

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 564**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/58 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2007 PCT/NZ2007/000265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2008 WO08030122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 07834867 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2089722**

54 Título: **Biomarcador para la detección precoz de trastornos cardiacos agudos**

30 Prioridad:

07.09.2006 US 842649 P

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

20.02.2018

73 Titular/es:

**OTAGO INNOVATION LIMITED (100.0%)
Centre for Innovation 87 St David Street P O Box 56
Dunedin, NZ**

72 Inventor/es:

**PEMBERTON, CHRISTOPHER, JOSEPH;
RICHARDS, ARTHUR, MARK;
NICHOLLS, MICHAEL, GARY y
YANDLE, TIMOTHY, GRANT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 655 564 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

Biomarcador para la detección precoz de trastornos cardiacos agudos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al péptido señal de BNP (BNP-SP) y a su uso en el pronóstico, diagnóstico y control de trastornos cardiacos agudos que incluyen síndromes coronarios agudos en un sujeto, que da lugar a la liberación del biomarcador en la circulación. Más concretamente, la invención se refiere a métodos de predicción, diagnóstico o control de un trastorno cardiaco agudo en un sujeto midiendo los niveles de BNP-SP de una muestra tomada poco después de iniciarse o en la presentación clínica con el trastorno.

Antecedentes

15 Los trastornos coronarios agudos, entre los que se incluyen los síndromes coronarios agudos (SCA), engloban un amplio espectro de episodios isquémicos cardiacos que varían desde la angina inestable hasta el infarto agudo de miocardio (IAM). El IAM se presenta como el más grave de estos episodios y, por tanto, requiere un diagnóstico rápido y preciso. Los pacientes que presentan dos o más de las características descritas (antecedentes de molestias torácicas isquémicas, cambios evolutivos en los registros del electrocardiograma (ECG) seriado, y un aumento y descenso de los biomarcadores cardiacos en plasma) se identifican claramente como aquellos que padecen un IAM¹. Sin embargo, una proporción significativa de los pacientes (40 %-50 %) con sospecha de IAM no tienen cambios seriados en el ECG ni síntomas típicos, poniendo así gran énfasis en las concentraciones de los biomarcadores en circulación para un diagnóstico preciso²⁻⁴.

25 El diagnóstico precoz exacto del infarto de miocardio facilita la introducción inmediata del tratamiento de reperfusión, incluyendo la revascularización percutánea o trombolítica eficaz y terapia anticoagulante y antiplaquetaria adyuvante. Dichos tratamientos van siendo progresivamente menos eficaces para reducir la mortalidad y la morbilidad con cada hora de retraso en el diagnóstico y el tratamiento²⁻⁴. Dada la necesidad de una toma de decisiones acelerada en esta situación clínica, existe un interés considerable en la identificación de biomarcadores, en particular, de biomarcadores en circulación, que proporcionen un diagnóstico precoz y específico de los trastornos cardiacos agudos, en particular, del IAM.

35 Se ha propuesto una serie de biomarcadores con este fin, que incluyen la creatina quinasa MB (CK-MB), la troponina T (TnT), la troponina I (TnI) y la mioglobina, pero existen limitaciones en su uso. El tiempo hasta la detección o la elevación anómala de los biomarcadores cardiacos en plasma puede ser de 6 horas (mioglobina, CK-MB) a 12 horas o más (TnT, TnI) con niveles máximos que no suelen darse hasta 24-48 horas después del inicio de la lesión, imponiendo una franja de retardo en el diagnóstico y tratamiento precisos¹⁻⁴. Además, tanto la mioglobina como la CK-MB no son específicas y se pueden secretar de fuentes extracardiacas, en especial durante el traumatismo o la cirugía¹. Otros biomarcadores útiles para este fin son BNP (preproBNP 103-134) y N-BNP (preproBNP (27-134), que también se conoce como NT-proBNP (véase la Figura 1). Ambos péptidos se secretan a la circulación.

45 La medición de las concentraciones en plasma de BNP y N-BNP pronto después del IAM tiene un potente valor de pronóstico^{2,6,7} y la incorporación de las concentraciones en plasma de estos péptidos en los regímenes de tratamiento puede mejorar significativamente los resultados clínicos de los pacientes con insuficiencia cardiaca⁸. Esto es particularmente cierto para el N-BNP, que tiene una semivida 14 veces superior a BNP⁵ y, por lo tanto, proporciona importante información adicional sobre el rendimiento cardiaco a largo plazo después del IAM.

50 Al igual que con los biomarcadores cardiacos anteriores, BNP y N-BNP pueden no alcanzar niveles detectables o anormales durante 6 a 12 horas después de iniciarse la lesión, no produciéndose los niveles máximos hasta 24 a 48 horas después del inicio. Los poderes predictivos/de diagnóstico a largo plazo de BNP y N-BNP carecen, por tanto, de la potencia concomitante de un marcador específico que proporcione un diagnóstico específico precoz de los trastornos cardiacos agudos, tales como una lesión cardiaca aguda en las primeras horas de la presentación clínica. Existe una necesidad de los mismos para dicho marcador precoz.

55 Más recientemente, se ha sugerido que BNP-SP puede ser útil para diagnosticar enfermedades cardiacas (documentos US 2005/0244904, WO 2005/052593). En general, se indica que los niveles de BNP-SP serán más altos en pacientes con insuficiencia cardiaca que en los pacientes normales. No se proporciona información en el curso de tiempo sobre cuándo medir los niveles de BNP-SP. Se afirma que los niveles de BNP-SP son elevados en combinación con N-BNP.

60 Es un objeto de la presente invención hacer algo para cumplir la necesidad de un marcador precoz de trastornos cardiacos agudos y/o al menos proporcionar al público una elección útil.

65

Sumario de la invención

El péptido señal natriurético de tipo B humano (BNP-SP) o preproBNP (1-26) es un péptido de 26 aminoácidos escindido de preproBNP (1-134) SEQ ID NO: 1. BNP-SP se muestra por separado en SEQ ID NO: 21.

5 Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que la concentración en circulación de BNP-SP es la máxima en las primeras horas después de iniciarse o en la presentación clínica con sospecha de síndromes coronarios agudos (SCA). Los máximos son del orden de cuatro a diez veces superiores, comúnmente de cinco a ocho veces superiores que en las poblaciones de control normales en estas primeras horas. Los solicitantes también han
10 mostrado que los niveles máximos medios de BNP-SP permanecieron tres veces por encima de los niveles en los voluntarios sanos normales durante hasta 6 semanas. Los experimentos de los solicitantes se realizaron usando RIA y anticuerpos específicos contra el BNP-SP (17-26).

15 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP para el diagnóstico de un trastorno cardíaco agudo, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19) y en el que el ensayo comprende detectar el fragmento de BNP-SP en una muestra obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio del trastorno o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el trastorno.

20 La invención también proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP para controlar un trastorno cardíaco agudo en un sujeto; controlar una respuesta al tratamiento de un trastorno coronario agudo en un sujeto; predecir, diagnosticar o controlar un episodio de rechazo de trasplante cardíaco en un sujeto; o distinguir entre un trastorno pulmonar y un trastorno cardíaco agudo en un sujeto, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19) y en el que el ensayo comprende detectar el fragmento de BNP-SP en una muestra obtenida
25 de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio del trastorno o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el trastorno.

30 En otro aspecto, la invención también proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP que comprende las etapas de: a) evaluar el nivel de un fragmento de BNP-SP en un sujeto en las dos primeras horas después de iniciarse o de la presentación clínica de un trastorno cardíaco agudo sospechoso, un episodio de rechazo de trasplante cardíaco o un trastorno pulmonar/cardíaco agudo; b) comparar el nivel de dicho fragmento de BNP-SP con un valor de control de fragmento de BNP-SP; y c) determinar si existe una desviación con respecto al control, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19).

35 Los métodos de la invención son métodos *in vitro*.

Preferentemente, la muestra biológica es sangre, saliva, fluido intersticial, plasma, orina, suero o tejido cardíaco.

40 La etapa de medición puede comprender la detección de la unión entre BNP-SP (17-26) y un agente de unión que se une selectivamente a BNP-SP (17-26). El agente de unión es preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Lo más comúnmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, policlonal o humanizado. Se prefieren los anticuerpos monoclonales.

45 En una realización, los niveles de BNP-SP (17-26) se miden usando espectroscopia de masas.

La unión de BNP-SP (17-26) se mide preferentemente usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que están inmovilizados en una fase sólida.

50 Los niveles de BNP-SP (17-26) pueden medirse útilmente con un ensayo seleccionado de RIA, ELISA, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico, espectrometría de masas y ensayo inmunoradiométrico.

55 Por consiguiente, la invención también proporciona el uso de un agente de unión específica a los fragmentos de BNP-SP para la fabricación de un kit de ensayo de fragmentos de BNP-SP para evaluar un trastorno cardíaco agudo en un sujeto, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO:19), comprendiendo el ensayo la detección del fragmento de BNP-SP en una muestra obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio del trastorno o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el trastorno.

60 El método de ensayo de la invención puede comprender además la medición del nivel de uno o más marcadores de fragmentos no de BNP-SP seleccionados del grupo que consiste en troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP y la proteína de unión a ácidos grasos específicos del corazón (H-FABP). Por lo general, los niveles de marcadores de dicho TCA o rechazo de trasplante cardíaco, o TCA/trastorno pulmonar se compararon con los niveles de marcadores de un control en el que una desviación en el nivel medido con respecto al nivel de control del marcador no BNP-SP, junto con un nivel medido de BNP-SP que es superior al nivel del control de BNP-SP sirve para predecir o diagnosticar el TCA, o se puede usar para controlar dicho TCA, rechazo de trasplante
65 cardíaco o TCA/trastorno pulmonar.

Los marcadores para su uso en el contexto del síndrome coronario agudo incluyen troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP, LDH, aspartato aminotransferasa y la proteína de unión a ácidos grasos específicos del corazón (H-FABP).

5 En otro aspecto, la presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une selectivamente a BNP-SP (17-26). El anticuerpo se puede usar para la predicción, el diagnóstico o el control de un trastorno cardíaco agudo (TCA), rechazo de trasplante cardíaco o TCA/trastorno pulmonar en un sujeto, en el que el TCA, el rechazo de trasplante cardíaco o el trastorno de TCA/pulmonar se caracteriza por la aparición de BNP-SP en una muestra biológica obtenida del sujeto en las dos horas siguientes a iniciarse o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el TCA, rechazo de trasplante cardíaco o TCA/trastorno pulmonar.

El agente de unión específico de BNP-SP puede ser cualquier material sólido o no sólido capaz de unirse a BNP-SP (17-26).

15 La herramienta de pronóstico, diagnóstico o control puede estar calibrada para medir los niveles de BNP-SP en el intervalo de 0,1 a 500 pmol/l, preferentemente de 1 a 400 pmol/l, preferentemente de 10 a 350 pmol/l, preferentemente de 20 a 300 pmol/l, preferentemente de 25 a 250 pmol/l, preferentemente de 30 a 180 pmol/l, preferentemente de 35 a 150 pmol/l, y preferentemente de 40 a 120 pmol/l.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardíaco agudo, un episodio de rechazo de trasplante cardíaco o un trastorno pulmonar/cardiaco agudo que comprende un agente de unión a un fragmento de BNP-SP que se une selectivamente al fragmento polipeptídico de BNP-SP de SEQ ID NO: 19 de la invención, en el que el kit es para su uso con un muestra biológica obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio de o la presentación clínica con el síndrome cardíaco agudo, rechazo de trasplante cardíaco o trastorno pulmonar/trastorno cardíaco agudo, incluyendo opcionalmente el kit instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardíaco agudo, un episodio de rechazo de trasplante cardíaco o un trastorno pulmonar/cardiaco agudo.

30 El kit puede calibrarse para medir los niveles de BNP-SP en el intervalo de 0,1 a 500 pmol/l, preferentemente de 1 a 400 pmol/l, preferentemente de 10 a 350 pmol/l, preferentemente de 20 a 300 pmol/l, preferentemente de 25 a 250 pmol/l, preferentemente de 30 a 180 pmol/l, preferentemente de 35 a 150 pmol/l, y preferentemente de 40 a 120 pmol/l.

35 Preferentemente, el kit también incluye instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar el TCA, rechazo de trasplante cardíaco o trastorno TCA/pulmonar en un sujeto en las dos horas siguientes al inicio o a la presentación clínica del nivel de BNP-SP medido en la muestra biológica obtenida en las dos horas siguientes al inicio o de la presentación clínica.

40 Una molécula de ácido nucleico que codifica BNP-SP (17-26) puede tener la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, la invención proporciona el polipéptido BNP-SP (17-26) aislado de SEQ ID NO: 19.

Breve descripción de las figuras

45 La invención se describirá ahora con referencia a las figuras de los dibujos adjuntos en los que:

FIGURAS

50 La Figura 1 es un diagrama esquemático que esboza el procesamiento de preproBNP humano que da lugar a la generación de péptidos señal, N-BNP y BNP libres;

la Figura 2A es un formato de notación de una sola letra de secuencias de preproBNP en siete especies. La región del péptido señal está en negrita y subrayada;

55 la Figura 2B es un alineamiento de múltiples secuencias con Clustal W versión 1.83 JALVIEW de las secuencias del péptido señal prepoBNP. En esta alineamiento, se usaron los parámetros por defecto de Clustal W de la siguiente manera: penalización por apertura de hueco de ADN = 15,0; penalización por extensión de hueco de ADN = 6,66; Matriz de ADN = identidad; penalización por apertura de hueco de proteína = 10,0; penalización por extensión de hueco de proteína = 0,2; Matriz de proteínas = Gonnet; ENDGAP de Proteína/ADN = - 1; GAPDIST de Proteína/DNA = 4. Los aminoácidos se presentaron en formato Pearson (fasta)⁹;

la Figura 3 muestra los resultados de un radioinmunoensayo con extractos de plasma humano (cuadrados vacíos) diluidos en paralelo con la curva patrón de BNP-SP (círculos rellenos);

65 la Figura 4 muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que las concentraciones en plasma de BNP-SP en seres humanos sanos no muestran ninguna correlación con la edad;

la Figura 5 muestra los resultados de un radioinmunoensayo que demuestra que los niveles en plasma de BNP y N-BNP en seres humanos sanos normales (n = 13) muestran una estrecha correlación (panel izquierdo), mientras que las concentraciones de BNP-SP no se correlacionan con N-BNP (panel derecho);

5 la Figura 6 muestra los resultados de un ensayo por radioinmunoensayo de SEHPLC (panel superior) y RPHPLC (panel inferior) de BNP-SP en plasma humano que sugiere que BNP-SP se eluye cerca de BNP-SP sintético (flecha descendente, panel inferior);

10 Figura 7: Resultados del radioinmunoensayo que muestran el panel superior: concentraciones de BNP-SP (hexágono vacío), BNP (círculos rellenos) y N-BNP (cuadrados vacíos) en plasma extraído de pacientes con IAM (n = 10) en los momentos mostrados desde el ingreso hospitalario. En contraste con los niveles de BNP y N-BNP que alcanzaron su punto máximo 24 horas después del ingreso, se observaron niveles más altos de BNP-SP al ingreso, siendo aproximadamente 7 veces superiores como media a los niveles medidos en individuos sanos normales (círculo vacío). Panel inferior: perfiles de concentración de CK-MB, mioglobina y TnT coincidentes en el tiempo en los mismos pacientes en el panel superior;

15 la Figura 8 muestra una tabla de datos de reactividad cruzada del antisuero BNP-SP; y

20 la Figura 9 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones en circulación de BNP-SP en pacientes derivados de una fuente cardíaca.

Definiciones

25 El trastorno cardíaco agudo (TCA) incluye, entre otros: síndromes coronarios agudos: (IAM) con elevación del segmento ST al presentar un ECG, angina inestable e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST; isquemia cardíaca; lesión cardíaca aguda; daño cardíaco agudo resultante de la toxicidad aguda del fármaco, miocardiopatías agudas y rechazo del trasplante cardíaco. Las definiciones descriptivas completas de estos trastornos se encuentran en la referencia 1.

30 El trastorno TCA/pulmonar se refiere a un sujeto con TCA o trastorno pulmonar no diagnosticado o sospechoso.

Los síndromes coronarios agudos (SCA) engloban un amplio espectro de episodios de isquemia cardíaca que incluyen angina inestable, infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST en el electrocardiograma (ECG) presentado e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST en el ECG.

35 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que tiene una estructura específica que interactúa (se une) específicamente con una molécula que comprende el antígeno usado para sintetizar el anticuerpo o con un antígeno estrechamente relacionado con el mismo. Un anticuerpo se une de forma selectiva o específica a un polipéptido BNP-SP de la invención si el anticuerpo se une preferentemente al BNP-SP, por ejemplo, tiene menos del 25 %, preferentemente menos del 10 %, preferentemente menos del 1 % de reactividad cruzada con un polipéptido no BNP-SP. Normalmente, el anticuerpo tendrá una afinidad de unión (valor de la constante de disociación (Kd)), para el antígeno no superior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a aproximadamente 10^{-8} M, preferentemente inferior a aproximadamente 10^{-9} M. La afinidad de unión puede evaluarse usando resonancia de plasma superficial.

45 Muestra biológica, como se usa en el presente documento, significa cualquier muestra derivada de un sujeto que se vaya a explorar. La muestra puede ser cualquier muestra conocida en la técnica, en la que se pueda detectar el BNP-SP. Se incluyen fluidos corporales tales como plasma, sangre, saliva, fluido intersticial, suero, orina, sinovial, cefalorraquídeo, linfático, seminal, amniótico, fluido pericárdico y ascitos, así como tejidos tales como tejidos cardíacos, pero sin limitarse a los mismos. También se incluyen muestras de sujetos sanos normales sin antecedentes clínicos de trastornos cardíacos agudos.

50 El término BNP-SP se refiere al péptido señal de BNP completo de 26 aminoácidos para la secuencia de prepro BNP humana (SEQ ID NO: 1). BNP-SP se muestra por separado en SEQ ID NO: 21. También se engloba dentro del término BNP-SP una variante o un fragmento de BNP-SP.

55 La expresión "que comprende", como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, significa "que consiste, al menos en parte, en", es decir, cuando se interpretan enunciados en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que incluyen "que comprende", es necesario que todas las características prologadas por dicha expresión en cada enunciado estén presentes, pero también pueden estar presentes otras características. Los términos relacionados tales como "comprende" y "comprendido" deben interpretarse de manera similar.

60 El término "polinucleótido/s", como se usa en el presente documento, significa un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido monocatenario o bicatenario de cualquier longitud, e incluye como ejemplos no limitantes secuencias codificantes y no codificantes de un gen, secuencias sentido y antisentido, exones, intrones, ADN

genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNip, miARN, ARNt, ribozimas, polinucleótidos recombinantes, secuencias de ADN o ARN naturales aisladas y purificadas, secuencias de ARN y ADN sintéticas, sondas de ácidos nucleicos, cebadores, fragmentos, construcciones genéticas, vectores y polinucleótidos modificados. La referencia a una molécula de ácido nucleico se debe entender de manera similar.

5 Un "fragmento" de una secuencia de polinucleótido proporcionada en el presente documento es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que es capaz de hibridarse de forma específica con una diana de interés, por ejemplo, una
 10 secuencia que tenga al menos 10 nucleótidos de longitud. Los fragmentos de la invención comprenden 10, preferentemente 15 nucleótidos, preferentemente 16, preferentemente 17, preferentemente 18, preferentemente 19,
 15 preferentemente 21, preferentemente 22, preferentemente 23, preferentemente 24, preferentemente 25, preferentemente 26, preferentemente 27, preferentemente 28, preferentemente 29, preferentemente 30,
 20 preferentemente 31, preferentemente 32, preferentemente 33, preferentemente 34, preferentemente 35, preferentemente 36, preferentemente 37, preferentemente 38, preferentemente 39, preferentemente 40,
 25 preferentemente 41, preferentemente 42, preferentemente 43, preferentemente 44, preferentemente 45, preferentemente 46, preferentemente 47, preferentemente 48, preferentemente 49, preferentemente 50,
 30 preferentemente 51, preferentemente 52, preferentemente 53, preferentemente 54, preferentemente 55, preferentemente 56, preferentemente 57, preferentemente 58, preferentemente 59, preferentemente 60,
 35 preferentemente 61, preferentemente 62, preferentemente 63, preferentemente 64, preferentemente 65, preferentemente 66, preferentemente 67, preferentemente 68, preferentemente 69, preferentemente 70,
 40 preferentemente 71, preferentemente 72, preferentemente 73, preferentemente 74, preferentemente 75, preferentemente 76, preferentemente 77 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 22. Un
 45 fragmento de una secuencia de polinucleótido se puede usar como un cebador, una sonda, incluida en una micromatriz, o se puede usar en los métodos de selección a base de polinucleótidos del presente documento.

25 El término "cebador" se refiere a un polinucleótido corto, que habitualmente tiene un grupo 3'OH libre, que se hibrida con un molde y se usa para cebar la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana.

30 El término "sonda" se refiere a un polinucleótido corto que se usa para detectar una secuencia polinucleotídica, que es complementaria a la sonda, en un ensayo basado en la hibridación. La sonda puede consistir en un "fragmento" de un polinucleótido como se define en el presente documento.

35 El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, engloba cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, pero preferentemente al menos 5 aminoácidos, preferentemente al menos 6, preferentemente al menos 7, preferentemente al menos 8, preferentemente al menos 9, preferentemente al menos 10, preferentemente al menos
 40 11, 12, preferentemente al menos 13, preferentemente al menos 14, preferentemente al menos 15, preferentemente al menos 16, preferentemente al menos 17, preferentemente al menos 18, preferentemente al menos 19, preferentemente al menos 20, preferentemente al menos 21, preferentemente al menos 22, preferentemente al menos 23, preferentemente al menos 24, preferentemente al menos 25 y preferentemente el total de los 26
 45 aminoácidos de la proteína BNP-SP de longitud completa (SEC ID NO: 21), en la que los restos de aminoácidos están enlazados por enlaces peptídicos covalentes. Los polipéptidos útiles en la presente invención pueden ser productos naturales purificados, o pueden producirse parcial o totalmente usando técnicas recombinantes o sintéticas. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro
 50 multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento de polipéptido, una variante polipeptídica o uno de sus derivados.

45 Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la actividad o unión biológica y/o proporciona una estructura tridimensional del polipéptido. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un
 50 fragmento de polipéptido, una variante polipeptídica o uno de sus derivados capaz de realizar la actividad del péptido señal anterior.

55 El término "aislado", como se aplica a las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas desveladas en el presente documento, se usa para referirse a secuencias que se retiran de su entorno celular natural. Se puede obtener una molécula aislada mediante cualquier método o combinación de métodos que incluyen técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas. Las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas se pueden preparar mediante al menos una etapa de purificación.

El término "recombinante" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se retira de secuencias que la rodean en su contexto natural y/o se recombinan con secuencias que no están presentes en su contexto natural.

60 Se produce una secuencia polipeptídica "recombinante" mediante la traducción de una secuencia polinucleotídica "recombinante".

65 Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas diferentes de las secuencias específicamente identificadas, en las que uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos se eliminan, sustituyen o añaden. Las variantes pueden ser variantes alélicas naturales o variantes no naturales. Las variantes pueden ser de la misma especie o de otras especies, y pueden englobar homólogos,

parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polipéptidos útiles en la invención y las actividades biológicas son iguales o similares a las de los polipéptidos o polinucleótidos precursores. El término "variante" con referencia a polinucleótidos y polipéptidos engloba todas las formas de polinucleótidos y polipéptidos definidas en el presente documento.

5 Las secuencias polinucleotídicas variantes presentan preferentemente al menos un 50 %, al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, preferentemente al menos un 71 %, preferentemente al menos un 72 %, preferentemente al menos un 73 %, preferentemente al menos un 74 %, preferentemente al menos un 75 %
10 preferentemente al menos un 76 %, preferentemente al menos un 77 %, preferentemente al menos un 78 %, preferentemente al menos un 79 %, preferentemente al menos un 80 %, preferentemente al menos un 81 %, preferentemente al menos un 82 %, preferentemente al menos un 83 %, preferentemente al menos un 84 %, preferentemente al menos un 85 %, preferentemente al menos un 86 %, preferentemente al menos un 87 %, preferentemente al menos un 88 %, preferentemente al menos un 89 %, preferentemente al menos un 90 %, preferentemente al menos un 91 %, preferentemente al menos un 92 %, preferentemente al menos un 93 %, preferentemente al menos un 94 %, preferentemente al menos un 95 %, preferentemente al menos un 96 %, preferentemente al menos un 97 %, preferentemente al menos un 98 % y preferentemente al menos un 99 % de identidad con una secuencia de la presente invención. La identidad se encuentra en una franja de comparación de al menos 10 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 15 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 20 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 27 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 40 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 50 posiciones de nucleótidos y lo más preferentemente en toda la longitud de un polinucleótido de la invención.

La identidad de secuencia de polinucleótidos puede calcularse a lo largo de toda la superposición entre secuencias de polinucleótidos candidatas y presentes usando programas de alineamiento global de secuencias (por ejemplo, Needleman S. B. y Wunsch C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Se encuentra una implantación completa del algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch en el programa Needle del paquete EMBOSS (Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite", *Trends in Genetics* junio de 2000, vol 16, n.º 6. pág. 276-277), que se puede obtener en <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>. El servidor del Instituto Europeo de Bioinformática también ofrece la posibilidad de realizar alineamientos globales de Needle de EMBOSS entre dos secuencias en línea en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>.

Como alternativa, se puede usar el programa GAP que calcula un alineamiento global óptima de dos secuencias sin penalizar los huecos terminales. GAP se describe en el siguiente artículo: Huang, X. (1994) "On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences" 10, 227-235.

Las variantes de polinucleótidos también engloban aquellas que presentan una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que no se podía esperar razonablemente que ocurrieran aleatoriamente. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias, e informa, para cada región, de un "valor E" que es el número esperado de veces que cabría esperar ver dicha coincidencia por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijo que contenga secuencias aleatorias. El tamaño de esta base de datos está establecido por defecto en el programa bl2seq. Para valores E pequeños, mucho menos de uno, el valor E es aproximadamente la probabilidad de dicha coincidencia aleatoria.

45 Las secuencias de polinucleótidos variantes presentan preferentemente un valor de E inferior a 1×10^{-5} , más preferentemente inferior a 1×10^{-6} , más preferentemente inferior a 1×10^{-9} , más preferentemente inferior a 1×10^{-12} , más preferentemente inferior a 1×10^{-15} , más preferentemente inferior a 1×10^{-18} y lo más preferentemente inferior a 1×10^{-21} en comparación con cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

50 Se prefiere el uso de BLASTN para su uso en la determinación de la identidad de secuencia para variantes de polinucleótidos de acuerdo con la presente invención.

La identidad de las secuencias de polinucleótidos puede examinarse usando los siguientes parámetros en línea de comandos de UNIX:

55 `bl2seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p blastn.`

El parámetro - F F desactiva el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. El programa bl2seq informa de la identidad de secuencia como el número y el porcentaje de nucleótidos idénticos en una línea "Identidades =".

La identidad y similitud de la secuencia de polinucleótidos también se puede determinar de la siguiente manera. Se compara la secuencia polinucleotídica objeto con una secuencia polinucleotídica candidata usando algoritmos de alineamiento de secuencias y herramientas de búsqueda de similitudes de secuencia tales como Genbank, EMBL, Swiss-PROT y otras bases de datos. *Nucleic Acids Res* 29:1-10 y 11-16, 2001 proporciona ejemplos de recursos en línea. BLASTN (del paquete de programas BLAST, versión 2.2. 13 de marzo de 2007 en bl2seq (Tatiana A. *et al.*,

FEMS Microbiol Lett. 174:247-250 (1999), Altschul *et al.*, *Nuc. Acid Res* 25:3389-3402, (1997)), que se encuentra a disposición del público en general en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) o en NCB1 en Bethesda, Maryland, EE.UU. Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq, excepto que el filtrado de partes de baja complejidad debe desactivarse.

5 Como alternativa, los polinucleótidos variantes se hibridan con la secuencia de polinucleótidos especificada, o un complemento de la misma en condiciones rigurosas.

10 La expresión "se hibrida en condiciones rigurosas" y sus equivalentes gramaticales se refieren a la capacidad de una molécula de polinucleótido para hibridarse con una molécula de polinucleótido diana (tal como una molécula de polinucleótido diana inmovilizada en una transferencia de ADN o ARN, tal como una transferencia de Southern o transferencia Northern) en condiciones definidas de temperatura y concentración de sal. La capacidad de hibridación en condiciones de hibridación rigurosas puede determinarse hibridando inicialmente en condiciones menos rigurosas y luego aumentando la rigurosidad hasta la rigurosidad deseada.

15 Con respecto a las moléculas de polinucleótidos superiores a aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación rigurosas típicas no son superiores a una temperatura de 25 a 30 °C (por ejemplo, 10 °C) por debajo de la temperatura de fusión (Tf) del dúplex nativo (véase, en general, Sambrook *et al.*, Eds, 1987, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel *et al.*, 1987, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing, incorporada en el presente documento por referencia). La Tf para moléculas de polinucleótidos mayores de aproximadamente 100 bases puede calcularse mediante la fórmula $T_f = 81,5 + 0,41 \% (G + C - \log (Na^+))$ (Sambrook *et al.*, Eds, 1987, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton and McCarthy, 1962, PNAS 84:1390). Las condiciones rigurosas típicas para un polinucleótido de más de 100 bases de longitud serían las condiciones de hibridación tales como el prelavado en una solución de 6 x SSC, SDS al 0,2 %; hibridación a 65 °C, 6 x SSC, SDS al 0,2 % durante la noche; seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno en 1 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C y dos lavados de 30 minutos cada uno en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C.

30 En una realización, las condiciones rigurosas usan formamida al 50 %, 5 x SSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado que comprende 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

35 Con respecto a las moléculas de polinucleótidos superiores a aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas son de 5 a 10 °C por debajo de la Tf. Como media, la Tf de una molécula de polinucleótido de longitud inferior a 100 pb se reduce en aproximadamente (500/longitud de oligonucleótido) °C.

40 Con respecto a los imitadores de ADN conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Nielsen *et al.*, *Science*. 6 de diciembre de 1991;254 (5037):1497-500). Los valores de Tf son más altos que los de los híbridos de ADN-ADN o ADN-ARN, y pueden calcularse usando la fórmula descrita en Giesen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1 de noviembre de 1998; 26 (21):5004-6. Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas para un híbrido de ADN-PNA que tiene una longitud inferior a 100 bases son de 5 a 10 °C por debajo de la Tf.

45 Los polinucleótidos variantes también engloban polinucleótidos que difieren de las secuencias de la invención, pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que tiene actividad similar a un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Una alteración de secuencia que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido es una "variación silenciosa". A excepción de ATG (metionina) y TGG (triptófano), se pueden cambiar otros codones para el mismo aminoácido mediante técnicas reconocidas en la materia, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones en un organismo hospedador en particular.

50 También se incluyen en la invención las alteraciones de la secuencia de polinucleótidos que dan lugar a sustituciones conservativas de uno o varios aminoácidos en la secuencia polipeptídica codificada sin alterar significativamente su actividad biológica. Un experto en la materia conocerá los métodos para realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, 1990, *Science* 247, 1306).

55 Los polinucleótidos variantes debidos a variaciones silenciosas y a sustituciones conservativas en la secuencia polipeptídica codificada se pueden determinar usando el programa bl2seq a través del algoritmo tblastx como se ha descrito anteriormente.

60 El término "variante" con referencia a polipéptidos también engloba polipéptidos producidos de forma natural, recombinante y sintética. Las secuencias polipeptídicas variantes presentan preferentemente al menos un 50 %, al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, preferentemente al menos un 71 %, preferentemente al menos un 72 %, preferentemente al menos un 73 %, preferentemente al menos un 74 %, preferentemente al menos un 75 % preferentemente al menos un 76 %, preferentemente al menos un 77 %, preferentemente al menos un 78 %, preferentemente al menos un 79 %, preferentemente al menos un 80 %, preferentemente al menos un 81 %, preferentemente al menos un 82 %, preferentemente al menos un 83 %, preferentemente al menos un 84 %, preferentemente al menos un 85 %, preferentemente al menos un 86 %, preferentemente al menos un 87 %, preferentemente al menos un 88 %, preferentemente al menos un 89 %, preferentemente al menos un 90 %, preferentemente al menos un 91 %, preferentemente al menos un 92 %, preferentemente al menos un 93 %, preferentemente al menos un 94 %, preferentemente al menos un 95 %, preferentemente al menos un 96 %, preferentemente al menos un 97 %, preferentemente al menos un 98 %, preferentemente al menos un 99 %.

preferentemente al menos un 82 %, preferentemente al menos un 83 %, preferentemente al menos un 84 %, preferentemente al menos un 85 %, preferentemente al menos un 86 %, preferentemente al menos un 87 %, preferentemente al menos un 88 %, preferentemente al menos un 89 %, preferentemente al menos un 90 %, preferentemente al menos un 91 %, preferentemente al menos un 92 %, preferentemente al menos un 93 %, preferentemente al menos un 94 %, preferentemente al menos un 95 %, preferentemente al menos un 96 %, preferentemente al menos un 97 %, preferentemente al menos un 98 % y preferentemente al menos un 99 % de identidad con una secuencia de la presente invención. La identidad se encuentra en una franja de comparación de al menos 5 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 7 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 10 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 15 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 20 posiciones de aminoácidos y lo más preferentemente, en la longitud total de un polipéptido usado en la invención.

Las variantes de polipéptidos también engloban aquellas que presentan una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que no se podía esperar razonablemente que ocurrieran aleatoriamente.

La identidad y similitud de la secuencia polipeptídica también se puede determinar de la siguiente manera. Se compara la secuencia polipeptídica objeto con una secuencia polipeptídica candidata usando BLASTP (del paquete de programas BLAST, versión 2.2.14 [mayo de 2006]) en bl2seq, que se encuentra disponible para el público en general en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq, a excepción de que se debe desactivar el filtrado de regiones de baja complejidad.

La similitud de las secuencias polipeptídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros en línea de comandos de UNIX:

```
bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp.
```

Las secuencias polipeptídicas variantes presentan preferentemente un valor de E inferior a 1×10^{-5} , más preferentemente inferior a 1×10^{-6} , más preferentemente inferior a 1×10^{-9} , más preferentemente inferior a 1×10^{-12} , más preferentemente inferior a 1×10^{-15} , más preferentemente inferior a 1×10^{-18} y lo más preferentemente inferior a 1×10^{-21} en comparación con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

El parámetro - F F desactiva el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias, en informa, para cada región, de un "valor E" que es el número esperado de veces que cabría esperar ver una coincidencia por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias aleatorias. Para valores E bajos, muy inferiores a uno, esta es aproximadamente la probabilidad de dicha coincidencia aleatoria.

La identidad de secuencia polipeptídica puede calcularse a todo lo largo de la superposición entre secuencias polipeptídicas candidatas y presentes usando programas de alineamiento global de secuencias. Needle de EMBOSS (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) "On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences" 10, 227-235), como los descritos anteriormente, también son programas de alineamiento global de secuencias adecuados para el cálculo de la identidad de las secuencias polipeptídicas.

Se prefiere el uso de BLASTP, como se ha descrito anteriormente, para su uso en la determinación de variantes polipeptídicas de acuerdo con la presente invención.

Las variantes preferidas incluyen péptidos cuya secuencia difiere del BNP-SP humano (1-26) del presente documento mediante una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones o inserciones conservativas de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica del péptido. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen la sustitución de un aminoácido con otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparaginas, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. También se pueden encontrar ejemplos de sustituciones conservativas en las secuencias de BNP-SP de las Figuras 2A y 2B, en las que se muestran las sustituciones en diferentes especies de mamíferos en comparación con la secuencia humana. Se pueden tomar otras sustituciones conservativas de la siguiente Tabla 1.

TABLA 1

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Los restos naturales se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 5 (1) Hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) Hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
 (3) Ácidos: asp, glu;
 (4) Básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 (5) Restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
 10 (6) Aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Véase, por ejemplo, que R está sustituido con H en BNP-SP 25.

15 Otras variantes incluyen péptidos con modificaciones que influyen en la estabilidad del péptido. Dichos análogos pueden contener, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que reemplazan a los enlaces peptídicos) en la secuencia peptídica. También se incluyen análogos que incluyen restos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales, por ejemplo, aminoácidos beta o gamma y análogos cíclicos.

20 Las sustituciones, eliminaciones, adiciones o inserciones pueden realizarse mediante métodos de mutagénesis conocidos en la técnica. Un trabajador cualificado estará al tanto de los métodos de realización de sustituciones fenotípicamente silenciosas de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, 1990, *Science* 247, 1306.¹⁰

25 También se incluyen dentro de los polipéptidos de la invención aquellos que se han modificado durante o después de la síntesis, por ejemplo, mediante biotilación, bencilación, glicosilación, fosforilación, amidación, mediante derivatización usando grupos de bloqueo/protección y similares. Dichas modificaciones pueden aumentar la estabilidad o actividad del polipéptido.

30 La expresión "construcción genética" se refiere a una molécula de polinucleótido, normalmente ADN bicatenario, en la que se puede haber insertado otra molécula de polinucleótido (la molécula de polinucleótido insertada) tal como, pero sin limitación, una molécula de ADNc. Una construcción genética puede contener los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de polinucleótido insertada y, opcionalmente, traducir la transcripción en un polipéptido. La molécula de polinucleótido insertada puede derivarse de la célula hospedador, o puede derivarse de una célula u organismo diferente y/o puede ser un polinucleótido recombinante. Una vez dentro de la célula
 35 hospedador, la construcción genética puede integrarse en el ADN cromosómico del hospedador. La construcción genética puede estar vinculada a un vector.

El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido, normalmente ADN bicatenario, que se usa para transportar la construcción genética a una célula hospedadora. El vector puede replicarse en al menos un sistema hospedador adicional, tal como *E. coli*.

5 La expresión "construcción de expresión" se refiere a una construcción genética que incluye los elementos necesarios que permiten la transcripción de la molécula de polinucleótido insertada y, opcionalmente, la traducción de la transcripción en un polipéptido. Una construcción de expresión normalmente comprende, en una dirección de 5' a 3':

- 10 a) un promotor funcional en la célula hospedadora en la que se transformará la construcción;
 b) el polinucleótido que se va a expresar; y
 c) un terminador funcional en la célula hospedadora en la que se transformará la construcción.

15 La expresión "región codificante" o "marco de lectura abierto" (ORF) se refieren a la cadena sentido de una secuencia de ADN genómico o una secuencia de ADNc que es capaz de producir un producto de transcripción y/o un polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La secuencia codificante se identifica por la presencia de un codón de inicio de la traducción 5' y un codón de terminación de la traducción 3'. Cuando se inserta en una construcción genética, una "secuencia de codificación" puede expresarse cuando está operativamente unida a secuencias promotoras y terminadoras y/u otros elementos reguladores.

20 "enlazado operativamente" significa que la secuencia que se va a expresar se coloca bajo el control de elementos reguladores que incluyen promotores, secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación, elementos reguladores específicos de tejido, elementos reguladores temporales, potenciadores, señales de poliadenilación, represores y terminadores.

25 La expresión "región no codificante" se refiere a secuencias no traducidas que están cadena arriba del sitio de inicio de la traducción y secuencia abajo del sitio de parada de la traducción. Estas secuencias también se denominan, respectivamente, UTR de 5' y UTR de 3'. Estas regiones incluyen los elementos necesarios para el inicio y la terminación de la transcripción y para la regulación de la eficacia de la traducción.

30 Los terminadores son secuencias que terminan la transcripción, y se encuentran en los extremos 3' no traducidos de los genes cadena abajo de la secuencia traducida. Los terminadores son determinantes importantes de la estabilidad del ARNm y, en algunos casos, se ha encontrado que tienen funciones reguladoras espaciales.

35 El término "promotor" se refiere a elementos reguladores en *cis* no transcritos cadena arriba de la región codificante que regulan la transcripción génica. Los promotores comprenden elementos iniciadores *cis* que especifican el sitio de inicio de la transcripción y cajas conservadas tales como la caja TATA, y motivos que están unidos por factores de transcripción.

40 Las expresiones "alterar la expresión de" y "expresión alterada" de un polinucleótido o polipéptido de la invención pretenden englobar la situación en la que el ADN genómico correspondiente a un polinucleótido de la invención se modifica conduciendo así a la expresión alterada de un polinucleótido o polipéptido de la invención. La modificación del ADN genómico puede ser a través de la transformación genética u otros métodos conocidos en la técnica para inducir mutaciones. La "expresión alterada" puede estar relacionada con un aumento o una disminución de la cantidad de ARN mensajero y/o polipéptido producido, y también puede producir una actividad alterada de un polipéptido debido a alteraciones en la secuencia de un polinucleótido y polipéptido producido.

45 "Sujeto", como se usa en el presente documento, es preferentemente un mamífero, e incluye mamíferos humanos y no humanos tales como gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, ciervos, ratones, ratas, primates (incluidos gorilas, monos rhesus y chimpancés), zarigüeyas y otros animales domésticos de granja o de zoológico. Preferentemente, el mamífero es el ser humano.

50 El término "presentación", como se usa en el presente documento, se refiere a la presentación de un sujeto en un centro médico tal como una clínica o un hospital.

55 Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" y "prevención" se refieren a medidas terapéuticas o profilácticas que alivian, mejoran, controlan, previenen, restringen, detienen o revierten la progresión del TCA, o rechazo de trasplante cardíaco o sus efectos, en particular de SCA. El sujeto puede mostrar una reducción observable o medible (estadísticamente significativa) en uno o más de TnI, BNP, N-BNP y otros marcadores clínicos habituales conocidos por los expertos en la materia, que indican una mejora.

60 Se pretende que la referencia a un intervalo de números desvelado en el presente documento (por ejemplo 1 a 10) también incorpore la referencia a todos los números relacionados dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1; 1,1; 2; 3; 3,9; 4; 5; 6; 6,5; 7; 8; 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todos los subintervalos de todos los intervalos expresamente desvelados en el presente documento se desvelan expresamente. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende

65

específicamente, y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerado deben considerarse expresamente indicadas en la presente solicitud de una manera similar.

Descripción detallada de la invención

El péptido natriurético de tipo B humano (BNP) es un miembro de la familia de péptidos natriuréticos cardiacos. Como se muestra en la Figura 1, el preproBNP es una molécula de 134 aminoácidos. El péptido señal BNP-SP (1-26) se escinde para dar preproBNP (27-134). El preproBNP (27-134) se procesa, a su vez, para dar formas bioactivas de preproBNP (103-134) y prepro BNP (27-102). Es probable que BNP-SP sea degradado en fragmentos más pequeños por la peptidasa señal (SPP); normalmente cerca de la región central hidrófoba de la secuencia BNP-SP (1-26).

Se ha pensado durante mucho tiempo que el papel funcional del BNP-SP se limita a controlar el tráfico de BNP en el retículo endoplásmico. Una vez que esto se logra, se ha supuesto que el péptido señal se degrada luego sin ser secretado desde la célula.

Muy recientemente, se ha encontrado que BNP-SP aparece en la circulación (documento WO 2005/052593; documento US 2005/0244904). Basándose en este hallazgo, se ha sugerido BNP-SP para su uso como un biomarcador en circulación para la enfermedad cardiaca. Los presentes solicitantes han hecho un hallazgo adicional y altamente inesperado. En pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM), la concentración en circulación de BNP-SP es máxima en las primeras horas posteriores a la aparición de los síntomas del paciente, de hecho, en el momento de la presentación en el hospital o la clínica. Esto contradice las expectativas de que los niveles de BNP-SP estarían correlacionados con los niveles de N-BNP y, por lo tanto, cabría esperar que alcanzaran su máximo de 12 a 24 horas desde el inicio o la presentación clínica con TCA, rechazo de trasplante cardiaco, o sospecha de TCA o un TCA no diagnosticado o trastorno pulmonar. Los niveles observados en las primeras horas son sorprendentemente muy altos, alcanzando a menudo un máximo de cuatro a diez, comúnmente de cinco a ocho veces más altos que los niveles de una población de control normal.

El nivel de BNP-SP permanece hasta tres veces superior a los niveles de BNP-SP en una población de control durante al menos 6 semanas desde la primera medición en la presentación clínica. Estos hallazgos sugieren que BNP-SP es útil como marcador precoz muy claro del rechazo de trasplante cardiaco, del TCA incluyendo los síndromes coronarios agudos (SCA) tales como el IAM, en particular, el IAM sin elevación del segmento ST, isquemia cardiaca aguda, y se puede usar para distinguir el TCA de los trastornos pulmonares.

Basándose en estos sorprendentes hallazgos, los solicitantes han determinado por primera vez que sería útil detectar BNP-SP en circulación o variantes o fragmentos del mismo, así como secuencias de nucleótidos codificantes de BNP-SP o las variantes y los fragmentos del mismo, en una muestra biológica tomada de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio de o la presentación clínica con el trastorno.

En el presente documento, se describen fragmentos antigénicos o variantes de BNP-SP que tienen una longitud de al menos 5 aminoácidos. Los fragmentos particularmente útiles son el extremo N o el extremo C de BNP-SP. Los ejemplos de péptidos antigénicos específicos son BNP-SP (1-10) (SEQ ID NO:13), BNP-SP (1-17) (SEQ ID NO:15), BNP-SP (12-23) (SEQ ID NO:17) y BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO:19). Las secuencias de nucleótidos correspondientes se dan en las SEQ ID NO: 14, 16, 18 y 20, respectivamente. Estas secuencias son proporcionadas por primera vez por los solicitantes.

Por consiguiente, la solicitud describe una molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento de BNP-SP seleccionado de:

- (a) SEQ ID NO: 14;
- (b) SEQ ID NO: 16;
- (c) SEQ ID NO: 18;
- (d) SEQ ID NO: 20;
- (e) un complemento de una cualquiera de (a) a (d);
- (f) una secuencia de al menos 15 nucleótidos de longitud, capaz de hibridarse con la secuencia de una cualquiera de (a) a (e) en condiciones rigurosas con la condición de que la secuencia no sea ccagtgcacaagctgctggaggcgaga o SEQ ID NO: 22.

La invención también proporciona polipéptidos BNP-SP (17-26) aislados codificados por SEQ ID NO: 20.

Un polipéptido específico de la invención es el polipéptido de SEQ ID NO: 19, como se expone en la lista de secuencias anexa. También se desvelan variantes funcionalmente equivalentes y fragmentos de este polipéptido como se definen en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento están preferentemente aisladas. Se pueden aislar de una muestra biológica usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia. A modo

de ejemplo, dichos polinucleótidos se pueden aislar mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en Mullis *et al.*, Eds. 1994 "The Polymerase Chain Reaction", Birkhauser.

5 Las moléculas de ácido nucleico pueden amplificarse usando cebadores, como se definen en el presente documento, derivados de las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento.

10 Otros métodos adicionales para aislar polinucleótidos incluyen el uso de todo o partes del polinucleótido de la invención, en particular, un polinucleótido codificante de la secuencia expuesta en la SEC ID NO: 19 como sondas de hibridación. Se puede usar la técnica de hibridación de sondas polinucleotídicas marcadas con polinucleótidos inmovilizados sobre soportes sólidos tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nailon, para rastrear genotecas de ADNc o genómicas. De manera similar, se pueden acoplar sondas a perlas e hibridarse a la secuencia diana. El aislamiento se puede efectuar usando protocolos conocidos en la técnica tales como la separación magnética. Las condiciones de hibridación y lavado rigurosas ilustrativas son como las que se han dado anteriormente.

15 Se pueden producir fragmentos de polinucleótidos mediante técnicas bien conocidas en la materia tales como digestión con endonucleasas de restricción y síntesis de oligonucleótidos.

20 Se puede usar una secuencia de polinucleótidos parcial como sonda en métodos bien conocidos en la técnica para identificar la secuencia de polinucleótidos de longitud completa correspondiente en una muestra. Dichos métodos incluyen métodos basados en PCR, RACE 5' (*Methods Enzymol.* 218: 340-56 (1993); Sambrook *et al.*, *Supra*) y el método basado en la hibridación, métodos basados en ordenador/bases de datos. Se pueden usar marcadores detectables tales como marcadores radioisótopos, fluorescentes, quimioluminiscentes y bioluminiscentes para facilitar la detección. La PCR inversa también permite la adquisición de secuencias desconocidas que flanquean las secuencias de polinucleótidos desveladas en el presente documento, comenzando con cebadores basados en una región conocida (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res* 16, 8186, (1998)). El método usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se circulariza luego por ligadura intramolecular y se usa como molde de PCR. Los cebadores divergentes están diseñados a partir de la región conocida. Para ensamblar físicamente clones de longitud completa, se pueden utilizar enfoques convencionales de biología molecular (Sambrook *et al.*, *Supra*).

35 Las variantes (incluyendo ortólogos) se pueden identificar mediante los métodos descritos. Los polinucleótidos variantes pueden identificarse usando métodos basados en PCR (Mullis *et al.*, Eds. 1994 "The Polymerase Chain Reaction", Birkhauser). Por lo general, la secuencia de polinucleótidos de un cebador, útil para amplificar variantes de moléculas de polinucleótidos mediante PCR, se puede basar en una secuencia codificante de una región conservada de la secuencia de aminoácidos correspondiente.

40 Otros métodos adicionales de identificación de polinucleótidos variantes incluyen el uso de todos, o partes de, los polinucleótidos especificados como sondas de hibridación para explorar genotecas de ADNc o genómicas como se ha descrito anteriormente. Por lo general, se pueden usar sondas basadas en una secuencia codificante de una región conservada de la secuencia de aminoácidos correspondiente. Las condiciones de hibridación también pueden ser menos rigurosas que las usadas en la exploración de secuencias idénticas a la sonda.

45 Las secuencias variantes, que incluyen variantes de polinucleótidos y polipéptidos, también se pueden identificar mediante los métodos informáticos descritos anteriormente.

50 Se pueden llevar a cabo múltiples alineamientos de secuencias de un grupo de secuencias relacionadas con CLUSTALW (Thompson, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680 (1994), <http://www-igbmc.ustrasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) o TCOFFEE (Cedric Notredame *et al.*, *J. Mol. Biol.* 302: 205-217 (2000)) o PILEUP, que usa alineamientos progresivos por parejas. (Feng *et al.*, *J. Mol. Evol.* 25, 351 (1987)).

55 Se dispone de aplicaciones de software de reconocimiento de patrones para encontrar motivos o secuencias de distintivos. Por ejemplo, MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) encuentra motivos y secuencias de distintivos en un conjunto de secuencias, y MAST (Motif Alignment and Search Tool) usa estos motivos para identificar motivos similares o iguales en secuencias de consulta. Los resultados de MAST se proporcionan como una serie de alineamientos con datos estadísticos apropiados y una visión general de los motivos encontrados. MEME y MAST se desarrollaron en la Universidad de California, San Diego.

60 PROSITE (Bairoch *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22, 3583 (1994); Hofmann *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27, 215 (1999)) es un método de identificación de las funciones de proteínas no caracterizadas traducidas a partir de secuencias genómicas o de ADNc. La base de datos PROSITE (www.expasy.org/prosite) contiene patrones y perfiles biológicamente significativos, y está diseñada para poderse usar con herramientas computacionales apropiadas para asignar una nueva secuencia a una familia conocida de proteínas o para determinar qué dominio/s conocido/s está/n presentes en la secuencia (Falquet *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 30, 235 (2002)). Prosearch es una herramienta que puede buscar bases de datos SWISS-PROT y EMBL con un patrón de secuencias o distintivos determinado.

65

Las proteínas se pueden clasificar de acuerdo con su relación de secuencia con otras proteínas del mismo genoma (parálogos) o de un genoma diferente (ortólogos). Los genes ortólogos son genes que evolucionaron por especiación a partir de un gen ancestral común y normalmente conservan la misma función a medida que evolucionan. Los genes parálogos son genes que se duplican dentro de un genoma, y los genes pueden adquirir nuevas especificidades o funciones modificadas que pueden estar relacionadas con la original. En Tatusov *et al.*, *Science* 278, 631-637, 1997), se revisan métodos de análisis filogenético.

Además de los métodos informáticos/de base de datos descritos anteriormente, las variantes polipeptídicas pueden identificarse mediante métodos físicos, por ejemplo, explorando genotecas de expresión usando anticuerpos producidos contra polipéptidos de la invención (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987) mediante técnicas de ADN recombinante también descritas por Sambrook *et al.*, o identificando polipéptidos de fuentes naturales con la ayuda de dichos anticuerpos.

Los polipéptidos, que incluyen variantes de polipéptidos, se pueden preparar usando métodos de síntesis de péptidos bien conocidos en la técnica, tales como síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (por ejemplo, Merrifield, 1963, en *J. Am Chem. Soc.* 85, 2149; Stewart *et al.*, 1969, en "Solid-Phase Peptide Synthesis", WH Freeman Co, San Francisco California; Matteucci *et al. J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191, 1981); o síntesis automática, por ejemplo, usando un sintetizador de Applied Biosystems (California, EE. UU.). Las formas mutadas de los polipéptidos también se pueden producir usando métodos sintéticos tales como mutagénesis específica del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos según lo descrito por Adelman *et al.*, "DNA" 2, 183 (1983).

Preferentemente, los polipéptidos y variantes de polipéptidos de la presente invención están aislados. Se pueden aislar o purificar a partir de fuentes naturales usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en la materia (por ejemplo, Deutscher, 1990, Ed, *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Guide to Protein Purification). Las tecnologías incluyen HPLC, cromatografía de intercambio iónico e inmunocromatografía, pero no se limitan a las mismas.

Como alternativa, los polipéptidos y las variantes de polipéptidos pueden expresarse de forma recombinante en células huésped adecuadas y separarse de las células como se trata a continuación. Entre otros usos, los polipéptidos y las variantes tienen utilidad para generar anticuerpos y generar ligandos.

Las construcciones genéticas descritas en el presente documento pueden comprender una o más de las secuencias de polinucleótidos y/o de los polinucleótidos desvelados que codifican los polipéptidos desvelados, de la invención y pueden ser útiles para transformar, por ejemplo, organismos bacterianos, fúngicos, de insectos, mamíferos o vegetales. Las construcciones genéticas de la invención pretenden incluir construcciones de expresión como se define en el presente documento. Se incluyen vectores (tales como pBR322, pUC18, pU19, Mp18, Mp19, ColE1, PCR1 y pKRC), fagos (tales como lambda gt10) y plásmidos M13 (tales como pBR322, pACYC184, pT127, RP4, p1J101, SV40 y BPV), cósmidos, YACS, vectores lanzadera BAC tales como pSA3, transposones PAT28 (tal como los descritos en el documento US 5.792.294) y similares.

Las construcciones pueden incluir convenientemente un gen de selección o marcador seleccionable. Por lo general, se usa un marcador de resistencia a antibióticos tal como ampicilina, metotrexato o tetraciclina.

Los promotores útiles en las construcciones incluyen los sistemas de promotores β -lactamasa, fosfatasa alcalina, triptófano y tac que son todos bien conocidos en la técnica. Los promotores de levadura incluyen 3-fosfoglicerato quinasa, enolasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, glucoquinasa y gliceraldehidato-3-fosfonato deshidrogenasa, pero no se limitan a los mismos.

Los potenciadores también pueden emplearse para actuar sobre los promotores con el fin de mejorar la transcripción. Los potenciadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen potenciador de SV40, potenciador del promotor precoz de citomegalovirus, globina, albúmina, insulina y similares.

Los métodos de producción y uso de construcciones y vectores genéticos son bien conocidos en la técnica y se describen, en general, en Sambrook *et al.*, (*supra*), y Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing, 1987. También se conocen métodos de transformación de células huésped seleccionadas con los vectores, por ejemplo, el tratamiento con cloruro de calcio descrito por Cohen, SN; *PNAS* 69, 2110, 1972.

Las células huésped que comprenden las construcciones genéticas y los vectores descritos pueden derivar de fuentes procariotas o eucariotas, por ejemplo, levaduras, bacterias, hongos, insectos (por ejemplo, baculovirus), animales, mamíferos u organismos vegetales. En una realización, las células huésped son células huésped aisladas. Los procariotas más comúnmente empleados como células huésped son cepas de *E. coli*. Otros huéspedes procariotas incluyen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Salmonella* y *Mycobacteria*, pero no se limitan a los mismos.

Las células eucariotas para la expresión de proteína recombinante incluyen, pero sin limitación, células Vero, HeLa, CHO (células de ovario de hámster chino), células 293, células BHK, células MDCK y células COS, así como estirpes celulares de cáncer de próstata tales como PrEC, LNCaP, Du 145 y RWPE-2. Las celdas están disponibles

en la ATCC, Virginia, EE. UU.

Los promotores procariotas compatibles con la expresión de moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen promotores constitutivos de la técnica conocidos (tales como el promotor int del bacteriófago lamda y el promotor bla de la secuencia del gen de beta-lactamasa de pBR322) y promotores regulables (tales como lacZ, recA y gal). También se puede requerir un sitio de unión al ribosoma cadena arriba de la secuencia codificante para la expresión.

Las células huésped que comprenden construcciones genéticas, tales como construcciones de expresión, son útiles en métodos para la producción recombinante de polipéptidos. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Supra*). Los métodos implican comúnmente el cultivo de células huésped en un medio apropiado en condiciones adecuadas para o que conducen a la expresión y selección de un polipéptido de la invención. Las células con un marcador seleccionable pueden cultivarse además en un medio apropiado para la selección de células huésped que expresan un polipéptido de la invención. Las células huésped transformadas que expresan un polipéptido de la invención se seleccionan y cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido. El polipéptido recombinante expresado puede separarse y purificarse del medio de cultivo usando métodos bien conocidos en la técnica que incluyen precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis y similares (por ejemplo, Deutscher, Ed, 1990, *Methods in Enzymology*, Vol 182, Guide to Protein Purification). Las células huésped también pueden ser útiles en métodos para la producción de un producto generado por un polipéptido expresado de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP (17-26) para diagnosticar un trastorno cardiaco agudo (TCA) en un sujeto, comprendiendo el método: medir el nivel de BNP-SP en una muestra biológica obtenida del sujeto en las dos horas siguientes a iniciarse el TCA, o en las dos horas siguientes a la presentación con el TCA; y comparar el nivel de dicho BNP-SP con el nivel de BNP-SP de un control en el que un nivel medido de BNP-SP superior al nivel de control es indicativo del TCA.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP (17-26) para controlar una respuesta al tratamiento de un trastorno cardiaco agudo (TCA) en un sujeto, comprendiendo el método: medir el nivel de BNP-SP en una muestra biológica obtenida del sujeto en las dos horas siguientes a iniciarse el TCA o en las dos horas siguientes a la presentación con el TCA; y comparar el nivel de dicho BNP-SP con el nivel de BNP-SP de un control en el que un cambio en el nivel medido de BNP-SP con respecto al nivel del control es indicativo de una respuesta al tratamiento.

Se sabe en la técnica que los precursores de BNP tales como proBNP27-102 proBNP27-47, se pueden usar para predecir o diagnosticar un episodio de rechazo de trasplante cardiaco y para distinguir entre causas pulmonares y causas cardiovasculares de la disnea (dificultad respiratoria). Véase el documento US 2005/0244902. Por consiguiente, es igualmente predecible que BNP-SP puede usarse como un marcador precoz del rechazo de trasplante cardiaco basado en análisis de tejido cardiaco, y para distinguir los trastornos pulmonares de los trastornos cardiacos agudos.

Por consiguiente, la invención también proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP (17-26) para predecir, diagnosticar o controlar un episodio de rechazo de trasplante cardiaco en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de BNP-SP en una muestra biológica obtenida del sujeto en las dos horas siguientes al trasplante cardiaco, y comparar el nivel de dicho BNP-SP con el nivel de BNP-SP de un control, en el que un nivel medido de BNP-SP superior al nivel del control es indicativo de una respuesta al tratamiento.

La invención también proporciona un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP (17-26) para distinguir entre un trastorno pulmonar y un trastorno cardiaco agudo (TCA) en un sujeto, comprendiendo el método medir el nivel de BNP-SP en una muestra biológica obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes a la presentación con el trastorno; y comparar el nivel de dicho BNP-SP con el nivel de BNP-SP de un control en el que un nivel medido de BNP-SP superior al nivel de control es indicativo del TCA.

El método de ensayo de fragmentos de BNP-SP (17-26) se puede usar para la predicción, el diagnóstico o el control de un trastorno cardiaco agudo (TCA), rechazo de trasplante cardiaco o TCA/trastorno pulmonar en un sujeto, comprendiendo el método la medición del nivel de BNP-SP en una muestra biológica obtenida del sujeto en las dos primeras horas de iniciarse o de la presentación clínica con el TCA, rechazo de trasplante o TCA/trastorno pulmonar.

Preferentemente, el nivel medido de BNP-SP se compara con el nivel de BNP-SP de un control, en el que un nivel medido de BNP-SP superior al nivel del control es indicativo de TCA o rechazo de trasplante.

El lector experto apreciará que, con fines de realizar una evaluación, el marcador requiere la correlación con un valor de referencia o un valor de control.

Como se usa en el presente documento, un control puede ser un individuo o grupo del que se toman muestras de BNP-SP y se determina un nivel de BNP-SP medio. Por lo general, el individuo o grupo comprenderá individuos sanos normales o un grupo de individuos que se sepa que no padecen TCA, rechazo de trasplante cardiaco o

trastorno de TCA/pulmonar. Los niveles de BNP-SP de la mayoría de los individuos están entre 0-15 pmol/l, y el nivel de control medio es de aproximadamente 10 pmol/l. Como alternativa, el nivel de control se puede evaluar basándose en una pluralidad de lecturas de individuos o grupos ensayados previamente. Otro ejemplo de un nivel de control es una medida radiométrica entre los niveles de BNP-SP y BNP en el tejido cardiaco. El nivel de BNP-SP del sujeto se puede comparar con el nivel de BNP-SP medio para esa población de control. El nivel de BNP-SP en la población de control cardiaco puede ser del orden de 1,5 a 3, comúnmente de 2 a 3 o de 2,5 a 3 veces superior a los niveles de BNP-SP de la población de control normal. Como alternativa, el control puede ser una o más lecturas o la media de dichas lecturas tomadas del mismo sujeto en un momento anterior. La determinación de controles apropiados y niveles de control para determinados métodos es bien conocida en la técnica.

La expresión "en las dos horas siguientes al inicio o la presentación clínica" incluye desde 1 minuto hasta e incluyendo 120 minutos desde el inicio de, o la presentación en el centro médico con TCA, rechazo de trasplante cardiaco o un trastorno TCA/pulmonar no diagnosticado o sospechado. Preferentemente las mediciones se realizan en la hora (desde 1 minuto hasta 60 minutos ambos inclusive) siguiente al inicio o a la presentación, preferentemente en los de 5 a 45 minutos, preferentemente de 15 a 40 minutos, preferentemente de 20 a 35 minutos, y de manera óptima en los 25 a 30 minutos siguientes al inicio o a la presentación.

Un nivel "superior" al de un control, o un cambio o una desviación de un control es preferentemente estadísticamente significativo. Se puede considerar que existe un nivel superior, una desviación o un cambio con respecto a un nivel de control o nivel de control medio si el nivel difiere del nivel de control en un 5 % o más, en un 10 % o más, preferentemente en un 20 % o más, más preferentemente en un 50 % o más en comparación con el nivel de control. Como alternativa, se puede calcular algo estadísticamente significativo como $p \leq 0,05$. En una alternativa adicional, los niveles superiores, la desviación y los cambios se pueden determinar mediante el recurso a los límites de referencia del ensayo o a los intervalos de referencia. Estos se pueden calcular a partir de una evaluación intuitiva o métodos no paramétricos. En general, estos métodos calculan los fractiles 0,025 y 0,975 fractiles como $0,025 \times (n + 1)$ y $0,975 (n + 1)$. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica^{23,24}. La presencia de un marcador ausente en un control también se contempla como un nivel superior, una desviación o un cambio.

Se apreciará que la etapa de medición de los niveles de BNP-SP en una muestra puede ser una sola medición en una sola muestra, o mediciones repetidas en varias muestras. Por consiguiente, la medición puede comprender de 1 a 20 mediciones de BNP-SP, preferentemente 1 a 10, preferentemente 1 a 5, preferentemente 1 a 3, preferentemente 1 o 2, preferentemente 2 o 3 mediciones, en muestras tomadas en diferentes momentos en el transcurso de las dos primeras horas, preferentemente en la hora siguiente al inicio de la presentación clínica. También se pueden tomar mediciones únicas o repetidas fuera del período de dos horas para establecer si el nivel de BNP-SP ha caído hasta el nivel de control normal o nivel de control cardiaco.

En una realización preferida, el método comprende medir niveles de BNP-SP en 1 o 2 muestras tomadas en el transcurso de la primera hora del inicio o presentación, seguido de la medición de niveles de BNP-SP en 1 o 2 muestras tomadas en el transcurso de dos a cuatro horas del inicio o de la presentación, o la medición inicial del nivel BNP-SP, preferentemente en el transcurso de dos a tres horas.

Como se ha indicado anteriormente, los niveles de BNP-SP medidos en el transcurso de las dos primeras horas del inicio o de la presentación normalmente son de cuatro a diez veces superiores, comúnmente de cinco a ocho veces superiores a los niveles de BNP-SP medidos en un control normal. Como se ha indicado anteriormente, también se incluyen, en los intervalos, los intervalos específicos 4 a 9, 4 a 8, 4 a 7, 4 a 6, 4 a 5, 5 a 10, 5 a 9, 5 a 8, 5 a 7, 5 a 6, 6 a 10, 6 a 9, 6 a 8, 6 a 7, 7 a 10, 7 a 9, 7 a 8, 8 a 10, 8 a 9 y 9 a 10 veces.

En otra realización, un nivel de BNP-SP de la muestra en el intervalo de 20 a 300 pmol/l, preferentemente de 25 a 250 pmol/l, preferentemente de 30 a 180 pmol/l, preferentemente de 35 a 150 pmol/l, preferentemente de 40 a 120 pmol/l, preferentemente 40 a 90 pmol/l y preferentemente 45 a 80 pmol/l es indicativo de TCA, rechazo de trasplante cardiaco, o distingue un TCA de un trastorno pulmonar.

Como se ha indicado anteriormente, los intervalos también incluyen valores dentro del intervalo tales como de 20 a 180 pmol/l, de 50 a 200 pmol/l, de 40 a 130 pmol/l, de 50 a 100 pmol/l, de 45 a 160 pmol/l, y similares.

La muestra biológica puede ser cualquier material biológico en el que se pueda localizar o secretar BNP-SP. Esto incluye cualquier tejido o fluido corporal tal como sangre, saliva, fluido intersticial, suero, plasma, orina, fluido pericárdico y fluido cefalorraquídeo, pero no se limita a los mismos. Preferentemente, la muestra biológica es una muestra biológica circulatoria, por ejemplo, sangre, suero o plasma. En una realización, la muestra biológica es tejido cardiaco.

La presencia de los marcadores y su nivel de expresión en la muestra se puede determinar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica tales como transferencia de Southern, transferencia Northern, FISH o PCR cuantitativa para cuantificar la transcripción de ARNm [(Thomas, *Pro. NAH, Acad. Sci. EE.UU. 77: 5201-5205* 1980), (Jain K. K., *Med Device Technol.* Mayo de 2004; 15(4):14-7)], transferencia de puntos, (análisis de ADN) o hibridación *in situ* usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias de marcador proporcionadas en el presente

documento.

Por consiguiente, la divulgación también proporciona un ensayo de detección de la presencia de una molécula de ácido nucleico de la invención, en una muestra, comprendiendo el método:

- 5
- (a) poner en contacto la muestra con una sonda de polinucleótido que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas; y
 - (b) detectar la presencia de un complejo de hibridación en la muestra.

10 Preferentemente, la sonda de hibridación es una sonda marcada. Los ejemplos de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioenzimáticos y de biotina-avidina. El marcaje y la visualización de las sondas marcadas se llevan a cabo de acuerdo con métodos de la técnica conocidos tales como los anteriores.

15 Por conveniencia, la sonda de ácido nucleico se puede inmovilizar sobre un soporte sólido que incluye resinas (tales como poliacrilamidas), hidratos de carbono (tales como sefarosa), plásticos (tales como policarbonato) y perlas de látex.

20 Como se ha tratado anteriormente, la sonda de molécula de ácido nucleico puede ser preferentemente una molécula de ARN, ADNc o ADN. Es una sonda preferida SEQ ID NO: 20.

Las condiciones rigurosas de hibridación son como se han descrito anteriormente.

25 El nivel de expresión del marcador de ácido nucleico se puede determinar usando técnicas de la materia conocidas tales como RT-PCR y técnicas de electroforesis, incluyendo SDS-PAGE. Usando estas técnicas, se amplifica la secuencia de ADN o ADNc de una molécula de ácido nucleico de la invención, en una muestra objeto, y se mide el nivel de ADN o ADNc o ARN.

30 En un método alternativo, el nivel de ADN, ADNc o ARN se puede medir directamente en la muestra sin amplificación.

Un método actualmente preferido es el ensayo de hibridación de transferencia Northern. Las sondas para su uso en el ensayo de hibridación de transferencia Northern pueden prepararse basándose en las secuencias marcadoras identificadas en el presente documento. Una sonda incluye preferentemente al menos 12, al menos 15, al menos 18, al menos 24, al menos 30, al menos 36, preferentemente al menos 42, preferentemente al menos 51, preferentemente al menos 60, preferentemente al menos 70 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de referencia.

35 Como alternativa, el nivel de expresión puede medirse usando ensayos de PCR basados en transcripción inversa (RT-PCR) con el uso de cebadores específicos para las secuencias de ácido nucleico. Si se desea, puede hacerse una comparación del nivel del marcador de la muestra con referencia a una molécula de ácido nucleico de control cuya expresión sea independiente del parámetro o condición que se esté midiendo. Una molécula de ácido nucleico de control se refiere a una molécula en la que el nivel no difiere entre el trastorno o el estado de rechazo de trasplante y el estado saludable. Los niveles de la molécula de control se pueden usar para normalizar los niveles en las poblaciones comparadas. Un ejemplo de dicha molécula de control es GAP-DH. Los marcadores de la invención cambiarán los niveles con el trastorno.

40 En una realización, la etapa de medición comprende detectar la unión entre BNP-SP (17-26) y un agente de unión que se une selectivamente a BNP-SP, o a un fragmento o una variante del mismo. Preferentemente, el agente de unión tiene baja reactividad cruzada con otros marcadores de hechos biológicos, y más particularmente, BNP o NT-
50 BNP. El agente de unión es preferentemente un anticuerpo o fragmento del mismo.

La presente invención también se refiere a dichos anticuerpos o fragmentos de los anticuerpos. Un anticuerpo que se une a BNP-SP, o un fragmento o una variante del mismo puede estar en cualquier forma, incluyendo todas las clases de anticuerpos policlonales, monoclonales, monocatenarios, humanos, humanizados y quiméricos producidos mediante recombinación genética. También se incluye el antisuero obtenido inmunizando un animal tal como un ratón, una rata o un conejo con BNP-SP (17-26), o un fragmento o una variante del mismo.

60 También se puede usar en el presente documento un fragmento de un anticuerpo o un anticuerpo modificado siempre que se una a BNP-SP (17-26) o una variante del mismo. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, F(ab'), F(ab''), y Fc o Fv, o un fragmento monocatenario (scFv), en el que los fragmentos Fv de las cadenas H y L están ligados por un enlazador apropiado (Huston *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-83 (1988)). La parte "Fc" de un anticuerpo se refiere a la parte de una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de región constante de cadena pesada; CH1, CH2 y CH3, pero no incluye la región variable de cadena pesada.

65

Los métodos de preparación de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1998)¹¹). Los anticuerpos más comúnmente usados se producen inmunizando un mamífero huésped adecuado. Las proteínas de fusión que comprenden BNP-SP también pueden usarse como inmunógenos.

5 Un anticuerpo puede modificarse por conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). El anticuerpo modificado se puede obtener modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

10 Como alternativa, se puede obtener un anticuerpo como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada de un anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, la región marco conservada (FR) derivada de anticuerpo humano, y la región constante. Dichos anticuerpos se pueden preparar usando métodos de la técnica conocidos.

15 En resumen, los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, de un adyuvante. Por lo general, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir BNP-SP, o un fragmento o una variante del mismo o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil
20 conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sepa que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, tiroglobulina bovina e inhibidor de la tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un
25 experto en la materia sin excesiva experimentación.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975¹² y el documento US 4.196.265. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como
30 ascitos en un mamífero. Las estirpes celulares inmortalizadas preferidas son estirpes de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, de la colección americana de cultivos tipo, Virginia, EE.UU. Se pueden usar inmunoensayos para detectar estirpes celulares inmortalizadas que secretan el anticuerpo de interés. Las secuencias de BNP-SP, o los fragmentos o las variantes de las mismas se pueden usar en la exploración.

35 Por consiguiente, también se contemplan en el presente documento hibridomas que son estirpes celulares inmortalizadas capaces de secretar un anticuerpo monoclonal específico de BNP-SP.

Los medios bien conocidos para establecer la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma incluyen inmunoprecipitación, inmunoensayo radioligado (RIA), ensayo
40 inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y transferencia de Western. (Lutz *et al.*, *Exp. Cell. Res.* 175:109-124 (1988)). Las muestras de animales inmunizados se pueden explorar de manera similar para determinar la presencia de anticuerpos policlonales.

45 Para facilitar la detección, se pueden marcar los anticuerpos y fragmentos del presente documento con marcadores detectables tales como compuestos fluorescentes, bioluminiscentes y quimioluminiscentes, así como radioisótopos, perlas magnéticas y marcadores de afinidad (por ejemplo, biotina y avidina). Los ejemplos de marcadores que permiten la medición indirecta de la unión incluyen enzimas en las que el sustrato puede proporcionar un producto fluorescente coloreado, las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa y similares. Los fluorocromos (por ejemplo, Rojo Texas, fluoresceína, ficobiliproteínas y ficoeritrina)
50 pueden usarse con un clasificador celular activado por fluorescencia. Las técnicas de marcaje son bien conocidas en la materia.

Los anticuerpos monoclonales secretados por las células pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido de ascitos mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo,
55 proteína Sefarosa A, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos o fragmentos monoclonales también se pueden producir por medios de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 4.816.567). También son posibles modificaciones de ADN tales como la sustitución de la secuencia de codificación de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de
60 las secuencias murinas homólogas (Patente de EE.UU. n.º 4.816.567 anterior). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos de preparación de anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. La producción de anticuerpos bivalentes quiméricos también se contempla en el presente documento.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por restos de una CDR de una especie no humana.
65

La producción de anticuerpos humanizados a partir de fuentes no humanas tales como conejo, rata y ratón es bien conocida^{13,14,15}.

5 Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos¹⁶; y métodos transgénicos, véase, por ejemplo, Neuberger 1996¹⁷; y Vaughan *et al.*, 1998¹⁸.

10 Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser útiles. Estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión hacia al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, BNP-SP, o una variante o un fragmento del mismo, y un antígeno seleccionado del grupo que incluye preproBNP, BNP, CK-MB, TnT, Tnl y mioglobina. Los anticuerpos con más de dos especificidades, por ejemplo, anticuerpos trispecíficos también se contemplan en el presente documento.

15 Los métodos de creación de anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Milstein y Cuello 1983¹⁹, Suresh *et al.*, 1986²⁰ y Brennan *et al.*, 1985²¹.

El BNP-SP que se une selectivamente por el anticuerpo es BNP-SP, o una variante antigénica o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente.

20 La unión de BNP-SP puede detectarse por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye específico (basado en anticuerpos) y no específico (tal como HPLC de fase sólida). Más comúnmente, los anticuerpos del presente documento se detectan usando un ensayo tal como ELISA o RIA como se ha indicado anteriormente. También son viables los ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich, ensayos no competitivos, fluoroinmunoensayo, ensayo inmunofluorométrico o ensayos inmunoradiométricos, ensayos de luminiscencia, ensayos de quimioluminiscencia y ensayo de espectrometría de masas tales como una electronebulización de ionización (ESI) de desorción e ionización láser mejorada en superficie (SELDI), ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), espectroscopia de masas de resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FTICR) sola o en combinación con agentes de unión no específicos tales como formatos de cromatografía.

30 Convenientemente, un anticuerpo puede fijarse a un sustrato sólido para facilitar el lavado y el aislamiento del complejo de BNP-SP/anticuerpo. La unión de anticuerpos a un soporte sólido se puede lograr usando técnicas de conocidas. Véase, por ejemplo, "Handbook of Experimental Immunology", 4ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986). Los sustratos sólidos útiles para anticuerpos incluyen vidrio, nylon, papel y plásticos. De forma similar, BNP-SP puede adsorberse sobre un sustrato sólido tal como sílice adsorbente, o partículas de resina, o chips de silicio opcionalmente recubiertos o derivatizados con intercambio iónico, fase inversa (por ejemplo, revestimiento de C18) u otros materiales. El sustrato puede estar en forma de perlas, placas, tubos, barras o biochips. Los biochips o las placas con ubicaciones direccionables y placas de microtitulación diferenciadas son particularmente útiles. También se prefieren para su uso múltiples sistemas en los que se usen perlas que contengan anticuerpos dirigidos a múltiples analitos para medir los niveles de los analitos en una sola muestra. Los analitos que se van a medir pueden incluir otros marcadores cardíacos, así como BNP-SP, o variantes o fragmentos de los mismos. Un ejemplo de un sistema de perlas multiplex adecuado para su uso en la presente invención es el sistema de perfilado multianalito Luminex Flurokine.

45 Los métodos de ensayo de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.221.685, US 5.310.687, US 5.480.792, US 5.525.524, US 5.679.526, US 5.824.799, US 5.851.776, US 5.885.527, US 5.922.615, US 5.939.272, US 5.647.124, US 5.985.579, US 6.019.944, US 6.113.855, US 6.143.576, y para ensayos sin marcar los documentos US 5.955.377 y US 5.631.171; véase también Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques" pág. 147-158 (CRC Press, Inc 1987), Harlow y Lane (1998) "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Publications, Nueva York, y el documento US 2005/0064511 para una descripción de los formatos y de las condiciones de ensayo.

Los analizadores de inmunoensayo también son bien conocidos e incluyen los sistemas Beckman Aceso, Abbott AxSym, Roche ElecSys and Dade Behring Status, entre otros, que están bien descritos²².

55 La unión de BNP-SP y un anticuerpo para formar un complejo puede detectarse directa o indirectamente. La detección directa se lleva a cabo usando marcadores tales como de fluorescencia, luminiscencia, radionucleidos, metales, colorantes y similares. La detección indirecta incluye la unión de marcadores detectables tales como digoxina o enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina para formar un anticuerpo BNP-SP marcado seguido de una etapa de detección del marcador mediante la adición de reactivos de detección.

60 Por ejemplo, se puede incubar la peroxidasa de rábano picante con sustratos tales como diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD) y peróxido para generar un producto coloreado cuya absorbancia puede medirse, o con luminol y peróxido para dar luz quimioluminiscente que se puede medir en un luminómetro como se conoce en la técnica. La biotina o la digoxina pueden reaccionar con agentes aglutinantes que se unen fuertemente a los mismos. Por ejemplo, las proteínas avidina y estreptavidina se unirán fuertemente a la biotina. A continuación, se une o se enlaza covalentemente un marcador medible adicional mediante reacción directa con la proteína, o mediante el uso

de agentes de reticulación comúnmente disponibles tales como MCS y carbodiimida, o mediante la adición de agentes quelantes.

En general, el complejo se separa de los reactivos no complejados, por ejemplo, mediante centrifugación. Si el anticuerpo está marcado, la cantidad de complejo se reflejará en la cantidad de marcador detectado. Como alternativa, un BNP-SP puede marcarse uniéndose a un anticuerpo y detectarse en un ensayo competitivo mediante la medición de una reducción en el BNP-SP marcado unido cuando el BNP-SP marcado con anticuerpo se incuba con una muestra biológica que contiene BNP-SP sin marcar. Se pueden usar otros inmunoensayos, por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich.

En un ejemplo, después del contacto con el anticuerpo, normalmente durante una noche, durante de 18 a 25 horas a 4 °C, o durante 1 a 2 o a 4 horas a una temperatura de 25 °C a 40 °C, el BNP-SP marcado unido al agente de unión (anticuerpo) se separa del BNP-SP marcado no unido. En ensayos en fase de solución, la separación se puede realizar mediante la adición de un anticuerpo anti-gamma globulina (segundo anticuerpo) acoplado a partículas en fase sólida tales como celulosa o material magnético. El segundo anticuerpo se produce en una especie diferente a la usada para el anticuerpo primario y se une al anticuerpo primario. Por lo tanto, todos los anticuerpos primarios se unen a la fase sólida a través del segundo anticuerpo. Este complejo se retira de la solución por centrifugación o atracción magnética y el péptido marcado unido se mide usando el marcador unido al mismo. Otras opciones para separar el marcador unido del marcador libre incluyen la formación de complejos inmunes, que precipitan de la solución, la precipitación de los anticuerpos por polietilenglicol o la unión del péptido marcado libre al carbón vegetal y la eliminación de la solución mediante centrifugación de la filtración. El marcador de la fase separada unida o libre se mide mediante un método apropiado tal como los presentados anteriormente.

Los ensayos de unión competitiva también pueden configurarse como ensayos en fase sólida que son más fáciles de realizar y, por lo tanto, se prefieren a los anteriores. Este tipo de ensayo usa placas con pocillos (comúnmente conocidas como placas de ELISA o de inmunoensayo), perlas sólidas o las superficies de los tubos. El anticuerpo primario bien se adsorbe o se une covalentemente a la superficie de la placa, perla o tubo, o se une indirectamente a través de un segundo anticuerpo anti-gamma globulina o anticuerpo contra la región Fc adsorbido, o se une covalentemente a la placa. La muestra y el péptido marcado (como anteriormente) se añaden a la placa juntos o secuencialmente, y se incuban en condiciones que permitan la competencia por la unión del anticuerpo entre BNP-SP en la muestra y el péptido marcado. Seguidamente, se puede aspirar el péptido marcado no unido y la placa se puede enjuagar, dejando el péptido marcado unido al anticuerpo unido a la placa. El péptido marcado puede medirse entonces usando técnicas descritas anteriormente.

Se prefieren más los ensayos de tipo sándwich por razones de especificidad, velocidad y mayor intervalo de medición. En este tipo de ensayo, un exceso del anticuerpo primario hacia BNP-SP se une al pocillo de una placa, perla o tubo de ELISA mediante adsorción, acoplamiento covalente, o un anticuerpo anti-Fc o anti-gammaglobulina, como se ha descrito anteriormente para los ensayos de unión de competencia en fase sólida. El fluido o extracto de muestra se pone en contacto con el anticuerpo unido a la fase sólida. Debido a que el anticuerpo está en exceso, esta reacción de unión normalmente es rápida. También se incuban un segundo anticuerpo contra BNP-SP con la muestra de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo se escoge para unirse a un sitio en BNP-SP que sea diferente del sitio de unión del anticuerpo primario. Estas dos reacciones de anticuerpos producen un sándwich con el BNP-SP de la muestra intercalada entre los dos anticuerpos. El segundo anticuerpo habitualmente se marca con un compuesto fácilmente medible como se detalla anteriormente para los ensayos de unión competitiva. Como alternativa, se puede poner en contacto un tercer anticuerpo marcado que se une específicamente al segundo anticuerpo con la muestra. Tras la eliminación por lavado del material no unido, el anticuerpo marcado unido puede medirse y cuantificarse mediante métodos descritos para ensayos de unión competitiva.

También se puede usar un ensayo del tipo de tira reactiva. Estos ensayos son bien conocidos en la técnica. Pueden, por ejemplo, emplear partículas pequeñas tales como de oro o partículas de látex coloreadas con anticuerpos específicos unidos. La muestra líquida que se va a medir puede añadirse a un extremo de una membrana o tira de papel previamente cargada con las partículas y permitir que migre a lo largo de la tira. La unión del antígeno de la muestra con las partículas modifica la capacidad de las partículas para unirse a sitios de atrapamiento, que contienen agentes de unión para las partículas, tales como antígenos o anticuerpos, a lo largo de la tira. La acumulación de las partículas coloreadas en estos sitios produce el desarrollo del color que depende de la concentración del antígeno competidor en la muestra. Otros métodos de tira reactiva pueden emplear anticuerpos unidos covalentemente a tiras de papel o de membrana para atrapar el antígeno en la muestra. Las reacciones posteriores que emplean segundos anticuerpos acoplados a enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante y la incubación con sustratos para producir un flujo de luz de color, fluorescente o quimioluminiscente permitirán la cuantificación del antígeno en la muestra.

Como se ha discutido en los siguientes ejemplos, el radioinmunoensayo (RIA) es una técnica de laboratorio actualmente preferida. En un RIA, se emplea un antígeno radiomarcado y un antígeno no marcado en la unión competitiva con un anticuerpo. Los radiomarcadores comunes incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C .

Los radioinmunoensayos que implican la precipitación de BNP-SP con un anticuerpo específico y una proteína de unión a anticuerpo radiomarcada pueden medir la cantidad de anticuerpo marcado en el precipitado como proporcional a la cantidad de BNP-SP en la muestra. Como alternativa, se produce un BNP-SP marcado y se usa una proteína de unión al anticuerpo no marcada. Luego se añade una muestra biológica que se vaya a analizar. La disminución en los recuentos del BNP-SP marcado es proporcional a la cantidad de BNP-SP de la muestra.

En el RIA, también es posible separar el BNP-SP unido del BNP-SP libre. Esto puede implicar la precipitación del complejo de BNP-SP/anticuerpo con un segundo anticuerpo. Por ejemplo, si el complejo de anticuerpo BNP-SP contiene anticuerpo de conejo, entonces se puede usar anticuerpo anti-conejo de burro para hacer precipitar el complejo y se cuenta la cantidad de marcador. Por ejemplo, en un contador LKB, Gammamaster. Véase Hunt *et al*²².

Los métodos de la invención comprenden además la medición de los niveles de uno o más marcadores no BNP-SP del TCA, rechazo de trasplante cardíaco o trastorno de TCA/pulmonar. El nivel del otro marcador o marcadores se puede comparar con los niveles medios de control de una población de control. Una desviación en el nivel medido desde el nivel de control medio es predictiva de o diagnóstica un TCA o rechazo de trasplante cardíaco.

Si bien los métodos de la invención se han descrito con respecto a un nivel superior o un aumento en los niveles de BNP-SP que son indicativos de TCA o rechazo de trasplante cardíaco, también es posible que, en algunos episodios o trastornos, los niveles de BNP-SP disminuyan. También se contemplan medidas de desviaciones por debajo de un nivel de control.

Otros marcadores que son particularmente útiles en el presente documento incluyen troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina y angiotensina II¹. Estos marcadores están todos implicados en la disfunción o enfermedad cardíaca. La correlación del nivel de BNP-SP con otros marcadores puede aumentar el valor de predicción, diagnóstico o control de BNP-SP. En el caso de TCA, el rechazo de trasplante cardíaco o TCA/trastorno pulmonar que combina los niveles de marcador BNP-SP con marcadores cardíacos conocidos puede aumentar el valor predictivo o de diagnóstico del resultado de un paciente.

El ensayo de varios marcadores peptídicos se puede llevar a cabo de forma simultánea o por separado usando una muestra de ensayo individual. Se prefieren los ensayos de formato simultáneo, de dos o múltiples sitios. Son particularmente útiles los sistemas de perlas multiplex, microensayo o biochip. Las perlas, los ensayos o los chips pueden tener una serie de ubicaciones diferenciadas, a menudo direccionables, que comprenden un anticuerpo para uno o más marcadores que incluyen BNP-SP. El uno o más marcadores incluyen más de un marcador BNP-SP. Por ejemplo, puede ser útil ensayar los fragmentos de BNP-SP N-terminal y C-terminal, y combinar los resultados del ensayo. Son viables muchas otras combinaciones de marcadores. El documento US2005/0064511 proporciona una descripción de chips y técnicas útiles en la presente invención. Luminex proporciona un sistema de perlas multiplex útil en la presente invención.

Cuando se va a controlar un sujeto, se pueden tomar varias muestras biológicas a lo largo del tiempo. El muestreo en serie permite cambios en los niveles del marcador, en particular, el BNP-SP medido a lo largo del tiempo. El muestreo puede proporcionar información sobre el tiempo aproximado de inicio de un episodio, la gravedad del episodio, qué pautas terapéuticas pueden ser apropiadas, la respuesta a las pautas terapéuticas empleadas y el pronóstico a largo plazo. El ensayo se puede llevar a cabo en los puntos de atención tales como ambulancias, consultorios médicos, presentación clínica, durante estancias hospitalarias, en pacientes ambulatorios o durante exploraciones rutinarias del estado de salud.

Los métodos de la invención también se pueden realizar junto con un ensayo de uno o más factores de riesgo tales como, pero sin limitación, edad, peso, sexo e antecedentes familiares de episodios tales como episodios cardíacos. Los resultados de las pruebas también se pueden usar junto con los métodos de la invención. Por ejemplo, los resultados de ECG y examen clínico. Un aumento estadísticamente significativo del nivel en circulación de BNP-SP, junto con uno o más factores de riesgo adicionales o resultados de la prueba se pueden usar para diagnosticar o pronosticar con mayor exactitud el estado del sujeto.

Los métodos del presente documento también se pueden usar como una guía para la terapia. Por ejemplo, qué terapias iniciar y cuándo, monitorización de la terapia, detección de efectos positivos o adversos de la terapia, por ejemplo, toxicidad cardíaca de los fármacos antimitóticos, y ajuste de las pautas terapéuticas si y cuando se requiera en función de los resultados. Esto puede mejorar los resultados a corto, medio y largo plazo para los pacientes. Para una guía de tratamientos, véase Troughton *et al*⁸.

Trastornos cardíacos agudos

Los solicitantes han demostrado que las concentraciones de la molécula de BNP-SP de longitud completa (1-26) y diversos fragmentos de la misma están correlacionadas con los trastornos cardíacos agudos. Por otra parte, los niveles de BNP-SP están en su punto más alto en la presentación clínica en el caso de pacientes que presentan sospecha de infarto agudo de miocardio (IAM). Los pacientes que presentan trastornos cardíacos agudos y, en

particular, isquemia cardiaca aguda, pueden o no experimentar un infarto de miocardio (IM) posterior. El grupo que no tiene IM no se puede diagnosticar fácilmente con las técnicas clínicas y los marcadores actuales. Por primera vez, los solicitantes han proporcionado un marcador útil precoz y específico para el daño miocárdico asociado con el IM. Esto puede permitir el diagnóstico precoz del daño miocárdico debido a eventos adversos (EA) y permitir que un médico distinga dichos casos de otros síndromes coronarios agudos, así como de otras causas de dolor en el pecho. Por ejemplo, angina, enfermedad gastrointestinal, trastornos pulmonares/pleurales y similares. Esto acorta significativamente el intervalo de 6 horas a 12 horas que actualmente se espera para la elevación de los niveles de biomarcadores cardiacos actuales, tales como mioglobina, CK-MB, TnT y Tnl. Por lo tanto, se pueden realizar un diagnóstico y tratamiento más preciso antes, reduciendo la morbilidad y la mortalidad, y proporcionando mejores resultados de pronóstico.

La invención tiene una aplicación particular en el control del tratamiento de reperfusión en pacientes cardiacos. El tratamiento de reperfusión comúnmente incluye la intervención coronaria percutánea (por ejemplo, angioplastia) y/o el tratamiento farmacológico. Los fármacos trombolíticos para la revascularización se emplean comúnmente en el tratamiento farmacológico. Las terapias adyuvantes incluyen terapias anticoagulantes y antiplaquetarias. El tratamiento de reperfusión es más eficaz cuando se emplea tan pronto como sea posible después del diagnóstico. Las pruebas de BNP-SP para acelerar el diagnóstico permiten la pronta introducción del tratamiento de reperfusión. La eficacia del tratamiento también puede controlarse mediante pruebas repetidas y la terapia ajustada según corresponda. Para una descripción exhaustiva del tratamiento de reperfusión, véase Braunwald *et al.*, en el presente documento¹.

Enfermedad cardiaca

Los métodos de la invención también se pueden usar para diagnosticar o predecir enfermedades cardiacas en un sujeto.

Los solicitantes han demostrado que, en pacientes con trastornos cardiacos agudos, los niveles de BNP-SP permanecen elevados durante al menos 6 semanas después de un episodio cardiaco. De manera similar, es predecible que los pacientes con enfermedad cardiaca o en riesgo de la misma presentarán un nivel de BNP-SP superior a los niveles medios de control en una población de control. A diferencia del BNP, los solicitantes han demostrado que los niveles de BNP-SP no se ven afectados por la edad de la población. Esto sugiere que BNP-SP tiene amplias aplicaciones como un marcador de la enfermedad cardiaca.

Rechazo de trasplante cardiaco

La invención también tiene aplicaciones en el control del trasplante cardiaco, comúnmente un trasplante de aloinjerto cardiaco, el rechazo a través de la biopsia de tejido regular durante y después del trasplante usando mediciones de BNP-SP. Un aumento en los niveles de BNP-SP medidos dentro de las dos horas posteriores al trasplante de corazón en relación con un nivel de control puede ser predictivo o diagnóstico de un episodio de rechazo.

La presente invención también proporciona un ensayo para BNP-SP en una muestra biológica obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio de o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con TCA, rechazo de trasplante cardiaco o TCA/trastorno pulmonar, comprendiendo el ensayo la detección y midiendo del nivel de BNP-SP en la muestra usando cualquier método conocido. Preferentemente, el ensayo es un ensayo *in vitro*. Dichos métodos incluyen todas las técnicas de ensayo conocidas descritas anteriormente, así como técnicas de electroforesis en gel, transferencia Western, espectroscopía de fase gaseosa, microscopía de fuerza atómica, resonancia de plasmón superficial, espectroscopia de masas, pero sin limitarse a las mismas²³.

En una realización, el ensayo comprende una o más secuencias de ácido nucleico que se unen a una o más de las secuencias de ácido nucleico de BNP-SP de la invención. Se puede diseñar una amplia selección de sondas y cebadores sentido y antisentido a partir de las secuencias de ácido nucleico del presente documento. El nivel de expresión de la secuencia de BNP-SP se identifica usando las técnicas conocidas tratadas anteriormente. La disposición puede ser un sustrato sólido, por ejemplo, un "chip" como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.744.305 o una membrana de nitrocelulosa.

Las proteínas expresadas por el marcador BNP-SP del presente documento también se pueden usar en los ensayos, y los resultados se pueden comparar con niveles de expresión de la misma proteína expresados en una muestra de control normal. La presencia y la cantidad de proteína se pueden evaluar usando formatos de ensayo conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

La presencia de BNP-SP se detecta preferentemente en la muestra uniendo BNP-SP a un agente de unión tal como un anticuerpo de la invención y midiendo la presencia de la cantidad de BNP-SP unido.

Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos selectivos hacia BNP-SP que incluyen variantes y fragmentos de los mismos forman un aspecto adicional de la invención, y los anticuerpos se pueden preparar mediante las técnicas descritas anteriormente. Los anticuerpos son útiles en los métodos y en el ensayo de la invención.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para la predicción, el diagnóstico o el control de un trastorno cardiaco agudo (TCA), rechazo de trasplante cardiaco o TCA/trastorno pulmonar que comprende un agente de unión a BNP-SP (17-26) de la invención, en el que el kit es para su uso con una muestra biológica obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio de o a la presentación clínica con TCA, rechazo de trasplante cardiaco o trastorno de TCA/pulmonar.

10 La invención también proporciona un kit para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardiaco agudo (TCA), rechazo de trasplante cardiaco o un trastorno TCA/pulmonar que comprende un agente de unión de la invención, en el que el kit está calibrado para medir los niveles de BNP-SP en el intervalo de 0,1 a 500 pmol/l, preferentemente de 1 a 400 pmol/l, preferentemente de 10 a 350 pmol/l, preferentemente de 20 a 300 pmol/l, preferentemente de 25 a 250 pmol/l, preferentemente de 30 a 180 pmol/l, preferentemente de 35 a 150 pmol/l, preferentemente de 40 a 120 pmol/l.

15 La calibración de los ensayos puede efectuarse de acuerdo con técnicas conocidas, por ejemplo, usando muestras de sangre con niveles conocidos de BNP-SP, o un conjunto de calibres con diferentes niveles conocidos de BNP-SP en cada uno. Las tiras de ensayo para su uso en kits de diagnóstico se calibran comúnmente durante la fabricación. Véase, por ejemplo, el documento US 6.780.645. El kit es útil para medir el nivel de BNP-SP en una muestra biológica. Los reactivos de detección pueden ser secuencias oligonucleotídicas complementarias a BNP-SP o un fragmento del marcador BNP-SP, o anticuerpos que se unen a los polipéptidos codificados por el marcador. Los reactivos se pueden unir a una matriz sólida como se ha descrito anteriormente o se pueden empaquetar con reactivos para unirlos a la matriz. La matriz o el sustrato sólido pueden estar en forma de perlas, placas, tubos, varillas de inmersión, tiras o biochips, todo como se ha tratado anteriormente.

20 Los reactivos de detección incluyen reactivos de lavado y reactivos capaces de detectar anticuerpos unidos (tales como anticuerpos secundarios marcados) o reactivos capaces de reaccionar con el anticuerpo marcado.

25 El kit también incluirá convenientemente un reactivo de control (positivo y/o negativo) y/o un medio para detectar el ácido nucleico o el anticuerpo. Las instrucciones de uso también se pueden incluir con el kit, tal como tomar una muestra biológica de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio o a la presentación con TCA, rechazo de trasplante cardiaco o trastorno de TCA/pulmonar, midiendo el nivel de BNP-SP en la muestra, comparando el mismo con un nivel de control y asociando el resultado con el estado cardiaco. En general, un aumento en el nivel del marcador BNP-SP con respecto a un control es indicativo de TCA o rechazo de trasplante cardiaco, o TCA en oposición a un trastorno pulmonar.

30 Más habitualmente, los kits se formatearán para ensayos conocidos en la técnica, y más habitualmente para PCR, hibridación Northern o ensayos de ELISA de Southern, como se conocen en la técnica.

35 Los kits también pueden incluir uno o más marcadores adicionales para TCA, rechazo de trasplante o trastornos TCA/pulmonar. En el caso del SCA, el marcador adicional puede incluir uno o más de troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP, LDH, aspartato aminotransferasa, H-FABP, endotelina, adrenomedulina, renina y ongotensina II. En una realización, todos los marcadores están incluidos en el kit.

40 El kit estará compuesto de uno o más recipientes y también puede incluir un equipo de recogida, por ejemplo, botes, bolsas (tales como bolsas de líquidos intravenosos), viales, jeringas y tubos de ensayo. Al menos un recipiente contiene un producto que es eficaz para predecir, diagnosticar o controlar el TCA (en particular, SCA), el rechazo de trasplante, o TCA/trastorno pulmonar. El producto habitualmente es una molécula de ácido nucleico, polipéptido o un agente de unión de la invención, o una composición que comprende cualquiera de estos. En una realización preferida, una instrucción o etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para predecir, diagnosticar o controlar un TCA (en particular, SCA), rechazo de trasplante o trastornos TCA/pulmonares. Otros componentes pueden incluir agujas, diluyentes y tampones. De manera útil, el kit puede incluir al menos un recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa.

45 Es deseable incluir en el kit agentes de unión que se unan selectivamente a BNP-SP. Preferentemente, el agente de unión es un anticuerpo. El anticuerpo usado en los ensayos y kits puede ser monoclonal o policlonal, y se puede preparar en cualquier mamífero como se ha tratado anteriormente. Los anticuerpos se preparan preferentemente contra un péptido nativo codificado o indicado por una secuencia de ácido nucleico de BNP-SP de la invención, BNP-SP (17-26) o un péptido sintético basado en el mismo, o puede generarse contra una secuencia exógena fusionada a una secuencia de ácido nucleico codificante de un péptido BNP-SP de la invención.

50 En una realización del kit, se inmoviliza un reactivo de detección de BNP-SP en una matriz sólida tal como una tira porosa para formar al menos un sitio de detección de BNP-SP. La región de medición o detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios de detección, conteniendo dichos sitios de detección un reactivo de detección de BNP-SP. Los sitios pueden organizarse en una barra, cruz o punto u otra disposición. Una tira de ensayo también puede contener sitios para controles negativos y/o positivos. Los sitios de control pueden, como alternativa, estar en una tira diferente. Los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos o

anticuerpos inmovilizados, por ejemplo, una cantidad mayor en el primer sitio de detección y cantidades más bajas en sitios posteriores. Tras la adición de una muestra biológica de ensayo, el número de sitios que muestran una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad de BNP-SP presente en la muestra.

5 También se puede incluir en el kit un dispositivo para el análisis de muestras que comprenda un cartucho de ensayo desechable con componentes apropiados (marcadores, anticuerpos y reactivos) para llevar a cabo pruebas de muestra. El dispositivo incluirá convenientemente una zona de prueba y una ventana de resultados de prueba. Los cartuchos inmunocromatográficos son ejemplos de dichos dispositivos. Véase, por ejemplo, los documentos US 6.399.398; US 6.235.241 y US 5.504.013.

10 Como alternativa, el dispositivo puede ser un dispositivo electrónico que permita la entrada, el almacenamiento y la evaluación de los niveles del marcador medido contra los niveles de control y otros niveles de marcador. El documento US 2006/0234315 proporciona ejemplos de dichos dispositivos.

15 En la presente memoria descriptiva, en la que se hace referencia a memorias descriptivas de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto generalmente tiene el fin de proporcionar un contexto para describir las características de la invención. A menos que se especifique lo contrario, la referencia a dichos documentos externos no debe interpretarse como una admisión de que dichos documentos; o dichas fuentes de información, en cualquier jurisdicción, sean estado de la técnica o formen parte del conocimiento general común en la técnica.

La invención se ilustrará ahora de una manera no limitante, haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

25 **MÉTODOS**

Todos los protocolos humanos fueron aprobados por el Comité Regional de Ética del Alto Sur del Ministerio de Salud de Nueva Zelanda y se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

30 **Productos químicos**

Los péptidos señal BNP humanos sintéticos BNP-SP (1-10), BNP-SP (17-26) y BNP-SP (1-26) (SEQ ID NO: 1) fueron sintetizados por Mimotopes (Australia). Todos los reactivos tampón se adquirieron en BDH y/o Sigma. BNP-SP (17-26) se sintetizó con el extremo C-terminal extendido con cisteína para el acoplamiento de un vehículo direccional. BNP-SP (17-26) también se extendió C-terminalmente con un resto de tirosilo para la preparación del trazador en el mismo péptido.

40 **Estudios humanos**

Para el estudio del intervalo de referencia en voluntarios sanos, se obtuvieron muestras de sangre de 13 voluntarios sanos (6 mujeres, edad media de 43 ± 12 años (intervalo de 22 a 60 años), IMC de $24,4 \pm 3,9$ kg/m²) después de un ayuno nocturno.

45 Para el análisis de las concentraciones de BNP-SP en la lesión cardíaca aguda, los presentes inventores estudiaron 10 pacientes consecutivos (4 mujeres, edad media de 70 ± 8 años (intervalo de 59 a 79 años)), que se presentaron en la Unidad de Cuidados Coronarios del Hospital Christchurch en las 6 h siguientes a la aparición de dolor en el pecho y una clara evidencia de infarto agudo de miocardio con elevación del ST, junto con un aumento posterior de la troponina T en plasma (TnT). Se excluyeron los pacientes con shock cardiogénico. Cinco pacientes habían documentado previamente hiperlipidemia, cuatro tenían hipertensión, uno tuvo un infarto de miocardio previo, uno estaba en tratamiento por insuficiencia cardíaca y dos tenían diabetes mellitus. Las medicaciones al ingreso eran diuréticos (dos pacientes), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (dos pacientes), aspirina (siete pacientes), bloqueadores β (dos pacientes). Un paciente recibió angioplastia coronaria transluminal percutánea primaria (ACTP para IM anterior), nueve pacientes recibieron trombolisis. Siete pacientes tuvieron un ECG durante la estancia en el hospital. En todos los pacientes, la fracción de eyección media fue del 54 % (intervalo, 24-75 %). La estancia hospitalaria media fue de 6,6 días (intervalo, 3-15 días). El tiempo transcurrido entre el inicio del dolor torácico y la extracción de la muestra venosa inicial (tiempo 0) fue de $3,9 \pm 0,3$ h. Se insertó una cánula intravenosa de calibre 18 en la vena del antebrazo para tomar muestras de sangre. Se tomaron muestras venosas (10 ml) al ingreso en la Unidad de Cuidados Coronarios (tiempo 0) y, posteriormente, a las 0,5, 1, 4, 8, 12, 24 y 72 h como pacientes internos, y a las 1, 6 y 12 semanas como pacientes externos. Las muestras se tomaron en tubos sobre hielo y se centrifugaron a +4 °C a 2.700 g durante 5 minutos y el plasma se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

60 **Extracción de plasma**

65 Todas las muestras de plasma se extrajeron del fabricante de SepPak Waters, cartuchos de EE. UU. como se ha descrito previamente²², se secaron y se almacenaron a -20 °C antes del RIA y HPLC.

Análisis de concentración de hormonas

Se analizaron muestras de plasma para determinar TnT, CK-MB y mioglobina usando inmunoensayos heterogéneos en un Elecsys 2010 usando anticuerpos biotinilados marcados con rutenio de acuerdo con los protocolos convencionales de los fabricantes, Roche Diagnostics. Las concentraciones de BNP y N-BNP inmunorreactivas (IR) se midieron usando los ensayos descritos anteriormente^{6,8}. El BNP-SP se midió mediante RIA específico de la siguiente manera:

RIA de BNP-SP

Para la medición de supuestos péptidos IR BNP-SP humanos, se generó un RIA nuevo y específico dirigido contra los aminoácidos 17-26 de la secuencia señal del preproBNP humano (1-26) (SEQ ID NO: 1).

Generación de anticuerpos

Se acopló preproBNPCys25 (17-26) a BSA derivatizado con éster de N-e-maleimidocaproiloxi-succinimida (EMCS) tratado con maleimida en PBS (pH 7,0) mediante mezcla suave a temperatura ambiente. El péptido acoplado se emulsionó con adyuvante de Freund y se inyectó por vía subcutánea en 2 conejos blancos de Nueva Zelanda en 4 a 5 sitios a intervalos mensuales. Se sangraron los conejos 12 días después de la inyección para evaluar los títulos de anticuerpos hasta que se lograron los niveles adecuados. Para el RIA, el BNP-SP IR se determinó usando antisuero a una dilución final de 1:6.000. Este antisuero no tiene reactividad cruzada detectable con proBNP(1-13), proBNP(1-76), proANP(1-30), ANP, BNP, endotelina 1, angiotensina II, angiotensina(1-7), urotensina II, CNP, proCNP(1-15), adrenomedulina, urocortina I y urocortina II (todos <0,01 %).

Yodación y método de ensayo

Se yodó preproBNP Tyr²⁵ (17-26) mediante el método de cloramina T y se purificó en HPLC de fase inversa como se ha descrito previamente²². Todas las muestras, los patrones, las trazas radiactivas y soluciones de antisuero se diluyeron en tampón de ensayo basado en potasio²². El ensayo de incubación consistió en 100 µl de muestra o patrón (0-640 pmol de preproBNP humano (17-26) combinados con 100 µl de antisuero que se agitó en movimientos vorticiales y se incubó a 4 °C durante 24 horas. A continuación, se añadieron 100 µl de trazas (4.000-5.000 cpm) y se incubaron además durante 24 horas a 4 °C. Las inmunorreactividades libres y unidas finalmente se separaron mediante el segundo método de anticuerpo en fase sólida (Sac-Cel anti-conejo de burro) y se contaron en un contador Gammamaster (LKB, Uppsala, Suecia).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se sometieron extractos de plasma a HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC) a temperatura ambiente en una columna de péptido TSK-Gel G2000SW (Toyosoda, Tokio, Japón) usando condiciones isocráticas de acetonitrilo al 60 %/ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % a un caudal de 0,25/ml/minuto. Las fracciones se recogieron a intervalos de 1 minuto y se sometieron a RIA de BNP-SP. La columna de SE-HPLC se calibró usando azul dextrano (Vo), citocromo C (~Mr 12.400), BNP45 de rata (~Mr 5.000), angiotensina II (~Mr de 1.045) y glicina (Vt). A continuación, se caracterizó más el BNP-SP IR identificado mediante SE-HPLC/RIA en una columna de HPLC de fase inversa C₁₈ Brownlee (RP-HPLC) (Applied Biosystems, CA) con un gradiente de elución lineal de acetonitrilo del 12 % al 48 %/TFA al 0,1 % durante más de 40 minutos, a un caudal de 1 ml/minuto. Se recogieron fracciones de un minuto, se secaron bajo una corriente de aire y se sometieron a RIA específico como para SE-HPLC. La RP-HPLC se calibró usando preproBNP sintético (17-26).

Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como la media ± ETM. Los datos del curso de tiempo se analizaron usando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas seguidas mediante pruebas post-hoc de diferencias menos significativas. El análisis de correlación de las concentraciones de hormona en plasma se llevó a cabo usando un modelo de regresión lineal general. En todos los análisis, se consideró significativo un valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Para determinar si los 26 aminoácidos SP de BNP, o fragmentos derivados del mismo, están presentes en el sistema circulatorio de los seres humanos, se desarrolló un radioinmunoensayo específico (RIA) dirigido contra los restos 117-26 de preproBNP(1-26) (BNP-SP, Figura 2). La dilución de los extractos plasmáticos muestra paralelismo con la curva patrón (Figura 3), y las concentraciones en plasma de BNP-SP en seres humanos sanos fueron de $9,6 \pm 2,2$ pmol/l ($n = 13$). En seres humanos sanos, las concentraciones de BNP-SP IR en sangre no muestran una correlación significativa con la edad (Figura 4). Sin embargo, aunque los niveles en plasma de BNP-SP son similares a los de sus péptidos hermanos BNP y N-BNP, no se correlacionan con ninguno de los péptidos (Figura 5).

El análisis bioquímico de BNP-SP IR en plasma mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa (RP) y de exclusión de tamaño (SE) sugiere que nuestro RIA específico detecta uno o varios fragmentos de BNP-SP que se eluyen con un Mr aproximado de 1.000-2.000 en la SE-HPLC y cerca del tiempo de elución del BNP-SP sintético en RP-HPLC (Figura 6).

Habiéndose establecido que los péptidos BNP-SP IR están presentes en el plasma humano, entonces se midieron las concentraciones en serie de BNP-SP IR en pacientes con IAM documentado (n = 10, Figura 7). Las concentraciones más altas de BNP-SP IR se observaron en el ingreso hospitalario y disminuyeron lentamente a niveles estables durante 6 semanas. Es importante destacar que los niveles máximos medios al ingreso fueron 7 veces superiores (intervalo 4-12) que los niveles en voluntarios sanos normales, y se mantuvieron 3 veces más altos hasta las 6 semanas. Este patrón contrasta con el de BNP y N-BNP cuyos niveles máximos no se producen hasta 24 horas después de la admisión (Figura 7). Las concentraciones máximas de mioglobina se produjeron 1-2 horas después del ingreso en el hospital, mientras que los niveles máximos de TnT y CK-MB no se alcanzaron hasta 8-12 horas después del ingreso.

EJEMPLO 2

Se cateterizaron treinta y dos pacientes con SCA sospechoso clínicamente estable y se tomaron muestras de sangre de múltiples sitios del órgano: arteria femoral (AF), vena hepática (VHC, vena cava inferior (VCI), vena del seno coronario cardiaco (VSC) y arteria pulmonar (AP). La sangre se recogió en tubos de EDTA enfriados, se preparó a partir de plasma por centrifugación, y el plasma se sometió a RIA de BNP-SP. La Figura 9 muestra claramente que el sitio más alto de concentración de BNP-SP es la VSC, la vena que drena el corazón, en especial, los ventrículos. Esta es una fuerte evidencia de que el corazón es el sitio predominante de secreción de BNP-SP y coincide con el patrón conocido de expresión génica de BNP, siendo el más alto en el corazón.

Conclusión

Las concentraciones en circulación de BNP-SP en pacientes clínicamente estables se derivan de fuentes cardiacas. La secreción cardiaca significativa coincide con que BNP-SP sea una hormona cardiaca.

DISCUSIÓN

Esta evidencia es la primera en documentar el péptido señal de preproBNP como presente en la circulación y el espacio extracelular en las dos horas siguientes a una presentación evidente con TCA o en las dos horas siguientes al inicio del TCA. Los presentes inventores mostraron en primera instancia que la medición de BNP-SP en sangre tiene potencial como un biomarcador rápido de isquemia cardiaca aguda y/o lesión posterior y, en segunda instancia, que la medición de BNP-SP después del episodio tiene posibles méritos como marcador del pronóstico a largo plazo y el resultado.

Como es evidente, los expertos en la materia apreciarán que la descripción anterior se proporciona a modo de ejemplo y que la invención no se limita a la misma.

Referencias

1. Braunwald E, Zipes D. P., Libby P. "Acute myocardial infarction Chp. 35 Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine", 6ª ed. 2001. pág. 1114-1231.
2. Richards A. M., Nicholls M. G., Yandle T. G., Frampton C., Espiner E. A., Turner J. G., Buttimore R. C., Lainchbury J. G., Elliott J. M., Ikram H., Crozier I. G., Smyth D. W. "Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction". *Circulation* 1998 97:1921-1929.
3. Jernberg T., Stridsberg M, Venge P., Lindahl B. "N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation". *J. Am. Coll. Cardiology* 2002 40:437-445.
4. Omland T, Persson A., Ng L., O'Brien R., Karlsson T., Herlitz J., Hartford M., Caidahl K. "N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes". *Circulation*. 2002 106:2913-2918.
5. Pemberton C. J., Johnson M. L., Yandle T. G., Espiner E. A. "Deconvolution Analysis of the Secretion and Elimination of Cardiac Natriuretic Peptides During Acute Volume Overload". *Hypertension* 2000; 36: 355-359.
6. Richards A. M., Nicholls M. G., Troughton R. W., Lainchbury J. G., Elliott J., Frampton C., Espiner E. A., Crozier I. G., Yandle T. G., Turner J. "Antecedent hypertension and heart failure after myocardial infarction". *J. Am. Coll. Cardiology*. 2002 39: 1182-1188.

7. Troughton R. W., Prior D. L., Pereira J. J., Martin M., Fogarty A., Morehead A., Yandle T. G., Richards A. M., Starling R. C., Young J. B., Thomas J. D., Klein A. L. "Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function". *J Am Coll Cardiol*. 2004 43:416-422.
- 5
8. Troughton R. W., Frampton C. M., Yandle T. G., Espiner E. A., Nicholls M G., Richards A. M. "Treatment of heart failure guided by plasma amino-terminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations". *Lancet* 2000 355: 1126.1130.
- 10
9. "Multiple Sequence Alignment with the Clustal series of programs", *Nucleic Acids Res* (2003) 31 (13): 3497-500.
10. Bowie, J. U et al., (1990). "Decieving the message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions". *Science* 247, 1306-1310.
- 15
11. Harbour y Lane 1998. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Press ,Nueva York.²⁷
12. Kohler y Milstein 1975. "continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specficity". *Nature*, 256, 495-497.
- 20
13. Verhoeyen M. C Milstein y G Winter, "Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity". *Science*. 25 de marzo de 1988; 239(4847):1534-6.
- 25
14. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. y Winter, G. "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse", *Nature* (1986) 321: 522-525.
15. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G. "Reshaping human antibodies for therapy". *Nature*. 1988 Mar 24; 332(6162):323-7.
- 30
16. Hoogenboom H. R., Winter G. (1992) "Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro". *J Mol Biol*. 20 de septiembre de 1992; 227 (2):381-8.
17. Michael Neuberger (1996) "Generating high-avidity human Mabs in mice", *Nature Biotechnology* 14, 826.
- 35
18. Tristan J. Vaughan, Jane K. Osbourn y Philip R. Tempest (1998) "Human antibodies by design". *Nature Biotechnology* 16, 535-539.
19. Milstein y Cuello (1983) "The co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities", *Nature*, 305:537-539.
- 40
20. Suresh, M. R., Cuello, A. C. y Milstein, C. (1986) "Bi-specific monoclonal antibodies from hybrid hibridomas". *Methods in Enzymology*, 121: 210-228.
- 45
21. Brennan *et al.*, "Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments" *Science* 229:81-83 (1985).
22. Hunt P. J., Richards A. M., Nicholls M. G., Yandle T. G., Doughty R. N., Espiner E. A. "Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment". *Clin. Endocrinol*. 1997 47:287-296.
- 50
23. "The Immunoassay Handbook". 3ª edición, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005.
24. Solber H. "Approved recommendation (1987) on the theory of reference values". Parte 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Journal of clinical Chemistry and Cilinical Biochemistry* 1987 25:645-656.
- 55
25. Braud V. M., Allan D. S., O'Callaghan C. A., Soderstrom K., D'Andrea A., Ogg G. S., Lazetic S., Young N. T., Bell J. I., Phillips J. H., Lanier L. L., McMichael A. J. "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C". *Nature* 1998 391:795-799.
- 60

Listado de secuencias

<110> Pemberton et al, Christopher
 5 <120> BIOMARCADORES
 <130> 517093 TVG
 <160> 24
 10 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 134
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <300>
 <308> NP_002512
 20 <309> 20-08-2006
 <313> (1)..(134)
 <400> 1

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro
 20 25 30
 Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn
 35 40 45
 His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu
 50 55 60
 Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg
 65 70 75 80
 Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys
 100 105 110
 Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys
 115 120 125
 Lys Val Leu Arg Arg His
 130

<210> 2
 <211> 708
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <300>
 <308> NM_002521
 <309> 20-08-2006

ES 2 655 564 T3

<313> (1)..(708)

<400> 2

```

ccccgcaggc tgagggcagg tgggaagcaa acccggacgc atcgcagcag cagcagcagc      60
agcagaagca gcagcagcag cctccgcagt cctccagag acatggatcc ccagacagca      120
ccttcccggg cgctcctgct cctgctcttc ttgcatctgg ctttctctgg aggtcgttcc      180
caccgcctgg gcagccccgg ttcagcctcg gacttggaaa cgcccgggtt acaggagcag      240
cgcaaccatt tgcaggggcaa actgtcggag ctgcaggtgg agcagacatc cctggagccc      300
ctccaggaga gccccctcc cacaggtgtc tgggaagtccc gggaggtagc caccgagggc      360
atccgtgggc accgcaaaat ggtcctctac accctgcggg caccacgaag cccaagatg      420
gtgcaagggc ctggctgctt tgggaggaag atggaccgga tcagctcttc cagtggcctg      480
ggctgcaaag tgctgaggcg gcattaagag gaagtccctgg ctgcagacac ctgcttctga      540
ttccacaagg ggctttttcc tcaaccctgt ggccgccttt gaagtgactc atttttttaa      600
tgtatttatg tatttatttg attgttttat ataagatggt ttcttacctt tgagcacaaa      660
atttccacgg tgaataaag tcaacattat aagctttaa aaaaaaaaaa      708

```

5

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

10

<300>

<308> NP_113733

<309> 06-11-2005

<313> (1)..(121)

15

<400> 3

ES 2 655 564 T3

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

5 <210> 4
 <211> 628
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*
 10 <300>
 <308> NM_031545
 <309> 06-11-2005
 <313> (1)..(628)
 15 <400> 4

gcgagacaag agagagcagg acaccatcgc agctgcctgg cccatcactt ctgcagcatg . 60
 gatctccaga aggtgctgcc ccagatgatt ctgctcctgc ttttccttaa tctgtcgccg 120
 ctgggaggtc actcccatcc cctgggaagt cctagccagt ctccagaaca atccacgatg 180
 cagaagctgc tggagctgat aagagaaaag tcagaggaaa tggctcagag acagctctca 240
 aaggaccaag gccctacaaa agaacttcta aaaagagtcc ttaggtctca agacagcgcc 300
 ttccggatcc aggagagact tcgaaattcc aagatggcac atagttcaag ctgctttggg 360
 cagaagatag accggatcgg cgcagtcagt cgcttgggct gtgacgggct gaggttgttt 420
 taggaagacc tcctggctgc agactccggc ttctgactct gcctgcggct cttctttccc 480
 cagctctggg accaccttc aagtgatcct gtttatttat ttgtttattt atttattttt 540
 atgttgctga tttctacaa gactgtttct tatcttccag cacaaacttg ccacagtgtg 600
 ataaacatag cctatttctt gcttttgg 628

ES 2 655 564 T3

<210> 5
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

5

<300>
 <308> AAB92565
 <309> 05-02-2001
 <313> (1)..(129)

10

<400> 5

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

15

<210> 6
 <211> 2125
 <212> ADN
 <213> *Ovis aries*

20

<300>
 <308> AF037466
 <309> 02-01-2001
 <313> (1)..(2125)

25

<400> 6

ES 2 655 564 T3

gcttgtcttt ctggcaacac cggagttgag gagagcaaga actcttgcgt tggaggctca 60
gcgtgatcag aaccacggac agcggtcagc gcgcccgagg gaccggcggg ctggcgcagg 120
gcagagttgc aggcttgcgc tcttccaggc ggggtgccga gttccaggcg gggaggggaa 180
acgcgctgca gtgatggggg gttggctggg gctgttcttt gtgagtcacc tcgtgcgccc 240
ggcatttgcg tcgagtctct gatcgcctggg gttctctctt ctcaattcag gaatgggggt 300
ggggaggaaa gaaaaaatc cacgctaata cccccggcgg ttttgcagga aaggaagcag 360
agagagagac gaaaggctat tgggtgtctac ccctccctgc ctacgcccc actcccgcac 420
cccaccctc caaaccccc cgccccccac cccgggcgcg cgttccagct cccggtcagg 480
cccatttcta tacaaggcct gctctcccca gcctccacc cctcggcgcg gagaggtgca 540
ttccccgcc ctgagctcag cgggtcgggc cggaatgcgg ccgataaatc agagataacc 600
cagagaggca gggccggccc agctcccagg accagggata aaaggcctct gttgcccaag 660
gatccgggag agcgcacc accggcactaga aggtgagacg tgaggcgcaa cccagcgaag 720
cagccgcggc cgcaaccag gaccagggat aaaaggcctc tgttgcccaa ggatccggga 780
gagcgcaccac cgggcactag aaggtgagac gtgaggcgca acccagcga gacagccgcg 840
ccgcaacctc catccgctcc gccagcgaca tggaccccc gaaggcgctg tcccgaacgc 900
tcctgcttct cctcttcttg cacctgtcgc tgctaggatg tcgttcccac ccgctgggtg 960
gccccggctc ggcttcggaa ctgcctgggt tacagggtgag cgctgctgaa ctgcgtaaac 1020
ccggttcgcc aagagggcgc ggacagcagc agttagcggg tccccatccc ccgaccctcc 1080
actcacatcc caagaggtcc ccaccctccc ttgggaatta gtgataccag aatcagaaag 1140
ggaattagaa catggagaga ctgggtgcgg gaagccggta cccagcgcgg ttggatcgct 1200

ES 2 655 564 T3

ttgccgccgt cgaggggtggc tgggccaag gtgcgggttt ctgaagatgc ggctccccta 1260
ccgtgcattg caggagctgt tggaccgtct acgagacagg gtctcggagc tgcaggcggga 1320
gcagctgcgc gtggagcccc tccagcaggg ccagggcctg gaagaaacct gggactcccc 1380
ggcggcagcc cccgcgggggt tccttgggcc ccaccacagc ctctccagg ccctgcgggg 1440
ccccaaatg atgcgcgact cgggctgctt tggacggagg ctggaccgga tcggctccct 1500
cagtggcctg ggctgcaacg gtgagcgcct atccgcattc cactgcaca tcaccattag 1560
agccacttct ggggccgatg tctcagggga ccaaatttg aacaaagaac atcactcttc 1620
tttgctggca gtcctcaggg ccaaggcatg cctctctggg aatattaaat ttggacaaca 1680
ttcattatca tgtctgggag ccccttctat ccacctctg cctctgactg aaaggggcag 1740
aatctttagg atgtaattca gtcactgttc agcaggccct ccttggagca aaaagaatag 1800
ttaacatttt tcctcctggt tccccctgaa ctgtctaaag ctgcaaaggc agaggggggg 1860
gtcaccaggg ggatggtaat ccctggttta caaggaggat ggggaggtcc ggggagatgg 1920
gttattccaa agccccaaac atgcagatga actgaagagg ggggtggcag ggggtggcaca 1980
gggtgagggga aagctcagat ccttctgtc tcccacccca aagtcatcat caccctctct 2040
ttcccccca cagtgtgag gaggtactaa gaggaggtcc tggctgcaga tatggctgca 2100
tctgattctc catcaactcc tgatc 2125

<210> 7
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

5

<300>
 <308> NP_999011
 <309> 16-04-2005
 <313> (1)..(131)

10

<400> 7

ES 2 655 564 T3

Met Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Arg Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu
 1 5 10 15
 His Leu Leu Leu Leu Gly Cys Arg Ser Tyr Pro Leu Gly Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Ala Ser Glu Leu Pro Gly Ile Gln Glu Leu Leu Asp Arg Leu Arg
 35 40 45
 Asp Arg Val Ser Glu Leu Gln Ala Glu Arg Thr Asp Leu Glu Pro Leu
 50 55 60
 Arg Gln Asp Arg Gly Leu Thr Glu Ala Trp Glu Ala Arg Glu Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Val Leu Gly Pro Arg Ser Ser Ile Phe Gln Val Leu Arg
 85 90 95
 Gly Ile Arg Ser Pro Lys Thr Met Arg Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg
 100 105 110
 Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu
 115 120 125
 Arg Arg Tyr
 130

- <210> 8
- <211> 670
- 5 <212> ADN
- <213> *Sus scrofa*
- <300>
- <308> NM_213846
- 10 <309> 16-04-2005
- <313> (1)..(670)
- <400> 8

caggctgcta ggaagtgaaa agtgaacctg gacccagctc agcggcagca gcagcggcag 60
caggcagcag cctctatcct ctctccagc cacatgggcc cccggatggc gcttccccgc 120
gtgctcctgc tctgttctt gcacctgtg ctgctaggat gccgttecta tccactgggt 180
ggcgctggcc tggcctcaga actgccaggg atacaggagc tgctggaccg cctgcgagac 240
agggctctcc agctgcaggc ggagcggacg gacctggagc ccctccggca ggaccgtggc 300
ctcacagaag cctgggaggc gaggaagca gccccacgg gggttcttgg gccccgcagt 360
agcatcttcc aagtcctccg gggaatacgc agccccaaga cgatgcgtga ctctggctgc 420
tttgggcgga ggctggaccg gatcggctcc ctgagcggcc tgggctgcaa tgtgctcagg 480
aggtactgag aagtcctggc tgacaacctc tgtgtccgct tctccaacgc cctccccctg 540
ctccccctca aagcaactcc tgtttttatt tatgtattta tttatttatt tatttggtgg 600
ttgtatataa gacggttctt atttgtgagc acattttttc catggtgaaa taaagtcaac 660
attagagctc 670

5 <210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <300>
 <308> NP_032752
 <309> 06-08-2006
 <313> (1)..(121)

<400> 9

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

ES 2 655 564 T3

<210> 10
 <211> 667
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 5
 <300>
 <308> NM_008726
 <309> 06-08-2006
 <313> (1)..(667)
 10
 <400> 10

 cgaccaccag tgcacaagct gcttggggag gcgagacaag ggagaacacg gcatcattgc 60
 ctggcccatc gcttctgcgg catggatctc ctgaagggtc tgtcccagat gattctgttt 120
 ctgcttttcc tttatctgtc accgctggga ggtcactcct atcctctggg aagtcctagc 180
 cagtctccag agcaattcaa gatgcagaag ctgctggagc tgataagaga aaagtcggag 240
 gaaatggccc agagacagct cttgaaggac caaggcctca caaaagaaca cccaaaaaga 300
 gtccttcggt ctcaaggcag caccctccgg gtccagcaga gacctcaaaa ttccaagggtg 360
 acacatatct caagctgctt tgggcacaag atagaccgga tcggatccgt cagtcgtttg 420
 ggctgtaacg cactgaagtt gttgtaggaa gacctcctgg ctgcaggaga ctccagtttc 480
 tgactctgcc tgggtctctt tccccagctc tgggaccacc tttgaagtga tcctatttat 540
 ttatttattt atatttattt ttatttttat tttttaattt attttgttgt ttttctacaa 600
 gactgtttct tatcttggag cacaaacttg ccacaacata ataaacatag cgtatttcct 660
 gcttttg 667

 15 <210> 11
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 20 <300>
 <308> P16859
 <309> 02-05-2006
 <313> (1)..(140)
 25 <400> 11

ES 2 655 564 T3

Met Glu Pro Cys Ala Ala Leu Pro Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Leu His Leu Ser Pro Leu Gly Gly Arg Pro His Pro Leu Gly Gly Arg
20 25 30
Ser Pro Ala Ser Glu Ala Ser Glu Ala Ser Glu Ala Ser Gly Leu Trp
35 40 45
Ala Val Gln Gln Leu Leu Gly Arg Leu Lys Asp Ala Val Ser Glu Leu
50 55 60
Gln Ala Glu Gln Leu Ala Leu Glu Pro Leu His Arg Ser His Ser Pro
65 70 75 80
Ala Glu Ala Pro Glu Ala Gly Gly Thr Pro Arg Gly Val Leu Ala Pro
85 90 95
His Asp Ser Val Leu Gln Ala Leu Arg Arg Leu Arg Ser Pro Lys Met
100 105 110
Met His Lys Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
115 120 125
Leu Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Lys Tyr
130 135 140

5 <210> 12
<211> 132
<212> PRT
<213> *Felis catus*

10 <300>
<308> AAG13661
<309> 18-07-2002
<313> (1)..(132)

<400> 12

ES 2 655 564 T3

Met Asp Pro Lys Thr Ala Leu Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Leu His Leu Ser Pro Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Gly Pro
20 25 30
Gly Pro Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ile Gln Glu Leu Leu Asp Gly Leu
35 40 45
Arg Asp Thr Val Ser Glu Leu Gln Glu Ala Gln Met Ala Leu Gly Pro
50 55 60
Leu Gln Gln Gly His Ser Pro Ala Glu Ser Trp Glu Ala Gln Glu Glu
65 70 75 80
Pro Pro Ala Arg Val Leu Ala Pro His Asp Asn Val Leu Arg Ala Leu
85 90 95
Arg Arg Leu Gly Ser Ser Lys Met Met Arg Asp Ser Arg Cys Phe Gly
100 105 110
Arg Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val
115 120 125
Leu Arg Arg His
130

5 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <300>
 <308> NP_002512
 <309> 20-08-2006
 <313> (1)..(10)

<400> 13

15 **Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala**
1 5 10

20 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <300>
 <308> NM_002521
 <309> 20-08-2006
 <313> (1)..(30)

<400> 14
 ccccgaggc tgaggcagg tggaagcaa 30

30 <210> 15

ES 2 655 564 T3

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

5

<300>
 <308> NP_002512
 <309> 20-08-2006
 <313> (1)..(17)

10

<400> 15

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Leu

15

<210> 16
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20

<300>
 <308> NM_002521
 <309> 20-08-2006
 <313> (1)..(51)

25

<400> 16

ccccgcagcc tgagggcagg tgggaagcaa acccggacgc atcgcagcag c 51

30

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<300>
 <308> NP_002512
 <309> 20-08-2006
 <313> (12).. (23)

<400> 17

Leu Leu Leu Leu Phe Leu His Leu Ala Phe Leu Gly
 1 5 10

40

<210> 18
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45

<300>
 <308> NM_002521
 <309> 20-08-2006
 <313> (36)..(69)

50

<400> 18

cggacgcac gcagcagcag cagcagcagc agaagc 36

55

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60

<300>
 <308> NP_002512

ES 2 655 564 T3

<309> 20-08-2006
<313> (17)..(26)

<400> 19

5

Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10

<300>
<308> NM_002521
<309> 20-08-2006
<313> (51)..(78)

15

<400> 20
agcagcagca gcagcagaag cagcagcagc 30

20

<210> 21
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<300>
<308> NP_002512
<309> 20-08-2006
<313> (1)..(26)

30

<400> 21

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser
20 25

35

<210> 22
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40

<300>
<308> NM_002521
<309> 20-08-2006
<313> (1)..(78)

45

<400> 22

ccccgcaggc tgagggcagg tgggaagcaa acccggacgc atcgcagcag cagcagcagc 60
agcagaagca gcagcagc 78

50

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

<300>
<308> NP_002512

ES 2 655 564 T3

<309> 20-08-2006
<313> (3)..(15)

<400> 23

5

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

<210> 24
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10

<300>
<308> NM_002521
<309> 20-08-2006
<313> (9)..(45)

15

<400> 24
aggctgaggg caggtgggaa gcaaaccgg acgcatcgc 39

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP para el diagnóstico de un trastorno cardiaco agudo en un sujeto, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19), comprendiendo el ensayo la detección del fragmento de BNP-SP en una muestra obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio del trastorno o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el trastorno.
- 10 2. Un método de ensayo de fragmentos de BNP-SP para controlar un trastorno cardiaco agudo en un sujeto; controlar una respuesta al tratamiento de un trastorno coronario agudo en un sujeto; predecir, diagnosticar o controlar un episodio de rechazo de trasplante cardiaco en un sujeto; o distinguir entre un trastorno pulmonar y un trastorno cardiaco agudo en un sujeto, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19) y en el que el ensayo comprende detectar el fragmento de BNP-SP en una muestra obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio del trastorno o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el trastorno.
- 15 3. Un método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es un RIA, un ELISA, un fluoroinmunoensayo, un ensayo inmunofluorométrico o un ensayo inmunorradiométrico, o se lleva a cabo usando espectroscopia de masas (incluyendo SELDI, ESI, MALDI y FTICR).
- 20 4. Uso de un agente de unión específico de fragmentos de BNP-SP para la fabricación de un kit de ensayo de fragmentos de BNP-SP para la evaluación de un trastorno cardiaco agudo en un sujeto, en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19), comprendiendo el ensayo la detección del fragmento de BNP-SP en una muestra obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio del trastorno o en las dos horas siguientes a la presentación clínica con el trastorno.
- 25 5. Un uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, incluyendo anticuerpo monoclonal, policlonal, quimérico y humanizado, y fragmentos de anticuerpo.
- 30 6. Un método de ensayo de agentes de unión a fragmentos de BNP-SP que comprenden las etapas de:
 - a) evaluar el nivel de un fragmento de BNP-SP en un sujeto en las dos primeras horas después de iniciarse o de la presentación clínica de un trastorno cardiaco agudo sospechoso, un episodio de rechazo de trasplante cardiaco o un trastorno pulmonar/cardiaco agudo;
 - b) comparar el nivel de dicho fragmento de BNP-SP con un valor de control de fragmento de BNP-SP; y
 - 35 c) determinar si existe una desviación con respecto al control,
 en el que el fragmento de BNP-SP es BNP-SP (17-26) (SEQ ID NO: 19).
- 40 7. Un método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se determina si hay un cambio con respecto a la desviación del control en un 5 % o superior, en un 10 % o superior, en un 20 % o superior o en un 50 % o superior o, como alternativa, si el nivel de fragmento de BNP-SP es de cuatro a diez veces superior al del control.
- 45 8. Un método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 7, en el que el trastorno cardiaco agudo es una isquemia cardiaca aguda.
- 50 9. Un método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 7, en el que el trastorno cardiaco agudo es un infarto agudo de miocardio, un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST al presentar un ECG, angina inestable, un infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST, lesión cardiaca aguda; daño cardiaco agudo resultante de la toxicidad aguda del fármaco, una miocardiopatía aguda y un rechazo del trasplante cardiaco.
- 55 10. Un método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 9, en el que el ensayo de fragmento de BNP-SP o agente de unión se usa para evaluar los niveles de fragmento de BNP-SP en un sujeto en los 30 minutos, la hora o las dos horas siguientes al inicio del trastorno cardiaco agudo o a la presentación clínica con un trastorno cardiaco agudo, un episodio de rechazo de trasplante cardiaco o un trastorno pulmonar/coronario agudo.
- 60 11. Un método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 10, en el que el fragmento de BNP-SP se evalúa en una muestra de sangre, plasma, suero, saliva o tejido cardiaco del sujeto.
- 65 12. Un método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 11, en el que el sujeto es un ser humano.
13. Un kit para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardiaco agudo, un episodio de rechazo de trasplante cardiaco o un trastorno pulmonar/cardiaco agudo que comprende un agente de unión a un fragmento de BNP-SP que se une selectivamente al fragmento polipeptídico de BNP-SP de SEQ ID NO: 19, en el que el kit es para su uso con un muestra biológica obtenida de un sujeto en las dos horas siguientes al inicio de o la presentación clínica con

el síndrome cardiaco agudo, rechazo de trasplante cardiaco o trastorno pulmonar/trastorno cardiaco agudo, incluyendo opcionalmente el kit instrucciones para predecir, diagnosticar o controlar un trastorno cardiaco agudo, un episodio de rechazo de trasplante cardiaco o un trastorno pulmonar/cardiaco agudo.

- 5 14. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido de fragmento de BNP-SP de SEQ ID NO: 19, estando dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado con un marcador detectable o no marcado.
- 10 15. Un polipéptido de fragmento de BNP-SP aislado que es un polipéptido de SEQ ID NO: 19.
16. Uso del polipéptido de fragmento de BNP-SP de SEQ ID NO: 19 en la preparación de un anticuerpo anti-fragmento de BNP-SP.
- 15 17. Un método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 7, que comprende además la medición de un marcador no de fragmento de BNP-SP seleccionado del grupo que consiste en troponina T, troponina I, creatina quinasa MB, mioglobina, BNP, NT-BNP y H-FABP.

Figura 2A

Ser humano (n.º de acceso del Genbank, NP_002512.1)
MDPQTAPSRALLLLFLHLAFLGGRSHPLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQKLSLSELQVEQTSLEPLQESPRPTGVWKSREVATEGIRGHRKMVLY
 TLRAFRSPKMVQGGCGFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH

Rata (n.º de acceso del Genbank NP_113733)
MDLQKVLPOMILLLLFLNLSPLGGHSHPLGSPSQSPQSTMQKLLLELIREKSEMAQRQLSKDQGPTKELLKRVLRSQDSAFRIQERLRNSKMAHS
 SSCFGQKIDRIGAVSRLLGCDGLRLF

Oveja (n.º de acceso del Genbank AAB92565)
MDPQKALSRLLLLFLHLSLGCRSHPLGGPGSASELPGLOELLDRDRVSELQAEQLRVEPLQQGQLEETWDSAAAAPAGFLGPHHSLLOAL
 RGPKMMDSGCFGRRLDRIGLSGLGCNVLRRY

Cerdo (n.º de acceso del Genbank NP_999011)
MGPRMALPRVLLLLFLHLLLGCRSYPLGGAGLASELPGIQELLDRDRVSELQAERTDLEPLRQDRGLTEAWEAREAAPTGVLGPRSSIFQVLR
 GIRSPKTMRDSCGCFGRRLDRIGLSGLGCNVLRRY

Ratón (n.º de acceso del Genbank NP_0327S2)
MDLLKVL~~S~~OMILFLLFLYLSPLGGHSHPLGSPSQSPQSPQFKMQKLLLELIREKSEMAQRQLLKDQGLTKEHPKRVLRSQGSTLRVQORPQNSKVTHI
 SSCFGHKIDRIGSVSRLLGCNALKLL

Perro (n.º de acceso del Genbank P16859)
MEPCAALPRALLLLFLHLSPLGGRPHPLGGRSPASEASEASGLWAVQELLGRKDAVSELQAEQLALEPLHRSHSPAEEAPEGGTPRGVLAP
 HDSVLQALRRLRSPKMMHKSGCFGRRLDRIGLSGLGCNVLRRY

Gato (n.º de acceso del Genbank AAG13661)
MDPKTALLRALLLFLHLSPGGRSHPLGGRSPASEASAIQELLDGLRDTVSELQEAQMALGPIQQGHSPAESWEAQEEPPARVLA~~P~~HDNVLRAL
 RRLGSSKMMRDSRCFGRRLDRIGLSGLGCNVLRRH

Figura 3

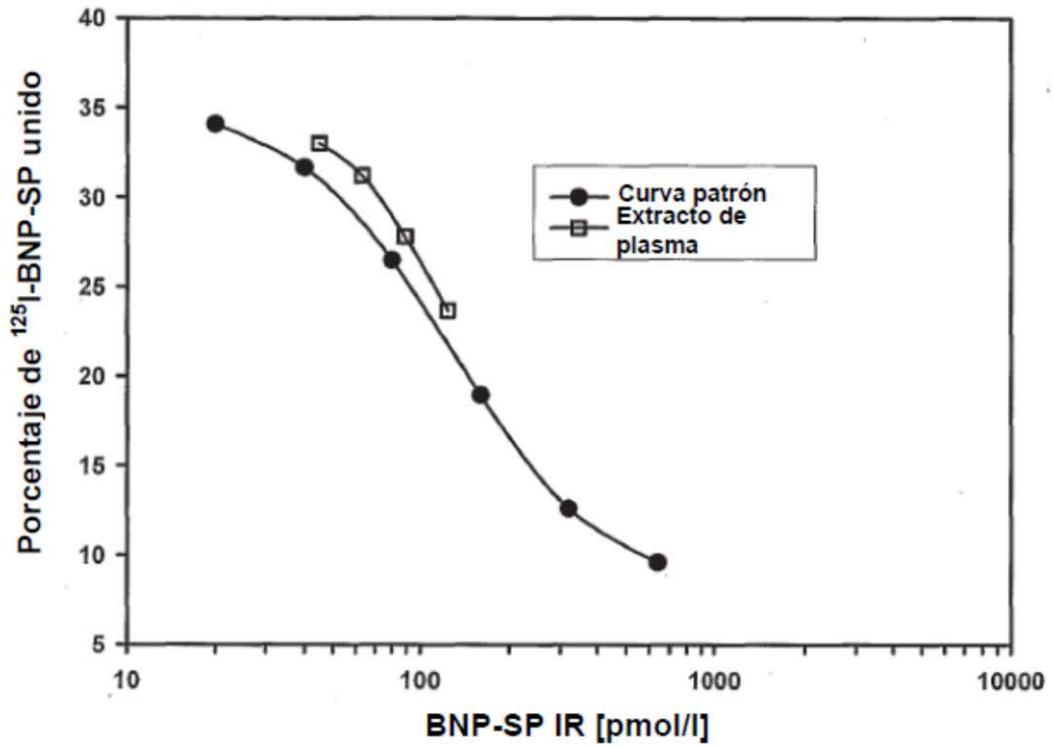


Figura 4

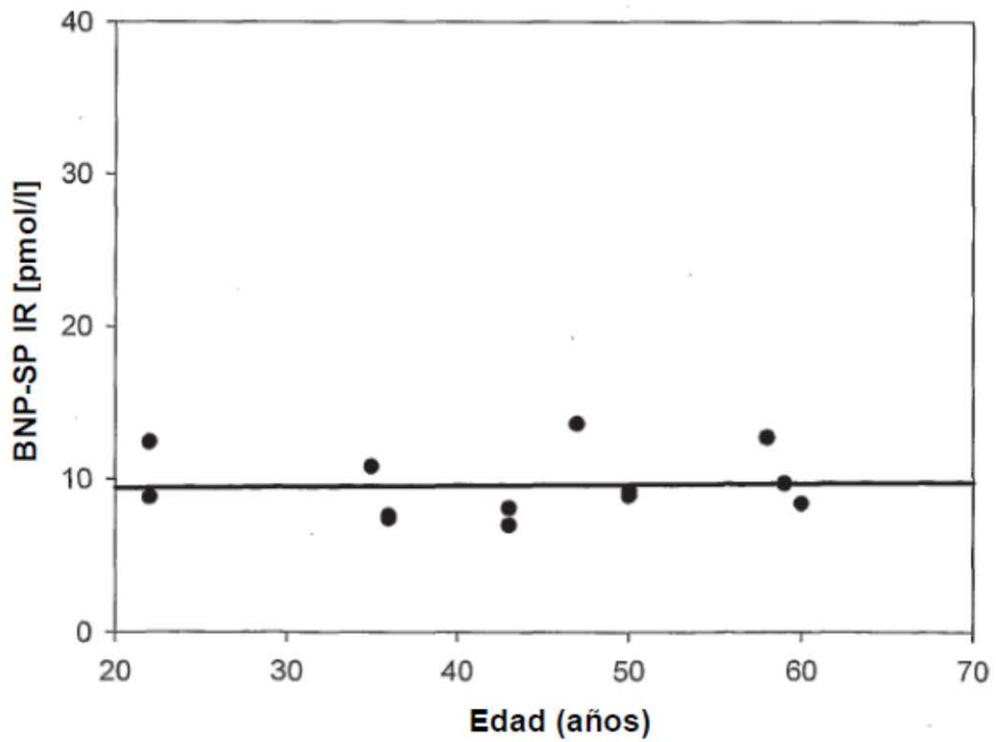


Figura 5

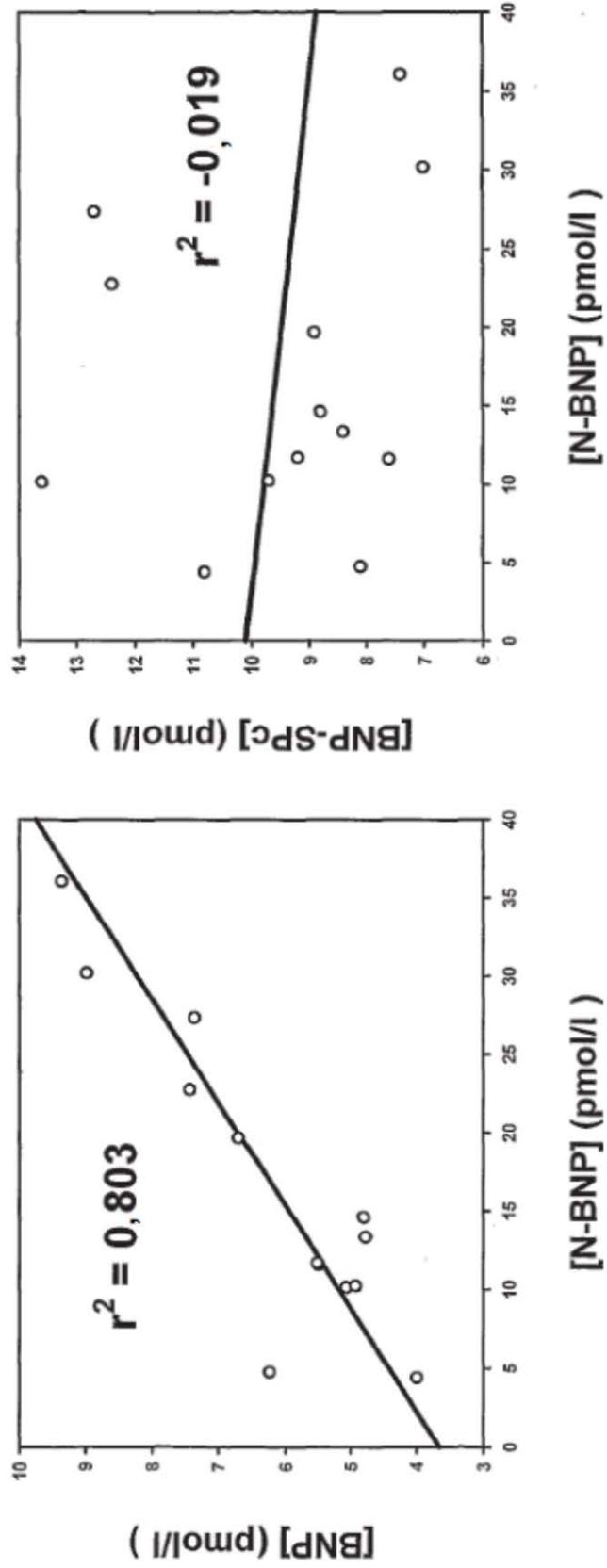


Figura 6

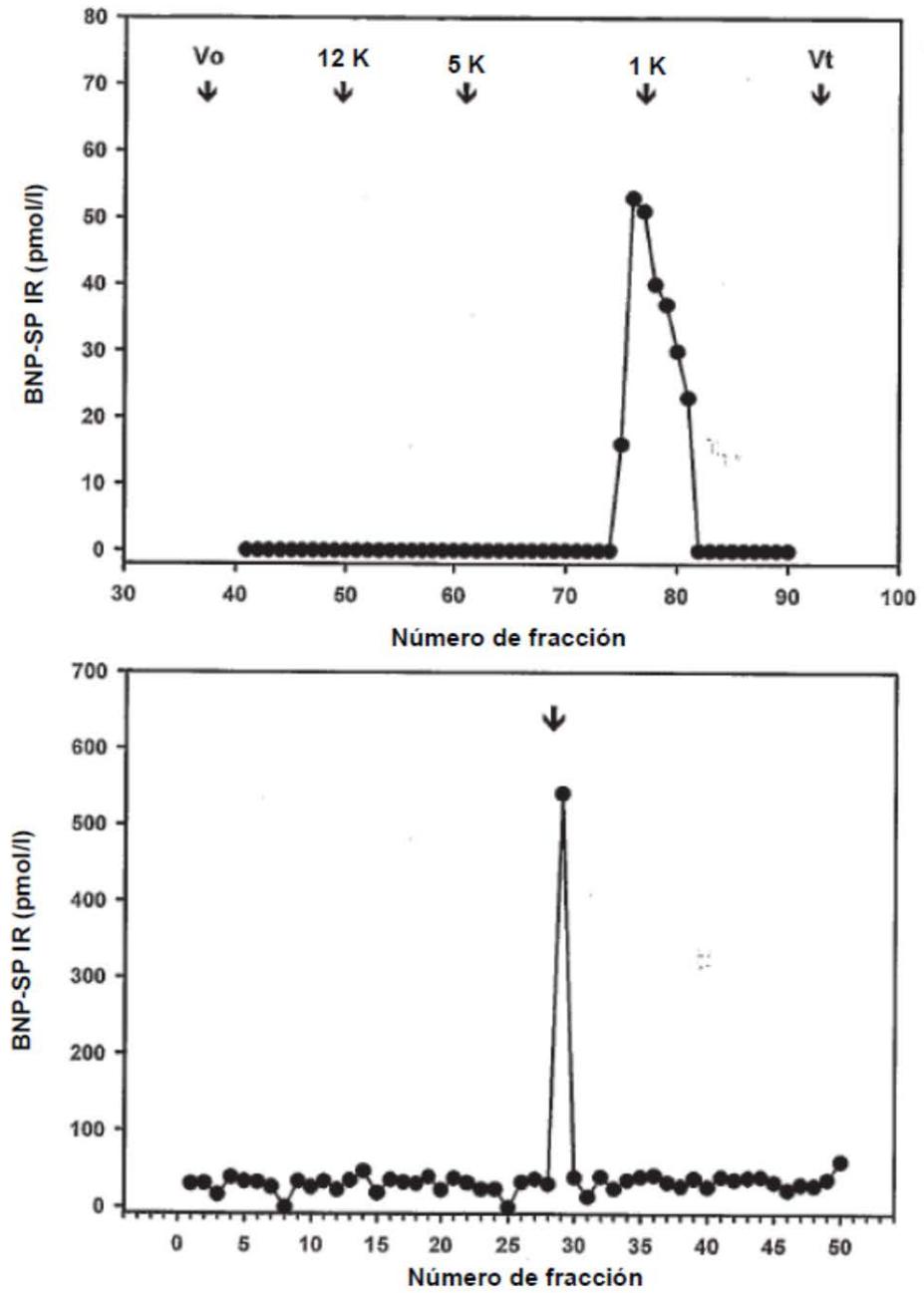


Figura 7

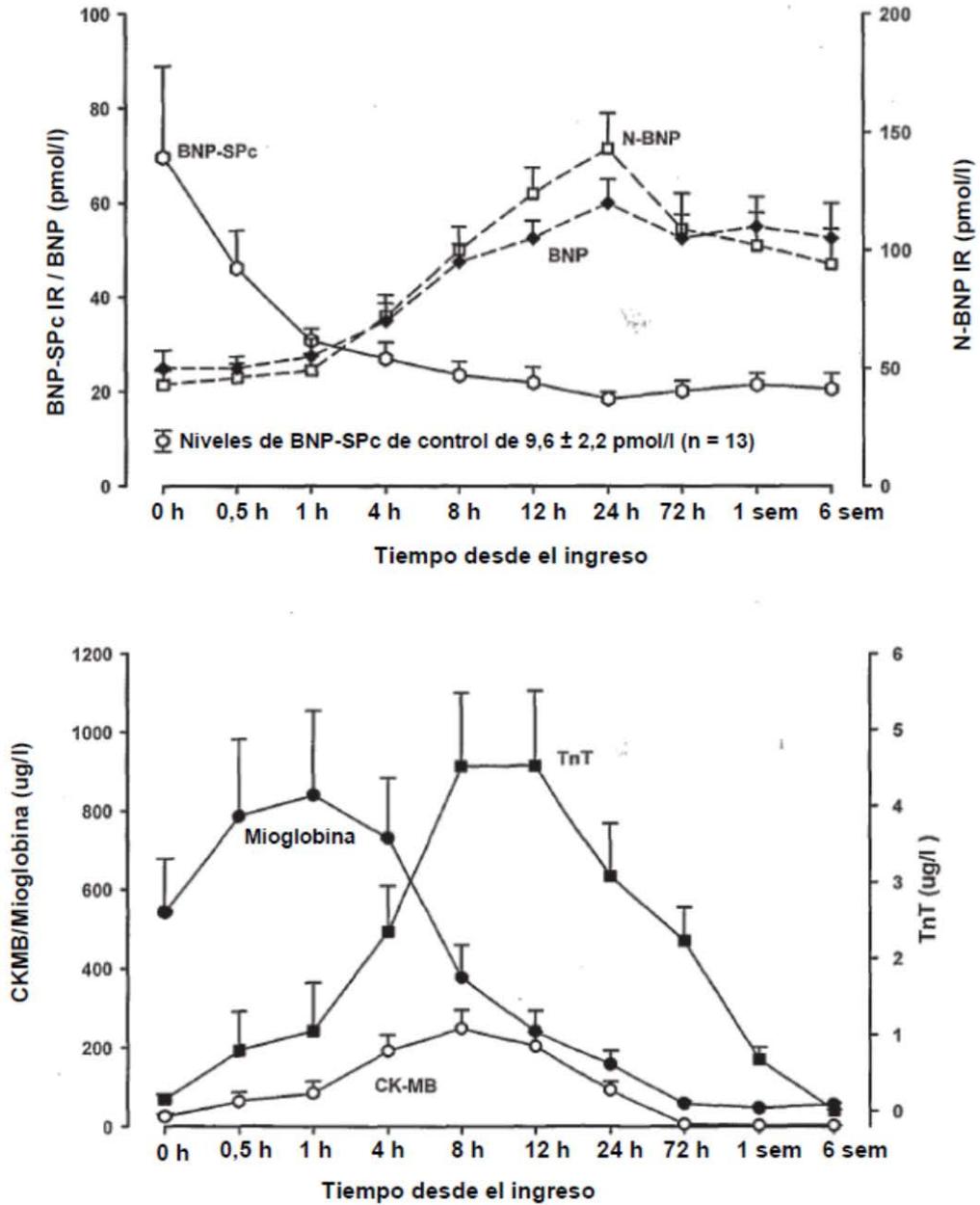


Figura 8

<u>Péptido</u>	<u>Reactividad cruzada con antisuero de BNP-SP (%)</u>
BNP-SP	100
proBNP(1-13)	<0,003
proBNP(1-76)	<0,01
proANP(1-30)	<0,009
ANP	<0,008
BNP	<0,009
Endotelina 1	<0,006
Angiotensina II	<0,003
Angiotensina (1-7)	<0,01
Urotensina II	<0,003
CNP	<0,006
proCNP(1-15)	<0,008
Adrenomedulina	<0,01
Urocortina I	<0,01
Urocortina II	<0,01

Figura 9

