra de referencia, es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia. Un ejemplo de tal una métrica es el PAAI. En este ejemplo, una reducción en el valor PAAI de un sujeto (por ejemplo, menos de 20, preferiblemente menos de 100) indica una mejora en la preeclampsia o eclampsia. Una reducción en el PAAI (por ejemplo, menos de 20, preferiblemente menos de 10) también puede indicar una dosis efectiva de un compuesto terapéutico. En modalidades preferidas de los aspectos que se relacionan con el diagnóstico o monitoreo de tratamientos terapéuticos, los polipéptidos se miden utilizando un

ensayo inmunológico tal como ELISA o western blot. El nivel de endoglina soluble puede ser el nivel de endoglina soluble libre unida (es decir, unida a un ligando), o total (es decir, libre más unida), así como también el nivel de endoglina soluble resultante de la degradación del clivaje enzimático. Para cualquiera de los métodos de monitoreo, la medición de los niveles se puede hacer dos o más 5 ocasiones y un cambio en los niveles entre mediciones es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.

En otro aspecto, la invención suministra un método para identificar un 10 compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia que involucra poner en contacto una célula que expresa una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión de la molécula de ácido nucleico en la célula contactada por el compuesto candidato con el nivel de expresión en una célula de control no contactada por el compuesto 15 candidato, en donde una alteración en la expresión de la molécula de ácido nucleico de endoglina soluble identifica el compuesto candidato como un compuesto que puede ser útil para mejorar la preeclampsia o eclampsia.

En otro aspecto, la invención suministra un método para identificar un 20 compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia que involucra poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de endoglina soluble con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión del polipéptido en la célula contactada por el compuesto candidato con el nivel de expresión de polipéptido en una célula de control no contactada por el compuesto candidato, en donde una 25 alteración en la expresión del polipéptido de endoglina soluble identifica el compuesto candidato como un compuesto que puede ser útil para mejorar la preeclampsia o eclampsia. En un aspecto, la alteración en la expresión se ensaya

utilizando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático, o un inmunoensayo. En una modalidad, la alteración en la expresión es una reducción en el nivel de endoglina soluble. La alteración en la expresión puede resultar de una alteración en la transcripción o una alteración en la traducción.

5

En otro aspecto, la invención suministra un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia que involucra poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de endoglina soluble con un compuesto candidato, y comparar la actividad biológica del polipéptido en la célula
10 contactada por el compuesto candidato con el nivel de actividad biológico en una célula de control no contactada por el compuesto candidato, en donde una alteración en la actividad biológica del polipéptido de endoglina soluble identifica el compuesto candidato como un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia. En una modalidad, el incremento en la actividad biológica se ensaya
15 utilizando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático, o un inmunoensayo.

En otro aspecto, la invención suministra un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, que comprende detectar la unión de un polipéptido de endoglina soluble y un compuesto candidato, en donde
20 un compuesto candidato que une el polipéptido de endoglina soluble puede ser útil para mejorar la preeclampsia o eclampsia.

En otro aspecto, la invención suministra un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia que involucra detectar la
25 unión entre un polipéptido de endoglina soluble y un factor de crecimiento en la presencia de un compuesto candidato, en donde una reducción en la unión, con relación a la unión entre el polipéptido de endoglina soluble y el factor de

crecimiento en la ausencia del compuesto candidato identifica el compuesto candidato como un compuesto que puede ser útil para mejorar la preeclampsia o eclampsia. En una modalidad, el factor de crecimiento es un miembro de la familia TGF- β .

5

En otro aspecto, la invención suministra un método para identificar un polipéptido o un fragmento de este, que evita la unión entre un polipéptido de endoglina soluble y un factor de crecimiento. El método involucra detectar la unión entre un polipéptido de endoglina soluble y un factor de crecimiento en la presencia del polipéptido candidato, en donde una reducción en la unión, con relación a la unión entre el polipéptido de endoglina soluble y el factor de crecimiento en la ausencia del candidato polipéptido identifica el polipéptido candidato como un polipéptido que evita la unión entre un polipéptido de endoglina soluble y un factor de crecimiento. En una modalidad, el factor de crecimiento es un miembro de la familia TGF- β .

10
15

En un aspecto relacionado, la invención suministra un compuesto identificado de acuerdo con los aspectos anteriores, en donde el compuesto es un polipéptido que une específicamente un polipéptido de endoglina soluble y evita que el polipéptido de endoglina soluble se una con un miembro de la familia TGF- β . En una modalidad preferida, el polipéptido es un anticuerpo que une una endoglina soluble, preferiblemente un anticuerpo que une específicamente la endoglina soluble.

20

Para el propósito de la presente invención, se definen adelante las siguientes abreviaturas y términos.

25

Por "alteración" significa un cambio (incremento o reducción) en los niveles de expresión de un gen o polipéptido según se detecta por métodos conocidos en la técnica tal como aquellos descritos adelante. Como se utiliza aquí, una alteración incluye un 10% de cambio en los niveles de expresión, preferiblemente un 25% de cambios, más preferiblemente un 40% de cambios, y más preferiblemente un 50% o más de cambios en los niveles de expresión.

"Alteración" también puede indicar un cambio (incremento o reducción) en la actividad biológica de cualquiera de los polipéptidos de la invención (por ejemplo, endoglina soluble, sFIt-1, VEGF o PIGF). Ejemplos de actividad biológica para endoglina soluble son angiogénesis y ensayos de unión utilizando ligandos conocidos tal como activin-A, BMP 2, BMP-7, TGF- β 1 y TGF- β 3. La actividad biológica de la endoglina soluble se puede medir por ensayos de unión de ligando, inmunoensayos, y ensayos de angiogénesis que son estándar en la técnica o se describen aquí. Ejemplos de actividad biológica para el PIGF o VEGF incluye unión a receptores según se mide por inmunoensayos, ensayos de unión de ligando o análisis de gráfica Scatchard e inducción de proliferación celular o migración según se mide por etiquetado BrdU, experimentos de conteo celular o ensayos cuantitativos para síntesis de ADN tal como incorporación de ^3H -timidina. Ejemplos de actividad biológica para el sFIt-1 incluyen unión a PIGF y VEGF según se mide por inmunoensayos, ensayos de unión de ligando, o análisis de gráfica Scatchard. Ejemplos adicionales de ensayos para actividad biológica para cada polipéptido se describen aquí. Como se utiliza aquí, una alteración incluye un 10% de cambio en la actividad biológica, preferiblemente un 25% de cambio, más preferiblemente un 40% de cambios, y más preferiblemente un 50% o más de cambio en la actividad biológica.

Por "oligómero de nucleobase antisentido" significa un oligómero de nucleobase, sin importar la longitud, que es complementario con la hebra de codificación o mRNA de un gen endoglin. Por "oligómero nucleobase" significa un compuesto que incluye una cadena de al menos ocho nucleobases, preferiblemente al menos doce, y más preferiblemente al menos dieciséis bases unidas por grupos de enlace. Se incluye en esta definición oligonucleótidos naturales y no naturales, ambos modificados y no modificados, así como también imitaciones de oligonucleótidos tales como proteínas de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos asegurados y ácidos arabinonucleicos. Numerosas nucleobases y grupos de enlace se pueden emplear en los oligómeros nucleobase de la invención, que incluyen aquellos descritos en la Publicación de Patente Estadounidense. 20030114412 (ver por ejemplo párrafos 27-45 de la publicación) y 20030114407 (ver por ejemplo párrafos 35-52 de la publicación, incorporado aquí como referencia. El oligómero nucleobase también se puede objetivar para el inicio traduccional y los sitios de detención. Preferiblemente el oligómero de nucleobase antisentido comprende de aproximadamente 8 a 30 nucleótidos. El oligómero de nucleobase antisentido también puede contener al menos 40, 60, 85, 120, o más nucleótidos consecutivos que son complementarios al mRNA endoglin o ADN, y pueden ser tan largos como la longitud completa del mRNA o el gen.

20

Por "Índice de masa corporal" significa un número, derivado al utilizar las mediciones de altura y peso, que da una indicación general de si o no el peso cae dentro de un rango saludable. La fórmula utilizada generalmente para determinar el índice de masa corporal es el peso de una persona en kilogramos dividido por la altura de la persona en metros cuadrados o peso (kg)/ (altura(m))².

25

Por "compuesto" significa cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, o polipéptido, o fragmentos de estos. Compuestos particularmente útiles de la invención pueden afectar los niveles de actividad biológica de la endoglina soluble por al menos 10%, 20%,
5 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más.

Por "anticuerpo quimérico" significa un polipéptido que comprende al menos una porción de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo ligada a al menos parte de otra proteína (típicamente un dominio constante de inmunoglobulina).

10

Por "ARN de doble hélice (dsARN)" significa una molécula de ácido ribonucleico que comprende una hélice sentido y antisentido. El dsARN se utiliza típicamente para mediar la interferencia por ARN.

15 Por "endoglina," también conocida como CD 105, significa un factor de crecimiento de mamífero que tiene actividad biológica de endoglina (ver Fonsatti et al., *Oncogene* 22:6557-6563, 2003; Fonsatti et al., *Curr. Cancer Drug Targets* 3:427-432, 2003) y es homólogo a la proteína definida por cualquiera de los siguientes números de acceso de GenBank: AAH29080 y NP_031958 (ratón);
20 AAS67893 (rata); NP_000109, P17813, VSP_004233, y CAA80673 (humano); y A49722 (cerdos), o se descrito en la U.S.P.N. 6,562,957. La endoglina es una glicoproteína de membrana celular homodimérica que se expresa en altos niveles en proliferación de células vasculares y sincitiotrofoblastos de placentas. Existen dos isoformas distintas de endoglina, L y S, que difieren en sus colas
25 citoplásmicas por 47 aminoácidos. Ambas isoformas están incluidas en el término endoglina como se utiliza aquí. La endoglina une a los miembros de la familia TGF- β y, en la presencia de TGF- β , la endoglina se puede asociar con los

receptores de señalización de TGF- β RI y RII, y potenciar la respuesta para los factores de crecimiento. Las actividades biológicas de endoglin incluyen la unión a los miembros de la familia TGF- β tales como activin-A, BMP 2, BMP-7, TGF- β 1 y TGF- β -3; la inducción de angiogénesis, regulación de proliferación celular, adhesión, migración, invasión; y activación de células endoteliales. Los ensayos para actividades biológicas de endoglin se conocen en la técnica e incluyen ensayos de unión de ligando o análisis de gráfica Scatchard; etiquetado BrdU, experimentos de continuación celular, o ensayos cuantitativos para síntesis de ADN tal como incorporación ^3H -timidina utilizada para la medición de proliferación celular; y ensayos de angiogénesis tales como aquellos descritos aquí o en McCarty et al., *Intl. J. of Oncol.* 21: 5-10, 2002; Akhtar et al. *Clin. Chem.* 49:32-40, 2003; y Yamashita et al, *J. Biol. Chem.* 269:1995-2001, 1994). Por "endoglin soluble" significa una forma de unión no membrana, circulante de endoglin que incluye al menos una parte de la porción extracelular de la proteína (ver figura 1).

La endoglin soluble puede resultar del clivaje de la forma de unión de membrana de endoglin mediante una enzima proteolítica. Un sitio de clivaje potencial es en el aminoácido 437. Aunque no se desea estar unido por la teoría, es probable que el dominio de unión de ligando extracelular retenido por la endoglin soluble pudiera permitir unir ligandos tales como el TGF- β 1 y TGF- β 3, creando por lo tanto una deficiencia resultante en TGF- β . Adicionalmente, en razón a que la endoglin es una molécula específica endotelial, es probable que las deficiencias de TGF- β sean máximas en las células endoteliales. La endoglin soluble también puede incluir productos de degradación circulante o fragmentos que son aquellos que resultan del clivaje enzimático de endoglin y que mantiene la actividad biológica de la endoglin. La función biológica de la endoglin soluble se desconoce actualmente, pero se predice que crea una deficiencia del TGF- β y otros ligandos conocidos. La actividad biológica de la endoglin soluble se puede ensayar al medir

los niveles de Activin A o TGF- β 3 libre o al utilizar ensayos de angiogénesis conocidos en la técnica o descritos aquí.

Por "ácido nucleico endoglina" significa un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas endoglina descritas anteriormente. En un ejemplo, el gen para endoglina humana consiste de 14 exones, en donde el exón 1 codifica a la secuencia de señal de péptido, los exones 2-12 codifican el dominio extracelular, el exón 13 codifica el dominio de transmembrana, y el exón 14 codifica el dominio citoplásmico del terminal C (ver Figuras 1, y 2).

10

Por "expresión" significa la detección de un gen o polipéptido por métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión del polipéptido se detecta a menudo por western blot, la expresión de ADN se detecta a menudo por Southern blot o reacción de cadena de polimerasa (PCR), y la expresión de ARN a menudo se detecta por northern blot, PCR o ensayos de protección RNasa

15

Por "fragmentos" significa una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico. Esta porción contiene preferiblemente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico de referencia o polipéptido. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

20

Por "edad gestacional" significa una referencia a la edad del feto, contando desde el primer día del último periodo menstrual de la madre usualmente referido en semanas.

25

Por "historia de preeclampsia o eclampsia" significa un diagnóstico previo de preeclampsia o eclampsia o hipertensión inducida por preñez en los sujetos mismos o en miembros relacionados con la familia.

5 Por "homólogos" significa cualquier gen de secuencia de proteína que lleva al menos 30% de homología, más preferiblemente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, y más preferiblemente 90% o más de homología con un gen conocido o secuencia de proteína sobre la longitud de la secuencia de comparación. Una proteína "homóloga" también puede tener al menos una actividad biológica de la proteína
10 de comparación. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de al menos 16 aminoácidos, preferiblemente al menos 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 25 aminoácidos, y más preferiblemente 35 aminoácidos o más. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de al menos 50 nucleótidos,
15 preferiblemente al menos 60 nucleótidos, más preferiblemente al menos 75 nucleótidos, y más preferiblemente al menos 110 nucleótidos. "Homología" también se puede referir a una similitud sustancial entre un epítipo utilizado para generar anticuerpos y la proteína o fragmento de este al que los anticuerpos se dirigen. En este caso, la homología se refiere a una similitud suficiente para elicitar
20 la producción de anticuerpos que puedan reconocer específicamente la proteína en tejido.

Por "anticuerpo humanizado" significa una secuencia de aminoácido de inmunoglobulina variante o fragmento de este que es capaz de unirse a un
25 antígeno predeterminado. Ordinariamente, el anticuerpo contendrá la cadena liviana así como también al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, articulación, CH2, CH3, o CH4

de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado comprende una región de estructura (FR) que tiene substancialmente la secuencia de aminoácido de una inmunoglobulina humana y una región determinadota de complementariedad (CDR) que tiene substancialmente la secuencia de aminoácido de una
5 inmunoglobulina no humana (las secuencias "de importación").

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en ésta desde una fuente que no es humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todas o al
10 menos una, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) en el que todas o substancialmente todas las regiones CDR correspondientes a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas de las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá óptimamente al menos una
15 porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Por "región de determinación de complementariedad (CDR)" significa las tres secuencias hipervariables en las regiones variables dentro de cada una de las cadenas liviana y pesada de inmunoglobulina. Por "región de estructura (FR)" significa las secuencias de
20 aminoácido ubicadas en cualquier lado de las tres secuencias hipervariables (CDR) de las cadenas liviana y pesada de inmunoglobulina.

Las regiones FR y CDR de anticuerpo humanizado no necesitan correspondencia precisamente con las secuencias parentales, por ejemplo, el
25 CDR de importación o el FR consenso se pueden mutagenizar por sustitución, inserción o eliminación de al menos un residuo de tal forma que el residuo FR o CDR en éste sitio no corresponde al consenso o el anticuerpo de importación.

Tales mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Usualmente, al menos el 75%, preferiblemente el 90%, y más preferiblemente al menos 95% de los residuos de anticuerpo humanizados corresponderán con al menos de las secuencias FR y CDR parentales.

5

Por "hibridiza" significa un par para formar una molécula de doble hebra entre secuencias de polinucleótido complementarias, o porciones de esta, bajo varias condiciones de rigor. (Ver, por ejemplo, Wahl and Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, *Methods Enzymol.* 152:507, 1987.) Por ejemplo, la

10 concentración de rigurosa de sal será ordinariamente de menos de aproximadamente 750 mM de NaCl y 75 mM de citrato de trisodio, preferiblemente menos de aproximadamente 500 mM de NaCl y 50 mM de citrato de trisodio, y más preferiblemente menos de aproximadamente 250 mM de NaCl y 25 mM de citrato de trisodio. Se puede obtener la hibridización de bajo rigor en la ausencia

15 de solvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que se puede obtener hibridización de alto rigor en la presencia de al menos aproximadamente 35% de formamida, y más preferiblemente al menos aproximadamente 50% de formamida. Condiciones rigurosas de temperatura incluirán ordinariamente temperaturas de al menos aproximadamente 30° C, más preferiblemente de al menos de

20 aproximadamente 37° C, y más preferiblemente de al menos de aproximadamente 42° C. Parámetros adicionales variantes, tal como tiempo de hibridización, la concentración de detergente, por ejemplo, sulfato dodecilo de sodio (SDS), y la inclusión de un portador de ADN, son bien conocidos por aquellos expertos en las técnica. Varios niveles de rigor se logran al combinar estas varias condiciones

25 según sea necesario. En una modalidad preferida, la hibridización ocurrirá a 30° C en 750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de trisodio, y 1% SDS. En uno modalidad más preferida, la hibridización ocurrirá a 37° C en 500 mM de NaCl, 50 mM de

citrato de trisodio, 1% SDS, 35% formamida, y 100 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado (ssADN). En una modalidad más preferida, la hibridización ocurrirá a 42° C en 250 mM de NaCl, 25 mM de citrato de trisodio, 1% SDS, 50% de formamida, y 200 µg/ml de ssADN. Variaciones útiles en estas condiciones
5 serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica.

Para la mayoría de aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridización también variarán en rigor. Las condiciones de rigor se pueden definir por concentración de sal y por temperatura. Como se describió anteriormente, el
10 rigor en el lavado se puede incrementar al reducir la concentración de sal o al incrementar la temperatura. Por ejemplo, la concentración de rigor de sal para las etapas de lavado será preferiblemente de menos de aproximadamente 30 mM de NaCl y 3 mM de citrato de trisodio, y más preferiblemente menos de aproximadamente 15 mM de NaCl y 1.5 mM de citrato de trisodio. Condiciones de
15 temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán ordinariamente una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C, y más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En una modalidad preferida, las etapas de lavado ocurrirán a 25°C en 30 mM de NaCl, 3 mM de citrato de trisodio, y 0.1% SDS. En
20 una modalidad más preferida, las etapas de lavado ocurrirán a 42°C en 15 mM de NaCl, 1.5 mM de citrato de trisodio, y 0.1% SDS. En una modalidad más preferida las etapas de lavado ocurrirán a 68°C en 15 mM de NaCl, 1.0 mM de citrato de trisodio y 0.1% SDS. Variaciones adicionales de estas condiciones serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica. Las técnicas de
25 hibridización son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current

Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and 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.

5

Por "retardo de crecimiento intrauterino (IUGR)" significa un síndrome que resulta en un peso de nacimiento que es menos del 10% del peso fetal predicho para la etapa gestacional del feto. El criterio actual de la Organización de Salud Mundial para el bajo peso de recién nacidos es un peso de 2,500 gm (5 lbs. 8 oz.) o por debajo del 10º percentil de la edad gestacional de acuerdo con las tablas estadounidenses de peso de recién nacidos para la edad gestacional por raza, paridad, y sexo del infante (Zhang and Bowes, Obstet. Gynecol. 86:200-208, 1995). Este bajo peso de los bebés recién nacidos también se refiere como "pequeño para edad gestacional (SGA)". La preeclampsia es una condición conocida por estar asociada con IUGR o SGA.

15

Por "métrica" significa una medición. Una métrica se puede utilizar, por ejemplo, para comparar los niveles de una molécula de ácido nucleico o polipéptido de interés. Las métricas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, fórmulas matemáticas o algoritmos, tal como tasas. La métrica para ser utilizada es aquella que mejor discrimina entre los niveles de endoglina soluble, sFlt-1, VEGF, o PlGF, o cualquier combinación de éstos, en un sujeto que tiene preeclampsia o eclampsia, y un sujeto normal de control. Dependiendo de la métrica que se utilice, el indicador de diagnóstico de la eclampsia o preeclampsia puede estar significativamente por encima o por debajo de un valor de referencia (por ejemplo, de un sujeto de control que no tiene preeclampsia o eclampsia).

20

25

El nivel de endoglina soluble se administra al medir la cantidad de endoglina soluble libre, unida (es decir, unida al factor de crecimiento), o total (libre + unida). El nivel del sFlt-1 se mide al medir la cantidad de sFlt-1 libre, unida (es decir, unida al factor de crecimiento), o sFlt-1 total (unida + libre). Los niveles de VEGF o PIGF se determinan al medir la cantidad del PIGF o VEGF libre (es decir, sin unión al sFlt-1). Una métrica de ejemplo es el $[sFlt-1/(VEGF + PIGF)]$, también referido como el Índice de preeclampsia antiangiogénico (PAAI).

Por "Índice de anti-angiogénesis de preeclampsia (PAAI)" significa la proporción de $sFlt-1/(VEGF + PIGF)$ utilizado como un indicador de la actividad anti-angiogénica. Un PAAI mayor de 10, más preferiblemente mayor de 20, se considera es indicador de preeclampsia o riesgo de preeclampsia.

Por "ligado operablemente" significa que un gen y una secuencia reguladora se conectan en tal una forma para permitir la expresión del gen cuando la molécula apropiada (por ejemplo proteínas activadoras transcripcionales) se unen a la secuencias reguladoras.

Por "portador farmacéuticamente aceptable" significa un portador que es fisiológicamente aceptable para el mamífero tratado mientras que retiene las propiedades terapéuticas del compuesto con el que éste se administra. Una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable de ejemplo es salina fisiológica. Otros portadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se conocen por un experto en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (20 edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.

Por "factor de crecimiento placentario (PIGF)" significa un factor de crecimiento de mamífero que es homólogo a la proteína definido por el número de acceso GenBank P49763 y que tiene la actividad PIGF biológica. El PIGF es un homodímero glicosilado que pertenece a la familia VEGF y se puede unir en dos isoformas distintas a través de mecanismos de división alternativos. El PIGF se expresa por cito- y sincitiotrofoblastos en la placenta y la actividad biológica PIGF incluye la inducción de proliferación, migración, y activación de células endoteliales, particularmente células trofoblastos.

Por "polimorfismo" significa una variación genética, mutación, eliminación, o adición en una endoglina soluble, sFlt-1, PIGF, o molécula de ácido nucleico VEGF que es indicadora de una predisposición a desarrollar preeclampsia o eclampsia. Tales polimorfismos se conocen por los expertos y se describen, por ejemplo, por Raab et al. (Biochem J. 339:579-588, 1999) y Parry et al. (Eur. J Immunogenet. 26:321-323, 1999). Un polimorfismo puede estar presente en la secuencia promotora, un cuadro relectura abierto, secuencia intrónica, o región 3' no traducida de un gen. Ejemplos conocidos de tales polimorfismos en el gen endoglina incluyen una inserción de 6 bases de GGGGGA en intron 7 en 26 bases más allá del extremo 3' del exon 7 (Ann. Neurol. 41:683-6, 1997).

20

Por "preeclampsia" significa un trastorno multi-sistema que se caracteriza por hipertensión con proteinuria o edema, o ambos, disfunción glomerular, edema de cerebro, edema de hígado, o anomalías por coagulación debido a preñez o la influencia de una preñez reciente. La preeclampsia ocurre generalmente después de la semana 20 de gestación. La preeclampsia se define generalmente como alguna combinación de los siguientes síntomas: (1) presión sanguínea sistólica (BP) >140 mmHg y diastólica BP >90 mmHg después de 20b semanas de

gestación (medido generalmente en dos ocasiones, 4-168 horas aparte), (2) nuevo inicio de proteinuria (1 + por vara aforadora en uroanálisis, >300mg de proteína en una recolección de orina de 24 horas, o una única muestra de orina aleatoria que tiene una proporción de proteína/creatinina >0.3), y (3) resolución de hipertensión y proteinuria durante 12 semanas posparto. La preeclampsia severa se define generalmente como (1) un BP diastólico > 110 mmHg (medido generalmente en dos ocasiones, 4-168 horas aparte) o (2) proteinuria caracterizada por una medición de 3.5 g o más proteínas en una recolección de orina de 24 horas o dos especímenes de orina aleatorio con al menos proteína 3+ por vara aforadora. En preeclampsia, la hipertensión y la proteinuria ocurren generalmente dentro de siete días una de la otra. En la preeclampsia severa, la hipertensión severa, proteinuria severa y el síndrome HELLP (hemólisis, enzimas de hígado elevadas, bajas plaquetas) o eclampsia puede ocurrir simultáneamente o sólo un síntoma a la vez. Ocasionalmente, la preeclampsia severa puede conducir al desarrollo de ataques. Ésta forma severa del síndrome se refiere como "eclampsia". La eclampsia también puede incluir disfunción o daño a varios órganos o tejidos tales como el hígado (por ejemplo, daño hepatocelular, necrosis periportal) y el sistema nervioso central (edema cerebral y hemorragia cerebral). La etiología de los ataques se cree que es secundaria al desarrollo del edema cerebral y el espasmo focal de los vasos sanguíneos pequeños en el riñón.

Por "proteína" o "polipéptido" o "fragmento de polipéptido" significa cualquier cadena de más de dos aminoácidos, con respecto de la modificación post-traducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), que constituye todo o parte de un polipéptido de ocurrencia natural o péptido, o que constituye un polipéptido o péptido de ocurrencia no natural.

Por "muestra de referencia" significa una muestra tomada de un sujeto preñado que no tiene preeclampsia o eclampsia, un sujeto que está preñado pero la muestra se toma anticipadamente en la preñez (por ejemplo, en el primero o segundo trimestre o antes de la detección de la preeclampsia o eclampsia), un
 5 sujeto que está preñado pero no tiene preeclampsia o eclampsia y sólo tiene una historia de preeclampsia o eclampsia, o un sujeto q no está preñado.

Por "reduce o inhibe" significa la capacidad de originar una reducción general preferiblemente del 20% o más, mas preferiblemente del 50% o más, y
 10 mas preferiblemente del 75% o más, en el nivel de proteína o ácido nucleico, detectado por los ensayos mencionados anteriormente (ver "expresión"), comparado con muestras no tratadas con oligómeros de nucleobase antisentido o dsARN o siARN utilizados para interferencia de ARN.

15 Por "ARN interfiriente pequeño (siARN)" significa una molécula dsARN aislada, preferiblemente mayor de 10 nucleótidos (nt) de longitud, más preferiblemente mayor de 15 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente mayor de 19 nucleótidos de longitud que se utiliza para identificar el gen o el Mam. Un rango de 19-25 nucleótidos es el tamaño más preferido para el siARN. El siARN
 20 también puede incluir ARN de orquilla corta en la que ambas hélices de un dúplex de siARN se incluye dentro de una molécula de ARN sencilla. El siARN incluye cualquier forma de dsARN (productos clivados proteolíticamente de dsARN mayor, ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido recombinantemente) así como también ARN alterado que difiere del
 25 ARN de ocurrencia natural por la adición, eliminación, sustitución, y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como aquel de los extremos de 21 a 23 nt ARN o internamente (en

uno o más nucleótidos del ARN). En una modalidad preferida, la molécula de ARN contiene un grupo hidroxilo 3'. Los nucleótidos en las moléculas de ARN de la presente invención también pueden comprender nucleótidos sin hélice, que incluyen nucleótidos de ocurrencia no natural o desoxirribonucleótidos.

- 5 Colectivamente, todos los tales ARN alterados se refieren como análogos de ARN. El siARN de la presente invención necesita sólo ser suficientemente similar al ARN natural que tiene la capacidad mediar la interferencia de ARN (ARNi). Como se utiliza aquí, el ARNi se refiere al clivaje y la degradación objetivada dependiente de ATP de una molécula de ARN específica a través de la introducción de ARN de
- 10 interferencia pequeña o dsARN en una célula o un organismo. Como se utiliza aquí "ARNi mediado" se refiere a la capacidad para distinguir o identificar que el ARN es capaz de ser degradado.

- Por "Flt-1 (sFlt-1)" (también conocido como sVEGF-R1) significa la forma
- 15 soluble del receptor Flt-1, que es homólogo con la proteína definida por el número de acceso del GenBank U01134, y que tiene actividad biológica sFlt-1. La actividad biológica de un polipéptido sFlt-1 se puede ensayar utilizando cualquier método estándar, por ejemplo, al ensayar la unión del sFlt-1 a VEGF. Al sFlt-1 le falta el dominio de transmembrana y el dominio de quinasa tirosina citoplásmico
- 20 del receptor sFlt-1. El sFlt-1 puede unirse al VEGF y PlGF con alta afinidad, pero esto no puede inducir la proliferación o angiogénesis y por lo tanto es funcionalmente diferente de los receptores Flt-1 y KDR. El sFlt-1 se purifica adicionalmente de las células endoteliales umbilical humanas y muestra posteriormente ser producido por células trofoblastos *in vivo*. Como se utiliza aquí,
- 25 el sFlt-1 incluye cualquier miembro de la familia sFlt-1 o isoforma. El sFlt-1 también puede significar los productos de degradación o fragmentos que resultan del clivaje enzimático del receptor sFlt-1 y que mantiene la actividad biológica del

sFlt-1. En un ejemplo, las metaloproteinasas específicas liberadas de la placenta puede clivar el dominio extracelular del receptor Flt-1 para liberar la porción N-terminal del Flt-1 en circulación.

5 Por "une específicamente" significa un compuesto anticuerpo que reconoce y une un polipéptido de la invención pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye naturalmente un polipéptido de la invención. Un ejemplo, un anticuerpo que une específicamente endoglina soluble no une endoglina unida a la
10 membrana de unión. En un ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a endoglina soluble reconoce una región dentro de los aminoácidos 1 a 437 de la endoglina que es única para endoglina soluble pero no la endoglina de longitud completa.

15 Por "sujeto" significa un mamífero, que incluye, pero no está limitado a, un humano, o mamífero no humano, tal como bovino, equino, canino, ovino, o felino. Incluido en ésta definición están los mamíferos preñados, posparto, y no preñados.

20 Por "sustancialmente idénticos" significa una secuencia de aminoácido que difiere sólo por las sustituciones de aminoácido conservadoras, por ejemplo, sustitución de un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo valina por glicina, arginina por lisina, etc.) o por uno o más sustituciones no conservadoras, eliminaciones, o inserciones ubicadas en las posiciones de la secuencia de
25 aminoácidos que no destruyen la función de la proteína. Preferiblemente, la secuencia de aminoácido es de al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, y más preferiblemente al menos 90% homólogos con otra secuencia de

aminoácidos. Los métodos para determinar la identidad están disponibles en programas de computador disponibles públicamente. Los métodos de programa de computador para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programa GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)). El algoritmo bien conocido de Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad. El programa BLAST está públicamente disponible de NCBI y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD 20894, BLAST 2.0 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Estos programas de software casan secuencias similares al asignar grados de homología a varias sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones. Las sustituciones conservadores incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, serina, treonina; lisina, arginina, y fenilalanina, tirosina.

Por "síntomas de preeclampsia" significa cualquiera de los siguientes: (1) una presión sanguínea sistólica (BP)>140 mmHg y una BP diastólica >90 mmHg después de 20 semanas de gestación, (2) nuevo inicio de proteinuria (1 + por vara aforadora en uroanálisis, >300mg de proteína en una recolección de orina en 24 horas, o proporción de proteína/creatinina de orina aleatoria >0.3), y (3) resolución de hipertensión y proteinuria durante 12 semanas posparto. Los síntomas de la pro-eclampsia también pueden incluir disfunción renal y endoteliosis glomerular o hipertrofia. Por "síntomas de eclampsia" significa el desarrollo de cualquiera de los siguientes síntomas debido a la preñez o la influencia de una preñez reciente: ataque, coma, trombocitopenia, edema de hígado, edema pulmonar, y edema cerebral.

Por "transformación de factor de crecimiento β (TGF- β)" significa un factor de crecimiento de mamífero que tiene actividad biológica TGF- β y es un miembro de una familia de polipéptidos paracrino relacionados estructuralmente encontrados ubicuamente en vertebrados, y prototípico de una gran familia de crecimiento metazoano, diferenciación, y factores de morfogénesis (ver, para revisión, Massague et al. *Ann Rev Cell Biol* 6:597-641 (1990); Massague et al. *Trends Cell Biol* 4:172-178 (1994); Kingsley *Gene Dev.* 8:133-146 (1994); y Sporn et al. *J Cell Biol* 119:1017- 1021 (1992). Como se describe en Kingsley, supra, la superfamilia TGF- β tiene al menos 25 miembros, y se puede agrupar en distintas sub-familias con secuencias altamente relacionadas. Las sub-familias más obvias incluyen lo siguiente: la sub-familia TGF- β , que comprende al menos cuatro genes que son mucho más similares al TGF- β 1 que a otros miembros de la superfamilia TGF- β ; la sub-familia activina, que comprende homo- o heterodímeros o dos sub-unidades, inhiben β -A e inhiben β -B. La sub-familia decapentaplégica, que incluye los factores de mamífero BMP2 y BMP4, que pueden inducir la formación de hueso ectópico y cartilago cuando se implanta bajo la piel o en los músculos. La sub-familia 60A, que incluye un número de mamíferos homólogos, con actividad osteoinductiva, que incluyen BMP5-8. Otros miembros de la superfamilia TGF- β que incluyen el factor 1 de diferenciación bruto (GDF-1), GDF-3/VGR-2, dorsalin, nodal, sustancia de inhibición de mulleriano (MIS), y factor de crecimiento neurotrófico derivado de glial (GDNF). Se nota que las sub-familias DPP y 60A se relacionan más cercanamente que con otros miembros de la superfamilia TGF- β , y han sido a menudo agrupados juntos como parte de una colección mayor de moléculas llamadas DVR (relacionadas dpp y vgl). A menos que se evidencie a partir del contexto en el que éste utiliza, el término TGF- β como se utiliza a través de ésta especificación se entenderá que se refiere generalmente a miembros de la

superfamilia TGF- β según se ha apropiado. (Massague et al, *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-91, 1998; Josso et al, *Curr. Op. Gen. Dev.*, 7:371-377, 1997). El TGF- β funciona para regular el crecimiento, diferenciación, motilidad, remodelamiento de tejido, neurogénesis, reparación, apoptosis, y angiogénesis en muchos tipos celulares. El TGF- β también inhibe la proliferación celular en muchos tipos de células y puede estimular la síntesis de proteínas de matriz.

Por "cantidad terapéutica" significa una cantidad que cuando se administra a un paciente que sufre de preeclampsia o eclampsia es suficiente para originar una reducción cualitativa o cuantitativa en los síntomas de preeclampsia o eclampsia como se describe aquí. Una "cantidad terapéutica" también significa una cantidad que cuando se administra a un paciente que sufre de preeclampsia o eclampsia es suficiente para originar una reducción en los niveles de expresión de endoglina o sFlt-1 o un incremento en los niveles de expresión del VEGF o PlGF según se mide por los ensayos descritos aquí.

Por "tratar" significa administrar un compuesto o una composición farmacéutica para propósitos profilácticos y/o terapéuticos. Para "tratar enfermedad" o uno para "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar tratamiento a un sujeto que ya sufre de una enfermedad para mejorar la condición del sujeto. Preferiblemente, el sujeto se diagnostica como que sufre de preeclampsia o eclampsia basado en la indicación de cualquiera de los síntomas característicos descritos adelante o el uso de los métodos del diagnóstico descritos aquí. Para "evitar enfermedad" se refiere a tratamiento profiláctico de un sujeto que aún no está enfermo, pero que es susceptible a, o de otra forma está en riesgo de, desarrollar una enfermedad particular. Preferiblemente, un sujeto se determina que está en riesgo de desarrollar preeclampsia o eclampsia utilizando

los métodos de diagnóstico descritos aquí. Así, en las reivindicaciones y modalidades, el tratamiento es la administración a un mamífero para propósito terapéutico o profiláctico.

- 5 Por "trofoblasto" significa la capa celular mesectoderma que cubre los blastocitos que erosionan la mucosa uterina y a través del cual el embrión recibe alimento de la madre; las células contribuyen a la formación de la placenta.

- Por "factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)" significa un factor de
10 crecimiento de mamífero que es homólogo al factor de crecimiento definido en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,332,671; 5,240,848; 5,194,596; y Chamock-Jones et al. (*Biol Reproduction*, 48: 1120-1128, 1993), y tiene actividad biológica VEGF. El VEGF existe como un homodímero glicosilado e incluye al menos cuatro isoformas divididas alternativamente diferentes. La actividad biológica del VEGF
15 incluye la promoción del crecimiento selectivo de células endoteliales vasculares o células endoteliales de vena umbilical y la inducción de angiogénesis. Como se utiliza aquí, el VEGF incluye cualquier miembro de la familia VEGF de isoforma (por ejemplo, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF189, VEGF165, o VEGF 121). Preferiblemente, el VEGF es la isoforma VEGF121 o
20 VEGF165 (Tischer et al., *J. Biol. Chem.* 266, 11947- 11954, 1991; Neufed et al. *Cancer Metastasis* 15:153- 158, 1996), que se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,447,768; 5,219,739; y 5,194,596, incorporada aquí como referencia. También se incluyen formas mutantes tal como el VEGF KDR-selectivo y el VEGF Flt-selectivo descrito en Gille et al. (*J. Biol. Chem.* 276:3222-3230,
25 2001). Como se usa aquí el VEGF también incluye cualquier forma modificada de VEGF tal como aquellas descritas en LeCouter et al. (*Science* 299:890-893, 2003). Aunque se prefiere el VEGF humano, la invención no se limita a formas humanas

y puede incluir otras formas animales de VEGF (por ejemplo ratón, rata, perro o pollo).

Por "vector" significa una molécula de ADN, usualmente derivada de un plásmido o bacteriófago, en la que los fragmentos de ADN se pueden insertar o clonar. Un vector recombinante contendrá uno o más sitios de restricción únicos, y pueden ser capaces de replicación autónoma en un huésped definido u organismo vehículo, tal que la secuencia clonada es reproducible. Un vector contiene un promotor ligado operablemente a un gen o región de codificación de tal forma que, luego de transfección en una célula recipiente, se expresa un ARN.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las modalidades preferidas de ésta, y de las reivindicaciones.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es una figura esquemática que muestra la proteína endoglina. SP: señal de péptido, ZP: dominio de zona pelúcida, CL: sitio de clivaje potencial (aminoácido 437) para la liberación de endoglina soluble, TM: dominio de transmembrana, Cito: dominio citoplasmático.

20

La FIGURA 2 muestra la secuencia de cADN predicha de endoglina soluble (aminoácidos 437).

25

La FIGURA 3 es un Northern blot que muestra los niveles de Mam endogлина en placentas de preñez normal (N), placentas de preñez preecláptica suave (p) y placentas de preñez preecláptica severa (P).

- 5 La FIGURA 4 es un Western blot que muestra los niveles de proteína de endogлина en la placenta. Las muestras son de dos pacientes preeclápticos, p32 y p26, que se presentan al Beth Israel Deaconess Medical Center en 2003 y suero materno de una mujer preñada. Se examina con Western blot utilizando un anticuerpo N-terminal obtenido de Santa Cruz, CA que muestra la banda 110kD en la placenta y
10 una banda 63 kD más pequeña que está presente en la muestra de placenta y suero.

La FIGURA 5 es una gráfica que muestra las concentraciones circulantes de endogлина soluble en mujer con preñez normal, preeclampsia suave, preeclampsia
15 severa, y preñez sin preeclampsia complicada por parto prematuro. Todos los especímenes se obtienen dentro de 24 horas antes de parto. La endogлина soluble se mide utilizando un kit ELISA de R & D Systems, MN (Cat #DNDG00). Los datos muestran que los niveles de endogлина soluble son significativamente elevados en pacientes preeclápticos al tiempo de enfermedad clínica.

20

Descripción Detallada

Hemos descubierto que los niveles de endogлина soluble se elevan en las muestras de suero sanguíneo tomadas de mujeres preeclápticas. La endogлина
25 soluble se puede formar por clivaje de la porción extracelular de la membrana que une la forma por enzima proteolítica. El exceso de endogлина soluble puede agotar las cantidades necesarias de placenta de estos factores mitogénicos y

angiogénicos esenciales. Así, la endoglina soluble, es un marcador diagnóstico excelente, para preeclampsia. Adicionalmente, hemos descubierto agentes terapéuticos que interfieren con la unión de endoglina soluble con factores de crecimiento, agentes que reducen la expresión de endoglina soluble o actividad biológica, o agentes que incrementan los niveles de factores de crecimiento, se pueden utilizar para tratar o prevenir preeclampsia o eclampsia en un sujeto. Tales agentes incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos para endoglina soluble, oligonucleótidos para ARNi o antisentido que reducen niveles de endoglina soluble, compuestos que incrementan los niveles de factores de crecimiento, compuestos que evitan el clivaje proteolítico de la forma de unión de membrana de endoglina evitando por lo tanto la liberación de endoglina soluble, y moléculas pequeñas que unen endoglina soluble y bloquean el sitio de unión de factor de crecimiento. La invención también caracteriza métodos para medir niveles de endoglina soluble como una herramienta de detección para diagnóstico anticipado y manejo de preeclampsia o eclampsia.

Mientras la descripción detallada presentada aquí se refiere específicamente a endoglina soluble, sFlt-1, VEGF, o PlGF, será claro para un experto en la técnica que la descripción detallada también se puede aplicar a miembros de la familia, isoformas y/o variantes de endoglina soluble, sFlt-1, VEGF, o PlGF.

Diagnósticos

La presente invención caracteriza ensayos basados en la detección de endoglina soluble para diagnóstico de preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones. Los niveles de endoglina, ya sean libres, unidos, o

niveles totales, se miden en una muestra de sujeto y se utilizan como un indicador de preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones. Los métodos de diagnóstico que miden los niveles de endoglina soluble también se pueden combinar con métodos para detectar niveles de sFlt-1, VEGF, o PlGF. En una modalidad, una métrica que incorpora endoglina soluble, sFlt-1, VEGF, o PlGF, o cualquier combinación de estos, se utiliza para determinar si una relación entre los niveles de al menos dos de las proteínas es indicador de preeclampsia o eclampsia.

Se pueden utilizar métodos estándar para medir los niveles de endoglina soluble, polipéptido VEGF, PlGF o sFlt-1 en cualquier fluido corporal, que incluye, pero no se limita a, orina, suero, plasma, saliva, fluido amniótico, o fluido cerebroespinal. Tales métodos incluyen inmunoensayo, ELISA, western blot utilizando anticuerpo dirigidos a endoglina soluble, VEGF, PlGF o sFlt-1, y técnicas de inmunoensayo de enzima cuantitativa tales como aquellas descritas en Ong et al. (*Obstet. Gynecol.* 98:608-611, 2001) y Su et al. (*Obstet Gynecol.*, 97:898-904, 2001). Los ensayos ELISA son el método preferido para medir los niveles de endoglina soluble, VEGF, PlGF o sFlt-1. Preferiblemente, se mide la endoglina soluble. Más preferiblemente, la medición de la endoglina soluble se combina con la medición del sFlt-1, VEGF, o PlGF, y más preferiblemente todas las cuatro proteínas (o los niveles mRNA indicadores de niveles de proteína) se miden. En modalidades preferidas adicionales, el índice de masa corporal (BMI) y la edad gestacional del feto también se miden e incluyen la métrica de diagnóstico. Los niveles de suero elevados de endoglina soluble se consideran un indicador positivo de preeclampsia o eclampsia. Por ejemplo, si el nivel de endoglina soluble se incrementa con relación a una muestra de referencia (por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más), con relación a una muestra de

referencia, esto se considera un indicador positivo de preeclampsia o eclampsia. Adicionalmente, cualquier alteración detectable en los niveles de endoglina soluble, sFlt-1, VEGF, o PIGF con relación a los niveles normales es indicador de eclampsia, preeclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones.

5 Normalmente, las concentraciones de suero circulante de endoglina soluble varían de 2-7 ng/ml durante el estado de no preñez y de 10-20 ng/ml durante la preñez normal. Los niveles de suero elevados mayores de ng/ml, preferiblemente mayores de 20 ng/ml, y más preferiblemente mayor de 25ng/ml o más, de endoglina soluble se considera un indicador positivo de preeclampsia.

10

En otra modalidad, el PAAI(sFlt-1/VEGF + PIGF) se utiliza, en combinación con medición de endoglina soluble, como un índice antiangiogénico que es diagnóstico de preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones. Si el nivel de endoglina soluble se incrementa con relación a una muestra de referencia (por ejemplo, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, o aún mucho más tanto como 10 veces o más), y el PAAI es mayor de 10, más preferiblemente mayor de 20, entonces se considera que el sujeto tiene preeclampsia, eclampsia, o está en riesgo inminente de desarrollar la misma. La proporción PAAI (sFlt-1/ VEGF + PIGF) es únicamente un ejemplo de una métrica útil que se puede utilizar como un indicador de diagnóstico. No se pretende que limite la invención. Virtualmente cualquier métrica que detecta una medición en los niveles de endoglina soluble, sFlt-1, PIGF, o VEGF, o cualquier combinación de éstos, en un sujeto con relación al control normal se puede utilizar como un indicador diagnóstico.

25

Los niveles de expresión de ácidos nucleicos particulares o polipéptidos se pueden correlacionar con un estado de enfermedad particular (por ejemplo,

preeclampsia o eclampsia), y así son útiles en el diagnóstico. Oligonucleótidos o fragmentos mayores derivados de una endoglina soluble, sFlt-1, PlGF, o secuencia de ácido nucleico VEGF se puede utilizar como una sonda no sólo para monitorear la expresión, si no también para identificar sujetos que tienen una

5 variación genética, mutación, o polimorfismo en una endoglina soluble, sFlt-1, PlGF, o molécula de ácido nucleico VEGF que es indicadora de una predisposición a desarrollar las condiciones. Estos polimorfismos pueden afectar los niveles de expresión de polipéptidos o ácido nucleico o la actividad biológica. Tales polimorfismos se conocen por los expertos en la técnica, y se describen, por

10 ejemplo, Raab et al., *supra*, y Parry et al. (*Eur. J Immunogenet.* 26:321-3, 1999). Por ejemplo, los polimorfismos en el gen endoglina se han descrito y muchos de éstos se asocian con el trastorno vascular dominante conocido como telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (HHT1). Muchas de éstas mutaciones conducen a la producción de una forma soluble de endoglina que es inestable, que

15 resulta en la expresión reducida de endoglina encontrada en células endoteliales y monocitos de pacientes HHT (Raab et al., *supra*). En otro ejemplo, una exploración de la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) revela al menos 330 polimorfismos conocidos en el gen y la región promotora del Flt-1/sFlt-1. La detección de la variación genética, mutación, o polimorfismo relacionado con una

20 muestra normal, de referencia puede ser como un indicador diagnóstico de preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

Tales alteraciones genéticas pueden estar presentes en la secuencia promotora, un cuadro de lectura abierto, secuencia intrónica, o región 3' no

25 traducida de un gen. La información relacionada con las alteraciones genéticas se pueden utilizar para diagnosticar un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o una propensión a desarrollar tales condiciones. Como se nota a través de

alteraciones específicas en los niveles de actividad biológica de endoglina soluble, el sFlt-1, VEGF, o PlGF, o cualquier combinación de éstos, se puede correlacionar con la probabilidad de preeclampsia o eclampsia, o la predisposición a la misma. Como un resultado, un experto en la técnica, que ha detectado una mutación
5 dada, puede luego ensayar una o más de las actividades biológicas de la proteína para determinar si la mutación origina o incrementa la probabilidad de preeclampsia o eclampsia.

En una modalidad, un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o una propensión
10 a desarrollar tales condiciones mostrará un incremento en la expresión de un ácido nucleico que codifica endoglina soluble o sFlt-1, o una alteración en los niveles PlGF o VEGF. Los métodos para detectar tales alteraciones son estándar en la técnica y se describen en Ausubel et al., *supra*. En un ejemplo el northern blot o PCR en tiempo real se utiliza para detectar niveles de endoglina soluble,
15 sFlt-1, PlGF, o mRNA VEGF.

En otra modalidad, la hibridización con sondas PCR que son capaces de detectar una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble, que incluyen secuencias genómicas, o moléculas cercanamente relacionadas, se pueden
20 utilizar para hibridizar a una secuencia de ácido nucleico derivada de un sujeto que tiene preeclampsia o eclampsia o está en riesgo de desarrollar tales condiciones. La especificidad de la sonda, si ésta se hace a partir de una región altamente específica, por ejemplo, la región reguladora 5', o a partir de una región menos específica, por ejemplo, un motivo conservado, y la rigurosidad de la
25 hibridización o amplificación (máxima, alta, intermedia, o baja)), determina si la sonda hibridiza a una secuencia de ocurrencia natural, variantes alélicas, u otras secuencias relacionadas. Las técnicas de hibridización se pueden utilizar para

identificar mutaciones indicadoras de preeclampsia o eclampsia en una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble, o se pueden utilizar para monitorear niveles de expresión de un gen que codifica un polipéptido de endoglina soluble (por ejemplo, por análisis Northern, Ausubel et al., *supra*).

5

En aún otra modalidad, los humanos se pueden diagnosticar para una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia por análisis directo de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble.

10 Un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o una propensión a desarrollar tales condiciones mostrará un incremento en la expresión de un polipéptido de endoglina soluble. El polipéptido de endoglina soluble puede incluir endoglina soluble de longitud completa, productos de degradación, y sus formas
15 alternativamente divididas de endoglina soluble, productos de clivaje enzimático de endoglina soluble, y similares. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de endoglina soluble se puede utilizar para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia o para identificar un sujeto en riesgo de desarrollar tales
20 condiciones. Una variedad de protocolos para medir una alteración en la expresión de tales polipéptidos se conocen, que incluyen métodos inmunológicos (tal como ELISA y RIA), y suministran una base para el diagnóstico de la preeclampsia o eclampsia o en riesgo de desarrollar tales condiciones. De nuevo, un incremento en el nivel del polipéptido de endoglina soluble se diagnostica de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o una propensión a desarrollar tales condiciones.

25 En una modalidad, el nivel de endoglina soluble se mide en combinación con el nivel de sFlt-1, VEGF, o polipéptido PlGF o ácido nucleico o cualquier combinación de éstos. Los métodos para la medición de sFlt-1, VEGF, y PlGF se

describen en el número de publicación PCT WO 2004/008946 y en la Publicación Estadounidense No. 20040126828, incorporados aquí como referencia en su totalidad.

5 La medición de cualquiera de los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos aquí, ocurre preferiblemente en al menos dos ocasiones diferentes y una alteración en los niveles según se compara con niveles de referencia normales durante el tiempo se utiliza como un indicador de preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones.

10

 El nivel de endoglina soluble presente en los fluidos corporales de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones se puede incrementar tampoco como el 10%, 20%, 30%, o 40%, o tanto como 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, o más con relación a los niveles en sujeto de control
15 normal o con relación a una muestra previa obtenida de los mismos fluidos corporales del mismo sujeto. El nivel de endoglina soluble en los fluidos corporales de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones, se puede alterar tan poco como 10%, 20%, 30%, o 40%, o tanto como 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, durante el tiempo a partir de una medición a
20 la siguiente.

 El nivel del sFlt-1, VEGF, o PlGF medido en combinación con el nivel de endoglina soluble en los fluidos corporales de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones se puede alterar tan poco como 10%,
25 20%, 30%, o 40%, o tanto como 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, o más con relación al nivel del sFlt-1, VEGF, o PlGF en un control normal. El nivel de sFlt-1, VEGF, o PlGF medido en combinación con el nivel de endoglina soluble en los fluidos

corporales de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar tales condiciones se puede alterar tan poco como el 10%, 20%, 30%, o 40%, o tanto como 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, durante el tiempo de una medición a la siguiente.

5

En una modalidad, una muestra de fluido corporal de un sujeto (por ejemplo, orina, plasma, suero, fluido amniótico, o fluido cerebroespinal) se recolecta anticipadamente en la preñez antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. En otro ejemplo, la muestra puede ser un tejido o célula recolectada anticipadamente en la preñez antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. Ejemplos no limitantes de tejidos y células incluyen tejido placentario, células placentarias, células endoteliales, y leucocitos tales como monocitos. En humanos, por ejemplo, las muestras de suero sanguíneo materno se recolectan a partir de la vena antecubital de mujeres preñadas durante el primero, segundo, o

10 tercero trimestres del embarazo. Preferiblemente, el ensayo se lleva a cabo durante el primer trimestre, por ejemplo, en 4, 6, 8, 10, o 12 semanas, o durante el segundo trimestre, por ejemplo, en 14, 16, 18, 20, 22, o 24 semanas. Tales ensayos también se pueden conducir al final del segundo trimestre o el tercer trimestre, por ejemplo, en las semanas 26, 28, 30, 32, 34, 36, o 38. Es preferible

15 que los niveles de endoglina soluble se midan dos veces durante éste periodo de tiempo. Para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia posparto, los ensayos para endoglina soluble se pueden llevar cabo posparto. Para el diagnóstico de una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia, el ensayo se lleva a cabo antes del inicio de la preñez. En un ejemplo, para el monitoreo y la administración

20 de terapia, el ensayo se lleva a cabo después del diagnóstico de preeclampsia pero durante la preñez.

25

En un ejemplo particular, se pueden recolectar muestras de sangre en serie durante la preñez, y los niveles de endoglina soluble determinados por ELISA. En otro ejemplo, una muestra se recolecta durante el segundo trimestre y anticipadamente en el tercer trimestre y en incremento en el nivel de endoglina soluble de la primer muestra a la segunda muestra es indicador de preeclampsia o eclampsia, o la propensión a desarrollar cualquier.

En la práctica veterinaria, se pueden llevar a cabo ensayos en cualquier tiempo durante la preñez, pero son, preferiblemente, llevados a cabo anticipadamente en la preñez, antes del inicio de los síntomas de preeclampsia. Dado que el término de preñez varía ampliamente entre especies, el tiempo del ensayo se determinará por un veterinario, pero corresponderá generalmente al tiempo de ensayos durante una preñez humana.

Los métodos de diagnóstico descritos aquí se pueden utilizar individualmente o en combinación con cualquier otro método de diagnóstico descrito aquí para un diagnóstico más exacto de la presencia de, severidad de, o tiempo estimado de el inicio de preeclampsia o eclampsia. Adicionalmente, los métodos de diagnóstico descritos aquí se pueden utilizar en combinación con cualquier otros métodos de diagnóstico determinados para ser útiles para el diagnóstico exacto de la presencia de, severidad de, o tiempo estimado de inicio de preeclampsia o eclampsia.

Los métodos de diagnóstico descritos aquí también se pueden utilizar para monitorear y manejar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto. En una modalidad, una terapia se administra hasta que el nivel de endoglina soluble en suero sea menor de 25 ng/ml. En otro ejemplo, si un sujeto se determina que tiene

un nivel incrementado de endoglina soluble con relación a un control normal luego la terapia se puede administrar hasta que los niveles de PIGF en suero se elevan a aproximadamente 400 pg/mL. En esta modalidad, los niveles de endoglina soluble, sFlt-1, PIGF, y VEGF, o cualquiera y todos estos, se miden repetidamente
5 como un método de no sólo diagnóstico de la enfermedad si no monitoreo del tratamiento y manejo de la preeclampsia y eclampsia.

Kits de Diagnóstico

10 La invención también suministra un kit de prueba diagnóstica. Por ejemplo, un kit de prueba diagnóstica puede incluir anticuerpos para endoglina soluble u medios para detectar, y más preferiblemente evaluar, la unión entre los anticuerpos y el polipéptido endoglina soluble. Para detección, el anticuerpo o el polipéptido endoglina soluble se etiqueta, y el anticuerpo o el polipéptido endoglina
15 soluble es de unión-sustrato, de tal forma que la interacción de anticuerpo-polipéptido endoglina soluble se puede establecer al determinar la cantidad de etiqueta adherida al sustrato luego de unión entre el anticuerpo y el polipéptido de endoglina soluble. Un ELISA convencional es un método conocido en la técnica común para detectar la interacción del sustrato-anticuerpo y se puede suministrar
20 con el kit de la invención. Los polipéptidos de endoglina soluble se pueden detectar en virtualmente cualquier fluido corporal que incluye, pero no se limita a orina, suero, plasma, saliva, fluido amniótico, o fluido cerebroespinal. La invención también prevé un kit de prueba diagnóstica que incluye un ácido nucleico de endoglina soluble que se puede utilizar para detectar y determinar niveles de
25 ácidos nucleicos de endoglina soluble. Un kit que determina una alteración en el nivel de polipéptido de endoglina soluble con relación a una referencia, tal como el

nivel presente en un control normal, es útil como un kit diagnóstico en los métodos de la invención.

Los kit diagnósticos de la invención también pueden incluir anticuerpos o
5 ácidos nucleicos para la detección de polipéptidos sFlt-1, VEGF o PlGF o ácidos nucleicos como se describen en la publicación PCT número WO 2004/008946.

Es deseable, que el kit contenga instrucciones para el uso del kit. En un ejemplo, el kit contiene instrucciones para el uso del kit para el diagnóstico de
10 preeclampsia, eclampsia, o la propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia. En aún otro ejemplo, el kit contiene instrucciones para el uso del kit para monitorear el tratamiento terapéutico o regímenes de dosis.

Ensayos de Selección

15

Como se discutió anteriormente, la expresión de un ácido nucleico de endoglina soluble o polipéptido se incrementa en un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o una propensión a desarrollar tales condiciones. Basados en éstos descubrimientos, las composiciones de la invención son útiles
20 para la selección de bajo costo alto rendimiento de compuestos candidatos para identificar aquellos que modulan la expresión de un polipéptido endoglina soluble o molécula de ácido nucleico cuya expresión se altera en un sujeto que tiene preeclampsia o eclampsia.

25

Cualquier número de métodos están disponibles para llevar a cabo ensayos de selección para identificar nuevos compuestos candidatos que alteran la expresión de una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble. En un ejemplo

de trabajo, los compuestos candidatos se agregan en concentraciones variantes al medio de cultivo de células cultivadas que expresan una secuencia de ácido nucleico de endoglina soluble. Ejemplos de cultivos celulares incluyen trofoblastos (por ejemplo, células BEWO, JAR, y JEG) y HUVEC. Las células que expresan

5 altos niveles de forma de unión de membrana de endoglina se pueden tratar con una proteinasa (por ejemplo, una matriz metaloproteinasa) que cliva el dominio extracelular de endoglina para formar endoglina soluble. Estas células luego se pueden utilizar para selección de nuevos compuestos candidatos. La expresión del gen se mide luego, por ejemplo, por análisis de micro disposición, análisis

10 Northern blot (Ausubel et al., *supra*), o RT-PCR, utilizando cualquier fragmento apropiado preparado a partir de la molécula de ácido nucleico como una sonda de hibridización. El nivel de expresión del gen en la presencia del compuesto candidato se compara con el nivel medido en un medio de cultivo de control que le falta el compuesto candidato. Un compuesto que promueve una reducción en la

15 expresión de endoglina soluble, molécula de ácido nucleico, o polipéptido, o un equivalente funcional de éstos, se considera útil en la invención; tal una molécula se puede utilizar, por ejemplo, como un terapéutico para tratar preeclampsia o eclampsia en un sujeto.

20 En otro ejemplo de trabajo, el efecto de los compuestos candidatos se puede medir en el nivel de la producción de polipéptido utilizando la misma aproximación general y técnicas inmunológicas estándar, tal como western blot o inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para un polipéptido endoglina soluble. Por ejemplo, se pueden utilizar inmunoensayos para detectar o monitorear

25 la expresión de al menos uno de los polipéptidos de la invención en un organismo. Anticuerpos policlonales o monoclonales (producidos como se describió anteriormente) que son capaces de unirse a tal un polipéptido se pueden utilizar

en cualquier formato de inmunoensayo estándar (por ejemplo, ensayo ELISA, western blot, o RIA) para medir en nivel del polipéptido. En algunas modalidades, un compuesto que promueve o se reduce en la expresión o actividad biológica de un polipéptido endoglina soluble se considera particularmente útil. De nuevo, tal una molécula se puede utilizar, por ejemplo, como un terapéutico para retrasar, mejorar, o tratar preeclampsia o eclampsia, o los síntomas de preeclampsia o eclampsia, en un sujeto.

En aún otro ejemplo de trabajo, los compuestos candidatos se pueden seleccionar para aquellos que se unen específicamente a un polipéptido endoglina soluble. La eficacia de tal un compuesto candidato es dependiente de su capacidad para interactuar con tal un polipéptido o un equivalente funcional de éste. Tal una interacción puede ser fácilmente ensayada utilizando cualquier número de técnicas de unión estándar y ensayos funcionales (por ejemplo, aquellos descritos en Ausubel et al., *supra*). En una modalidad, un compuesto candidato se puede ensayar *in vitro* por su capacidad para unir específicamente un polipéptido de la invención. En otra modalidad, un compuesto candidato se ensaya por su capacidad para reducir la actividad biológica de un polipéptido endoglina soluble al reducir la unión de un polipéptido endoglina soluble y un factor de crecimiento, tal como TGF- β , TGF- β 3, activin-A, BMP-2 y BMP-7.

En otro ejemplo de trabajo, se expresa un ácido nucleico de endoglina soluble como una fusión transcripcional o traduccional con un reportero detectable, y expresado en una célula aislada (por ejemplo célula de insecto o mamífero) bajo el control de un promotor heterólogo, tal compuesto un promotor inducible. La célula que expresa la proteína de fusión se pone en contacto luego con un compuesto candidato, y la expresión del reportero detectable en esa célula se

comprara con la expresión del reportero detectable en una célula de control no tratada. Un compuesto candidato que reduce la expresión de un reportero detectable de endoglina soluble es un compuesto que es útil para el tratamiento de preeclampsia o eclampsia. En modalidades preferidas, el compuesto candidato
5 altera la expresión de un gen reportero fusionado a un ácido nucleico o ácido nucleico.

En un ejemplo de trabajo particular, un compuesto candidato que se une un polipéptido endoglina soluble se puede identificar utilizando una técnica basada en
10 cromatografía. Por ejemplo, un polipéptido recombinante de la invención se puede purificar por técnicas estándar a partir de células construidas con ingeniería para expresar el polipéptido (por ejemplo, aquellos descritos anteriormente) y se puede inmovilizar en una columna. Una solución de compuestos candidatos se pasa luego a través de la columna y un compuesto específico para el polipéptido de
15 endoglina soluble se identifica sobre la base de su capacidad para unir al polipéptido y se puede inmovilizar en la columna. Para aislar el compuesto, la columna se lava para remover moléculas unidas no específicamente, y el compuesto de interés se libera luego de la columna y se recolecta. Se pueden utilizar métodos similares para aislar un compuesto unido a una microdisposición
20 de polipéptido. Los compuestos aislados por éste método (o por cualquier otro método apropiado) pueden si se desea, ser purificados adicionalmente (por ejemplo, por cromatografía líquida de alto desempeño). Adicionalmente, éstos compuestos candidatos se pueden ensayar por su capacidad para reducir la actividad de un polipéptido endoglina soluble. Compuestos aislados por ésta
25 aproximación también se pueden utilizar, por ejemplo, como terapéuticos para tratar preeclampsia o eclampsia en un sujeto humano. Compuestos que se identifican como unión a un polipéptido de la invención con una constante afinidad

menor de o igual a 10 mM se considera particularmente útiles en la invención. Alternativamente, cualquier sistema de detección de interacción de proteína *in vivo*, por ejemplo, cualquier ensayo de dos híbridos se puede utilizar para identificar compuestos o proteínas que se unen a un polipéptido de la invención.

5

Antagonistas potenciales incluyen moléculas orgánicas, polipéptidos, péptido miméticos, polipéptidos, ácidos nucleicos, y anticuerpos que se unen a una secuencia de ácido nucleico de endoglina soluble o a un polipéptido de endoglina soluble.

10

Las secuencias de ADN de endoglina soluble también se pueden utilizar en el descubrimiento y desarrollo de un compuesto terapéutico para el tratamiento de preeclampsia o eclampsia. La proteína codificada, luego de expresión, se puede utilizar como un objetivo para selección de drogas. Adicionalmente, las secuencias

15 de ADN que codifican las regiones terminales amino de la proteína codificada o Shine-Delgarno u otra traducción que facilita que las secuencias se puedan aislar por técnicas estándar (Ausubel et al., *supra*).

Opcionalmente, los compuestos identificados en cualquiera de los ensayos

20 descritos anteriormente se pueden confirmar como útiles en un ensayo para compuestos que reducen la actividad biológica de la endoglina soluble.

Moléculas pequeñas de la invención preferiblemente tiene peso molecular por debajo de 2,000 daltons, más preferiblemente entre 300 y 1,000 daltons, y

25 más preferiblemente entre 400 y 700 daltons. Se prefiere que estas moléculas pequeñas sean moléculas orgánicas.

Compuestos de Ensayo y Extractos

En general, los compuestos capaces para reducir la actividad de un polipéptido endoglina soluble se identifican a partir de grandes librerías de extractos sintéticos o productos naturales (o semisintéticos) o librerías químicas o de librerías de ácido nucleico o polipéptido, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Aquellos expertos en el campo del descubrimiento de drogas y desarrollo entenderán que la fuente precisa de extractos de prueba o compuestos no es crítico para el procedimiento de selección de la invención. Los compuestos utilizados en selección pueden incluir compuestos conocidos (por ejemplo, terapéuticos conocidos utilizados para otras enfermedades o trastornos). Alternativamente, virtualmente cualquier número de extractos químicos desconocidos o compuestos se puede seleccionar utilizando los métodos descritos aquí. Ejemplos de tales extractos o compuestos incluyen, pero no están limitados a, extractos de plantas, de hongos, procarióticos o basados en animales, fermentación de retoños, y compuestos sintéticos, así como también modificación de compuestos existentes. También están disponibles numerosos métodos para generar síntesis directa o aleatoria (por ejemplo, síntesis total o semisíntesis) de cualquier número de compuestos químicos, que incluyen, pero no están limitados a, compuestos basados en ácido nucleico, sacarida, lípido, y péptido. Librerías de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente de Brandon Associates (Merrimack, NH) y Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alternativamente, las librerías de compuestos naturales en la forma de extractos de bacterias, de hongos, de plantas, y de animales están disponibles comercialmente de un número de fuentes, que incluyen Biotics (Sussex, UK), Xenova (Slough, UK), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL), y PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA). Adicionalmente, se producen librerías producidas sintética y

naturalmente, si se desea, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por extracción estándar y métodos de fraccionamiento. Adicionalmente, si se desea, cualquier librería de compuestos se modifica fácilmente utilizando métodos de bioquímica, física o química estándar.

5

Adicionalmente, aquellos expertos en la técnica de descubrimiento y desarrollo de drogas entienden fácilmente que los métodos para desreplicación (por ejemplo, desreplicación taxonómica, desreplicación biológica, y desreplicación química, o cualquier combinación de estos) o la eliminación de replicas o repeticiones de materiales ya conocidos por su actividad de interrupción de muda se deben emplear siempre que sea posible.

10 Cuando se encuentra un extracto crudo para reducir la actividad de un polipéptido de endoglina soluble, o para unir a un polipéptido de endoglina soluble, la fraccionamiento adicional del extracto líder positivo es necesario para aislar
15 constituyentes químicos responsables del efecto observado. Así, la meta del proceso de extracción, fraccionamiento, y purificación es la caracterización cuidadosa e identificación de una entidad química dentro del extracto crudo que reduce la actividad de un polipéptido de endoglina soluble. Métodos de
20 fraccionamiento y purificación de tales extractos heterogéneos se conocen en la técnica. Si se desea, los compuestos mostrados por ser útiles como terapéuticos para el tratamiento de preeclampsia o eclampsia humana se modifican químicamente de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

25 **Terapéuticos**

La presente invención caracteriza métodos y composiciones para tratar o evitar preeclampsia o eclampsia en un sujeto. Dado que los niveles de endoglina soluble se incrementan en sujetos que tienen preeclampsia, eclampsia, o que tienen una propensión a desarrollar tales condiciones, cualquier agente que reduce la expresión de los niveles y/o actividad biológica de un polipéptido de endoglina soluble o molécula de ácido nucleico es útil en los métodos de la invención. Tales agentes incluyen compuestos tales como TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, o BMP7, que pueden interrumpir la unión de endoglina soluble a los ligandos; un anticuerpo purificado o fragmento de unión a antígeno que une específicamente la endoglina soluble; oligómeros núcleo base antisentido; y dsARN utilizados para mediar la interferencia de ARN. Compuestos adicionales útiles pueden alterar la actividad biológica de la endoglina soluble, por ejemplo, según se mide por el ensayo de angiogénesis. Estos métodos de ensayo se describen en detalle adelante. Estos métodos también se pueden combinar con métodos para reducir los niveles sFlt-1 o para incrementar los niveles VEGF o PLGF o reducir los niveles sFlt-1 como se describe en la publicación PCT número WO 2004/008946 y la publicación de patente estadounidense número 20040126828.

20 Terapéuticos que objetivan la ruta de señalización TGF- β

El TGF- β es el prototipo de una familia de al menos 25 factores de crecimiento que regulan el crecimiento, diferenciación, motilidad, remodelación de tejido, neurogénesis, reparación de heridas, apoptosis, y angiogénesis en muchos tipos celulares. El TGF- β también inhibe la proliferación celular en muchos tipos de células y puede estimular la síntesis de proteínas matriz. A menos que se evidencie a partir del contexto en el que este se usa, el término TGF- β como se

utiliza a través de esta especificación se entenderá que se refiere generalmente a miembros de la súper familia TGF- β según sea apropiado. Endoglinas solubles que unen varios miembros específicos de la familia TGF- β incluyen TGF- β 1, TGF- β 3, activin, BMP-2 y BMP-7, y pueden servir para agotar el desarrollo del feto o la placenta de estos factores mitogénicos y angiogénicos necesarios. La presente invención caracteriza métodos para incrementar los niveles de estos ligandos para unirse a una endoglina soluble y para neutralizar los efectos de endoglina soluble.

Proteínas Purificadas

10

En una modalidad preferida de la presente invención formas purificadas de cualquier ligando de endoglina soluble tal como proteínas de la familia TGF- β que incluyen pero no se limitan a TGF- β 1, TGF- β 3, activin – A, BMP2 y BMP7, se administran al sujeto con el fin de tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia.

15

Proteínas de la familia TGF- β purificados incluyen cualquier proteína con una secuencia de aminoácido que es homóloga, más deseablemente, sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácido del TGF- β 1 o TGF- β 3, o cualquier miembro de la familia TGF- β conocido, que puede inducir angiogénesis.

20 Ejemplos no limitantes incluyen TGF- β 1 humano (Cat#240-B-002) y TGF- β 3 humano (Cat#243-B3-002) de R&D systems , MN.

Compuestos terapéuticos que inhiben el clivaje proteolítico de endoglina

25

Hemos identificado un sitio de clivaje potencial en el dominio extra celular de la endoglina en donde una enzima proteolítica puede clivar la forma de unión de membrana de la endoglina, liberando el dominio extra celular como una forma

soluble. Nuestras alineaciones de secuencia del sitio de clivaje sugieren que una metalo proteinaza de matriz (MMP) puede ser responsable del clivaje y liberación de endoglina soluble. Alternativamente, una catepsina o una elastasa también se pueden involucrar en el evento de clivaje. El MMP también se conoce como

5 colagenasa, gelatinasa, y estromelinas y actualmente existen 26 miembros de familia conocidos (para una revisión ver Whittaker and Ayscough, Cell Transmissions 17:1, que se puede obtener del siguiente sitio web: www.sigma-aldrich.com/cellsignalling). Un MMP preferido es MMP9 que se conoce por ser regulado positivamente en placentas a partir de pacientes preeclámpticos (Lim et,

10 al., Am. J. Pathol. 151:1809-1818, 1997). La actividad del MMP se controla a través de la activación de proenzimas e inhibición por inhibidores endógenos tales como inhibidores de tejido de metaloproteinazas (TIMPS). Los inhibidores de MMP son proteínas de unión de zinc. Existen 4 inhibidores endógenos conocidos (TIMP1-4), que se revisan en Whittaker et al., Supra. Adicionalmente, una

15 variedad de inhibidores MMP sintéticos y de ocurrencia natural se han identificado y también se revisan en Whittaker et al., Supra. Ejemplos incluyen anticuerpos dirigidos a MMP, y varios compuestos incluyen BB-2516, BB-94, CT1746, BAY 12-9566, AG3340, CGS-27023A, D2163, y Ro32-3555, algunos de los cuales están actualmente en ensayos clínicos. Dado el papel potencial del MMP, las

20 catepsinas, o elastasas en la liberación y regulación positiva de los niveles de endoglina soluble, la presente invención también prevé el uso de cualquier compuesto, tal como aquellos descritos anteriormente, conocidos por inhibir la actividad de cualquier MMP, catepsina, o elastasa involucrada en el clivaje y liberación de la endoglina soluble, para el tratamiento o prevención de

25 preeclampsia o eclampsia en un sujeto.

Compuestos terapéuticos que incrementan las proteínas de unión de endoglina soluble.

La presente invención prevé el uso de cualquier compuesto conocido por
5 estimular o incrementar los niveles de suero sanguíneo de proteínas de unión de endoglina soluble, que incluyen pero no se limitan a, TGF- β 1, TGF- β 3, activin – A, BMP2 y BMP7, para el tratamiento o prevención de preeclampsia en un sujeto. Estos compuestos se pueden utilizar solos o en combinación con las proteínas purificadas descritas anteriormente o cualquiera de los otros métodos utilizados
10 para incrementar los niveles de proteína de las proteínas de la familia TGF- β descritas aquí. En un ejemplo, la ciclosporina se utiliza para estimular la producción de TGF- β 1, en una dosis de 100-200 mg dos veces al día.

Adicionalmente al uso de los compuestos que pueden incrementar los
15 niveles de suero de proteínas de unión de endoglina soluble, la invención prevé el uso de cualquier medicación de hipertensión crónica utilizado en combinación con cualquiera de los métodos terapéuticos descritos aquí. Las medicaciones utilizadas para el tratamiento durante la hipertensión durante preñez incluyen metildopa, clorhidrato de hibralizina, o labetalol. Para cada una de estas
20 medicaciones, modos de administración y dosis se determinan por el médico y las instrucciones del fabricante.

Compuestos terapéuticos que alteran la actividad anti-angiogénica de la endoglina soluble

25

Los compuestos terapéuticos adicionales se pueden identificar utilizando ensayos de angiogénesis. Por ejemplo, el suero preecláptico agregado a un

ensayo de formación de tubo matrigel inducirá un estado antiangiogénico. Los compuestos de ensayo se pueden luego agregar al ensayo y una revisión en el estado antiangiogénico por 10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más indica que el compuesto puede reducir la actividad biológica de la endogлина soluble y es útil como un compuesto terapéutico.

Ácidos Nucleicos Terapéuticos

Un trabajo reciente ha mostrado que el suministro de ácido nucleico (ADN o ARN) capaz de expresar un mitógeno de célula endotelial tal como VEGF al sitio de una aleación de vaso sanguíneo inducirá la proliferación y reendotelización del vaso lesionado. Mientras que la presente invención no se relaciona con lesiones de vasos sanguíneos, estas técnicas generales para el suministro de ácido nucleico a las células endoteliales se puede utilizar en la presente invención para el suministro de ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión de endogлина soluble, tal como TGF- β 1, TGF- β 3, activin – A, BMP2 y BMP7. Estas técnicas generales se describen en la patente estadounidense número 5, 830, 879 y 6, 258, 787 y se incorporan aquí como referencia.

En la presente invención el ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico (ADN o ARN) que incluyen ADN genómico, cADN, o mARN, que codifican una proteína de unión de endogлина soluble tal como TGF- β 1, TGF- β 3, activin – A, BMP2 y BMP7. Los ácidos nucleicos que codifican la proteína deseada se pueden obtener utilizando procedimientos de rutina en la técnica, por ejemplo, amplificación PCR, ADN recombinante.

Modos de suministrar ácidos nucleicos

Para cualquiera de las aplicaciones de ácido nucleico descritas aquí, los métodos estándar para administrar ácidos nucleicos se pueden utilizar. Por ejemplo, para simplificar la manipulación y manejo de los ácidos nucleicos que

5 codifican la proteína de unión de endoglina soluble, el ácido nucleico se inserta preferiblemente en un cassette en donde éste se liga operablemente a un promotor. El promotor debe ser capaz de controlar la expresión de la proteína de unión de endoglina soluble en las células huésped objetivo deseada. La selección de los promotores apropiados se puede lograr fácilmente. Preferiblemente, uno

10 podría utilizar un promotor de alta expresión. Un ejemplo de un promotor adecuado es el promotor citomegalovirus (CMV) de par base 763. El virus de sarcoma de Rous (RSV) (Davis, et al., *Hum. Gene Ther.* 4:151-159, 1993) y promotores de virus de tumor de mama de ratón (MMTV) también se pueden utilizar. Ciertas proteínas se pueden expresar utilizando su promotor nativo. Otros

15 elementos que pueden mejorar la expresión también se pueden incluir (por ejemplo, mejoradores o un sistema que resulta en altos niveles de expresión tal como un gen tat y un elemento tar). El vector recombinante puede ser un vector de plásmido tal como el pUC 118, pBR322, u otros vectores de plásmido conocidos, que incluyen, por ejemplo, un origen de *E. coli* de replicación (ver, Sambrook, et

20 al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989). El vector de plásmido también puede incluir un marcador seleccionable tal como el gen β lactamasa para resistencia a la ampicilina, dado que el polipéptido marcador no afecta adversamente el metabolismo del organismo a ser tratado. El cassette también se puede unir a una porción de unión de ácido nucleico en un

25 sistema de suministro sintético, tal como el sistema descrito en la Publicación PCT No. WO95/22618. El ácido nucleico se puede introducir en las células por cualquier medio apropiado para el vector empleado. Muchos de tales métodos son

bien conocidos en la técnica (Sambrook et al., *supra*, y Watson et al., "ADN Recombinante", Capítulo 12, 2ª edición, Scientific American Books, 1992). Los vectores de expresión se pueden transferir por métodos tales como precipitación del fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por liposoma, pistola de genes, microinyección, transferencia mediana por cápsido vírico, transferencia mediada por polibreno, o fusión de protoplasto. Para una revisión de los procedimientos para la preparación de liposoma, objetivo y suministro de contenidos, ver Mannino y Gould-Fogerite, (*Bio Techniques*, 6:682- 690, 1988), Feigner and Holm, (*Bethesda Res. Lab. Focus*, 11:21, 1989) y Maurer (*Bethesda Res. Lab. Focus*, 11 :25, 1989).

La transferencia del vector recombinante (ya sea vector de plásmido o vectores virales) se puede lograr a través de inyección directa en el fluido amniótico o suministro intravenoso.

15

El suministro de gen que utiliza vectores adenovirales o vectores adeno-asociados (AAV) también se puede utilizar. Los adenovirus están presentes en un gran número de especies animales, no son muy patogénicos, y pueden replicar igualmente bien en células de división y quiescentes. Como una regla general, los adenovirus utilizados para el suministro de gen les falta uno o más genes requeridos para replicación viral. Los vectores adenovirales recombinantes defectuosos de replicación utilizados para el suministro de una proteína de unión de endoglina soluble, se pueden producir de acuerdo con técnicas conocidas en el arte (ver Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584, 1992; Stratford-Perricadet et al., *J. Clin. Invest.*, 90:626-630, 1992; and Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155, 1992). Por un ejemplo del uso de la terapia de gen *in utero* ver Patente Estadounidense No. 6,399,585.

25

Una vez transferido, el ácido nucleico se expresa por las células en el sitio de lesión durante un periodo de tiempo suficiente para incrementar los niveles de suero sanguíneo de una proteína de unión de endoglina soluble. Debido a que los factores que contiene el ácido nucleico no se incorporan normalmente en el genoma de las células, la expresión de la proteína de interés tiene lugar sólo durante un tiempo limitado. Típicamente, la proteína se expresa en niveles terapéuticos durante aproximadamente dos días a varias semanas, preferiblemente de aproximadamente una a dos semanas. La replicación del ADN se puede utilizar para suministrar periodos adicionales de expresión de la proteína terapéutica.

Ácidos nucleicos terapéuticos que inhiben la expresión de endoglina soluble.

La presente invención también caracteriza el uso de oligómeros nucleobase antisentido para regular negativamente la expresión de mRNA de endoglina soluble directamente. Al unir a la secuencia de ácido nucleico complementaria (la hélice de codificación o sentido) los oligómeros de nucleobase antisentido son capaces de inhibir la expresión de proteína presumiblemente a través del clivaje enzimático de la hélice de ARN por ARNasa H. Preferiblemente el oligómero nucleobase antisentido es capaz de reducir la expresión de proteína de endoglina soluble en una células que expresa niveles incrementados de endoglina soluble. Preferiblemente la reducción de expresión de proteína de endoglina soluble es al menos 10% con relación a las células tratadas con un oligonucleótido de control, más preferiblemente 25%, y más preferiblemente 50% o más. Los métodos para seleccionar y preparar oligómeros nucleobase antisentido son bien conocidos en la técnica. Para un ejemplo del uso de oligómeros de nucleobase antisentido para

regular negativamente la expresión VEGF ver Patente Estadounidense No. 6,410,322, incorporada aquí como referencia. Métodos para ensayar niveles de expresión de proteína también son bien conocidos en la técnica e incluyen western blot, inmunoprecipitación, y ELISA.

5

La presente invención también caracteriza el uso de la interferencia ARN (ARNi) para inhibir la expresión de endoglina soluble. La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo recientemente descubierto de silenciamiento de gen post-transcripcional (PTGS) en el que el ARN de doble hélice (dsARN) que
10 corresponde a un gen o mRNA de interés se introduce en un organismo resultando en la degradación del mRNA correspondiente. En la reacción ARNi, las hélices de sentido y antisentido de la molécula dsARN se procesan en fragmentos ARN pequeños o segmentos que varían en longitud de 21 a 23 nucleótidos (nt) y que tienen colas 3' 2-nucleótido. Alternativamente, el dsARN sintético, que es de
15 21 a 23 nt de longitud y tiene colas 3' 2-nucleótido se pueden sintetizar, purificar y utilizar en la reacción. Estos 21 a 23 nt dsARN se conocen como "guías ARN" o "ARN de interferencia corta" (siARN).

Los dúplex de siARN se unen luego a un complejo nucleasa compuesto de
20 proteínas que objetivan y destruyen mRNA endógeno que tienen homología con el siARN dentro del complejo. Aunque la identidad de las proteínas dentro del complejo permanece no clara, la función del complejo es objetivar la molécula de RN homóloga a través de las interacciones de pares base entre una hélice de siARN y el mRNA endógeno. El mRNA se cliva luego aproximadamente 12 nt el
25 terminal 3' del siARN y se degrada. De ésta forma, los genes específicos se pueden objetivar y degradar, resultando por lo tanto en una pérdida de expresión de proteína del gen objetivado. El diARN también se puede sintetizar

químicamente o obtener a partir de una compañía que sintetiza químicamente el siARN (por ejemplo, Dharmacon Research Inc., Farmacia, o ABI).

Los requerimientos específicos y modificaciones de dsARN se describen en la Publicación PCT No. WO01/75164 (incorporada aquí como referencia). Mientras que las moléculas dsARN pueden variar en longitud, es más preferible utilizar moléculas de siARN que son de 21- a 23- nucleótidos dsARN con los extremos salientes 3' de 2- a 3- nucleótidos característicos típicamente (2'-deoxi)timidina o uracilo. El siARN comprende típicamente un grupo hidroxilo 3'. La hebra sencilla del siARN así como también las formas de extremo romas del dsARN también se pueden utilizar. Con el fin de mejorar adicionalmente la estabilidad del ARN, las salientes 3' se pueden estabilizar contra degradación. En una de tales modalidades, el ARN se estabiliza al incluir nucleótidos purina, tal como adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de los nucleótidos pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, sustitución de salientes de 2- nucleótido uridino por (2'-deoxi)timida se tolera y no afecta la eficiencia del ARNi. La ausencia de un grupo 2' hidroxilo mejora significativamente la resistencia de la nucleasa de la saliente en el medio de cultivo de tejido.

Alternativamente el siARN se puede preparar utilizando cualquiera de los métodos establecidos en la Publicación PCT No. WO01/75164 (incorporada aquí como referencia) o utilizando procedimientos estándar para transcripción in vitro de ARN y dsARN que anulan procedimientos como se describe en Elbashir et al. (*Genes & Dev.*, 15:188- 200, 2001). El siARN también se obtiene como se describe en Elbashir et al., por incubación de dsARN que corresponde a un secuencia del gen objetivo en un lisato *Drosophila* libre de células, de embriones *Drosophila* de blastodermo sincitial bajo condiciones en la que el dsARN se

procesa para generar siARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos, que luego se aíslan utilizando técnicas conocidas por aquellos expertos en la arte. Por ejemplo, se puede utilizar electroforesis de gel para separar el 21-23 nt ARN y el ARN se diluye de tajadas de gel. Adicionalmente, la
5 cromatografía (por ejemplo, cromatografía de exclusión de tamaño), centrifugación de gradiente de glicerol, y purificación por afinidad, con anticuerpo se pueden utilizar para aislar el ARN 21 a 23 nt.

Una variedad de métodos están disponibles para transfección, o
10 introducción de dsARN u oligonucleótidos en células de mamífero. Por ejemplo, existen varios reactivos de transfección disponibles comercialmente que incluyen pero no se limitan a: TransIT-TKO™ (Mirus, Cat. # MIR 2150), Transmessenger™ (Qiagen, Cat. # 301525), y Oligofectamine™ (Invitrogen, Cat. # MIR 12252-011). Protocolos para cada reactivo de transfección están disponibles del fabricante.

15

En la presente invención, el dsARN, o siARN, es complementario con la secuencia mRNA de mRNA de endoglina soluble y puede reducir o inhibir la expresión de la endoglina soluble. Preferiblemente, la reducción en la expresión de proteína de endoglina soluble es al menos 10% con relación a células tratadas
20 con un control dsARN o siARN, más preferiblemente 25%, y más preferiblemente al menos 50%. Métodos para ensayar niveles de expresión de proteína también son bien conocidos en la técnica e incluyen western blot, inmunoprecipitación, y ELISA.

25 En la presente invención, los ácidos nucleicos utilizados incluyen cualquier modificación que mejore la estabilidad o función del ácido nucleico en cualquier

forma. Ejemplo, incluyen modificaciones a la estructura del fosfato, que incluyen enlace, o la porción azúcar.

Ensayos para expresión de proteína y gen

5

Los siguientes métodos se pueden utilizar para evaluar la expresión de gen o proteína y determinar la eficacia de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para incrementar los niveles de proteína de unión de endogлина soluble, o para reducir los niveles de proteína de endogлина soluble.

10

El suero sanguíneo del sujeto se mide para niveles de endogлина soluble, utilizando métodos tales como ELISA; Western blotting, o inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos. El suero sanguíneo del sujeto también se puede medir para niveles de TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP2, BMP7, o cualquier

15 ligando de proteína conocido por unirse a la endogлина soluble. Los métodos utilizados para medir niveles de suero de proteínas incluyen ELISA; Western blotting, o inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos. Adicionalmente, los ensayos de angiogénesis in Vitro se pueden desarrollar para determinar si la sangre del sujeto se ha convertido de un estado antiangiogénico a un estado

20 proangiogénico. Tales ensayos se describen anteriormente en el ejemplo 4. Un resultado positivo se considera un incremento de al menos 20%, preferiblemente 30%, más preferiblemente al menos 50%, y más preferiblemente al menos 60% en los niveles de suero de TGF- β 1, TGF- β 3, Activin-A, BMP2, BMP7, o cualquier

25 ligando de proteína conocido por unirse a la endogлина soluble. Un resultado positivo también se puede considerar la conversión de un estado antiangiogénico a un estado proangiogénico utilizando el ensayo de angiogénesis in Vitro.

Las muestras de suero sanguíneo del sujeto también se pueden medir para niveles de TGF- β 1, TGF- β 3, Activin-A, BMP2, BMP7, o niveles de ácido nucleico de endoglina soluble. Existen varios métodos conocidos para ensayar la expresión de gen. Algunos ejemplos incluyen la preparación del ARN a partir de muestras de sangre del sujeto y el uso del ARN para northern blotting, amplificación basada en PCR, o ensayos de protección ARNasa.

Uso de anticuerpos para el tratamiento terapéutico

Los niveles elevados de endoglina soluble hallados en las muestras de suero tomadas de mujeres preñadas que sufren de preeclampsia sugiere que la endoglina soluble está actuando como un "sumidero fisiológico" para unirse a las células trofoblastos y células endoteliales maternas de factores de crecimiento funcionales requeridas para el desarrollo angiogénesis del feto o la placenta. El uso de los compuestos, tales como anticuerpos para unirse a endoglina soluble y neutralizar la actividad de la endoglina soluble (por ejemplo unión a TGF- β 1, TGF- β 3, Activin-A, BMP2, BMP7) pueden ayudar a evitar o tratar preeclampsia o eclampsia, al producir un incremento en TGF- β 1, TGF- β 3, Activin-A, BMP2, BMP7. Tal incremento permitiría un aumento en la proliferación de trofoblastos, migración y angiogénesis requerida para desarrollo placentario y alimentación fetal, y para muerte celular endotelial materna sistémica.

La presente invención suministra anticuerpos que unen específicamente el dominio de unión de ligando de la endoglina soluble. Los anticuerpos se utilizan para neutralizar la actividad de la endoglina soluble y el mecanismo más efectivo se cree está a través del bloqueo directo de los sitios de unión para el TGF- β 1, TGF- β 3, Activin-A, BMP2, BMP7, sin embargo, otros mecanismos no se pueden

eliminar. Métodos para la preparación y uso de los anticuerpos para propósitos terapéuticos se describen en varias patentes que incluyen las patentes Estadounidenses números 6, 054,297; 5, 821, 337; 6, 365, 157; y 6, 185,464 que se incorporan aquí como referencia. Los anticuerpos pueden ser policlonales o
5 monoclonales; se prefieren los anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos monoclonales, particularmente aquellos derivados de roedores que incluyen ratones, se han utilizado para el tratamiento de varias enfermedades; sin embargo, existen limitaciones a su uso e incluyen la inducción de una
10 respuesta de inmunoglobulina antiratón humana que origina rápida claridad y una reducción en la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, una limitación mayor en el uso clínico de anticuerpos monoclonales de roedor es una respuesta antiglobulina durante terapia (Mollet et al., Blood, 62:988-995 1983; Schroff et al., Cancer Res., 45:879-885, 1985).

15

La técnica ha intentado superar este problema al construir anticuerpos "quiméricos" en el que un dominio variable de unión a antígeno animal se acopla con un dominio constante humano (patente Estadounidense número 4, 816, 567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Boulianne et al.,
20 Nature, 312:643-646, 1984; Neuberger et al., Nature, 314:268-270, 1985): La producción y uso de tales anticuerpos quiméricos se describe adelante.

La inhibición competitiva de ligando que se une a endoglina soluble es útil para la prevención o tratamiento de preeclampsia o eclampsia. Tal un incremento
25 puede resultar en un rescate de la disfunción endotelial y un cambio en el balance de los factores proangiogénicos / antiangiogénicos hacia la angiogénesis.

Un cóctel de anticuerpos monoclonales de la presente invención se puede utilizar como un tratamiento efectivo para la preeclampsia o eclampsia. El cóctel puede incluir tampoco como dos, tres, o cuatro anticuerpos diferentes o tantos como seis, ocho, o diez anticuerpos diferentes. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención se pueden combinar con una droga antihipertensiva (por ejemplo, metildopa, clorhidrato de hidralacina, o labetalol) o cualquier otra medicación utilizada para tratar preeclampsia, eclampsia o los síntomas asociados con preeclampsia o eclampsia.

10 Preparación de Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor sFlt-1 se pueden producir por métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen el método inmunológico descrito por Kohler and Milstein (Nature, 15 256:495-497, 1975) y Campbell ("Monoclonal Antibody Technology, The production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" in Burdon et al., Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985), así como también por el método de ADN recombinante descrito por Huse et al., (Science, 246, 1275-1281, 20 1989).

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar a partir de súper nadantes de células de de hibridoma cultivadas o de ascitos inducidos partícula inoculación intraperitoneal de células de hibridoma en ratones. La técnica de 25 hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Eur. J. Immunol, 6, 511-519, 1976) se ha aplicado ampliamente para producir líneas de células híbridas que

secretan altos niveles de anticuerpos monoclonales contra muchos antígenos específicos.

La ruta y programa de inmunización del animal huésped o células de
5 producción de anticuerpo cultivadas de este se mantienen generalmente con
técnicas convencionales y establecidas para estimulación y producción de
anticuerpo. Típicamente, se utilizan ratones como modelo de ensayo, sin
embargo, cualquier sujeto mamífero que incluye sujetos humanos o células que
10 producen anticuerpos de estos se pueden manipular de acuerdo con el proceso de
esta invención para servir como la base para la producción de mamífero, que
incluye líneas celulares híbridas, de humano.

Después de inmunización, las células linfoides humanas se fusionan con
células de mieloma para generar una línea celular híbrida que se puede cultivar y
15 subcultivar indefinidamente, para producir grandes cantidades de anticuerpos
monoclonales. Para propósitos de esta invención, las células linfoides inmunes
seleccionadas para fusión son linfocitos y su progenie diferenciada normal,
tomada del tejido de nodo linfático o tejido del bazo de animales inmunizados. El
uso de células de bazo se prefiere, en razón a que ellas ofrecen una fuente
20 conveniente y más concentrada de células que producen anticuerpos con respecto
al sistema del ratón. Las células mieloma suministran la base para propagación
continua del híbrido fusionado. Las células de mieloma son células de tumor
derivadas de células de plasma. Las líneas de células de mieloma se puede
obtener, por ejemplo, del American Type Culture Collection (ATCC; Manassas,
25 VA). Líneas de células hetero Mieloma de ratón – humano y mieloma humano
también se han descrito (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).

Se puede mantener líneas celulares híbridas in Vitro en medio de cultivo celular. Una vez la línea celular de hibridoma se establece, esta se puede mantener en una variedad de medios nutricionalmente adecuados tal como medio hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT). Más aún, las líneas celulares híbridas se pueden almacenar y preservar en cualquier número de formas convencionales, que incluyen congelamiento y almacenamiento bajo nitrógeno líquido. Las líneas celulares congeladas se pueden revivir y cultivar indefinidamente con secreción y síntesis resumida del anticuerpo monoclonal. El anticuerpo secretado se recupera del supernadante de cultivo de tejido por métodos convencionales tales como precipitación, cromatografía de intercambio de ión, cromatografía de afinidad o similar.

15

El anticuerpo se puede preparar en cualquier mamífero, que incluye ratones, ratas, cabras y humanos. El anticuerpo puede ser un miembro de una de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, y las subclases de estos, y preferiblemente es un anticuerpo IgG.

20

Mientras el animal preferido para producir anticuerpos monoclonales es el ratón, la invención no se limita a eso; de hecho se pueden utilizar anticuerpos humanos y puede probar ser preferible. Tales anticuerpos se pueden obtener al utilizar hibridomas humanos (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss Inc., P. 77-96, 1985). En la presente invención, técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos al dividir los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto

25

con los genes de una molécula de anticuerpo humano se pueden utilizar (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); tales anticuerpos están dentro del alcance de esta invención y se describen adelante.

5

Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, células B inmortalizadas del virus Epstein Barr (EBV) se utilizan para producir los anticuerpos monoclonales de la presente invención (Crawford D. et al., J. of Gen. Virol., 64:697-700, 1983; Kozbor y Roder, J. Immunol; 4:1275-1280, 1981; Kozbor et al., Methods in
10 Enzymology, 121: 120-140, 1986). En general, el procedimiento consiste en aislar el virus Epstein – Barr de una fuente adecuada, generalmente una línea celular infectada, y exponer las células secretoras de anticuerpo objetivo a súper nadantes que contienen el virus. Las células se lavan, se cultivan , en un medio de cultivo celular apropiado. Posteriormente, las células transformadas viralmente
15 presentes en el cultivo celular se pueden identificar por la presencia de antígeno nuclear viral Epstein Barr, y células secretoras de anticuerpo transformadas también identificadas utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Otros métodos para producir anticuerpos monoclonales, tal como ADN recombinante también se incluyen dentro del alcance de la invención.

20

Preparación de inmunógenos de endoglina soluble

La endoglina soluble se puede utilizar por si misma como un inmunógeno, o se puede unir a una proteína portadora o a otros objetos, tal como glóbulos de
25 sefrosa. La endoglina soluble se puede purificar a partir de células conocidas para expresar la proteína endógena tal como células endoteliales de vena umbilical humana (trofoblastos o HUVEC; Burrows et al., Clin. Cancer Res.

1:1623-1634, 1995; Fonsatti et al., *Clin. Cancer Res.* 6:2037-2043, 2000). Las células que expresan endoglina de unión de membrana se pueden tratar con una enzima proteolítica (por ejemplo matriz metaloproteinasa) para clivar el dominio extracelular, produciendo por lo tanto la forma soluble. Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico que codifica la endoglina soluble. O porciones de ésta, se pueden insertar en vectores conocidos para expresión en células huésped utilizando técnicas de ADN recombinante estándar. Las células huésped adecuadas para expresión de endoglina soluble incluyen células de baculovirus (por ejemplo, células Sf9), células bacterianas, (por ejemplo, *E. coli*), y células de mamífero (por ejemplo células NIH3T3).

Adicionalmente los péptidos se pueden sintetizar y utilizar como inmunógenos. Los métodos para elaborar anticuerpos para péptidos son bien conocidos en la técnica y requieren generalmente acoplar el péptido a una molécula portadora adecuada, tal como albúmina de suero. Los péptidos incluyen cualquier secuencia de aminoácido que es sustancialmente idéntica a cualquier parte de a secuencia de aminoácido de endoglina soluble que corresponde a los números de acceso del GenBank AAH29080 y NP_031958 (ratón); AAS67893 (rata); NP_000109, P17813, VSP_004233, y CAA80673 (humano); y A49722 (pig). Los péptidos pueden ser de cualquier longitud, preferiblemente 10 aminoácidos o más, mas preferiblemente 25 aminoácidos o más, y mas preferiblemente 40, 50, 60, 70, 80, o 100 aminoácidos o más. Preferiblemente, la secuencia de aminoácido es de al menos 60%, más preferiblemente 85%, y, más preferiblemente 95% idéntica a la secuencia de cualquiera de las secuencias de endoglina humana. Los péptidos se pueden obtener comercialmente o hacer utilizando técnicas bien conocidas en el arte, tal como, por ejemplo, el método de fase sólida Merrifield (*Science*, 232:341-347, 1985). El procedimiento puede

utilizar sintetizadores disponibles comercialmente tal como una máquina de péptido automatizado Biosearch 9500, con clivaje de aminoácidos bloqueados que se logra con fluoruro de hidrógeno, y los péptidos purificados por HPLC preparativo que utiliza un instrumento Waters Delta Prep 3000, en una columna de 5 15-20 µm Vydac C4 PrepPAK column.

Equivalentes funcionales de anticuerpos

La invención también incluye equivalentes funcionales de los anticuerpos descritos en ésta especificación. Los equivalentes funcionales incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a la secuencia de aminoácido de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos de la invención. Equivalentes funcionales tiene características de unión comparables con aquellos de los anticuerpos, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla y humanizada, quimerizada, así como también fragmentos de éstos. Los métodos para producir tales equivalentes funcionales se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT No. WO93/21319; Solicitud de Patente Europea No. 239,400; Publicación PCT No. WO89/09622; Solicitud de Patente Europea No. 338,745; Solicitud de Patente Europea No. 332424; y Patente Estadounidense No. 4,816,567; cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia.

Los anticuerpos quimerizados tienen preferiblemente regiones constantes derivadas sustancialmente o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpo humano y regiones variables derivadas sustancialmente o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero diferente de un humano. Tales anticuerpo humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de

inmunoglobulina o fragmentos de éstos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada inmunoglobulina no humana. Métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica (para revisión ver Vaswani y Hamilton, 5 *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 81: 105- 119, 1998 y Carter, *Nature Reviews Cancer*, 1:118-129, 2001). Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en éste desde una fuente que no es humana. Esos residuos de aminoácido no humano a menudo se refieren como residuos de importación, que se forman típicamente desde un dominio variable de 10 importación. La humanización puede ser desarrollada esencialmente siguiendo los métodos conocidos en la técnica (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988; y Verhoeven et al., *Science*, 239:1534- 1536 1988), al sustituir CDR de roedor u otras secuencias CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, 15 tales anticuerpo humanizados son anticuerpos quiméricos en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por a secuencia correspondiente de una especie no humana (ver por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567). En la práctica, los anticuerpos humanizados, son anticuerpos típicamente humanos en los que algunos residuos 20 CDR y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores (Presta, *Curr. Op. Struct. Biol*, 2:593-596, 1992).

Los métodos adicionales para la preparación de anticuerpos humanizados 25 se pueden encontrar en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,821,337, y 6,054,297, y Carter, (*supra*) que se incorporan todas aquí como referencia. El anticuerpo humanizado se selecciona de cualquier clase de inmunoglobulinas, que

incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Donde la actividad citotóxica no es necesaria, tal como en la presente invención, el dominio constante es preferiblemente de la clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y
5 seleccionar dominios constantes particulares par optimizar efectoras deseadas está dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el arte, que incluyen librerías de exhibición de fago (Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991 y Winter et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:433-455, 10 1994). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también son útiles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *supra*; Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86-95, 1991).

15 Mamíferos adecuados diferentes de un humano incluyen cualquier mamífero del que se puedan hacer anticuerpos monoclonales. Ejemplos de mamíferos diferentes de un humano incluyen, por ejemplo, un conejo, rata, ratón, caballo, cabra, o primate; se prefiere un ratón.

20 Equivalentes funcionales de anticuerpos también incluyen fragmentos de anticuerpo de cadena única, también conocidos como fragmentos de cadena única (scFvs). Los fragmentos de anticuerpo de cadena única con polipéptidos recombinantes que unen típicamente antígenos o reporteros; fragmentos de estos contienen al menos un fragmento de una secuencia de aminoácido de cadena
25 pesada de anticuerpo variable (V_H) atada a al menos un fragmento de una secuencia de cadena liviana de anticuerpo variable (V_L) con o sin uno o más de los ligadores de interconexión. Tal un ligador puede ser un péptido flexible, corto

seleccionado para asegurar que el pliegue tri-dimensional apropiado para los dominios V_L y V_H ocurre una vez ellos se ligan para mantener la especificidad de unión de molécula objetivo del anticuerpo completo del cual se deriva el fragmento de anticuerpo de cadena única. Generalmente, el terminal carboxilo de la

5 secuencia V_L o V_H se liga covalentemente mediante tal un ligador de péptido al terminal aminoácido de una secuencia V_L y V_H complementaria. Fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla se pueden generar mediante clonación molecular, técnicas de librería de exhibición de fago de anticuerpo o similares. Estas proteínas se pueden producir en células eucarióticas o procarióticas, que incluyen

10 bacterias.

Los fragmentos de anticuerpo de cadena única que contienen secuencias de aminoácido que tienen al menos una de las regiones variables o CDR de los anticuerpos completos descritos en ésta especificación, sino que también les falta

15 algunos o todos de los dominios constantes de éstos anticuerpos. Estos dominios constantes no necesariamente son para unión a antígeno, sino que constituyen una mayor porción de la estructura de los anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpo de cadena única pueden por lo tanto superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos que contienen parte o todo de un

20 dominio constante. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo de cadena única tienden a ser libres de interacciones indeseadas entre moléculas biológicas y región constante de cadena pesada, u otra actividad biológica no deseada. Adicionalmente, los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden por lo

25 tanto tener mayor permeabilidad capilar que los anticuerpos completos, permitiendo a los fragmentos de anticuerpo de cadena única localizar y unirse a sitios de unión de antígeno más eficientemente. También, los fragmentos de

anticuerpo se pueden producir en una relativamente gran escala en células procarióticas, facilitando así su producción. Adicionalmente, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla los hacen menos similares que los anticuerpos completos para provocar una
5 respuesta inmune en un paciente.

Equivalentes funcionales adicionales incluyen fragmentos de anticuerpos que tienen la misma o características de unión comparables con aquellos del anticuerpo completo. Tales fragmentos pueden contener uno o fragmentos Fab o
10 F(ab')₂. Preferiblemente los fragmentos de anticuerpo contienen todos los seis CDR del anticuerpo completo, aunque fragmentos que contienen menos de todas de tales regiones, tales como tres, cuatro o cinco CDRs, también son funcionales.

Adicionalmente, los equivalente funcionales pueden ser o pueden combinar
15 miembros de uno cualquiera de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de estos.

Preparación de equivalentes funcionales de anticuerpos

20 Se preparan equivalentes de anticuerpos por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de anticuerpos enzimáticamente a partir de anticuerpos completos. Preferiblemente, los equivalentes de los anticuerpos se preparan a partir de ADN que codifica tales equivalentes. Los fragmentos de codificación de ADN de anticuerpos se pueden
25 preparar al eliminar todas las proteínas deseadas del ADN que codifica el anticuerpo de longitud completa.

Los anticuerpos quimerizados que codifican ADN se pueden preparar al recombinar sustancialmente ADN o codificar exclusivamente regiones constantes humanas y regiones variables que codifican ADN derivadas de sustancialmente o exclusivamente de la secuencia de región variable de un mamífero diferente de un humano. Los anticuerpos humanizados que codifican ADN se pueden preparar por recombinación de regiones constante que codifican ADN y regiones variables diferentes del CDR derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y ADN que codifica CDR derivado sustancialmente o exclusivamente de un mamífero diferente de un humano.

10

Fuentes adecuadas de moléculas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen células, tales como hibridomas, que expresan el anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos se pueden utilizar por ellos mismos como equivalentes de anticuerpo, o se pueden recombinar en equivalentes, como se describió anteriormente.

15

Las eliminaciones de ADN y recombinaciones descritas en esta sección se pueden llevar a cabo por métodos conocidos, tal como aquellos descritos en las solicitudes de patente publicadas listadas anteriormente.

20

Clasificación y selección de anticuerpo

Se aíslan anticuerpos monoclonales y se purifican utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden clasificar utilizando métodos conocidos en la técnica tales como ELISA contra el antígeno de péptido endoglina soluble o análisis Western blot. Ejemplos no

25

limitantes de tales técnicas se describen en los ejemplos II y III de la patente Estadounidense número 6, 365, 157, incorporada aquí como referencia.

Usos terapéuticos de anticuerpos

5

Cuando se utiliza en vivo para el tratamiento o prevención de preeclampsia o eclampsia, los anticuerpos de la invención objeto se administran al sujeto en cantidades terapéuticamente efectivas. Preferiblemente, los anticuerpos se administran parenteralmente o intravenosamente por infusión continua. La dosis y el régimen de dosis depende de la severidad de la enfermedad, y la salud general del sujeto. La cantidad de anticuerpo administrada está típicamente en el rango de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto, preferiblemente 0.01 a aproximadamente 5 mg/kg del peso del sujeto.

15

Para administración parenteral, los anticuerpos se formulan en una forma inyectable de dosis unitaria (solución, suspensión emulsión) en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son inherentemente no tóxicos, y no terapéuticos. Ejemplos de tales vehículos son agua, salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y 5% de albúmina de suero humana. Vehículos no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo también se pueden utilizar. Los liposomas se pueden utilizar como portadores. El vehículo puede contener cantidades menores de aditivos tal como sustancias que mejorar la isotonicidad y estabilidad química, por ejemplo, amortiguadores y preservativos. Los anticuerpos se formulan típicamente en tales vehículos en concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml a 10 mg/ml.

25

Terapias de Combinación

Opcionalmente, un terapéutico de preeclampsia o eclampsia se puede administrar en combinación con cualquier otra terapia de preeclampsia o eclampsia estándar; tales métodos se conocen por el experto en la técnica.

Dosis y modos de administración

Preferiblemente, el terapéutico se administra durante la preñez para el tratamiento o prevención de la preeclampsia o eclampsia o después de la preñez para tratar preeclampsia o eclampsia post parto. Las técnicas y dosis para la administración varían dependiendo del tipo de compuesto (por ejemplo, compuesto químico, anticuerpo, antisentido, o vector de ácido nucleico) y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica o se determinan fácilmente.

15

Compuestos terapéuticos de la presente invención se pueden administrar con un diluyente farmacéuticamente aceptable, portador, o excipiente, en forma de dosis unitaria. La administración puede ser parenteral, intravenosa, subcutánea, oral, o local por inyección directa en el fluido amniótico. El suministro intravenoso por infusión continua es el método preferido para administrar las composiciones terapéuticas de la presente invención.

20

La composición puede estar en la forma de una píldora, tableta, cápsula, líquido o tableta de liberación sostenida para administración oral; o un líquido para administración intravenosa, subcutánea o parenteral; o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

25

Los métodos bien conocidos en la técnica para elaborar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20 ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Las formulaciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, 5 contener excipientes, agua estéril, salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Se pueden utilizar copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, copolímeros de lacturo/glicoluro, polímeros de lacturo biodegradable, biocompatibles, para controlar la liberación de los compuestos. Las formulaciones de nanopartícula (por 10 ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas de lípido sólido, lisosomas) se pueden utilizar para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de suministro parenteral potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero acetato etileno – vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. La concentración del compuesto en la formulación varía 15 dependiendo de un número de factores, que incluyen la dosis de la droga a ser administrada, y la ruta de administración.

El compuesto se puede administrar opcionalmente como una sal farmacéuticamente aceptable, tal como sales de adición ácida no tóxicas o 20 complejos de metal que se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica. Ejemplos de sales de adición ácida incluyen ácidos orgánicos tales como acético, láctico, palmítico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, trascórbico, succínico, benzóico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanosulfónico, toluenosulfónico o ácido trifluoroacético o similares; ácidos poliméricos tales como 25 ácido tánico, carboximetilcelulosa, o similares; y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, o similares. Complejos de metal incluyen zinc, hierro, y similares.

Formulaciones para uso oral incluyen tabletas que contienen los ingredientes activos en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes o llenadotes (por ejemplo sucrosa y sorbitol), agentes lubricantes, glidantes, y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados, o talco).

Las formulaciones para uso oral también se pueden suministrar como tabletas masticables, o como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina suave en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio aceitoso.

La dosis y el tiempo de administración del compuesto depende de varios factores clínicos que incluyen la salud general del sujeto y la severidad de los síntomas de preeclampsia. En general, una vez que la preeclampsia o una propensión a desarrollar la preeclampsia se detecta, la infusión continua de la proteína purificada se utiliza para tratar o evitar la progresión adicional de la condición. El tratamiento se puede continuar durante un periodo de tiempo que varía de uno a cien días, más preferiblemente de uno a sesenta días, y más preferiblemente de uno a veinte días, o hasta la terminación de la preñez. Las dosis varían dependiendo de cada compuesto y la severidad de la condición y se titula para lograr una concentración de suero sanguíneo que varía de 10 a 20 ng/ml de endoglina soluble; y/o de 1 a 500 ng/ml de VEGF o PLGF, o ambos, preferiblemente 1 a 10 ng/ml, más preferiblemente 5 a 50 ng/ml, y más preferiblemente 5 a 10 ng/ml de VEGF o PLGF, o ambos.

Los métodos del diagnóstico descritos aquí también se pueden utilizar para monitorear la preeclampsia o eclampsia durante la terapia o para determinar las dosis de compuestos terapéuticos. En un ejemplo, el compuesto terapéutico se administra y el PAAI se determina durante el curso de terapia. Si el PAAI es
5 menos de 20, preferiblemente menor de 10, entonces la dosis terapéutica se considera es una dosis efectiva.

Monitoreo del Sujeto

10 El estado de la enfermedad o tratamiento de un sujeto que tiene preeclampsia, eclampsia, o una propensión a desarrollar tal una condición se puede monitorear utilizando los métodos y composiciones de la invención. En una modalidad, la expresión de un polipéptido de endoglina soluble en un fluido corporal, tal como orina, plasma, fluido amniótico, o CSF, se monitorea. En otra
15 modalidad, la expresión de un polipéptido sFit-1, VEGF, o PLGF presente en un fluido corporal, tal como orina, plasma, fluido amniótico o CSF, se monitorea. Tal monitoreo puede ser útil, por ejemplo, al evaluar la eficacia de una droga particular en un sujeto o en evaluar la progresión de la enfermedad. Los terapéuticos que reducen la expresión de una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble o
20 polipéptido se toman como particularmente útiles en la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención. Ellos no
25 significan que limitan la invención en ninguna forma.

Ejemplo 1. Niveles incrementados de mARN endoglina y proteína en mujeres preñadas con preeclampsia

En un intento por identificar los factores secretados novedosos que juegan un papel patológico en la preeclampsia, desarrollamos una expresión de gen que hace un perfil del tejido de placenta de 17 mujeres preñadas con preeclampsia y 13 mujeres preñadas normales utilizando chips de micro ensayo Affymetrix U95 A. Encontramos que el gen para la endoglina se regula positivamente en mujeres con preeclampsia.

10

Con el fin de confirmar la regulación positiva de la endoglina en la preeclampsia, desarrollamos análisis Western blot para analizar los niveles de mARN de endoglina placentaria (figura 3) y el análisis Western blot para medir los niveles de proteína en suero de endoglina (figura 4) en mujeres preñadas preeclámplicas según se compara con mujeres preñadas normotensivas. La preeclampsia se define como (1) presión sanguínea sistólica (BP) >140 mmHg y un BP diastólico >90 mmHg después de 20 semanas de gestación, (2) nuevo inicio de proteinuria (1+ por vara aforadora en uroanálisis, > 300 mg de proteína en una recolección de orina de 24 horas, o proporción de proteína / creatinina orina aleatoria > 0.3 y (3) resolución de hipertensión y proteinuria durante dos semanas post parto. Pacientes que experimenten hipertensión, proteinuria, o enfermedad renal se excluyen. Los pacientes se dividen en preeclampsia severa y suave basados en la presencia o ausencia de proteinuria de rango nefrítico (> 3 g de proteína en una recolección de orina de 24 horas o proporción de proteína orina/ creatinina > 3.0). Las proporciones de proteína orina / creatinina media en el grupo de preeclampsia suave es de 0.94 +/- 0.2 y en el grupo de preeclampsia severa es de 7.8 +/- 2.1. Las edades gestacionales medias de los varios grupos son como

25

sigue: normal 38.8 +/- 0.2 semanas, preeclampsia suave 34 +/- 1.2 semanas, preeclampsia severa 31.3 +/- 0.6 semanas, y pretérmino 29.5 +/- 0 semanas. Se obtienen muestras placentarias inmediatamente después de suministro. Cuatro muestras aleatorias se toman de cada placenta, se colocan en solubilización de estabilización después de ARN (Ambion, Austin, TX) y se almacenan a -70°C. El aislamiento del ARN se desarrolla utilizando Qiagen ARN easy Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA).

El northern blot examinado con una sonda de par base 400 en la región de codificación de la endoglina (Unigene Hs. 76753) y una sonda GAPDH como un control de normalización que muestra un incremento en la endoglina placentaria mRNA. El western blot, examinado con un anticuerpo para el terminal amino de la endoglina, muestra un incremento en los niveles de suero materno y placentario de proteína de endoglina en mujeres preñadas preeclámplicas según se compara con mujeres preñadas normotensivas.

Ejemplo 2. Demostración de una endoglina soluble en la placenta y suero de pacientes preeclámpticos

Se utiliza el análisis western blot para medir los niveles de proteína endoglina en placentas y suero de mujeres preeclámplicas que sugieren la presencia de una proteína más pequeña (63 kDa) que está presente en la placenta y suero de mujeres preñadas preeclámplicas. Hemos demostrado que este fragmento más pequeño es el dominio extracelular de la endoglina. Esta versión truncada es similar para ser expulsada de los sinciotiotrofoblastos placentarios y células endoteliales y que circulan en cantidad de exceso en pacientes con preeclampsia. Esta forma soluble de endoglina puede actuar como

un agente antiangiogénico al unir a ligandos circulantes que son necesarios para la salud vascular normal.

Ejemplo 3. Concentraciones circulantes de endoglina soluble en mujeres con
5 preñez preecláptica Vs normal.

Con el fin de comparar los niveles de circulación, la endoglina soluble del suero normal, mujeres con preeclampsia suave o mujeres con preeclampsia severa, desarrollamos análisis ELISA en ambas muestras sanguíneas tomadas de
 10 estas mujeres. Los pacientes se dividen en pacientes con preeclampsia suave y severa basados en la presencia o ausencia de nefrítico que varía de proteinuria (> 3 % de proteína en una recolección de orina de 24 horas o proteína / creatinina proporción mayor de 3.0). La proporción de proteína orina / creatinina media en el grupo de preeclampsia suave es de 0.94 +/- 0.2 % y el grupo de preeclampsia
 15 severa es de 7.8 +/- 2.1 (figura 5). El ELISA se desarrolla utilizando el kit ELISA disponible comercialmente de R & D systems, MN (Cat #DNDG00) como se describió anteriormente (Maynard et al, JCI; 2003)-

Ejemplo 4. Ensayo modelo para angiogénesis
 20

Un ensayo de tubo endotelial puede utilizar un modelo in Vitro de angiogénesis. El factor de crecimiento matrigel reducido (7 mg/ml, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) se coloca en pozos (100 µl/pozo) de una placa de cultivo celular de 48 pozos precongelado y se incuba a 37°C durante 25-30
 25 minutos para permitir la polimerización. Las células endoteliales de vena umbilical humana (30,000 + in 300 µl de medio basal endotelial sin suero, Clonetics, Walkersville, MD) en 3-5 pasajes se trata con 10% de suero de paciente, se

colocan en placas en pozos cubiertos matrigel, y se incuban a 37°C durante 12-16 horas. La formación del tubo luego se evalúa a través de un microscopio de contraste de fase invertida en 4X (Nikon Corporation, Tokio, Japan) y se analiza (área de tubo y longitud total) utilizando software de análisis de formación de imagen PCI Simple

Otras modalidades

A partir de la anterior descripción, es evidente que se pueden hacer modificaciones y variaciones a la invención descrita aquí para adoptar varios usos y condiciones. Tales modalidades también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Todas las publicaciones mencionadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia para el mismo alcance como si cada publicación independiente o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada como referencia. Adicionalmente, el número de publicación PCT WO 2004/008946 y la publicación Estadounidense número 20040126828, se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

20

Lo que se reivindica es:

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar o evitar preeclampsia o eclampsia en un sujeto, dicho método comprende la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto capaz de unirse a endoglina soluble, en donde dicha administración es durante un tiempo y en una cantidad suficiente para tratar o evitar dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es un anticuerpo de endoglina soluble purificada o un fragmento de antígeno de unión de endoglina soluble.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es un factor de crecimiento.
4. El método de la reivindicación 3, en donde dicho factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de: transformar el factor de crecimiento (TGF)- β 1 o TGF- β 3, activin A, Proteína Morfogénica de Hueso (BMP)-2 o BMP-7.
5. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente administrar un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo sFlt-1 purificado, un fragmento de unión a antígeno anti-sFlt, nicotina, teofilina, adenosina, nifedipina, midoxidilo, sulfato de magnesio, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factor de crecimiento placentario (PLGF).

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho VEGF es VEGF 121 o VEGF 165.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de administrar a un sujeto un compuesto antihipertensivo.
8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un humano preñado.
9. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un humano posparto.
10. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto no es un humano.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho sujeto se selecciona del grupo que consiste de una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato.
12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende adicionalmente monitorear la preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto, en donde dicho monitoreo comprende medir el nivel de molécula de ácido nucleico de endoglina soluble en una muestra de dicho sujeto y compararlo con una muestra de referencia, en donde una alteración en dichos niveles diagnostica preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

13. El método de la reivindicación 12, en donde una reducción en el nivel de ácido nucleico de endoglina soluble con relación a una muestra de referencia indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia.
- 5 14. El método de la reivindicación 12, en donde dicho método comprende adicionalmente medir el nivel de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF, o PLGF en una muestra de dicho sujeto.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, en donde una reducción en el nivel del ácido nucleico del sFlt-1 con relación a una referencia indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia.
- 15 16. El método de la reivindicación 14, en donde un incremento en el nivel de ácido nucleico del VEGF o PIGF con relación a una referencia indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia.
- 20 17. El método de la reivindicación 12 o 14, en donde dicha medición del nivel se hace en dos o más ocasiones y un cambio en dichos niveles entre la medición es un indicador diagnóstico de dicha preeclampsia o eclampsia.
- 25 18. Un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, dicho método comprende la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto que incrementa el nivel de un factor de crecimiento capaz de unirse a endoglina soluble, en donde dicha administración es una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o evitar dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

19. El método de la reivindicación 18, en donde dicho factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de: transformar el factor de crecimiento (TGF)- β 1, TGF-3 β , activin A, BMP-2, y BMP-7.
- 5
20. El método de la reivindicación 18, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de ciclosporina, tocoferol alfa, metisergida, bromocriptina, y aldomet.
- 10
21. Un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, dicho método comprende la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto que inhibe la unión del factor de crecimiento con un polipéptido endoglina soluble, en donde dicha administración es suficiente para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto.
- 15
22. El método de la reivindicación 21, en donde dicho compuesto se une a la endoglina soluble y bloquea la unión del factor de crecimiento.
- 20
23. Un método para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en un sujeto, dicho método comprende la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto capaz de reducir la expresión de endoglina soluble o actividad biológica, en donde dicha administración es suficiente para tratar o evitar dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.
- 25
24. El método de la reivindicación 23, en donde dicho compuesto es un compuesto que inhibe una enzima proteolítica seleccionada del grupo que consiste de: matriz de metaloproteínasa (MMP), catepsina, o elastasa.

25. El método de la reivindicación 24, en donde dicho MMP es MMP9.
- 5 26. El método de la reivindicación 23, dicho compuesto comprende un oligómero nucleobase antisentido complementario con al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico endoglina, en donde dicha administración es suficiente para tratar o evitar dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.
- 10 27. El método de la reivindicación 26, en donde dicho oligómero nucleobase antisentido es de 8 a 30 nucleótidos de longitud.
- 15 28. El método de la reivindicación 23, dicho compuesto comprende un ARN de doble hélice que comprende al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico de endoglina, en donde dicha administración es suficiente para tratar o evitar la preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.
- 20 29. El método de la reivindicación 28, en donde dicho ARN de doble hebra es un ARN de interferencia pequeña (siARN) de 19 a 25 nucleótidos de longitud.
- 25 30. El método de la reivindicación 23, dicho compuesto comprende un anticuerpo purificado o fragmento de unión a antígeno que une específicamente la endoglina soluble.
31. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende adicionalmente monitorear dicha preeclampsia o eclampsia en dicho

sujeto, en donde dicho monitoreo comprende medir el nivel de polipéptido endoglina soluble en una muestra de dicho sujeto.

5 32. El método de la reivindicación 31, en donde un nivel de endoglina soluble menor de 25 ng/ml indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia.

10 33. El método de la reivindicación 32, en donde el nivel de endoglina soluble menor de 20 ng/ml indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia.

10 34. El método de la reivindicación 31, en donde dicha medición de niveles se hace en dos o más ocasiones y un incremento en dichos niveles entre mediciones es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.

15 35. El método de la reivindicación 31, en donde dicho método comprende adicionalmente monitorear dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto, en donde dicho monitoreo comprende medir el nivel de al menos un polipéptido de sFlt-1, VEGF, o PlGF en una muestra de dicho sujeto.

20 36. El método de la reivindicación 31, en donde dicha medición de nivel se compara con una muestra de referencia normal.

25 37. El método de la reivindicación 36, en donde una reducción en el nivel de endoglina soluble con relación a dicha muestra de referencia normal indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.

38. El método de la reivindicación 31, en donde dicho monitoreo se utiliza para determinar la dosis terapéutica del compuesto.
- 5 39. El método de la reivindicación 31, en donde dicha medida se hace utilizando un ensayo inmunológico.
40. El método de la reivindicación 31, en donde el nivel de endoglina soluble es el nivel de endoglina soluble libre, unida, o total.
- 10 41. El método de la reivindicación 31, en donde el nivel de endoglina soluble es el nivel de un polipéptido endoglina que resulta de la degradación o clivaje enzimático.
- 15 42. El método de la reivindicación 35, que comprende adicionalmente calcular la relación entre dichos niveles de sFlt-1, VEGF, o PlGF utilizando una métrica, en donde una alteración en la relación entre dichos niveles en la muestra de sujeto con relación a una muestra de referencia, es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto.
- 20 43. El método de la reivindicación 42, en donde dicha métrica es un índice de preeclampsia antiangiogénico (PAAI): $[sFlt-1/VEGF + PlGF]$.
44. El método de la reivindicación 43, en donde un valor PAAI menor de 20 indica una mejora en dicha preeclampsia o eclampsia.
- 25 45. El método de la reivindicación 43, en donde dicho PAAI se utiliza para determinar la dosis del compuesto terapéutico.

46. El método de la reivindicación 45, en donde el compuesto terapéutico se administra en una dosis tal que el PAAI es menor de 20.
- 5 47. El método de la reivindicación 42, en donde dicha medición de niveles se hace en dos o más ocasiones y un cambio en dichos niveles entre mediciones es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- 10 48. Una composición que comprende un anticuerpo purificado o fragmento de unión a antígeno de este que une específicamente endoglina soluble.
49. La composición de la reivindicación 48, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno evita la unión de un factor de crecimiento con endoglina soluble.
- 15 50. La composición de la reivindicación 48, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 20 51. La composición de la reivindicación 48, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este es un anticuerpo humano o humanizado.
52. La composición de la reivindicación 48, en donde dicho anticuerpo le falta una porción Fc.
- 25 53. La composición de la reivindicación 48, en donde dicho anticuerpo es una estructura $F(ab')_2$, un Fab o una estructura Fv.

54. La composición de la reivindicación 48, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este está presente en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5
55. Un método para diagnosticar un sujeto que tiene, o que tiene una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia, dicho método comprende medir el nivel de polipéptido de endoglina soluble en una muestra de dicho sujeto.
- 10
56. El método de la reivindicación 55, en donde un incremento en el nivel de polipéptido de endoglina soluble con relación a la muestra de referencia es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
- 15
57. El método de la reivindicación 55, en donde el nivel de endoglina soluble es el nivel de endoglina soluble libre, unida, o total.
- 20
58. El método de la reivindicación 55, en donde el nivel de endoglina soluble mayor de 20 ng/ml es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
- 25
59. El método de la reivindicación 55, en donde dicha medición se hace utilizando un ensayo inmunológico.
60. El método de la reivindicación 59, en donde dicho ensayo inmunológico es un ELISA.

61. El método de la reivindicación 55, en donde dicha muestra es un fluido corporal.
- 5 62. Un método para diagnosticar un sujeto que tiene, o que tiene una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia, dicho método comprende medir el nivel de molécula de ácido nucleico de endoglin soluble en una muestra de dicho sujeto y compararla con una muestra de referencia, en donde una alteración en dichos niveles diagnostica
- 10 preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto, o diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
63. El método de la reivindicación 62, en donde dicha alteración en dichos niveles es un incremento.
- 15 64. El método de la reivindicación 62, que comprende adicionalmente medir el nivel de al menos una molécula de ácido nucleico de sFlt-1, VEGF, o PlGF en una muestra de dicho sujeto y compararla con una muestra de referencia, en donde una alteración en dichos niveles diagnostica
- 20 preeclampsia o eclampsia en dicho sujeto, o diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
65. Un método para diagnosticar un sujeto que tiene, o que tiene una propensión a desarrollar, preeclampsia o eclampsia, dicho método
- 25 comprende determinar la secuencia de ácido nucleico de un gen endoglin en una muestra de un sujeto y compararla con una secuencia de referencia, en donde una alteración en la secuencia de ácido nucleico

del sujeto que es una alteración que cambia el nivel de expresión del producto de gen en dicho sujeto diagnostica el sujeto con preeclampsia o eclampsia, o una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.

- 5 66. El método de la reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicha muestra es un fluido corporal de dicho sujeto en el que dicha endoglina soluble es normalmente detectable.
- 10 67. El método de la reivindicación 66, en donde dicho fluido se selecciona del grupo que consiste de orina, fluido amniótico, suero, plasma y fluido cerebroespinal.
- 15 68. El método de la reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicha muestra es una célula.
- 20 69. El método de la reivindicación 68, en donde dicha célula se selecciona del grupo que consiste de una células endotelial, un leucocito, un monocito, o una célula derivada de la placenta.
- 25 70. El método de la reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicha muestra es un tejido.
71. El método de la reivindicación 70, en donde dicho tejido es un tejido placentario.

72. El método de la reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicho sujeto es un humano no preñado y dicho método diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia.
- 5 73. El método de la reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicho sujeto es un humano preñado o un humano posparto.
74. El método de la reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicho sujeto no es un humano.
- 10 75. El método de la reivindicación 74, en donde dicho no humano se selecciona del grupo que consiste de una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un perro o un gato.
- 15 76. El método de las reivindicación 55, 62 o 65, en donde dicha medición de nivel se hace en dos o más ocasiones y un cambio en dichos niveles entre la medición es un indicador diagnóstico de preeclampsia o eclampsia.
- 20 77. Un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende una secuencia de ácido nucleico de endoglina soluble o una secuencia complementaria de esta, o cualquier combinación de esta.
- 25 78. El kit de la reivindicación 7, en donde dicho kit comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico de VEGF, sFlt-1 o PlGF o una secuencia complementaria de esta, o cualquier combinación de esta.

79. Un kit para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia en un sujeto que comprende unos medios para detectar un polipéptido de endoglina soluble.
- 5 80. El kit de la reivindicación 79, en donde dicho kit comprende adicionalmente unos medios para detectar polipéptido VEGF, sFlt-1 o PlGF.
- 10 81. El kit de la reivindicación 79, en donde dichos medios de detección se seleccionan del grupo que consiste de un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático, y un ensayo colorimétrico.
- 15 82. El kit de la reivindicación 77 o 79, en donde dicho kit diagnostica una propensión a desarrollar preeclampsia o eclampsia en un sujeto preñado o no preñado.
- 20 83. Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, dicho método comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula de ácido nucleico de endoglina soluble con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión de dicha molécula de ácido nucleico de endoglina en dicha célula puesta en contacto por dicho compuesto candidato con el nivel de expresión en una célula de control no puesta en contacto por dicho compuesto candidato, en donde una alteración en la expresión de dicha molécula de ácido nucleico de endoglina soluble identifica dicho compuesto candidato como un
- 25 compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.

84. El método de la reivindicación 83, en donde dicha alteración es una reducción en el nivel de dicha molécula de ácido nucleico de endoglina soluble.
- 5 85. Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, dicho método comprende poner en contacto una célula que expresa un polipéptido endoglina soluble con un compuesto candidato, y comparar el nivel de expresión de dicho polipéptido de endoglina soluble en dicha célula puesta en contacto con dicho compuesto candidato con el
- 10 nivel de expresión de polipéptido en una células de control no puesta en contacto por dicho compuesto candidato, en donde una alteración en la expresión de dicho polipéptido de endoglina identifica dicho compuesto candidato como un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.
- 15 86. El método de la reivindicación 85, en donde dicha alteración en la expresión se ensaya utilizando un ensayo inmunológico, un ensayo enzimático, o un inmunoensayo.
87. El método de la reivindicación 85, en donde dicha alteración en la
- 20 expresión es una reducción en el nivel de endoglina soluble.
88. El método de la reivindicación 85, en donde dicha alteración en la expresión es una alteración en la transcripción.
- 25 89. El método de la reivindicación 85, en donde dicha alteración en la expresión es una alteración en la traducción.

- 5 90. Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, el método comprende poner en contacto una célula que expresa un polipéptido de endoglina soluble con un compuesto candidato, y comparar la actividad biológica de dicho polipéptido en dicha célula puesta en contacto por dicho compuesto candidato con el nivel de actividad biológica en un célula de control no puesta en contacto por dicho compuesto candidato, en donde una alteración en la actividad biológica de dicho polipéptido endoglina identifica dicho compuesto candidato como un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.
- 10 91. Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, dicho método comprende detectar la unión entre un polipéptido de endoglina soluble y un factor de crecimiento en la presencia de un compuesto candidato, en donde una reducción en dicha unión, con relación a la unión entre dicho polipéptido de endoglina soluble y dicho factor de crecimiento en la ausencia de dicho compuesto candidato identifica dicho compuesto candidato como un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia.
- 15 92. Un método para identificar un polipéptido, o fragmento de este, que evita la unión entre un polipéptido endoglina soluble y un factor de crecimiento, dicho método comprende detectar la unión entre un polipéptido endoglina soluble y un factor de crecimiento en la presencia de dicho polipéptido candidato, en donde una reducción en dicha unión, con relación a la unión entre dicho polipéptido de endoglina soluble y dicho factor de crecimiento en la presencia de dicho polipéptido candidato identifica
- 20 25

dicho polipéptido candidato como un polipéptido que evita la unión entre un polipéptido endoglina soluble y un factor de crecimiento.

- 5 93. Un método para identificar un compuesto que mejora la preeclampsia o eclampsia, que comprende detectar la unión entre un polipéptido endoglina soluble y un compuesto candidato, en donde un compuesto que une dicho polipéptido endoglina soluble mejora la preeclampsia o eclampsia.

MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR PREECLAMPSIA O ECLAMPSIA

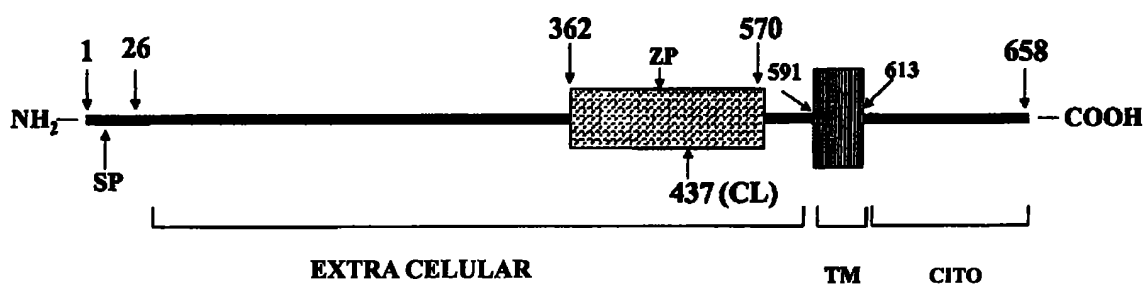
Resumen de la Descripción

5

Se describen aquí métodos para diagnosticar la preeclampsia y eclampsia al detectar el nivel de actividad biológica de polipéptido de endoglina soluble o ácidos nucleicos. También se describen aquí métodos para tratar la preeclampsia y eclampsia utilizando métodos que alteran los niveles de endoglina soluble o actividad biológica.

10

205



SP-péptido de señal
ZP-zona de dominio pelucida
CL-sitio de clivaje potencial (AA 437) que libera endoglina soluble
TM-dominio de transmembrana
Cito-dominio citoplásmico

Fig 1: Esquemático de Proteína de Endoglina

205

**Título: MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR
PREECLAMPSIA O ECLAMPSIA**

Solicitante (s): S. Ananth Karumanchi et al.

Fecha de Presentación: Septiembre 24, 2004

Página 2 de 5

Cliente No.: 21559

Figura 2

Secuencia de cADN predicha en endoglina soluble (437 aminoácidos)

```

1   atggaccgcg gcacgctccc tctggctggt gccctgctgc tggccagctg cagcctcagc
61  cccacaagtc ttgcagaaac agtccattgt gaccttcagc ctgtggggcc cgagagggac
121 gaggtgacat ataccactag ccaggctctcg aagggtctgc tggctcaggc cccaatgcc
181 atccttgaag tccatgtcct cttcctggag ttcccaacgg gcccgtcaca gctggagctg
241 actctccagg catccaagca aaatggcacc tggcccccag aggtgcttct ggtcctcagt
301 gtaaacagca gtgtcttccg gcatctccag gccctgggaa tcccaactga cttggcctac
361 aattccagcc tggtcnctt ccaagagccc ccgggggtca acaccacaga gctgccatcc
421 ttccccaaga cccagatcct tgagtgggca gctgagaggg gccccatcac ctctgctgot
481 gagctgaatg acccccagag catctctctc cgactgggac aagcccaggg gtcactgtcc
541 ttctgcatgc tgggaagccag ccaggacatg ggccgcacgc tcgagtggcg gccgcgtact
601 ccagccttgg tccggggctg ccacttggaa ggcgtggcgg gccacaagga ggcgcacatc
661 ctgaggggtc tgccggggca ctccggccgg ccccggaagg tgacggtgaa ggtggaaactg
721 agctgcgcac ccggggatct cgatgcctgc ctcatctctg aggggtcccc ctacgtgtcc
781 tggctcatcg acgccaacca caacatgcag atctggacca ctggagaata ctctttcaag
841 atctttccag agaaaaacat tcgtggcttc aagctcccag acacacctca aggcctcctg
901 ggggagggccc ggatgctcaa tgccagcatt gtggcatcct tcgtggagct accgtggccc
961 agcattgtct cacttcatgc ctccagctgc ggtggtaggg tgccagacctc accgcacccg
1021 atccagacca ctctcccaaa ggacacttgt agcccgagag tgcctcatgtc cttgatccag
1081 acaaagtgtg ccgacgacgc catgacctg gtactaaaga aagagcttgt tgccgatttg
1141 aagtgcacca tcacgggccc gaccttctgg gaccccagct gtgaggcaga ggacgggggt
1201 gacaagtgtg tcttgcgcag tgcttactcc agctgtggca tgcagggtgc agcaagtatg
1261 atcagcaatg aggcggtggt caatatcttg tcgagctcat caccacagcg g

```

MEJOR COPIA DISPONIBLE

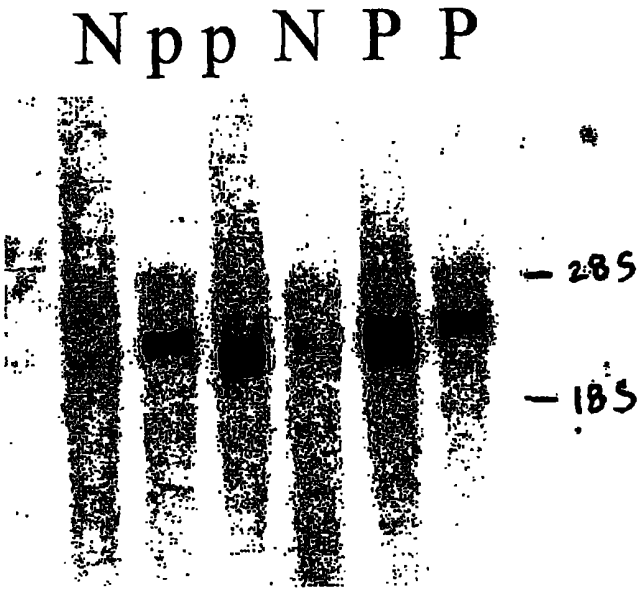


Figura 3

207

MEJOR COPIA DISPONIBLE

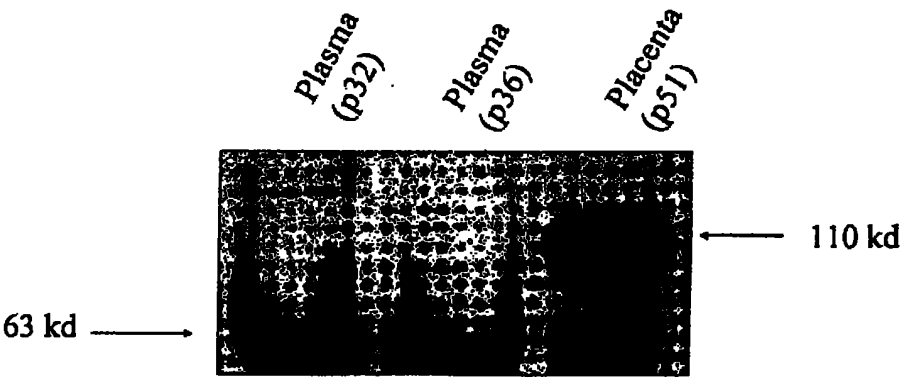
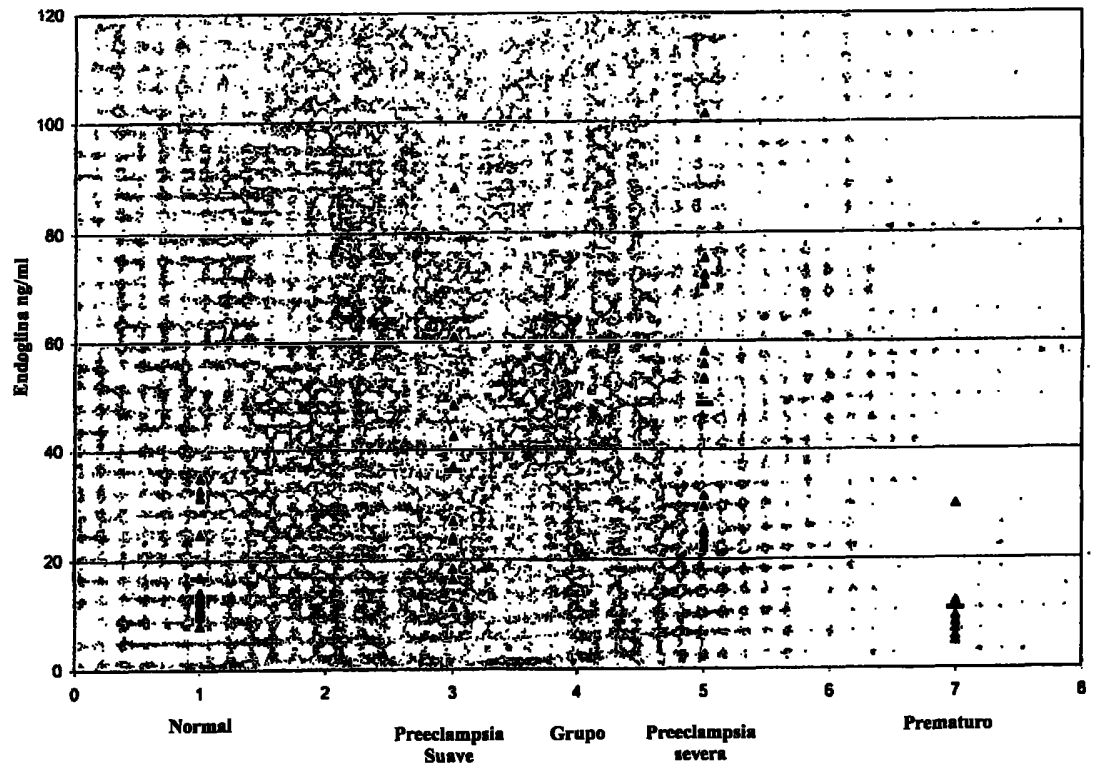


Figura 4

Figura 5: Circulación de endoglina soluble en preeclampsia



Título: MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR
PREECLAMPSIA O ECLAMPSIA
Solicitante (s): S. Ananth Karumanchi et al.
Fecha de Presentación: Septiembre 24, 2004
Página 5 de 5
Cliente No.: 21559

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

MONTO OFICIAL DE CAJA : 07 - 28,128
FECHA : ABRIL 9 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040125-00000-0000
Fecha: 2007-04-23 18:08:08 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIVII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 211

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55800349	09/04/2007	44,318,000.00

C O N C E P T O

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.

SOM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

COLO 15863 841 001 5

272

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-040125-00000-0000

Fecha: 2007-04-23 18:08:08
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONI
Eva: 378 FASENACIONALI
Folios: 211



REQUISITO:

PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- ◆ Descripción de la invención [✓]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [✓]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Olinda M Neiva Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

213

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	7 40125
	Solicitud internacional	PCT/US2005/034483
	Fecha inicio fase nacional	24/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	7329

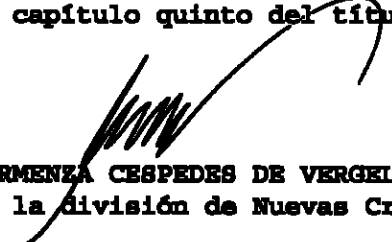
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 15 JUN 2007
adpall