



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 942**

51 Int. Cl.:
G01N 33/74 (2006.01)
C07K 14/58 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08714281 .6**
96 Fecha de presentación : **07.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2118668**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **Método para determinar NT-proBNP equino.**

30 Prioridad: **07.03.2007 AT A 365/2007**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.09.2011

73 Titular/es:
BIOMEDICA MEDIZINPRODUKTE GmbH & Co KG.
Divischgasse 4
1210 Wien, AT

72 Inventor/es: **Woloszczuk, Wolfgang y**
Hawa, Gerhard

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 364 942 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar NT-proBNP equino

5 La presente invención se refiere a un método para determinar NT-proBNP equino o fragmentos.

El péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético cerebral (BNP) y el péptido natriurético de tipo C (CNP) pertenecen a una familia de hormonas que pueden secretarse desde la aurícula del corazón, los ventrículos del corazón y las células endoteliales vasculares.

10 En C-terminal, todos los péptidos natriuréticos tienen la misma estructura de anillo de 17 aminoácidos conectada por un enlace disulfuro. Esta parte es responsable de su actividad biológica. En la actualidad, se han caracterizado 3 receptores, el receptor ANP-A (específico de ANP y BNP), el receptor ANP-B (específico de CNP y ANP) y el receptor de eliminación. BNP se ha aislado por primera vez de cerebro porcino y se ha encontrado también después en el corazón porcino. Ya se ha descrito en la bibliografía que los péptidos natriuréticos protegen al organismo frente a un exceso de líquido y alta presión arterial. El papel biológico, bioquímico y patofisiológico de los péptidos natriuréticos ya se ha descrito exhaustivamente en publicaciones de revisión. En la actualidad, el valor de los péptidos natriuréticos como un marcador de suero para diagnóstico y control de la terapia de enfermedades cardíacas en seres humanos está bien documentado.

20 En seres humanos, la forma madura del BNP que se secreta principalmente del ventrículo se forma a partir de una preetapa molecular alta, la proBNP (1-108). El péptido C terminal fisiológicamente activo, proBNP (77-108), también denominado BNP-32, consiste en 32 aminoácidos, la forma N terminal que circula en plasma consiste en 76 aminoácidos (NT-proBNP (1-76)). Además, también se han descrito los fragmentos 8-29 y 31-57 de pre-proBNP, en los que particularmente la determinación del fragmento 8-29 para medir el 1-76 de NT-proBNP proporciona datos clínicos análogos.

30 Las enfermedades cardíacas desempeñan un papel importante no solamente en seres humanos, también los animales, especialmente mascotas, tales como perros y gatos, o animales útiles, tales como caballos, están aquejados de estas enfermedades. Los caballos que padecen enfermedades cardíacas generalmente no están muy sanos, sudan rápidamente, su pulso aumenta, tienen disnea o tienen fiebre. Aproximadamente 0,3 % de todos los caballos tienen un defecto cardíaco congénito, sus arterias pueden transportar menos oxígeno que en el estado sano. En la mayoría de los casos, sin embargo, se desarrollan problemas cardíacos en el transcurso de la vida, aparecen con frecuencia arritmias cardíacas, pero son principalmente normales en el estado en reposo. Las arritmias cardíacas patológicas son un señal de un daño miocárdico que puede estar causado por falta de oxígeno o por infecciones. Las inflamaciones del miocardio se llaman miocarditis. Si la estructura química de las fibras del miocardio cambia, el corazón ya no será capaz de bombear de forma apropiada sangre y se habla de miocardosis. Las inflamaciones del endocardio se desencadenan por bacterias que alcanzan el corazón a través de la sangre, por ejemplo, mediante pezuñas o articulaciones inflamadas. En el caso de una hidropesía del pericardio, entra agua en el pericardio a través de las paredes de los vasos sanguíneos. Como norma, el no tratamiento de problemas cardíacos dará como resultado insuficiencia cardíaca. En casos leves, la circulación tendrá un efecto equilibrante, en casos graves, se espera fallo cardíaco. En caballos que padecen un defecto de válvula de la mitad derecha del corazón, la sangre retenida en los órganos conducirá a cirrosis del hígado. Las enfermedades cardíacas se diagnostican por los veterinarios por medio de auscultación, ultrasonidos o ECG. Inicialmente, el caballo no se someterá a ninguna tensión e idealmente, debería alojarse en un establo abierto o en una caballeriza externa de modo que el corazón recibirá una gran cantidad de oxígeno. La curación o tratamiento, respectivamente, de enfermedades cardíacas puede tomar un tiempo muy largo, una terapia tardará de 4 a 6 semanas en cualquier caso. Algunos caballos pueden curarse permanentemente, otros tendrán una recaída cuando se detenga la medicación. Sin embargo, incluso en el caso de cura, no puede volver a exigirse rendimiento máximo al caballo. Puesto que el corazón es capaz de inicialmente equilibrar las disfunciones trabajando más duro, una enfermedad tal permanecerá indetectada en la mayoría de los casos, con la consecuencia de que el estado del corazón se deteriorará debido al esfuerzo aumentado del corazón. Los síntomas resultantes de enfermedades cardíacas, tales como fatiga, insuficiencia circulatoria, cansancio en la mayoría de los casos serán reconocibles cuando el corazón del animal ya no sea capaz de compensar la debilidad. En un caso tal, la enfermedad cardíaca ya habrá progresado tanto que la curación completa apenas será posible. El diagnóstico de enfermedades cardíacas en caballos tan pronto como sea posible sería, por lo tanto, de gran importancia y podría obviar daños irreparables o incluso prevenir que los caballos usados en deportes se vieran impedidos irrevocablemente para participar en deportes que impliquen carreras y torneos.

60 Como norma los cambios crónicos en la válvula cardíaca y el miocardio no son curables, pero la progresión adicional de la enfermedad cardíaca puede ralentizarse por el uso de medicamentos. También por esta razón, un diagnóstico temprano de una enfermedad cardíaca en desarrollo es importante. Como rutina, se usan métodos principalmente físicos para este fin, tal como auscultación de los sonidos cardíacos, el registro de un electrocardiograma, exámenes de rayos X y ultrasónicas. Estos métodos de examinación principalmente tienen la desventaja de que pueden llevarse a cabo solamente después de que sea directamente detectable un daño cardíaco ya visible o audible. Además, los métodos de examinación físicos requieren dispositivos adecuados y principalmente caros para

realizar un diagnóstico apropiado.

En general, las enfermedades cardíacas del caballo son altamente similares a enfermedades análogas en seres humanos.

En muchas enfermedades cardíacas, tales como, por ejemplo, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica, disfunción e hipertrofia ventricular izquierda, se libera BNP. Esta hormona provoca la secreción del líquido mediante los riñones y, por lo tanto, regula el sistema cardiovascular. Puesto que este péptido se produce en el corazón y se produce crecientemente si el corazón se estresa en exceso y se congestiona, la detección del nivel de BNP en sangre es un medio adecuado para evaluar la insuficiencia cardíaca.

BNP, también como otros péptidos natriuréticos, desempeña una parte importante en la regulación del equilibrio de agua y la presión sanguínea. Si la pared cardíaca se estira, libera más BNP, dando como resultado una secreción de sodio y líquido mediante el riñón y en una dilatación de los vasos sanguíneos que, en suma, son capaces de reducir la presión sanguínea y el llenado del corazón. BNP se sintetiza por las células del músculo cardíaco como proBNP que, finalmente, se escinde en BNP y proBNP N-terminal. Ambas partes del BNP se secretan en la sangre y pueden detectarse en la misma.

Las enfermedades cardíacas en animales se tratan, entre otros, en las siguientes publicaciones relevantes: Bright JM y Cali JV, *J Am Vet Med Assoc* 2000,216: 1110-4; Guglielmini C, *Vet Res Commun* 2003, 27 Suppl 1:555; Boswood A *et al.*, *J Small Anim Pract* 2003, 44: 104-8; Takemura N *et al.*, *J Vet Med Sci* 2003, 65: 1265-7; MacDonald KA *et al.*, *J Vet Intern Med* 2003, 17: 172-7; Greco DS *et al.*, *Can Vet J* 2003, 44: 293-7; Monnet E *et al.*, *J Am Vet Med Assoc* 1997, 211: 569-72; Hamlin RL *et al.*, *J Vet Intern Med* 1996, 10: 85-7; Gaschen L *et al.*, *J Vet Intern Med* 1999, 13: 346-56.

Ya se conoce una pluralidad de métodos en la técnica anterior por medio de los cuales puede detectarse proBNP humano, o los fragmentos del mismo, respectivamente, en el suero de un individuo. Los documentos EP 0 648 228 B1, WO 03/87819 y FR 2 843 396 pueden mencionarse aquí como ejemplos.

En el documento US 2004/0018577, se ha descrito un inmunoensayo que comprende al menos tres anticuerpos que son capaces de unirse a diferentes epitopos de un analito. Los analitos a detectar aquí se refieren particularmente a la detección de marcadores respecto a enfermedades cardíacas, en los que entre otros pueden detectarse también BNP y proBNP.

Biondo A. W. *et al.* (*Vet. Pathol.* 2003, 40(5):501-506) describe un método para detectar ANP y BNP en gatos por medio de anticuerpos policlonales que se dirigen contra un péptido de ANP que comprende los aminoácidos 1 a 28 y contra un péptido que comprende los aminoácidos 43 a 56 de proBNP, respectivamente.

En el documento EP 1 016 867 A1, se ha descrito un inmunoensayo para la detección de preproBNP en mamíferos. Aquí, se usan anticuerpos que se dirigen contra péptidos que comprenden los aminoácidos 27 a 102, 73 a 102 y 27 a 64 de BNP humano.

Jortani S.A. *et al.* (*Clin.Chem.*2003, 50(2):265-278) describe el uso de BNP y sus formas prepro- y pro- como posibles marcadores para enfermedades cardíacas. Este artículo no menciona ninguna región peptídica preferida de BNP que sería adecuada para detectar enfermedades cardíacas en caballos.

En el documento WO 2000/35951, se han descrito varios péptidos, contra los que pueden producirse anticuerpos que son adecuados en un método para diagnosticar enfermedades cardíacas. Aquí, se describen tres péptidos que comprenden los aminoácidos 1 a 13, 37 a 49 y 65 a 76 de la proteína NT-pro-BNP humana que también pueden emplearse para la producción de anticuerpos que se dirigen contra estos péptidos.

En el documento WO 2006/027374 A, se han descrito ensayos de BNP específicos para perros y gatos. Se ha mostrado que por medio de los anticuerpos descritos en él, BNP también podría detectarse en algunos otros animales, pero no pudo proporcionarse una detección específica de BNP de caballo hasta el momento.

En Mifune H *et al.* (*Anat. Embryol. (Berl)* 192(1995): 117-21), se ha descrito un método para detectar péptidos BNP y ANP inmunorreactivos en la aurícula de corazones de caballo.

En el documento EP 1 557 431 A1, se ha descrito un método para cuantificar BNP humano en el que se usan anticuerpos dirigidos contra los epitopos que comprenden los restos aminoacídicos 5-13, 1-10, 15-25 y 17-32 de BNP humano.

Richter R. *et al.* (*Acta Anat (Basel)*, 162 (1998): 185-93) describe la localización de ANP en los corazones de caballos.

En Coupal *et al.* (*Peptides* 1998, (1998): 572-573) se examina la interacción de ANP y en particular de BNP con el

receptor correspondiente NPR-A. Los autores de esta publicación usaron un fragmento de BNP que se fotomarcó mediante el uso de análogos de fenilalanililo.

5 En el documento US 2004/096919 se describe un ensayo de ELISA y un kit de ensayo de diagnóstico que pueden usarse para determinar los niveles de NT-proBNP en fluidos corporales. Esta solicitud de patente de Estados Unidos se refiere a proBNP humano y fragmentos específicos del mismo.

10 Además, existen en el mercado varios kits de ensayo para la detección de proBNP humano y sus fragmentos (por ejemplo de Roche y Biomedica). Sin embargo, no existe ningún método conocido por medio del cual pueda determinarse específicamente proBNP en muestras equinas. Por lo tanto, y a causa de las exámenes físicos complejas y caras de los caballos, es un objeto de la presente invención proporcionar medios adecuados para determinar proBNP y sus fragmentos, respectivamente en muestras de caballos. En particular, se permitirá con la misma un diagnóstico oportuno de una enfermedad cardíaca incipiente.

15 En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para determinar NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprenden las etapas de:

- proporcionar una muestra equina,
- poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que se une específicamente a NT-proBNP equino y
- 20 - determinar la presencia y/o concentración del NT-proBNP equino o fragmentos del mismo existentes en la muestra.

25 Con la presente invención, se proporciona la determinación de NT-proBNP equino en la que se describen anticuerpos específicos contra esta especie. De esta manera, puede conseguirse un diagnóstico eficaz y temprano de enfermedades cardíacas en un caballo que es altamente relevante.

30 Preferentemente, la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, el al menos un anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo de NT-proBNP específico de SEC ID N°: 1, en particular a un epítipo seleccionado de los epítipos con las secuencias PLGGLGPASEQS, PASEQSGIQELL, LLDRLGDSVLEP, SVLEPQAERMTL, PQAERMTLEPLQ, EPLQQDRGPAAE, LQQDRGPAAEASE, DRGPAAESETRG, PAEASETRGAAP, RGAAPTGVLGPR, LGPRTKVLQALR, PRTKVLQALRGL o LQALRGLRSPKM.

35 Preferiblemente, en la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, se usa adicionalmente al menos un anticuerpo de NT-proBNP que no es específico de NT-proBNP equino.

40 De acuerdo con una realización preferida del método de acuerdo con la invención, se usan adicionalmente al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, al menos un anticuerpo que es específico para pre-proBNP equino, en particular un anticuerpo que se une específicamente al menos a un epítipo de SEC ID N°: 1, seleccionado de epítipos con las secuencias SPKMMRNSGCFG (SEC ID N°: 16) o DRIGSFSGLGCN (SEC ID N°: 17).

45 Se señala que las secuencias de NT-proBNP y proBNP equinos, respectivamente, se mencionan como ejemplo para la familia de caballo completa, por lo que aminoácidos individuales en las secuencias de proBNP de animales de otros géneros de esta familia que se desvían de las secuencias descritas en este documento también se incluyen por las secuencias descritas en este documento, siempre que estos aminoácidos que se desvían no se relacionen con los epítipos de los anticuerpos descritos en este documento de manera que ya no sea posible una unión específica. Las secuencias de aminoácidos que se describen en este documento para las otras especies se han publicado en bases de datos públicas.

50 Las muestras usadas en el método de acuerdo con la invención comprenden muestras líquidas, tales como, por ejemplo, sangre, orina, pero también muestras tisulares, tales como, por ejemplo, secciones tisulares de la musculatura cardíaca o del cerebro. Según se requiera, las muestras pueden prepararse de forma apropiada por ejemplo para facilitar o hacer posible la puesta en contacto posterior de la muestra con los anticuerpos de la invención. Por lo tanto, pueden proporcionarse fracciones que contienen proBNP, NT-proBNP, o fragmentos de los mismos, respectivamente, a partir de muestras sanguíneas o las muestras tisulares pueden, por ejemplo, homogeneizarse y separarse de forma similar de las fracciones no proteináceas.

60 La unión de al menos un anticuerpo con un epítipo del NT-proBNP equino en la muestra significa que el anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo en una región de secuencia definida de una proteína específica, no siendo capaz este anticuerpo de unirse específicamente a epítipos de la proteína externamente a la región definida.

65 De acuerdo con la invención, un anticuerpo que es capaz de unirse a un epítipo específico de caballo puede usarse para determinar NT-proBNP y proBNP o fragmentos de los mismos. Sin embargo, puede ser ventajoso usar varios (por ejemplo dos, tres, cuatro o cinco) anticuerpos que sean capaces de unirse a diferentes epítipos del NT-proBNP.

La presencia y/o concentración del NT-proBNP equino o fragmento del mismo existente en la muestra puede determinarse por métodos conocidos en la técnica anterior. Como ejemplo, debería mencionarse llevar a cabo inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo ELISA) en muestras líquidas o métodos inmunohistoquímicos en muestras tisulares, respectivamente.

5 “Anticuerpos” de acuerdo con la presente invención también comprende fragmentos de anticuerpos capaces de reconocer un epítipo de acuerdo con la invención. Por lo tanto, un anticuerpo puede, por ejemplo, existir únicamente en la porción F(ab) que tiene el sitio de unión a antígeno. Estos fragmentos de anticuerpo pueden además ser parte de un anticuerpo biespecífico o de un heteromínuculo (consúltese, por ejemplo, el documento EP1 100 830 B1).

10 “NT-proBNP o fragmentos del mismo” de acuerdo con la invención comprende todos los fragmentos de NT-proBNP que se forman *in vivo* o que se producen *in vitro* (por ejemplo, mezclando una muestra con proteasa o sustancias químicas, tales como CNBr) y que tienen los epítipos de acuerdo con la invención.

15 En un método de acuerdo con la presente invención, pueden usarse varios anticuerpos capaces de unirse específicamente a varios epítipos diferentes en proBNP equino. Por esta razón, puede usarse al menos un anticuerpo que es capaz de unirse al menos a un epítipo de acuerdo con la invención. Además, debería mencionarse aquí que las regiones de aminoácidos indicadas aquí no necesitan tener solamente un epítipo, sino que pueden comprender además varios epítipos, dependiendo de su tamaño. Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención comprende el uso de una combinación de varios anticuerpos capaces de unirse específicamente al menos a un epítipo.

20 De acuerdo con una realización preferida, el al menos un anticuerpo es policlonal y/o monoclonal. Por supuesto, de acuerdo con la invención también se subsumen variaciones funcionales de anticuerpos completos, sus fragmentos o derivados bajo el término “anticuerpo” por el experto en la materia o se entiende que son medios equivalentes a los anticuerpos.

25 Los anticuerpos empleados en un método de acuerdo con la invención pueden ser tanto policlonales como también monoclonales. Para producir estos anticuerpos, se usan fragmentos peptídicos que comprenden las regiones de aminoácidos descritas en este documento del proBNP equino. Estos fragmentos peptídicos pueden producirse sintéticamente (Merrifield R. P., 1963, J Am. Chem. Soc 85, 2000, 149), recombinantemente o por degradación química o enzimática de proBNP de origen recombinante o nativo. Dependiendo de su tamaño, los péptidos recuperados de los mismos se unirán a un vehículo inmunogénico (por ejemplo KLH) o se usarán directamente para producir anticuerpos policlonales o monoclonales (por ejemplo Kohler G. y Milstein C, 1975, Nature 256: 495; Galfre *et al.*, 1977, Nature 266:550). De acuerdo con la invención, los anticuerpos también pueden producirse de forma recombinante. Los métodos para producir anticuerpos recombinantes se conocen suficientemente por el experto en la materia (consúltese, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001).

40 De acuerdo con una realización preferida adicional, al menos un anticuerpo adicional se une al al menos un anticuerpo o al al menos un epítipo, por lo que, por ejemplo, el ensayo de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo como un ensayo de tipo sándwich.

45 La unión de un epítipo adicional al al menos un anticuerpo hace posible determinar el segundo y, indirectamente, el epítipo unido al al menos un anticuerpo, cualitativamente y cuantitativamente, respectivamente. Si el al menos un anticuerpo adicional se une al al menos un epítipo, es posible, mediante un inmunoensayo enzimático, determinar cualitativa y cuantitativamente la unión del al menos un anticuerpo con el al menos un epítipo si, por ejemplo, el al menos un anticuerpo se inmoviliza en una fase sólida.

50 Preferiblemente, el al menos un anticuerpo y/o el al menos un anticuerpo adicional se marcan.

55 En este caso, el al menos un anticuerpo y/o el al menos un anticuerpo adicional se marcan por una enzima, tal como peroxidasa, en particular peroxidasa de rábano rústico, biotina, colorante fluorescente, en particular fluoresceína (FITC, DFTF), R-ficoeritrina (PE), peridinio-clorofila-proteína (PerCP) y conjugados en tándem, tales como PE-Cy5 o PE-Texas Red, coloides de oro o radionúclidos.

60 Marcando uno de los dos anticuerpos, es posible determinar por una reacción secundaria o también determinar directamente la presencia y concentración, respectivamente, del anticuerpo marcado unido al al menos un epítipo. Los anticuerpos en sí mismos podrían, a su vez, detectarse por conjugados de proteína A (por ejemplo conjugado de proteína A y oro).

El al menos un anticuerpo o el al menos un anticuerpo adicional pueden unirse a una fase sólida.

65 Mediante dicha unión del al menos un anticuerpo o del al menos un anticuerpo adicional, pueden producirse microplacas de anticuerpos, placas de microtitulación recubiertas o dispositivos de flujo lateral, por ejemplo, que pueden emplearse en una pluralidad de métodos.

Preferiblemente, la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1 se lleva a cabo por un método seleccionado del grupo que consiste en radioinmunoensayo, ensayo de inmunounión, transferencia de Western, inmunohistoquímica, inmunoensayo enzimático, dispositivo de flujo lateral (LFD, tiras de ensayo) y combinaciones de los mismos.

Los métodos anteriormente mencionados se conocen suficientemente para el experto en la materia. Una revisión de estos métodos puede, por ejemplo, encontrarse en "Bioanalytik" (Lottspeich y Zorbas, Spektrum Verlag 1998). Se han descrito dispositivos de flujo lateral (LFD, tiras de ensayo) en el documento WO 02/059567, por ejemplo.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a anticuerpos o mezclas de anticuerpo que se unen específicamente a un NT-proBNP equino. De acuerdo con la invención, "que se une específicamente" significa que por estos anticuerpos, la forma equina de la proteína se reconoce específicamente y que estos anticuerpos no se unen a proBNP de otras especies. En este caso, es suficiente si los anticuerpos muestran esta especificidad en ciertas condiciones fácilmente determinables por el experto en la materia, incluso si en condiciones menos rigurosas (en el ensayo de unión de antígeno/anticuerpo) esta especificidad no está presente. En particular, por "específico" de acuerdo con la presente invención se entiende que el anticuerpo o mezcla de anticuerpos, respectivamente, de acuerdo con la invención (por ejemplo, la preparación de anticuerpos policlonales o la mezcla de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítomos) es capaz de distinguir NT-proBNP equino de proBNP humano, murino, de rata, porcino, bovino, canino, felino o de oveja en un ensayo de unión (es decir, entra en una unión diferente o se une a preBNP equino exclusivamente, respectivamente).

Preferiblemente, los anticuerpos o la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención se une específicamente al menos a un epítomo de SEC ID N°: 1, seleccionado de los epítomos con las secuencias PLGGLGPASEQS (SEC ID N°: 3), PASE-QSGIQELL (SEC ID N°: 4), LLDRLGDSVLEP (SEC ID N°: 5), SVLEPQAERMTL (SEC ID N°: 6), PQAERMTLEPLQ (SEC ID N°: 7), EPLQQDRGPAAE (SEC ID N°: 8), LQQDRGPAAEASE (SEC ID N°: 9), DRGPAAEASETRG (SEC ID N°: 10), PAEASETRGAAP (SEC ID N°: 11), RGAAPTGVLGPR (SEC ID N°: 12), LGPRTKVLQALR (SEC ID N°: 13), PRTKVLQALRGL (SEC ID N°: 14), LQALRGLRSPKM (SEC ID N°: 15), SPKMMRNSGCFG (SEC ID N°: 16) o DRIGSFSGLGCN (SEC ID N°: 17). La unión específica a los epítomos específicos de caballo mencionados en este documento se consigue por los anticuerpos de acuerdo con la invención preferiblemente en polipéptidos mayores, principalmente en pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP o BNP equinos. En este caso los anticuerpos de acuerdo con la invención no entran en ninguna unión significativa con polipéptidos homólogos correspondientes de otras especies, al menos no en condiciones suficientemente rigurosas (es decir tales condiciones como se usan habitualmente en métodos de inmunodiagnóstico clínico de BNP. Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente por cromatografía de afinidad específica de epítomos o como anticuerpos monoclonales específicos de epítomo (en cada caso mediante el uso de mapeo de epítomos).

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID. N°: 1 o fragmentos específicos de la misma, en particular los aminoácidos 8 a 113, 8 a 81 y 82 a 113 de SEC ID N°: 1. Los aminoácidos 1 a 7 ya no están presentes en pre-proBNP (secuencia señal); con el aminoácido 82 (S), comienza la hormona de BNP equina madura. Un fragmento "específico" de SEC ID N°: 1 es un fragmento que difiere en al menos un resto aminoacídico de las secuencias de prepro-BNP conocidas y comprende al menos 8, en particular al menos 10 aminoácidos. Los fragmentos de la invención particularmente preferidos comprenden preferiblemente uno o más epítomos seleccionados del grupo que consiste en PLGGLGPASEQS (SEC ID N°: 3), PASEQSGIQELL (SEC ID N°: 4), LLDRLGDSVLEP (SEC ID N°: 5), SVLEPQAERMTL (SEC ID N°: 6), PQAERMTLEPLQ (SEC ID N°: 7), EPLQQDRGPAAE (SEC ID N°: 8), LQQDRGPAAEASE (SEC ID N°: 9), DRGPAAEASETRG (SEC ID N°: 10), PAEASETRGAAP (SEC ID N°: 11), RGAAPTGVLGPR (SEC ID N°: 12), LGPRTKVLQALR (SEC ID N°: 13), PRTKVLQALRGL (SEC ID N°: 14), LQALRGLRSPKM (SEC ID N°: 15), SPKMMRNSGCFG (SEC ID N°: 16) o DRIGSFSGLGCN (SEC ID N°: 17).

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un polipéptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias PLGGLGPASEQS (SEC ID N°: 3), PASEQSGIQELL (SEC ID N°: 4), LLDRLGDSVLEP (SEC ID N°: 5), SVLEPQAERMTL (SEC ID N°: 6), PQAERMTLEPLQ (SEC ID N°: 7), EPLQQDRGPAAE (SEC ID N°: 8), LQQDRGPAAEASE (SEC ID N°: 9), DRGPAAEASETRG (SEC ID N°: 10), PAEASETRGAAP (SEC ID N°: 11), RGAAPTGVLGPR (SEC ID N°: 12), LGPRTKVLQALR (SEC ID N°: 13), PRTKVLQALRGL (SEC ID N°: 14), LQALRGLRSPKM (SEQ ID No. 15), SPKMMRNSGCFG (SEC ID N°: 16) o DRIGSFSGLGCN (SEC ID N°: 17).

El polipéptido de la invención puede sintetizarse químicamente o aislarse a partir de una muestra o producirse recombinantemente, respectivamente.

Para producir de forma apropiada el epítomo a partir de un péptido que se ha aislado de una muestra o que se ha producido de forma recombinante, dicho péptido puede procesarse adicionalmente por métodos enzimáticos o químicos conocidos por sí mismos. Los polipéptidos de acuerdo con la invención también pueden preporcionarse como conjugados con moléculas adicionales, preferiblemente con moléculas adicionales en el extremo N o C terminal de los péptidos, en particular con polipéptidos adicionales que no se conectan de forma natural con los

polipéptidos de la invención.

5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención para determinar NT-proBNP equino o fragmentos del mismo en un método de acuerdo con la invención.

Los péptidos de la invención pueden usarse en forma marcada en inmunoensayos competitivos.

10 Preferiblemente, los péptidos de acuerdo con la presente invención se usan para producir un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos.

Además, los péptidos de acuerdo con la presente invención se usan como un control positivo o como un patrón para determinaciones de concentración en un método de acuerdo con la invención.

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit para determinar NT-proBNP equino o fragmentos del mismo, que comprende al menos un anticuerpo o al menos una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, medios para la detección cualitativa y/o cuantitativa de una unión del al menos un anticuerpo o de la al menos una mezcla de anticuerpos con NT-proBNP o fragmentos del mismo y opcionalmente péptidos de acuerdo con la invención (es decir proBNP equino o fragmentos del mismo) como un control positivo o un patrón para una
20 determinación de concentración.

De acuerdo con la invención, el kit puede comprender al menos un anticuerpo adicional.

25 Este anticuerpo adicional tiene una avidéz para el al menos un anticuerpo o también para el al menos un epítipo.

De acuerdo con una realización preferida, el al menos un anticuerpo y/o el al menos un anticuerpo adicional se marcan.

30 Preferiblemente, dicho marcaje comprende enzimas, tales como peroxidasa, en particular peroxidasa de rábano rusticano, biotina, colorantes fluorescentes, en particular fluoresceína (FITC, DFTF), R-ficoeritrina (PE), peridinio-clorofila-proteína (PerCP) y conjugados en tándem, tales como PE-Cy5 o PE-Texas Red, coloide de oro o radionúclidos.

35 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un kit de la invención en un método para determinar proBNP equino.

40 La presente invención describe adicionalmente un método para producir de forma recombinante los polipéptidos de la invención, en el que un ácido nucleico que codifica estos polipéptidos se introduce en un organismo huésped adecuado, los polipéptidos se expresan por el huésped de una manera conocida por sí misma y se recuperan los polipéptidos expresados. Estos métodos, incluyendo huéspedes adecuados, sistemas de expresión y método para recuperar los polipéptidos como tal se conocen para el experto en la materia.

45 Por otro lado, los polipéptidos de la invención también pueden sintetizarse químicamente, preferiblemente mediante el método de fase sólida (Merryfield). También para esto, está disponible un conjunto de métodos conocidos por sí mismos para el experto en la materia.

50 La presente invención también se refiere al uso de los anticuerpos de la invención para diagnosticar enfermedades cardíacas en un caballo. En este caso, los anticuerpos pueden usarse en las preparaciones conocidas para seres humanos. Los polipéptidos de la invención pueden también usarse, por ejemplo, como una muestra comparativa convencional o para valorar anticuerpos que aún no han reaccionado.

La invención se explicará en más detalle por medio de los siguientes ejemplos y figuras sin, sin embargo, restringirse a los mismos.

55 La Figura 1 muestra una disposición de secuencias de BNP ya conocidas (SEC ID N°: 32-39) de diversas especies en comparación con la secuencia de acuerdo con la invención;

La Figura 2 muestra el diseño de variantes de pre-proBNP equino (SEC ID N°: 40-45);

La Figura 3 muestra un análisis estructural comparativo de los pre-proBNP de diversas especies;

60 La Figura 4 muestra un análisis estructural de la variante más probable del pre-proBNP de caballo (eq-pre-proBNP);

La Figura 5 muestra el aislamiento de eq-pre-proBNP;

La Figura 6 muestra el análisis del ARN total en un gel de agarosa 1,2 %: M) GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas), 150 ng, 1) ARN total, mitad derecha del corazón, 1 µg, 2) ARN total, mitad izquierda del corazón, 1 µg;

65 La Figura 7 muestra el análisis de los ADNc bc en un gel de agarosa 1,2 %: M) GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas), 150 ng, 1) ADNc bc de tejido cardíaco equino, 120 ng;

La Figura 8 muestra una secuencia parcial del ADNc del pre-pro-BNP de caballo;

La Figura 9 muestra el árbol filogenético de secuencias de diversos péptidos natriuréticos; las secuencias de aminoácidos individuales de los péptidos natriuréticos comparados se han tomado de bases de datos de secuencias relevantes;

5 La Figura 10 muestra la especificidad de un antisuero de NT-proBNP a diferencia de NT-proBNP de diversas especies.

Ejemplos:

10 Ejemplo 1:

1. *Diseño de secuencias de pre-proBNP de caballo:*

15 Incluso aunque las secuencias de aminoácidos de las moléculas de algunas especies (perro, gato, vaca) que son análogas a pre-pro-BNP humano ya se han aclarado, nadie ha sido capaz hasta el momento de aislar el pre-pro-BNP del caballo y caracterizarlo. Esto se debe probablemente a la baja homología de secuencia de las moléculas de pre-pro-BNP de diferentes especies animales (Figura 1). Por lo tanto, se han desarrollado secuencias que podrían corresponder a los tramos de aminoácidos de los pre-proBNP del caballo. Estas secuencias no resultan obvias por las secuencias previamente publicadas de las moléculas de pre-proBNP de otras especies puesto que, como ya se ha mencionado, existe solamente una ligera correlación de estas secuencias. La selección de las más prometedoras de las variantes de secuencia hipotéticas (Figura 2) se han efectuado por un nuevo enfoque en el que las secuencias se han sometido a un análisis molecular por medio de introducción proteómica.

20 Al hacerlo, algunas variantes de las secuencias establecidas en ciertas regiones mostraron sorprendentemente una correlación significativa de los denominados factores de reconocimiento que sugiere una alta conservación estructural y funcional, respectivamente, de estas estructuras y, por lo tanto, una alta probabilidad para la corrección de la variante de secuencia. La Figura 3 proporciona un estudio de los análisis moleculares llevados a cabo. La Figura 4 muestra el análisis estructural análogo para la variante de secuencia más probable.

30 Puesto que los picos en los diagramas de factor de reconocimiento corresponden a áreas con alta antigenicidad y disponibilidad de epítomos, se ha deducido que los anticuerpos contra las regiones 1-20 y 45-55 deberían ser adecuados para preparar eq-pre-proBNP equinos. Tales anticuerpos se produjeron y el aislamiento de las moléculas descrito posteriormente se llevó a cabo con ellos.

35 2. *Preparación de BNP de caballo a partir del suero:*

El pre-proBNP de caballo se purifica por medio de cromatografía de inmunoafinidad y se detecta en un ELISA competitivo.

40 Se centrifugó suero de caballo durante 10 minutos a 2000 rpm y se almacenó a -20 °C después de la adición de Proclin300 1 ml/l.

45 Se cargó Estreptavidina-Sepharose (AMERSHAM) con anticuerpo S2190 biotinilado purificado AA45-55. (Parámetros de columna 100 µg de anticuerpo/ml de Estreptavidina-Sepharose). Parámetros de elución: tampón de unión borato 0,05 M, pH 8,0, tampón de elución, tampón de glicina 0,1 M, pH 2,0, 0,5 ml/min.

3. *Detección de eq-pre-proBNP por medio de ELISA competitivo:*

50 El eq-pre-proBNP recuperado se detectó en un ELISA mediante el uso de un anticuerpo contra la secuencia 1-20. Se usó un péptido marcado con peroxidasa de una secuencia correspondiente como una molécula indicadora. La figura 5 muestra la correlación de la inmunorreactividad con el perfil de elución de la cromatografía de afinidad.

55 Debido a la inmunorreactividad bien medible, se asumió que eq-pre-proBNP, de hecho, se había aislado y basándose en las secuencias parciales determinadas, se llevó a cabo una amplificación biológica molecular del eq-pre-proBNP (4).

4. *Amplificación del eq-pre-proBNP de ARN total del tejido cardíaco de caballo:*

Material de partida:

60 Dos tubos pequeños con tejido cardíaco de caballo en RNALater que se denotaron por derecha e izquierda, respectivamente.

Aislamiento de ARN total:

65 El aislamiento del ARN total se efectuó con el kit Midi de Tejido Fibroso RNeasy de Quiagen de acuerdo con las

instrucciones del productor. Se usaron 200 mg de tejido de cada una de las mitades izquierda y derecha del corazón, respectivamente, para el aislamiento.

La calidad del ARN total se analizó en un gel de agarosa 1,2 % (Figura 6).

Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc de la primera cadena se efectuó con el Kit de Construcción de Bibliotecas de BD Biosciences de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como el molde, se usó 1 µg de ARN total. Se preparó ADNc bicatenario (ADNc bc) por amplificación por PCR (15 ciclos) con el cebador de PCR 5' y el cebador de PCR 3'/CDS III.

La calidad del ADNc bc se analizó en un gel de agarosa 1,2 % (Figura 7).

Amplificación por PCR:

Por medio de secuencias de referencia dadas, se derivaron varios cebadores de PCR. Para la amplificación del extremo 3' del gen de proBNP, se usaron cebadores directos específicos de gen y el cebador de síntesis de ADNc 3'. Para la amplificación del extremo 5', se usaron cebadores inversos específicos de gen y un cebador que abarcaba la región 3' del oligo SMARTIV.

Se separaron los productos específicos de PCR mediante geles de agarosa preparatorios y los fragmentos se escindieron del gel. El aislamiento del ADN se efectuó con el Kit NucleoSpin Extract II Kit de Macherey-Nagel de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de PCR se secuenciaron cada uno con los cebadores específicos de gen. Los datos de secuencia se adaptaron con el programa SeqMan (DNASStar Lasergene Software), y las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de nucleótidos y proteínas de la base de datos de Genbank.

Clonación:

El fragmento de PCR que mostró muy buenas homologías con las secuencias de proBNP se clonó en el plásmido pA11i10. El ADN plasmídico de varios clones se aisló y se secuenció. Los datos de la secuencia se adaptaron con el programa SeqMan, se retiró la secuencia del vector y se ensamblaron las secuencias obtenidas. Se identificaron transcritos de diferentes longitudes. Esto se debe al hecho de que los transcritos se poliadenilan cada uno en diferentes posiciones. La secuencia consenso resultante corresponde al transcrito más corto y se muestra en la Figura 6.

Par amplificar el fragmento de PCR específico de proBNP, se usó un 27mer (5'-CTCCTGCTCCTCCTSTTCTTGACCTG-3' (SEC ID N°: 18)). La letra S significa los nucleótidos C o G. Ambas variantes se han encontrado en los clones. Por lo tanto, los primeros 27 nucleótidos (nueve aminoácidos) de la secuencia obtenida no pueden considerarse seguros, puesto que no están predeterminados por el cebador. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos derivada del pre-proBNP de caballo puede indicarse como sigue:

SPLGGRSYPL GGLGPASEQS GIQELLDRLG DSVLEPQAER MTLEPLQQDR
GPAEASETRG AAPTGVLGPR TKVLQALRGL RSPKMMRNSG CFGRRLDRI
SFSGLGCNVL RRY (Sec. ID. N°: 1)

La secuencia de proBNP se lee como sigue (la hormona BNP activa está subrayada); la secuencia de NT-proBNP consiste por lo tanto en la parte no subrayada de SEC ID N°: 2:

YPLGGLGPAS EQSGIQELLD RLGDSVLEPQ AERMTLEPLQ QDRGPAEASE
TRGAAPTGVL GPRTKVLQAL RGLRSPKMMR NSGCFGRRLD RIGSFSGLGC
NVLRRY (Sec. ID. N°: 2)

Para la amplificación del extremo 5' completo del propéptido, se sintetizaron 22 cebadores inversos específicos de secuencia y se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en diversas condiciones. Se obtuvieron fragmentos de PCR específicos y se secuenciaron, pero no pudo determinarse la secuencia 5' del propéptido. Quizás el extremo 5' no pudo amplificarse, puesto que el ARN total mostró señales de degradación. Quizás el extremo 5' del proBNP se ha degradado.

La secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID N°: 1 se comparó en el programa MegAlign (DNASStar Lasergene Software) con diversas secuencias de péptido natriuréticos de tipos A, B y C por medio del método de ClustalW. La relación filogenética detectada de la secuencia se ilustró en un árbol filogenético (consúltese Figura 9). La Figura 9 muestra que el proBNP de caballo se localiza en el grupo de los péptidos natriuréticos de tipo B y muestra la mayor homología con la secuencia peptídica de cerdo.

5. *Especificidad de los anticuerpos de la invención:*

La especificidad de los anticuerpos de la invención se caracteriza principalmente en que son capaces de distinguir la molécula equina de los homólogos de otras especies conocidas (seres humanos, ratón, rata, cerdo, vaca, perro, gato y oveja) mediante los epítomos únicos en pre-proBNP equino.

La especificidad con respecto al epítomo PLGGLGPASEQS (SEC ID N°: 3) significa por ejemplo que el anticuerpo de la invención se une a este epítomo, pero no se une, o se une con una afinidad notablemente menor (por ejemplo distinguible en el ELISA) a PLGSPGSASDLE (humano) (SEC ID N°: 19), PLGSPSQSPEQF (ratón) (SEC ID N°: 20), PLGSPSQSPEQS (rata) (SEC ID N°: 21), PLGGAGLASELP (cerdo) (SEC ID N°: 22), PLGGPGPVSELP (vaca) (SEC ID N°: 23), PLGGRS-PASEAS (perro) (SEC ID N°: 24), PLGGPGPASEAS (gato) (SEC ID N°: 25) y PLGGPGSASELP (oveja) (SEC ID N°: 26). Esto se mantiene de forma análoga para los epítomos preferidos adicionales PASEQSGIQELL (SEC ID N°: 4), LLDRLGDSVLEP (SEC ID N°: 5), SVLEPQAERMTL (SEC ID N°: 6), PQAERMTLEPLQ (SEC ID N°: 7), EPLQQDRGPAAE (SEC ID N°: 8), LQQDRGPAAEASE (SEC ID N°: 9), DRGPAAEASETRG (SEC ID N°: 10), PAEASETRGAAP (SEC ID N°: 11), RGAAPT-GVLGPR (SEC ID N°: 12), LGPRTKVLQALR (SEC ID N°: 13), PRTKVLQALRGL (SEC ID N°: 14), LQALRGLRSPKM (SEC ID N°: 15), SPKMMRNSGCFG (SEC ID N°: 16) o DRIGSFSGLGCN (SEC ID N°: 17) (cada uno en comparación con las secuencias de acuerdo con la Figura 1). La unión específica a los epítomos específicos equinos mencionada aquí se consigue por los anticuerpos de la invención preferiblemente dentro del alcance de unión a polipéptidos mayores, principalmente a pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP o BNP.

Ejemplo 2:

Objetivo del experimento:

Prueba de una "especificidad de especie" de los antisueros de oveja generados para NT-proBNP.

Método:

Ensayo de la reactividad de los antisueros equinos con NT-proBNP de otras especies.

Procedimiento:

Recubrimiento de placas

Se recubrieron placas de microtitulación con NT-proBNP recombinante (1 µg/ml, 200 µg/pocillo, pH 9,6, tampón carbonato 0,02 M) de diversas especies durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron y se bloquearon durante 1 hora con una solución de tampón de bloqueo (PBS 10 mM pH 7,4 que contenía peptona 2 % (p/v) y leche desnatada en polvo 0,1 % (p/v)) durante 1 hora.

La solución de bloqueo se aspiró y las placas se secaron durante una noche a 30 °C.

Procedimiento de ELISA

Se diluyó antisuero para NT-proBNP equino 1:10000 en PBS 0,1 M, pH 7,3 y se aplicaron 200 µl de esta solución a las placas que se habían recubierto con NT-proBNP recombinante. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se mezclaron 200 µl de conjugado anti oveja de conejo-HRP durante 30 minutos. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con 200 µl de tetrametilbencidina (TMB) durante 10 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 0,1 M y la densidad óptica se midió a 450 nm con un dispositivo de lectura de microplacas convencional.

Resultados:

La reactividad con NT-proBNP recombinante de las siguientes especies se ensayó con las secuencias indicadas a continuación (proBNP humano, SEC ID N°: 27; proBNP de ratón, SEC ID N°: 28; proBNP de rata, SEC ID N°: 29; proBNP de gato, SEC ID N°: 30; proBNP de caballo, SEC ID N°: 31):

proBNP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
humano	H	P	L	G	S	P	G	s	A	S	D	L	E	T	s	G	L	Q	E	Q
ratón	Y	P	L	G	s	P	S	Q	S	P	E	Q	F	K	M	Q	K	L	L	E.
rata	H	P	L	G	s	P	S	Q	S	P	E	Q	S	T	M	Q	K	L	L	E
gato	H	P	L	G	G	P	G	P	A	S	E	A	S	A	I			Q	E	L
caballo	Y	P	L	G	G	L	G	P	A	s	E	Q	s			G	I	Q	E	L

proBNP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
humano	R	N	H	L	Q	G	K	L	S	E	L	Q	V	E	Q	T	s	L	E	P
ratón	L	I	R	E	K	S	E	E	M	A										
rata	L	I	R	E	K	S	E	E	M	A	Q	R	Q	L	S	K	D	Q	G	P
gato	L	D	G	L	R	D	T	V	S	E	L	Q	E	A	Q	M	A	L	G	P
caballo	L	D	R	L	G	D	S	V	L	E	P	Q	A	E	R	M	T	L	E	P
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
humano	L	Q	E	s	P	R	P	T	G	V	w	K	s	R	E	V	A	T	E	G
ratón				Q	R	Q	L	L	K	D	Q	G	L	T	K	E	H	p	K	R
rata	T	K	E	L	L			V	L	R	S	Q	D	S	A	F	R	I	Q	E
gato	L	Q	Q	G	H	S	P	A	E	S	W	E	A	Q	E	E	P	p	A	R
caballo	L	Q	Q	D	R	G	P	A	E	A	S	E	T	R	G	A	A	p	T	G
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76				
humano	I	R	G	H	R	K	M	V	L	Y	T	L	R	A	P	R				
ratón	V	L	R	S	Q	G	s	T	L	R	V	Q	Q	R	P	Q				
rata	R	L	R																	
gato	V	L	A	P	H	D	N	V	L	R	A	L	R	R	L	G				
caballo	V	L	G	P	R	T	K	V	L	Q	A	L	R	G	L	R				

La afinidad relativa del antisuero con las moléculas de NT-proBNP inmovilizadas se puso en relación a la afinidad del antígeno con respecto a NT-proBNP equino (afinidad a NT-proBNP equino = 100 %)

	humano	gato	rata	ratón	caballo
afinidades rel.	2 %	7 %	5 %	1 %	100 %

5 *Conclusión:*

Los antisueros de oveja anti NT-proBNP equino fueron específicos, mostrando solamente reactividad cruzada ligera con NT-proBNP humano, de gato, de rata o de ratón.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG
- 5 <120> Método para determinar NT-proBNP
- <130> R 51665
- <150> AT A 365/2007
- 10 <151> 07-03-2007
- <160> 45
- <170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Equus caballus
- 20 <400> 1

Ser Pro Leu Gly Gly Arg Ser Tyr Pro Leu Gly Gly Leu Gly Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Glu Gln Ser Gly Ile Gln Glu Leu Leu Asp Arg Leu Gly Asp Ser
 20 25 30
 Val Leu Glu Pro Gln Ala Glu Arg Met Thr Leu Glu Pro Leu Gln Gln
 35 40 45
 Asp Arg Gly Pro Ala Glu Ala Ser Glu Thr Arg Gly Ala Ala Pro Thr
 50 55 60
 Gly Val Leu Gly Pro Arg Thr Lys Val Leu Gln Ala Leu Arg Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Pro Lys Met Met Arg Asn Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu
 85 90 95
 Asp Arg Ile Gly Ser Phe Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Arg
 100 105 110
 Tyr

- 25 <210> 2
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Equus caballus
- 30 <400> 2

Tyr Pro Leu Gly Gly Leu Gly Pro Ala Ser Glu Gln Ser Gly Ile Gln
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Asp Arg Leu Gly Asp Ser Val Leu Glu Pro Gln Ala Glu
 20 25 30

Arg Met Thr Leu Glu Pro Leu Gln Gln Asp Arg Gly Pro Ala Glu Ala

35

40

45

Ser Glu Thr Arg Gly Ala Ala Pro Thr Gly Val Leu Gly Pro Arg Thr
 50 55 60

Lys Val Leu Gln Ala Leu Arg Gly Leu Arg Ser Pro Lys Met Met Arg
 65 70 75 80

Asn Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Phe Ser
 85 90 95

Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Arg Tyr
 100 105

5 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP equino
 <400> 3

Pro Leu Gly Gly Leu Gly Pro Ala Ser Glu Gln Ser
 1 5 10

15 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP equino
 <400> 4

Pro Ala Ser Glu Gln Ser Gly Ile Gln Glu Leu Leu
 1 5 10

25 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino

5 <400> 5

Leu Leu Asp Arg Leu Gly Asp Ser Val Leu Glu Pro
1 5 10

10 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino

<400> 6

Ser Val Leu Glu Pro Gln Ala Glu Arg Met Thr Leu
1 5 10

20 <210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino

<400> 7

Pro Gln Ala Glu Arg Met Thr Leu Glu Pro Leu Gln
1 5 10

30 <210> 8
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Artificial

40 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino

<400> 8

Glu Pro Leu Gln Gln Asp Arg Gly Pro Ala Glu Ala
1 5 10

45 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino

<400> 9

Leu Gln Gln Asp Arg Gly Pro Ala Glu Ala Ser Glu
1 5 10

5 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP equino
 <400> 10

Asp Arg Gly Pro Ala Glu Ala Ser Glu Thr Arg Gly
1 5 10

15 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP equino
 <400> 11

Pro Ala Glu Ala Ser Glu Thr Arg Gly Ala Ala Pro
1 5 10

25 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP equino
 35 <400> 12

Arg Gly Ala Ala Pro Thr Gly Val Leu Gly Pro Arg
1 5 10

40 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP equino
 <400> 13

Leu Gly Pro Arg Thr Lys Val Leu Gln Ala Leu Arg
1 5 10

50 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino

5 <400> 14

Pro Arg Thr Lys Val Leu Gln Ala Leu Arg Gly Leu
1 5 10

10 <210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino
<400> 15

Leu Gln Ala Leu Arg Gly Leu Arg Ser Pro Lys Met
1 5 10

20 <210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino
<400> 16

Ser Pro Lys Met Met Arg Asn Ser Gly Cys Phe Gly
1 5 10

30 <210> 17
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> fragmento de NT-proBNP equino
40 <400> 17

Asp Arg Ile Gly Ser Phe Ser Gly Leu Gly Cys Asn
1 5 10

45 <210> 18
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador
<400> 18
ctcctgctcc tctsttctt gcacctg 27

55 <210> 19
<211> 12

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP humano

<400> 19

Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu
1 5 10

10 <210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP murino

<400> 20

Pro Leu Gly Ser Pro Ser Gln Ser Pro Glu Gln Phe
1 5 10

20 <210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP de rata

<400> 21

Pro Leu Gly Ser Pro Ser Gln Ser Pro Glu Gln Ser

1 5 10

30 <210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP porcino

40 <400> 22

Pro Leu Gly Gly Ala Gly Leu Ala Ser Glu Leu Pro
1 5 10

45 <210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> fragmento de NT-proBNP bovino

<400> 23

Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Val Ser Glu Leu Pro
1 5 10

5 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP de perro
 <400> 24

Pro Leu Gly Gly Arg Ser Pro Ala Ser Glu Ala Ser
1 5 10

15 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP de gato
 <400> 25

Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Ala Ser
1 5 10

25 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> fragmento de NT-proBNP de oveja
 <400> 26

Pro Leu Gly Gly Pro Gly Ser Ala Ser Glu Leu Pro

1 5 10

35 <210> 27
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 27

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
 20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
 35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
 50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg
 65 70 75

5 <210> 28
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28

Tyr Pro Leu Gly Ser Pro Ser Gln Ser Pro Glu Gln Phe Lys Met Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Glu Leu Ile Arg Glu Lys Ser Glu Glu Met Ala Gln Arg
 20 25 30

Gln Leu Leu Lys Asp Gln Gly Leu Thr Lys Glu His Pro Lys Arg Val
 35 40 45

Leu Arg Ser Gln Gly Ser Thr Leu Arg Val Gln Gln Arg Pro Gln
 50 55 60

10 <210> 29
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

15 <400> 29

His Pro Leu Gly Ser Pro Ser Gln Ser Pro Glu Gln Ser Thr Met Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Glu Leu Ile Arg Glu Lys Ser Glu Glu Met Ala Gln Arg
 20 25 30

Gln Leu Ser Lys Asp Gln Gly Pro Thr Lys Glu Leu Leu Val Leu Arg
 35 40 45

Ser Gln Asp Ser Ala Phe Arg Ile Gln Glu Arg Leu Arg
 50 55 60

20 <210> 30
 <211> 74

<212> PRT
 <213> Felis catus

<400> 30

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ile Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Gly Leu Arg Asp Thr Val Ser Glu Leu Gln Glu Ala
 20 25 30
 Gln Met Ala Leu Gly Pro Leu Gln Gln Gly His Ser Pro Ala Glu Ser
 35 40 45
 Trp Glu Ala Gln Glu Glu Pro Pro Ala Arg Val Leu Ala Pro His Asp
 50 55 60
 Asn Val Leu Arg Ala Leu Arg Arg Leu Gly
 65 70

5

<210> 31
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

10

<400> 31

Tyr Pro Leu Gly Gly Leu Gly Pro Ala Ser Glu Gln Ser Gly Ile Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Arg Leu Gly Asp Ser Val Leu Glu Pro Gln Ala Glu
 20 25 30
 Arg Met Thr Leu Glu Pro Leu Gln Gln Asp Arg Gly Pro Ala Glu Ala
 35 40 45
 Ser Glu Thr Arg Gly Ala Ala Pro Thr Gly Val Leu Gly Pro Arg Thr
 50 55 60
 Lys Val Leu Gln Ala Leu Arg Gly Leu Arg
 65 70

15

<210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 32

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
 20 25 30
 Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
 35 40 45
 Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
 50 55 60
 Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
 65 70 75 80
 Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 100 105

5
 <210> 33
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 33

Tyr Pro Leu Gly Ser Pro Ser Gln Ser Pro Glu Gln Phe Lys Met Gln
 1 5 10 15
 Lys Leu Leu Glu Leu Ile Arg Glu Lys Ser Glu Glu Met Ala Gln Arg
 20 25 30
 Gln Leu Leu Lys Asp Gln Gly Leu Thr Lys Glu His Pro Lys Arg Val
 35 40 45
 Leu Arg Ser Gln Gly Ser Thr Leu Arg Val Gln Gln Arg Pro Gln Asn
 50 55 60
 Ser Lys Val Thr His Ile Ser Ser Cys Phe Gly His Lys Ile Asp Arg
 65 70 75 80
 Ile Gly Ser Val Ser Arg Leu Gly Cys Asn Ala Leu Lys Leu Leu
 85 90 95

10
 <210> 34
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus
 15
 <400> 34

His Pro Leu Gly Ser Pro Ser Gln Ser Pro Glu Gln Ser Thr Met Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Glu Leu Ile Arg Glu Lys Ser Glu Glu Met Ala Gln Arg
 20 25 30

Gln Leu Ser Lys Asp Gln Gly Pro Thr Lys Glu Leu Leu Val Leu Arg
 35 40 45

Ser Gln Asp Ser Ala Phe Arg Ile Gln Glu Arg Leu Arg
 50 55 60

<210> 35
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sus sp.

5

<400> 35

His Pro Leu Gly Gly Ala Gly Leu Ala Ser Glu Leu Pro Gly Ile Gln
 1 5 10 15

Glu Arg Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala
 20 25 30

Glu Arg Thr Asp Leu Glu Pro Leu Arg Gln Asp Arg Gly Leu Thr Glu
 35 40 45

Ala Trp Ala Arg Glu Ala Ala Pro Thr Gly Val Leu Gly Pro Arg Ser
 50 55 60

Ser Ile Phe Gln Val Arg Leu Gly Ile Arg Ser Pro Lys Thr Met Arg
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser
 85 90 95

Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Arg Tyr
 100 105

<210> 36
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

10

15

<400> 36

His Pro Val Gly Gly Pro Gly Pro Val Ser Glu Leu Pro Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30
 Gln Leu Arg Val Glu Leu Pro Gln Gln Gly Gln Gly Leu Glu Glu Thr
 35 40 45
 Trp Asp Ser Pro Ala Ala Ala Pro Ala Gly Phe Leu Gly Pro His His
 50 55 60
 Ser Ile Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Lys Met Met Arg Asp Ser Gly
 65 70 75 80
 Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gly Leu Gly
 85 90 95
 Cys Asn Val Leu Arg Arg Tyr
 100

<210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Canis lupus

<400> 37

His Pro Leu Gly Gly Arg Ser Pro Ala Ser Glu Ala Ser Gly Leu Trp
 1 5 10 15
 Ala Val Gln Glu Leu Leu Gly Arg Leu Lys Asp Ala Val Ser Leu Glu
 20 25 30
 Gln Ala Glu Gln Leu Ala Leu Glu Pro Leu His Arg Ser His Ser Pro
 35 40 45
 Ala Glu Ala Pro Glu Ala Gly Gly Thr Pro Arg Gly Val Leu Ala Pro
 50 55 60
 His Asp Ser Val Leu Gln Ala Leu Arg Arg Leu Arg Ser Pro Lys Met
 65 70 75 80
 Met His Lys Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Lys Tyr
 100 105

10 <210> 38
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Felis catus

15 <400> 38

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ile Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Gly Leu Arg Asp Thr Val Ser Glu Leu Gln Glu Ala
 20 25 30
 Gln Met Ala Leu Gly Pro Leu Gln Gln Gly His Ser Pro Ala Glu Ser
 35 40 45
 Trp Glu Ala Gln Glu Glu Pro Pro Ala Arg Val Leu Ala Pro His Asp
 50 55 60
 Asn Val Leu Arg Ala Leu Arg Arg Leu Gly Ser Ser Lys Met Met Arg
 65 70 75 80
 Asp Ser Arg Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser
 85 90 95
 Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Arg His
 100 105

<210> 39
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> ovis sp.

5

<400> 39

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Ser Ala Ser Glu Leu Pro Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30
 Gln Leu Arg Val Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Glu Glu Thr
 35 40 45
 Trp Asp Ser Pro Ala Ala Ala Pro Ala Gly Phe Leu Gly Pro His His
 50 55 60
 Ser Leu Leu Gln Ala Leu Arg Gly Pro Lys Met Met Arg Asp Ser Gly
 65 70 75 80
 Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gly Leu Gly
 85 90 95
 Cys Asn Val Leu Arg Arg Tyr
 100

10

<210> 40
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>

<223> fragmento de una variante de NT-proBNP equino

<400> 40

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Leu Pro Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30
 Gln Leu Ala Leu Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Glu Glu
 35 40 45

5

<210> 41
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> fragmento de una variante de NT-proBNP equino

<400> 41

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Leu Pro Gly Ile Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30
 Gln Leu Ala Val Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Ala Glu
 35 40 45

15

<210> 42
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> fragmento de una variante de NT-proBNP equino

<400> 42

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Leu Pro Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30
 Gln Leu Asp Leu Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Thr Glu
 35 40 45

25

<210> 43
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> fragmento de una variante de NT-proBNP equino

35

<400> 43

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Leu Pro Gly Ile Gln
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30

Gln Leu Asp Val Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Glu Glu
 35 40 45

<210> 44
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> fragmento de una variante de NT-proBNP equino

<400> 44

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Leu Pro Gly Leu Gln
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30

Gln Leu Arg Leu Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Ala Glu
 35 40 45

<210> 45
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> fragmento de una variante de NT-proBNP equino

<400> 45

His Pro Leu Gly Gly Pro Gly Pro Ala Ser Glu Leu Pro Gly Ile Gln
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu
 20 25 30

Gln Leu Arg Val Glu Pro Leu Gln Gln Gly Gln Gly Leu Thr Glu
 35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar NT-proBNP equino, o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende las etapas de:
- 5 -proporcionar una muestra equina,
- poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que se une específicamente a NT-proBNP equino y
- 10 -determinar la presencia y/o concentración del NT-proBNP equino o fragmentos del mismo existentes en la muestra.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** en la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, el al menos un anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo de NT-proBNP específico de SEC ID N°: 1, en particular a un epítipo seleccionado de los epítopos con las secuencias PLGGLGPASEQS, PASEQSGIQELL, LLDRLGDSVLEP, SVLEPQAERMTL, PQAERMTLEPLQ, EPLQQDRGPAAE, LQQDRGPAAEASE, DRGPAAEASETRG, PAEASETRGAAP, RGAAPTGVLGPR, LGPRTKVLQALR, PRTKVLQALRGL o LQALRGLRSPKM.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado por que** en la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, se usa adicionalmente al menos un anticuerpo de NT-proBNP que no es específico de NT-proBNP equino.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** en la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, se usa adicionalmente al menos un anticuerpo que es específico de pre-proBNP equino, en particular un anticuerpo que se une específicamente al menos a un epítipo de SEC ID N°: 1, seleccionado de los epítopos con las secuencias SPKMMRNSGCFG o DRIGSFSGLGCN.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo es policlonal y/o monoclonal.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la determinación de NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, se lleva a cabo por un método seleccionado del grupo que consiste en radioinmunoensayo, ensayo de inmunounión, transferencia de Western, inmunohistoquímica, inmunoensayo enzimático, dispositivo de flujo lateral (LFD, tiras de ensayo) y combinaciones de los mismos.
- 35 7. Un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos **caracterizado por que** se une específicamente a NT-proBNP equino.
- 40 8. El anticuerpo o mezcla de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** se une al menos a un epítipo de SEC ID N°: 1, seleccionado de los epítopos con las secuencias PLGGLGPASEQS, PASEQSGIQELL, LLDRLGDSVLEP, SVLEPQAERMTL, PQAERMTLEPLQ, EPLQQDRGPAAE, LQQDRGPAAEASE, DRGPAAEASETRG, PAEASETRGAAP, RGAAPTGVLGPR, LGPRTKVLQALR, PRTKVLQALRGL, LQALRGLRSPKM, SPKMMRNSGCFG o DRIGSFSGLGCN.
- 45 9. Polipéptido con la secuencia de aminoácidos SEC ID. N°: 1 o fragmentos del mismo con los aminoácidos 8 a 113, 8 a 81 y 82 a 113 de SEC ID N°: 1.
- 50 10. Secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias PLGGLGPASEQS, PASEQSGIQELL, LLDRLGDSVLEP, SVLEPQAERMTL, PQAERMTLEPLQ, EPLQQDRGPAAE, LQQDRGPAAEASE, DRGPAAEASETRG, PAEASETR-GAAP, RGAAPTGVLGPR, LGPRTKVLQALR, PRTKVLQALRGL, LQALRGLRSPKM, SPKMMRNSGCFG o DRIGSFSGLGCN.
- 55 11. El uso de un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para determinar NT-proBNP equino o fragmentos del mismo en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 60 12. El uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10 para producir un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 65 13. Un kit para determinar NT-proBNP equino o fragmentos del mismo que comprenden al menos 8 aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende al menos un anticuerpo o al menos una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, medios para la detección cualitativa y/o cuantitativa de una unión del al menos un anticuerpo o de la al menos una mezcla de anticuerpos con NT-proBNP equino o con los fragmentos del mismo y opcionalmente péptidos de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10 como un control positivo o un patrón para una determinación de concentración.

- 5 14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado por que** el medio para la detección cualitativa y/o cuantitativa de una unión del al menos un anticuerpo o de la al menos una mezcla de anticuerpos con proBNP equino o con los fragmentos del mismo comprende al menos un anticuerpo adicional.
- 10 15. El kit de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, **caracterizado por que** el al menos un anticuerpo y/o el al menos un anticuerpo adicional están marcados.
- 15 16. El uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
17. El uso *in vitro* de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para diagnosticar enfermedades cardíacas en un caballo.
18. El uso *in vitro* de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10 para diagnosticar enfermedades cardíacas en un caballo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47
 proBNP humano H P L G S P G S A S D L E T S G L Q E Q R N H L Q G K L S E L Q V E Q T S L E P L Q E S P R P
 proBNP de ratón Y P L G S P S O S P E E Q F K M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L
 prepro-BNP de rata H P L G S P S O S P E E Q S I M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L
 BNP-32 porcino H P L G S P S O S P E E Q S I M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L
 proBNP bovino H P L G S P S O S P E E Q S I M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L
 proBNP de perro H P L G S P S O S P E E Q S I M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L
 proBNP de gato H P L G S P S O S P E E Q S I M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L
 proBNP de oveja H P L G S P S O S P E E Q S I M Q K L L E L I R E K S E E M A Q R Q L S K D Q Q P T K E L L

48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93
 proBNP humano T G V W K S R E V A T E G I R G H R K M V L Y T L R A P R S P K M V Q O S G C F G R K M D R
 proBNP de ratón L K D Q G L T K E H P K R V L R S Q G S T L R V Q Q R P Q N S K V T H I S S C F G H K I D R
 prepro-BNP de rata V L R S Q Q S A F R I Q E R L R
 BNP-32 porcino I E A W A B E A A P T G V L Q P B S S I F Q V R L G I R S P K T M R D S G C F G R R L D R
 proBNP bovino E E T W D S P A A A P A G F L G P H H S I L R A L R P P G K M M R D S G C F G R R L D R
 proBNP de perro P A E A P E A G G T P R Q V L A P H D S Y L Q A L R R L R S P K M M H H K S G C F G R R L D R
 proBNP de gato A E S W E A Q E E P P A R V L A P H D N Y L R A L R R L G S S K M M R D S R C F G R R L D R
 proBNP de oveja E E T W D S P A A A P A G F L Q A L R G P K M M R D S G C F G R R L D R

94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
 proBNP humano I S S S G L G C K V L R R H
 proBNP de ratón I G S V S R L G C N A L K L L
 prepro-BNP de rata I G S L S G L G C N V L R R Y
 BNP-32 porcino I G S L S G L G C N V L R R Y
 proBNP bovino I G S L S G L G C N V L R R Y
 proBNP de perro I G S L S G L G C N V L R R Y
 proBNP de gato I G S L S G L G C N V L R R Y
 proBNP de oveja I G S L S G L G C N V L R R Y

Fig.1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47				
Var1	H	P	L	G	P	G	P	A	S	E	L	P	G	L	Q	E	L	L	D	R	L	R	D	R	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	A	E	Q	L	A	L	E	P	L	Q	Q	G	G	L		
Var2	H	P	L	G	P	G	P	A	S	E	L	P	G	I	Q	E	L	L	D	R	L	R	D	R	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	A	V	E	P	L	Q	Q	G	G	L						
Var3	H	P	L	G	P	G	P	A	S	E	L	P	G	L	Q	E	L	L	D	R	L	R	D	R	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	D	L	E	P	L	Q	Q	G	G	L						
Var4	H	P	L	G	P	G	P	A	S	E	L	P	G	I	Q	E	L	L	D	R	L	R	D	R	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	D	V	E	P	L	Q	Q	G	G	L						
Var5	H	P	L	G	P	G	P	A	S	E	L	P	G	L	Q	E	L	L	D	R	L	R	D	R	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	R	L	E	P	L	Q	Q	G	G	L						
Var6	H	P	L	G	P	G	P	A	S	E	L	P	G	I	Q	E	L	L	D	R	L	R	D	R	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	R	V	E	P	L	Q	Q	G	G	L						

Fig.2

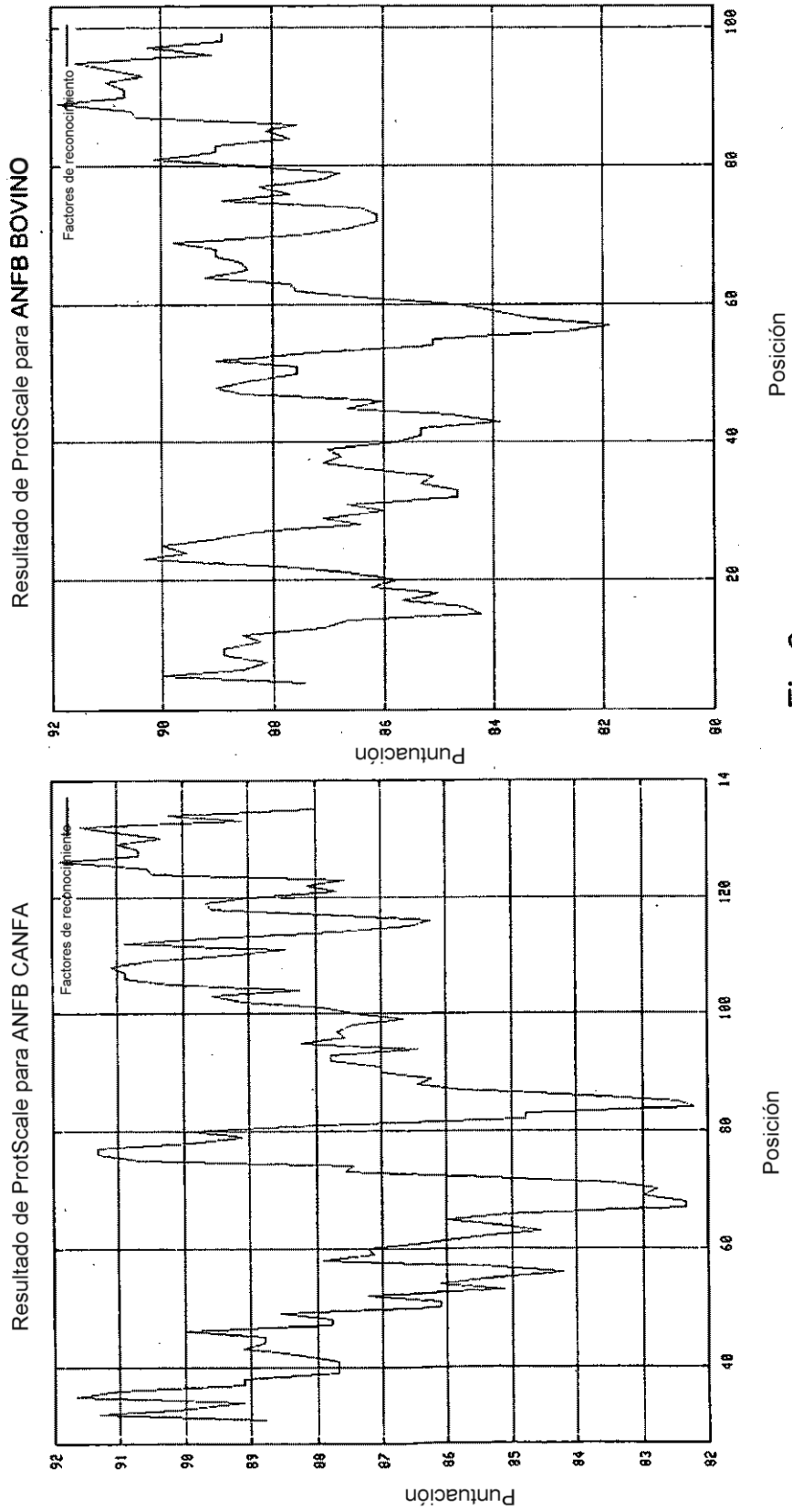


Fig.3

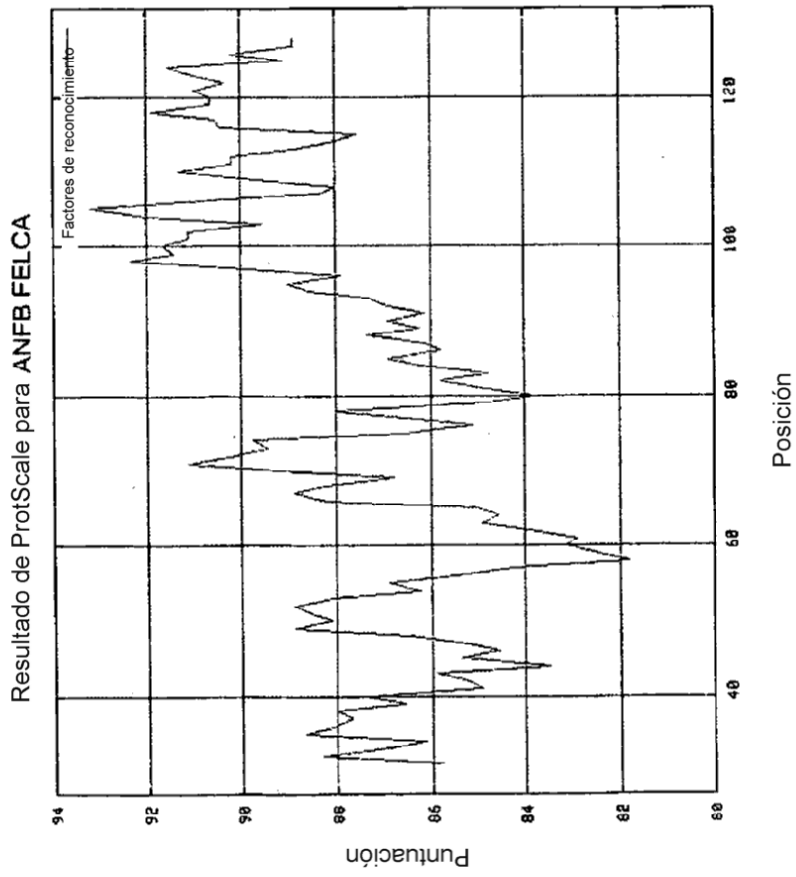
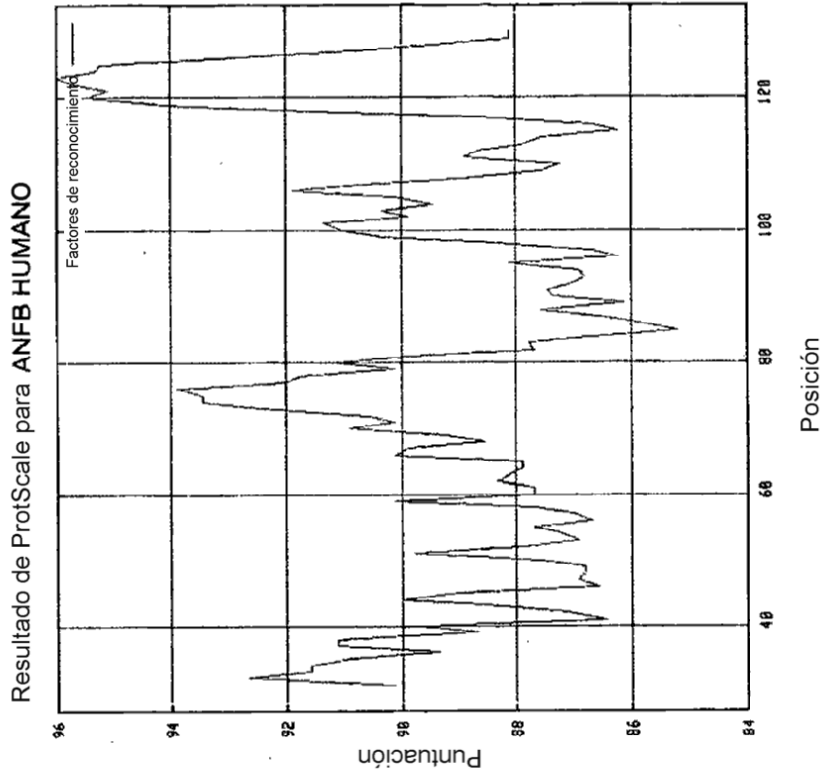


Fig.3 (Continuación)

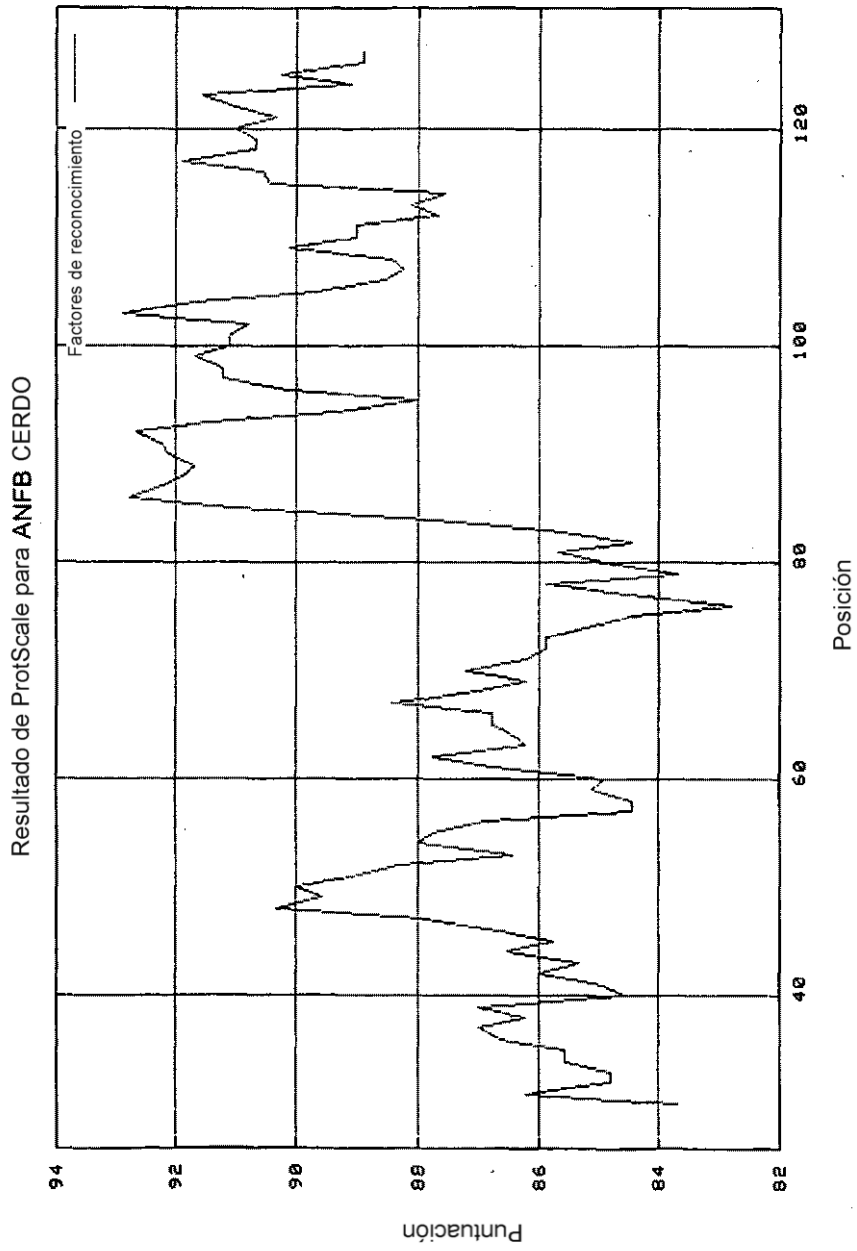


Fig.3 (Continuación)

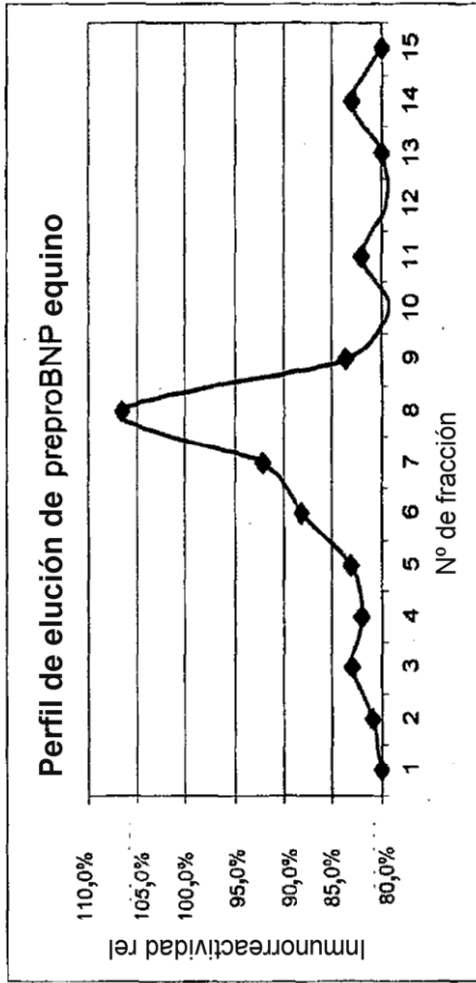
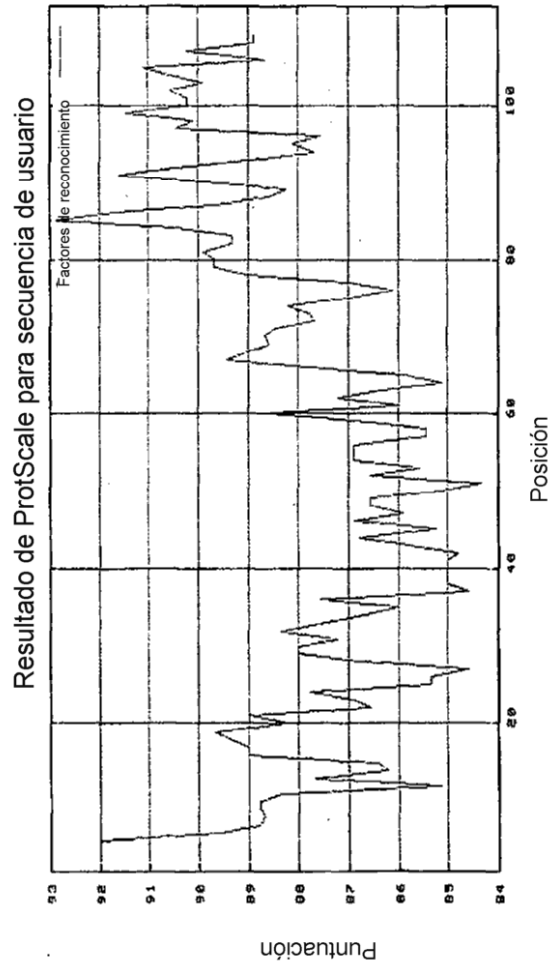


Fig.5

Fig.4



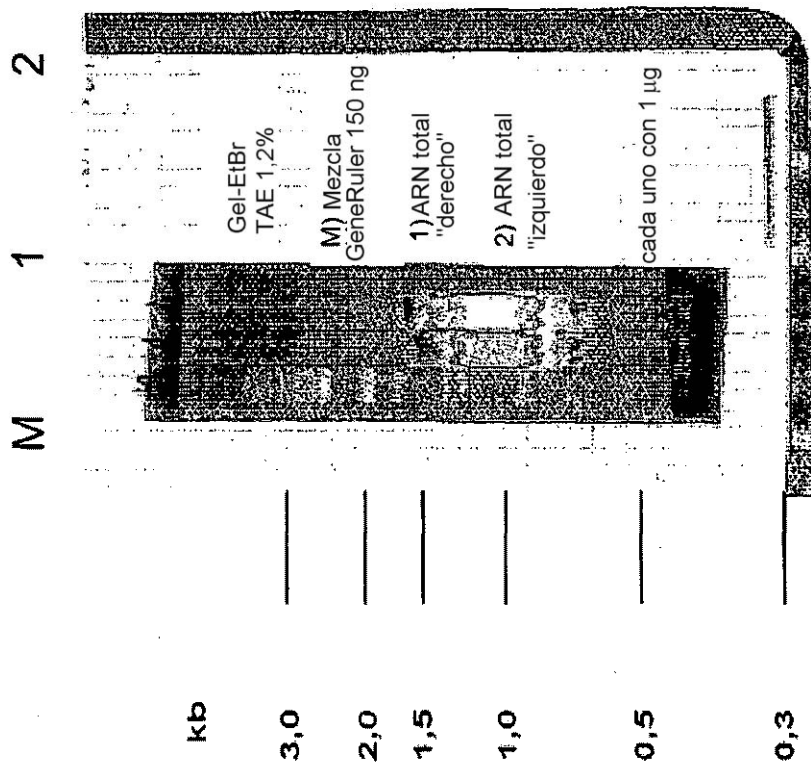


Fig.6

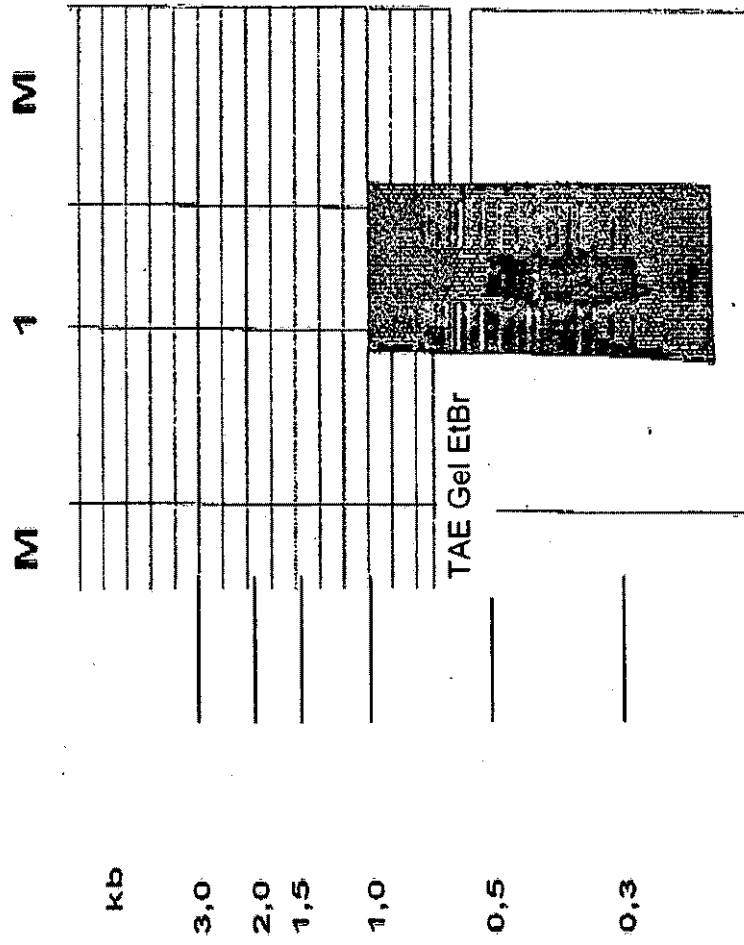


Fig.7

```

5' 0  C T C T G C T C C T T C T T G C A C C T G T C G C C C G T G G A G G T C G T T C T T A C C C A C T G G G G C C C T C G G C C
0 1  G A G G A C G A G G A A G A A C G T G G A C A G C G G C G A C C C T C C A G C A A G G A T G G G T A C C C G C C G G A G C C G G
1 2  L L L L L F L L H L S P L G G R S Y P L G G L G
0 3'  C G C C T C G G A A C A G T C C G G A A T A C A G G A C T C T G S A C C G T T G G G A G A C T C C G T C T T G G A G C C G C A G G C
5' 0  G G G A G C C T T G T C A G G C C T T A T G I C C T G A C A C C T G G C A A C C C T T G A G G C A G A A C C T C G G C G T C C G
0 1  P A S E Q S G I Q E L L D R L G D S V L E P Q A
0 2'  A G A C G G A T G A C C C T G G A G C C C T C C A G C A G G A C C G T G G C C C C G C A G A A G C C T C G G A G A C C C G G G G G C A
5' 0  T C T C G C T A C T G G G A C C T C G G G A G G T C G T C C T G G C A C C G G G C G T T C T G G A G C C T T C G G A G C C T T G G C C C C C G T
0 1  E R M T L E P L Q Q D R G P A E A S E T R G A
0 2'  G C C C T A C G G G T G T C C T T G G C C C G C A G A G G T C C T C A G G C C C T G C G G G A C T A C G C A G C C C C A A G A
5' 0  C G G G A T G C C C A C A G G A C C C G G G C G T T C C A G G A G T C C G G G A C C C C T G A T G C C T G A T G C C T G G G G T T C T
0 1  A P T G V L G P R T K V L Q A L R G L R S P K
0 2'  T G A T G C C A A C T C G G G C T C T C G G G G A G G C T A G A C C G G A T C G G C T C C T T C A G T G G C C T S G G C T G C A A
5' 0  A C T A C G C G T T G A G C C C G A C G A A G C C C G C C T C C G A T C T G C C T A G C C G A G G A A G T C A C C G G A C C C G A C G T T
0 1  M R N S G C F G R R L D R I G S F S G L G C N
0 2'  T G T G C T G A G G A G G T A T T A G A G A A G T C C T G G C C G C A G A C A A C C G C A T C T G A C T C T C C A T C A A C C C C C T G
5' 0  A C A C G A C T C C C A T A A T T C T C T T C A G G A C C G G C G T C T G T T G C G T A G A C T G A G A G G T A G T T G G G G G A C
0 1  Y L R R Y E E V L A A D N R I L S I N P L
0 2'  A T C C C C T G A A G C A A C T A T T T A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T A T A A G A T
5' 0  T A G G G A G A C T T C G T T G A G G A T A A T A A T A A C A T A A T A A T A A T A A T A A T C H A C A A A A T A T A T T C T A
0 1  I P S E A T P I Y L F V F I Y L F R L F Y I R
0 2'  G G C T C T T A C C T T T G A C A C A A A T T T G C T G T G S G A A T A A A A T C A A T G T T A T G G C
5' 0  C G A G A A T G G A A A C T C G T T T A A C G A C A C C A C T T T A T T T T T A G T T A C A A T A C C G
0 1  W L L P L S T N L L W N K I N V M A

```

Fig.8

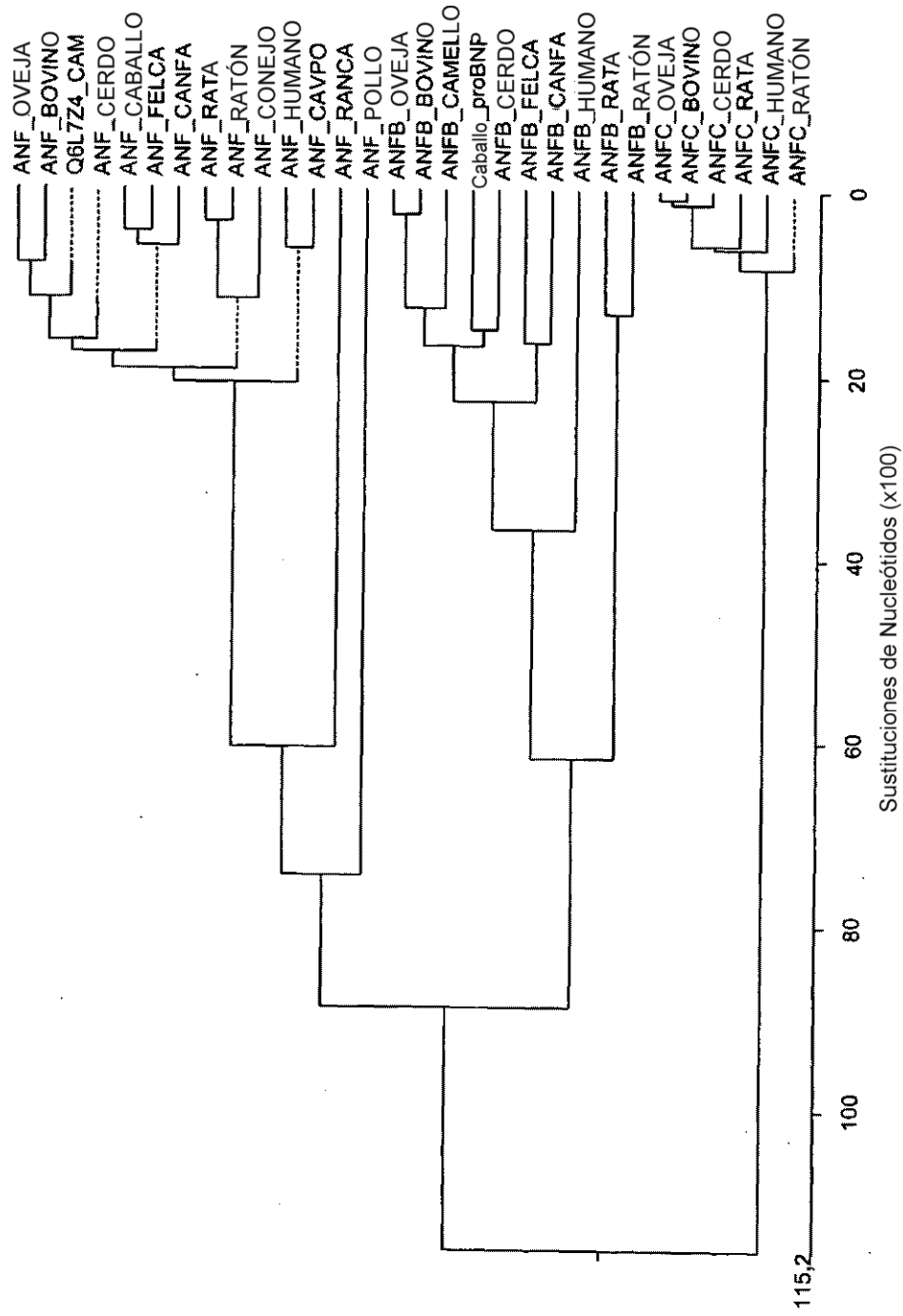


Fig.9

Fig.10

