

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 791**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2008 E 08796287 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2171053**

54 Título: **Polipéptidos natriuréticos**

30 Prioridad:

20.07.2007 US 951117 P

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

03.07.2014

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 FIRST STREET SW
ROCHESTER, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**BURNETT, JOHN, C. JR. y
LEE, CANDACE, Y. W.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 472 791 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos natriuréticos

Declaración respecto de la presente investigación patrocinada por el gobierno federal

5 La presente invención se llevó a cabo con ayuda del gobierno mediante la subvención HL036634 concedida por los Institutos Nacionales del Corazón, Pulmón y Sangre. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

Antecedentes*1. Campo técnico*

10 El presente documento se refiere a polipéptidos natriuréticos. Por ejemplo, el presente documento proporciona procedimientos y materiales relacionados con polipéptidos natriuréticos y el uso de polipéptidos natriuréticos para tratar afecciones cardiovasculares y renales.

2. Información de antecedentes

Los polipéptidos natriuréticos son polipéptidos que pueden causar natriuresis (excreción aumentada de sodio en la orina). Dichos polipéptidos pueden producirse por el cerebro, corazón, riñón y/o tejido vascular.

15 El documento EP 0497 368 A1 describe péptidos natriuréticos, que incluyen péptidos natriuréticos quiméricos. También se describe en el documento EP 0497 368 A1 agentes para suprimir el crecimiento de células musculares lisas vasculares que contienen esos péptidos como ingredientes eficaces.

Lee y Burnett (Heart Failure Reviews 2007, 12(2): 131-142) describen del mismo modo péptidos natriuréticos quiméricos. Los autores proporcionan un artículo de revisión acerca de las aplicaciones terapéuticas de ciertos péptidos natriuréticos en síndromes de insuficiencia cardíaca aguda.

Sumario

20 La invención puede definirse por las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un polipéptido de menos de 44 restos de aminoácidos de longitud, en el que dicho polipéptido comprende, en orden de amino terminal a carboxilo terminal:

- 25 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición, sustracción o sustitución,
 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más dos adiciones, sustracciones o sustituciones,
 (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición, sustracción o sustitución, en la que dicho polipéptido comprende actividad natriurética.

30 El polipéptido de acuerdo con la invención puede comprender, en un orden de amino terminal a carboxilo terminal:

- (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1,
 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones, sustracciones o sustituciones, y
 35 (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición, sustracción o sustitución; o
 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición, sustracción o sustitución,
 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2, y
 40 (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición, sustracción o sustitución; o

- (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición, sustracción o sustitución,
 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones, sustracciones o sustituciones, y
 45 (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.

El polipéptido de acuerdo con la invención puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4.

El polipéptido de acuerdo con la invención puede comprender, en orden de amino terminal a carboxilo terminal:

(a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una sustitución conservativa de aminoácidos,

5 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones, sustracciones o sustituciones, y

(c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición, sustracción o sustitución; o

(a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición, sustracción o sustitución,

10 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos sustituciones conservativas de aminoácidos, y

(c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición, sustracción o sustitución; o

(a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición, sustracción o sustitución,

15 (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones, sustracciones o sustituciones, y

(c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una sustitución conservativa de aminoácidos.

El polipéptido de acuerdo con la invención puede carecer de la capacidad para inducir hipotensión sistémica.

El polipéptido de acuerdo con la invención puede ser un polipéptido sustancialmente puro.

20 De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de la invención.

También, de acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un vector, comprendiendo el vector un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención.

25 Además, de acuerdo con una realización de la invención, se proporciona una célula huésped, comprendiendo la célula huésped un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención.

La célula huésped puede ser una célula huésped eucariota.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el polipéptido de la invención.

30 También, de acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un polipéptido de la invención para su uso en el aumento de la actividad natriurética en un mamífero sin disminuir la presión sanguínea.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una afección cardiovascular o afección renal, en el que dicho polipéptido es para suministrarse en condiciones en las que la gravedad de una manifestación de dicha afección cardiovascular o afección renal se reduce. De acuerdo con una realización preferente, la administración de dicho polipéptido a dicho mamífero no disminuye la presión sanguínea de dicho mamífero.

35 El presente documento se refiere a polipéptidos natriuréticos. Por ejemplo, el presente documento proporciona procedimientos y materiales relacionados con polipéptidos natriuréticos y el uso de polipéptidos natriuréticos para tratar afecciones cardiovasculares, afecciones renales, o tanto a afecciones cardiovasculares como afecciones renales. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede tener actividad diurética, actividad natriurética, la capacidad para activar GMPc, la capacidad para aumentar la tasa de filtración glomerular, la capacidad para reducir la producción de renina, la capacidad para reducir la producción de angiotensina, la capacidad para reducir la producción de aldosterona, la capacidad para reducir las presiones de llenado cardiaco anormalmente elevadas, la capacidad para optimizar el flujo sanguíneo renal, o una combinación de las mismas. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede aumentar los niveles endógenos de ANP, BNP y CNP. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede carecer de la capacidad para disminuir la presión sanguínea y puede carecer de la capacidad para causar hipotensión sistémica. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede ser un agonista para el receptor A del péptido natriurético, receptor B del péptido natriurético, o tanto del receptor A del péptido natriurético como del receptor B del péptido natriurético.

polipéptido comprende, en un orden de amino terminal a carboxilo terminal: (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición, sustracción o sustitución, (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones, sustracciones o sustituciones, y (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición, sustracción o sustitución. El polipéptido comprende actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad para inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1, la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2, y la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una sustitución conservativa de aminoácidos. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una sustitución conservativa de aminoácidos. El polipéptido puede ser un polipéptido sustancialmente puro.

También se divulga un procedimiento para aumentar la actividad natriurética en un mamífero sin disminuir la presión sanguínea. El procedimiento comprende administrar, al mamífero, un polipéptido de menos de 44 restos de aminoácidos de longitud, en el que el polipéptido comprende, en orden de amino terminal a carboxilo terminal: (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones, (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones, y (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones. El polipéptido puede comprender actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad para inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1, la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2, y la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de tres sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de cinco sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de tres sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede ser un polipéptido sustancialmente puro.

También se divulga un procedimiento para tratar a un mamífero que tiene una afección cardiovascular o afección renal. El procedimiento comprende administrar, al mamífero, un polipéptido de menos de 44 restos de aminoácidos de longitud en condiciones en las que la gravedad de una manifestación de la afección cardiovascular o afección renal se reduce, en el que el polipéptido comprende, en orden de amino terminal a carboxilo terminal: (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones, (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones, y (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones. El polipéptido puede comprender actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad para inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1, la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2, y la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de tres sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de cinco sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede comprender la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de tres sustituciones conservativas de aminoácidos. El polipéptido puede ser un polipéptido sustancialmente puro. La administración del polipéptido al mamífero puede ser de tal forma que no disminuya la presión sanguínea del mamífero.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo sus definiciones.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un polipéptido de CU-NP que tiene 32 restos de aminoácidos de longitud (SEC ID N°: 4). Los diez primeros restos de aminoácidos de SEC ID N°: 4 corresponden a los restos de aminoácido 1 a 10 de urodilatina humana y se designan como SEC ID N°: 1. Los restos de aminoácidos 11 a 27 de SEC ID N°: 4 corresponden a los restos de aminoácidos 6 a 22 de CNP humana madura y se designan como SEC ID N°: 2. Los restos de aminoácidos 28 a 32 de SEC ID N°: 4 corresponden a los restos de aminoácidos 28 a 32 de urodilatina humana y se designan como SEC ID N°: 3.

La Figura 2 es un gráfico que representa la Presión de Perfusión Renal (estimada por PPR = PAM – PAD) de

perros normales anestesiados tratados con CU-NP o URO como se indica (media \pm ETM; * = $P < 0,05$ frente a línea basal; ‡ = $P < 0,05$ entre grupos).

La Figura 3 es un gráfico que representa la respuesta de GMPc a concentraciones equimolares de CU-NP, CNP y URO en glomérulos caninos aislados (n = 3-7 para blancos, es decir, controles; n = 5-8 para glomérulos, † = $P < 0,0001$ frente a blanco; * = $P < 0,01$ frente a blanco).

La Figura 4 es un gráfico que representa la respuesta de GMPc a concentraciones equimolares de CU-NP en presencia o ausencia de un antagonista de NPR-A (1 μ M de A7195), un antagonista de NPR-B (1 μ M de P19), o ambos antagonistas (A71915 seguido de P19, concentración final 1 μ M para ambos) evaluado en glomérulos caninos aislados (n = 2-4 para blancos; n = 3-6 para glomérulos; * = $P < 0,05$ frente a blanco; † = $P < 0,01$ frente a blanco; ‡ = $P < 0,0001$ frente a blanco).

La Figura 5 es un gráfico que representa la respuesta de GMPc a CNP o CU-NP en ausencia o presencia de un anticuerpo de NPR-B (1:100) evaluado en células endoteliales aórticas humanas.

Descripción detallada

El presente documento se refiere a polipéptidos natriuréticos. Por ejemplo, el presente documento proporciona procedimientos y materiales relacionados con polipéptidos natriuréticos y el uso de polipéptidos natriuréticos para tratar afecciones cardiovasculares (por ejemplo, insuficiencia cardiaca aguda descompensada, síndromes coronarios agudos, y la remodelación ventricular post-infarto de miocardio) y afecciones renales (por ejemplo, disfunción renal perioperatoria, disfunción renal secundaria a fallo cardiaco y nefropatía diabética).

Un polipéptido proporcionado en el presente documento tiene actividad natriurética. En algunos casos, tiene la capacidad para activar el GMPc, la capacidad para aumentar la tasa de filtración glomerular, la capacidad para reducir la producción de renina, la capacidad para reducir la producción de angiotensina, la capacidad para reducir la producción de aldosterona, la capacidad para reducir presiones de llenado cardiaco anormalmente elevadas, la capacidad para optimizar el flujo sanguíneo renal, o una combinación de las mismas. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede aumentar los niveles endógenos de ANP, BNP y CNP. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede carecer de la capacidad para disminuir la presión sanguínea y causar hipotensión sistémica. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede ser un agonista para el receptor A de péptido natriurético, receptor B de péptido natriurético, o tanto receptor A de péptido natriurético como receptor B de péptido natriurético.

Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede incluir la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede contener una secuencia de aminoácidos que se alinea con (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con una o cero adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con dos o menos (una o cero) adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos y (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con una o cero adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede contener la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con la excepción de que el primer resto de treonina o el último resto de serina de SEC ID N°: 1 se suprimen o reemplazan con un resto de aminoácido diferente.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, aspártico-glutámico como aminoácidos ácidos; lisina/arginina/histidina como aminoácidos básicos; leucina/isoleucina, metionina/valina, alanina/valina como aminoácidos hidrófobos; serina/glicina/alanina/treonina como aminoácidos hidrófilos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos también incluyen agrupamientos basados en las cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxicas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Después de efectuar una sustitución de aminoácidos, las actividades del polipéptido que contiene la sustitución de aminoácidos pueden evaluarse usando los ensayos descritos en el presente documento.

En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede contener (a) una primera secuencia de aminoácidos que o bien se expone en SEC ID N°: 1 o se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con una o cero deleciones o sustituciones de aminoácidos, (b) una segunda secuencia de aminoácidos que o bien se expone en SEC ID N°: 2 o se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con dos o menos (una o cero) adiciones o sustituciones de aminoácidos y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que o bien se expone en SEC ID N°: 3 o se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con una o cero deleciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede comprender o consistir en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento tiene menos de 44 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede ser de entre 28 y 42, entre 29 y 41, entre 30 y 40,

entre 31 y 39 o entre 30 y 35 restos de aminoácidos de longitud. Se apreciará que el polipéptido con una longitud de 25 restos de aminoácidos es un polipéptido con una longitud de 25 restos de aminoácidos.

En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede ser un polipéptido sustancialmente puro. Como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente puro” en referencia a un polipéptido significa que el polipéptido está sustancialmente libre de otros polipéptidos, lípidos, carbohidratos y ácido nucleico con los que naturalmente se asocia. Por tanto, un polipéptido sustancialmente puro es cualquier polipéptido que está retirado de su entorno natural y es al menos un 60 por ciento puro o es cualquier polipéptido sintetizado químicamente. Un polipéptido sustancialmente puro puede ser al menos aproximadamente un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento puro. Típicamente, un polipéptido sustancialmente puro producirá una única banda principal en un gel de poliacrilamida no reductor.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento puede obtenerse mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o por síntesis química (por ejemplo, usando procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida o un sintetizador peptídico como un Peptide Synthesizer ABI 431A; Applied Biosystems; Foster City, CA). Por ejemplo, puede usarse tecnología recombinante convencional que usa vectores de expresión que codifican un polipéptido proporcionado en el presente documento. Los polipéptidos resultantes pueden purificarse a continuación usando, por ejemplo, técnicas cromatográficas de afinidad y HPLC. Puede medirse el alcance de la purificación por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo pero sin limitación: cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Un polipéptido proporcionado en el presente documento puede diseñarse o modificarse por ingeniería genética para contener una secuencia marcadora que permite que el polipéptido se purifique (por ejemplo, capturado en una matriz de afinidad). Por ejemplo, puede usarse un marcador como c-myc, hemaglutinina, polihistidina o marcador Flag™ (Kodak) para ayudar en la purificación del polipéptido. Dichos marcadores pueden insertarse en cualquier parte en el polipéptido incluyendo tanto en los extremos carboxilo como amino. Otras fusiones que pueden emplearse incluyen enzimas que ayuden en la detección del polipéptido, tales como fosfatasa alcalina.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento puede producirse para contener tres regiones, una primera región que incluye un extremo N-terminal (por ejemplo, una secuencia N-terminal de un polipéptido de urodilatina humana), una segunda región que incluye una estructura en anillo de un polipéptido natriurético maduro tal como un polipéptido de CNP humano, y una tercera región que incluye un extremo C-terminal (por ejemplo, una secuencia C-terminal de un polipéptido de urodilatina humana).

Un polipéptido proporcionado en el presente documento puede usarse para tratar enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades de las arterias coronarias, enfermedades renales. Por ejemplo, un polipéptido de CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4 puede administrarse a un ser humano que tenga enfermedad de las arterias coronarias en condiciones en las que la gravedad de los síntomas de la enfermedad de la arteria coronaria en humanos se reduzca.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento puede formularse como una composición farmacéutica mediante la mezcla con excipientes o vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden administrarse a un sujeto que lo necesite en una cantidad eficaz para tratar, por ejemplo, afecciones de corazón, hígado, riñón, u otras que retengan sodio. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse para administración parenteral, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas en soluciones fisiológicas tamponadas acuosas; para administración oral, particularmente en forma de comprimidos o cápsulas; o para administración intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Las composiciones para otras vías de administración pueden prepararse según se desee empleando procedimientos apropiados.

Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir como excipientes comunes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y combinaciones de los mismos. En algunos casos, pueden usarse polímero láctido biodegradable, biocompatible, copolímero láctido/glicólido, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, o combinaciones de los mismos como excipientes para controlar la liberación del polipéptido *in vivo*. Otros sistemas adecuados de suministro parenteral que pueden usarse incluyen, sin limitación, partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, liposomas, y combinaciones de los mismos. Las formulaciones para administración por inhalación pueden incluir excipientes tales como lactosa. Las formulaciones para inhalación pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato, desoxicolato, o combinaciones de los mismos, o pueden ser soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales. Si se desea, una composición que contiene un polipéptido proporcionado en el presente documento puede formularse como gel para aplicarse por vía intranasal. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir glicocolato para administración bucal.

Para administración oral, pueden prepararse comprimidos o cápsulas empleando procedimientos apropiados con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de

sodio). Los comprimidos pueden recubrirse usando procedimientos apropiados. Pueden formularse preparaciones para administración oral para proporcionar liberación controlada del polipéptido.

Las preparaciones nasales pueden presentarse en forma de líquido o como un producto seco. Las suspensiones o soluciones acuosas nebulizadas pueden incluir vehículos o excipientes para ajustar el pH y/o la tonicidad.

5 *Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos*

El presente documento también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican uno o más de los polipéptidos proporcionados en el presente documento. El término "aislado" como se usa en el presente documento en referencia a ácido nucleico se refiere a un ácido nucleico de origen natural que no se encuentra inmediatamente contiguo con ambas de las secuencias con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se deriva. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede ser, sin limitación, una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre que una de las secuencias de ácido nucleico normalmente encontradas flanqueando inmediatamente esa molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural esté eliminada o ausente. Por tanto, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, un ADN recombinante que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias así como un ADN recombinante que se incorpora en un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus o herpes virus), o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir una molécula de ADN recombinante que es parte de una secuencia de ácido nucleico híbrida o de fusión.

El término "aislado" como se usa en el presente documento en referencia a un ácido nucleico también incluye cualquier ácido nucleico de origen no natural ya que las secuencias de ácido nucleico de origen no natural no se encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma de origen natural. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen no natural tal como un ácido nucleico modificado por ingeniería genética se considera un ácido nucleico aislado. Un ácido nucleico modificado por ingeniería genética (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4) puede fabricarse empleando técnicas comunes de clonación molecular o síntesis química de ácidos nucleicos. Un ácido nucleico aislado de origen no natural puede ser independiente de otras secuencias, o incorporarse en un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus o herpes virus) o el ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, un ácido nucleico de origen no natural puede incluir una molécula de ácido nucleico que es parte de una secuencia de ácido nucleico híbrida o de fusión. Un ácido nucleico existente de entre cientos a millones de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o cortes de geles que contienen un producto de digestión de restricción de ADN genómico, no deben considerarse un ácido nucleico aislado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere tanto a ARN como a ADN, incluyendo ARNm, ADNc, ADN genómico, ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente), y análogos de ácidos nucleicos. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario, y en el caso de monocatenario, puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal. Los análogos de ácidos nucleicos pueden modificarse en el resto de la base, en el resto del azúcar o la cadena principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de un ácido nucleico. Las modificaciones en el resto de la base incluyen desoxiuridina por desoxitimidina, y 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Las modificaciones en el resto de azúcar pueden incluir modificación del hidroxilo 2' del azúcar de ribosa para formar azúcares de 2'-O-metilo o 2'-O-alilo. La cadena principal de fosfato de desoxirribosa puede modificarse para producir ácidos nucleicos morfolino, en los que cada resto de base se une a un anillo morfolino de seis miembros, o ácidos nucleicos peptídicos, en los que el esqueleto de desoxifosfato se reemplaza por una cadena principal de pseudopéptido y se mantienen las cuatro bases. Véase, por ejemplo, Summerton y Weller *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 7: 187-195 (1997); y Hyrup y col. *Bioorgan. Med. Chem.*, 4: 5-23 (1996). Además, el esqueleto de desoxifosfato puede reemplazarse con, por ejemplo, una cadena principal de fosforotioato o fosforoditioato, una cadena principal de fosforamidita, o una cadena principal de alquil fosfotriéster.

Un ácido nucleico proporcionado en el presente documento puede comprender o consistir en una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4. Por ejemplo, dicho ácido nucleico puede contener la secuencia de ácido nucleico humana para CNP y urodilatina modificada por ingeniería genética para codificar la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4.

Típicamente, un ácido nucleico aislado proporcionado en el presente documento tiene al menos 10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400 o más nucleótidos de longitud). Las moléculas de ácido nucleico que son menores que la longitud completa pueden ser útiles, por ejemplo, como cebadores o sondas para fines de diagnóstico. Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden producirse por técnicas convencionales, incluyendo, sin limitación, técnicas de clonaje molecular comunes y de síntesis química de ácidos nucleicos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). PCR se refiere a un procedimiento o técnica en la que se amplifican enzimáticamente ácidos nucleicos diana. La información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se emplea típicamente para diseñar cebadores de

oligonucleótidos que son idénticos en secuencia a las cadenas opuestas del molde a amplificar. La PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas a partir de ADN así como de ARN, incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores típicamente tienen de 15 a 50 nucleótidos de longitud, pero pueden variar desde 10 nucleótidos a cientos de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, un cebador puede tener 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40 o 45 nucleótidos de longitud. Un cebador puede purificarse a partir de una digestión de restricción mediante procedimientos convencionales, o puede sintetizarse químicamente. Los cebadores típicamente son monocatenarios para máxima eficiencia en la amplificación, pero un cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero (por ejemplo, tratados con calor) para separar las cadenas antes de usarse en amplificación. Las técnicas generales de PCR se describen, por ejemplo, en PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. por Dieffenbach y Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Cuando se emplea ARN como fuente de plantilla, puede usarse transcriptasa inversa para sintetizar una cadena de ADN complementario (ADNc). La reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de cadena, replicación de secuencia autosostenida o amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico también pueden usarse para obtener ácidos nucleicos aislados como se describe en otros documentos (Lewis, Genetic Engineering News, 12(9): 1 (1992); Guatelli y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1874-1878 (1990); y Weiss, Science, 254: 1292 (1991)).

Los ácidos nucleicos aislados también pueden sintetizarse químicamente, ya sea como una única molécula de ácido nucleico (por ejemplo, usando síntesis de ADN automatizada en la dirección 3' a 5' usando tecnología de fosforamidita) o como una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse uno o más pares de oligonucleótidos largos (por ejemplo, >100 nucleótidos) que contengan la secuencia deseada, conteniendo cada par un segmento corto de complementariedad (por ejemplo, de aproximadamente 15 nucleótidos) de tal forma que se forma un dúplex cuando el par de oligonucleótidos se hibrida. Se usa la ADN polimerasa para extender los oligonucleótidos, dando lugar a una molécula de ácido nucleico bicatenaria sencilla por par de oligonucleótidos, que a continuación puede ligarse en un vector.

Los ácidos nucleicos aislados también pueden obtenerse mediante mutagénesis. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en las SEC ID N^o: 1, 2, 3 o 4 puede mutarse utilizando técnicas convencionales tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos y/o mutagénesis dirigida al sitio mediante PCR. Véase Short Protocols in Molecular Biology, Capítulo 8, Green Publishing Associates y John Wiley & Sons, Editado por Ausubel y col., 1992. Dichas mutaciones incluyen adiciones, deleciones, sustituciones y combinaciones de las mismas.

Vectores y células huésped

El presente documento también proporciona vectores que contienen un ácido nucleico proporcionado en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, en el cual puede insertarse otro segmento de ADN para producir la replicación del segmento insertado. Un vector puede ser un vector de expresión. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una o más secuencias de control de la expresión, y una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN.

En un vector de expresión proporcionado en el presente documento, el ácido nucleico puede unirse operativamente a una o más secuencias de control de la expresión. Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" significa incorporado en una construcción genética de tal forma que las secuencias de control de la expresión controlen de manera eficaz la expresión de una secuencia codificante de interés. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión incluyen promotores, potenciadores y regiones terminadoras de la transcripción. Un promotor es una secuencia de control de la expresión compuesta de una región de una molécula de ADN, típicamente dentro de 100 nucleótidos cadena arriba del punto en el que comienza la transcripción (generalmente cerca del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II). Para poner una secuencia codificante bajo el control de un promotor, puede ser necesario posicionar el sitio de inicio de la traducción del marco de lectura traduccional del polipéptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos cadena abajo del promotor. Los potenciadores proporcionan especificidad de expresión en términos de tiempo, localización, y nivel. A diferencia de los promotores, los potenciadores pueden funcionar cuando se localizan a diversas distancias del sitio de transcripción. Un potenciador también puede localizarse cadena abajo del sitio de iniciación de la transcripción. Una secuencia codificante está "unida operativamente" y "bajo el control" de secuencias de control de la expresión en una célula cuando la ARN polimerasa es capaz de transcribir la secuencia codificante en ARNm, que a continuación puede traducirse en el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófagos, baculovirus, virus del mosaico del tabaco, herpes virus, citomegalovirus, retrovirus, poxvirus, adenovirus y virus adeno-asociados. Se encuentran disponibles en el mercado numerosos vectores y sistemas de expresión de corporaciones tales como Novagen (Madison, WI), Clontech Laboratories (Mountain View, CA), Stratagene (La Jolla, CA), e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

Un vector de expresión puede incluir una secuencia marcadora diseñada para facilitar la manipulación posterior de la secuencia de ácido nucleico expresada (por ejemplo, purificación o localización). Las secuencias marcadoras, tales

como las secuencias de la proteína verde fluorescente (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina o marcador Flag™ (Kodak, New Haven, CT) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Dichos marcadores pueden insertarse en cualquier parte del polipéptido incluyendo los extremos carboxilo o amino.

- 5 El presente documento también proporciona células huéspedes que contienen una molécula de ácido nucleico y/o un vector de ácido nucleico proporcionado en el presente documento. La expresión "célula huésped" se refiere a células procariontas y eucariotas en las que puede introducirse una molécula de ácido nucleico o vector. Puede usarse cualquier procedimiento para introducir ácido nucleico en una célula. Por ejemplo, pueden usarse precipitación de fosfato cálcico, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección, y transferencia de ácido nucleico mediada por virus para introducir el ácido nucleico en las células. Además, el ADN desnudo puede dispensarse directamente a las células *in vivo* como se describe en otros documentos (Patentes de los Estados Unidos N° 5.580.859 y 5.589.466).

Detección de polipéptidos

- 15 El presente documento proporciona procedimientos y materiales para detectar un polipéptido proporcionado en el presente documento. Dichos procedimientos y materiales pueden usarse para controlar los niveles de polipéptido en un mamífero que recibe el polipéptido como un agente terapéutico. Un polipéptido proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido de CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4) puede detectarse, por ejemplo, inmunológicamente usando uno o más anticuerpos. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas que son capaces de unirse a un determinante epitópico de un polipéptido proporcionado en el presente documento. El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico o un antígeno al que se une el parátipo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y típicamente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos generalmente tienen al menos cinco aminoácidos contiguos (un epítipo continuo), o como alternativa pueden ser un conjunto de aminoácidos no contiguos que definen una estructura concreta (por ejemplo, un epítipo conformacional). El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla, fragmentos Fab, y fragmentos F(ab)₂. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo que están contenidas en el suero de los animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un epítipo concreto de un antígeno.

- Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad de unión específica por un polipéptido proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido de CU-NP) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4) mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos F(ab')₂ mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. En algunos casos, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab. Véase, por ejemplo, Huse y col., *Science*, 246: 1275 (1989). Una vez producidos, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ensayarse para reconocimiento de un polipéptido proporcionado en el presente documento mediante procedimientos de inmunoensayo convencional incluyendo técnicas de ELISA, radioinmunoensayo, y transferencias de Western. Véase, *Short Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 11, Green Publishing Associates y John Wiley & Sons, Editado por Ausubel, F.M y col., 1992.

- En los ensayos inmunológicos, puede marcarse un anticuerpo que tenga afinidad de unión específica por un polipéptido proporcionado en el presente documento o un anticuerpo secundario que se una a dicho anticuerpo, ya sea directa o indirectamente. Los marcadores adecuados incluyen, sin limitación, radionúclidos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H, ³²P, ³³P o ¹⁴C), restos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, FITC, PerCP, rodamina o PE), restos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas de Qdot™ proporcionadas por Invitrogen (Carlsbad, CA)), compuestos que absorben luz de una longitud de onda definida, o enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante). Los anticuerpos pueden marcarse indirectamente mediante conjugación con biotina y a continuación detectarse con avidina o estreptavidina marcada con una molécula descrita anteriormente. Los procedimientos de detección o cuantificación de un marcador dependen de la naturaleza del marcador y son conocidos en la técnica. Los ejemplos de detectores incluyen, sin limitación, película de rayos x, contadores de radiactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y densitómetros. Pueden usarse combinaciones de estos enfoques (incluyendo ensayos "multi-capas"), familiares para los expertos en la técnica, para mejorar la sensibilidad de los ensayos.

- 55 Los ensayos inmunológicos para detectar un polipéptido proporcionado en el presente documento pueden efectuarse en una variedad de formatos conocidos, incluyendo ensayos tipo sándwich, ensayos de competición (RIA competitivo), o inmunoensayos de puente. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 5.296.347, 4.233.402, 4.098.876, y 4.034.074. Los métodos de detección de un polipéptido proporcionado en el presente documento incluyen generalmente poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo que se una a un polipéptido proporcionado en el presente documento y detectar la unión del polipéptido al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que tenga afinidad de unión específica por un polipéptido proporcionado en el presente documento

puede inmovilizarse en un sustrato sólido mediante cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica y después exponerse a la muestra biológica. La unión del polipéptido al anticuerpo en el sustrato sólido puede detectarse aprovechando el fenómeno de resonancia de plasmón superficial, que da como resultado un cambio en la intensidad de la resonancia de plasmón superficial tras la unión que puede detectarse cualitativamente o cuantitativamente mediante un instrumento apropiado, por ejemplo, un aparato Biacore (Biacore International AB, Rapskatan, Suecia). En algunos casos, el anticuerpo puede marcarse y detectarse como se ha descrito anteriormente. Puede generarse una curva patrón usando cantidades conocidas de un polipéptido proporcionado en el presente documento para ayudar en la cuantificación de los niveles del polipéptido.

En algunas realizaciones, un ensayo de tipo "sándwich" en que se inmoviliza un anticuerpo de captura en un sustrato sólido puede usarse para detectar la presencia, ausencia o nivel de un polipéptido proporcionado en el presente documento. El sustrato sólido puede ponerse en contacto con la muestra biológica de tal forma que cualquier polipéptido de interés en la muestra pueda unirse al anticuerpo inmovilizado. La presencia, ausencia o nivel del polipéptido unido al anticuerpo puede determinarse usando un anticuerpo "de detección" que tenga afinidad de unión específica por el polipéptido. En algunas realizaciones, puede usarse un anticuerpo de captura que tiene afinidad de unión por CNP o urodilatina así como por un polipéptido proporcionado en el presente documento. En esta realización, puede usarse un anticuerpo de detección que tiene afinidad de unión específica por un polipéptido particular proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido de CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4). Se entiende que en los ensayos de tipo sándwich, el anticuerpo de captura no debe unirse al mismo epítipo (o intervalo de epítipos en el caso de un anticuerpo policlonal) que el anticuerpo de detección. Por tanto, si se usa un anticuerpo monoclonal como anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser otro anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que o bien está físicamente separado o se solapa únicamente de manera parcial con el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de captura, o un anticuerpo policlonal que se une a epítipos distintos de, o además de, aquellos a los que se une el anticuerpo monoclonal de captura. Si se usa un anticuerpo policlonal como anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser o bien un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que está o bien físicamente separado de o parcialmente solapado sobre cualquiera de los epítipos a los que se une el anticuerpo policlonal de captura, o un anticuerpo policlonal que se une a epítipos distintos de, o además de, aquellos a los que se une el anticuerpo policlonal de captura. Los ensayos de tipo sándwich pueden efectuarse como ensayos de ELISA de tipo sándwich, ensayos de transferencia de Western de tipo sándwich, o ensayos de detección inmunomagnética de tipo sándwich.

Los sustratos sólidos adecuados a los que un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de captura) puede unirse incluyen, sin limitación, placas de microtitulación, tubos, membranas tales como membranas de nailon o nitrocelulosa, y perlas o partículas (por ejemplo, perlas o partículas de agarosa, celulosa, vidrio, poliestireno, poliacrilamida, magnéticas o magnetizables). Las partículas magnéticas o magnetizables pueden ser particularmente útiles cuando se usa un sistema de inmunoensayo automatizado.

Pueden producirse anticuerpos que tienen afinidad de unión específica por un polipéptido proporcionado en el presente documento mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, un polipéptido puede producirse de manera recombinante como se ha descrito anteriormente, puede purificarse a partir de una muestra biológica (por ejemplo, un sistema de expresión heterólogo), o puede sintetizarse químicamente, y usarse para inmunizar animales huéspedes, incluyendo conejos, pollos, ratones, cobayas o ratas. Por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 4 o fragmentos de la misma que tengan al menos seis aminoácidos de longitud, puede usarse para inmunizar un animal. Varios adyuvantes que pueden usarse para aumentar la respuesta inmunológica dependen de las especies huéspedes e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleaginosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando un polipéptido proporcionado en el presente documento y tecnología de hibridoma convencional. En particular, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo tal como se describe por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), la técnica de hibridoma de linfocito B humano (Kosbor y col., *Immunology Today*, 4: 72 (1983); Cole y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2026 (1983)), y la técnica de hibridoma EBV (Cole y col., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1983)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales puede cultivarse *in vitro* e *in vivo*.

Otras técnicas para detectar un polipéptido proporcionado en el presente documento incluyen técnicas espectrofotométricas de masas tales como ionización por electropulverización (ESI) y desorción-ionización por láser asistida por matriz (MALDI). Véase, por ejemplo, Gevaert y col., *Electrophoresis*, 22(9): 1645-51 (2001); Chaurand y col., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10(2): 91-103 (1999). Los espectrómetros de masas útiles para dichas aplicaciones están disponibles a través de Applied Biosystems (Foster City, CA), Bruker Daltronics (Billerica, MA), y Amersham Pharmacia (Sunnyvale, CA).

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no pertenecientes a la invención son para fines únicamente ilustrativos.

Ejemplos**Ejemplo 1 – Síntesis de CU-NP**

Se diseñó un polipéptido con la secuencia expuesta en la Figura 1 y se sintetizó usando un Sintetizador Peptídico ABI 431A. Este polipéptido se cita como polipéptido de CU-NP (Figura 1). El polipéptido de CU-NP sintetizado se confirmó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas. Su peso molecular es 3535,09, y su secuencia de aminoácidos es Thr-Ala-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEC ID N°: 4) con un puente disulfuro que une los restos de Cys (Figura 1).

Ejemplo 2 – Efectos *in vivo* de CU-NP

Se evaluó la función cardiorrenal en tres perros normales anestesiados. Se obtuvieron los aclaramientos en la preinfusión, durante la infusión intravenosa de 10, 50 y 100 ng de CU-NP/kg/minuto durante 45 minutos a cada nivel de dosificación (es decir, cada perro recibió infusiones de 45 minutos consecutivas de 10, 50 y 100 ng/kg/minuto) y post-infusión. La reabsorción tubular de Na⁺ y TFG se evaluaron por el aclaramiento de Li⁺ e inulina, respectivamente. Se cuantificaron las neurohormonas mediante radioinmunoensayos. Los datos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguidas de test de Dunnett. Los resultados (media ± ETM) se presentan en la Tabla 1.

Además, la actividad de renina en plasma disminuyó de 9 ± 2 a $5 \pm 1^*$ a $3 \pm 1^\dagger$ a $3 \pm 1^\dagger$ ng/ml/hora, y los niveles de angiotensina II disminuyeron de 18 ± 1 a $10 \pm 0,4^\dagger$ a $5 \pm 0,4^\dagger$ a $7 \pm 1^\dagger$ pg/ml. No se observaron cambios significativos en el intervalo de QTc (ms) al final de la infusión a 100 ng/kg/minuto (329 ± 15) frente a pre-infusión (323 ± 6).

Estos resultados demuestran que un polipéptido que contiene secuencias de aminoácidos de CNP y urodilatina puede, de manera dependiente de la dosis, (1) aumentar la natriuresis, diuresis y TFG, (2) disminuir las presiones de llenado cardiaco, y (3) inhibir la renina y angiotensina, sin inducir hipotensión significativa.

Tabla 1

<i>Datos renales y cardiovasculares para CU-NP</i>					
	Pre-Infusión	10 ng/kg/ minuto	50 ng/kg/ minuto	100 ng/kg/ minuto	Post-Infusión
TFG (ml/min)	31 ± 5	39 ± 1	43 ± 4*	53 ± 3 [†]	36 ± 2
Flujo de orina (ml/min)	0,09 ± 0,01	0,3 ± 0,07	1,5 ± 0,5 [†]	1,9 ± 0,3 [†]	0,3 ± 0,05
Excreción de Na ⁺ (μEq/ min)	1,9 ± 0,9	33 ± 1 3	235 ± 72 [†]	342 ± 60 [†]	66 ± 12
RFP _{Na+} (%)	92 ± 0,9	73 ± 4,5 [†]	54 ± 1,8 [†]	55 ± 2,6 [†]	62 ± 3,5 [†]
RFD _{Na+} (%)	99 ± 0,3	98 ± 0,5	92 ± 1,6 [†]	90 ± 0,8 [†]	97 ± 0,6*
Generación de GMPc renal (pmol/ min)	356 ± 36	534 ± 94	1301 ± 60*	4608 ± 370 [†]	1086 ± 27
PCP (mmHg)	4,6 ± 0,7	3,8 ± 1	2,5 ± 1 [†]	1,7 ± 0,9 [†]	3,2 ± 1*
PAD (mmHg)	1,5 ± 1	0,9 ± 0,9	0,6 ± 1*	-0,2 ± 0,8 [†]	0,1 ± 0,9 [†]
PAM (mmHg)	129 ± 17	129 ± 13	128 ± 10	120 ± 11	124 ± 13

* = P<0,05; † = P<0,01; TFG = tasa de filtración glomerular; RFP_{Na+} = reabsorción de sodio fraccional proximal; RFD_{Na+} = reabsorción de sodio fraccional distal; PCP = presión capilar pulmonar; PAD = presión de la aurícula derecha; PAM = presión arterial media.

Ejemplo 3 – Efectos biológicos adicionales de CU-NP

El polipéptido de CU-NP o CNP se infundió por vía intravenosa en perros normales anestesiados a 50 ng/kg/minuto durante 75 minutos. Se recogieron muestras de orina y sangre pre-infusión (pre-I), a los 30 y 60 minutos de infusión y post-infusión (post-1). Se usó el aclaramiento de inulina para evaluar la tasa de filtración glomerular (TFG). Se usó la técnica del aclaramiento de litio para la medida de reabsorción de Na⁺ fraccional proximal y distal (RFP_{Na+} y RFD_{Na+}, respectivamente). Se hicieron comparaciones de los tres últimos puntos de tiempo frente a pre-I. Se usó la prueba de la t de Student cuando se compararon los resultados de dos puntos de tiempo, mientras que se usó ANOVA de medidas repetidas para comparar cuatro puntos de tiempo. Los resultados (media ± ETM) se presentan

en las Tablas 2A y 2B.

- El polipéptido de CU-NP aumentó significativamente GMPc en plasma y la excreción urinaria de GMPc. CU-NP también aumentó el flujo de orina y la excreción urinaria de Na⁺, y condujo a una tasa de filtración glomerular mejorada. Se redujeron la presión capilar pulmonar y la presión de la aurícula derecha sin reducir la hipotensión sistémica. La presión pulmonar arterial también se redujo significativamente, y se conservó el rendimiento cardíaco. Se suprimieron la actividad de la renina en plasma, los niveles de angiotensina II, y los niveles de aldosterona durante la infusión de CU-NP, pero se produjo una elevación o “rebote” después del cese de la infusión de CU-NP. Estos datos sugieren que puede usarse una forma de larga duración de CU-NP para una supresión continuada de neurohormonas.
- 5
- 10 CU-NP también aumentó significativamente la generación renal de GMPc y excreción urinaria de K⁺. Se redujeron significativamente tanto RFP_{Na+} como RFD_{Na+}. Estos hallazgos se asociaron con un aumento en el flujo sanguíneo renal ajustado al peso y una reducción en la resistencia vascular renal. También se observó un aumento en el hematocrito. Se aumentaron la ANP en plasma, BNP en plasma y CNP en plasma, así como la excreción urinaria de ANP, BNP y CNP.
- 15 Estos resultados demuestran que un polipéptido de CU-NP puede tener actividades activadoras de GMPc, diuréticas, natriuréticas, potenciadoras de TFG, supresoras del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), descarga cardíaca, y actividades hemodinámicas renales favorables mientras que carece de la capacidad de disminuir la presión sanguínea y causar hipotensión sistémica. Además, estos resultados demuestran que un polipéptido de CU-NP puede aumentar los niveles endógenos de ANP y BNP. Los efectos tubulares del polipéptido de CU-NP sintetizado son coherentes con acciones a nivel del túbulo proximal y células del conducto de recolección medular interno.
- 20

Tabla 2A

<i>Datos renales y cardiovasculares para CU-NP</i>				
	Pre-Infusión	30 minutos	60 minutos	Post-Infusión
TFG (ml/min)	38,4 ± 3,6	50,7 ± 2,6*	53,8 ± 2,8 ^{††}	50,1 ± 3,5*
Flujo de orina (ml/min)	0,13 ± 0,02	1,28 ± 0,25 ^{††}	1,34 ± 0,22 ^{††}	0,33 ± 0,04
Excreción de Na ⁺ (μEq/min)	8,0 ± 3,3	216,4 ± 42,3 ^{††}	237,7 ± 35,8 ^{††}	51,2 ± 9,4
Excreción de K ⁺ (μEq/min)	14,9 ± 4,5	68,3 ± 12,5 [†]	74,6 ± 15,3 [†]	32,9 ± 3,0
RFP _{Na+} (%)	84,9 ± 2,5	62,4 ± 4,0 [†]	61,3 ± 1,9 [†]	70,4 ± 2,8 [†]
RFD _{Na+} (%)	99,2 ± 0,2	92,4 ± 1,2 [†]	92,2 ± 1,1 ^{††}	97,7 ± 0,4
Generación de GMPc renal (pmol/min)	469,0 ± 55,4	2168 ± 53 ^{†§}	2987 ± 622 ^{††}	1394 ± 185
GMPc en plasma (pmol/ml)	8,2 ± 0,7	26,2 ± 1,3 ^{††}	29,8 ± 1,5 ^{††}	13,0 ± 0,9 [†]
Excreción urinaria de GMPc (pmol/min)	770 ± 48	3508 ± 574 ^{††}	4591 ± 664 ^{††}	2052 ± 208
PCP (mmHg)	5,6 ± 0,9	3,9 ± 0,7*	2,9 ± 0,9 [†]	4,3 ± 0,8
PAD (mmHg)	1,1 ± 0,6	0,3 ± 0,5	-0,1 ± 0,5*	0,7 ± 0,4
Hipotensión sistémica (mmHg)	135,9 ± 3,9	135,9 ± 2,7	133,9 ± 3,6	142,3 ± 2,7 [†]
PAP (mmHg)	11,8 ± 0,9	10,7 ± 0,8*	10,5 ± 0,7 [†]	12,3 ± 0,7
Rendimiento cardíaco (l/min)	3,1 ± 0,3	3,4 ± 0,5	3,0 ± 0,5	2,8 ± 0,5
Actividad de renina en plasma (ng/ml/hora)	8,8 ± 2	2,5 ± 0,8 [†]	1,5 ± 0,4 [†]	14,0 ± 1,3 [†]
Angiotensina II (pg/ml)	13,9 ± 2,0	6,9 ± 0,7 [†]	4,5 ± 0,3 [†]	22,6 ± 1,6 [†]
Aldosterona (ng/dl)	15,8 ± 2,7	14,2 ± 2,2	12,1 ± 2,1	30,4 ± 3,5 [†]
FSR ajustada (ml/kg/min)	10,8 ± 0,8	11,64 ± 0,5	12,21 ± 0,4 [†]	11,60 ± 0,5
RVR (x 10 ⁻³ mmHg·min·l ⁻¹)	0,55 ± 0,05	0,50 ± 0,04	0,47 ± 0,03 [†]	0,53 ± 0,04
Hematocrito (%)	37,8 ± 1,3	40,3 ± 1,3 [†]	41,1 ± 1,4 [†]	40,3 ± 1,8 [†]

(continuación)

<i>Datos renales y cardiovasculares para CU-NP</i>				
	Pre-Infusión	30 minutos	60 minutos	Post-Infusión
ANP en plasma (pg/ml)	14,1 ± 0,8	16,7 ± 0,9*	16,6 ± 1,1*	15,2 ± 0,6
BNP en plasma (pg/ml)	8,2 ± 0,9	21,0 ± 1,8 [†]	17,0 ± 2,2 [†]	10,1 ± 1,4
CNP en plasma (pg/ml)	4,0 ± 0,3	15,4 ± 0,9 [†]	15,1 ± 1,4 [†]	3,2 ± 0,2
Excreción de ANP (pg/min)	3,2 ± 1,5	21,9 ± 9,5	28,3 ± 13,6	10,4 ± 2,5
Excreción de BNP (pg/min)	13,9 ± 1,5	18,2 ± 1,5	19,3 ± 1,2	28,3 ± 5,4*
Excreción de CNP (pg/min)	2,0 ± 0,4	4,0 ± 1,2	9,1 ± 3,9	21,5 ± 17,4

* = P<0,05 frente a pre-I; † = P<0,01 frente a pre-I; ‡ = P<0,05 frente a CNP; § = P<0,01 frente a CNP; ¶ = P<0,001 frente a CNP; TFG = tasa de filtración glomerular; RFP_{Na+} = reabsorción de sodio fraccional proximal; RFD_{Na+} = reabsorción de sodio fraccional distal; PCP = presión capilar pulmonar; PAD = presión de la aurícula derecha; PAP = presión arterial pulmonar; FSR = flujo sanguíneo renal; RVR = resistencia vascular renal.

Tabla 2B

<i>Datos comparativos renales y cardiovasculares para CNP</i>				
	Pre-Infusión	30 minutos	60 minutos	Post-Infusión
TFG (ml/min)	38 ± 4	42 ± 4	39 ± 3	44 ± 3
Flujo de orina (ml/min)	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,06 [†]	0,4 ± 0,02 [†]	0,3 ± 0,04
Excreción de Na ⁺ (μEq/min)	16 ± 6	56 ± 21	71 ± 8*	30 ± 8
RFP _{Na+} (%)	83 ± 3	67 ± 3	51 ± 7 [†]	68 ± 3*
RFD _{Na+} (%)	99 ± 0,5	98 ± 0,8	98 ± 0,5	99 ± 0,2
Generación renal de GMPc (pmol/min)	491 ± 65	452 ± 202	603 ± 199	582 ± 91
GMPc en plasma (pmol/ml)	8 ± 1	11 ± 1 [†]	12 ± 1 [†]	12 ± 1 [†]
Excreción de GMPc urinaria (pmol/min)	830 ± 74	1119 ± 102*	1338 ± 81 [†]	1090 ± 76*

* = P<0,05 frente a pre-I; † = P<0,01 frente a pre-I; TFG = tasa de filtración glomerular; RFP_{Na+} = reabsorción de sodio fraccional proximal; RFD_{Na+} = reabsorción de sodio fraccional distal

5 Ejemplo 3 – Evaluación de CU-NP en las células endoteliales aórticas humanas e *in vivo*

CU-NP se ensayó en células endoteliales aórticas humanas (HAEC), y se definió el transcurso de tiempo de activación de GMPc *in vivo*. CU-NP se incubó con HAEC (2-5 pasos, a 80-90 % de confluencia) a 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ o 10⁻⁶ M durante 10 minutos en un incubador de CO₂. Se infundió CU-NP (n = 6) o CNP (n = 3) por vía intravenosa en perros normales anestesiados a 14 pmol/kg/min durante 75 minutos. Se recogió sangre pre-infusión, a los 25, 30, 45, 60, 75 minutos durante la infusión (I) y a los 1, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 45, 60 minutos después de la infusión (post-1). El GMP cíclico se cuantificó mediante radioinmunoensayo.

Como se muestra en la Tabla 3, CU-NP estimuló la producción de GMPc en HAEC (P<0,01 para 10⁻⁶ M frente a sin tratamiento). Además, CU-NP aumentó el GMPc en plasma *in vivo* frente a pre-I (todos los puntos temporales durante I y post-I, P<0,01, excepto a los 45 minutos post-I, P<0,05). CU-NP activó GMPc en mayor medida en comparación con CNP (P<0,001, 25 minutos I hasta 30 minutos post-I). Por tanto, CU-NP activó significativamente GMPc en HAEC, y también estimuló significativamente GMPc en mayor medida que CU-NP *in vivo*.

Tabla 3

<i>Efectos de CU-NP en HAEC</i>	
Concentración de CU-NP	GMPc (media ± ETM, pmol/ml)
10 ⁻¹⁰ M	0,0007 ± 0,0007
10 ⁻⁸ M	0,03 ± 0,02
10 ⁻⁶ M	0,571 ± 0,05 [†]
Sin tratamiento	0,003 ± 0,002
† = P<0,01 frente a sin tratamiento.	

Ejemplo 4 – Acciones estimulantes sobre GMPc de CU-NP en glomérulos caninos aislados

5 Se llevaron a cabo experimentos para determinar si CU-NP estimula directamente GMPc en glomérulos aislados, y para comparar las acciones activadoras sobre GMPc de CU-NP con CNP, URO, y CNP-C, que consistía en la longitud completa de 22 AA de CNP con un duplicado del extremo N-terminal fusionado en la posición C-terminal. Se aislaron los glomérulos tras la recolección de riñones caninos normales. Se incubaron CU-NP, CNP, URO y CNP-C (10⁻⁵ M) con glomérulos frente a control. Se midió el GMP cíclico mediante RIA, con corrección para niveles de proteína. CU-NP y URO suscitaron mayores respuestas de GMPc que los controles respectivos (P<0,01), pero sin diferencia entre grupos. CU-NP y URO estimularon mayores respuestas de GMPc frente a CNP y frente a CNP-C (P<0,001). Por tanto, CU-NP estimuló GMPc en los glomérulos en mayor medida que CNP, pero en una medida similar a URO. CNP-C no activó GMPc. Estos datos sugieren que el GMPc mejorado activado potencialmente puede requerir extremos N y/o C terminales de ligandos para el receptor A de NP.

Tabla 4

<i>Efectos de CU-NP sobre la producción de GMPc en glomérulos aislados</i>	
Tratamiento	GMPc (media ± ETM; fmol/μg)
CU-NP	0,73 ± 0,09 ^{†‡}
CNP	0,0019 ± 0,0005
URO	0,69 ± 0,07 ^{†‡}
CNP-C	0,00597 ± 0,0053
† = P<0,01 frente a control correspondiente. ‡ = P<0,001 frente a 0CNP y CNP-C	

15

Ejemplo 5 – Efectos hemoconcentradores de CU-NP

20 Tres NP humanos (BNP, CNP, URO, y CU-NP) se estudiaron para evaluar sus efectos en la permeabilidad vascular como se manifestó por un aumento en el hematocrito. Perros normales anestesiados recibieron infusiones intravenosas de BNP (n = 7), CNP (n = 6), URO (n = 5) o CU-NP (n = 6) a 14 pmol/kg/minuto. Se recogió sangre en tubos de EDTA en hielo y se centrifugó. Los datos se presentan para la línea basal y a los 60 minutos de la infusión. Además de aumentar el hematocrito (Tabla 5), CU-NP redujo la presión CP *in vivo* (línea basal 6 ± 0,9 mmHg, 60 minutos 3 ± 0,9 mmHg; P<0,05). Por tanto, los efectos hemoconcentradores de CU-NP pueden contribuir a sus acciones de descarga cardíaca *in vivo*.

Tabla 5

<i>Efectos de CU-NP en hematocrito</i>		
Tratamiento	Hematocrito (media ± ETM; %)	
	Línea basal	60 min
BNP	36 ± 1	40 ± 2*
CNP	36 ± 1	37 ± 1

25

(continuación)

<i>Efectos de CU-NP en hematocrito</i>		
Tratamiento	Hematocrito (media \pm ETM; %)	
	Línea basal	60 min
URO	37 \pm 1	40 \pm 1*
CU-NP	38 \pm 1	41 \pm 1 [†]
(* = P<0,05; † = P<0,01)		

Ejemplo 6 – Acciones cardiorrenales y neurohumorales de CU-NP en insuficiencia cardiaca experimental canina

- 5 CU-NP se evaluó en insuficiencia cardiaca canina (IC) para determinar si CU-NP podría activar el segundo mensajero GMPc y ejercer acciones favorables sin hipotensión excesiva. Se indujo IC leve por estimulación (180 bpm durante 10 días). Se infundió CU-NP en 6 perros anestesiados por vía intravenosa a 75 ng/kg/minuto durante 75 minutos. Se midió la TFG mediante el aclaramiento de inulina. La reabsorción fraccional de Na⁺ (RFNa) se evaluó mediante el aclaramiento de Li⁺. Se recogieron los datos pre-infusión (pre-I), a los 30 y 60 minutos I, y post-I. La actividad de renina en plasma, angiotensina II, aldosterona y GMPc también se midieron. Los resultados (media \pm ETM) se presentan en la Tabla 6.

- 15 CU-NP aumentó el GMPc en plasma, la excreción urinaria de GMPc, generación neta renal de GMPc, flujo de orina, y excreción de Na⁺ urinaria. Se redujeron la RFNa proximal y distal. Se mejoraron el flujo sanguíneo renal y TFG, con un descenso leve de PAM. Tanto RC como RVS permanecieron sin cambios. PCP y PAP se redujeron. La actividad de renina en plasma, angiotensina II y aldosterona también se suprimieron. Por tanto, CU-NP activó GMPc en IC canina y ejerció acciones potenciadoras renales, de descarga cardiaca y supresoras del Sistema de Renina-Angiotensina-Aldosterona sin hipotensión excesiva.

Tabla 6

<i>Datos renales y cardiovasculares para CU-NP en IC experimental</i>				
	Pre-Infusión	30 minutos	60 minutos	Post-Infusión
TFG (ml/min)	40 \pm 5	51 \pm 9	51 \pm 3	53 \pm 7*
Flujo de orina (ml/min)	0,09 \pm 0,01	0,50 \pm 0,15 [†]	0,56 \pm 0,11 [†]	0,19 \pm 0,03
Excreción de Na ⁺ (μ Eq/min)	2,9 \pm 0,9	80,5 \pm 29,4 [†]	102,0 \pm 22,2 [†]	22,1 \pm 7,9
RFP _{Na+} (%)	89 \pm 2	68 \pm 5 [†]	67 \pm 3 [†]	79 \pm 3*
RFD _{Na+} (%)	99,6 \pm 0,1	96 \pm 1 [†]	96 \pm 1 [†]	99 \pm 0,3
Generación renal de GMPc (pmol/min)	610 \pm 66	2977 \pm 549 ⁺	3255 \pm 662 [†]	1342 \pm 200
GMPc en plasma (pmol/ml)	17 \pm 3	41 \pm 3 ⁺	43 \pm 2 [†]	21 \pm 2
Excreción urinaria de GMPc (pmol/min)	1186 \pm 152	5066 \pm 826 [†]	5476 \pm 876 [†]	2394 \pm 197
PCP (mmHg)	11 \pm 1	9 \pm 1 [†]	8 \pm 1 [†]	10 \pm 1
PAP (mmHg)	16 \pm 0,8	15 \pm 0,6*	14 \pm 0,7 [†]	16 \pm 0,7
Actividad de renina en plasma (ng/ml/hora)	9 \pm 2	3 \pm 1 [†]	2 \pm 1 [†]	9 \pm 2
Angiotensina II (pg/ml)	32 \pm 7	9 \pm 2 [†]	9 \pm 3 [†]	19 \pm 4
Aldosterona (ng/dl)	14 \pm 5	9 \pm 2	6 \pm 2*	11 \pm 3
FSR (ml/min)	238 \pm 39	281 \pm 42*	294 \pm 42 [†]	275 \pm 42*
PAM (mmHg)	108 \pm 9	100 \pm 8 [†]	96 \pm 8 [†]	107 \pm 8
RC (l/min)	2,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,04

(continuación)

Datos renales y cardiovasculares para CU-NP en IC experimental				
	Pre-Infusión	30 minutos	60 minutos	Post-Infusión
RVS (mmHg·l ⁻¹ ·Min)	42 ± 3	39 ± 3	39 ± 3	45 ± 3
* = P<0,05 frente a pre-I; † = P<0,01 frente a pre-I; TFG = tasa de filtración glomerular; RFP _{Na+} = reabsorción de sodio fraccional proximal; RFD _{Na+} = reabsorción de sodio fraccional distal; PCP = presión capilar pulmonar; PAD = presión de la aurícula derecha; PAP = presión arterial pulmonar; FSR = flujo sanguíneo renal; PAM = presión arterial media; RC = rendimiento cardíaco; RVS = resistencia vascular sistémica.				

Ejemplo 7 – Efectos *in vivo* de CU-NP en la presión de perfusión renal

5 Se llevaron a cabo estudios para determinar las acciones *in vivo* de CNP, CU-NP y URO en la presión de perfusión renal (PPR, estimada mediante PAM - PAD), ya que PPR es un determinante clave de la función renal. Debido a la acción potenciadora de TFG de CU-NP, también se efectuaron estudios *in vitro* para evaluar la hipótesis de que CU-NP (a diferencia de CNP) también activa NPR-A, un potente receptor NP de actuación renal.

10 Se infundieron dosis equimolares de CU-NP, CNP humana o URO humano por vía intravenosa a 14,14 pmol/kg/minuto en 17 perros normales anestesiados durante 75 minutos. Se evaluó PPR en línea basal y a los 60 minutos de infusión. Los datos se expresan como media ± ETM. Se midieron los aclaramientos a partir del minuto 16 al 45 y a partir del minuto 46 al 75 después de la iniciación de infusión de péptido. Con cada grupo, se usó una prueba t de 2 colas para muestras relacionadas para comparar PPR a los 60 minutos de infusión de péptido frente a línea basal. Se efectuaron comparaciones entre grupos mediante ANOVA de dos vías seguida de post-test de Bonferroni.

15 Las respuestas de GMPc a los 3 péptidos también se evaluaron en glomérulos aislados de riñones caninos después de la recolección, en presencia o ausencia de un antagonista de NPR-A, A719153 (1 μM), o un antagonista de NPR-B, P194 (1 μM), o ambos antagonistas añadidos secuencialmente (A71915 seguido de P 194, concentración final para ambos de 1 μM). Para confirmar la participación de NPR-B en la respuesta de GMPc a CU-NP, se llevaron a cabo experimentos adicionales usando células endoteliales aórticas humanas (HAEC). La respuesta de GMP cíclico se determinó incubando CU-NP (10⁻⁶ M) durante 10 minutos en ausencia o presencia de un anticuerpo para el dominio de unión al ligando de NPR-B. Los datos *in vitro* (media ± ETM) se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de post-test de Bonferroni. Se definió la significación estadística como P<0,05. Se usó GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) para los análisis estadísticos.

25 En los estudios *in vivo*, PPR (mmHg) se preservó con CU-NP comparado con URO. Cuando se compararon los dos grupos, PPR era significativamente más baja con URO frente a CU-NP a 60 minutos de infusión de péptido (P<0,05, Figura 2). PPR no cambió con CNP.

Tabla 7

Efectos de CU-NP en PPR		
	PPR (media ± ETM; mmHg)	
Tratamiento	Pre-I	60 minutos
CNP	120 ± 4	123 ± 8
URO	127 ± 4	119 ± 4*
CU-NP	135 ± 4	134 ± 4
* = P = 0,05 frente a línea basal		

30 *In vitro*, CU-NP a 10⁻⁵ aumentó GMPc 7 veces frente a CNP (0,76 ± 0,05‡ fmol/μg frente a 0,11 ± 0,05 fmol/μg), con una tendencia a activar GMPc incluso más que URO (0,54 ± 0,10 fmol/μg; P = 0,086). Estos resultados se ilustran en la Figura 3. La acción estimulante sobre GMPc de CU-NP se atenuó mediante el bloqueo NPR-A con A71915 (0,31 ± 0,05† fmol/μg), bloqueo de NPR-B con P19 (0,28 ± 0,04† fmol/μg), o bloqueo de tanto NPR-A como NPR-B con A71915 y P19 (0,23 ± 0,05† fmol/μg), como se muestra en la Figura 4.

35 En HAEC, CU-NP y CNP 10⁻⁶ M aumentaron GMPc a 0,30 ± 0,02 pmol/ml y 0,17 ± 0,04 pmol/ml, respectivamente (P<0,01 para CU-NP frente a CNP; P<0,001 para CU-NP frente a control; P<0,001 para CNP frente a control). En presencia del anticuerpo de NPR-B (1:100), las respuestas de GMPc se atenuaron a 0,19 ± 0,02 pmol/ml para CU-NP y 0,08 ± 0,01 pmol/ml para CNP (P<0,01 para CU-NP frente a sin anticuerpo y P<0,05 para CNP frente a sin

anticuerpo). Los resultados se representan gráficamente en la Figura 5. Estos datos sugieren que NPR-B está involucrado, al menos en parte, en la respuesta de GMPc a CU-NP.

5 Por tanto, CU-NP preserva PPR a dosis potenciadoras renales, en comparación con URO, que reduce PPR. Además, en glomérulos aislados las acciones de CU-NP incluyen co-activación tanto de NPR-A como de NPR-B, lo que representa un activador dual novedoso de receptores NP en el riñón. NPR-B está implicado en parte en la respuesta de GMPc a CU-NP en células endoteliales aórticas humanas. Por tanto, CU-NP representa una nueva tecnología de péptido novedosa que es capaz de la activación dual de NPR-A y NPR-B.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de menos de 44 restos de aminoácidos de longitud, en el que dicho polipéptido comprende, en orden de amino terminal a carboxilo terminal:

- 5 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos,
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones de aminoácidos, sustracciones de aminoácidos o sustituciones de aminoácidos, y
- (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos,

10 en el que dicho polipéptido comprende actividad natriurética.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende, en orden de amino terminal a carboxilo terminal:

- 15 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones de aminoácidos, sustracciones de aminoácidos o sustituciones de aminoácidos, y
- (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos;
- o
- 20 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos,
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2, y
- (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos;
- o
- 25 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos,
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones de aminoácidos, sustracciones de aminoácidos o sustituciones de aminoácidos, y
- (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.

30 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4.

4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido comprende, en orden de amino terminal a carboxilo terminal:

- 35 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una sustitución de aminoácidos conservativa,
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones de aminoácidos, sustracciones de aminoácidos o sustituciones de aminoácidos, y
- (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos;
- o
- 40 (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos,
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos sustituciones conservativas de aminoácidos, y
- (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos;
- 45 o
- (a) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 con no más de una adición de aminoácidos, sustracción de aminoácidos o sustitución de aminoácidos,
- (b) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 con no más de dos adiciones de aminoácidos, sustracciones de aminoácidos o sustituciones de aminoácidos, y
- 50 (c) la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 con no más de una sustitución conservativa de aminoácidos.

5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido carece de la capacidad para inducir hipotensión sistémica.

6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido es un polipéptido sustancialmente puro.

55 7. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 5 10. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que dicha célula huésped es una célula huésped eucariota.
11. Una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
12. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de afecciones cardiovasculares o afecciones renales en un mamífero sin disminuir la presión sanguínea.
- 10 13. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una afección cardiovascular o afección renal, en el que dicho polipéptido se administra en condiciones en las que se reduce la gravedad de una manifestación de dicha afección cardiovascular o afección renal.
- 15 14. El polipéptido para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una afección cardiovascular o afección renal de la reivindicación 13, en el que la administración de dicho polipéptido a dicho mamífero no disminuye la presión sanguínea de dicho mamífero.

Figura 1

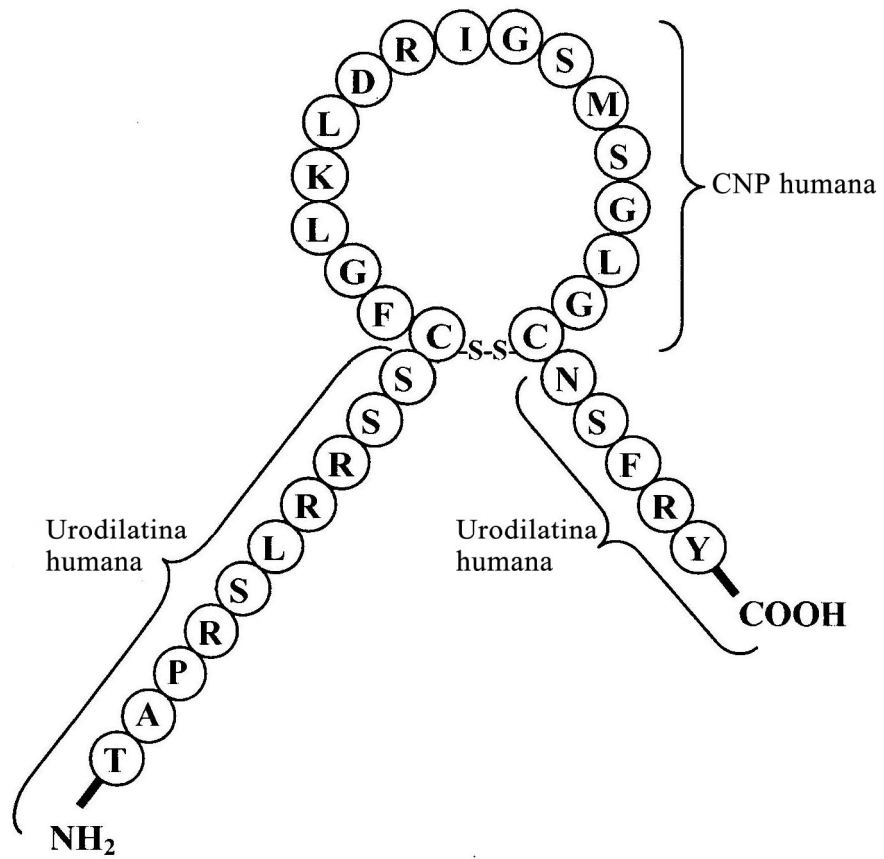


Figura 2

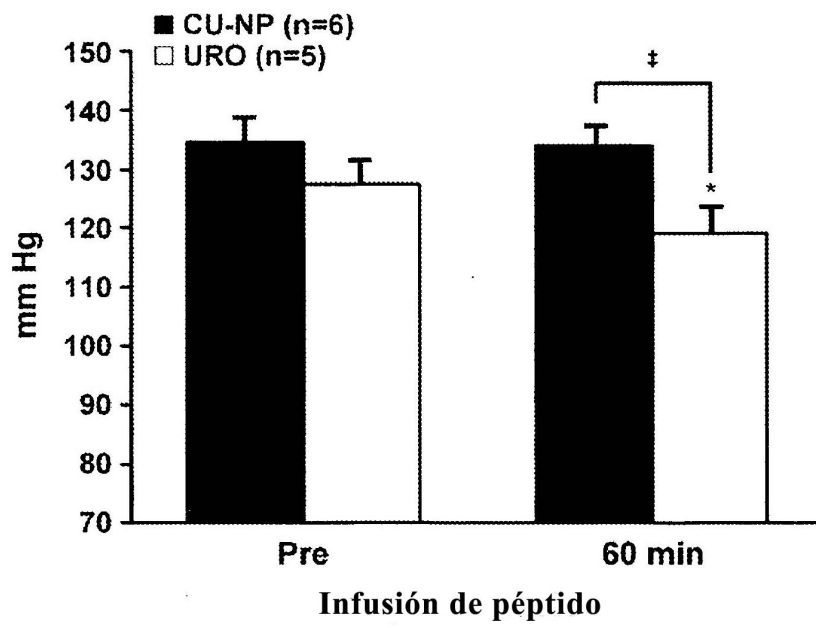


Figura 3

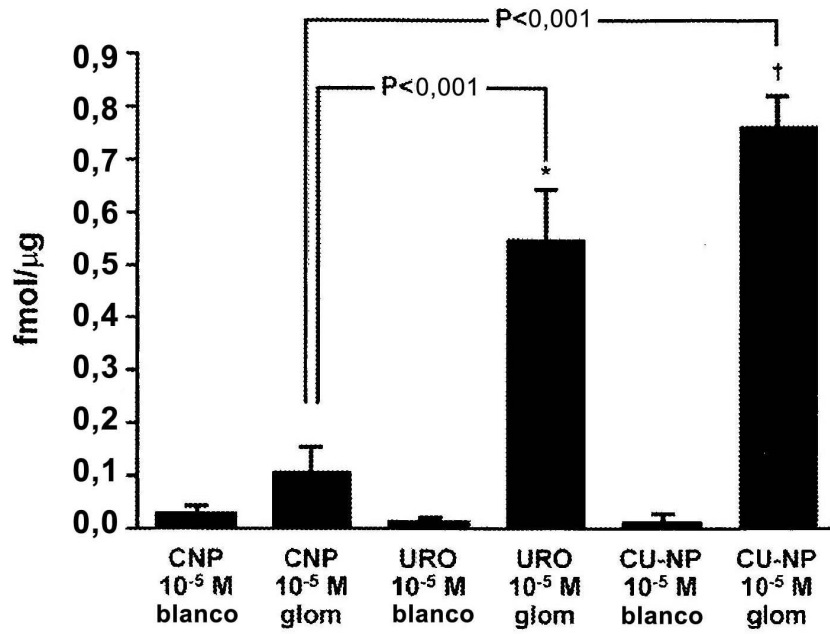


Figura 4

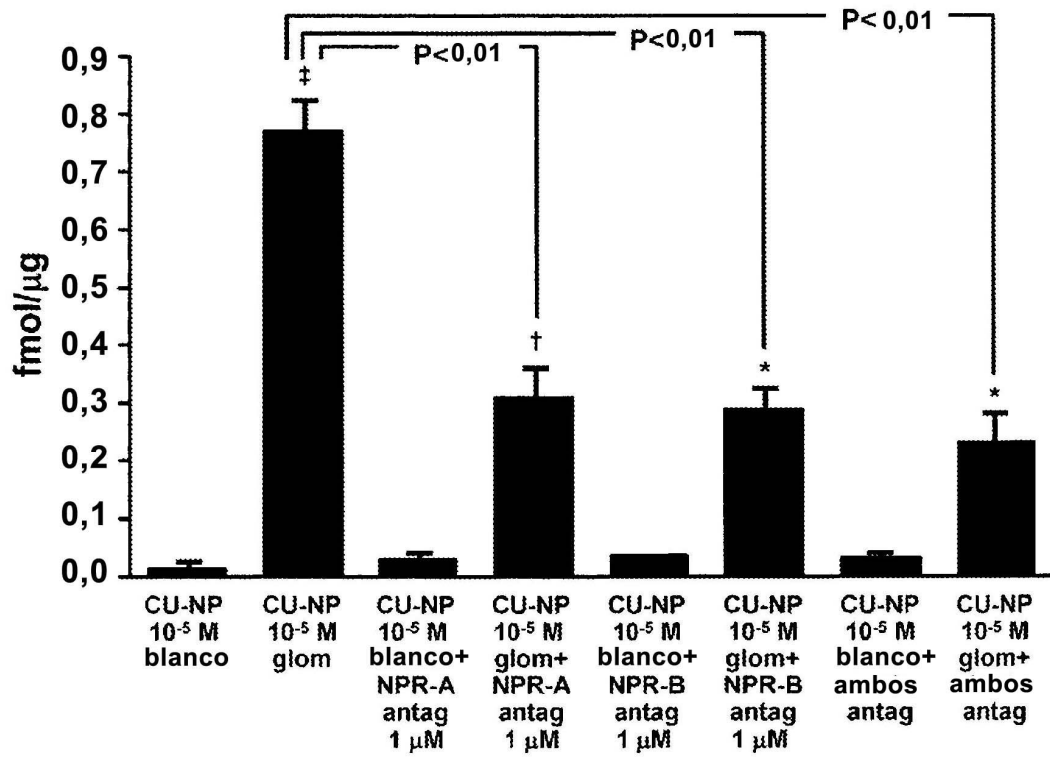


Figura 5

