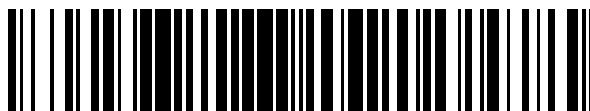


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 122**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 14/58 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04740371 .2**

96 Fecha de presentación: **28.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1664769**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Ensayo para detectar feromonas peptídicas natriuréticas auriculares y cerebrales**

30 Prioridad:
30.06.2003 GB 0315291

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
**ORION DIAGNOSTICA OY
KOIVU-MANKKAAN TIE 6 B
02200 ESPOO, FI**

72 Inventor/es:
**VUOLTEENAHO, Olli;
ALA-KOPSALA, Minna;
RUSKOaho, Heikki;
LEPPÄLUOTO, Juhani y
HAAPALAHTI, Jouko**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

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).

ES 2 377 122 T3

DESCRIPCIÓN

Ensayo para detectar feromonas peptídicas natriuréticas auriculares y cerebrales

Campo de técnico de la invención

La invención se relaciona con métodos de ensayo útiles para el diagnóstico y/o el monitoreo del tratamiento de condiciones cardíacas tales como insuficiencia cardíaca y con sustancias para uso en los métodos

Antecedentes de la invención

La insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) es un síndrome clínico provocado por una enfermedad cardíaca, caracterizada por falta de aliento y retención anormal de agua y sodio, y que trae como consecuencia edema. Esto se presenta cuando el corazón es incapaz de generar un gasto cardíaco suficiente para satisfacer las demandas del cuerpo sin un marcado incremento de la presión diastólica. Es una consecuencia de una enfermedad cardíaca que perjudica la función sistólica o diastólica ventricular, o ambas. No es una única enfermedad sino la etapa final de muchas formas diferentes de enfermedades del corazón, las más comunes de las cuales son las enfermedades de las arterias coronarias, hipertensión y diabetes (Kannel et al. 1994). La insuficiencia cardíaca se manifiesta por síntomas de pobre perfusión tisular (por ejemplo, fatiga, pobre tolerancia al ejercicio) o congestión de los cauces vasculares (por ejemplo, disnea, edema pulmonar, edema periférico) o ambos. El tratamiento de la insuficiencia cardíaca se dirige en general hacia sus causas subyacentes.

La prevalencia de insuficiencia cardíaca sintomática en la población en general en Europa se estima que es aproximadamente del 0,4 - 2%. Como la prevalencia se eleva rápidamente con la edad, se espera que el incremento en las expectativas de vida tenga un mayor impacto sobre la incidencia de la insuficiencia cardíaca en el futuro próximo. La forma asintomática de la disfunción sistólica ventricular izquierda se estima que es tan común como insuficiencia cardíaca congestiva sintomática (McDonagh et al. 1997).

Se ha encontrado que los parámetros actuales de la rutina clínica e investigativa utilizados para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca (examen clínico, electrocardiografía, rayos X de tórax) son inadecuados debido a que el diagnóstico causa resultados que son falsos positivos (Remes et al. 1991). La ecocardiografía proporciona información específica sobre el diagnóstico y pronóstico, pero no es particularmente adecuada para selección o para diagnósticos rápidos en el punto de atención. Por lo tanto, existe la necesidad por nuevas pruebas de diagnóstico para fallo cardíaco.

Una cantidad de estudios han demostrado la utilidad de la medición de los péptidos individuales derivados de la prohormona del péptido natriurético atrial (proANP) y la prohormona del péptido natriurético cerebral (proBNP) en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca (Talwar et al 2000; De Lemos et al 2001; Daly et al 2002). El fallo cardíaco está asociado con niveles circulantes elevados de péptido natriurético atrial (ANP), péptido natriurético cerebral (BNP), un fragmento del terminal N de proANP (NTproANP) y un fragmento del terminal N de proBNP (NT-proBNP) (Sagnella 1998). Altas concentraciones en plasma están correlacionados con un pronóstico pobre después de infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca (Omland et al 2002). Además, el monitoreo de los niveles en plasma de NT-proBNP parece ofrecer una orientación más poderosa en la terapia de insuficiencia cardíaca que el seguido por parámetros clínicos convencionales (Troughton et al 2000).

Sin embargo los métodos de diagnóstico del estado del arte, tal como aquellos divulgados en WO 87/06938, WO 00/35951, WO 91/00292, US 5.786.163, EP 648 228 B1, WO 00/45176, WO 00/19207, US 6.124.430, EP 542 255 B1) o aquellos comercialmente disponibles, únicamente pretenden medir, y únicamente son capaces de medir, un solo péptido (ANP, BNP, NT-proANP o NT-proBNP) a la vez. Por ejemplo, el estado del arte divulga el uso del receptor del receptor del ANP o el receptor de NPRA (GC-A) en ensayos para determinar péptidos natriuréticos, pero no divulga ninguna determinación simultánea de péptidos natriuréticos. La patente de los Estados Unidos Número 5.747.274 divulga la detección simultánea de al menos tres marcadores cardíacos utilizando al menos tres pares diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales, cada uno específico para un marcador diferente. Por consiguiente, estos ensayos producen múltiples resultados. Por lo tanto, subsiste en el estado del arte la necesidad por un medio confiable y sensible pero relativamente económico y sencillo para detectar o diagnosticar fallo cardíaco tal como insuficiencia cardíaca.

US-A-6117644 describe un método para diagnosticar rechazo de un trasplante cardíaco en un paciente que comprende determinar el nivel de BNP o un fragmento del mismo en una muestra de fluido corporal del paciente.

Nishikimi et al (JACC 1995; 26: 1424 - 31) describe la medición de los niveles en plasma de adrenomedulina en pacientes con insuficiencia cardíaca para investigar el papel de la adrenomedulina en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca.

Qi et al (American Heart Journal 2001; 142: 725 - 732) describe un estudio que evalúa el BNP y el ANP circulante y la parte del terminal N de sus pro-péptidos como marcadores de hipotrofia ventricular izquierda y el incremento de presión atrial en pacientes con estenosis aórtica.

Ruskoaho (Endocrine Reviews 2003; 24(3): 341 - 356) revisa hormonas cardiacas como herramientas de diagnóstico en insuficiencia cardíaca.

Por lo tanto la presente invención proporciona un método de análisis que detecta la activación o inactivación de los sistemas hormonales del ANP o del BNP mediante el análisis tanto para péptidos derivados de proANP como de proBNP en forma simultánea. Tanto los péptidos derivados de proANP como de proBNP pueden ser analizados en la misma muestra, al mismo tiempo. El método produce un solo resultado y se realiza de manera similar que los métodos del estado del arte. Además los presentes métodos de análisis muestran mayor sensibilidad que los métodos del estado del arte. Aún más, la presente prueba tiene una gran capacidad para producir un resultado confiable del análisis ya sea que el paciente esté en una fase temprana o en una fase tardía de insuficiencia cardíaca. La fórmula única del ensayo de la presente invención, llevada a cabo de por sí en forma simultánea, ofrece una alternativa más económica y rentable para los análisis disponibles permitiendo así una mediación confiable de activación o inactivación tanto de los sistemas hormonales del ANP y del BNP.

Resumen de la invención

Por lo tanto la presente invención proporciona un método *in vitro* para determinar la activación o inactivación del sistema hormonal del péptido natriurético atrial (ANP) y del péptido natriurético cerebral (BNP), comprendiendo el método detectar en forma simultánea en una sola lectura o resultado la presencia o la cantidad de prohormonas del péptido natriurético atrial y cerebral (proANP y proBNP) o fragmentos de las mismas en una muestra.

La invención también provee:

- un agente que comprende:

(a)

(i) proANP (SEQ ID NO. 1), ANP (SEQ ID NO. 2) o NT-proANP (SEQ ID NO. 3);

(ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;

y

(b)

(i) pro-BNP (SEQ ID NO. 4), BNP. (SEQ ID NO. 5), NT-proBNP (SEQ ID NO. 6);

(ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;

- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica al agente, o secuencia complementaria:

- un vector de expresión y una célula huésped que incluyen al polinucleótido;

- un proceso para producir al agente polipeptídico que comprende:

(a) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido; y opcionalmente

(b) recuperar al polipéptido expresado;

- un método para identificar una sustancia que se enlaza específicamente con

(a)

(i) proANP (SEQ ID NO. 1), ANP (SEQ ID NO. 2) o NT-proANP (SEQ ID NO. 3);

(ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud y

(b)

(i) pro-BNP (SEQ ID NO. 4), BNP (SEQ ID NO. 5), NT-proBNP (SEQ ID NO. 6);

(ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud cuyo método comprende:

(A) poner en contacto una sustancia candidata con (a) y (b) bajo condiciones que permitan el enlazamiento específico; y

(B) determinar si la sustancia candidata se enlaza con (a) y (b);

- un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo que es capaz de enlazarse con ambos:

- 5 (a)
 - (i) proANP (SEQ ID NO. 1), ANP (SEQ ID NO. 2) o NT-proANP (SEQ ID NO. 3);
 - (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
 - (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud; y(b)
- 10 (i) pro-BNP (SEQ ID NO. 4), BNP (SEQ ID NO. 5) o NT-proBNP (SEQ ID NO. 6);
 - (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
 - (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud- un proceso para elaboración del anticuerpo;
- un soporte sólido que contiene al anticuerpo.
- 15 La invención provee además métodos para diagnosticar insuficiencia cardíaca y/o monitorear el tratamiento de insuficiencia cardíaca y un kit de diagnóstico para uso en tales métodos.

Breve descripción de los dibujos
Figura 1: Purificación por medio de HPLC en fase reversa de una nueva proteína o agente peptídico de la invención.
Figura 2a: Una curva de enlazamiento competitivo para el inmunoensayo de NT-proXNP.
20 Figura 2b: Desarrollo de títulos de anticuerpo en inmunización de una cabra utilizando una proteína de fusión de GST de NT-proXNP2 como inmunógeno.
Figura 3: Niveles en suero de NT-proANP, NT-proBNP y NT-proXNP en pacientes con trastornos cardíacos.
Figura 4: Niveles en suero de NT-proANP, NT-proBNP y NT-proXNP en pacientes cardíacos.
Figura 5: Response de NT-proANP, NT-proBNP y NT-proXNP en plasma y rendimiento cardíaco (CO) en pacientes de insuficiencia cardíaca a la terapia.
25 Breve descripción de las secuencias
SEQ ID NO: 1 secuencia de aminoácidos de proANP humano
SEQ ID NO: 2 secuencia de aminoácidos de ANP humano
SEQ ID NO: 3 secuencia de aminoácidos de NT-proANP humano
30 SEQ ID NO: 4 secuencia de aminoácidos de proBNP humano
SEQ ID NO: 5 secuencia de aminoácidos de BNP humano
SEQ ID NO: 6 secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano
SEQ ID NO: 7 secuencia de nucleótidos que codifica proANP humano
SEQ ID NO: 8 secuencia de nucleótidos que codifica ANP humano
35 SEQ ID NO: 9 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proANP humano
SEQ ID NO: 10 secuencia de nucleótidos que codifica proBNP humano
SEQ ID NO: 11 secuencia de nucleótidos que codifica BNP humano
SEQ ID NO: 12 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proBNP humano

SEQ ID NO: 13 secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP1

SEQ ID NO: 14 secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP2

SEQ ID NO: 15 secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP3

SEQ ID NO: 16 secuencia espaciadora de aminoácidos

5 SEQ ID NO: 17 secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP4

SEQ ID NO: 18 secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP5

SEQ ID NO: 19 secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención proXNP6

SEQ ID NO: 20: secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención XNP7

SEQ ID NO: 21 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP1

10 SEQ ID NO: 22 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP2

SEQ ID NO: 23 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP3

SEQ ID NO: 24 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP4

SEQ ID NO: 25 secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP5

SEQ ID NO: 26 secuencia de nucleótidos que codifica proXNP6

15 SEQ ID NO: 27 secuencia de nucleótidos que codifica XNP7

SEQ ID NO: 28 secuencia del iniciador

SEQ ID NO: 29 secuencia del iniciador

SEQ ID NO: 30 secuencia del iniciador

SEQ ID NO: 31 secuencia del iniciador

20 SEQ ID NO: 32 secuencia del iniciador

SEQ ID NO: 33 secuencia de aminoácidos del receptor de GC-A humano

SEQ ID NO: 34 secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del receptor de GC-A humano

SEQ ID NO: 35 secuencia de aminoácidos del receptor de GC-B

SEQ ID NO: 36 secuencia de aminoácidos del receptor de GC-C

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con un nuevo método de ensayo que es útil para diagnosticar y/o monitorear el tratamiento de una enfermedad cardíaca, en particular insuficiencia cardíaca y con componentes y kits para uso en el método. El método permite la detección de la activación o inactivación del sistema hormonal del péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético cerebral (BNP) en un individuo en forma simultánea. Se utiliza un método único de análisis. En general el método analiza en forma simultánea la presencia y/o la cantidad de péptidos derivados de prohormonas de péptidos natriuréticos de tipo A y B en una muestra biológica adecuada.

30

Términos y abreviaturas

proANP es una prohormona de péptido natriurético atrial;

proANP se procesa por medio de la escisión del fragmento del terminal N dentro del péptido natriurético atrial maduro (ANP). proANP humano tiene 126 aminoácidos (proANP₁₋₁₂₆)

35

SEQ ID NO: 1

NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG
ALGRGPWDSS DRSALLKSKL RALLTAPRSL RRSCFGGRM DRIGAQSGLG CNSFRY

ANP es un péptido natriurético atrial

40 ANP humano está formado por los aminoácidos 99 a 126 de la prohormona (proANP₉₉₋₁₂₆)

SEQ ID NO: 2

SLRRSSCFGG RMDRIGAQSG LGCNSFRY

NT-proANP es el fragmento del terminal N de proANP

El fragmento del terminal N de proANP humano está formado por los aminoácidos 1 a 98 (proANP₁₋₉₈)

5 SEQ ID NO: 3

NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG
ALGRGPWDSS DRSALLKSKL RALLTAPR

proBNP es la prohormona del péptido natriurético cerebral,

10 proBNP se procesa por medio de la escisión del fragmento del terminal N dentro del péptido natriurético cerebral maduro (BNP). proBNP humano tiene 108 aminoácidos (proBNP₁₋₁₀₈)

SEQ ID NO: 4

HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSE LQVEQTSLEP LQESPRPTGV WKSREVATEG IRGHRKVMVLY
TLRAPRSPKM VQSGSGCFGRK MDRISSSSGL GCKVLR RH

BNP es un péptido natriurético cerebral

15 BNP humano está formado por los aminoácidos 77 a 108 de la prohormona (proBNP₇₇₋₁₀₈)

SEQ ID NO: 5

SPKMVQSGSGC FGRKMDRISS SSGLGCKVLR RH

NT-proBNP es el fragmento del terminal N de proBNP

El fragmento del terminal N de proBNP humano está formado por los aminoácidos 1 a 76 (proBNP₁₋₇₆)

20 SEQ ID NO: 6

HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSE LQVEQTSLEP LQESPRPTGV WKSREVATEG IRGHRICMVLY
TLRAPR

proXNP es un agente de la invención que comprende la secuencia de aminoácidos derivada u originada a partir tanto de proANP como de proBNP

25 XNP es un agente de la invención que comprende la secuencia de aminoácidos derivada u originada a partir tanto de ANP como de BNP

NT-proXNP es un agente de la invención que comprende la secuencia de aminoácidos derivada u originada a partir tanto de NT-proANP como de NT-proBNP

NT-proXNP1 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₁₅₋₂₄ y proANP₈₂₋₉₆

30 NT-proXNP2 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₁₋₃₇ y proANP₂₉₋₉₈

NT-proXNP3 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₂₀₋₈₀

NT-proXNP4 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₁₋₇₆ y proANP₁₋₉₈

NT-proXNP5 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₆₀₋₈₀

35 proXNP6 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₁₋₁₀₈ o una subsecuencia del mismo y proANP₁₋₁₂₆ o una subsecuencia del mismo

XNP7 es un agente de la invención formado a partir de proBNP₇₇₋₉₂ o una subsecuencia del mismo y proANP₁₁₂₋₁₂₆ o una subsecuencia del mismo.

Variantes de polipéptidos

40 Se hace referencia aquí a variantes de polipéptidos. Por ejemplo, se hace referencia a variantes de proANP, ANP, NT-proANP, proBNP, BNP y NT-proBNP, en la descripción de sustancias y agentes de enlazamiento de la invención. Se hace referencia también a variantes de los polipéptidos receptores de GC-A, GC-B y GC-C.

El término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene el mismo carácter esencial o una funcionalidad biológica básica que el polipéptido relevante. De este modo una variante es típicamente capaz de complementar una o más actividades de ese polipéptido. Típicamente una variante incluye una secuencia de aminoácidos que es homóloga a toda o a una parte de la secuencia del polipéptido. En general una variante (homóloga) tiene una secuencia de aminoácidos con más del 70% de identidad, preferiblemente al menos 75% u 80% o al menos 90% y particularmente preferiblemente al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% de identidad con la secuencia dada, por ejemplo sobre una región de al menos 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o más aminoácidos contiguos. Las variantes pueden incluir variantes alélicas, especies homólogas y la supresión, modificación o adición de aminoácidos individuales o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de la proteína, siempre que el péptido mantenga una funcionalidad biológica básica del polipéptido objetivo.

Una variante alélica será una variante que se presentará en forma natural, por ejemplo, en un humano, y que funcionará en una forma sustancialmente similar a la del polipéptido relevante. En forma similar, un homólogo de la especie de una proteína será la proteína equivalente que se presenta naturalmente en otra especie y que retiene una función biológica básica del polipéptido dado. Por lo tanto, por ejemplo, una variante de un polipéptido nativo o de origen natural, tal como aquellos que pueden ser detectados en una muestra biológica, puede ser una variante alélica o un homólogo de la especie de otro polipéptido conocido.

Las variantes alélicas y los homólogos de la especie pueden ser obtenidos, por ejemplo, por medio del sondeo de una biblioteca elaborada a partir de células de la especie apropiada utilizando una sonda adecuada, para obtener clones que codifican las variantes alélicas o de la especie. Los clones pueden ser manipulados por medio de técnicas convencionales para generar un polipéptido que puede ser producido por medio de técnicas sintéticas o recombinantes ya conocidas.

Las variantes pueden incluir polipéptidos que sean de mayor longitud que el polipéptido relevante. Una variante puede incluir o consistir de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, aminoácidos hasta por ejemplo 500, 1000 o 2000 aminoácidos.

Una variante puede ser una proteína de fusión.

Las variantes pueden incluir sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 hasta 10, 20 ó 30 (ó 10, 20, 30 ó 40 hasta 50, 60 ó 70) sustituciones. El polipéptido modificado generalmente retiene la habilidad para complementar una o más de las actividades de y/o la actividad antigénica del polipéptido objetivo. Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden ser sustituidos entre sí.

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Polar no cargado	CSTM
		NQ
	Polar cargado	DE
		KR
AROMÁTICO		HFYW

Las secuencias más cortas de polipéptidos o fragmentos están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un péptido de al menos 6, 10, 12, 15, 17, 20, 25 aminoácidos o hasta 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 200, 300, 400 ó 500 aminoácidos de longitud (dependiendo del tamaño del polipéptido objetivo) se considera que cae dentro del alcance de la invención siempre que demuestre una funcionalidad biológica básica del polipéptido objetivo. En particular, pero no exclusivamente, este aspecto de la invención abarca la situación en la cual cuando la proteína es un fragmento de la secuencia completa de la proteína y puede representar un sitio de enlazamiento por otra molécula o entidad, tal como una región de enlazamiento del péptido, o un epítipo. Tales fragmentos pueden o no retener otras funciones del polipéptido objetivo.

Las variantes de polipéptidos como las mencionadas aquí generalmente retienen una funcionalidad biológica básica del polipéptido relevante. La variante puede retener una o más de las actividades biológicas nativas o funciones del polipéptido objetivo.

En particular, una variante como la mencionada aquí generalmente retiene una o más de las características de enlazamiento del polipéptido relevante. Alternativa o adicionalmente, la variante puede retener una actividad antigénica del polipéptido.

En una modalidad una variante exhibe al menos una de las propiedades de enlazamiento o de reconocimiento del polipéptido objetivo. En particular una variante puede ser capaz de enlazarse con un producto que puede enlazarse con el polipéptido por ejemplo un ligando, un receptor o un anticuerpo. De este modo, por ejemplo, una variante de ANP o BNP puede ser capaz de enlazarse con el receptor de GC-A. En forma similar, una variante del receptor de GC-A o GC-B puede enlazar ANP o BNP. Típicamente una variante enlaza al producto con una afinidad que es al

menos del 60%, tal como al menos 70, 80 ó 90%, por ejemplo 95, 97 ó 99% de la afinidad con lo cual el polipéptido relevante se enlaza con el producto. Los ensayos adecuados de enlazamiento son conocidos en el arte.

Las variantes que tienen una actividad particular o característica de enlazamiento del polipéptido dado pueden ser identificadas con base en tales actividades o características, por ejemplo a partir de una biblioteca de polipéptidos.

- 5 En una modalidad adicional una variante de polipéptido puede retener las propiedades antigénicas del polipéptido objetivo. Tal variante puede, por ejemplo, ser capaz de generar una respuesta inmune en un individuo. La respuesta inmune puede ser mediada por un anticuerpo y/o célula, tal como mediada por una célula T. De este modo una variante puede ser capaz de elevar los anticuerpos que sean específicos para y enlazarse con el polipéptido objetivo. Un péptido para generar una respuesta inmune puede ser identificado por medio de estudios de
- 10 inmunización, típicamente en un modelo animal. Por ejemplo, un péptido candidato puede ser administrado a un animal y después se puede determinar la respuesta del anticuerpo o célula T generada que es específica para el péptido. El antisuero generado después de la administración de un péptido a un animal puede ser evaluado por la capacidad para enlazar al péptido o para enlazar al polipéptido objetivo.

- 15 Una variante que tiene al menos una de las características de enlazamiento de un polipéptido dado puede incluir al menos una región de enlazamiento del polipéptido. Tal región de enlazamiento media en general el enlazamiento del polipéptido con otro producto tal como un receptor o un anticuerpo. La región de enlazamiento puede ser externa o interna al polipéptido dado. Por lo tanto una variante puede incluir un sitio de enlazamiento, epítipo o fragmento antigénico del polipéptido relevante. Preferiblemente la región de enlazamiento en la variante retiene la conformación que tiene en el polipéptido relevante. En un aspecto las variantes son fragmentos. Por ejemplo los
- 20 fragmentos pueden ser de al menos 6 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 10, tal como al menos 12 ó 15 o hasta 20, 30 ó 40 aminoácidos. Se pueden utilizar también fragmentos mayores tal como hasta de 60, 90, 100 ó 200 aminoácidos. Tales fragmentos pueden de otra manera no demostrar una función o actividad celular del polipéptido objetivo.

ANP y BNP

- 25 Los péptidos natriuréticos cardíacos ANP y BNP y los fragmentos del terminal N (NT-proANP y NT-proBNP) de prohormonas del péptido natriurético tipo A y tipo B (proANP y proBNP) son liberados a la circulación cuando el corazón es sometido a sobrecarga de presión o de volumen. Su función es disminuir la carga y proteger el corazón. A pesar del hecho de que el corazón produce dos distintos péptidos natriuréticos biológicamente activos (ANP y BNP), cada uno derivado de su propio gen y regulado en forma diferente, sus efectos biológicos son mediados por
- 30 las células objetivo por medio de un solo receptor, GC-A (NPRA) (Drewett et al. 1994). La activación de ambos sistemas hormonales ANP y BNP se refiere al favorecimiento de la expresión tanto de los genes de ANP como de BNP o la producción o incremento en concentraciones en plasma, mientras que la inactivación de ambos sistemas de ANP y BNP se refiere a la reducción de la expresión de los genes tanto para ANP como para BNP o la producción o disminuye en la concentración en plasma.
- 35 En la sobrecarga del volumen y la presión cardíaca, la expresión del gen para el ANP y los niveles circulantes de ANP y NT-proANP son principalmente inducidos por la precarga incrementada del corazón, mientras que la expresión del gen para BNP y los niveles circulantes de BNP y NT-proBNP son principalmente sensibles a un incremento de la poscarga (Yoshimura et al. 1993; Yasue et al. 1994). Además, los genes para ANP y BNP son regulados en forma diferencial en las diferentes cámaras del corazón (Dzimiri et al. 2002). Los niveles elevados en
- 40 plasma de ANP o NT-proANP están asociados con sobrecarga atrial por ejemplo taquicardia, mientras que BNP y NT-proBNP son mejores marcadores de sobrecarga ventricular por ejemplo estenosis aórtica. Los niveles circulantes marcadamente elevados tanto de ANP como de BNP (y NT-proANP y NT-proBNP) sugieren una sobrecarga atrial y ventricular combinada, como en cardiomiopatía combinada. De este modo, en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas la información mediada por ANP y BNP converge en la membrana celular objetivo para provocar una cascada de señalización intracelular común. Como ya se mencionó, los análisis existentes miden uno de los analitos a la vez (ANP, BNP, NT-proANP o NT-proBNP). Debido a que una mayor intensidad de los péptidos natriuréticos en el diagnóstico de enfermedades cardíacas recae en el alto valor predictivo negativo, el ensayo de combinación de ANP y BNP (o NT-proANP y NT-proBNP) en la presente invención añadirá valor sobre aquel suministrado mediante el análisis de cualquiera de los analitos solos. El análisis secuencial de ANP y BNP (o NT-proANP y NT-proBNP)
- 50 sería innecesariamente complejo, incluido un doble esfuerzo para el control de calidad, y no es rentable.

- La presente invención provee nuevos métodos de diagnóstico y uso de los mismos que, por imitación del sistema regulador fisiológico que actúa en el organismo, puede combinar la información obtenida a partir de la activación o inactivación, respectivamente, de los sistemas hormonales del ANP y del BNP por un medio simple de medición simultánea de una concentración proporcionalmente acumulativa de péptidos derivados tanto de prohormonas del
- 55 péptido natriurético tipo A como del tipo B.

Métodos de análisis

La invención provee un método nuevo y sensible adecuado para diagnosticar y evaluar condiciones cardíacas tales como insuficiencia cardíaca, que determina la activación o inactivación de los sistemas hormonales ANP y BNP. El

método de la invención se enfoca en la detección o el monitoreo de los niveles combinados de proANP, proBNP y fragmentos de los mismos en una muestra biológica adecuada. De acuerdo con el método, los péptidos derivados de u originados a partir tanto de proANP como de proBNP se analizan al mismo tiempo en una muestra dada. En una modalidad se puede utilizar el método ya sea para propósitos de diagnóstico o para monitoreo del tratamiento.

- 5 Los péptidos derivados de proANP y proBNP incluyen NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP así como proANP y proBNP. La muestra puede contener otros péptidos derivados también de las prohormonas por ejemplo por proteólisis. Por ejemplo, otros péptidos pueden incluir proANP₁₋₃₀, proANP₃₁₋₆₇ o proANP₇₉₋₉₈. Por lo tanto, en una modalidad, cualquier combinación de proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP y BNP, y opcionalmente otros péptidos derivados, puede ser analizada en el método. En una modalidad la muestra puede contener péptidos
10 derivados de proANP sin péptidos derivados de proBNP o vice versa.

Ya que los péptidos se detectan simultáneamente, únicamente se requiere una sola lectura o resultado. El método es adecuado para evaluar el riesgo y detectar fallo cardíaco tal como insuficiencia cardíaca, y para evaluar tratamientos para insuficiencia cardíaca. Como tal es más sensible, económico y simple de llevar a cabo que los métodos del estado del arte.

- 15 Los péptidos analizados en la invención están presentes en niveles normales de referencia en la población general. La activación de los sistemas ANP y BNP se puede considerar que se presenta cuando el nivel combinado de péptidos es mayor que su nivel de referencia normal. Por lo tanto, en cualquier formato particular de análisis, si el resultado indica un nivel cualitativamente o cuantitativamente superior de péptidos que el nivel de referencia, está implícita la activación del sistema. Por ejemplo, se puede calibrar un análisis por ejemplo utilizando un agente de la
20 invención, de modo que se sabe que una lectura particular en el análisis representa el nivel normal de péptidos. O el análisis puede ser de tal manera que un nivel normal o de referencia del péptido producirá un resultado despreciable o insignificante.

- La inactivación de los sistemas ANP y BNP, por ejemplo después de insuficiencia cardíaca quizás en respuesta a un tratamiento médico, se presenta cuando el nivel combinado de péptidos cae del nivel elevado asociado con el incidente cardíaco anterior. Por medio de la realización de análisis seriales será posible detectar una disminución cualitativa o cuantitativa en los niveles de péptidos. Será posible determinar también la tasa de disminución y para
25 evaluar la efectividad de un tratamiento dado.

- Los métodos presentes son capaces de detectar simultáneamente tanto los péptidos derivados de proANP como de proBNP. El cambio real en el nivel individual de péptidos puede ser por ejemplo A+ y B+, A+ y B-, A- y B+, o A- y B- (donde A representa los niveles de péptidos derivados de proANP y B representa los niveles de péptidos derivados
30 de proBNP).

Los presentes métodos de análisis pueden ser cualitativos o cuantitativos. Por ejemplo, un análisis cuantitativo es posible cuando se utiliza un agente de la invención como antígeno que compite en un ensayo de competición.

- 35 En general, el método presente comprende poner en contacto una muestra con una primera sustancia de enlazamiento que es capaz de enlazar tanto péptidos derivados de proANP como de proBNP bajo condiciones que permitan que ocurra tal enlazamiento. Se detectan luego cualquiera de los complejos de enlazamiento formados entre la primera sustancia de enlazamiento y tales péptidos. Los medios de detección adecuados son conocidos en el arte y se describen con más detalle más adelante.

- 40 Los péptidos que van a ser detectados son como los descritos anteriormente. En un aspecto son péptidos de origen natural. Los péptidos proporcionan un indicador de activación o inactivación de los sistemas ANP y BNP. La primera sustancia de enlazamiento es como se define aquí.

- En una modalidad la primera sustancia de enlazamiento es una sustancia de enlazamiento bi o oligo-específica como se define aquí. Tal sustancia de enlazamiento es capaz de enlazarse tanto con péptidos derivados de proANP como de proBNP. En una modalidad se utiliza esta primera sustancia de enlazamiento en el análisis cuando no se
45 utiliza un agente de la invención en el análisis, por ejemplo como un antígeno que compite en un análisis de enlazamiento competitivo. Los complejos de enlazamiento entre la primera sustancia de enlazamiento y los péptidos en la muestra pueden ser detectados y se puede determinar la activación o inactivación como anteriormente.

- En un aspecto, el presente método adicionalmente comprende poner en contacto una muestra con un agente de la invención como se describe aquí (XNP, proXNP, o NT-proXNP). El agente comprende péptidos derivados de o que
50 se originan a partir tanto de proANP como de proBNP y es capaz de enlazarse con la primera sustancia de enlazamiento. Tal agente puede ser utilizado como un estándar para calibrar los presentes análisis. El agente puede ser utilizado como un antígeno que compite en un ensayo de competición. Los niveles de péptido en una muestra dada pueden ser expresados por lo tanto en términos de concentración del agente. Los formatos adecuados de análisis, los medios de detección y de cuantificación son conocidos en el arte y se describen con más detalle más
55 adelante.

Los métodos de la invención se aplican generalmente a una muestra, típicamente una muestra biológica. Típicamente la muestra es una que es conocida o que se sospecha que es una muestra corporal de un individuo, tal

como un humano. Una muestra puede ser una tomada de un individuo o paciente. La muestra puede incluir un fluido corporal, por ejemplo sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina, saliva u otro fluido biológico en el cual los péptidos derivados de prohormonas e péptidos natriuréticos de tipo A y B pueden estar presentes. La muestra puede ser una muestra humana. La muestra puede ser obtenida de un individuo o paciente utilizando un procedimiento estándar o de rutina. La muestra puede ser por lo tanto de tal manera que se puede utilizar el análisis para selección diagnóstica o monitoreo terapéutico o evaluación. La muestra puede ser obtenida de un individuo o sujeto vivo.

Una muestra puede ser procesada antes de ser utilizada en el método. Por ejemplo, puede ser diluida, típicamente en agua, solución salina o solución salina que contenga un amortiguador (cualquiera de estos diluyentes puede contener adicionalmente detergente).

Generalmente, el presente método se lleva a cabo en solución acuosa. Sin embargo, en modalidades particulares (algunas de las cuales son discutidas más adelante), la primera sustancia de enlazamiento, o el agente pueden ser inmovilizados en un soporte sólido. Típicamente tal soporte es la superficie del contenedor en el cual se lleva a cabo el método, tal como la superficie de un pozo de una placa de microtitulación. En otras modalidades el soporte puede ser una lámina (por ejemplo una lámina de nitrocelulosa o de nylon) o un lecho (por ejemplo de Sefarosa o de látex).

En una modalidad el soporte sólido es una partícula, barra o placa de microtitulación. Se puede utilizar una placa para ELISA.

La primera sustancia de enlazamiento o el agente pueden ser marcados con una etiqueta detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables han sido descritos aquí.

En principio, se puede emplear cualquier técnica adecuada de análisis en la presente invención. Por ejemplo, los métodos adecuados incluyen métodos de inmunoensayo, tanto competitivos como no competitivos, métodos de enlazamiento de anticuerpo que emplean ya sea antígenos marcados como no marcados o sus análogos (inmunoensayos), o sustancias de enlazamiento marcadas o no marcadas que reconocen sus antígenos o análogos (ensayos inmunométricos y ensayos de enlazamiento del receptor), respectivamente. Se pueden utilizar ensayos tipo sándwich.

Los métodos de métodos de inmunoensayo que pueden ser utilizados incluyen inmunoensayos de fluorescencia de europio (FIA), ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos con enzimas, ensayos inmunoenzimométricos, fluoroinmunoensayos resueltos en el tiempo, ensayos inmunofluorométricos, inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA), inmunoensayos de electroquimioluminiscencia anódicos o catódicos, diferentes ensayos de tiras reactivas de química seca, inmunoensayos con base en partículas, inmunoensayos directos sin marcadores, tal como los ensayos con base en resonancia de plasmones superficiales, ondas acústicas superficiales y espectroscopía Raman mejorada de superficie, inmunoensayos homogéneos tales como ensayos de proximidad con dos etiquetas diferentes, tecnología de chips, tecnología de arreglos, inmunoensayos mejorados de partículas y otros inmunoensayos de partículas, tanto de partículas marcadas como no marcadas de tamaño individual como dual. El látex y el oro, en diferentes formas, pueden ser mencionados como ejemplos de partículas que son utilizadas. Las determinaciones turbidométricas y nefelométricas son también formatos de ensayo posibles.

La tecnología de membrana cromatográfica también puede ser utilizada como formato para implementar la presente invención. El análisis por membrana cromatográfica incluye tanto un análisis lateral como de flujo a través suyo. Los reactivos utilizados son inmovilizados ya sea en forma permanente como no permanente sobre la membrana donde ellos tienen un papel muy distinto en las diferentes zonas del análisis es decir una o múltiples zona(s) para reactivo(s), análisis, control(es) etc. Los reactivos inmovilizados pueden ser sustancias de enlazamiento, el agente de la invención, anticuerpo de la sustancia de anti-enlazamiento, anticuerpo anti-analito, anticuerpo anti-agente o una etiqueta.

Los complejos de enlazamiento de la primera sustancia de enlazamiento con péptidos en la muestra o con el agente pueden ser detectados utilizando una segunda sustancia de enlazamiento. Por ejemplo, la segunda sustancia de enlazamiento puede ser un anticuerpo que por sí mismo cuenta con una etiqueta detectable tal como aquellas enlistadas más arriba. La segunda sustancia de enlazamiento puede ser una sustancia que cause precipitación o bien inmovilice y separe los complejos de la primera sustancia de enlazamiento.

Se describirán ahora modalidades particulares del presente método en forma más detallada:

(a) Una modalidad utiliza un agente proXNP marcado como antígeno, junto con anticuerpo como primera sustancia de enlazamiento que reconoce tanto péptidos derivados de prohormonas de péptido natriurético tanto de tipo A como B como al agente. En tales métodos se añade una cantidad constante conocida de agente marcado a la muestra que contiene una cantidad desconocida de antígeno no marcado, es decir analito peptídico que va a ser medido. Tanto el antígeno marcado como el no marcado se enlazan con la primera sustancia de enlazamiento, por ejemplo en una forma competitiva y la medición de la cantidad del agente marcado enlazado, cuando se compara con la cantidad conocida añadida de agente, puede ser utilizada para determinar cuánto antígeno no marcado está presente en la muestra reflejando así la activación o la inactivación de ambos sistemas el ANP y el BNP como una

medición proporcionalmente acumulativa de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B.

(b) Otro tipo preferido de método utiliza una primera sustancia marcada de enlazamiento. En tales métodos, se analiza el complejo de la primera sustancia marcada de enlazamiento y los péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B dando una medición proporcionalmente acumulativa de la cantidad de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en la muestra. Un caso específico es aquel en donde la primera sustancia de enlazamiento puede ser el receptor natriurético GC-A o un fragmento o extensión del mismo, un anticuerpo bi, oligoespecífico o bifuncional que reconoce péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B como del agente.

(c) Un tipo adicional de método se basa en el uso de un anticuerpo marcado con sustancia de enlazamiento, cuyo anticuerpo puede ser producido en una especie animal diferente que el anticuerpo primario o secundario utilizado en el caso de la sustancia de enlazamiento que contiene un anticuerpo.

(d) Un método adicional comprende (i) poner en contacto la muestra con un agente y una primera sustancia de enlazamiento, que contiene la primera sustancia de enlazamiento marcada o que contiene agente marcado; y (ii) detectar y /o determinar cuantitativamente el enlazamiento de la primera sustancia marcada de enlazamiento con el agente no marcado o el agente marcado con la sustancia de enlazamiento que reconoce péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B y al agente.

(e) Un método comprende poner en contacto una muestra, la cual se sabe o se sospecha que contiene péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B con (en cualquier orden): (i) una primera sustancia de enlazamiento que reconoce ambos péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B y un agente de la invención; y (ii) una cantidad conocida del agente marcado, que actúa como un antígeno, de tal manera que la etiqueta se enlaza con la sustancia de enlazamiento en una cantidad que depende de la cantidad de péptidos no marcados derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B presentes en la muestra; y analizar la cantidad de marcador enlazado y/o no enlazado como una medida proporcionalmente acumulativa del nivel no marcado de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en la muestra.

(f) Un método de inmunoensayo convencional (por ejemplo radioinmunoensayo) puede comprender:

(i) la inmovilización sobre un soporte sólido de una primera sustancia de enlazamiento no marcada que reconoce y enlaza péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B y un agente de la invención;

(ii) la adición de una muestra que contiene o que se sospecha que contiene los péptidos nativos objetivo derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B junto con una cantidad fija de agente marcado, de tal manera que los péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B y el agente marcado están libres para competir por el enlazamiento con la sustancia inmovilizada de enlazamiento;

(iii) la separación del material inmovilizado (enlazado) del material no inmovilizado (no enlazado);

(iv) la determinación de la cantidad de agente marcado enlazado a la sustancia de enlazamiento; y

(v) la comparación de las cantidades de agente marcado enlazado o no enlazado en mezclas de análisis de muestras de prueba con la señal obtenida utilizando calibradores con una concentración conocida de agente con el propósito de determinar la concentración proporcionalmente acumulativa de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en la muestra que está siendo analizada.

(g) Alternativamente, el método (f) puede ser llevado a cabo en solución, donde, se puede utilizar una segunda sustancia de enlazamiento ya sea para precipitar o bien inmovilizar y separar los complejos primera sustancia de enlazamiento-antígeno. Un ejemplo típico de esto comprende:

(i) poner en contacto una muestra que contiene o que se sospecha que contiene los péptidos derivados de prohormonas del péptido natriurético de tipo A y B que van a ser detectados con una primera sustancia de enlazamiento que reconoce péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A y de tipo B o el enlazamiento de los mismos de acuerdo con la invención en presencia de una cantidad fija de un agente marcado de la invención;

(ii) poner en contacto la mezcla resultante con una sustancia de enlazamiento secundaria inmovilizada que se enlaza con la primera sustancia de enlazamiento;

(iii) separar el material inmovilizado del material no inmovilizado; y

(iv) comparar las cantidades del agente marcado en el material inmovilizado o no inmovilizado con las cantidades obtenidas utilizando calibradores con concentración conocida del agente nuevo para determinar la concentración proporcionalmente acumulativa de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en la muestra que está siendo analizada.

5 (h) También se prevé un análisis inmunométrico que emplea el uso de un agente no marcado inmovilizado, un ejemplo típico del cual comprende:

(i) la inmovilización sobre un soporte sólido de un agente no marcado de la invención;

10 (ii) la adición de una muestra que contiene o que se sospecha que contiene los péptidos objetivo derivados de prohormonas del péptido natriurético tipo A y tipo B junto con una cantidad fija de sustancia de enlazamiento marcada que reconoce péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B de acuerdo con la invención, de tal manera que los péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en la muestra están libres para competir con el agente inmovilizado de la invención por la sustancia de enlazamiento marcada.

15 (iii) la separación de la sustancia de enlazamiento marcada que reconoce péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B que no está enlazada al agente inmovilizado de la invención;

(iv) la determinación de la cantidad de sustancia de enlazamiento marcada enlazada al agente inmovilizado de la invención; y

20 (v) la comparación de las cantidades de sustancia de enlazamiento marcada inmovilizada o no inmovilizada en las mezclas de ensayo de muestras de prueba con la actividad obtenida utilizando calibradores con concentración conocida del agente de la invención, con el propósito de determinar la concentración proporcionalmente acumulativa de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en la muestra que está siendo analizada.

25 Por lo tanto la invención provee métodos para la determinación de la concentración proporcionalmente acumulativa de péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B en una muestra, mostrando ya sea una activación o una inactivación tanto de los sistemas ANP como BNP.

La primera sustancia de enlazamiento

30 De acuerdo con el presente método, se analizan al mismo tiempo péptidos derivados tanto de proANP como de proBNP al mismo tiempo en una muestra dada. Como anteriormente los péptidos derivados de proANP y proBNP incluyen NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP así como proANP y proBNP. Una muestra puede contener otros péptidos derivados también de las prohormonas por ejemplo por medio de proteólisis. Por ejemplo, otros péptidos pueden incluir proANP₁₋₃₀, proANP₃₁₋₆₇ o proANP₇₉₋₉₈. Por lo tanto en una modalidad, cualquier combinación de proANP, NT-proANP, ANP, proBNP, NT-proBNP y BNP, y opcionalmente otros péptidos derivados, pueden ser analizados en el método.

35 Los presentes análisis utilizan una primera sustancia de enlazamiento que reconoce o se enlaza con péptidos derivados tanto de prohormonas del péptido natriurético de tipo A como de tipo B, tal como aquellos péptidos descritos anteriormente. De este modo la sustancia es capaz de enlazarse tanto con proANP como con proBNP o con variantes, incluidos fragmentos de ambas prohormonas. La primera sustancia de enlazamiento puede no enlazar ambos juegos de péptidos con igual afinidad. La sustancia de enlazamiento se enlaza con proANP, ANP o NT-proANP de origen natural y con proBNP, BNP, o NT-proBNP de origen natural. Por ejemplo puede enlazarse con
40 las SEQ ID Nos 1, 2 ó 3 y las SEQ ID Nos 4, 5 ó 6, o con variantes alélicas o especies homólogas de las mismas. Alternativamente o adicionalmente, la sustancia puede enlazarse con uno o más fragmentos de cualquiera de las anteriores secuencias, por ejemplo fragmentos que incluyen un epítipo, fragmento antigénico, o un sitio de enlazamiento. Tales fragmentos son discutidos más detalladamente aquí.

La primera sustancia de enlazamiento es capaz de enlazarse tanto con:

45 (a)

(i) proANP (SEQ ID NO. 1), ANP (SEQ ID NO. 2) o NT-proANP (SEQ ID NO. 3);

(ii) una variante homóloga de (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii);

como con

50 (b)

(i) pro-BNP (SEQ ID NO. 4), BNP (SEQ ID NO. 5) o NT-proBNP (SEQ ID NO. 6);

(ii) una variante homóloga de (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii).

Las variantes y los fragmentos son como los definidos aquí.

La variante homóloga (ii) tiene al menos 70% de identidad con (i), y/o el fragmento (iii) es de al menos 6 aminoácidos de longitud. En un aspecto la variante homóloga (ii) es una especie homóloga o una variante alélica de (i).

En una modalidad una sustancia de enlazamiento de acuerdo con la invención es capaz de enlazarse con un péptido que contiene o que consiste de los aminoácidos 7 a 23 del ANP y/o los aminoácidos 10 a 26 de BNP o variantes de los mismos. Estas regiones del péptido forman una estructura conservada del anillo en las moléculas nativas.

Una sustancia de enlazamiento puede enlazarse con un epítipo de proANP y/o proBNP. Por ejemplo, los epítopos adecuados incluyen los aminoácidos 5-13, 1-10, 15-25 y 27-32 de BNP y los aminoácidos 65-76 y 1-13 de NT-proBNP o variantes de los mismos.

En una modalidad, una sustancia de enlazamiento es capaz de enlazarse con uno o más péptidos seleccionados de proBNP₁₋₃₇, proBNP₁₅₋₂₄, proBNP₁₀₋₂₉, proBNP₇₇₋₉₂, proBNP₁₋₁₀₈, ProANP₂₉₋₉₈, proANP₈₂₋₉₆, proANP₂₀₋₈₀, proANP₆₀₋₈₀, proANP₁₋₁₂₆ y proANP₁₁₂₋₁₂₆ o Variantes de los mismos. Por ejemplo, una sustancia de enlazamiento puede ser capaz de enlazarse tanto con proBNP₁₅₋₂₄ como con proANP₈₂₋₉₆, tanto con proBNP₁₋₃₇ como con proANP₂₉₋₉₈, tanto con proBNP₁₀₋₂₉ como con proANP₂₀₋₈₀, tanto con proBNP₁₀₋₂₉ como con proANP₆₀₋₈₀, tanto con proBNP₁₋₁₀₈ como con proANP₁₋₁₂₆ o tanto con proBNP₇₇₋₉₂ como con proANP₁₁₂₋₁₂₆. Por ejemplo, una sustancia de enlazamiento de acuerdo con la invención puede enlazarse con NT-proXNP1 (SEQ ID NO: 13), NT-proXNP2 (SEQ ID NO: 14), NT-proXNP3 (SEQ ID NO: 15) NT-proXNP4 (SEQ ID NO: 17), NT-proXNP5 (SEQ ID NO: 18), proXNP6 (SEQ ID NO: 19) o XNP7 (SEQ ID NO: 20).

En aquellas modalidades de la presente invención que utilizan un agente de enlazamiento de la invención, la primera sustancia de enlazamiento es también capaz de enlazarse con el agente de enlazamiento.

Los ensayos adecuados de enlazamiento para determinar el enlazamiento son conocidos en el arte. En general una primera sustancia de enlazamiento es capaz de enlazar un péptido dado en una medida que puede ser utilizada en un ensayo de enlazamiento y detección tal como aquellos descritos aquí. Por ejemplo, una sustancia de enlazamiento adecuada puede enlazarse con al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100% de la afinidad de enlazamiento de un anticuerpo específico con el péptido, o del receptor natriurético GC-A con el péptido, por ejemplo del receptor GC-A con ANP o BNP.

La primera sustancia de enlazamiento como se la utiliza aquí puede ser una sola sustancia o una mezcla de sustancias. Una sustancia de enlazamiento adecuada puede ser por ejemplo, un receptor o un anticuerpo, o fragmentos o derivados de los mismos, con propiedades bi o oligoespecíficas, o una mezcla de las mismas.

En un aspecto se utiliza una mezcla de sustancias de enlazamiento como una primera sustancia de enlazamiento en modalidades donde se utiliza también un agente de la invención. Una mezcla puede incluir sustancias de enlazamiento monoespecíficas, biespecíficas y/o oligoespecíficas. Cualquier composición adecuada de sustancias de enlazamiento puede ser utilizada que permita la detección de péptidos derivados de proANP y proBNP de acuerdo con los métodos presentes. Las sustancias de enlazamiento específicas del péptido derivado de pro-ANP y las sustancias de enlazamiento específicas del péptido derivado de proBNP pueden estar presentes en cualquier proporción adecuada. Por ejemplo pueden estar presentes en iguales cantidades o capacidades de enlazamiento. Alternativamente, cada una puede estar presente, por ejemplo, en 2, 3, 4, 5 hasta 10 veces la cantidad o capacidad de enlazamiento de la otra. En una modalidad, se puede utilizar en un análisis una mezcla 1:1 de sustancia de enlazamiento específica del péptido derivado de proANP por ejemplo anticuerpo y de sustancia de enlazamiento específica del péptido derivado de proBNP por ejemplo anticuerpo.

En modalidades donde el análisis no incluye agente de la invención se prefiere que la primera sustancia de enlazamiento sea una sola sustancia de enlazamiento bi u oligoespecífica. Por lo tanto una primera sustancia de enlazamiento para uso en tales modalidades puede ser una sola sustancia que sea de enlazamiento bi u oligofuncional. Esa sola sustancia tiene la especificidad de enlazamiento de la primera sustancia de enlazamiento como se expuso anteriormente. Puede por ejemplo, tener dos o más sitios de enlazamiento para el ligando, o dos o más ligandos pueden enlazarse con un sitio en la sustancia con la misma o con diferentes afinidades. Por ejemplo tal sustancia puede incluir un receptor o anticuerpo o fragmentos de cualquiera de ellos.

(a) Receptores

Un ejemplo de un receptor adecuado es el receptor natriurético GC-A. Una secuencia de GC-A humana puede ser encontrada bajo el número de acceso P 16066 (SEQ ID NO: 33). El receptor o un fragmento, extensión o derivado del mismo puede ser producido por medio de métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte (Misono et al.,

1999). En resumen, el dominio de enlazamiento del ligando extracelular del receptor (SEQ ID NO: 34) puede ser producido por clonación de la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos requerida para el enlazamiento tanto de ANP como de BNP humano, dentro de un vector de expresión procariota o eucariota adecuado, transfectando el vector dentro de una célula huésped apropiada, cultivando la célula huésped en un medio de cultivo adecuado, y recolectando la proteína recombinante. La secuencia derivada del receptor puede ser liberada por medio de digestión con la enzima, purificada con cromatografía de afinidad y HPLC en fase reversa e identificada por medio del mapeo y secuenciación del péptido.

El receptor de GC-B (número de acceso P20594, SEQ ID NO: 35) o ANPrecC o el receptor de despeje (número de acceso P17342, SEQ ID NO: 36) pueden actuar también como una sustancia de enlazamiento.

Por lo tanto en una modalidad la primera sustancia de enlazamiento puede incluir:

- (a) un receptor natriurético GC-A (SEQ ID NO: 33), GC-B (SEQ ID NO: 35) o GC-C (SEQ ID NO: 36);
- (b) una variante homóloga de (a); o
- (c) un fragmento de (a) o (b).

En un aspecto la primera sustancia de enlazamiento incluye un dominio de enlazamiento extracelular del receptor natriurético GC-A (SEQ ID NO: 34) o una variante homóloga de un fragmento del mismo.

Se puede utilizar una extensión o derivado de cualquiera de las sustancias de enlazamiento anteriores. De este modo, se puede modificar la estructura de la molécula, por ejemplo por medio de la adición de un asa para facilitar la unión a un soporte sólido, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de enlazamiento o las propiedades de la molécula.

(b) Anticuerpos

La primera sustancia de enlazamiento puede incluir un anticuerpo o un fragmento o derivado de un anticuerpo. Por lo tanto, en un aspecto la presente invención se relaciona con un anticuerpo con la especificidad de enlazamiento expuesta anteriormente.

Los anticuerpos pueden elevarse contra epítomos específicos de las secuencias dadas de péptidos. Un anticuerpo, u otro compuesto, "se enlaza específicamente" con un polipéptido cuando este se enlaza con afinidad preferencial o alta afinidad con la proteína o proteínas por lo cual es específico pero no se enlaza específicamente únicamente con baja afinidad con otros polipéptidos. Se conocen bien en el arte una variedad de protocolos para enlazamiento competitivo o ensayos inmunométricos para determinar la capacidad específica de enlazamiento de un anticuerpo (ver por ejemplo Maddox et al, J. Exp. Med. 158, 1211 - 1226, 1993). Tales inmunoensayos involucran típicamente la formación de complejos entre proteína específica y anticuerpo y la medición de la formación de complejo.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede incluir ya sea un anticuerpo completo o un fragmento del mismo y tiene la especificidad de enlazamiento expuesta anteriormente. Los fragmentos incluyen a los fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena sencilla. Un anticuerpo completo es típicamente un anticuerpo que es producido por cualquiera de los métodos para la producción de un anticuerpo que se discuten aquí. Típicamente el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, tal como un anticuerpo de primate, humano, roedor (por ejemplo ratón o rata), conejo, ovino, porcino, equino, cabra o camello. El anticuerpo puede ser cualquier clase o isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgM, pero preferiblemente es IgG.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico que sea capaz de enlazarse con dos antígenos diferentes, o un anticuerpo oligoespecífico que se capaz de enlazarse con más de dos antígenos diferentes. El anticuerpo puede incluir un anticuerpo policlonal, monoclonal, oligoclonal, bifuncional o policlonal de reacción cruzada como se explicó anteriormente.

Un fragmento de anticuerpo completo que puede ser utilizado en el método incluye un sitio para enlazamiento del antígeno, por ejemplo los fragmentos F(ab') o F(ab')₂. Tales fragmentos o anticuerpos pueden ser utilizados para formar derivados de anticuerpo. Por ejemplo el anticuerpo completo o fragmento puede estar asociado con otras fracciones, tales como enlazadores que pueden ser utilizados para unir dos o más fragmentos o anticuerpos. Tales enlazadores pueden ser enlazadores químicos o pueden estar presentes en la forma de una proteína de fusión con el fragmento o anticuerpo completo. Los enlazadores pueden ser utilizados por lo tanto para unir anticuerpos completos o fragmentos que tengan las mismas o diferentes especificidades de enlazamiento, por ejemplo que puedan enlazar los mismos o diferentes polimorfismos. El anticuerpo puede ser un "anticuerpo biespecífico" formado por medio de la unión de dos dominios variables espalda con espalda. En una modalidad el anticuerpo es un anticuerpo químico que contiene la secuencia de diferentes anticuerpo naturales, por ejemplo un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos bifuncionales pueden ser elaborados por medio de combinación química de fragmentos con las características deseadas.

Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos por medio de cualquier método adecuado. Por ejemplo, anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos pueden ser producidos por selección de inmunógenos para aumentar los anticuerpos, los anticuerpos que se acoplan químicamente o fragmentos de anticuerpos, fusión somática de hibridomas/esplenocitos monoclonales o técnicas recombinantes. Se pueden utilizar técnicas de despliegue en fagos en la producción de anticuerpos.

Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en el arte, ver por ejemplo Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo elevando los anticuerpos en un animal huésped contra el polipéptido completo o un fragmento del mismo, por ejemplo un epítipo antigénico del mismo, o "inmunógeno". El fragmento puede ser cualquiera de los fragmentos mencionados aquí (típicamente al menos 6 o al menos 10 ó 15 aminoácidos de longitud). Se puede utilizar un agente de la invención para elevar los anticuerpos utilizando técnicas conocidas.

Un método para producir un anticuerpo policlonal comprende la inmunización de un animal huésped adecuado, por ejemplo un animal experimental, con el inmunógeno y aislamiento de inmunoglobulinas del suero del animal. El animal puede ser por lo tanto inoculado con el inmunógeno, se puede remover posteriormente sangre del animal y purificar la fracción de IgG.

Se producen anticuerpos monoclonales y policlonales por medio de la inmunización de un animal huésped adecuado (por ejemplo un conejo, oveja, cabra, cerdo, pollo, conejillo de Indias, rata o ratón) con un inmunógeno. Por ejemplo, el inmunógeno puede incluir un agente de acuerdo con la presente invención. En una modalidad se administran uno o más refuerzos de inmunógeno al animal. Por ejemplo, se pueden utilizar 1, 2, 3, 4 o más refuerzos. Los métodos de producción de anticuerpos monoclonales o policlonales son bien conocidos por aquellos capacitados en el arte y se puede utilizar cualquiera de estos métodos para preparar anticuerpos. Si se desea, se puede administrar el inmunógeno como un conjugado, en el cual se acopla el inmunógeno, por ejemplo a través de una cadena lateral de los residuos de aminoácido con un portador adecuado. La molécula portadora es típicamente un portador fisiológicamente aceptable.

Después de que el animal experimental ha producido anticuerpos policlonales se puede utilizar el suero diluido o se pueden aislar las inmunoglobulinas deseadas del suero. En una modalidad el suero puede ser diluido antes de usarlo. Las diluciones adecuadas pueden incluir por ejemplo, de 1:1000 a 1:500.000, por ejemplo de 1:20.000 a 1:80.000, 1:10.000 a 1:15.000 o de 1:50.000 a 1:60.000. En una modalidad la concentración del anticuerpo utilizado en un ensayo de la invención es la misma que la concentración de anticuerpo en tal dilución de suero. El anticuerpo obtenido puede ser aislado y, si se desea, purificado, por ejemplo hasta una pureza del 70% - 100%. Típicamente el animal se inocula con inmunógeno, se remueve la sangre y se purifica la fracción de IgG.

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales son también bien conocidos por aquellos capacitados en el arte (Köhler & Millstein 1975 Nature 256, 495 - 497). Tales métodos generalmente comprenden la immortalización de células lo que produce al anticuerpo reivindicado. Las células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales, se producen por fusión de células de bazo de un animal inmunizado con células tumorales. Las células de hibridoma resultantes se immortalizan y las células producen al anticuerpo deseado. La célula immortalizada que produce el anticuerpo deseado puede ser seleccionada por medio de un procedimiento convencional. Los hibridomas pueden ser cultivados en medio de cultivo o inyectados en forma intraperitoneal, por formación de fluido de ascitis, o dentro del torrente sanguíneo de un huésped alogénico o inmunocomprometido.

Se pueden producir anticuerpos humanos por medio de inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguido por transformación de los linfocitos con el virus de Epstein-Barr. Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos también por medio de tecnología de ADN recombinante como lo describen Skerra y Plückthun (1988). También es posible utilizar cualquiera de los derivados, como por ejemplo los fragmentos F(ab'), y F(ab')₂ tanto de anticuerpos monoclonales y policlonales preparados por reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre anticuerpos sustancialmente intactos por métodos bien conocidos para una persona capacitada en el arte.

De este modo, se pueden elaborar los anticuerpos suministrados por la invención (y aquellos son utilizados en el método de la invención) cultivando una célula que expresa al anticuerpo y opcionalmente purificando el anticuerpo de la célula.

La célula utilizada en el proceso puede ser una que se obtiene por medio de la administración de un péptido que comprende cualquiera de los péptidos antigénicos relevantes a un mamífero, extrayendo células B del mamífero y selección de una célula de estas con base en la capacidad para expresar un anticuerpo que enlaza los antígenos. Opcionalmente las células B se immortalizan después de la extracción o selección, por ejemplo fusionándolas con una célula inmortal (para formar un hibridoma) o por medio de infección con el virus EBV.

Las células que expresan el anticuerpo incluyen un polinucleótido que es capaz de expresar al anticuerpo, un polinucleótido que codifica al anticuerpo.

Otro tipo de célula que puede ser utilizada para elaborar al anticuerpo es uno que es recombinante para un polinucleótido que expresa al anticuerpo. Tal célula puede ser procariota o eucariota (por ejemplo de cualquiera de los mamíferos mencionados aquí).

El anticuerpo puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido. Típicamente el soporte sólido es la superficie del contenedor en la cual se lleva a cabo el método, por ejemplo la superficie de una placa de microtitulación. En otras modalidades el soporte puede ser una partícula, una lámina (por ejemplo una lámina de nitrocelulosa o de nylon) o una perla (por ejemplo de Sefarosa o de látex). El anticuerpo puede estar presente sobre una placa de ELISA o en una barra.

Los anticuerpos de la invención son por ejemplo útiles en métodos de purificación, aislamiento o selección que involucran técnicas de inmunoprecipitación.

Se puede utilizar una barra para llevar a cabo el método de la invención. La barra incluye un material poroso capaz de transportar cromatográficamente un líquido y uno o más de los anticuerpos mencionados aquí. Cuando se pone en contacto la barra con la muestra retira el líquido desde la muestra hacia una región de detección sobre la barra. Los péptidos en la muestra que se derivan de proANP o proBNP se detectan por su enlazamiento con la región de detección.

El líquido se retira a través de una región en la barra que contiene los anticuerpos de la invención. Estos anticuerpos se enlazan con los péptidos relevantes formando un complejo anticuerpo/péptido. Este complejo se esparce hacia la región de detección que contiene un agente (inmovilizado sobre la barra) que enlaza y por lo tanto inmoviliza al complejo en la región de detección. Este agente es típicamente un agente de enlazamiento específico (por ejemplo un anticuerpo) que enlaza ya sea al anticuerpo o al péptido del complejo. El complejo anticuerpo/péptido es típicamente detectado en la región de detección por medio del uso de una etiqueta que se une al anticuerpo específico.

La proteína en la muestra puede ser marcada antes de ser retirada de la barra. La proteína marcada es luego retirada de la barra (que ha sido puesta en contacto con la muestra) y se detecta por medio del enlazamiento del anticuerpo específico del polimorfismo (que está enlazado a la región de detección).

Típicamente la etiqueta utilizada en los sistemas de barra descritos anteriormente es una etiqueta visualmente detectable que puede ser detectada en forma visible (es decir que puede ser observada con a simple vista) cuando se inmoviliza suficiente complejo anticuerpo/proteína en la región de detección. Una etiqueta adecuada es una partícula de oro (u otro metal coloidal) o un fluoróforo (por ejemplo fluoresceína).

La barra puede contener un agente desnaturizante que provoca desnaturalización de la proteína que es retirada de la barra. En una modalidad se expone la muestra a condicione de desnaturalización (por ejemplo en contacto con un agente desnaturizante) antes de ponerla en contacto con la barra.

Agentes de la invención (proXNP, NT-proXNP, XNP)

(a) Agentes peptídicos

En una modalidad el presente método de análisis utiliza un agente (proXNP, XNP o NT-proXNP) que contiene una secuencia de aminoácidos derivada o que se origina a partir tanto de proANP como de proBNP. El agente imita péptidos derivados de proANP y de proBNP en la muestra que va ser analizada, en particular péptidos de origen natural. El agente para uso en el presente método es reconocido también o enlazado por la primera sustancia de enlazamiento que es utilizada en el método. De este modo el agente puede competir con los péptidos en una muestra por el enlazamiento con la sustancia de enlazamiento en los análisis de la invención. Un agente puede ser utilizado también como un calibrador o estándar en un análisis. Por lo tanto, los agentes son particularmente útiles para cuantificar péptidos derivados de proANP y proBNP en una muestra. Por ejemplo, en los presentes métodos de análisis, la medición de péptidos en una muestra se puede expresar como una concentración de agente. Además el agente puede ser utilizado como un inmunógeno para producir anticuerpo adecuado para uso como una primera sustancia de enlazamiento, de acuerdo con los métodos expuestos anteriormente.

El agente es un polipéptido. Por ejemplo, un agente puede contener o consistir de una proteína de fusión. Un agente de acuerdo con la invención generalmente contiene una secuencia característica de proANP y una secuencia característica de proBNP. Por lo tanto, un agente típicamente incluye al menos una secuencia del péptido derivada de proANP y al menos una secuencia del péptido derivada de proBNP.

El agente incluye tanto:

(a)

(i) las SEQ ID Nos 1, 2 ó 3;

(ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;

como

(b)

(i) las SEQ ID Nos 4, 5 ó 6;

(ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o

(iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud.

- 5 En un aspecto un agente incluye los aminoácidos 7 a 23 de ANP y/o los aminoácidos 10 a 26 de BNP, o variantes de los mismos. Estos péptidos forman una estructura anular conservada en ANP y BNP natural, que puede estar conservado en el agente. En una modalidad, un agente incluye un epítipo de proANP y/o de proBNP. Por ejemplo, los epítipos adecuados incluyen los aminoácidos 5 a 13, 1 a 10, 15 a 25 ó 27 a 32 de BNP y los aminoácidos 65 a 76 ó 1 a 13 de NT-proBNP. En una modalidad un agente incluye la secuencia de péptidos derivada tanto de (de acuerdo con lo anterior) NT-proANP como de NT-proBNP (tal agente es denominado NT-proXNP), o tanto de ANP como de BNP (siendo denominado el agente como XNP).

- 10 En una modalidad el agente puede contener la secuencia de péptidos seleccionada de uno o más entre proBNP₁₋₃₇, proBNP₁₅₋₂₄, proBNP₁₀₋₂₉, proBNP₇₇₋₉₂, proBNP₁₋₁₀₈, proANP₂₉₋₉₈, proANP₈₂₋₉₆, proANP₂₀₋₈₀, proANP₆₀₋₈₀, proANP₁₁₂₋₁₂₆ o variantes de las mismas. En un aspecto un agente incluye al menos una secuencia de proBNP y al menos una de proANP selecciona de esta lista. Las combinaciones adecuadas son proBNP₁₅₋₂₄ y proANP₈₂₋₉₆, proBNP₁₋₃₇ y proANP₂₉₋₉₈, proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₂₀₋₈₀, proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₆₀₋₈₀, proBNP₁₋₁₀₈ y proANP₁₋₁₂₆ o proBNP₇₇₋₉₂ y proANP₁₁₂₋₁₂₆. De este modo, un agente de acuerdo con la invención puede incluir o consistir de NT-proXNP1 (SEQ ID NO: 13), NTproXNP2 (SEQ ID NO: 14), NT-proXNP3 (SEQ ID NO: 15), NT-proXNP4 (SEQ ID NO: 17), NT-proXNP5 (SEQ ID NO: 18), proXNP6 (SEQ ID NO: 19) o XNP7 (SEQ ID NO: 20).

- 20 Además de las secuencias de los péptidos derivadas de proANP y proBNP el agente puede incluir una secuencia lineal, conectora o aducto de aminoácidos de longitud o composición variable. Se conocen enlazadores adecuados en el estado del arte. La estructura del enlazador puede ser por ejemplo para permitir la unión de una o más etiquetas (por ejemplo grupos fluorescentes o enzimas) con el enlazador. Por ejemplo, los espaciadores y aductos adecuados incluyen Gly-Lys-Tyr-Gly (GKYG) (SEQ ID NO: 16), Ser-Arg, Gly-Ser o un solo aminoácido por ejemplo Tyr o Cys. El residuo de Tyr permite yodación radioactiva y el residuo de Lys o Cys permite la unión de etiquetas que requieren un grupo amino o un grupo sulfhidrilo.

Un agente puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido, por ejemplo aquellos descritos para los anticuerpos.

- 30 Un agente de la invención puede incluir una secuencia químicamente modificada de aminoácidos, por ejemplo modificados después de la traducción. Por ejemplo, puede ser glicosilada o incluir residuos modificados de aminoácidos. Puede ser modificado por medio de la adición de residuos de histidina para ayudar a la purificación. Puede ser deseable producir un péptido o proteína en una forma adecuada para unión a un soporte sólido. La proteína o el péptido pueden ser por lo tanto modificados para mejorar su enlazamiento a un soporte sólido por ejemplo por medio de la adición de un residuo de cisteína.

(b) Agentes que codifican polinucleótidos

- 35 La invención también se relaciona con polinucleótidos que codifican un agente de acuerdo con la invención. Tales polinucleótidos incluyen una secuencia que codifica los polipéptidos del agente como se definió anteriormente y/o una secuencia que es complementaria a la secuencia de codificación.

En particular un polinucleótido de la invención puede incluir tanto:

(a)

- 40 (i) las SEQ ID Nos 7, 8 ó 9;

(ii) una secuencia complementaria a (i);

(iii) una secuencia que hibrida bajo condiciones rigurosas a (i) o (ii);

(iv) una secuencia que se degenerada como resultado del código genético a (i), (ii) o (iii);

(v) una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con cualquiera de las secuencias en (i) hasta (iv); o

- 45 (vi) un fragmento hasta de 40 nucleótidos de longitud de cualquiera de las secuencias en (i) hasta (v);

y

(b)

(i) las SEQ ID Nos 10, 11 ó 12;

- (ii) una secuencia complementaria a (i);
- (iii) una secuencia que hibrida bajo condiciones rigurosas a (i) o (ii);
- (iv) una secuencia que se degenerada como resultado del código genético a (i), (ii) o (iii);
- (v) una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con cualquiera de las secuencia en (i) hasta (iv); o

5 (vi) un fragmento hasta de 40 nucleótidos de longitud de cualquiera de las secuencias en (i) hasta (v).

Un polinucleótido puede incluir también una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del enlazador o del espaciador en el agente. Un polinucleótido de la invención típicamente incluye 1000 pares de bases o menos, por ejemplo 500 pares de bases o menos. Un polinucleótido puede incluir hasta 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 pares de bases. Por ejemplo, un polinucleótido puede incluir hasta 50, 100, 150 o 175 nucleótidos.

10 Típicamente el polinucleótido es ADN. Sin embargo, la invención puede incluir polinucleótidos de ARN. Los polinucleótidos pueden ser mono o bicatenarios, y pueden incluir nucleótidos sintéticos o modificados.

Un polinucleótido de la invención puede hibridar a la secuencia de codificación o el complemento de la secuencia de codificación de la secuencia especificada (cualquiera de las SEQ ID Nos: 7 - 12) en un nivel significativamente por encima del nivel de fondo. La hibridación e fondo puede presentarse, por ejemplo, debido a los otros ADN presentes en una biblioteca de ADN. El nivel de la señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia de codificación o el complemento de la secuencia de codificación de la secuencia específica es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, tan intensa como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia de codificación de la secuencia específica. La intensidad de la interacción puede ser medida, por ejemplo, por medio de marcación radioactiva de la sonda, por ejemplo con ³²P. La hibridación selectiva típicamente se puede lograr utilizando condiciones de rigurosidad media a alta. Sin embargo, tal hibridación puede ser llevada a cabo bajo cualquiera de las condiciones adecuadas conocidas en el arte (ver Sambrook et al, 1989) Por ejemplo, si se requiere alta rigurosidad las condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60 °C hasta 65 °C. Si se requiere baja rigurosidad las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 °C.

La secuencia de codificación de cualquiera de las SEQ ID Nos: 7 - 12 puede ser modificada por medio de sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 hasta 10, 25 ó 50 sustituciones. El polinucleótido de cualquiera de las SEQ ID Nos: 7 - 12 puede ser modificado alternativa o adicionalmente por una o más inserciones y/o supresiones y/o por medio de una extensión en uno cualquiera o en ambos extremos. También se pueden incluir secuencias adicionales por ejemplo secuencias de señalización. Pueden hacerse sustituciones degeneradas y/o pueden hacerse sustituciones que darían como resultado una sustitución conservadora de aminoácidos cuando se traduce la secuencia modificada, por ejemplo como se muestra en la Tabla incluida en la sección de Variantes más arriba.

Una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar selectivamente con el complemento de la secuencia de codificación de ADN de cualquiera de las SEQ ID Nos: 7 - 12 tendrá generalmente al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia específica de codificación sobre una región de al menos 20, por ejemplo al menos 30, por ejemplo al menos 40, al menos 60, 80, 100 por ejemplo 100 ó 200 o más nucleótidos o lo más preferible sobre la longitud completa de la secuencia específica de codificación.

Por ejemplo el Paquete UWGCG provee el programa BESTFIT que puede sr utilizado para calcular la homología (por ejemplo utilizado sobre sus ajustes predeterminados) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, páginas 387 - 395). Se pueden utilizar los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular homología o alineación de secuencias (típicamente sobre sus ajustes predeterminados), por ejemplo como se describe en Altschul (1993) J. Mol. Evol. 36: 290 - 300; Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 10.

El programa para llevar a cabo análisis por BLAST se encuentra públicamente disponible a través del National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo involucra primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) por medio de la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que o bien coincide o satisface alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una base de datos de secuencia. T se conoce como el umbral de puntuación por palabra de los alrededores (Altschul et al, 1990). Estos aciertos iniciales por palabra de los alrededores actúan como semillas para iniciar las búsquedas para hallar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para poder incrementar la puntuación acumulativa por alineación. Las extensiones para los aciertos de palabra en cada dirección se interrumpen cuando: la puntuación acumulativa por alineación cae en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa baja hasta cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de uno o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de la secuencia. Los parámetros del algoritmo de BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza como predeterminadas una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación de BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 89: 10915 - 10919) alineaciones (B) de 50, expectativas (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo de BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; ver por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877. Una medición de la similitud suministrada por el algoritmo de BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por medio de la cual ocurriría una coincidencia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, se considera que una secuencia es similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es aproximadamente menor a 1, preferiblemente aproximadamente menor a 0,1, más preferiblemente aproximadamente menor a 0,01, y lo más preferible aproximadamente menor a 0,001.

Cualquier combinación de los grados de identidad de secuencia anteriormente mencionados y tamaños mínimos pueden ser utilizados para definir polinucleótidos de la invención, siendo preferidas las combinaciones más rigurosas (es decir mayor identidad de secuencia sobre longitudes mayores). De este modo, por ejemplo un polinucleótido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia sobre 25, preferiblemente sobre 30 nucleótidos forma un aspecto de la invención, al igual que un polinucleótido que tenga al menos 95% de identidad de secuencia sobre 40 nucleótidos.

Los fragmentos de polinucleótidos son hasta de 40, y pueden ser, por ejemplo, hasta de 30 nucleótidos de longitud. Preferiblemente la longitud es hasta de 5, 10, 15, 20 ó 25 nucleótidos.

En una modalidad, un polinucleótido que codifica un agente de la invención puede incluir cualquiera de las SEQ ID NOS: 21 a 27. Por lo tanto un polinucleótido puede codificar NT-proXNP1, NT-proXNP2, NT-proXNP3, NT-proXNP4, NT-proXNP5, proXNP6 o XNP7. Un polinucleótido puede incluir:

- (a) las SEQ ID NO 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27;
- (b) una secuencia complementaria a (a);
- (c) una secuencia que hibrida bajo condiciones rigurosas a (a) o (b);
- (d) una secuencia que se degenera como resultado del código genético a (a), (b) o (c);
- (e) una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con cualquiera de las secuencias en (a) hasta (d); o
- (f) un fragmento de cualquiera de las secuencia en (a) hasta (e).

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser producidos en forma recombinante, sintética, o por medio de cualquier medio disponible para aquellos capacitados en el arte. También pueden ser clonados por medio de técnicas estándar. Los polinucleótidos son típicamente suministrados en forma aislada y/o purificada.

En general, los iniciadores serán producidos por medios sintéticos, lo que involucra una fabricación por etapas de la secuencia deseada de ácido nucleico, un nucleótido a la vez. Las técnicas para lograr esto utilizando técnicas automatizadas se encuentran fácilmente disponibles en el estado del arte.

Aunque en general las técnicas mencionadas aquí son bien conocidas en el arte, puede hacerse referencia en forma particular a Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención tiene utilidad en la producción de los agentes polipeptídicos de acuerdo con la invención, que puede tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos pueden ser utilizados en la síntesis de proteínas recombinantes. Los métodos de expresión de proteína recombinante son bien conocidos en el arte y se discuten adicionalmente más adelante.

Los polinucleótidos o iniciadores de la invención pueden portar una etiqueta de revelado. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos por ejemplo ¹²⁵I, ³²P o ³⁵S, etiquetas enzimáticas, u otras etiquetas de proteína por ejemplo biotina. Tales etiquetas pueden ser añadidas a polinucleótidos o iniciadores de la invención y pueden ser detectadas utilizando técnicas ya conocidas.

(c) Vectores, células huésped y Expresión de agentes peptídicos

Los polinucleótidos de la invención pueden ser incorporados en un vector recombinante replicable. El vector puede ser utilizado para replicar al ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto, los polinucleótidos de la invención pueden ser elaborados por medio de la introducción de un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped bajo condiciones que producen la replicación del vector.

En un aspecto el vector es un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente polipeptídico de la invención. Tales vectores de expresión se construyen rutinariamente en el arte de la biología molecular y pueden, por ejemplo, involucrar el uso de ADN plasmídico e iniciadores apropiados, promotores,

reforzadores y otros elementos, que pueden ser necesariamente, y que se posicionan en la orientación correcta, con el propósito de permitir la expresión de proteína. Otros vectores adecuados serían evidentes para las personas capacitadas en el arte. A modo de ejemplo adicional en este sentido se hace referencia a Sambrook et al. 1989.

5 En una modalidad, un polinucleótido de la invención o para uso en la invención en un vector está operativamente enlazado a una secuencia de control que es capaz de proveer la expresión de la secuencia de codificación por la célula huésped, es decir el vector es un vector de expresión. El término "operativamente enlazado" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite actuar en su forma prevista. Una secuencia reguladora, por ejemplo un promotor, "operativamente enlazado" a una secuencia de codificación está ubicada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles
10 con la secuencia reguladora.

Los vectores pueden ser por ejemplo, vectores plásmidos, virus o fagos provistos con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia para un vector de hongos.

15 Los promotores y otras señales de regulación de la expresión pueden ser seleccionados para que sean compatibles con la célula huésped para la cual se diseña la expresión. Por ejemplo, los promotores de levadura incluyen *S. cerevisiae* GAL4 y promotores ADH, *S. pombe nmt1* y el promotor *adh*. Los promotores de mamífero incluyen al promotor de metalotioneína que puede ser inducido en respuesta a metales pesados por ejemplo cadmio. También se pueden utilizar promotores virales por ejemplo el promotor de antígeno T grande del SV40 o promotores adenovirus. Todos estos promotores se encuentran disponibles en el arte.

Se pueden utilizar promotores de mamífero, por ejemplo promotores de β -actina. Se pueden utilizar promotores específicos del tejido. También se pueden utilizar promotores virales, por ejemplo la repetición del terminal largo del virus e la leucemia de múrido de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del SV40, el promotor IE de citomegalovirus humano (CMV), adenovirus, promotores del HSV (por ejemplo los promotores IE del HSV), o promotores del HPV, particularmente la región reguladora secuencia arriba del HPV (URR). Los promotores virales se encuentran disponibles en el arte.

25 Los vectores pueden ser utilizados *in vitro*, por ejemplo para la producción de ADN o ARN o utilizados para transfectar o transformar una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero.

30 Los vectores de expresión pueden ser transformados en una célula huésped adecuada para permitir la expresión de un agente polipeptídico de la invención o un componente peptídico del agente de acuerdo con la invención. La célula huésped, transformada o transfectada con un vector de expresión como se describió anteriormente, se cultiva bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido o fragmento, y se recupera el producto de la expresión. El polipéptido puede ser aislado y purificado utilizando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de despliegue en fagos. Las células huésped se escogen para ser compatibles con el vector y serán preferiblemente bacterianas. Las células huésped pueden ser también células de un animal no humano, o una planta transformada con un polinucleótido de la invención.

General

40 Cualquiera de los agentes, polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células o anticuerpos de la invención pueden estar presentes en forma sustancialmente aislada. Pueden ser mezclados con portadores o diluyentes que no interferirán con su uso pretendido y aún ser considerados como sustancialmente aislados. También pueden estar en forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente incluirán al menos 90%, por ejemplo al menos 95%, 98% o 99% de las proteínas, polinucleótidos, células o masa seca de la preparación.

45 Cualquiera de los agentes, o anticuerpos de la invención pueden ser marcados, generalmente con una etiqueta detectable adecuada. Por ejemplo, las etiquetas adecuadas incluyen etiquetas radioactivas, etiquetas de enzimas (por ejemplo fosfatasa alcalina y peroxidasa por ejemplo HRP), etiquetas químicas por ejemplo biotina (que puede ser detectada por avidina o estreptavidina conjugada con peroxidasa), lantánidos por ejemplo europio y etiquetas fluorescentes (por ejemplo fluoresceína y rodamina), y etiquetas luminiscentes o quimioluminiscentes (por ejemplo éster de acridinio, luminol), oro (u otro metal coloidal), un colorante o una partícula. Las etiquetas de enzimas pueden ser detectadas utilizando un sistema con base en quimioluminiscencia o cromogénico.

50 Tratamiento de diagnóstico y monitoreo

Los presentes métodos son útiles para evaluar la salud cardíaca en un individuo. En particular, se pueden utilizar los métodos para detectar y evaluar insuficiencia cardíaca. Un ejemplo particular de una enfermedad cardíaca que puede ser manejada utilizando los presentes métodos es la insuficiencia cardíaca congestiva.

55 La insuficiencia cardíaca es una condición clínica caracterizada por la inhabilidad del corazón para generar un gasto cardiaco suficiente para satisfacer las demandas del organismo lo cual resulta en una activación de los sistemas hormonales ANP y BNP. La activación del sistema ANP está inicialmente asociada principalmente con una

sobrecarga atrial mientras que la activación del sistema BNP es ante todo sugerente de sobrecarga ventricular. La inactivación de los sistemas es un resultado de cualquiera de los sistemas reguladores propios del paciente o el uso de fármacos terapéuticos para el tratamiento de insuficiencia cardíaca.

5 Como anteriormente, los presentes métodos, pueden ser utilizados por medio de la determinación de los niveles combinados de los péptidos derivados de proANP y proBNP en una muestra con relación a un nivel de un péptido de referencia, para determinar la activación o inactivación tanto del sistema hormonal ANP como del BNP en un individuo. Por lo tanto, los presentes métodos pueden ser utilizados para evaluar el funcionamiento de los sistemas cardíacos. Los métodos de la invención son útiles para seleccionar y descartar, evaluar la severidad, evaluar el pronóstico, hacer seguimiento al tratamiento y dirigir el tratamiento de una enfermedad cardíaca por ejemplo
10 insuficiencia cardíaca en pacientes con sobrecarga de volumen o de presión cardíaca.

Por ejemplo, los métodos pueden ser utilizados para diagnóstico de una enfermedad cardíaca. Los métodos pueden ser utilizados para seleccionar individuos, para evaluar la severidad de una condición cardíaca, para evaluar el pronóstico o para estimar la susceptibilidad, por ejemplo a un fallo cardíaco. Los presentes métodos pueden ser empleados también como un seguimiento al tratamiento para una enfermedad cardíaca y para evaluar, monitorear y
15 dirigir el tratamiento de una enfermedad cardíaca. Por medio del monitoreo de la activación o inactivación de los sistemas ANP y BNP de acuerdo con los presentes métodos, es posible evaluar los efectos del tratamiento en pacientes que padecen una enfermedad cardíaca, por ejemplo terapia farmacológica. Por lo tanto los presentes métodos pueden ser utilizados para evaluar la sensibilidad del paciente a una terapia particular y para mejorar el tratamiento que se administra.

20 Los presentes métodos pueden ser utilizados para evaluar la susceptibilidad a una enfermedad cardíaca. Los individuos pueden ser entonces aconsejados sobre cambios en el estilo de vida que pueden ser requeridos para disminuir la probabilidad de desarrollar o disminuir la severidad de los síntomas asociados con una enfermedad cardíaca por ejemplo insuficiencia cardíaca. Los individuos pueden ser tratados profilácticamente para el mismo propósito.

25 Kits de diagnóstico

La invención también provee un kit de diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 35. El kit es adecuado para uso en los presentes métodos y es en general útil para el diagnóstico y evaluación de la condición cardíaca como se describió anteriormente.

30 Los contenidos del kit serán adecuados para el formato de análisis para el cual está diseñado el kit. Típicamente el kit incluye una primera sustancia de enlazamiento como se define en la reivindicación 1 (I), y opcionalmente medios para detectar complejos de enlazamiento formados por la primera sustancia de enlazamiento, también como se describe aquí. Un kit puede incluir adicionalmente un agente de acuerdo con la invención, siendo el agente capaz de enlazarse con la primera sustancia de enlazamiento en el kit como se define en la reivindicación 1 (II). La primera sustancia de enlazamiento y/o el agente pueden estar marcados.

35 En general un kit puede incluir otros reactivos o componentes para uso en el ensayo particular, por ejemplo amortiguadores, precipitadores, medios de etiquetado y/o de detección. El kit puede incluir instrucciones, por ejemplo un inserto dentro del empaque que instruye al usuario del kit sobre el contenido del mismo y el formato de análisis.

Por lo tanto, un kit para un ensayo competitivo puede incluir:

40 (a) una primera sustancia de enlazamiento;
(b) un agente etiquetado (NT-proXNP, proANP o XNP);
(c) un estándar (NT-proXNP, proXNP o XNP); y
(d) otros materiales usuales de acuerdo con el sistema de detección, por ejemplo precipitadores, amortiguadores etc.

45 Un kit para un ensayo tipo sándwich puede contener:

(a) una primera sustancia de enlazamiento;
(b) una segunda sustancia de enlazamiento marcada;
(c) un estándar (NT-proXNP, proXNP, XNP);
(c) otros materiales usuales de acuerdo con el sistema de detección.

50

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención. A menos que se indique otra cosa, los métodos utilizados son técnicas estándar de bioquímica y de biología molecular. Los ejemplos de libros de texto adecuados de metodología general incluyen Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1995) John Wiley y Sons Inc.

Ejemplo I

Expresión y purificación de NT-proXNP recombinante

Los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1 - 37 de NT-proBNP humano y aquellos que codifican los aminoácidos 29 - 98 de NT-proANP humano se amplifican por medio de PCR de transcripción inversa de ARN atrial humano utilizando iniciadores oligonucleótidos. El iniciador 5' para amplificación de NT-proBNP contiene el sitio de escisión para la enzima de restricción *Bam*HI (5'-GCGGATCCCACCCGCTGGGCAGCCCCG-3' SEQ ID NO: 28) y el iniciador 3' para *Xba*I (5'-GCTCTAGAGGATGTCTGCTCCACC-3' SEQ ID NO: 29). El iniciador 5' para amplificación de NT-proANP tiene enlazador *Xba*I (5'-GCTCTAGAGAAGATGAGGTCGTGC-3' SEQ ID NO: 30) y el iniciador 3' tiene al enlazador *Eco*RI (5'-GCGAATTCTCACCGAGGGGCAGTGAGC-3' SEQ ID NO: 31). Además, el amplicón de NT-proANP contiene un codón de terminación en el marco (TGA) en su extremo 3' precediendo al sitio de escisión de *Eco*RI. La otra versión del amplicón de NT-proBNP contiene un codón en el marco para Tyr en su terminal 5' después de la secuencia enlazadora de *Bam*HI (5'-GCGGATCCTACCACCCGCTGGGCAG-3' SEQ ID NO: 32). Los productos de la RT-PCR se purifican por medio de electroforesis en agarosa, se escinden con *Xba*I y *Bam*HI o *Eco*RI y se subclonan de extremo a extremo (NT-proBNP → NT-proANP) en el sitio *Bam*HI/*Eco*RI del vector pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las secuencias de nucleótidos y los marcos de lectura de las construcciones se confirman por medio de secuenciación.

La expresión y purificación por afinidad de las proteínas de GST se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Un cultivo durante la noche de *E. coli*, transformado con un plásmido recombinante, se diluye 1:100 en 2xYTA y se cultiva a 37°C hasta que la OD a 660 nm alcanza 0,6. Se añade isopropil-1-tio-D-galactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,1 mM y se incuba adicionalmente el cultivo durante 1 - 2 h. Las células bacterianas se recolectan por medio de centrifugación (7000 g durante 10 min a +4°C), se resuspende en PBS (50 µl/ml del cultivo) y se sonica. El lisado celular se clarifica a 7000 g durante 15 min. Se aplica el sobrenadante a una columna de agarosa glutationa (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) y se lava tres veces con PBS. La proteína de fusión se eluye con glutationa 10 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se almacena en alícuotas a 20°C. Las muestras se separan por SDS-PAGE (acrilamida al 12%). Se pueden utilizar tanto vectores de expresión procariotas como eucariotas. Por lo tanto, se puede producir el péptido completo o al menos una porción de dicho péptido o proteína en células procariotas o eucariotas.

Los péptidos recombinantes se liberan del compañero de fusión por medio de tratamiento con trombina (Amersham Pharmacia Biotech) a temperatura ambiente durante 1 h (1U /100 µg de proteína). Se purifican los péptidos por medio de HPLC en fase reversa utilizando una columna C4 Vydac de 4,6 x 150 mm. Se eluye la columna con un gradiente lineal de 20 - 48 % de acetonitrilo durante 40 min en ácido trifluoroacético acuoso. La tasa de elución es de 1 ml/min y se mide la absorbancia a 200 - 280 nm durante la HPLC para monitorear la pureza de los productos.

Un ejemplo del perfil de HPLC del producto purificado que consiste de (desde el terminal NH₂ hasta el terminal CO₂H) proBNP₁₋₃₇ humano, un espaciador corto, serina y arginina, y proANP₂₉₋₉₈ humano, se presenta en la Figura 1. Dos aminoácidos adicionales, glicina y serina, originados a partir de GST se dejen en el terminal N del péptido como un aducto.

Ejemplo 2

Síntesis química de NT-proXNP

Se ensambló la combinación epítipo NT-proXNP5 que incluye las secuencias (desde el terminal NH₂ hasta el terminal CO₂H) proBNP₁₀₋₂₉ humanas, espaciador Cys y proANP₆₀₋₈₀ humana con un Sintetizador de Péptidos utilizando química Fmoc. Alternativamente se ensambló la combinación epítipo péptido NT-proXNP1 que incluye (desde el terminal NH₂ hasta el terminal CO₂H) las secuencias proBNP₁₅₋₂₄ humana, espaciador Gly-Lys-Tyr-Gly y proANP₈₂₋₉₆ humana. Se escindió el producto a partir de la resina HMP con 95 % de ácido trifluoroacético/2,5 % de H₂O, 2,5 % de tri-isopropilsilano, precipitado con dietil éter, se seca y desaliniza sobre Sefadex G-15 en ácido acético al 30 %. Se purificó el péptido por medio de HPLC en fase reversa en un preparado. Un cartucho C18 RCM NovaPak (2,5 x 10 cm) con un gradiente lineal de acetonitrilo en ácido trifluoroacético acuoso al 0,1 %. Se determinó la pureza por medio de HPLC en fase reversa en condiciones de elución con diferente selectividad. Se confirmó la identidad del péptido por medio del análisis de aminoácidos o espectrometría de masas MALDI-TOF y mapeo de péptidos.

Ejemplo 3**Inmunoensayo de NT-proXNP**

Se preparó la sustancia de enlazamiento a partir de anticuerpos de cabra obtenidos utilizando como inmunógeno proteína de fusión purificada por afinidad de GST/NT-proANP₂₀₋₈₀ y NT-proBNP₁₀₋₂₉-TBG o proteína de fusión GST de NT-pro-BNP₁₋₃₇ y NTproANP₂₉₋₉₈. El último de los antígenos peptídicos fue preparado con los métodos descritos en el Ejemplo 1 y contiene proBNP₁₋₃₇ humano, espaciador Ser-Arg, proANP₂₉₋₉₈ humano y aducto Gly-Ser. Alternativamente, se preparó otro antígeno peptídico con los métodos descritos en el Ejemplo 2 que contiene (desde el terminal NH₂ hasta el terminal CO₂H) las secuencias de proBNP₁₀₋₂₉ humano, espaciador de cisteína a partir del cual fue acoplado a la tiroglobulina bovina (TBG) antes de la inmunización y proANP₆₀₋₈₀ humano. Las cabras fueron inyectadas en múltiples sitios en el lomo con 1 - 1,5 mg de inmunógeno en 1 ml de NaCl al 0,9 % emulsionado en un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Se suministraron refuerzos de 0,5 mg en adyuvante incompleto de Freund 2 - 4 veces en intervalos de 2 - 3 semanas y se retira sangre 14 días después de las últimas inyecciones. Se escogieron los antisueros de acuerdo con el título del enlazamiento del péptido o agente proteico marcado con yodo radiactivo de la invención (ver más adelante), así como la sensibilidad y especificidad con relación a péptidos relacionados y al péptido o agente proteico de la invención. Cualquier modificación del péptido o agente proteico de la invención o cualquier fragmento o derivado del mismo puede ser utilizado también con propósitos de inmunización para producir ya sea anticuerpos monoclonales o policlonales.

NT-proBNP₁₋₃₇/NT-proANP₂₉₋₉₈ recombinante (1,5 µg), producido como se describe en el Ejemplo 1, fue marcado con yodo radioactivo utilizando 0,5 mCi de Na¹²⁵I en presencia de 10 µg de cloramina-T en amortiguador de fosfato 0,5 M, pH 7,5 durante 60 s, seguido por la adición de 10 µg de disulfito de sodio. La mezcla fue desalinizada por medio de filtración en gel de Sefadex G-25 y purificada por HPLC en fase reversa en una columna C18 Symmetry y un gradiente lineal de 20 % a 50 % de acetonitrilo durante 30 min en ácido trifluoroacético acuoso con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se monitoreó la radioactividad en un contador Multi-Gamma (Wallac, Turku, Finlandia).

NT-proBNP₁₋₃₇/NT-proANP₂₉₋₉₈ recombinante, producido como se describe en el Ejemplo 1, fue utilizado también como el calibrador del ensayo en el inmunoensayo de NT-proXNP. El amortiguador del ensayo utilizado para todas las diluciones consiste de fosfato ácido de sodio 0,04 M, fosfato dihidrógeno de sodio 0,01 M, NaCl 0,1 M, gelatina al 0,1 %, Triton X-100 al 0,05 %, pH 7,4). Se incubaron muestras de suero o plasma en duplicados de 25 µl con 100 µl de antisuero y 100 µl de solución trazadora (que contiene aproximadamente 8 000 cpm de péptido yodado) durante 16 - 24 h a +4°C. Se realizó la calibración por medio de incubación de los calibradores (0,08 - 8 nmol l⁻¹) con la misma cantidad y concentración de antisuero, trazador y anti-antisuero durante el mismo período de tiempo anterior. Se determinó la cantidad de antisuero analizada para enlazar 40 - 50% del trazador cuando no había competidor presente, con el propósito de garantizar suficiente competición en el enlazamiento.

La Figura 2b muestra el desarrollo de títulos de anticuerpo en la inmunización de una cabra utilizando la proteína de fusión GST de NTproBNP₁₋₃₇/NT-proANP₂₉₋₉₈ (que contiene la SEQ ID NO: 14) como inmunógeno, títulos después del 1er, 3ero y 4to refuerzo en RIA de NT-proANP₁₋₉₈ y NT- proBNP₁₋₇₆. La Figura 2b muestra que, por ejemplo, una sustancia de enlazamiento preparada en una cabra, obtenida por medio del uso de proteína de fusión GSTde NT-proBNP₁₋₃₇/NT-proANP₂₉₋₄₈ (que contiene la SEQ ID NO: 14) como inmunógeno, típicamente en dilución de 1:50.000-1:60.000 fue adecuado para 40 - 50% del enlazamiento y enlazamiento simultáneo de NT-proANP (SEQ ID NO: 3) y NT-proBNP (SEQ ID NO: 6) demostrado también en radioinmunoensayos separados de NT-proANP₁₋₉₈ y NTproBNP₁₋₇₆. Se produjo una sustancia similar de enlazamiento en la inmunización de una cabra utilizando conjugado de TBG de NTproBNP₁₀₋₂₉/NT-proANP₆₀₋₈₀, (que contiene la SEQ ID NO: 18) como inmunógeno. Una dilución típica en un ensayo competitivo de NT-proXNP estaba en el rango de 1:10.000 a 1:15.000.

Se separó NT-proXNP enlazado y libre por medio de precipitación con IgG anticabra de asno en 0,5 ml de polietilén glicol 6000 al 8%, que contenía como portador suero normal de cabra (1 µl). Después de centrifugación, se midió la radioactividad del precipitado. Un ejemplo de una curva de referencia obtenida por medio de este tipo de análisis se presenta en la Figura 2a.

La Figura 2a muestra una curva de enlazamiento competitivo para un inmunoensayo de NT-proXNP. El ensayo utiliza NT-proBNP₁₋₃₇/NT-proANP₂₉₋₉₈ recombinante como calibrador y trazador y sustancia de enlazamiento con base en anticuerpo policlonal de cabra para reconocer NT-proXNP, NT-proANP y NT-proBNP simultáneamente. El eje X describe la cantidad de calibrador añadida y el eje Y Enlazado/Enlazado sin calibrador añadido.

El inmunoensayo de NT-proXNP descrito en el Ejemplo 3 fue utilizado para determinar los niveles en suero de NT-proXNP en 700 pacientes con trastornos cardíacos. Los resultados se muestran en la Figure 3. Los niveles de NT-proXNP se correlacionan de manera altamente significativa con los niveles de NT-proANP y NT-proBNP medidos a partir de las mismas muestras por medio de radioinmunoensayos internos separados de NT-proANP₁₋₉₈ y NT-proBNP₁₋₇₆.

Los métodos del Ejemplo 3 fueron utilizados para el análisis de los niveles en suero de NT-proXNP, en 500 pacientes cardíacos clasificados de acuerdo con la escala de la New York Heart Association (NYHA). Los resultados

se muestran en la Figura 4. Los niveles en suero de NT-proANP y NT-proBNP medidos por medio de radioinmunoensayos internos separados a partir de las mismas muestras se muestran como referencia como una medida de activación de los sistemas ANP y BNP.

- 5 Los métodos del Ejemplo 3 fueron utilizados para analizar los niveles en plasma de NT-proXNP en pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca y estos fueron correlacionados con efecto positivo de terapia farmacológica en los pacientes. Los resultados se muestran en la Figura 5. Los niveles en suero de NT-proANP y NT-proBNP medidos a partir de las mismas muestras por medio de radioinmunoensayos internos separados se muestran como referencia. Pacientes (n = 11) que sufren de insuficiencia cardíaca (clase II-III estable de la NYHA) fueron tratados por medio de infusión intravenosa de un inodilatador durante 24 horas. Se midió el gasto cardíaco (CO) como ml/min con ecocardiografía. Los niveles de NT-proANP, NT-proBNP y NT-proXNP fueron analizados antes y a las 24 horas del inicio de la administración del fármaco. La sensibilidad relativa para detectar la respuesta al tratamiento se determinó en los niveles límite de un incremento del 10 % en CO, como se determinó con ecocardiografía y disminuyó un 20 % en NT-ProANP y NT-ProBNP y NT-proXNP como una medición de la inactivación de sistemas ANP y BNP. NT-proXNP excedió el límite en todos los 11 casos, mientras que NT-proANP y NT-proBNP y CO excluyeron el límite en 9 de 11 casos.
- 10
- 15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ORION DIAGNOSTICA OY

<120> ASSAY

<130> N88837A JHS

5 <140> EP 04740371.2

<141> 2004-06-28

<150> GB 0315291.5

<151> 2003-06-30

<160> 36

10 <170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

```

Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys
1      5      10      15
Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val
20      25      30
Val Pro Pro Gln Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala
35      40      45
Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro
50      55      60
Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser
65      70      75      80
Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala
85      90      95
Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg
100     105     110
Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
115     120     125

```

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Cys	Phe	Gly	Gly	Arg	Met	Asp	Arg	Ile	Gly
1				5				10						15	
Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn	Ser	Phe	Arg	Tyr				
			20					25							

<210> 3

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4

<211> 108

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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							

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 5

Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp
1				5					10					15	
Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu	Arg	Arg	His
			20					25					30		

<210> 6

<211> 76

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 6

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					

<210> 7

15 <211> 378

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

aatcccatgt	acaatgccgt	gtccaacgca	gacctgatgg	atttcaagaa	tttgctggac	60
catttgaag	aaaagatgcc	tttagaagat	gaggtcgtgc	ccccacaagt	gctcagtga	120
ccgaatgaag	aagcgggggc	tgctctcagc	cccctccctg	aggtgcctcc	ctggaccggg	180
gaagtcagcc	cagcccagag	agatggaggt	gccctcgggc	ggggccctg	ggactcctct	240
gatcgatctg	ccctcctaaa	aagcaagctg	agggcgctgc	tactgcccc	tcggagcctg	300
cggagatcca	gctgcttcgg	gggcaggatg	gacaggattg	gagcccagag	cggactgggc	360
tgtaacagct	tccggtac					378

20 <210> 8

<211> 84

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

5 **agcctgcgga gatccagctg cttcgggggc aggatggaca ggattggagc ccagagcgga 60**
ctgggctgta acagcttccg gtac 84

<210> 9

<211> 294

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 9

aatcccatgt acaatgc'cgt gtccaacgca gacctgatgg atttcaagaa ttgctggac 60
catttgaag aaaagatgcc tttagaagat gaggtcgtgc cccacaagt gctcagtgag 120
ccgaatgaag aagcgggggc tgctctcagc cccctccctg aggtgcctcc ctggaccggg 180
gaagtcagcc cagcc'cagag agatggaggt gccctcgggc ggggccctg ggactcctct 240
gatcgatctg cctcctctaaa aagcaagctg agggcgctgc t'actgcccc tcgg 294

<210> 10

<211> 324

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 10

cacccgctgg gcagccccgg ttcagcctcg gacttggaaa cgtccggggt acaggagcag 60
cgcaaccatt tgcagggcaa actgtcggag ctgcaggtgg agcagacatc cctggagccc 120

ctccaggaga gccccgctcc cacagggtgtc tggaagtccc gggaggtagc caccgagggc 180
atccgtgggc accgcaaaat ggtcctctac accctgcggg caccacgaag cccaagatg 240
gtgcaagggc ctggctgctt tgggaggaag atggaccgga tcagtcctc cagtggcctg 300
ggctgcaaag tgctgaggcg gcat 324

<210> 11

20 <211> 96

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggaccg gatcagctcc 60
tccagtggcc tgggctgcaa agtgctgagg cggcat 96

<210> 12

<211> 228

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 12

```

cacccgctgg gcagccccgg ttcagcctcg gacttggaaa cgcccggtt acaggagcag      60
cgcaaccatt tgcagggcaa actgtcggag ctgcagggtgg agcagacatc cctggagccc      120
ctccaggaga gccccgtcc cacagggtgc tggaagtccc gggaggtagc caccgagggc      180
atccgtgggc accgcaaaat ggtcctctac accctgcggg caccacga      228

```

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP1

<400> 13

```

Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Arg Ser Ala Leu Leu Lys
1          5          10          15
Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala
20          25

```

15 <210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP2

<400> 14

```

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 Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser

```

		35					40				45						
Glu	Pro	Asn	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Glu	Val		
	50					55					60						
Pro	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Val	Ser	Pro	Ala	Gln	Arg	Asp	Gly	Gly	Ala		
65					70				75						80		
Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Lys		
			85						90					95			
Ser	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Pro	Arg							
			100					105									

<210> 15

<211> 81

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP3

<400> 15

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

10 <210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia de aminoácidos del espaciador

<400> 16

Gly Lys Tyr Gly
1

<210> 17

<211> 174

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP4

<400> 17

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	Asn	Pro	Met	Tyr
65					70					75					80
Asn	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu	Met	Asp	Phe	Lys	Asn	Leu	Leu	Asp
				85					90					95	
His	Leu	Glu	Glu	Lys	Met	Pro	Leu	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Pro	Pro	Gln
			100					105					110		
Val	Leu	Ser	Glu	Pro	Asn	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu
		115					120					125			
Pro	Glu	Val	Pro	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Val	Ser	Pro	Ala	Gln	Arg	Asp
	130					135					140				
Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Ala
145					150					155					160
Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Pro	Arg		
				165					170						

<210> 18

10 <211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP5

15 <400> 18

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

<210> 19

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP6

<400> 19

His	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly
				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	Asn	Pro	Met	Tyr
			100					105					110		
Asn	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu	Met	Asp	Phe	Lys	Asn	Leu	Leu	Asp
		115					120					125			
His	Leu	Glu	Glu	Lys	Met	Pro	Leu	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Pro	Pro	Gln
	130					135					140				
Val	Leu	Ser	Glu	Pro	Asn	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu
145					150				155						160
Pro	Glu	Val	Pro	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Val	Ser	Pro	Ala	Gln	Arg	Asp
				165					170					175	
Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Ala
			180					185					190		
Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Pro	Arg	Ser	Leu
		195					200					205			
Arg	Arg	Ser	Ser	Cys	Phe	Gly	Gly	Arg	Met	Asp	Arg	Ile	Gly	Ala	Gln
	210					215					220				
Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn	Ser	Phe	Arg	Tyr						
225					230										

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de aminoácidos de un agente de acuerdo con la invención NT-proXNP7

<400> 20

Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp
			5						10					15	
Arg	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn	Ser	Phe	Arg	Tyr	
		20						25					30		

<210> 21

<211> 75

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP1

<400> 21

tccgggttac	aggagcagcg	caaccatttg	cgatctgccc	tcctaaaaag	caagctgagg	60
gcgctgctca	ctgcc					75

<210> 22

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP2

<400> 22

caccgcgtgg	gcagccccgg	ttcagcctcg	gacttggaag	cgccggggtt	acaggagcag	60
cgcaaccatt	tgcagggcaa	actgtcggag	ctgcagggtg	agcagacatc	cgaagatgag	120
gtcgtgcccc	cacaagtgtc	cagtgaagcg	aatgaagaag	cgggggctgc	tctcagcccc	180
ctccctgagg	tgcctccctg	gaccggggaa	gtcagcccag	cccagagaga	tggaggtgcc	240
ctcggggcgg	gcccctggga	ctcctctgat	cgatctgccc	tcctaaaaag	caagctgagg	300
gcgctgctca	ctgcccctcg	g				321

<210> 23

25 <211> 241

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP3

5 <400> 23

tcggacttgg	aaacgtccgg	gttacaggag	cagcgcaacc	atttgcaggg	caaactgtga	60
ccatttggaa	gaaaagatgc	ctttagaaga	tgaggtcgtg	ccccacaag	tgctcagtga	120
gccgaatgaa	gaagcggggg	ctgctctcag	ccccctccct	gaggtgcctc	cctggaccgg	180
ggaagtcagc	ccagcccaga	gagatggagg	tgccctcggg	cggggccctt	gggactcctc	240
t						241

<210> 24

<211> 522

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP4

<400> 24

caccgcgtgg	gcagccccgg	ttcagcctcg	gacttggaaa	cgcccggtt	acaggagcag	60
cgcaaccatt	tgaggggcaa	actgtcggag	ctgcagggtg	agcagacatc	cctggagccc	120
ctccaggaga	gcccccgctc	cacagggtgc	tggaagtccc	gggaggtagc	caccgagggc	180
atccgtgggc	accgcaaaat	ggtcctctac	accctgcggg	caccacgaaa	tcccatgtac	240
aatgccgtgt	ccaacgcaga	cctgatggat	ttcaagaatt	tgctggacca	tttgggaagaa	300
aagatgcctt	tagaagatga	ggtcgtgccc	ccacaagtgc	tcagtgagcc	gaatgaagaa	360
gcgggggctg	ctctcagccc	cctccctgag	gtgcctccct	ggaccgggga	agtcagccca	420
gcccagagag	atggaggtgc	cctcggggcg	ggccccctgg	actcctctga	tcgatctgcc	480
ctcctaaaaa	gcaagctgag	ggcgctgctc	actgcccctc	gg		522

15 <210> 25

<211> 123

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia de nucleótidos que codifica NT-proXNP5

<400> 25

tcggacttgg	aaacgtccgg	gttacaggag	cagcgcaacc	atttgcaggg	caaactgtcg	60
ggggaagtca	gcccagccca	gagagatgga	ggtgccctcg	ggcggggccc	ctgggactcc	120
tct					123	

<210> 26

<211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de nucleótidos que codifica proXNP6

<400> 26

```

caccgcgtgg gcagccccgg ttcagcctcg gacttggaac cgtccggggt acaggagcag      60
cgcaaccatt tgcagggcaa actgtcggag ctgcagggtg agcagacatc cctggagccc      120
ctccaggaga gcccccgctc cacagggtgc tggaaagtccc gggaggtagc caccgagggc      180
atccgtgggc accgcaaaat ggtcctctac accctgcggg caccacgaag cccaagatg      240
gtgcaagggc ctggctgctt tgggaggaag atggaccgga tcagctcctc cagtggcctg      300
ggctgcaaag tgctgaggcg gcataatccc atgtacaatg ccgtgtccaa cgcagacctg      360
atggatttca agaatttgct ggaccatttg gaagaaaaga tgcctttaga agatgaggtc      420
gtgccccac aagtgtctag tgagccgaat gaagaagcgg gggctgctct cagccccctc      480
cctgagggtg ctccctggac cggggaagtc agcccagccc agagagatgg aggtgccctc      540
gggcggggcc cctgggactc ctctgataca tctgccctcc taaaaagcaa gctgagggcg      600
ctgtcactg cccctcggag cctgcggaga tccagctgct tcgggggcag gatggacagg      660
attggagccc agagcggact gggctgtaac agcttccggt ac                                702

```

<210> 27

<211> 93

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos que codifica XNP7

<400> 27

```

agccccaaga tgggtgcaagg gtctggctgc tttgggagga agatggacag gattggagcc      60
cagagcggac tgggctgtaa cagcttccgg tac                                93

```

15

<210> 28

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia del iniciador

<400> 28

gcggatccca cccgctgggc agccccg 27

<210> 29

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> secuencia del iniciador
 <400> 29
 gctctagagg atgtctgctc cacc 24
 <210> 30
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del iniciador
 <400> 30
 15 gctctagaga agatgagggtc gtgc 24
 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia del iniciador
 <400> 31
 gcgaattctc accgaggggc agtgagc 27
 <210> 32
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del iniciador
 30 <400> 32
 gcggatccta ccacccgctg ggcag 25

<210> 33

<211> 1061

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 33

Met	Pro	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Gly	Ser	His	Ala
			20					25					30		
Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Thr	Ser	Tyr
		35					40					45			
Pro	Trp	Ser	Trp	Ala	Arg	Val	Gly	Pro	Ala	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala
	50					55					60				
Gln	Val	Lys	Ala	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Val	Arg	Thr
65				70						75				80	
Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Glu	Asn	Ala	Leu	Gly	Val	Cys	Ser	Asp	Thr	Ala
				85						90				95	
Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	His	Asn	Pro	Ala	Val
			100					105					110		
Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	Val	Tyr	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Gly	Arg	Phe
		115					120					125			
Thr	Ala	His	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Phe	Gly	Val	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Ala	Gly	Pro
145				150						155					160
Ser	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Val	Ala	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Leu
				165					170					175	
Gly	Trp	Glu	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gly	Asp
			180				185						190		
Glu	Glu	His	Cys	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Val	Arg
		195					200					205			
Asp	Arg	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp
	210					215					220				
Leu	Ser	His	Tyr	Thr	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Lys	Gly	Arg

225	230										235				240		
Val	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Thr	Leu	Met	Leu		
				245					250					255			
Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Tyr	Val	Phe	Phe	His		
			260					265					270				
Leu	Asp	Ile	Phe	Gly	Gln	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala	Pro		
		275				280						285					
Arg	Arg	Pro	Trp	Glu	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	Ala	Arg	Gln		
	290					295					300						
Ala	Phe	Gln	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asp	Pro	Asp	Asn	Pro		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	His	Leu	Ala	Tyr	Glu	Gln		
				325					330					335			
Phe	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asp	Gly	Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser		
			340					345					350				
Phe	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ile	Gln	Ala	Val	Thr	Glu	Thr	Leu		
		355					360					365					
Ala	His	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Gln	Arg	Met		
	370					375					380						
Trp	Asn	Arg	Ser	Phe	Gln	Gly	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asp	Ser		
385					390					395					400		
Ser	Gly	Asp	Arg	Glu	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Asp	Met	Asp	Pro	Glu		
				405					410					415			
Asn	Gly	Ala	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Asn	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Gln	Glu		
			420					425					430				
Leu	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Lys	Leu	Asn	Trp	Pro	Leu	Gly	Tyr	Pro		
		435					440				445						
Pro	Pro	Asp	Ile	Pro	Lys	Cys	Gly	Phe	Asp	Asn	Glu	Asp	Pro	Ala	Cys		
	450				455					460							
Asn	Gln	Asp	His	Leu	Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Leu	Val	Gly	Ser		
465					470					475					480		
Leu	Ser	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Ile	Val	Ser	Phe	Phe	Ile	Tyr	Arg	Lys		
				485					490					495			
Met	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu	Ala	Ser	Glu	Leu	Trp	Arg	Val	Arg	Trp		
	500				505				510								
Glu	Asp	Val	Glu	Pro	Ser	Ser	Leu	Glu	Arg	His	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly		
		515					520					525					
Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Asn	Tyr	Gly	Ser	Leu	Leu		
	530					535					540						
Thr	Thr	Glu	Gly	Gln	Phe	Gln	Val	Phe	Ala	Lys	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Lys		
545					550					555					560		
Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Val	Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Arg	Ile	Glu	Leu		
				565					570					575			
Thr	Arg	Lys</															

Glu	Leu	Leu	Arg	Met	Ala	Ser	Pro	Pro	Val	Arg	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly
705					710					715					720
Asp	Val	Tyr	Ser	Phe	Gly	Ile	Ile	Leu	Gln	Glu	Ile	Ala	Leu	Arg	Ser
				725					730						735
Gly	Val	Phe	His	Val	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Ser	Pro	Lys	Glu	Ile	Ile
			740					745					750		
Glu	Arg	Val	Thr	Arg	Gly	Glu	Gln	Pro	Pro	Phe	Arg	Pro	Ser	Leu	Ala
		755					760					765			
Leu	Gln	Ser	His	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Leu	Met	Gln	Arg	Cys	Trp
	770					775					780				
Ala	Glu	Asp	Pro	Gln	Glu	Arg	Pro	Pro	Phe	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Thr
785					790					795					800
Leu	Arg	Lys	Phe	Asn	Arg	Glu	Asn	Ser	Ser	Asn	Ile	Leu	Asp	Asn	Leu
				805					810					815	
Leu	Ser	Arg	Met	Glu	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu
			820					825					830		
Glu	Arg	Thr	Gln	Ala	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu
		835					840					845			
Leu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Pro	His	Ser	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg	Gly
	850					855					860				
Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Phe	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Tyr	Phe	Ser
865					870					875					880
Asp	Ile	Val	Gly	Phe	Thr	Ala	Leu	Ser	Ala	Glu	Ser	Thr	Pro	Met	Gln
				885					890					895	
Val	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Leu	Tyr	Thr	Cys	Phe	Asp	Ala	Val	Ile
			900					905					910		
Asp	Asn	Phe	Asp	Val	Tyr	Lys	Val	Glu	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Tyr	Met
		915					920					925			
Val	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Arg	Asn	Gly	Arg	Leu	His	Ala	Cys	Glu
		930				935					940				
Val	Ala	Arg	Met	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Ser	Phe	Arg
945					950					955					960
Ile	Arg	His	Arg	Pro	Gln	Glu	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Ile	Gly	Ile	His
				965					970					975	
Thr	Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	Lys	Met	Pro	Arg	Tyr
			980					985					990		
Cys	Leu	Phe	Gly	Asp	Thr	Val	Asn	Thr	Ala	Ser	Arg	Met	Glu	Ser	Asn
		995					1000					1005			
Gly	Glu	Ala	Leu	Lys	Ile	His	Leu	Ser	Ser	Glu	Thr	Lys	Ala	Val	Leu
	1010					1015					1020				
Glu	Glu	Phe	Gly	Gly	Phe	Glu	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Asp	Val	Glu	Met
1025					1030										

<210> 34

<211> 430

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 34

Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Thr	Ser	Tyr
1				5				10						15	
Pro	Trp	Ser	Trp	Ala	Arg	Val	Gly	Pro	Ala	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala
			20					25					30		
Gln	Val	Lys	Ala	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Val	Arg	Thr

		35					40				45				
Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Glu	Asn	Ala	Leu	Gly	Val	Cys	Ser	Asp	Thr	Ala
50						55					60				
Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	His	Asn	Pro	Ala	Val
65					70					75					80
Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	Val	Tyr	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Gly	Arg	Phe
				85					90					95	
Thr	Ala	His	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu
			100				105						110		
Gly	Phe	Gly	Val	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Ala	Gly	Pro
		115				120						125			
Ser	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Val	Ala	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Leu
130						135					140				
Gly	Trp	Glu	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gly	Asp
145				150						155					160
Glu	Glu	His	Cys	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Val	Arg
				165					170					175	
Asp	Arg	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp
			180				185						190		
Leu	Ser	His	Tyr	Thr	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Lys	Gly	Arg
		195				200						205			
Val	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Thr	Leu	Met	Leu
210						215					220				
Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Tyr	Val	Phe	Phe	His
225				230						235					240
Leu	Asp	Ile	Phe	Gly	Gln	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	
Arg	Arg	Pro	Trp	Glu	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	Ala	Arg	Gln
			260				265						270		
Ala	Phe	Gln	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asp	Pro	Asp	Asn	Pro
		275					280					285			
Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	His	Leu	Ala	Tyr	Glu	Gln
290						295					300				
Phe	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asp	Gly	Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser
305					310					315					320
Phe	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ile	Gln	Ala	Val	Thr	Glu	Thr	Leu
				325					330					335	
Ala	His	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Gln	Arg	Met
			340					345					350		
Trp	Asn	Arg	Ser	Phe	Gln	Gly	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asp	Ser
		355					360					365			
Ser	Gly	Asp	Arg	Glu	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Asp	Met	Asp	Pro	Glu
370						375					380				
Asn	Gly	Ala	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Asn	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Gln	Glu
385				390						395					400
Leu	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Lys	Leu	Asn	Trp	Pro	Leu	Gly	Tyr	Pro
			405					410						415	
Pro	Pro	Asp	Ile	Pro	Lys	Cys	Gly	Phe	Asp	Asn	Glu	Asp	Pro		
			420					425					430		

ES 2 377 122 T3

<210> 35

<211> 1047

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 35

Met	Ala	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	

Val	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Pro
			20					25					30		
Glu	His	Asn	Leu	Ser	Tyr	Ala	Trp	Ala	Trp	Pro	Arg	Val	Gly	Pro	Ala
		35					40					45			
Val	Ala	Leu	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Ala	Leu	Pro	Val	Asp	Leu
	50					55					60				
Arg	Phe	Val	Ser	Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Ala	Cys	Ser	Glu	Tyr	Leu	Ala
65					70					75					80
Pro	Leu	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Lys	Leu	Tyr	His	Asp	Pro	Asp	Leu	Leu
				85					90					95	
Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	Val	Tyr	Pro	Ala	Ala	Ser	Val	Ala	Arg	Phe	Ala
			100					105					110		
Ser	His	Trp	Arg	Leu	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Gly
		115					120					125			
Phe	Ser	Ala	Lys	Asn	Asp	His	Tyr	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Thr	Gly	Pro
	130					135					140				
Ser	Ala	Pro	Lys	Leu	Gly	Glu	Phe	Val	Val	Thr	Leu	His	Gly	His	Phe
145					150					155					160
Asn	Trp	Thr	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Tyr	Leu	Asp	Ala	Arg	Thr	Asp
				165					170					175	
Asp	Arg	Pro	His	Tyr	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Val	Phe	Glu	Ala	Leu	Gln
			180					185					190		
Gly	Ser	Asn	Leu	Ser	Val	Gln	His	Gln	Val	Tyr	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly
		195					200					205			
Gly	Pro	Glu	Gln	Ala	Thr	His	Phe	Ile	Arg	Ala	Asn	Gly	Arg	Ile	Val
	210					215					220				
Tyr	Ile	Cys	Gly	Pro	Leu	Glu	Met	Leu	His	Glu	Ile	Leu	Leu	Gln	Ala
225					230					235					240
Gln	Arg	Glu	Asn	Leu	Thr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Val	Phe	Phe	Tyr	Leu	Asp
				245					250					255	
Val	Phe	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Pro	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Arg
			260					265					270		
Pro	Trp	Gln	Asp	Asn	Arg	Thr	Arg	Glu	Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Arg	Glu
	275						280					285			
Ala	Phe	Gln	Thr	Val	Leu	Val	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Pro	Pro	Asn	Pro
	290					295					300				
Glu	Tyr	Gln	Glu	Phe	Gln	Asn	Arg	Leu	Leu	Ile	Arg	Ala	Arg	Glu	Asp
305					310					315					320
Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Met	Asn	Leu	Ile	Ala	Gly	Cys
				325					330					335	
Phe	Tyr	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Tyr	Ala	Glu	Val	Leu	Asn	Glu	Thr	Ile
			340					345					350		
Gln	Glu	Gly	Gly	Thr	Arg	Glu	Asp	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Glu	Lys	Met
		355													

				485					490					495			
Glu	Glu	Leu	Gln	Phe	Gly	Asn	Ser	Glu	Arg	Tyr	His	Lys	Gly	Ala	Gly		
			500					505					510				
Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ser	Leu	Met		
		515					520					525					
Thr	Ala	His	Gly	Lys	Tyr	Gln	Ile	Phe	Ala	Asn	Thr	Gly	His	Phe	Lys		
		530				535					540						
Gly	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Lys	His	Val	Asn	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Leu		
545					550					555					560		
Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Phe	Glu	Leu	Lys	His	Met	Arg	Asp	Val	Gln	Phe		
				565					570					575			
Asn	His	Leu	Thr	Arg	Phe	Ile	Gly	Ala	Cys	Ile	Asp	Pro	Pro	Asn	Ile		
			580					585					590				
Cys	Ile	Val	Thr	Glu	Tyr	Cys	Pro	Arg	Gly	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu		
		595					600					605					
Glu	Asn	Asp	Ser	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Met	Phe	Arg	Tyr	Ser	Leu	Ile		
	610				615						620						
Asn	Asp	Leu	Val	Lys	Gly	Met	Ala	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Ile	Ser		
625					630					635					640		
Ser	His	Gly	Ser	Leu	Lys	Ser	Ser	Asn	Cys	Val	Val	Asp	Ser	Arg	Phe		
				645					650					655			
Val	Leu	Lys	Ile	Thr	Asp	Tyr	Gly	Leu	Ala	Ser	Phe	Arg	Ser	Thr	Ala		
			660					665						670			
Glu	Pro	Asp	Asp	Ser	His	Ala	Leu	Tyr	Ala	Lys	Lys	Leu	Trp	Thr	Ala		
		675					680					685					
Pro	Glu	Leu	Leu	Ser	Gly	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Thr	Gly	Met	Gln	Lys		
	690					695					700						
Ala	Asp	Val	Tyr	Ser	Phe	Gly	Ile	Ile	Leu	Gln	Glu	Ile	Ala	Leu	Arg		
705					710					715					720		
Ser	Gly	Pro	Phe	Tyr	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Ser	Pro	Lys	Glu	Ile		
				725					730					735			
Val	Gln	Lys	Val	Arg	Asn	Gly	Gln	Arg	Pro	Tyr	Phe	Arg	Pro	Ser	Ile		
				740				745					750				
Asp	Arg	Thr	Gln	Leu	Asn	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Met	Glu	Arg	Cys		
		755					760					765					
Trp	Ala	Gln	Asp	Pro	Ala	Glu	Arg	Pro	Asp	Phe	Gly	Gln	Ile	Lys	Gly		
	770					775					780						
Phe	Ile	Arg	Arg	Phe	Asn	Lys	Glu	Gly	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Asp	Asn		
785					790					795					800		
Leu	Leu	Leu	Arg	Met	Glu	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asn	Leu	Glu	Lys	Leu	Val		
				805					810					815			
Glu	Glu	Arg	Thr	Gln	Ala	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Ala	Glu	Ala		
			820					825					830				
Leu	Leu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Pro	His	Ser	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg		
		835					840					845					
Gly	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Phe	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Tyr	Phe		
	850					855					860						
Ser	Asp	Ile	Val	Gly	Phe	Thr	Ala	Leu	Ser	Ala	Glu	Ser	Thr	Pro	Met		
865					870					875					880		
Gln	Val	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Leu	Tyr	Thr	Cys	Phe	Asp	Ala	Ile		
				885					890					895			
Ile	Asp	Asn	Phe	Asp	Val	Tyr	Lys	Val	Glu	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Tyr		
			900					905					910				
Met	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Gly	Arg	Asn	Gly	Gln	Arg	His	Ala	Pro		
		915					920					925					
Glu	Ile	Ala	Arg	Met	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Ser	Ser	Phe		
	930					935					940						
Arg	Ile	Arg	His	Arg	Pro	His	Asp	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Ile	Gly	Val		
945					950					955					960		

His	Thr	Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	Lys	Met	Pro	Arg	
				965					970					975		
Tyr	Cys	Leu	Phe	Gly	Asp	Thr	Val	Asn	Thr	Ala	Ser	Arg	Met	Glu	Ser	
			980					985					990			
Asn	Gly	Gln	Ala	Leu	Lys	Ile	His	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Lys	Asp	Ala	
		995					1000						1005			
Leu	Asp	Glu	Leu	Gly	Cys	Phe	Gln	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Asp	Val	Glu	
	1010					1015					1020					
Met	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Met	Arg	Thr	Tyr	Trp	Leu	Leu	Gly	Glu	Arg	
1025					1030					1035					1040	
Lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu										
				1045												

<210> 36

<211> 541

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 36

Met	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Phe	Ser	Pro	Cys	Val	Leu	Leu	Gly			
1				5					10					15				
Trp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Gly			
			20					25					30					
Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Gly	Arg	Gln	Glu	Arg	Glu	Ala	Leu			
		35				40					45							
Pro	Pro	Gln	Lys	Ile	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Asp	Asp	Ser			
	50					55					60							
Tyr	Leu	Phe	Ser	Leu	Thr	Arg	Val	Arg	Pro	Ala	Ile	Glu	Tyr	Ala	Leu			
65					70				75						80			
Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Asn	Gly	Thr	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly			
				85				90					95					
Thr	Arg	Phe	Gln	Val	Ala	Tyr	Glu	Asp	Ser	Asp	Cys	Gly	Asn	Arg	Ala			
			100					105					110					
Leu	Phe	Ser	Leu	Val	Asp	Arg	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Lys	Pro			
		115				120						125						
Asp	Leu	Ile	Leu	Gly	Pro	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Ala			
	130				135						140							
Arg	Leu	Ala	Ser	His	Trp	Asp	Leu	Pro	Met	Leu	Ser	Ala	Gly	Ala	Leu			
145					150					155					160			
Ala	Ala	Gly	Phe	Gln	His	Lys	Asp	Ser	Glu	Tyr	Ser	His	Leu	Thr	Arg			
				165					170					175				
Val	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Lys	Met	Gly	Glu	Met	Met	Leu	Ala	Leu	Phe			
			180					185					190					
Arg	His	His	His	Trp	Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Asp	Lys			
		195				200						205						
Leu	Glu	Arg	Asn	Cys	Tyr	Phe	Thr	Leu	Glu	Gly	Val	His	Glu	Val	Phe			
	210				215						220							
Gln	Glu	Glu	Gly	Leu	His	Thr	Ser	Ile	Tyr	Ser	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys			
225				230						235					240			
Asp	Leu	Asp	Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Arg	Asn	Ile	Gln	Ala	Ser	Glu	Arg			
			245					250						255				
Val	Val	Ile	Met	Cys	Ala	Ser	Ser	Asp	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Met	Leu			
			260					265					270					
Val	Ala	His	Arg	His	Gly	Met	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr	Ala	Phe	Phe	Asn			
		275				280						285						
Ile	Glu	Leu	Phe	Asn	Ser	Ser	Ser	Tyr	Gly	Asp	Gly	Ser	Trp	Lys	Arg			
	290				295						300							
Gly	Asp	Lys	His	Asp	Phe	Glu	Ala	Lys	Gln	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gln			

305					310					315					320
Thr	Val	Thr	Leu	Leu	Arg	Thr	Val	Lys	Pro	Glu	Phe	Glu	Lys	Phe	Ser
				325					330					335	
Met	Glu	Val	Lys	Ser	Ser	Val	Glu	Lys	Gln	Gly	Leu	Asn	Met	Glu	Asp
			340					345					350		
Tyr	Val	Asn	Met	Phe	Val	Glu	Gly	Phe	His	Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Tyr
		355					360					365			
Val	Leu	Ala	Leu	His	Glu	Val	Leu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ser	Lys	Lys	Asp
	370					375					380				
Gly	Gly	Lys	Ile	Ile	Gln	Gln	Thr	Trp	Asn	Arg	Thr	Phe	Glu	Gly	Ile
385					390				395						400
Ala	Gly	Gln	Val	Ser	Ile	Asp	Ala	Asn	Gly	Asp	Arg	Tyr	Gly	Asp	Phe
				405				410						415	
Ser	Val	Ile	Ala	Met	Thr	Asp	Val	Glu	Ala	Gly	Thr	Gln	Glu	Val	Ile
			420				425						430		
Gly	Asp	Tyr	Phe	Gly	Lys	Glu	Gly	Arg	Phe	Glu	Met	Arg	Pro	Asn	Val
		435					440					445			
Lys	Tyr	Pro	Trp	Gly	Pro	Leu	Lys	Leu	Arg	Ile	Asp	Glu	Asn	Arg	Ile
	450					455					460				
Val	Glu	His	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro	Cys	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Glu
465					470					475					480
Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly
				485					490					495	
Leu	Leu	Met	Ala	Phe	Tyr	Phe	Phe	Arg	Lys	Lys	Tyr	Arg	Ile	Thr	Ile
			500					505					510		
Glu	Arg	Arg	Thr	Gln	Gln	Glu	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Lys	His	Arg	Glu
		515					520					525			
Leu	Arg	Glu	Asp	Ser	Ile	Arg	Ser	His	Phe	Ser	Val	Ala			
	530					535					540				

REFERENCIAS

- Altschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215: 403 - 410
- Altschul et al., J. Mol. Evol. (1993) 36: 290 - 300
- Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995) John Wiley & Sons Inc
- 5 Daly C et al.: Natriuretic peptides in the diagnosis of heart disease - First amongst equals? In J Cardiol 2002; 84: 107 - 13.
- De Lemos J. A. et al.: The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med 2001; 345: 1014 - 21.
- Devereux et al., Nucleic Acids Research (1984) 12: 387 - 395
- 10 Drewett J. G., Garbers D. L.: The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. Endocrine Rev 1994; 15: 135 - 62.
- Dzimiri N, Moorji A, Afrane B, Al-Halees Z. Differential regulation of atrial and brain natriuretic peptides and its implications for the management of left ventricular volume overload. Eur J Clin Invest 2002; 32: 563 - 9.
- 15 Harlow and Lane "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)
- Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10915 - 10919
- Kannel W. B. et al.: Changing epidemiological features of heart failure. Br Heart J 1994; 72: S3 - S9
- Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5873 - 5877
- 20 Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495 - 7.
- McDonagh T. A. et al.: Symptomatic and asymptomatic left-ventricular systolic dysfunction in an urban population. Lancet 1997; 350: 829 - 33.
- Maddox et al., J. Exp. Med. (1993) 158: 1211 - 1226
- 25 Misono K, Sivasubramanian N, Berkner K, Xhang X. Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes. Biochemistry 1999; 38: 516 - 23
- Omland T et al.: N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute in coronary syndromes. Circulation 2002; 106: 2913 - 8.
- 30 Remes M, Miettinen H, Reunanen A, Pyörälä K. Validity of clinical diagnosis of heart failure in primary health care. Eur Heart J 1991; 12: 315 - 21.
- Sagnella G. A.: Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular diseases. Clin Sci 1998; 95: 519 - 29.
- Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)
- 35 Skerra A, Plückthun A: Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science 1988; 240: 1038 - 41.
- Talwar S et al.: Towards a blood test for heart failure: the potential use of circulating natriuretic peptides. J Clin Pharmacol 2000; 50: 15 - 20.
- 40 Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Troughton RW et al.: Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. Lancet 2000; 355: 1126 - 30.
- Yasue H et al.: Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. Circulation 1994; 90: 195 - 203.
- Yoshimura M et al.: Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. Circulation 1993; 87: 464 - 469.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar la activación o inactivación del sistema hormonal del péptido natriurético atrial (ANP) y del péptido natriurético cerebral (BNP), comprendiendo el método detectar en forma simultánea en una sola lectura o resultado la presencia o la cantidad de prohormonas del péptido natriurético atrial y cerebral (proANP y proBNP) o fragmentos de las mismas en una muestra, dicho método comprendiendo:
- 5 (I) poner en contacto la muestra con una primera sustancia de enlazamiento bi o oligo-específica que es capaz de enlazarse tanto con:
- (a)
- (i) proANP (SEQ ID NO: 1), ANP (SEQ ID NO: 2) o NT-proANP (SEQ ID NO: 3);
- 10 (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;
- y
- (b)
- (i) pro-BNP (SEQ ID NO: 4), BNP (SEQ ID NO: 5) o NT-proBNP (SEQ ID NO: 6);
- 15 (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud; o
- (II) poner en contacto la muestra con
- un agente que contiene:
- (a)
- 20 (i) proANP (SEQ ID NO: 1), ANP (SEQ ID NO: 2) o NT-proANP (SEQ ID NO: 3);
- (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;
- y
- (b)
- 25 (i) pro-BNP (SEQ ID NO: 4), BNP (SEQ ID NO: 5) o NT-proBNP (SEQ ID NO: 6);
- (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;
- y
- una primera sustancia de enlazamiento que es capaz de enlazarse con:
- 30 (a)
- (i) proANP (SEQ ID NO: 1), ANP (SEQ ID NO: 2) o NT-proANP (SEQ ID NO: 3);
- (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;
- y
- 35 (b)
- (i) pro-BNP (SEQ ID NO: 4), BNP (SEQ ID NO: 5) o NT-proBNP (SEQ ID NO: 6);
- (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;

y

(c) el agente.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 (II) donde la primera sustancia de enlazamiento comprende:

(a) una sustancia de enlazamiento bi o oligo-específica; o

5 (b) una mezcla de sustancias de enlazamiento mono-específicas.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 donde la primera sustancia de enlazamiento comprende:

(a) receptor natriurético GC-A (SEQ ID NO: 33);

(b) secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (a); o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene al menos 400 aminoácidos de longitud.

10 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 donde la primera sustancia de enlazamiento comprende un dominio de enlazamiento extracelular del receptor natriurético GC-A (SEQ ID NO: 34).

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 donde la primera sustancia de enlazamiento comprende un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo.

15 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 donde el anticuerpo comprende un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo oligoclonal, un anticuerpo bifuncional o un anticuerpo policlonal de reacción cruzada.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1(II) o cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 que depende de la reivindicación 1(II) donde en el agente, (a)(i) es la SEQ ID NO: 3 y (b)(i) es la SEQ ID NO: 6 o (a)(i) es la SEQ ID NO: 2 y (b)(i) es la SEQ ID NO: 5.

20 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1(II) o cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 que depende de la reivindicación 1(II) donde el agente comprende o consiste de:

(a) proBNP₁₅₋₂₄ y proANP₈₂₋₉₆;

(b) proBNP₁₋₃₇ y proANP₂₉₋₉₈;

(c) proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₂₀₋₈₀;

25 (d) proBNP₁₋₇₆ y proANP₁₋₉₈;

(e) proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₆₀₋₈₀;

(f) proBNP₁₋₁₀₈ y proANP₁₋₁₂₆; o

(g) proBNP₇₇₋₉₂ y proANP₁₁₂₋₁₂₆.

30 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1(II) o cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 que depende de la reivindicación 1(II) donde el agente es un polipéptido.

10. A método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la primera sustancia de enlazamiento y/o el agente están:

(a) marcados con una etiqueta detectable; y/o

(b) inmovilizados.

35 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que adicionalmente comprende poner en contacto la muestra con una segunda sustancia de enlazamiento que es capaz de enlazarse con la primera sustancia de enlazamiento.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 donde la segunda sustancia de enlazamiento está:

(a) marcada con una etiqueta detectable; y/o

40 (b) inmovilizada.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 donde la segunda sustancia de enlazamiento provoca la precipitación de la primera sustancia de enlazamiento y de cualquier péptido que esté enlazado a ella.

14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un inmunoensayo.

15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que permite diagnosticar insuficiencia cardíaca o monitorear el tratamiento de una condición cardíaca.

16. Un agente que es un polipéptido que comprende:

- 5 (a)
- (i) proANP (SEQ ID NO: 1), ANP (SEQ ID NO: 2) o NT-proANP (SEQ ID NO: 3);
 - (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
 - (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;

y

- 10 (b)
- (i) pro-BNP (SEQ ID NO: 4), BNP (SEQ ID NO: 5), NT-proBNP (SEQ ID NO: 6);
 - (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
 - (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud.

17. Un agente de acuerdo con la reivindicación 16 que comprende o consiste de:

- 15 (a) proBNP₁₅₋₂₄ y proANP₈₂₋₉₆;
- (b) proBNP₁₋₃₇ y proANP₂₉₋₉₈;
- (c) proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₂₀₋₈₀;
- (d) proBNP₁₋₇₆ y proANP₁₋₉₈;
- (e) proBNP₁₀₋₂₉ y proANP₆₀₋₈₀;
- 20 (f) proBNP₁₋₁₀₈ y proANP₁₋₁₂₆; o
- (g) proBNP₇₇₋₉₂ y proANP₁₁₂₋₁₂₆.

18. Un agente de acuerdo con reivindicación 17 que comprende cualquiera de las SEQ ID Nos: 13, 14, 15, 17, 18, 19 ó 20.

25 19. Un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 que está marcado con una etiqueta detectable.

20. A polinucleótido que comprende la secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 o una secuencia que es complementaria a la secuencia de codificación.

21. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 que comprende:

- (a)
- 30 (i) las SEQ ID Nos 7, 8 ó 9;
- (ii) una secuencia complementaria a (i);
 - (iii) una secuencia que hibrida bajo condiciones rigurosas a (i) o (ii);
 - (iv) una secuencia que se degenerada como resultado del código genético a (i), (ii) o (iii);
 - (v) una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con cualquiera de las secuencias en (i) hasta (iv); o
- 35 (vi) un fragmento hasta de 40 nucleótidos de longitud de cualquiera de las secuencias en (i) hasta (v);
- y
- (b)
- (i) las SEQ ID Nos 10, 11 ó 12;

- (ii) una secuencia complementaria a (i);
- (iii) una secuencia que hibrida bajo condiciones rigurosas a (i) o (ii);
- (iv) una secuencia que se degenerada como resultado del código genético a (i), (ii) o (iii);
- (v) una secuencia que tiene al menos 70% de identidad con cualquiera de las secuencia en (i) hasta (iv); o
- 5 (vi) un fragmento hasta de 40 nucleótidos de longitud de cualquiera de las secuencias en (i) hasta (v).
- 22. Un vector de expresión que contiene un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21.
- 23. Una célula huésped que comprende un polinucleótido de acuerdo con reivindicación 20 ó 21 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 22.
- 10 24. Un proceso para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 cuyo proceso comprende:
 - (a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 23 bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido; y opcionalmente
 - (b) recuperar el polipéptido expresado.
- 15 25. Un proceso para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 que comprende síntesis química.
- 26. Un anticuerpo bi o oligo-específico, fragmento o derivado del mismo que es capaz de enlazarse tanto con:
 - (a)
 - (i) proANP (SEQ ID NO: 1), ANP (SEQ ID NO: 2) o NT-proANP (SEQ ID NO: 3);
 - (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
 - 20 (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud;
 - como con
 - (b)
 - (i) pro-BNP (SEQ ID NO: 4), BNP (SEQ ID NO: 5) o NT-proBNP (SEQ ID NO: 6);
 - (ii) una secuencia homóloga que tiene al menos 70% de identidad con (i); o
 - 25 (iii) un fragmento de (i) o (ii) que tiene al menos 6 aminoácidos de longitud.
- 27. Un anticuerpo, fragmento o derivado de acuerdo con la reivindicación 26 que está marcado con una etiqueta detectable.
- 28. Un proceso para elaborar un anticuerpo como se define en la reivindicación 26 ó 27 que comprende el cultivo de una célula que expresa al anticuerpo y opcionalmente purificar el anticuerpo de la célula.
- 30 29. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 28 en el cual la célula es una que puede ser obtenida por medio de la administración de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 a un mamífero, la extracción de células B del mamífero y seleccionar una célula de estas con base en la habilidad para expresar un anticuerpo con la especificidad del anticuerpo de la reivindicación 26.
- 35 30. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 28 en el cual la célula es recombinante para un polinucleótido que expresa al anticuerpo.
- 31. Un soporte sólido que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27 o un agente de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17.
- 32. Un soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 31, que es una partícula, barra, lámina o placa de microtitulación.
- 40 33. Un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21 o un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27 para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por medio del diagnóstico de insuficiencia cardíaca o el monitoreo del tratamiento de insuficiencia cardíaca.

34. El uso de una primera sustancia de enlazamiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21 o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27 para la fabricación de un reactivo para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca y/o el monitoreo del tratamiento de insuficiencia cardíaca.
- 5 35. un kit de diagnóstico que comprende:
- (a) una primera sustancia de enlazamiento como se define en la reivindicación 1 (I); o
- (b) una primera sustancia de enlazamiento y un agente como se define en la reivindicación 1(II);
- donde opcionalmente la sustancia de enlazamiento y/o el agente está etiquetado.
- 10 36. Un kit de acuerdo con la reivindicación 35 donde la primera sustancia de enlazamiento es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, y/o está presente sobre un soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 31 ó 32.
37. Un kit de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36 donde el agente es como se define en las reivindicaciones 16 a 19.
- 15 38. El uso de una primera sustancia de enlazamiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un agente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21, un anticuerpo, fragmento o derivado de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27, un soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 31 ó 32 o un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 en un método *in vitro* para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca y/o el monitoreo del tratamiento de insuficiencia cardíaca.
- 20 39. El uso de acuerdo con la reivindicación 38 que comprende un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

Figura 1.

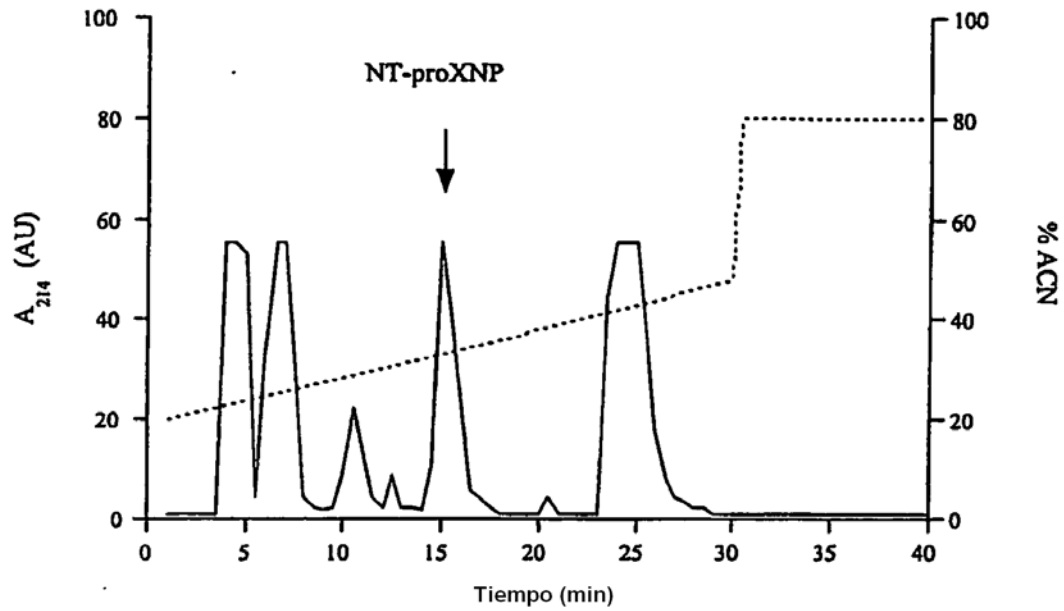


Figura 2a.

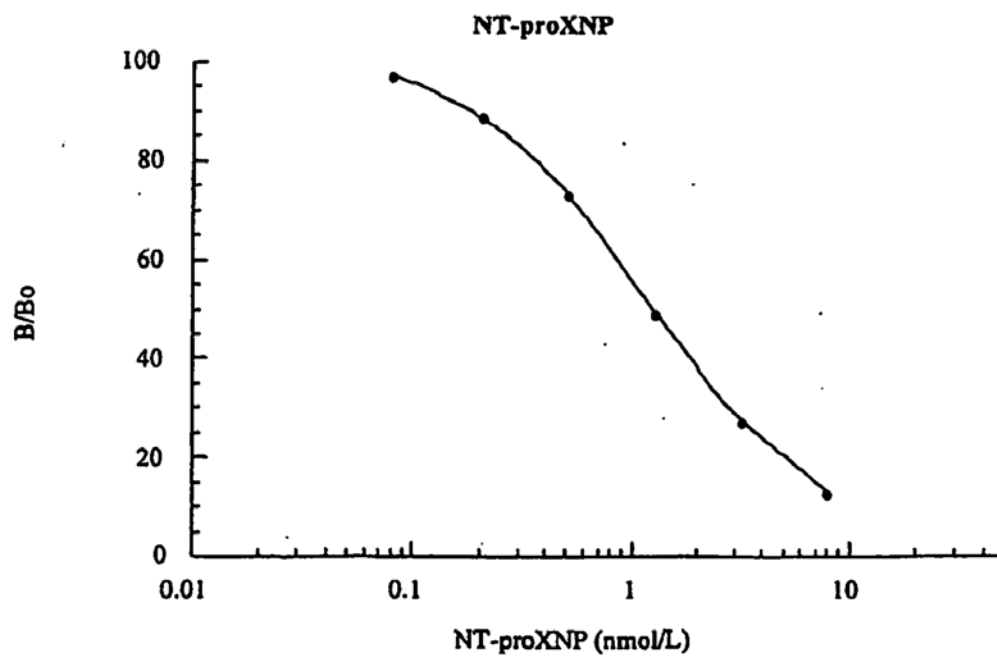


Figura 2b

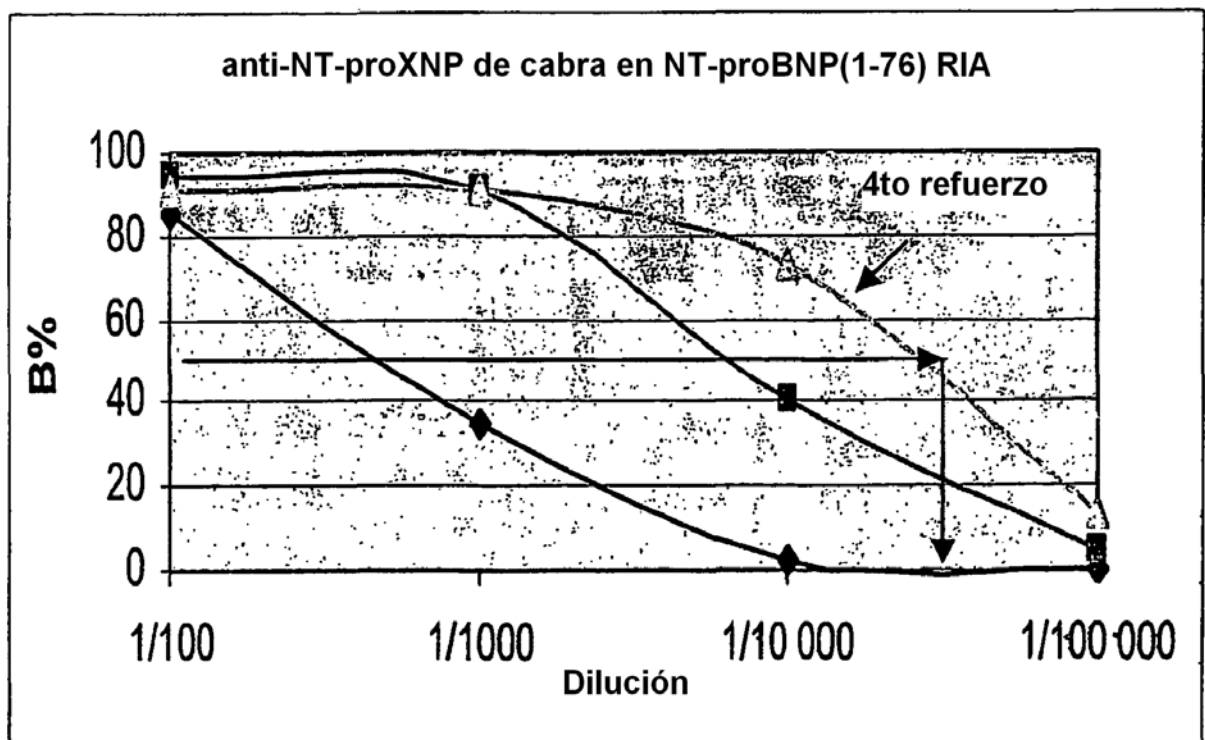
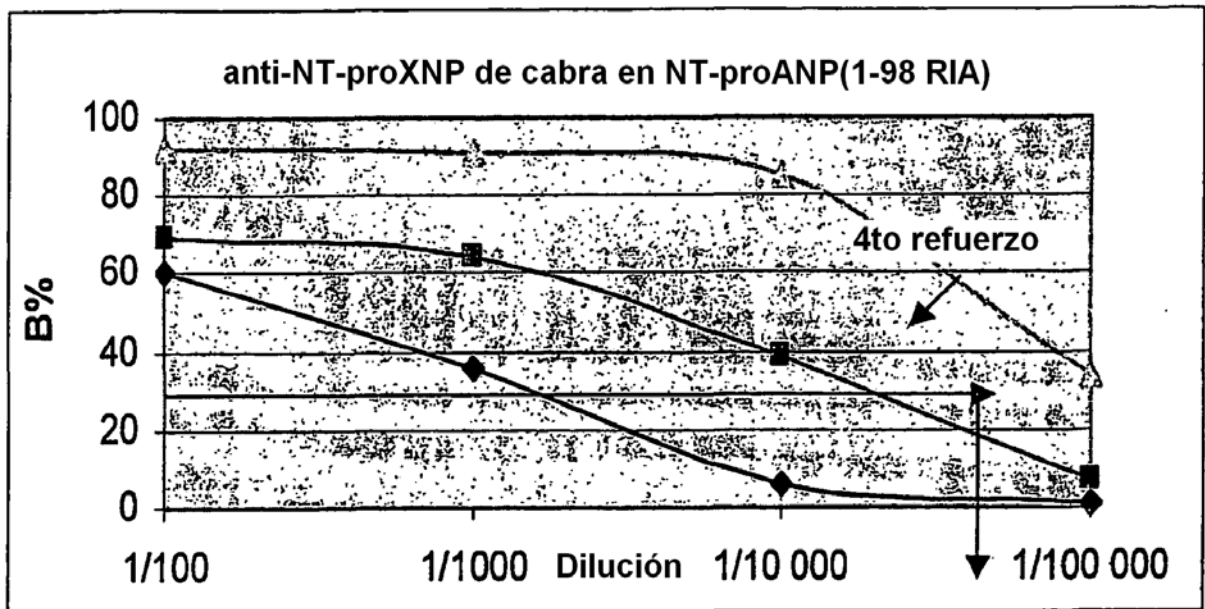


Figura 3.

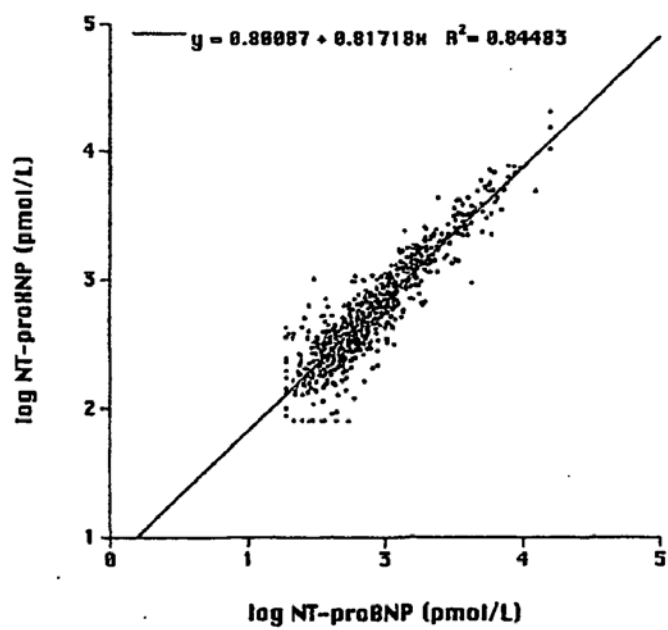
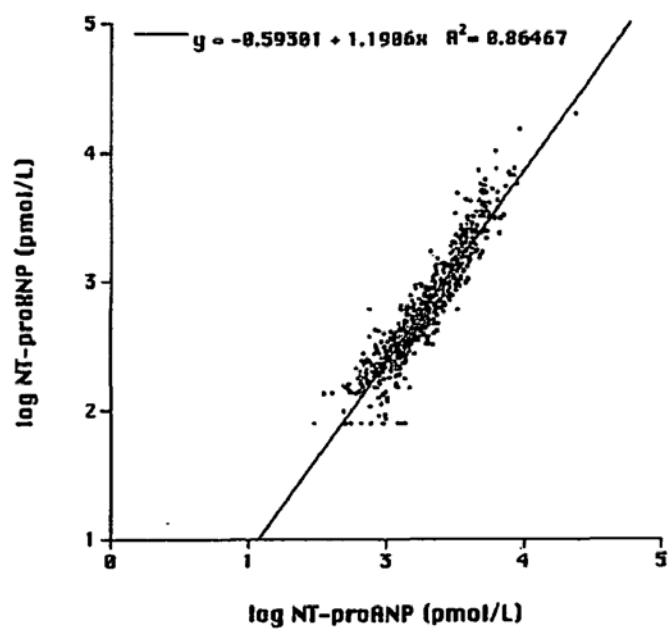


Figura 4.

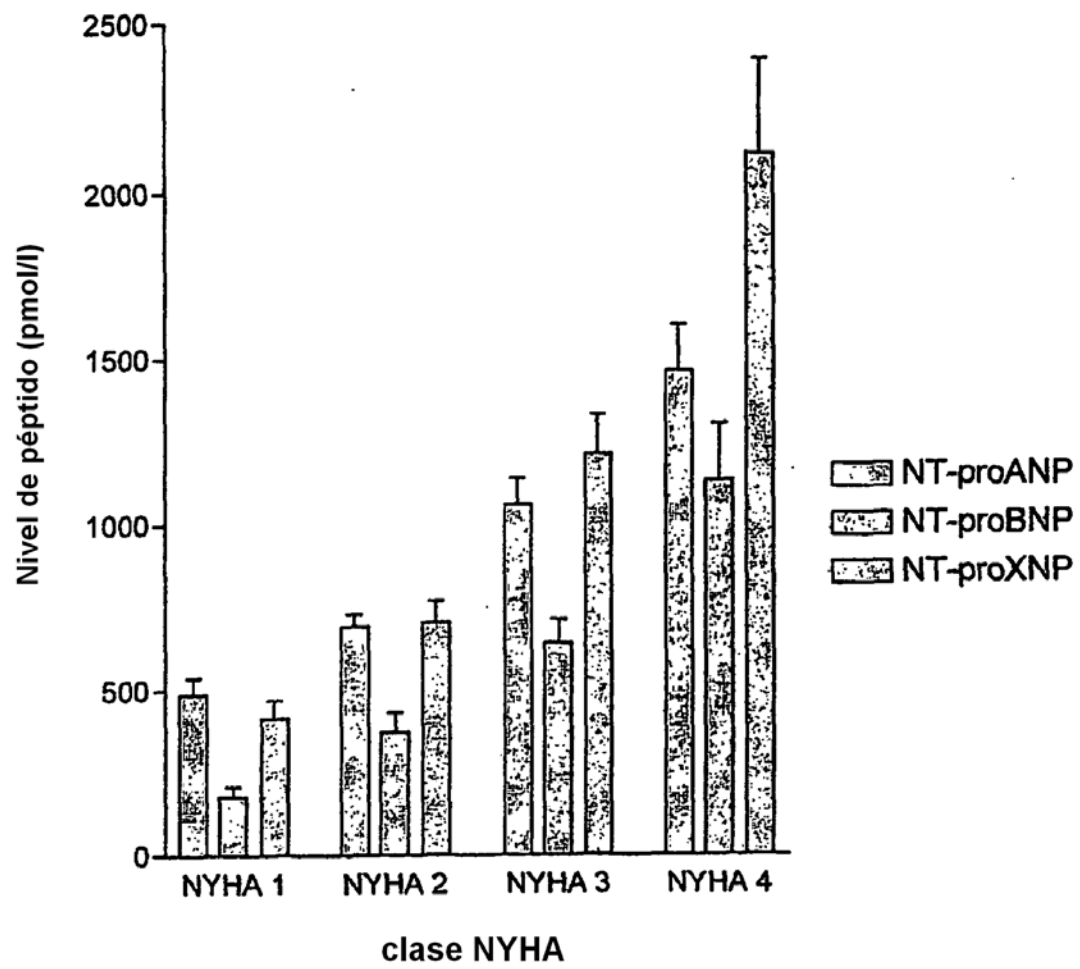
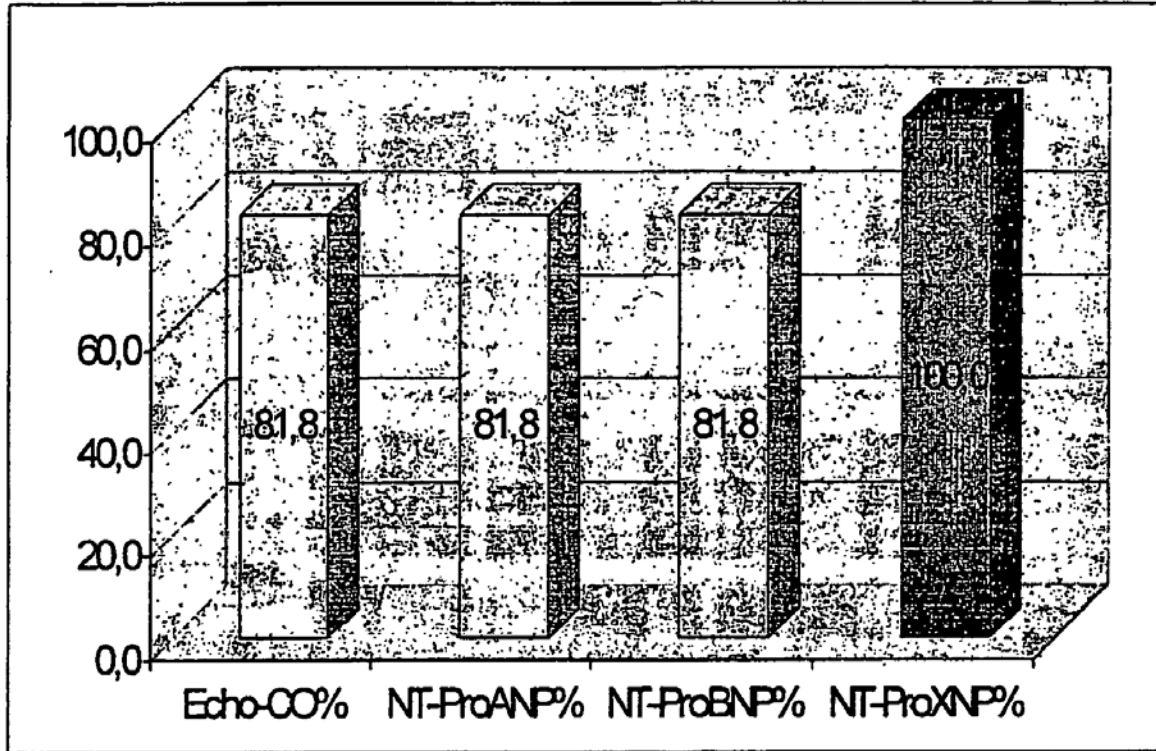


Figura 5



	Cambio de Echo CO	Cambio de NT-ProANP	Cambio de NT-ProBNP	Cambio de NT-ProXNP
Límite	> +10%	> -20%	> -20%	> -20%
Positivo	9	9	9	11
Negativo	2	2	2	0
Sensibilidad	81.8	81.8	81.8	100.0