

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 953**

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 14160347 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2765139**

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:

18.09.2017

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 632 953 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

5 **Antecedentes**1. *Campo técnico*

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

2. *Información de antecedentes*

15 Los polipéptidos natriuréticos son polipéptidos que pueden causar natriuresis (excreciones incrementadas de sodio en la orina). Tales polipéptidos se pueden producir por el tejido de cerebro, corazón, riñón y/o sistema vascular. El documento de patente Europea EP 0 497 368 describe polipéptidos natriuréticos artificiales, incluyendo péptidos natriuréticos quiméricos. EP 0 497 368 también describe agentes para suprimir el crecimiento de las células del músculo liso vascular que contienen esos péptidos como principios activos.

20 **Compendio**

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

40 En general, un aspecto de este documento se ocupa de un polipéptido que tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos, en el que el polipéptido comprende, en un orden desde el terminal amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro.

55 En otro aspecto, este documento se ocupa de un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido con una longitud de al menos 44 restos de aminoácidos, en el que el polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco

sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro.

5 En otro aspecto, este documento se ocupa de un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos, en el que el polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro.

En otro aspecto, este documento se ocupa de una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos, en el que el polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro. La célula hospedadora puede ser una célula hospedadora eucariota.

40 En otro aspecto, este documento se ocupa de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido que tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos, en la que el polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro.

En otro aspecto, este documento se ocupa de un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido para su uso en el incremento de la actividad natriurética en un mamífero sin bajar la presión sanguínea. El polipéptido o la composición farmacéutica se administra al mamífero, en el que el polipéptido tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos, en el que el polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia

mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro.

En otro aspecto, este documento se ocupa de un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una afección cardiovascular o afección renal. El polipéptido o la composición farmacéutica se administra al mamífero, en el que el polipéptido tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos en condiciones en las que se reduce la gravedad de una manifestación de la afección cardiovascular o afección renal, en las que el polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi: (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos. El polipéptido puede presentar actividad natriurética. El polipéptido puede carecer de la capacidad de inducir hipotensión sistémica. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2, y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras. El polipéptido puede ser un polipéptido básicamente puro. La administración del polipéptido al mamífero puede ser de modo que no baje la presión sanguínea del mamífero.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se muestran en los dibujos acompañantes y la descripción de a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un polipéptido CU-NP que tiene una longitud de 32 restos de aminoácidos (SEQ ID NO:4). Los primeros diez restos de aminoácidos de SEQ ID NO:4 corresponden a los restos de aminoácidos 1 a 10 de urodilatina humana y se designan como SEQ ID NO:1. Los restos de aminoácidos 11 a 27 de SEQ ID NO:4 corresponden a los restos de aminoácidos 6 a 22 de CNP maduro humano y se designan como SEQ ID NO:2. Los restos de aminoácidos 28 a 32 de SEQ ID NO:4 corresponden a los restos de aminoácidos 28 a 32 de urodilatina humana y se designan como SEQ ID NO:3.

La Figura 2 es una gráfica que traza la Presión de Perfusión Renal (estimada por $PPR = PAM - PAD$) de perros anestesiados normales tratados con CU-NP o URO como se indica (media \pm EEM; * $P < 0,05$ frente a línea base; † $P < 0,05$ entre grupos).

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

La Figura 4 es una gráfica que traza la respuesta de GMPc a concentraciones equimolares de CU-NP en presencia o ausencia de un antagonista de NPR-A ($1 \mu M$ de A71915), un antagonista de NPR-B ($1 \mu M$ de P19), o ambos antagonistas (A71915 seguido de P19, concentración final de $1 \mu M$ para ambos) valorados en glomérulos caninos aislados ($n = 2$ a 4 , para blancos; $n = 3$ a 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 una gráfica que traza la respuesta de GMPc a CNP o CU-NP en ausencia o presencia de un Anticuerpo de NPR-B (1:100) valorado en células endoteliales de aorta humana.

Descripción detallada

Este documento se refiere a polipéptidos natriuréticos. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales relacionados con polipéptidos natriuréticos y el uso de polipéptidos natriuréticos para tratar afecciones cardiovasculares (por ejemplo, insuficiencia cardíaca descompensada aguda, síndromes coronarios agudos y remodelación ventricular después del infarto de miocardio) y afecciones renales (por ejemplo, disfunción renal perioperativa, disfunción renal secundaria a la insuficiencia cardíaca, y nefropatía diabética).

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

Un polipéptido proporcionado en el presente documento puede tener cualquier secuencia y tiene una longitud de menos de 44 restos de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede incluir la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3. En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede contener una secuencia de aminoácidos que se alinea con (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con tres o menos (por ejemplo, dos o menos, una o cero) adiciones, sustituciones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas, (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con cinco o menos (por ejemplo, cuatro o menos, tres o menos, dos o menos, una o cero) adiciones, deleciones, sustituciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas y (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con tres o menos (por ejemplo, dos o menos, una o cero) adiciones, deleciones, sustituciones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado puede contener la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con la excepción de que el primer resto de treonina o el último resto de serina de SEQ ID NO:1 se elimina o reemplaza con un resto de aminoácido diferente.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras 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. Sustituciones de aminoácidos conservadoras también pueden incluir agrupamientos basados en las cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Después de realizar una sustitución de aminoácido, las actividades del polipéptido que contiene la sustitución de aminoácido se pueden valorar 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 está mostrada en SEQ ID NO:1 o se alinea con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con tres o menos (por ejemplo, dos o menos, una o cero) adiciones, sustituciones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas, (b) una segunda secuencia de aminoácidos que o bien está mostrada en SEQ ID NO:2 o se alinea con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con cinco o menos (por ejemplo, cuatro o menos, tres o menos, dos o menos, una o cero) adiciones, sustituciones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas, y (a) una tercera secuencia de aminoácidos que o bien está mostrada en SEQ ID NO:3 o se alinea con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con tres o menos (por ejemplo, dos o menos, una o cero) adiciones, deleciones, sustituciones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede comprender o consistir de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento tiene una longitud menor de 44 restos de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede tener una longitud de entre 25 y 43 (por ejemplo, entre 26 y 43, entre 27 y 43, entre 28 y 42, entre 29 y 41, entre 30 y 40, entre 31 y 39, o entre 30 y 35) restos de aminoácidos. Se apreciará que un polipéptido con una longitud de 25 o 43 restos de aminoácidos es un polipéptido con una longitud entre 25 y 43 restos de aminoácidos.

En algunos casos, un polipéptido proporcionado en el presente documento puede ser un polipéptido básicamente puro. Tal como se usa en el presente documento, el término "básicamente puro" en referencia a un polipéptido significa que el polipéptido está básicamente libre de otros polipéptidos, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos con los que se asocia de manera natural. Por tanto, un polipéptido básicamente puro es cualquier polipéptido que se separa de su ambiente natural y es al menos 60 por ciento puro o es cualquier polipéptido químicamente sintetizado. Un polipéptido básicamente puro puede ser al menos aproximadamente 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento puro. Generalmente, un polipéptido básicamente puro producirá una única banda importante en un gel de poli(acrilamida) no reductor.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede obtener mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o mediante síntesis química (por ejemplo, usando métodos de

síntesis de polipéptido de fase sólida o un sintetizador de péptido tal como un Sintetizador de Péptido ABI 431A; Applied Biosystems; Foster City, CA). Por ejemplo, se puede usar tecnología recombinante estándar que usa vectores de expresión que codifican un polipéptido proporcionado en el presente documento. A continuación, los polipéptidos resultantes se pueden purificar usando, por ejemplo, técnicas cromatográficas de afinidad y HPLC. El grado de purificación se puede medir por cualquier método apropiado, que incluye, pero no se limita a: cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede diseñar o modificar por ingeniería para contener una secuencia etiqueta que permita que se purifique el polipéptido (por ejemplo, capturado sobre una matriz de afinidad). Por ejemplo, se puede usar una etiqueta tal como c-myc, hemaglutinina, polihistidina, o etiqueta Flag™ (Kodak) para ayudar a la purificación del polipéptido. Tales etiquetas pueden estar insertadas en cualquier lugar dentro del polipéptido incluyendo en cualquiera de los extremos carboxilo o amino. Otras fusiones que se pueden usar incluyen enzimas que ayudan en la detección del polipéptido, tal como fosfatasa alcalina.

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

Un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede usar para tratar enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades de arteria coronaria, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, cáncer, enfermedades metabólicas o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4 se puede administrar a un humano que tiene enfermedad de arteria coronaria en condiciones en las que se reduce la gravedad de los síntomas de la enfermedad de arteria coronaria humana.

Un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede formular como una composición farmacéutica mediante la mezcla con excipientes o vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones se pueden administrar a un sujeto en necesidad de las mismas en una cantidad eficaz para tratar, por ejemplo, afecciones del corazón, hígado, riñón u otras que retienen sodio. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar para administración parenteral, particularmente en la forma de soluciones o suspensiones líquidas en soluciones tampón fisiológicas acuosas; para administración oral, particularmente en la forma de comprimidos o cápsulas; o para administración intranasal, particularmente en la forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Se pueden preparar composiciones para otras vías de administración, si se desea, usando métodos apropiados.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir excipientes comunes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y combinaciones de los mismos. En algunos casos, se pueden usar, polímero láctida biodegradable y biocompatible, copolímero láctida/glicólido, compolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, o combinaciones de los mismos como excipientes para controlar la liberación del polipéptido *in vivo*. Otros sistemas de administración parenteral adecuados que se pueden usar incluyen, sin limitación, partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantable, liposomas y combinaciones de los mismos. Las formulaciones para la 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, desoxicocolato o combinaciones de los mismos, o pueden ser soluciones aceitosas para la administración en la forma de gotas nasales. Si se desea, una composición que contiene un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede formular como gel para aplicarse por vía intranasal. Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir glicocolato para la administración bucal.

Para la administración oral, se pueden preparar comprimidos o cápsulas usando métodos apropiados con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes ligantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir usando métodos apropiados. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular para dar liberación controlada del polipéptido.

Las preparaciones nasales se pueden presentar en una forma líquida o como producto seco. Las suspensiones o soluciones acuosas nebulizadas pueden incluir vehículos o excipientes para ajustar el pH y/o tonicidad.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos

Este 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 es inmediatamente contiguo con ambas secuencias con las cuales es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una 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, una proporcionada de las secuencias de ácidos nucleicos encontradas normalmente flanqueando de manera inmediata esa molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural está eliminada o ausente. Por tanto, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, un ADN recombinante que existe como molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias, así como ADN recombinante que está incorporado en un vector, un plásmido autónomamente replicante, un virus (por ejemplo, retrovirus, adenovirus o herpesvirus), o dentro del ADN genómico de un procarionte o eucariota. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir una molécula de ADN recombinante que es parte de una secuencia de ácidos nucleicos híbrida o de fusión.

El término "aislado" usado en el presente documento en referencia a ácido nucleico también incluye cualquier ácido nucleico de origen no natural puesto que las secuencias de ácidos nucleicos de origen no natural se no encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma de origen natural. Por ejemplo, ácido nucleico de origen no natural tal como un ácido nucleico modificado por ingeniería se considera que es ácido nucleico aislado. El ácido nucleico modificado por ingeniería (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4) se puede realizar usando técnicas comunes de clonación molecular o de síntesis química de ácido nucleicos. El ácido nucleico de origen no natural aislado puede ser independiente de otras secuencias, o se incorpora en un vector, un plásmido autónomamente replicante, un virus (por ejemplo, un retrovirus, adenovirus, o herpesvirus), o el ADN genómico de un procarionte o eucariota. Además, un ácido nucleico de origen no natural puede incluir una molécula de ácido nucleico que es parte de una secuencia de ácidos nucleicos híbrida o de fusión. Un ácido nucleico que existe entre cientos a millones de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, genotecas de ADNc o genotecas genómicas, o porciones de gel que contienen una digestión de restricción de ADN genómico, no se considera un ácido nucleico aislado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a tanto ARN como ADN, incluyendo ARNm, ADNc, ADN genómico, ADN sintético (por ejemplo, químicamente sintetizado) y análogos del ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, y en el que de cadena sencilla, puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal. Análogos de ácidos nucleicos se pueden modificar en el resto de base, resto de azúcar, o el esqueleto de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de un ácido nucleico. Modificaciones en el resto de base incluyen desoxiuridina por desoxitimidina, y 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Modificaciones del resto de azúcar pueden incluir modificación del 2' hidroxilo del azúcar ribosa para formar 2'-O-tmetilo o 2'-O-alilo azúcares. El esqueleto de desoxirribosa fosfato se puede modificar para producir ácidos nucleicos morfolino, en los cuales cada resto de base está unido a un anillo morfolino de seis miembros o ácidos nucleicos peptídicos, en los cuales el esqueleto de desoxifosfato está reemplazado por un esqueleto de pseudopéptido y se retienen 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 se puede reemplazar con, por ejemplo, un fosforoditioato o esqueleto de fosforoditioato, una fosforoamidita, o un esqueleto de alquil fosfortriéster.

Un ácido nucleico proporcionado en el presente documento puede comprender o consistir en una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4. Por ejemplo, tal ácido nucleico puede contener la secuencia de ácidos nucleicos humana para CNP y urodilatina modificada por ingeniería para codificar la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4.

Generalmente, un ácido nucleico aislado proporcionado en el presente documento tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos (por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, o más nucleótidos). Las moléculas de ácidos nucleicos que son menores que la longitud completa pueden ser útiles, por ejemplo, como cebadores o sondas con fines de diagnóstico. Las moléculas de ácidos nucleicos aislados se pueden producir por técnicas estándar, que incluyen, sin limitación, técnicas comunes de clonación molecular y síntesis química de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR). La PCR se refiere a un procedimiento o técnica en la que los ácidos nucleicos diana se amplifican enzimáticamente. Generalmente, se emplea información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá para diseñar cebadores de oligonucleótido que son idénticos en secuencia a cadenas opuestas del patrón a amplificar. La PCR se puede usar para amplificar secuencias específicas del ADN así como ARN, incluyendo secuencias del ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores generalmente tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos, pero la longitud puede oscilar desde 10 nucleótidos a cientos de nucleótidos. Por ejemplo, un cebador puede tener una longitud de 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, o 45 nucleótidos. Se puede purificar un cebador a partir de una digestión de restricción por métodos convencionales, o se puede sintetizar químicamente. Generalmente los cebadores son de cadena sencilla para eficacia máxima en la amplificación, pero un cebador puede ser de doble cadena. Los cebadores de doble cadena primero se desnaturalizan (por ejemplo, tratados con calor) para separar las cadenas antes de su uso en la amplificación. Se describen técnicas generales de PCR, por ejemplo, en "PCR Primer: A Laboratory Manual", ed. por Dieffenbach y Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Cuando se usa ARN como fuente de patrón, se puede usar transcriptasa inversa para

5 sintetizar una cadena de ADN complementario (ADNc). También se pueden usar la reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de cadena, replicación de secuencia autosostenida o amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos para obtener ácidos nucleicos aislados como se describe en otra parte (Lewis, *Genetic Engineering News*, 12(9):1(1992); Guatelli y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1.874-1.878 (1990); y Weiss, *Science*, 254:1.292 (1991)).

10 Los ácidos nucleicos aislados también se pueden sintetizar químicamente, o bien como una molécula de ácido nucleico única (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, se pueden sintetizar uno o más pares de oligonucleótidos largos (por ejemplo, >100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, con cada par que contiene un segmento corto de complementariedad (por ejemplo, aproximadamente 15 nucleótidos) de modo que se forma un dúplex cuando el par de oligonucleótidos se aparean. La ADN polimerasa se usa para prolongar los oligonucleótidos, dando como resultado una molécula de ácido nucleico de doble cadena única por par de oligonucleótidos, la cual, a continuación, se puede ligar en un vector.

15 Los ácidos nucleicos aislados también se pueden obtener por mutagénesis. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 se puede mutar usando técnicas estándares tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida a oligonucleótido y/o mutagénesis dirigida a sitio por PCR. Véase, "Short Protocols in Molecular Biology", capítulo 8, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, Editado por Ausubel y col., 1992. Tales mutaciones incluyen adiciones, deleciones, sustituciones y combinaciones de las mismas.

Vectores y células hospedadoras

25 Este documento también proporciona vectores que contienen un ácido nucleico proporcionado en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, un "vector" es un replicón, tal como plásmido, fago o cósmido, dentro del cual se puede insertar otro segmento de ADN para provocar 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 expresión, y una "secuencia de control de expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN.

30 En un vector de expresión proporcionado en el presente documento, el ácido nucleico puede estar unido de manera operativa a una o más secuencias de control de expresión. Tal como se usa en el presente documento, "unido de manera operativa" significa incorporado en una construcción genética de modo que las secuencias de control de expresión controlan eficazmente la expresión de una secuencia codificante de interés. Ejemplos de secuencias de control de expresión incluyen promotores, potenciadores y regiones terminantes de transcripción. Un promotor es una secuencia de control de expresión compuesta de una región de una molécula de ADN, generalmente dentro de 35 100 nucleótidos en dirección 5' (*upstream*) del punto en el cual comienza la transcripción (generalmente cerca del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II). Para someter a una secuencia codificante al control de un promotor, puede ser necesario colocar el sitio de iniciación de la traducción del marco de lectura de traducción del péptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos en dirección 3' (*downstream*) del promotor. Los potenciadores proporcionan la especificidad de expresión en términos de tiempo, localización y nivel. A diferencia de los promotores, los potenciadores pueden funcionar cuando se localizan en diversas distancias a partir del sitio de transcripción. Un potenciador también puede estar localizado en dirección 3' desde el sitio de iniciación de la 40 transcripción. Una secuencia codificante está "unida de manera operativa" y "bajo el control" de las secuencias de control de expresión en una célula cuando la ARN polimerasa es capaz de transcribir la secuencia codificante en ARNm, el cual, a continuación, se puede traducir en el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

45 Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores víricos derivados de, por ejemplo, bacteriófago, baculovirus, virus del mosaico de tabaco, herpesvirus, citomegalovirus, retrovirus, poxvirus, adenovirus y virus adenoasociados. Numerosos vectores y sistemas de expresión están comercialmente disponibles de tales corporaciones como Novagen (Madison, WI), Clontech Laboratories (Mountain View, CA), Stratagene (La Jolla, CA), y Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

50 Un vector de expresión puede incluir una secuencia etiqueta diseñada para facilitar la posterior manipulación de la secuencia de ácido nucleico expresada (por ejemplo, purificación o localización). Secuencias etiqueta, tales como proteína verde fluorescente (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, o secuencias etiqueta Flag™ (Kodak, New Haven, CT) generalmente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Tales etiquetas se pueden insertar en cualquier lugar dentro del polipéptido incluyendo en cualquiera de los 55 extremos carboxilo o amino.

60 Este documento también proporciona células hospedadoras que contienen una molécula de ácido nucleico y/o vector de ácido nucleico proporcionado en el presente documento. El término "célula hospedadora" se refiere a células procariontas y células eucariotas dentro de las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico o vector. Se puede usar cualquier método para introducir ácido nucleico en una célula. Por ejemplo, se pueden usar precipitación de fosfato de calcio, electroporación, golpe de calor, lipofección, microinyección y transferencia de 65

ácido nucleico mediada por virus para introducir ácido nucleico en células. Además, el ADN desnudo se puede administrar directamente a las células *in vivo* como se describe en otra parte (Documentos de Patente Americana N° 5.580.859 y 5.589.466).

5 *Detección de polipéptidos*

Este documento proporciona métodos y materiales para detectar un polipéptido proporcionado en el presente documento. Tales métodos y materiales se pueden usar para hacer un seguimiento de los niveles del polipéptido en un mamífero que recibe el polipéptido como terapéutico. Un polipéptido proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4) se puede detectar, por ejemplo, usando inmunológicamente uno o más anticuerpos. Tal 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 sobre un antígeno al cual se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Los epítipos generalmente tienen al menos cinco aminoácidos contiguos (un epítipo contiguo), o alternativamente pueden ser un conjunto de aminoácidos no contiguos que definen una estructura particular (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 los sueros de los animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales son poblaciones homogéneas de anticuerpos a un epítipo particular de un antígeno.

Fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad de unión específica para un polipéptido proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4) se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos F(ab')₂ por digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo; se pueden generar fragmentos Fab reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. En algunos casos, se pueden construir genotecas de expresión de Fab. Véase, por ejemplo, Huse y col., *Science*, 246:1.275 (1989). Una vez producidos, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden ensayar para el reconocimiento de un polipéptido proporcionado en el presente documento por métodos de inmunoensayo estándares que incluyen técnicas ELISA, radioinmunoensayos, y transferencia tipo Western. Véase, "Short Protocols in Molecular Biology", Capítulo 11, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, Editado por Ausubel, F.M y col., 1992.

En los ensayos inmunológicos, un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica para un polipéptido proporcionado en el presente documento o un anticuerpo secundario que se une a tal anticuerpo se puede marcar, o bien directamente o indirectamente. Marcadores adecuados incluyen, sin limitación, radionúclidos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H, ³²P, ³³P, o ¹⁴C), residuos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, FITC, PerCP, rodamina, o PE), residuos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot™ suministradas 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 se pueden marcar indirectamente por conjugación con biotina, a continuación, detectar con avidina o estreptavidina marcada con una molécula anteriormente descrita. Los métodos de detección o cuantificación de un marcador dependen de la naturaleza del marcador y son conocidos en la técnica. Ejemplos de detectores incluyen, sin limitación, película de rayos x, contadores de radioactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y densitómetros. Combinaciones de estos enfoques (incluyendo los ensayos "multicapa") familiares para los expertos en la técnica se pueden usar para aumentar la sensibilidad de los ensayos.

Ensayos inmunológicos para detectar un polipéptido proporcionado en el presente documento se pueden realizar en diversos formatos conocidos, incluyendo ensayos tipo sándwich, ensayos de competición (RIA competitiva), o inmunoensayos puente. Véase, por ejemplo, los Documentos de Patente Americana N° 5.296.347; 4.233.402; 4.098.876; y 4.034.074. Métodos de detección de un polipéptido proporcionado en el presente documento generalmente incluyen poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo que se une a un polipéptido proporcionado en el presente documento y detectar la unión del polipéptido al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica para un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede inmovilizar sobre un sustrato sólido por cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica y, a continuación, se expone a la muestra biológica. La unión del polipéptido al anticuerpo sobre el sustrato sólido se puede detectar aprovechando el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie, que da como resultado un cambio en la intensidad de la resonancia de plasmón de superficie tras la unión que se puede detectar cualitativamente o cuantitativamente por un instrumento apropiado, por ejemplo, un aparato de Biacore (Biacore International AB, Rapskatan, Suecia). En algunos casos, el anticuerpo se puede marcar y detectar como se describió anteriormente. Se puede generar una curva estándar que usa cantidades conocidas de un polipéptido proporcionado en el presente documento para ayudar en la cuantificación de los niveles del polipéptido.

En algunas realizaciones, se puede usar un ensayo tipo "sándwich" en el que se inmoviliza un anticuerpo de captura

sobre un sustrato sólido para detectar la presencia, ausencia, o nivel de un polipéptido proporcionado en el presente documento. El sustrato sólido se puede poner en contacto con la muestra biológica de modo que cualquier polipéptido de interés en la muestra pueda unirse al anticuerpo inmovilizado. La presencia, ausencia o nivel del polipéptido unido al anticuerpo se puede determinar usando un anticuerpo de "detección" que tiene afinidad de unión específica para el polipéptido. En algunas realizaciones, se puede usar un anticuerpo de captura que tiene afinidad de unión para CNP o urodilatina así como un polipéptido proporcionado en el presente documento. En esta realización, se puede usar un anticuerpo de detección que tiene afinidad de unión específica para un particular polipéptido proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido CU-NP que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4). Se entiende que en los ensayos tipo "sándwich", el anticuerpo de captura no se debería unir al mismo epítipo (o rango de epítipos en el caso de un anticuerpo policlonal) como el anticuerpo de detección. Por tanto, si se usa un anticuerpo monoclonal como un anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser otro anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que o bien se separa físicamente o solamente se superpone parcialmente con el epítipo al cual se une el anticuerpo monoclonal de captura, o un anticuerpo policlonal que se une a epítipos aparte de o además de al que se une el anticuerpo monoclonal de captura. Si se usa un anticuerpo policlonal como un anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser o bien anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que o bien está separado físicamente de o está superpuesto parcialmente con cualquiera de los epítipos a los cuales se une el anticuerpo policlonal de captura, o un anticuerpo policlonal que se une a epítipos aparte de o además de al cual se une el anticuerpo policlonal de captura. Los ensayos tipo sándwich se pueden realizar como ensayos ELISA tipo sándwich, ensayos de transferencia Western tipo sándwich, o ensayos de detección inmunomagnética de tipo sándwich.

Sustratos sólidos adecuados a los cuales se pueden unir un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo de captura) incluyen, sin limitación, placas de microtitulación, tubos, membranas tales como membranas de nilón 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.

Anticuerpos que tienen afinidad de unión específica para un polipéptido proporcionado en el presente documento se puede producir por métodos estándares. Por ejemplo, un polipéptido se puede producir recombinantemente como se describió anteriormente, se puede purificar a partir de una muestra biológica (por ejemplo, un sistema de expresión heteróloga), o se puede sintetizar químicamente, y usar para inmunizar animales hospedadores, incluyendo conejos, pollos, ratones, cobayos o ratas. Por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4, o fragmentos de la misma que tiene al menos una longitud de seis aminoácidos, se pueden usar para inmunizar a un animal. Diversos adyuvantes que se pueden usar para incrementar la respuesta inmunológica dependen de las especies hospedadoras e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tales como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa y dinitrofenol. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando un polipéptido proporcionado en el presente documento y tecnología de hibridoma estándar. En particular, se pueden obtener anticuerpos monoclonales mediante cualquier técnica que prevea la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares contiguas en cultivo tal como se describe por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), la técnica del hibridoma de linfocito B humano (Kosbor y col., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cole y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2.026 (1983)), y la técnica del hibridoma de EBV (Cole y col., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," *Alan R. Liss, Inc.*, pp. 77-96 (1983)). Tales 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 se pueden cultivar *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):1.645-51 (2001); Chaurand y col., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10(2):91-103 (1999). Espectrómetros de masas útiles para tales aplicaciones están disponibles por Applied Biosystems (Foster City, CA); Bruker Daltronics (Billerica, MA); y Amersham Pharmacia (Sunnyvale, CA).

La invención se describirá más en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Síntesis de CU-NP

Se diseñó un polipéptido con la secuencia mostrada en la Figura 1 y se sintetizó usando un Sintetizador de Péptido ABI 431A. Este polipéptido es denominado un polipéptido CU-NP (Figura 1). El polipéptido CU-NP sintetizado se confirmó por cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas. Su peso molecular es de 3.535,09, 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-MetSer-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEQ ID NO:4) con un puente disulfuro que une los restos de Cys (Figura 1).

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

- Se valoró la función cardiorenal en tres perros anestesiados normales. Las depuraciones se obtuvieron en pre-infusión, durante la infusión intravenosa de 10, 50 y 100 ng de CU-NP/kg/minuto durante 45 minutos en 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. Se valoraron la reabsorción de Na⁺ tubular y TFG mediante la depuración de Li⁺ e inulina, respectivamente. Las neurohormonas se cuantificaron por radioinmunoensayos. Los datos se analizaron por ANOVA con medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett. Los resultados (media ± EEM) se presentan en la Tabla 1.
- Además, la actividad de renina en plasma disminuyó desde 9 ± 2 a 5 ± 1* a 3 ± 1[†] a 3 ± 1[†] ng/ml/hora, y los niveles de angiotensina II disminuyeron desde 18 ± 1 a 10 ± 0,4[†] a 5 ± 0,4[†] a 7 ± 1[†] pg/ml. No se observó cambio significativo en el intervalo 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 urodilatina y CNP puede, de manera dosis dependiente, (1) incrementar la natriuresis, la diuresis y TFG, (2) disminuir las presiones de llenado cardíaco y (3) inhibir la renina y la angiotensina, sin inducir hipotensión significativa.

Tabla 1

Datos cardiovasculares y renales para CU-NP					
	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 ± 13	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 renal de GMPc (pmol/min)	356 ± 36	534 ± 94	1301 ± 60*	4608 ± 370 [†]	1086 ± 27
PECP (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 fraccional proximal de sodio;
RFD_{Na+}=reabsorción fraccional distal de sodio; PECP=presión de enclavamiento capilar pulmonar;
PAD=presión de atrio derecho; PAM=presión arterial media

Ejemplo 3 – Efectos biológicos adicionales de CU-NP

- Se administraron por infusión intravenosamente polipéptido CU-NP o CNP a perros anestesiados normales a 50 ng/kg/minuto durante 75 minutos. Se recogieron muestras de sangre y orina pre-infusión (pre-I), a 30 minutos y 60 minutos de la infusión, y post-infusión (post-I). La depuración de inulina se usó para la valoración de la tasa de filtración glomerular (TFG). La técnica de depuración de litio se usó para la medida de la reabsorción fraccional proximal y distal de Na⁺ (RFP_{Na} y RFD_{Na}, respectivamente). Se realizaron comparaciones en los tres últimos momentos frente a pre-I. La prueba de Student se usó cuando se compararon los resultados para dos momentos, mientras que se usó ANOVA con medidas repetidas para comparar cuatro momentos. Los resultados (media ± EEM) se presentan en las Tablas 2A y 2B.

- El polipéptido CU-NP incrementó significativamente la excreción de GMPc en plasma y GMPc en orina. CU-NP también incrementó el flujo de orina y la excreción urinaria de Na⁺, y condujo a tasa de filtración glomerular aumentada. La presión de enclavamiento capilar pulmonar y la presión de atrio derecho se redujeron sin reducir la hipotensión sistémica. La presión arterial pulmonar también se redujo significativamente, y se mantuvo el gasto cardíaco. La actividad de la renina en plasma, los niveles de angiotensina II y los niveles de aldosterona se suprimieron durante la infusión de CU-NP, pero se siguieron mediante una elevación o "recuperación" después del cese de la infusión de CU-NP. Estos datos sugieren que una forma de actuación a largo plazo de CU-NP se puede usar para la supresión continuada de neurohormonas.

- CU-NP también incrementó significativamente la generación renal de GMPc y la excreción urinaria de K⁺. Tanto RFP_{Na+} como RFD_{Na+} se redujeron significativamente. Estos encuentros estaban asociados con un incremento en el flujo sanguíneo renal ajustado por peso y una reducción en la resistencia vascular renal. También se observó un incremento en hematocritos. Se incrementaron ANP en plasma, BNP en plasma y CNP en plasma, tal como fue la

excreción urinaria de ANP, BNP y CNP.

Estos resultados demuestran que un polipéptido CU-NP puede tener actividades de activación de GMPc, diuréticas, natriuréticas, de aumento de TFG, supresoras del sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), de descarga cardiaca y hemodinámicas renales favorables mientras que carece de la capacidad de bajar la presión sanguínea y causar hipotensión sistémica. Además, estos resultados demuestran que un polipéptido CU-NP puede incrementar niveles de ANP y BNP endógenos. Los efectos tubulares del polipéptido CU-NP sintetizado son consistentes con las acciones al nivel del túbulo proximal y células de conducto colector medular interno.

5

Tabla 2A

Datos renales y cardiovasculares para CU-NP				
	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 ⁺ (Teq/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 renal de GMPc (pmol/min)	469,0 ± 55,4	2168 ± 531 ^{‡§}	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	770 ± 48	3508 ± 574 [¶]	4591 ± 664 [¶]	2052 ± 208
PECP (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
gasto cardiaco (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 ajustado (ml/kg/min)	10,8 ± 0,8	11,64 ± 0,5	12,21 ± 0,4 [†]	11,60 ± 0,5
RVR (x10 ⁻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 [†]
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	154 ± 0,9 [†]	15,1 ± 1,4 [†]	3,2 ± 0,2
Excreción de ANP (pg/ml)	3,2 ± 1,5	21,9 ± 9,5	28,3 ± 13,6	10,4 ± 2,5
Excreción de BNP (pg/ml)	13,9 ± 1,5	18,2 ± 1,5	19,3 ± 1,2	28,3 ± 5,4*
Excreción de CNP (pg/ml)	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 fraccional proximal de sodio;
RFD_{Na+}= reabsorción fraccional distal de sodio; PECP=presión de enclavamiento capilar pulmonar;
PAD=presión de atrio derecho; PAP=presión arterial pulmonar; FSR=flujo sanguíneo renal;
RVR=resistencia vascular renal.

Tabla 2B

Datos renales y cardiovasculares comparativos para CNP				
	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 urinaria de GMPc	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 fraccional proximal de sodio;
 RFD_{Na+}=reabsorción fraccional distal de sodio.

Ejemplo 3- Evaluación de CU-NP en células endoteliales de aorta humana *in vivo*

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

10 Tal 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 no tratamiento). Además, CU-NP incrementó GMPc en plasma *in vivo* frente a pre-I (todos los momentos durante I y post-I, P<0,01, excepto a 45 minutos post-I, P<0,05). CU-NP activó GMPc a un mayor grado en comparación con CNP (P<0,001, 25 minutos I a 30 minutos post-I). Por tanto, CU-NP activó significativamente GMPc en HAEC, y
 15 también estimuló significativamente GMPc a mayor grado que CNP *in vivo*.

Tabla 3

Efectos de CU-NP sobre HAEC	
Concentración de CU-NP	GMPc (media ± EEM, pmol/ml)
10 ⁻¹⁰ M	0,0007 ± 0,0007
10 ⁻⁸ M	0,03 ± 0,02
10 ⁻⁶ M	0,571 ± 0,05†
No tratamiento	0,003 ± 0,002
†=P<0,01 frente a no tratamiento	

20 Ejemplo 4 –acciones estimulantes de GMPc de CU-NP en glomérulos caninos aislados

Se condujeron experimentos para determinar si CU-NP estimula directamente GMPc en glomérulos aislados, y para comparar las acciones activadoras de GMPc de CU-NP con CNP, URO y CNP-C, que consistían en la longitud completa de 22 aminoácidos de CNP con un duplicado del extremo N fusionado en la posición C terminal. Los
 25 glomérulos se aislaron tras la extracción de riñones caninos normales. CU-NP, CNP, URO, y CNP-C (10⁻⁵ M) se incubaron con glomérulos frente a control. Se midió GMP cíclico por RIA, con corrección para niveles de proteína. CU-NP y URO suscitaron mayores respuestas de GMPc que los respectivos controles (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 glomérulos en mayor grado que CNP, pero en similar grado que URO. CNP-C
 30 no activó GMPc. Estos datos sugieren que el GMPc aumentado potencialmente activado puede requerir extremos N y/o C de ligandos para el receptor A de NP.

Tabla 4

Efectos de CU-NP sobre la producción de GMPc en glomérulos aislados	
Tratamiento	GMPc (media ± EEM; fmol/Tg)
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 correspondiente control; ‡=P<0,001 frente a CNP y CNP-C	

35 Ejemplo 5 – Efectos de hemoconcentración de CU-NP

Se estudiaron tres NP humanos (BNP, CNP, URO) y CU-NP para evaluar sus efectos sobre la permeabilidad vascular manifestada por un incremento en hematocrito. Perros anestesiados normales recibieron intravenosamente infusiones 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
 40 EDTA sobre hielo y se centrifugaron. Los datos se informan para la línea base y a 60 minutos de infusión. Además de incrementar el hematocrito (Tabla 5), CU-NP redujo la presión de ECP *in vivo* (línea base 6 ± 0.9 mmHg, 60 minutos 3 ± 0.9 mmHg; P<0,05). Por tanto, los efectos de la hemoconcentración de CU-NP pueden contribuir a sus acciones de descarga cardíaca *in vivo*.

Tabla 5

Efectos de CU-NP sobre hematocrito		
Tratamiento	Hematocrito (media \pm EEM; %)	
	línea base	60 min
BNP	36 \pm 1	40 \pm 2
CNP	36 \pm 1	37 \pm 1
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 Se evaluó CU-NP en insuficiencia cardiaca (IC) canina para determinar si CU-NP activaría el segundo mensajero GMPc y ejercería acciones favorables sin excesiva hipotensión. Se indujo IC suave marcando el ritmo (180 lpm durante 10 días). CU-NP se administró por infusión intravenosamente en 6 perros anestesiados a 75 ng/kg/minuto durante 75 minutos. TFG se midió por la depuración de inulina. Se valoró la reabsorción fraccional de Na⁺ (RFNa) por depuración de Li⁺. Los datos se recogieron a pre-infusión (pre-I), 30 y 60 minutos I, y post-I. La actividad de la renina en plasma, la angiotensina II, la aldosterona y el GMPc también se midieron. Los resultados (media \pm EEM) se presenta en la Tabla 6.

15 CU-NP incrementó GMPc en plasma, la excreción urinaria de GMPc, la generación de GMPc renal neta, el flujo de orina, y la excreción urinaria de Na⁺. Se redujeron RFNa proximal y distal. Se aumentaron el flujo sanguíneo renal y la TFG, con un descenso suave en PAM. Tanto GC como RVS eran iguales. Se redujeron PECP y PAP. Se suprimieron también la actividad de renina en plasma, la angiotensina II y la aldosterona. Por tanto, CU-NP activó GMPc en IC canina y ejerció las acciones de aumento renal, descarga cardiaca y de supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona sin excesiva hipotensión.

20

Tabla 6

Datos renales y cardiovasculares para CU-NP en IC experimental				
	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	1186 \pm 152	5066 \pm 826 [†]	5476 \pm 876 [†]	2394 \pm 197
PECP (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
GC (l/min)	2,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,04
RVS (mmHg·l ⁻¹ ·min)	42 \pm 3	39 \pm 3	39 \pm 3	45 \pm 3

*= $P < 0,05$ frente a pre-I;
†= $P < 0,01$ frente a pre-I; TFG=tasa de filtración glomerular;
RFP_{Na+}=reabsorción fraccional proximal de sodio;
RFD_{Na+}=reabsorción fraccional distal de sodio; PECP=presión de enclavamiento capilar pulmonar;
PAP=presión arterial pulmonar; FSR=flujo sanguíneo renal; PAM=presión arterial media; GC=gasto cardiaco; RVS=resistencia vascular sistémica.

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

25

Se condujeron estudios para determinar las acciones *in vivo* de CNP, CU-NP y URO sobre la presión de perfusión renal (PPR, estimada por PAM-PAD), ya que PPR es una clave determinante de la función renal. Dada la acción de aumento de TFG de CU-NP, también se hicieron estudios *in vitro* para ensayar la hipótesis de que CU-NP (a

diferencia de CNP) también activa NPR-A, un potente receptor de NP de acción renal.

- Se administraron por infusión intravenosamente dosis equimolares de CU-NP, CNP humano, o URO humano a 14,14 pmol/kg/minuto a 17 perros anestesiados normales durante 75 minutos. Se valoró PPR en línea base y a 60 minutos de infusión. Los datos se expresan como media ± EEM. Se midieron las depuraciones desde el 16^o al 45^o minuto y desde el 46^o al 75^o minuto después de la iniciación de la infusión peptídica. Dentro de cada grupo, se usó la prueba t de dos colas para comparar PPR a 60 minutos de infusión peptídica frente a línea base. Se realizaron comparaciones entre grupos por ANOVA bidireccional seguida de prueba posterior Bonferroni.
- Se valoraron las respuestas de GMPc a los 3 péptidos en glomérulos aislados a partir de riñones caninos tras extirpación, en presencia o ausencia de un antagonista de NPR-A, A719153 (1 μM), o un antagonista de NPR-B, P 194 (1 μM), o ambos antagonistas se añadieron secuencialmente (A71915 seguido de P 194, 1 μM de concentración final para ambos). Para confirmar la implicación de NPR-B en la respuesta de GMPc a CU-NP, se condujeron experimentos adicionales usando células endoteliales de aorta humana (HAEC). Se determinó la respuesta de GMP cíclica mediante incubación de CU-NP (10⁻⁶ M) durante 10 minutos en ausencia o presencia de un anticuerpo al dominio de unión a ligando de NPR-B. Los datos *in vitro* (media ± EEM) se analizaron por ANOVA bidireccional seguida de la prueba posterior de Bonferroni. Se definió la significancia estadística como P<0,05. Se usó GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) para los análisis estadísticos.
- En los estudios *in vivo*, se mantuvo PPR (mmHg) con CU-NP en comparación con URO. Cuando los dos grupos se compararon, se bajó PPR significativamente con URO frente a CU-NP a 60 minutos de la infusión peptídica (P<0,05, Figura 2). PPR era igual por CNP.

Tabla 7

Efectos de CU-NP sobre PPR		
	PPR (media ± EEM; 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 base		

- In vitro*, CU-NP 10⁻⁵ M incrementó GMPc 7 veces frente a CNP (0,76 ± 0,05‡ fmol/μg frente a 0,11 ± 0,05 fmol/μg) con una tendencia de 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 de GMPc de CU-NP se atenuó por bloqueo de 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 y NPR-B con A71915 y P19 (0,23 ± 0,05† fmol/μg), como se muestra en la Figura 4.

- En HAEC, CU-NP 10⁻⁶ M y CNP incrementaron GMPc a 0,30 ± 0,02 pmol/ml y 0,17 ± 0,04 pmol/mol, 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 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 no anticuerpo y P<0,05 para CNP frente a no anticuerpo). Los resultados se trazan en la Figura 5. Estos datos sugieren que NPR-B está implicado, al menos en parte, en la respuesta de GMPc a CU-NP.

- Por tanto, CU-NP mantiene PPR a dosis de aumento renal, en contraste con URO, el cual reduce PPR. Además, en glomérulos aislados las acciones de CU-NP implican activación conjunta de tanto NPR-A como NPR-B, representando un novedoso activador de receptor NP dual en el riñón. NPR-B está implicado en parte en la respuesta de GMPc a CU-NP en células endoteliales de aorta humana. Por tanto, CU-NP representa una novedosa nueva tecnología peptídica que es capaz de la activación dual de NPR-A y NPR-B.

45 Otras realizaciones

Se entiende que, aunque la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, la anterior descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research

55 <120> POLIPÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

<130> 116-087T1

ES 2 632 953 T3

<150> EP 08796287.4
 <151> 18-07-2008

5 <150> PCT/US2008/070447
 <151> 18-07-2008

<150> 60/951.117
 <151> 20-07-2007

10 <160> 4

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
 1 5 10

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
 1 5 10 15
Cys

30

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 3

Asn Ser Phe Arg Tyr
 1 5

40

<210> 4
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Péptido sintético

50 <400> 4

Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15
Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido con una longitud menor de 44 restos de aminoácidos, en donde dicho polipéptido comprende, en un orden desde el extremo amino al extremo carboxi:
- 5 (a) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres adiciones o sustituciones de aminoácidos,
 (b) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos, y
 10 (c) la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres adiciones, sustracciones o sustituciones de aminoácidos.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido presenta actividad natriurética.
- 15 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido carece de la capacidad de inducir hipotensión sistémica.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1.
- 20 5. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2.
6. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3.
- 25 7. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 y la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3.
- 30 8. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras.
9. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 con no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras.
- 35 10. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 con no más de tres sustituciones de aminoácidos conservadoras.
11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho polipéptido es un polipéptido sustancialmente puro.
- 40 12. Un ácido nucleico aislado que codifica del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 45 14. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 50 15. La célula hospedadora de la reivindicación 14, en donde dicha célula hospedadora es una célula hospedadora eucariota.
16. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 55 17. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 16 para su uso en el incremento de la actividad natriurética en un mamífero sin bajar la presión sanguínea, en donde dicho polipéptido o dicha composición se administran a dicho mamífero.
- 60 18. El polipéptido de una cualquier de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una afección cardiovascular o una afección renal, en donde dicho polipéptido o dicha composición se administran a dicho mamífero en condiciones en las que la gravedad de una manifestación de dichas afección cardiovascular o afección renal se reduce después de la administración.
- 65 19. El polipéptido o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 18, en donde la administración de

dichos polipéptido o composición farmacéutica a dicho mamífero, no baja la presión sanguínea de dicho mamífero.

20. El polipéptido o la composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde el polipéptido o la composición farmacéutica son para administración parenteral.

5 21. El polipéptido o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 20, en donde el polipéptido o la composición farmacéutica son para administración parenteral mediante una bomba osmótica.

10 22. El polipéptido o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 20, en donde el polipéptido o la composición farmacéutica son para administración parenteral mediante un sistema de infusión implantable.

23. El polipéptido o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 20, en donde el polipéptido o la composición farmacéutica son para administración parenteral mediante administración bucal.

15 24. Un polipéptido que consiste en la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4.

25. El polipéptido de la reivindicación 24, que tiene un puente disulfuro que une los restos de cisteína.

20 26. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el polipéptido de la reivindicación 24 o la reivindicación 25.

27. El polipéptido de la reivindicación 24 o la reivindicación 25 para su uso en el incremento de la actividad natriurética en un mamífero sin bajar la presión sanguínea, en donde dicho polipéptido se administra a dicho mamífero.

25 28. El polipéptido de la reivindicación 24 o la reivindicación 25 para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una afección cardiovascular o una afección renal, en donde dicho polipéptido se administra a dicho mamífero en condiciones en las que la gravedad de una manifestación de dichas afección cardiovascular o afección renal se reduce después de la administración.

30 29. El polipéptido para el uso de la reivindicación 28, en donde la administración de dicho polipéptido a dicho mamífero no baja la presión sanguínea de dicho mamífero.

35 30. El polipéptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 28, en donde el polipéptido es para administración parental.

31. El polipéptido para el uso de la reivindicación 30, en donde el polipéptido es para administración parenteral mediante una bomba osmótica.

40 32. El polipéptido para el uso de la reivindicación 30, en donde el polipéptido es para administración parenteral mediante un sistema de infusión implantable.

33. El polipéptido para el uso de la reivindicación 30, en donde el polipéptido es para administración parenteral mediante administración bucal.

45

Figura 1

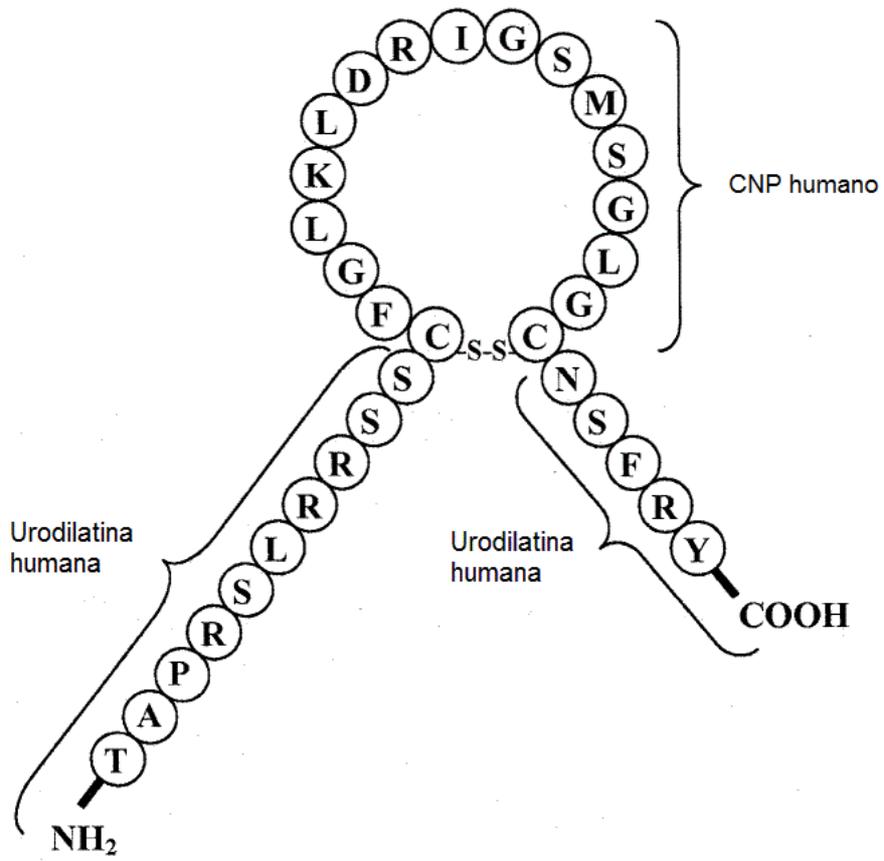


Figura 2

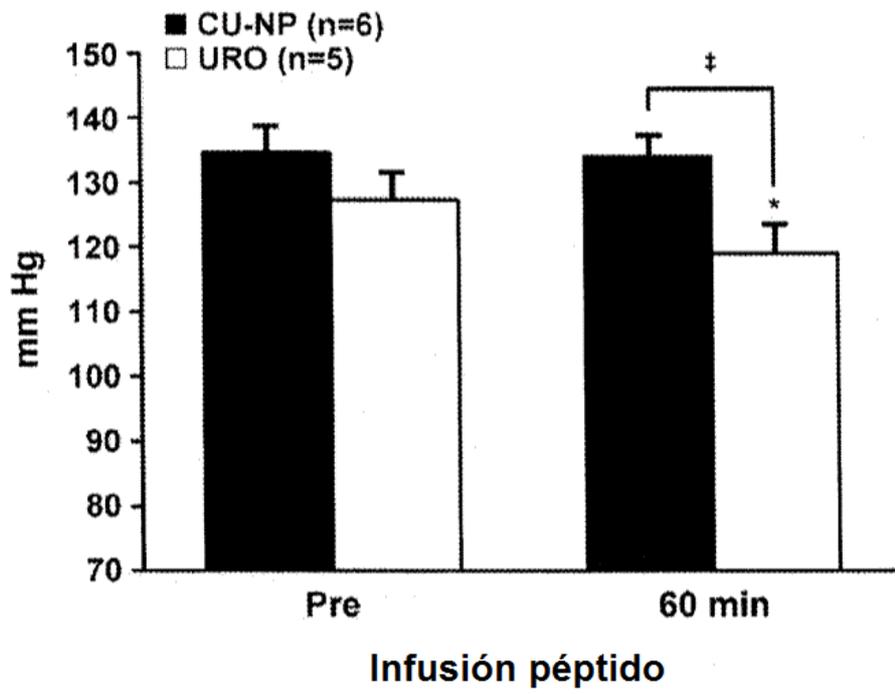


Figura 3

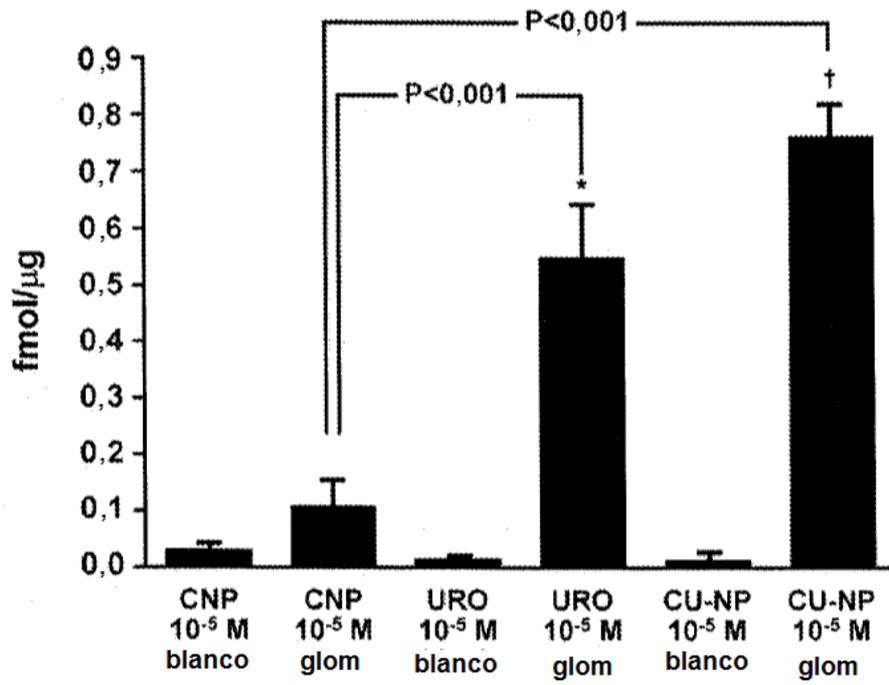


Figura 4

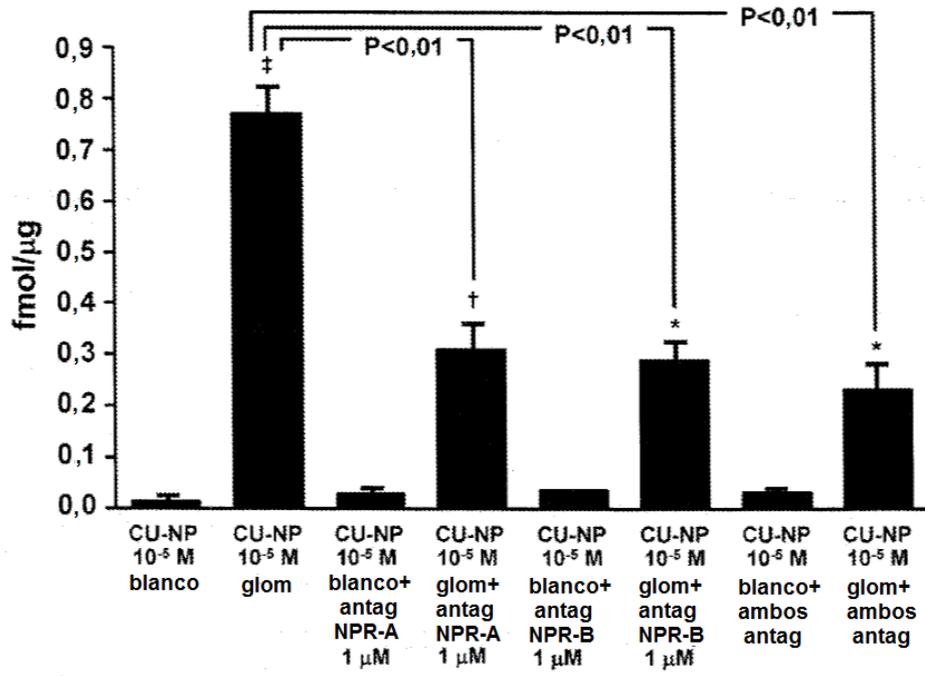


Figura 5

