



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104684574 B

(45)授权公告日 2018.08.31

(21)申请号 201380048382.9

(22)申请日 2013.09.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104684574 A

(43)申请公布日 2015.06.03

(30)优先权数据

12306120.2 2012.09.17 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.03.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/058615 2013.09.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/041526 EN 2014.03.20

(73)专利权人 原子能与替代能源署

地址 法国巴黎

专利权人 国家科学研究中心

国家健康科学研究所

雷根斯堡大学 列日大学

(72)发明人 N·吉勒斯 D·斯文特 L·昆顿

H·雷恩弗兰克 R·威兹戈尔

B·莫拉克 C·曼德里

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 王芝艳 吴小瑛

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

(56)对比文件

US 5663143 A, 1997.09.02,

Hidetoshi Inagaki et al. Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean Pseudechis australis.《Toxicon》.2011,第59卷(第1期),第74-80页.

Punniyakoti T. et al. Arginine vasopressin receptor antagonists (vaptans): pharmacological tools and potential therapeutic agents.《Drug Discovery Today》.2010,第15卷(第19-20期),第826-841页.

审查员 张蕊

权利要求书2页 说明书18页

序列表6页 附图13页

(54)发明名称

加压素-2受体的肽拮抗剂

(57)摘要

本发明涉及可用于治疗、诊断、医学成像、药物筛选和研究的一组新的具有加压素-2受体拮抗活性的蛇毒碱性蛋白酶抑制剂。

1. 分离的蛋白质在制备用作加压素-2受体 (V2R) 拮抗剂用于涉及V2R途径的疾病的治疗的药物中的用途,所述分离的蛋白质由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,或者由与SEQ ID NO:1的差别在于具有单个氨基酸取代S3K,4个氨基酸的N-末端缺失,2个氨基酸的N-末端缺失和2个氨基酸的C-末端缺失,或者4个氨基酸的N-末端缺失和2个氨基酸的C-末端缺失的氨基酸序列组成,

并且所述氨基酸序列包含:

(i) 在SEQ ID NO:1的位置15至18的基序 $X_1X_2X_3X_4$,其中, X_1 是天冬氨酰(N), X_2 是甘氨酸(G), X_3 和 X_4 为疏水氨基酸,和

(ii) 一个至三个在两个半胱氨酸残基之间的二硫键。

2. 根据权利要求1所述用途,其中,所述蛋白质由选自由下述组成的组中的序列组成:氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述疾病选自由以下组成的组中:以正常容量性低钠血症或高容量性低钠血症为特征的病理状况、抗利尿不适当肾病综合征、先天肾原性尿崩症、多囊性肾病、癌症、血栓和美尼尔氏病。

4. 权利要求1或2中所定义的分开的蛋白质在制备用于诊断涉及V2R表达水平提高或降低的病理的试剂中的用途。

5. 权利要求1或2中所定义的分开的蛋白质的用途,用于筛选V2R配体。

6. 权利要求1或2中所定义的分开的蛋白质的用途,用作用于产生V2R晶体的结晶试剂。

7. 分离的蛋白质,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,或者由与SEQ ID NO:1的差别在于具有单个氨基酸取代S3K,4个氨基酸的N-末端缺失,2个氨基酸的N-末端缺失和2个氨基酸的C-末端缺失,或者4个氨基酸的N-末端缺失和2个氨基酸的C-末端缺失的氨基酸序列组成,并且其包含:

(i) 在SEQ ID NO:1的位置15至18的基序 $X_1X_2X_3X_4$,其中, X_1 是天冬氨酰(N), X_2 是甘氨酸(G), X_3 和 X_4 为疏水氨基酸,和

(ii) 一个至三个在两个半胱氨酸残基之间的二硫键,

并且其中,所述蛋白质具有V2R拮抗活性。

8. 根据权利要求7所述的蛋白质,其中,所述序列包含1至3个选自C1和C6之间二硫键、C2和C4之间二硫键以及C3和C5之间二硫键的二硫键,其中,C1至C6均为半胱氨酸残基,并且从所述序列的N端至C端分别编号。

9. 根据权利要求8所述的蛋白质,其中,C1至C6分别在SEQ ID NO:1的位置5、14、30、38、51和55。

10. 根据权利要求7~9的任一项所述的蛋白质,其由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15的任一条组成。

11. 根据权利要求7~9的任一项所述的蛋白质,所述蛋白质带有标记。

12. 根据权利要求10所述的蛋白质,所述蛋白质带有标记。

13. 表达载体,其包含编码权利要求7至10的任一项所述的蛋白质的多核苷酸。

14. 宿主细胞,所述宿主细胞被编码根据权利要求7~12的任一项的蛋白质的多核苷酸或根据权利要求13的载体修饰。

15. 药物组合物,至少包含:(i) 根据权利要求7~12的任一项的蛋白质,编码所述蛋白

质的多核苷酸,和/或包含所述多核苷酸的载体,和(ii)药学上可接受的载体。

16. 诊断试剂或成像试剂,其包含根据权利要求11或12所述的带有标记的蛋白质。

加压素-2受体的肽拮抗剂

[0001] 本发明涉及可用于治疗、诊断、医学成像、药物筛选和研究的一组新的具有加压素-2受体拮抗活性的蛇毒碱性蛋白酶抑制剂。

[0002] G蛋白偶联受体 (GPCR) 构成内在膜蛋白最大的家族。已经鉴别超过800个GPCR, 相关的基因占人基因组中编码序列的2~3%。它们参与调控大部分的生理功能, 并且是当前销售的大约30%的药物的靶标。GPCR中, 精氨酸-加压素V2受体亚型 (也称为加压素-2、加压素2、加压素类型2或V2受体, 并且缩写为AVPR2或V2R) 被认为是结合到细胞内环化腺核苷单磷酸酯 (cAMP) 信号转导通路的受体的原型。它代表基本的治疗模型。

[0003] 精氨酸-加压素 (AVP) 也称为抗利尿激素, 是在下丘脑产生的9个氨基酸的环肽。它通过3种不同的受体亚型发挥作用: 加压素1a (V1aR)、加压素1b (V1bR) 和加压素2 (V2R)。V1aR和V1bR的功能通过它们与G蛋白质Gq的相互作用而介导, 导致细胞内钙浓度的提高。V1aR主要在肝脏、平滑肌细胞 (血管收缩)、血小板、脑、视网膜和生殖器官中表达, 而V1bR主要在垂体前叶表达, 在此在应激响应中其刺激作用控制皮质激素轴。V1bR还在胰腺和肾上腺中表达, 其在此调节胰高血糖素、胰岛素和儿茶酚胺的分泌。V2R位于肾收集管, 其在此结合G蛋白。G蛋白活化腺苷酸环化酶, 转而导致环化AMP的产生提高。cAMP活化蛋白激酶A, 蛋白激酶A磷酸化和活化负责肾脏中水的再吸收的称为水通道蛋白的水通道。V2R还在内耳中表达, 其在此调节渗透压。

[0004] V2R参与主要生理功能的调节, 并且是用于开发治疗病症的新治疗药物的靶标。已经开发了称为vaptan的非肽类V2R拮抗剂, 并在许多临床试验中进行了测试, 但是它们中大多数由于其肝毒性而未得到药物批准机关的批准。目前, FDA和/或EMA仅批准了Tolvaptan (OPC-41061) 和Conivaptan (YM-087)。

[0005] 以正常容量性低钠血症或高容量性低钠血症为特征的病理状况

[0006] AVP的过度分泌是诸如低钠血症的疾病的主要病理原因, 并且解释了为何使用V2R拮抗剂在以正常容量性低钠血症或高容量性低钠血症为特征的病理状况中, 例如在SIADH (抗利尿激素分泌不当综合征)、肝硬化和充血性心力衰竭 (CHF; Ghali et al., Cardiology, 2008, 111, 147-157) 中, 如此有效。SIADH由AVP的过度分泌引起, AVP的过度分泌导致过量的水的留存并由此产生Na⁺浓度的减小以及肺和中枢神经系统中的水肿。V2R拮抗剂通过它们的利尿作用提高血清的Na⁺水平, 或使血清的Na⁺水平正常。Tolvaptan (OPC-41061) 和Conivaptan (YM-087) 已经被FDA和/或EMA批准用于诊断正常容量性低钠血症或高容量性低钠血症、SIADH、充血性心力衰竭和肝硬化的患者 (Arai et al., Curr Opin Pharmacol., 2007, 7, 124-129; Manning et al., Prog. Brain Res., 2008, 170, 473-412)。V2R拮抗剂可能潜在有益于以正常容量性低钠血症或高容量性低钠血症为特征的其它病理状况 (例如脑水肿) (Walcott et al., Neurotherapeutics, 2012, 9, 65-72)。

[0007] 抗利尿不适当肾病综合征 (Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis, NSIAD)

[0008] NSIAD的起因是V2R突变, 例如负责受体的组成型活性的R137C和R137L。尽管血清加压素水平低, 但患者表现为低钠血症以及高的尿的渗透摩尔浓度。在细胞培养物

(Tenenbaum et al., PLoS One, 2009, 4, e8333) 或患有 NSIAD 的患者 (Decaux et al., JASN, 2007, 18, 606-612) 中, V2R 拮抗剂 Satavaptan 和 Tolvaptan 不能够抑制该组成型活性。

[0009] 先天肾原性尿崩症 (Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus, cNDI)

[0010] 该疾病与 V2R 的失活突变相关。不足的受体被隔离在细胞内, 并且不能被循环的 AVP 获得。这导致特别是在儿童中的具有严重脱水的多尿症。V2R 拮抗剂 (vaptan) 作为药物伴侣, 它们能够渗透细胞, 并且可解救突变的受体 (Morello et al., J. Clin. Investigation, 2000, 105, 887-895)。在一些情况下, 这使得受体被 AVP 刺激, 以恢复抗利尿作用 (Bernier et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2006, 17, 232-243; Robben et al., Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 2007, 292, 253-260)。Vaptan 在临床试验中进行了测试, 但是大多数由于其毒性而未被 FDA 批准 (Manning et al., Prog. Brain Res., 2008, 170, 473-512)。目前, 仅 Tolvaptan 被 FDA 批准。

[0011] 多囊性肾病

[0012] 多囊性肾病特征为出现许多囊, 在大多数患者中最终导致末期肾衰竭。尽管在血液中具有高的加压素浓度, 但在 PKD1 和 PKD2 基因中具有突变的患者不能够浓缩尿。对于该病症目前可用的治疗为透析或移植。V2R 拮抗剂在隐性和显性多囊性肾病的不同动物模型 (包括 CD1^{pcy/pcy} 小鼠模型) 中被证明减缓病程 (Gattone et al., Nature Medicine, 2003, 9, 1323-1326; Torres, V.E., Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2008, 3, 1212-1218; Wang et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2008, 19, 102-108)。CD1^{pcy/pcy} 小鼠是由编码肾胱素-3 (nephrocystin-3) 的 NPHP3 基因中的错义突变引起的常染色体隐性囊性肾病的模型, 肾胱素-3 是参与肾小管的发育和功能的蛋白质。该突变导致肾囊肿的形成以及末期肾衰竭。此外, 对于患有常染色体显性多囊性肾病的患者的 III 期临床试验显示, 在 3 年期间给患者施用 Tolvaptan 减少了囊衬里上皮细胞的增殖 (Higashihara et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2011, 6, 2499-2507)。

[0013] 癌症

[0014] 通过与抑制蛋白 (arrestin) 的相互作用, V2R 刺激导致 cAMP 和 MAP 激酶参与的信号转导通路的活化, 从而有助于增殖反应。例如, 注射 AVP 到小鼠引起可被 V2R 拮抗剂抑制的肾小管上皮细胞的增殖 (Alonso et al., Endocrinology, 2009, 150, 239-250)。此外, 诸如 V2R 拮抗剂的利尿剂能够抑制肾癌细胞 (Bolignano et al., Urol. Oncol., 2010, 28, 642-647) 和肺癌细胞 (Pequeux et al., Endocr. Relat. Cancer, 2004, 11, 871-885) 的增殖。这些结果表明 V2R 拮抗剂是抗不同类型的癌症的良好的治疗候选物。

[0015] 血栓

[0016] 血管性血友病因子 (VWF) 涉及初步止血。已经证明 AVP 还有 V2R 特异性激动剂, dDAVP (minirin[®]), 通过它们与 V2R 的相互作用而提高 VWF 和 VIII 因子的水平 (Kaufmann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106, 107-116)。过量的凝固可导致血栓 (血块), 可通过使用 V2R 拮抗剂而限制凝血因子的分泌, 得到治愈。

[0017] 美尼尔氏病

[0018] 在法国, 估计美尼尔氏病的发病率为 1/13,300, 其发病机制大部分未知。内淋巴肿胀认为是特有的病症, 其可由内淋巴分泌过多或由再吸收不充分引起。内耳美尼尔氏病看来是诸如眩晕、恶心、耳鸣和听力丧失的症状的根源。耳蜗压力提高被认为损害了神经胶质

细胞正确检测声波或运动的能力 (Kitahara et al., J. Neuroendocrinol., 2008, 20, 1295-1300)。目前, 使用抑制碳酸酐酶并用作低钾血利尿剂的乙酰唑胺 (醋氮酰胺) 进行治疗。V2R 可通过降低向内耳的渗透压而用于治疗美尼尔氏病。

[0019] 虽然已经清楚地证明了 vaptan 对多种病症均具有 V2R 拮抗剂的治疗效果, 但是它们的治疗用途仍受限于一些主要缺点:

[0020] —Vaptan 由于它们对细胞色素 CYP3A4 的抑制作用而具有肝毒性。由于这个原因, 使用它们必须要严格监测患者, 并且限制它们的长期施用。一些 Vaptan 仅静脉注射, 这限制了它们用于住院患者。

[0021] —Vaptan 仅对 V2R 具有一些选择性, V2/V1a 选择性指数为 112 (Satavaptan) 至 0.15 (Conivaptan)。

[0022] —Vaptan 是 MAP 激酶活化的激动剂。因此, 它们不能完全阻断特异的 V2R 相关信号转导通路。

[0023] —Vaptan 在生理缓冲液中溶解度差, 并且生物可用度有限 (Bernier et al., JASN, 2006, 17, 591-)。

[0024] 因此, 需要新的 V2R 拮抗剂, 与目前可用的非肽 V2R 拮抗剂相比, 所述新的 V2R 拮抗剂用于治疗用途的性能得到改善, 尤其其 V2R 选择性提高且毒性降低。

[0025] Kunitz 结构域是 Kunitz-型蛋白酶抑制剂的活性结构域。它们相对较小, 具有约 50~60 个氨基酸的长度, 并具有富含二硫键的 α 和 β 折叠结构。具有该结构域的大多数序列属于 kunitz/牛胰脏胰蛋白酶抑制剂家族, 包括牛胰脏胰蛋白酶抑制剂 (BPTI 或碱性蛋白酶抑制剂) 和许多其它成员, 例如蛇毒碱性蛋白酶抑制剂 (如绿窄头眼镜蛇毒素 (dendrotoxins))、哺乳动物的间- α -胰蛋白酶抑制剂、trypstatin (在老年痴呆症的淀粉样蛋白的可选拼接形态中发现的结构域)、在 VI 型和 VII 型胶原蛋白的 α -1 和 α -3 链的 C-末端的结构域、组织因子通路抑制剂的前体和在豆类种子中包含的 Kunitz STI 蛋白酶抑制剂。

[0026] 绿窄头眼镜蛇毒素为一组从黑曼巴蛇 (*Dendroaspis polyepis polyepis*) 和东部绿曼巴蛇 (*Dendroaspis angusticeps*) 的毒液中分离的神经毒素, 它们为神经元中特定亚类的电压门控钾离子通道的选择性阻断剂, 从而增强了乙酰胆碱在肌肉神经接合处的释放。由于高的效能以及对钾离子通道的选择性, 绿窄头眼镜蛇毒素代表了为研究这些离子通道蛋白的结构和功能以及用于治疗人类疾病的有用的药物制剂 (WO 2007/019267)。绿窄头眼镜蛇毒素是由少于 100 个氨基酸 (通常约 57~60 个氨基酸) 的单肽链组成的小蛋白, 所述单肽链折叠成 Kunitz 结构, 即富含二硫键的 α 和 β 折叠, 所述折叠包含具有 1-6、2-4、3-5 连接的 3 个二硫键, 并且排列形成扭曲的双链反平行的 β 折叠片, 随后是 α 螺旋 (Berndt et al., J. Mol. Biol., 1993, 234, 735-750)。

[0027] 本发明人已经从绿曼巴蛇的毒液分离了新的毒素, 并且他们已经证明命名为 U-Da2a 的该毒素是 kunitz/牛胰脏胰蛋白酶抑制剂家族的蛇毒碱性蛋白酶抑制剂的成员, 是竞争性和选择性的 V2R 拮抗剂。他们还发现 U-Da2a 序列的第 15~18 位中的氨基酸基序对于 U-Da2a 对 V2R 的竞争性拮抗活性至关重要, 并且在这些位点具有相似的基序的其它蛇毒碱性蛋白酶抑制剂也是 V2R 拮抗剂, 而不具有该基序的蛇毒碱性蛋白酶抑制剂不是 V2R 拮抗剂。这些结果允许定义一组新的具有 V2R 拮抗活性的蛇毒碱性蛋白酶抑制剂, 包括具有该具体的氨基酸基序的新的以及已知的绿窄头眼镜蛇毒素。

[0028] 作为V2R的拮抗剂,该组蛇毒碱性蛋白酶抑制剂的蛋白质可用于各种应用,包括治疗、诊断、治疗反应的预测、医学成像、药物筛选和研究。具体地,这些蛋白为治疗涉及V2R通路的疾病(例如低血钠症和多囊性肾病)的治疗提供良好的治疗候选物。

[0029] 本发明的一个方面涉及分离的蛋白质,在涉及加压素-2受体(V2R)途径的疾病的治疗中用作V2R拮抗剂,所述分离的蛋白质包含与SEQ ID NO:1的1~57残基至少50%的同一性的氨基酸序列(I),并且包含:

[0030] (i) 在SEQ ID NO:1的位置15至18的基序 $X_1X_2X_3X_4$,其中, X_1 是天冬氨酰(N), X_2 是甘氨酸(G), X_3 和 X_4 为疏水氨基酸,或者 X_1 是蛋氨酸(M), X_2 和 X_3 为苯丙氨酸(F), X_4 为异亮氨酸(I),和

[0031] (ii) 一个至三个在两个半胱氨酸残基之间的二硫键。

[0032] 在下面的描述中,使用标准的一个字母的氨基酸编码。疏水氨基酸是指M、W、F、A、V、L、I、Y和P。

[0033] 用于本发明的不同用途的可为天然的、重组的或合成的蛋白质包含氨基酸序列(I)或由氨基酸序列(I)组成。所述序列(I)为具有竞争性V2R拮抗活性的药理活性的毒素,命名为蛋白质、肽或毒素。用于本发明的不同用途的蛋白质具有绿窄头眼镜蛇毒素典型的Kunitz-型结构,其为扭曲的双链反向平行 β 折叠片,后面为 α 螺旋,并包含1~3个二硫键以稳定所述蛋白质并促成其结构构象。

[0034] 这些性质可通过本领域技术人员已知的技术容易地验证,例如通过本申请的实施例中描述的那些技术验证。

[0035] 本发明包括蛋白质以及此类蛋白质的肽模拟物(peptidomimetic)的用途,所述蛋白质包含通过肽键连接的天然氨基酸(20个基因编码的L构型和/或D构型的氨基酸),或者由通过肽键连接的天然氨基酸(20个基因编码的L构型和/或D构型的氨基酸)组成,在所述肽模拟物中氨基酸或肽键被功能类似物取代。此类功能类似物包括除了所述20个基因编码的氨基酸外的全部已知的氨基酸。在通过引用合并于此的US 2008/0234183的表1A中提供了非编码氨基酸的非限制性列表。本发明还包括通过引入任何修饰到所述蛋白质的一个或多个氨基酸残基、肽键、N-末端和/或C-末端而从上述蛋白质衍生的修饰蛋白质,只要在所述修饰蛋白内保持了所述V2R拮抗活性。通过本领域技术人员已知的常规方法引入到所述蛋白质中的这些修饰以非限制的方式包括:非产生蛋白质的氨基酸(D氨基酸或氨基酸类似物)对天然氨基酸的取代;肽键的修饰,尤其是retro型或retro-inverso型键或者不同于肽键的键;环化,以及加入化学基团到蛋白质的侧链或末端,尤其是使感兴趣的试剂结合到本发明所述的蛋白质的化学基团。这些修饰可用于标记所述蛋白质,并提高其对V2R的亲合力、其生物利用度和/或其稳定性。

[0036] 氨基酸序列同一性百分比定义为在序列比对并且在必要时引入空位以获得最大的序列同一性时,对比的序列中与参考序列SEQ ID NO:1相同的氨基酸残基的百分比。然后,根据下面的公式确定同一性百分比:

[0037] 同一性百分比 = $100 \times [1 - (C/R)]$, 其中,C为参考序列SEQ ID NO:1和对比序列在SEQ ID NO:1的整个长度上(即SEQ ID NO:1的第1~57位)的差异的数目,其中,(i) 参考序列中的每个在对比序列中不具有相应的对齐氨基酸的氨基酸,(ii) 参考序列中的每个空位,和(iii) 参考序列中与对比序列中的氨基酸不同的每个对齐氨基酸构成差异;并且R是

参考序列中在与对比序列的比对的全长上的氨基酸的数目,其中在参考序列中产生的任何空位也计算为氨基酸。

[0038] 可以本领域技术人员已知的各种方式,例如使用公众可用的计算机软件例如BLAST(Altschul et al., J.Mol.Biol., 1990, 215, 403-)进行目的在于确定氨基酸序列同一性百分比的比对。当使用这样的软件时,优选使用默认参数,例如用于空位罚分和延长罚分的默认参数。对于氨基酸序列,使用BLASTP程序,其默认字长(W)为3,期望值(E)为10。

[0039] 例如,图1B提供的Blackelin-3(SEQ ID NO:5;83个氨基酸)与U-Da2a(SEQ ID NO:1)的比对显示了在参考序列和对比序列的比对的长度上,即SEQ ID NO:1的整个长度(SEQ ID NO:1的第1~57位)上,在参考序列中无空位,在对比序列中无空隙,并且在参考序列中有23个氨基酸与对比序列中的对齐氨基酸序列不同。因此,C=23,R=57。同一性% = $100 \times [1 - (23/57)]$ 。Blackelin-3包含与SEQ ID NO:1的第1~57位具有60%同一性的氨基酸序列。

[0040] 在优选的实施方式中,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:1的残基1~57至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列(I),或由与SEQ ID NO:1的残基1~57至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列(I)组成。优选地,所述序列(I)与SEQ ID NO:1的残基1~57具有至少60%的同一性。更优选地,所述序列(I)与SEQ ID NO:1的残基1~57具有至少65%的同一性。

[0041] 在另一个优选的实施方式中,序列(I)包含选自由NGFF和NGLF组成的组中的基序X₁X₂X₃X₄。

[0042] 在另一个优选的实施方式中,序列(I)具有达100个氨基酸,更优选约60个氨基酸,并选自由SEQ ID NO:1以及与SEQ ID NO:1具有区别的序列组成的组,所述区别为SEQ ID NO:1中1至5个氨基酸的分散的缺失和/或插入,和/或1至30、优选1~15、1~10或1~5个氨基酸的取代和/或末端缺失。

[0043] 所述缺失和/或插入有利地选自:(i)分散在SEQ ID NO:1中的一个至五个单氨基酸缺失/插入,和(ii)在SEQ ID NO:1的一端或两端的1~5个氨基酸的末端缺失。优选地,所述末端缺失选自SEQ ID NO:1的1、2、3或4个氨基酸残基的N-末端缺失和/或1或2个氨基酸残基的C-末端缺失。

[0044] SEQ ID NO:1的取代有利地选自1~10,优选1~5个保守的取代,即用一种氨基酸被另一种具有相似化学或物理性质(大小、电荷或极性)的氨基酸取代,所述另一种氨基酸整体不改变蛋白的功能性质。更优选地,所述保守取代选自下述5组中的一种:第1组一小的脂族、非极性或稍有极性的残基(A、S、T、P、G);第2组一极性、带负电荷的残基和它们的酰胺(D、N、E、Q);第3组一极性、带正电荷残基(H、R、K);第4组一大的脂族非极性残基(M、L、I、V、C);以及第5组一大的芳香残基(F、Y、W)。

[0045] 有利地,在SEQ ID NO:1的位置5和55、14和38和/或30及51的半胱氨酸残基没有被突变。

[0046] 优选地,所述蛋白质包含选自由以下组成的组中的序列,或所述蛋白质由选自由以下组成的组中的序列组成:氨基酸序列SEQ ID NO:1~5,包含1、2、3或4个氨基酸残基的N-末端缺失和/或1或2个氨基酸残基的C-末端缺失的SEQ ID NO:1~3的任一条的变体,以及包含1至30个氨基酸残基的N-末端缺失和/或1或2个氨基酸残基的C-末端缺失的SEQ

ID NO:5或6的变异体。此类优选的蛋白质的实例为SEQ ID NO:11~13。

[0047] 在另一个优选的实施方式中,所述序列(I)包含1~3个(1、2或3),优选三个选自C1与C6之间、C2和C4之间以及C3和C5之间的二硫键的二硫键,其中,C1至C6均为半胱氨酸残基且分别从所述序列(I)的N端至C端进行编号。此类蛋白质的实例为SEQ ID NO:1和16,分别包含3个和2个二硫键。优选地,C1在所述序列(I)的位置1至31,更优选1至15、1至10或1至5(1、2、3、4或5),并且与C6间隔 50 ± 2 个氨基酸;C2和C4、C3和C5分别间隔 25 ± 2 和 20 ± 2 个氨基酸。更优选地,C1至C6分别在SEQ ID NO:1的位置5、14、30、38、51和55。此外,C1和/或C6分别有利地为所述蛋白质的第一个和最后一个残基。

[0048] 在另一个优选的实施方式中,所述蛋白质是修饰的蛋白质,缺少SEQ ID NO:1的4个N-端和2个C-端残基,其中,通过例如乙酰化化学阻止C1的NH₂官能,并且还通过例如酰胺化化学阻止C6的COOH官能。所述肽为已知更耐外切蛋白酶的环肽。

[0049] 在另一个优选的实施方式中,所述蛋白质是修饰的蛋白质,其中,内切蛋白酶靶向的一个或多个氨基酸残基被它们的相应非天然的D-型取代。例如,胰蛋白酶靶向的一个或多个精氨酸和/或赖氨酸残基可被其相应的非天然形态取代。

[0050] 在另一个优选的实施方式中,所述蛋白质是修饰的蛋白质,其中,一个或多个二硫键被非天然的键取代。优选地,所述非天然键对还原具有抗性,例如,如噻唑烷连接。这些连接提高了本发明的蛋白质对生物流体中存在的还原剂的抗性。

[0051] 在另一个优选的实施方式中,所述蛋白质是融合蛋白质或嵌合蛋白质,包含融合到所述序列(I)的一个末端的序列(II),以及可选地融合到所述序列(I)的另一个末端的另一条序列(III)。所述蛋白质的长度对于本发明不关键,只要保持V2R拮抗活性。序列(II)和(III)包含一个或多个其它蛋白质/肽部分,包括允许本发明的蛋白质的纯化、检测、固定和/或细胞靶向,和/或提高对V2R的亲性和生物利用度、在表达系统中的产量和/或蛋白质的稳定性的那些部分。所述部分可选自:(i)标记部分,例如荧光蛋白(GFP及其衍生物、BFP和YFP)、(ii)报告部分,例如酶标签(荧光素酶、碱性磷酸酶、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、 β -半乳糖苷酶),(iii)结合部分,例如表位标记(polyHis6、FLAG、HA、myc.)、DNA结合结构域、激素结合结构域、用于固定到支撑物上的聚赖氨酸标签,(iii)稳定部分,例如ZZ、DsBa和DsBb,以及(iv)用于将所述嵌合蛋白送到特定的细胞类型或细胞区室的靶向部分。此外,有利地,序列(II)和/或(III)包含连接子,所述连接子足够长,以避免抑制序列(I)与序列(II)和/或(III)之间的相互作用。连接子还可包含蛋白酶识别位点,例如,用于从本发明的纯化嵌合蛋白去除亲和标签和稳定化部分。

[0052] 在另一个优选的实施方式中,所述蛋白质与提高其生物利用度,尤其是降低其尿排出的试剂(例如,如聚乙二醇)结合。

[0053] 本发明包括编码所述蛋白质的可表达形式的多核苷酸或包含所述多核苷酸的重组载体的用途。编码所述蛋白质的可表达形式的多核苷酸是指当在细胞中或无细胞的系统中表达时产生功能蛋白质的核酸分子。

[0054] 根据本发明,所述蛋白质、多核苷酸和/或载体可包含在药物组合物中,所述药物组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0055] 所述药物组合物经配制用于通过多种路径施用,所述途径包括但不限于口服、胃肠外或局部给药。所述药学上可接受的载体是通常使用的那些。

[0056] 此外,可通过本领域技术人员熟知的方式有利地修饰所述蛋白质,以改变其生理特性,尤其是改善其在生物体内的半衰期(糖基化:HAUBNER R.et al.,J.Nucl.Med.,2001,42,326-36;与PEG结合:KIM TH.et al.,Biomaterials,2002,23,2311-7),其溶解度(与白蛋白杂合:KOEHLER MF.et al.,Bioorg.Med.Chem.Lett.,2002,12,2883-6),其对蛋白酶的抗性(非天然的氨基酸(例如D构象)),和/或其肠道吸收(Lien et al.,TIB,2003,21,556-)。

[0057] 所述药物组合物包含治疗有效量的所述蛋白质/多核苷酸/载体,例如足以对施用其的个体显示有益。所述药学有效量取决于使用的组合物、给药路径、被治疗的哺乳动物的类型(人或动物)、考虑的具体哺乳动物的身体特征、同时给药(concurrent medication)以及医学领域技术人员将认识到的其它因素。

[0058] 本发明还提供了治疗有需要的患者中涉及V2R通路的病理的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的所述蛋白质、多核苷酸和/载体。

[0059] 涉及V2R通路的病理不受限制的包括:(i)以正常血容性或低血容性低钠血症为特征的病理状况,例如充血性心力衰竭(CHF)、肝硬化、抗利尿激素分泌失调综合征(SIADH)和脑水肿,(ii)抗利尿不适当肾病综合征(NSIAD),(iii)先天肾源性尿崩症(cNDI),(iv)多囊性肾病,(v)癌症,包括肾癌或肺癌,(vi)血栓症和(vii)美尼尔氏病。

[0060] 本发明的另一方面涉及所述蛋白质用作诊断剂或成像剂的用途,所述诊断剂或成像剂可用在光学成像、磁共振成像(MRI)和正电子发射断层成像(PET)中,用于在生理或病理条件下原位(体内或体外)检测V2R,或用于对内源或外源刺激的响应,目的是为了诊断或研究。所述蛋白质还用作药物筛选工具,用于筛选V2R配体,包括V2R激动剂或拮抗剂。

[0061] 在优选的实施方式中,所述蛋白质连接有标记剂,所述标记剂产生可检测的和/或可量化的信号,尤其是放射剂、磁化剂或发光剂(放射发光剂、化学发光剂、生物发光剂、荧光剂或磷光剂)。可使用本领域技术人员熟知的标准的连接技术通过共价或非共价键直接或间接标记所述标记的蛋白质。标记剂的实例包括放射性同位素,例如锝-99 (^{99}Tc)、氟18 (^{18}F)、氦 (^3H) 和碘 (^{125}I);发光剂,例如AlexaFluor、FITC和青色素3;顺磁性造影剂,例如钆化合物,以及超顺磁性造影剂,例如氧化铁纳米颗粒。

[0062] 在更优选的实施方式中,所述标记的蛋白质共价连接至放射剂或荧光剂。

[0063] 可通过如下实现标记剂(例如荧光剂或放射剂)与蛋白质的共价连接:(i)在蛋白质的化学合成过程中在所述蛋白质的N-末端或C-末端引入标记试剂,或者(ii)在重组或合成的蛋白质中引入反应基团(自由的半胱氨酸、生物素、叠氮基),然后使用所述基团共价连接所述标记试剂。

[0064] 优选地,所述标记试剂共价连接到所述蛋白质的N端或C端,因为所述蛋白质的端点不参与其与V2R的结合。

[0065] 本发明的一个主题是所述蛋白质用于体外诊断涉及V2R表达水平提高或降低的病理的用途。

[0066] 本发明的另一主题为所述蛋白质用于体内诊断涉及V2R表达水平提高或降低的病理。

[0067] 对于诊断用途,所述标记的蛋白质用于使V2R表达在来自患者的组织中原位可视化,并通过与来自健康个体的相同类型的组织相比来评价其表达水平。V2R的过表达表示的

诸如癌症的病理状态,而V2R的表达不足表示的是诸如先天肾源性尿崩症(cNDI)的病理状态。一旦诊断确立,可能确定对所诊断患者的有效治疗,包括使用V2R拮抗剂,例如用于治疗癌症或cNDI。

[0068] 本发明的一个主题为所述蛋白质作为用于研究V2R的研究工具的用途。

[0069] 本发明的另一个主题为用于体内和体外检测V2R的方法,所述方法至少包括步骤:

[0070] 一使待分析的细胞与所述标记蛋白质接触;和

[0071] 一检测所述标记的细胞。

[0072] 所述细胞的标记尤其是荧光标记或磁标记,其可通过本领域技术人员已知的任何技术(荧光显微检测、流式细胞术、磁共振成像)检测。

[0073] 在哺乳动物身体内的体内受体检测(细胞显影),尤其是实时检测,包括向所述哺乳动物施用(胃肠外注射、口服给药)所述肽的在前步骤。

[0074] 本发明的另一个主题是所述蛋白质用于筛选V2R配体的用途。

[0075] 本发明的主题还有筛选V2R配体的方法,所述方法包括:

[0076] 一使V2R与测试分子和标记蛋白质孵育,以及

[0077] 一测量在存在和缺少所述测试分子条件下获得的信号,其中,与不具有测试分子的对照相比在所述分子存在下较低的信号表明,所述测试分子是V2R配体。

[0078] 然后,使用本领域中熟知的药理实验,例如本申请的实施例中公开的那些药理实验,在表达V2R的细胞中检测所鉴定的配体对V2R的激动、拮抗作用。

[0079] 本发明的另一个主题为所述蛋白质用作结晶剂的用途,用于产生V2R晶体。然后,通过X射线衍射分析V2R晶体,以确定V2R的三维结构。

[0080] 本发明的另一方面是分离的蛋白质,所述分离的蛋白质包含氨基酸序列(I),所述氨基酸序列(I)与SEQ ID NO:1的1~57残基具有至少70%同一性,并且包含:(i)在SEQ ID NO:1的第15至18位的基序 $X_1X_2X_3X_4$,其中, X_1 是天冬氨酰(N), X_2 是甘氨酸(G), X_3 和 X_4 为疏水氨基酸,和(ii)至少一个在两个半胱氨酸残基之间的二硫键,并且其中,所述蛋白质具有V2R拮抗活性。

[0081] 本发明的蛋白质包括SEQ ID NO:1的蛋白质,命名为U-Da2a、U-Da2a蛋白质、U-Da2a肽或U-Da2a毒素。

[0082] 本发明的蛋白质属于在本发明中使用的蛋白质组的亚组。因此,本发明的蛋白质具有蛇毒碱性蛋白酶抑制剂的特征性Kunitz折叠以及V2R拮抗活性。本发明的蛋白质是天然的、重组或合成的蛋白质,如前面针对用在本发明中的蛋白质的解释,其可被修饰、嵌合和/或标记。

[0083] 与已知的非肽V2R拮抗剂不同,本发明的蛋白质具有下述有益特征:

[0084] -是V2R的高选择性配体,本发明的蛋白质相对于150种其它GPCR和8种心脏离子通道具有对V2R的绝对选择性。例如,U-Da2a具有超过10,000的V2R/V1a选择指数。高亲和力和强选择性的组合可降低治疗剂量并由此降低二级副作用。

[0085] -具有对V2R的纳摩尔亲和力。

[0086] -是第一个选择性和竞争性的拮抗剂,能够阻碍V2R的三个主要信号通路,即cAMP聚集、抑制蛋白募集和MAP激酶磷酸化,并且由此可产生一种新型治疗剂,

[0087] 一能够体内到达V2R靶标,并且在至少90天的期间每天使用饱和剂量,产生强的利

尿作用,没有任何毒性。

[0088] 一作为肽,显示额外的令人关注的性质:肽降解产物无毒性,完美的水溶解性,其不跨过血脑屏障,并且因此不影响中枢神经系统中受体的功能,并且其是用于产生新的诊断工具的先导化学结构。

[0089] 在优选的实施方式中,本发明的蛋白质包含与SEQ ID NO:1的残基1~57具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列(I),或由与SEQ ID NO:1的残基1~57有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列(I)组成。

[0090] 在另一个优选的实施方式中,所述序列(I)具有达75个氨基酸,更优选约60个氨基酸,并选自SED ID NO:1和与SEQ ID NO:1的区别在于1~15,优选1~10,更优选1~5个氨基酸的缺失、插入和/或取代的序列组成的组中。

[0091] 缺失和/或插入有利地选自:(i)分散在SEQ ID NO:1中的1~5个单氨基酸缺失/插入,和(ii)在SEQ ID NO:1的一端或两端的1~5个氨基酸的末端缺失。优选地,末端缺失选自SEQ ID NO:1的1、2、3或4个氨基酸残基的N-末端缺失和/或1或2个氨基酸残基的C-末端缺失。

[0092] SEQ ID NO:1的取代基有利地选自1~10,优选1~5个保守取代。有利地,在SEQ ID NO:1的位置5和55、14和38和/或30和51的半胱氨酸残基没有被突变。

[0093] 优选地,本发明的蛋白质包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的变体,或由氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的变体组成,所述SEQ ID NO:1的变体包含1、2、3或4个氨基酸残基的N-末端缺失和/或1或2个氨基酸残基的C-末端缺失。此类优选的蛋白质的实例为SEQ ID NO:11~13。

[0094] 在另一个优选的实施方式中,序列(I)包含1~3(1、2或3),优选3个选自C1与C6、C2和C4以及C3和C5之间的二硫键的二硫键,其中,C1至C6均为半胱氨酸残基并且从所述序列(I)的N端至C端进行编号。此类蛋白质的实例为SEQ ID NO:1和16,分别包含3个和2个二硫键。优选地,C1在所述序列(I)的位置1至5(1、2、3、4或5),并且与C6间隔 50 ± 2 个氨基酸;C2和C4、C3和C5分别间隔 25 ± 2 和 20 ± 2 个氨基酸。更优选地,C1至C6分别在SEQ ID NO:1的第5、14、30、38、51和55位。此外,有利地,C1和/或C6分别为所述蛋白质的第一个和最后一个残基。

[0095] 本发明另一方面涉及编码本发明的蛋白质的分离的多核苷酸。所述合成或重组的多核苷酸可为单链和/或双链的DNA、RNA或其组合。优选地,所述多核苷酸包含针对在其中表达所述蛋白质的宿主进行优化的编码序列。

[0096] 本发明另一方面涉及包含所述多核苷酸的重组载体。优选地,所述重组载体为当转染或转化到诸如哺乳动物、细菌或真菌细胞的宿主细胞时能够表达所述多核苷酸的表达载体。所述多核苷酸以正确的方向并以正确的表达用阅读框而插入到所述表达载体中。优选地,所述多核苷酸可操作地连接到至少一个转录调控序列,并且可选择地连接到至少一个翻译调控序列。重组载体包括遗传工程和基因治疗中通常使用的载体,包括例如质粒和病毒载体。

[0097] 本发明的另一方面提供了转化有所述多核苷酸或重组载体的宿主细胞。

[0098] 本发明的所述多核苷酸、载体、细胞可使用熟知的重组DNA技术用于生产本发明的蛋白质。

[0099] 本发明的另一方面涉及药物组合物,所述药物组合物包含至少一种本发明的蛋白质、多核苷酸和/或载体以及药学上可接受的载体。本发明另一方面涉及作为药物的本发明的蛋白质、多核苷酸和/或载体。

[0100] 本发明的另一方面涉及诊断试剂,所述诊断试剂包含本发明所述的蛋白质,优选标记的蛋白质。

[0101] 本发明还提供了试剂盒,所述试剂盒包含:(a) 容器,所述容器含有下述的一种或多种:溶液或冻干形式的本发明的蛋白质、多核苷酸、重组载体、修饰的宿主细胞、药物组合物、诊断剂或显像剂;(b) 可选择的第二容器,所述第二容器含有用于冻干制剂的稀释液或重配溶液;(c) 可选择的第三容器,所述第三容器含有分离的V2R受体或宿主细胞,能够以溶液或冻干形态表达V2R,以及可选择的说明书,所述说明书针对所述溶液的使用和/或所述重配和/或使用所述冻干制剂。

[0102] 根据本发明的V2R来自任何哺乳动物。优选地,本发明的V2R是人V2R。

[0103] 通过本领域中已知的常规方法制备本发明的多核苷酸。例如,通过由PCR或RT-PCR扩增核酸序列,通过用同源探针杂交而筛选基因组DNA文库,或者通过全部或部分的化学合成,产生所述多核苷酸。通过本领域中已知的常规的重组DNA和基因工程技术构建重组载体并引入到宿主细胞中。

[0104] 通过本领域技术人员已知的常规技术,尤其是通过固相或液相合成或通过重组DNA在合适的细胞系统(真核或原核)中的表达,制备所述蛋白质。更具体地,所述蛋白质及其衍生物可通过Merrifield等(J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-)首次描述的Fmoc技术固相合成,并通过反相高效液相色谱法纯化;所述蛋白质及其衍生物还可通过由本领域技术人员已知的任何方法获得的相应cDNA产生;所述cDNA克隆到真核或原核表达载体中,并且在细胞中产生的用重组载体修饰的蛋白质通过任何合适的方式(尤其是通过亲和层析)纯化。

[0105] 除非另外表明,本发明的实施将使用在本领域技术范围内的常规技术手段。此类技术在文献中有全面解释。

[0106] 除了上述内容外,本发明还包括其它内容,其将从参照附图、参考本发明的主题的示例性实施方式的下述说明中显现,附图中:

[0107] 一图1表示U-Da2a与其它已知毒素的序列比对。A. 绿窄头眼镜蛇毒素-B(Dtx-B Ala 27或Dtx-B-A27;SWISSPROT P00983.1;SEQ ID NO:2);绿窄头眼镜蛇毒素-E His55(DTx-E-H55;SWISSPROT P00984.1;SEQ ID NO:6);Mulgin-1(GenBank AAT45400.1;SEQ ID NO:4);Blackelin-3(GenBank ABV64393;SEQ ID NO:5);绿窄头眼镜蛇毒素-K(Dtx-K;SWISSPROT P00981.2;SEQ ID NO:8); α -绿窄头眼镜蛇毒素(Alpha-Dtx;SWISSPROT P00980.1;SEQ ID NO:9);牛胰脏胰蛋白酶抑制剂(BPTI;SWISSPROT P00974.2;SEQ ID NO:10)。右侧表示同一性百分比。B. U-Da2a与Blackelin-3的比对,说明了同一性百分比的测定。

[0108] 一图2描述了U-Da2a对在真核细胞中表达的不同加压素受体亚型的³H-AVP结合抑制。(○) V1aR、(◇) V1bR、(■) V2R。

[0109] 一图3描述了U-Da2a毒素在稳定表达人V2R的CHO细胞上对AVP诱导的cAMP产生的影响。A. 在缺少(●)或存在增加的U-Da2a浓度:20nM(■)、60nM(▲)、150nM(○)、300nM(■)

和500nM(◆)下,AVP诱导的对V2R的剂量响应曲线。B.U-Da2a毒素对V2R的通过增加的AVP浓度而引导的cAMP产生的影响的Schild图。从3个独立的实验获得这些累积数据。

[0110] 一图4描述了tsA细胞中U-Da2a对通过AVP与V2R-Rluc受体的作用而引导的 β -抑制蛋白-1-YFP移动的影响。A.在缺少(●)或存在提高的U-Da2a浓度:100nM(▲)、500nM(■)、1 μ M(▼)、5 μ M(○)和10 μ M(△)下,对V2R的AVP剂量响应曲线。B.U-Da2a毒素对由提高的AVP浓度引起的 β -抑制蛋白-1-YFP到V2-Rluc受体的移动影响的Schild图。从3个独立的实验获得这些累积数据。

[0111] 一图5描述了在tsA细胞中U-Da2a对由AVP对V2R的作用引起的MAP激酶磷酸化作用的影响。A.在缺少(●)或存在提高的U-Da2a浓度:0.6 μ M(■)、1 μ M(▲)、3 μ M(◆)、6 μ M(○)、10 μ M(□)、30 μ M(△)和60 μ M(◇)下,AVP对V2R剂量响应曲线。B.U-Da2a毒素对由提高针对V2R受体的AVP浓度引起的MAP激酶磷酸化作用的影响的Schild图。从3个独立的实验获得这些累积数据。

[0112] 一图6描述了U-Da2a毒素在CD1^{pcy/pcy}小鼠中的利尿作用。以1 μ mol/kg的单剂量向CD1^{pcy/pcy}小鼠皮下和腹膜内注射U-Da2a。在注射后,收集在代谢笼中24个小时的尿,并测定尿的体积。基础状态(空白柱)尿的体积以及注射U-Da2a后的尿体积(黑色柱)。

[0113] 一图7描述了U-Da2a毒素在CD1^{pcy/pcy}小鼠中对渗透摩尔浓度的影响。以1 μ mol/kg的单剂量向CD1^{pcy/pcy}小鼠皮下和腹膜内注射U-Da2a。注射后,收集在代谢笼中24个小时的尿,并测量尿的渗透摩尔浓度。基础状态(空白柱),U-Da2a(黑色柱)。

[0114] 一图8描述了在CD1^{pcy/pcy}小鼠中通过腹膜内给药提高U-Da2a毒素剂量的利尿效果。在第1、3和5天以0.01(空白柱)、0.1(灰色柱)和1(黑色柱) μ mol/kg向CD1^{pcy/pcy}小鼠腹腔内注射U-Da2a。在代谢笼中收集注射后24个小时的尿,并测定尿的体积。

[0115] 一图9描述了在CD1^{pcy/pcy}小鼠中通过腹膜内给药而提高U-Da2a毒素剂量对渗透摩尔浓度的影响。在第1、3和5天以0.01(空白柱)、0.1(灰色柱)和1(黑色柱) μ mol/kg向CD1^{pcy/pcy}小鼠腹腔内注射U-Da2a。在代谢笼中收集注射后24个小时的尿,并测定尿的体积。

[0116] 一图10描述了在CD1^{pcy/pcy}小鼠中每日以0.1 μ mol/kg腹腔注射U-Da2a达99天后U-Da2a的利尿效果。在0天(空白柱)、30天(浅灰色柱)、70天(深灰色柱)和99天(黑色柱),收集在代谢笼中24个小时的尿,并测定尿的体积。

[0117] 一图11描述了CD1^{pcy/pcy}小鼠中每日以0.1 μ mol/kg腹腔注射U-Da2a达99天后U-Da2a对渗透摩尔浓度的影响。在0天(空白柱)、30天(浅灰色柱)、70天(深灰色柱)和99天(黑色柱),收集在代谢笼中24个小时的尿,并测定尿的渗透摩尔浓度。

[0118] 一图12通过肾脏重量/体重、肾脏重量/心脏重量以及心脏重量/体重之比而描述了每日以0.1 μ mol/kg腹腔注射毒素99天后U-Da2a对CD1^{pcy/pcy}小鼠中肾脏重量的影响。用4%的多聚甲醛/1 $\times$ 磷酸盐缓冲盐水灌注固定小鼠,取出肾脏和心脏并称重。基础状态(空白柱),U-Da2a(黑色柱)。

[0119] 一图13描述了在CD1^{pcy/pcy}小鼠中每日以0.1 μ mol/kg腹腔注射毒素99天后U-Da2a对囊肿数目的影响。用4%的多聚甲醛/1 $\times$ 磷酸盐缓冲盐水灌注固定小鼠,去除肾脏,并包埋在石蜡中。A.用苏木精和曙红染色肾脏的横切面。B.使用程序ImageJ确定囊肿的数目,并与截面的大小相关联,从而获得相对的囊肿数目。U-Da2a(灰色柱),对照(0.9%NaCl;黑色柱)。

[0120] 一图14描述了U-Da2a和U-Da2a变异体对在真核细胞中表达的加压素V2受体亚型(V2R)的³H-AVP结合抑制。(●)AVP、(▲)U-Da2a WT、(□)U-Da2a-delta4-Nter、(◆)U-Da2a-delta2-Nter-delta2-Cter、(▼)U-Da2a-S3K、(○)U-Da2a-N15K G16A。

[0121] 一图15描述了U-Da2a、Dtx-B-A27S、Dtx-K、Dtx-E-R55对在真核细胞中表达的加压素V2受体亚型(V2R)的³H-AVP结合抑制。

[0122] 一图16描述了U-Da2a WT(空圆)和U-Da2a C14S C38S(实圆)对V2R的³H-AVP结合抑制。 K_i U-Da2a WT=1.03nM。 K_i U-Da2a C14S,C38S=6200nM。

[0123] 实施例1:U-Da2a的制备和生化表征

[0124] 1) 材料和方法

[0125] a) 蛋白的提取和纯化

[0126] 在Akta净化器(Pfizer,加拿大)上使用2mL/分钟的多步NaCl梯度通过在Source 15S上离子交换(2×15cm),将1克的东部绿曼巴蛇毒素(Latoxan,法国)分成13个试样。试样F通过反相色谱(Waters 600),在制备柱(C18,15μm,20cm,Vydac,法国,20mL/分钟)上,使用在100分钟内0~100%乙腈线性梯度和0.1%三氟乙酸进一步纯化。在C18Vydac柱(4.6mm,5μm,15cm,1mL/分钟)上使用0.5%乙腈/分钟的梯度最终纯化试样D。

[0127] b) 生化特征

[0128] 使用埃德曼降解法对U-Da2a测序

[0129] 可在Applied Biosystems(美国加利福尼亚州福斯特市)的Procise Model492自动测序仪上,使用埃德曼化学法进行U-Da2a(在涂布有Biobrene的滤器上装填200pmol)的N-末端测序。

[0130] 通过In-Source Decay MALDI-TOF测序

[0131] 用2μL的100mM三(羧乙基)磷化氢(Sigma-Aldrich,美国圣路易斯)还原15μg的纯化的U-Da2a,以去除二硫键。在50℃1个小时后,根据生产商的方案在Zip-Tip C₁₈微型柱(Millipore,Billerica,MA,美国)上纯化混合物。用5μL的乙腈/甲酸(ACN/FA)0.2%(50/50,v/v)进行还原毒素的洗脱。在乙腈/甲酸0.1%50/50(v/v)中饱和的1,5-二氨基萘(Acros,Geel,比利时)用作在原衰减实验(in-source decay experiment)的基质。1μL的毒素溶液和1μL的基质混合到一起,并点到MALDI板上。用装备有Nd-YAG Smartbeam激光器(MLN 202,LTB)的ULTRAFLEX II MALDI-TOF/TOF(Bruker Daltonics,德国不莱梅)质谱仪记录在原衰减(ISD)片段化。在55%的激光功率设定下,获得m/z在900和6500之间的光谱。

[0132] U-Da2a的消化、肽质量指纹图谱和C-末端表征

[0133] 将300ng纯化的毒素溶解在5μL的50mM NH₄HCO₃(pH 8)中。然后,加入2μL的250mM的二硫苏糖醇(DTT),以还原全部的二硫键(在56℃30分钟)。然后,在1个小时的期间内,室温下黑暗中用2.2μL的500mM碘乙酰胺(IAA)烷基化巯基。DTT和IAA均在50mM的NH₄HCO₃中初步制备。在37℃于4个小时的期间内,最终加入10ng的牛胰蛋白酶(1/30的比例)以消化U-Da2a。产生的肽用Zip-Tip C₁₈微型柱脱盐,并用10μL的ACN/FA 0.2%(50/50,v/v)洗脱。将1μL的该样品点到MALDI板上,并与1μL用作基质的2,5-二羟基苯甲酸(2,5-DHB)混合。用ULTRAFLEX II分光仪对肽进行分析(参见如上)。记录m/z 500至3600的肽质量指纹图谱。使用LIFT-TOF/TOF技术进行串联质谱实验(Detlev et al.,Suckau,Anal.Bioanal.Chem.,2003,376,952-965)。

[0134] 软件

[0135] 由Flex Control 3.0获得全部的数据。用Biotoools 3.2和Sequence Editor3.2分析产生的光谱。三种软件来自Bruker Daltonics。

[0136] c) 蛋白合成和加工

[0137] U-Da2a在Applied biosystems 433A肽合成仪(美国加利福尼亚州福斯特市)上合成,根据描述的用于毒蕈硷毒素(muscarinic toxin) MT1的方法纯化和折叠(Mourier et al., Mol Pharmacol, 2003, 63, 26-35)。简而言之,这涉及使用Fmoc策略的固相合成,肽裂解以及在反相柱上的纯化。然后,线性肽在含甘油(25%)以及氧化的和还原的谷胱甘肽(1mM)的pH 8的Tris缓冲液的存在下折叠24个小时。

[0138] 2) 结果

[0139] 通过筛选从绿窄头眼镜蛇提取的毒液,检测到了能够结合V2R的毒素的存在。纯化后,该毒素通过两种互补的方法(埃德曼降解法和质谱裂解法)测序,并进行生化表征。

[0140] 称为U-Da2a的毒素是57个氨基酸的肽:RPSFCNLPVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCKGNANRFSTIEK CRRTC VG (SEQ ID NO:1),具有3个二硫键(Cys1-Cys6、Cys2-Cys4和Cys3-Cys5),属于Kunitz结构家族。最接近的序列是其它蛇毒素,例如绿窄头眼镜蛇毒素E、B和K、Mulgin-1和Blakelin-3(图1)。这些绿窄头眼镜蛇毒素具有阻挡电压依赖性钾通道的性质。

[0141] 固相肽合成可以合成大量的GMP质量的U-Da2a。然后,加工所合成的肽,以形成二硫键。具有与天然产物相同的药性性质的该合成化合物用在下面的全部实验中。

[0142] 实施例2:U-Da2a的选择性谱

[0143] 1) 材料和方法

[0144] 1.1加压素受体的结合测试

[0145] 来自表达加压素受体的细胞的膜购自PerkinElmer (Courtaboeuf, 法国)。在96孔板中用³H-AVP (PerkinElmer, Courtaboeuf, 法国) 进行结合实验。在100μL终体积的反应混合物中包含50mM的Tris-HCl (pH 7.4)、10mM的MgCl₂和1g/L的BSA。室温孵育板3小时。结合反应通过在细胞收集器(PerkinElmer, Courtaboeuf, 法国) 上滤过预浸泡在0.5%的聚乙亚胺中的GF/C过滤器而终止,并干燥板。每个孔加Ultimagold 0 (25μl; PerkinElmer), 并使用TopCount计数器(PerkinElmer, Courtaboeuf, 法国) 计数样品(55%的计数率)。在1μM AVP的存在下测量非特异性结合。使用Kaleidagraph (Synergy software, Reading, PA, 美国) 使单点抑制质量作用曲线(one-site inhibition mass action curve) 拟合至抑制结合数据。使用Cheng-Prusoff方程(Cheng et al., Biochem. Pharmacol., 1973, 22, 3099-3108) 将IC₅₀值转化成用于竞争实验的K_i。

[0146] 1.2FLIPR测试

[0147] 进行FLIPR测试以描绘U-Da2a对不同G蛋白偶联受体(GPCR) 的激动活性和拮抗活性。

[0148] 测定对每个GPCR的活化百分值和抑制百分值。最初加入1μM U-Da2a后测定百分活化值。此外,在测定抑制百分值前在25℃温育U-Da2a 2分钟。在以所估算的EC₈₀浓度加入参考激动剂后,测定抑制百分值。使用EMD Millipore's GPCRProfiler®测试缓冲液准备全部的孔。GPCRProfiler®测试缓冲液为改良的汉克斯平衡盐溶液(HBSS), 其中HBSS经补充而含有20mM的HEPES和2.5mM pH7.4的丙磺舒(Probenecid)。在FLIPR^{TETRA}仪器上进行激动剂

测试,其中,U-Da2a、媒介对照和参考激动剂Emax在确定荧光基线后加到测定板。激动剂测试总计180秒,并用于评估每种化合物激活每种所测定的GPCR的能力。使用先前测定的EC₈₀量值进行拮抗测试,在确定荧光基线后,用参考激动剂的EC₈₀浓度刺激全部预孵育的(2分钟)样本化合物孔。使用相同的测试板以及用于激动测试的相同仪器进行拮抗测试。全部的测试板数据经合适的基线校正。在应用基线校正后,输出最大的荧光值,并处理数据以计算活化百分值(相对于Emax参考激动剂和媒介对照值),抑制百分值(相对于EC₈₀和媒介对照值),以及其它统计值(即,Z',重复数据值之间的百分比变化),以评估每个板的质量。在测试板的数据被否定时,进行另外的实验。

[0149] 1.3电生理测试

[0150] 根据制造商的说明用IonWorks Quattro和IonWorks HT电生理学平台(MOLECULAR DEVICES)进行电生理测试,以检测U-Da2a对心脏离子通道的活性(Nav1.5,Cav1.2,Kv4.3/KChIP2,Kv1.5,KCNQ1/minK,Kir2.1,hERG,HCN4)。在水中制备300μM浓度的U-Da2a。转移储备溶液到主板(master plate)并转移至测试板内,其中测试板每个孔放入2μl的溶液。在测试的当天,加入含有合适浓度的DMSO的198μl外部溶液,并彻底混合。这产生了1:100的稀释。当添加至IonWork中的孔时,产生进一步的1:3稀释,从而产生总计1:300的稀释。在每个测试板上,保留至少8个孔用于媒介对照(0.3%的DMSO),至少8个孔用于对所检测的细胞系特异的每种阳性对照。在最大的封闭浓度和合适的IC₅₀浓度下检测阳性对照。用于阳性对照的化合物:Nav1.5100μM和5mM Lidocaine,Kv4.3/KChIP220μM和500μM Quinidine,Cav1.21μM和100μM Nitrendipine,Kv1.5300μM和10mM4-AP,KCNQ1/minK 10μM和100μM Chromanol 293B,hERG 0.1μM和1μM Cisapride,HCN450μM和3mM Cesium,Kir2.120μM和500μM Barium。

[0151] 2) 结果

[0152] 使用放射性标记的配体³H-AVP在三种加压素受体亚型上于平衡时进行结合测定。U-Da2a对V2R具有2~5nM的亲和力,然而即便在1μM的浓度,毒素并不抑制³H-AVP结合到V1aR和V1bR(图2)。

[0153] 进行FLIPR测试,以描绘U-Da2a对157个GPCR的激动活性和拮抗活性:M1、M2、M3、M4、M5、A1、A2B、A3、α1A、α1B、α1D(D2-79)、α2A、β1、β2、β3、C3aR、C5aR、AT1、APJ、BB1、BB2、BB3、缓激肽B2(Bradykinin B2)、CGPR1、CaS、CB1、CB2、ChemR23、CCR1、CCR10、CCR2B、CCR3、CCR4、CCR5恒河猴(rhesus macaque)、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、XCR1/GPR5、CCK1、CCK2、CRF1、CRF2、D1、D2L、D4、D5、ETA、ETB、GPR41、GPR43、GABAB1b、GAL1、GAL2、生长素受体、GIP、GLP-1、GLP-2、胰高血糖素(glucagon)、分泌素受体、mGlu1、mGlu2、TSH、GnRH、H1、H2、H3、GPR99、GPR54、BLT1、CysLT1、CysLT2、LPA1、LPA3、LPA5/GPR92、S1P1、S1P2、S1P3、S1P4、S1P5、MrgD、MRGX1、MRGX2、MCHR1、MCHR2、MC2、MC4、MC5、胃动素受体(motilin receptor)、NMU1、NMU2、NPBW1/GPR7、Y2、Y4、NTR1、FPR1、FPR11、GPR109A、δ、κ、μ、NOP/ORL1、OX1、OX2、GPR39、OT、GPR103/QRFP、P2RY1、P2RY2、P2RY4、P2RY11、P2RY12、PAF、PK1、PK2、PRP、DP、EP1、EP2、EP3、EP4、FP、IP1、TP、胰蛋白酶活化的PAR、凝血酶活化的PAR、PTH1、PTH2、5-HT1A、5-HT2A、5-HT2B、5-HT2C、5-HT4B、5-HT6、SST2、SST3、SST4、SST5、GPR68/OGRI1、SUCNR1/GPR91、NK1、NK2、NK3、TRH、GPR14、V1A、V1B、V2、PAC1长的同工型、VPAC1和VPAC2。仅在V2R上检测到U-Da2a活性,拮抗69%,因此证明了U-Da2a对V2R受体的选择性。

[0154] 进行电生理学测试,以检测U-Da2a对心脏离子通道Nav1.5、Cav1.2、Kv4.3/KChIP2、Kv1.5、KCNQ1/mink、Kir2.1、hERG和HCN4的活性。U-Da2a在1 μ M的浓度下没有显示对任何离子通道的显著抑制。这些结果证明U-Da2a对V2R具有独特的活性,这与绿窄头眼镜蛇毒素对心脏离子通道的已知活性不同,并且出乎意料。

[0155] 实施例3:U-Da2a药理作用的体外表征

[0156] 1) 材料和方法

[0157] 1.1用加压素活化V2R诱导的对cAMP产生的竞争性拮抗效果

[0158] 将表达人V2R的稳定转染的CHO细胞(Cotte et al., J. Biol. Chem., 1998, 273, 29462-68; Phalipou et al., J. Biol. Chem., 1999, 274, 23316-23327)接种到96孔中。24个小时后,在50 μ l体积的包含DMEM、5% BSA和0.1mM R0201724 (CALBIOCHEM#557502, MERCK-MILLIPORE) (cAMP特异的磷酸二酯酶的选择性抑制剂)的培养介质中,在缺少(对照条件)或存在浓度增高的U-Da2a(抑制条件)下,用浓度增高的AVP刺激细胞24个小时。使用cAMP Dynamic 2试剂盒(Cisbio-International),通过Cisbio-International开发的均相时间分辨荧光共振能量传递技术(HTRF®)进行cAMP的测量。在37℃刺激30分钟后,通过加入50 μ l的裂解缓冲液到培养介质中而裂解细胞。裂解缓冲液包含用在665nm发射的受体荧光团标记的cAMP (cAMP-d2)。然后,加入50 μ l的包含用在620nm发射的供体荧光团标记的抗cAMP抗体的裂解缓冲液(Anti-cAMP Europium Kryptate=AC-K)。在缺少内源cAMP时,cAMP-d2和AC-K之间的FRET比665/620最大。一旦细胞在刺激后产生内源的cAMP,它与cAMP-d2竞争,并且665/620之比减小。通过试验665/620之比与用已知cAMP浓度建立的标准曲线之间进行比较,测定内源cAMP浓度。用Rbystar软件(BMG Labtech)在基于激光的HTRF® reader Rbystar上进行这些计算。

[0159] 1.2在加压素活化V2R后,毒素U-Da2a对 β -抑制蛋白-1运动性的竞争性拮抗作用

[0160] 在6孔板中接种 2.5×10^6 个tsA细胞,所述tsA细胞是转化的人肾脏(HEK293)细胞系,其稳定表达SV40温度敏感T抗原(ECACC),瞬时转染150ng用于hV2Rluc的pRK5表达质粒(PHARMINGEN#556104, BD BIOSCIENCE; Terrillon et al., Mol. Endocrinol., 2003, 17, 677-691)和1 μ g用于 β -抑制蛋白-1-YFP的表达质粒(β -抑制蛋白克隆到pEYFP-N1中(CLONTECH); Scott et al., J. Biol. Chem., 2002, 277, 3552-3559)。转染48个小时后,用含有146mM NaCl、4.2mM KCl、0.5mM MgCl₂、1mM CaCl₂、10mM HEPES (pH 7.4)、1mg/ml葡萄糖的KREBS缓冲液洗细胞,并重悬在1ml的该缓冲液中。V2-Rluc与 β -抑制蛋白-1-YFP之间的生物发光共振能量转移(BRET™)测量在96孔板中进行,所述96孔板在50 μ l的终体积中包含30 μ l的细胞悬浮液(75,000个细胞)、10 μ l的KREBS缓冲液(对照条件)或者包含浓度提高的加压素的配体的混合物(刺激对照条件)或者存在浓度提高的毒素的配体的混合物(具有抑制剂的刺激条件)。然后,加入10 μ l的荧光素酶底物Coelenterazine h (Renilla luciferin; MOLECULAR PROBES C-6780, INVITROGEN, LIFE TECHNOLOGIES)到混合物中,并在37℃培养,随后使用MikroWin 2000软件(Mikrotek Laborsysteme, GmbH)在微板光度计(Mithras LB940 Berthold Technologies)中进行BRET测量。

[0161] 1.3在AVP活化V2R后毒素U-Da2a对MAP激酶磷酸化作用的竞争性拮抗作用

[0162] 利用包含10%血清的DMEM培养基将 10×10^6 个tsA细胞接种到包被有聚鸟氨酸(poly-ornithin)的96孔板中,每个孔具有75,000个细胞,所述tsA细胞是转化的人类肾

(HEK293), 其稳定表达SV40稳定敏感T抗原 (ECACC)、瞬时转染500ng的用于人类V2R的pRK5表达质粒 (PHARMINGEN#556104, BD BIOSCIENCE; Terrillon et al., Mol. Endocrinol., 2003, 17, 677-691)。8个小时和24个小时后, 用无血清的培养基使细胞饥饿, 并随后再刺激27个小时。在37℃用DMEM (对照条件) 或用提高剂量的AVP (刺激条件) 或用AVP和毒素的混合物 (使用抑制剂的刺激条件) 培养转染的细胞。然后, 用50μl的Cellul' ERK试剂盒的裂解缓冲液 (Cisbio International) 替换所述培养基, 并且在室温孵育细胞30分钟。在384孔板中, 向16μl的裂解细胞首先加入2μl的标记有接受体荧光团的抗磷酸化ERK的抗体 (AC-ERK-P-d2在665nm发射), 然后加入2μl的标记有供体荧光团的总ERK抗体 (AC-ERK-K在620nm发射)。当ERK磷酸化发生时, 与所述供体紧邻的接受体能够在665nm发射, 从而产生FRET信号。665/620比的提高相应于MAP激酶磷酸化的提高。两个小时后, 在基于激光的HTRF® reader Rubystar上用Rubystar软件 (BMG Labtech) 测量RT-FRET。

[0163] 2) 结果

[0164] U-Da2a药理作用的体外表征证明, U-Da2a能够以竞争的方式抑制V2R活化引起的cAMP产生, 屏蔽系数 (shield coefficient) 为 -0.91 ± 0.02 , K_{inact} 为 12.0 ± 0.4 nM, PA_2 为 7.92 ± 0.02 (图3A和图3B)。U-Da2a还能够以竞争的方式抑制β-抑制蛋白-1-YFP在hV2-Rluc受体上的移动, 屏蔽系数为 -0.9 ± 0.2 , K_{inact} 为 110 ± 50 nM, PA_2 为 7.0 ± 0.2 (图4A和图4B)。最后, U-Da2a能够以竞争的方式抑制V2R的AVP刺激后MAP激酶的磷酸化, 屏蔽系数为 -0.9 ± 0.2 , K_{inact} 为 210 ± 80 nM, PA_2 为 6.9 ± 0.2 (图5A和图5B)。这些功能细胞测试证明了U-Da2a针对V2R三种主要的信号通路 (即cAMP积累、抑制蛋白的募集和MAP激酶的磷酸化) 的竞争性拮抗性质。

[0165] 实施例4: U-Da2a药理作用的体内表征

[0166] 1) 材料和方法

[0167] 1.1 剂量响应实验

[0168] 毒素以1mg/ml的浓度溶解于0.9%的NaCl中。以1、0.1和0.01μmol毒素/kg体重的剂量, 向成年CD1^{pcy/pcy} (Takahashi et al., J. Urol., 1986, 135, 1280-1283, and J. Am. Soc. Nephrol., 1991, 1, 980-989和Olbrich et al., Nature Genetics, 2003, 34, 455-459) 和成年C57BL/6小鼠腹腔内和皮下注射毒素。在首次注射后1天、3天和5天将小鼠留在代谢笼中24个小时。收集的尿以14,000rpm离心30分钟。用Knauer渗压计测定尿的渗透摩尔浓度 (mOsm/kg), 用移液管测量尿的体积 (μl)。

[0169] 1.2 长期给药实验

[0170] 毒素以1mg/ml的浓度溶解于0.9%的NaCl中, 并以0.1μmol/kg/天的剂量腹腔内施用于成年CD1^{pcy/pcy}小鼠。在0、30、70和99天, 收集在代谢笼中24个小时的尿, 并测定尿的体积和尿的渗透摩尔浓度。

[0171] 2) 结果

[0172] 在CD1^{pcy/pcy}小鼠系 (多囊性肾病的动物模型, 在该动物模型中之前已经证明V2R拮抗剂抑制囊肿形成) 中检测毒素的体内作用。由于U-Da2a是抑制V2R的三种信号转导通路的特异性、选择性且生物可用的V2R拮抗剂, 所以该毒素代表了针对多囊性肾病的有价值的治疗药物。

[0173] 在第一组实验中, 以0.1μmol/kg的单剂量, 向CD1^{pcy/pcy}小鼠腹腔内以及皮下施用

毒素。在基础状态的CD1^{pcy/pcy}小鼠尿的体积非常低,具有高的渗透摩尔浓度。相反,以1 μ mol/kg腹腔内(i.p.)或皮下(s.c.)注射U-Da2a导致尿体积大幅提高,原因是毒素对V2R的拮抗作用产生利尿作用(图6)。由于尿体积的增加,利尿作用与渗透摩尔浓度的大幅减小(即盐浓度的减小)相关(图7)。这些结果证明,U-Da2a能够在体内通过皮下或腹腔内达到其靶标V2R。由于技术原因,在下面的检测中使用很好地耐受的腹膜内路径。

[0174] 在第二组实验中,以1、0.1和0.01 μ mol毒素/kg体重的剂量,向CD1^{pcy/pcy}小鼠腹腔内施用毒素。在注射毒素后,观察到剂量依赖的利尿作用以及尿渗透摩尔浓度的减小(分别为图8和图9)。0.1 μ mol/kg的剂量足以观察到毒素的最大作用。

[0175] 在第三组实验中,以0.1 μ mol/kg/天的剂量施用毒素99天。在第0、30、70和99天测定尿的体积和尿的渗透摩尔浓度(分别为图10和图11)。在长期每日注射毒素(99天)后,没有检测到毒性作用。

[0176] 实施例5:用于检测作为抗囊肿形成的治疗剂的U-Da2a在pcy小鼠中的功效的临床试验

[0177] 1) 材料和方法

[0178] 毒素以1mg/ml的浓度溶解于0.9%的NaCl中。以0.1 μ mol毒素/kg体重/天的剂量,向10周年龄的CD1^{pcy/pcy}小鼠腹腔注射毒素99天。然后,用4%的多聚甲醛/1 $\times$ 磷酸盐缓冲盐水灌注固定小鼠,取出肾脏和心脏并称重。然后,计算肾脏重量或心脏重量/体重,以及肾脏重量/心脏重量,以评价毒素对囊肿形成的影响。肾脏包埋在石蜡中。用苏木精和曙红染色肾脏横切片。使用程序ImageJ测定囊肿的数目,并与切片的大小相关联,从而获得相对囊肿数目。

[0179] 2) 结果

[0180] 以0.1 μ mol/kg剂量施用U-Da2a减小了CD1^{pcy/pcy}小鼠的肾脏重量(图12)。此外,肾脏的组织学分析证明,用U-Da2a治疗显著降低了囊肿的数目(图13)。

[0181] 实施例6:确定参与V2R拮抗活性的U-Da2a氨基酸残基

[0182] 1) 材料和方法

[0183] 使用实施例1中描述的用于U-Da2a的方案制备蛋白质,并且如实施例2中描述进行V2R结合测试。

[0184] 2) 结果

[0185] 在下面的U-Da2a变异体和已知的绿窄头眼镜蛇毒素上进行竞争结合测试:

[0186] 一具有4个氨基酸残基的N-末端缺失的U-Da2a变异体(U-Da2a-delta4N-ter,SEQ ID NO:11),

[0187] 一具有2个氨基酸残基的N-末端缺失和2个氨基酸残基的C-末端缺失的U-Da2a变异体(U-Da2a-delta2N-ter/delta2C-ter,SEQ ID NO:12),

[0188] 一具有取代S3K的U-Da2a变异体(U-Da2a-S3K,SEQ ID NO:15),

[0189] 一具有取代N15K/G16A的U-Da2a变异体(U-Da2a-N15K,G16A,SEQ ID NO:14),

[0190] -Dtx-B A27S(SEQ ID NO:3)

[0191] -Dtx-K(SEQ ID NO:8),

[0192] -DtxE R55(SEQ ID NO:7),和

[0193] -具有取代C14S和C38S的U-Da2a变异体(SEQ ID NO:16)。

[0194] 结果证明,结合V2R并且通过抑制其天然配体AVP的结合而阻碍其活性并不需要U-Da2a的N端和C端区域,原因是具有N-末端和/或C-末端缺失或在N-末端区域具有取代的U-Da2a变异体与U-Da2a相比显示相似的对V2R的亲合力(图14和表I)。

[0195] 相比之下,位置在与碱性胰脏胰蛋白酶抑制剂(BPTI)的活性位点的那些残基同源但是对应于不同氨基酸的残基N15和G16(对于U-Da2a是N15、G16,而对于BPTI是K15和A16)对于结合V2R并抑制其活性至关重要,原因是在第15和16位的NG残基被K和A残基取代的U-Da2a变异体对V2R显示小1000倍的亲合力(图14和表I)。

[0196] 表I:配体对V2R的结合亲和性

[0197]

配体	Ki (nM±SEM)
AVP	1.44±0.69
U-Da2a-WT	1.03±0.34
U-Da2a-delta4N-ter	1.57±1.20
U-Da2a-delta2N-ter/delta2C-ter	3.23±2.31
U-Da2a-S3K	1.29±0.34
U-Da2a-N15K,G16A	8030±1300

[0198] 通过在第15和16位具有不同残基的绿窄头眼镜蛇毒素的结合测试证实了这些结果,显示在第15和16位具有K和A的DTx-E-R55与BPTI类似不能够阻止V2R,甚至在浓度比利用U-D2a获得80%抑制所需浓度高100倍的情况下(图15)。相似地,在第15和16位具有K和R的DTx-K没有获得对V2R的抑制。相比之下,在第15和16位具有M和F的Dtx-B A27S具有与U-D2a相似的对V2R的抑制性能(图15)。

[0199] 这些结果表明,U-Da2a药效团位于与BPTI的活性位点同源的位点,在位置与毒素的N-末端区域和C-末端区域限定的部分相对的部分中的环内。V2R拮抗活性需要第15和16位为NG或MF。

[0200] 用缺失第二个二硫键(C2与C4之间)的变异体U-Da2a C14S C38S检测二硫键对U-Da2a活性的重要性。考虑到仅具有2个二硫键的独特的Kunitz折叠毒素Conkunitzin-S1(UniProtKB/Swiss-Prot登录号P0C1X2;SEQ ID NO:17)的存在,去除了该二硫键。该毒素缺少第二个桥(bridge),但是采用典型的3(10)-β-β-αKunitz折叠,并显示对钾通道的活性(Buczek et al.,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.,2006,62,980-90)。

[0201] 对V2R的结合测试证明,野生型U-Da2a的Ki等于1.03nM,而C14SC38S变异体的Ki等于6200nM(图16)。这些结果证明了当本发明的蛋白质中存在3个二硫键(C1与C6、C2与C4以及C3与C5之间)时,所述蛋白的V2R拮抗活性提高。

序列表

<110> 原子能与替代能源署 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES)

<120> 加压素-2受体的拮抗剂

<130> 263EP518

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

<213> 东部绿曼巴蛇 (Dendroaspis angusticeps)

<400> 1

Arg Pro Ser Phe Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Cys Asn Gly
1 5 10 15

Phe Phe Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser
20 25 30

Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile
35 40 45

Glu Lys Cys Arg Arg Thr Cys Val Gly
50 55

[0001]

<210> 2

<211> 57

<212> PRT

<213> 黑曼巴蛇 (Dendroaspis polylepis)

<400> 2

Arg Pro Tyr Ala Cys Glu Leu Ile Val Ala Ala Gly Pro Cys Met Phe
1 5 10 15

Phe Ile Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Gly Ala Asn Lys Cys Tyr Pro
20 25 30

Phe Thr Tyr Ser Gly Cys Arg Gly Asn Ala Asn Arg Phe Lys Thr Ile
35 40 45

Glu Glu Cys Arg Arg Thr Cys Val Val
50 55

<210> 3

<211> 57

<212> PRT

<213> 黑曼巴蛇 (Dendroaspis polylepis)

<400> 3

Arg Pro Tyr Ala Cys Glu Leu Ile Val Ala Ala Gly Pro Cys Met Phe
1 5 10 15

Phe Ile Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Gly Ser Asn Lys Cys Tyr Pro
20 25 30

Phe Thr Tyr Ser Gly Cys Arg Gly Asn Ala Asn Arg Phe Lys Thr Ile
35 40 45

Glu Glu Cys Arg Arg Thr Cys Val Val
50 55

<210> 4
<211> 83
<212> PRT
<213> 棕伊澳蛇 (*Pseudechis australis*)

<400> 4

Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
1 5 10 15

Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Arg Phe Cys Glu
20 25 30

Leu Pro Ala Asp Pro Gly Pro Cys Asn Gly Leu Phe Gln Ala Phe Tyr
35 40 45

Tyr Asn Pro Val Gln Arg Thr Cys Leu Lys Phe Arg Tyr Gly Gly Cys
50 55 60

Lys Gly Asn Pro Asn Thr Phe Lys Thr Ile Glu Glu Cys Lys Arg Thr
65 70 75 80

Cys Ala Ala

[0002]

<210> 5
<211> 83
<212> PRT
<213> 棕伊澳蛇 (*Pseudechis australis*)

<400> 5

Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
1 5 10 15

Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu
20 25 30

Leu Pro Ala Asp Pro Gly Pro Cys Asn Gly Leu Phe Gln Ala Phe Tyr
35 40 45

Tyr Asn Pro Val Gln Arg Lys Cys Leu Lys Phe Arg Tyr Gly Gly Cys
50 55 60

Lys Ala Asn Pro Asn Thr Phe Lys Thr Ile Glu Glu Cys Lys Arg Ile
65 70 75 80

Cys Ala Ala

<210> 6
<211> 59
<212> PRT
<213> 黑曼巴蛇 (*Dendroaspis polylepis*)

<400> 6

Leu Gln His Arg Thr Phe Cys Lys Leu Pro Ala Glu Pro Gly Pro Cys
1 5 10 15

Lys Ala Ser Ile Pro Ala Phe Tyr Tyr Asn Trp Ala Ala Lys Lys Cys
20 25 30

Gln Leu Phe His Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser
35 40 45

Thr Ile Glu Lys Cys Arg His Ala Cys Val Gly
50 55

<210> 7

<211> 59

<212> PRT

<213> 黑曼巴蛇 (Dendroaspis polylepis)

<400> 7

Leu Gln His Arg Thr Phe Cys Lys Leu Pro Ala Glu Pro Gly Pro Cys
1 5 10 15

Lys Ala Ser Ile Pro Ala Phe Tyr Tyr Asn Trp Ala Ala Lys Lys Cys
20 25 30

Gln Leu Phe His Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser
35 40 45

Thr Ile Glu Lys Cys Arg Arg Ala Cys Val Gly
50 55

[0003]

<210> 8

<211> 79

<212> PRT

<213> 黑曼巴蛇 (Dendroaspis polylepis)

<400> 8

Ser Gly His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp Ala Glu
1 5 10 15

Leu Thr Pro Val Ser Gly Ala Ala Lys Tyr Cys Lys Leu Pro Leu Arg
20 25 30

Ile Gly Pro Cys Lys Arg Lys Ile Pro Ser Phe Tyr Tyr Lys Trp Lys
35 40 45

Ala Lys Gln Cys Leu Pro Phe Asp Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Ala
50 55 60

Asn Arg Phe Lys Thr Ile Glu Glu Cys Arg Arg Thr Cys Val Gly
65 70 75

<210> 9

<211> 59

<212> PRT

<213> 东部绿曼巴蛇 (Dendroaspis angusticeps)

<400> 9

Gln Pro Arg Arg Lys Leu Cys Ile Leu His Arg Asn Pro Gly Arg Cys
1 5 10 15

Tyr Asp Lys Ile Pro Ala Phe Tyr Tyr Asn Gln Lys Lys Lys Gln Cys

	20	25	30
	Glu Arg Phe Asp Trp Ser Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Arg Phe Lys 35 40 45		
	Thr Ile Glu Glu Cys Arg Arg Thr Cys Ile Gly 50 55		
<210>	10		
<211>	100		
<212>	PRT		
<213>	Bos taurus		
<400>	10		
	Met Lys Met Ser Arg Leu Cys Leu Ser Val Ala Leu Leu Val Leu Leu 1 5 10 15		
	Gly Thr Leu Ala Ala Ser Thr Pro Gly Cys Asp Thr Ser Asn Gln Ala 20 25 30		
	Lys Ala Gln Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro 35 40 45		
	Cys Lys Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu 50 55 60		
	Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe 65 70 75 80		
[0004]	Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala Ile Gly Pro 85 90 95		
	Trp Glu Asn Leu 100		
<210>	11		
<211>	53		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	11		
	Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Cys Asn Gly Phe Phe Ser Ala 1 5 10 15		
	Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser Phe Thr Tyr Gly 20 25 30		
	Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile Glu Lys Cys Arg 35 40 45		
	Arg Thr Cys Val Gly 50		
<210>	12		
<211>	53		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Ser Phe Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Cys Asn Gly Phe Phe
1 5 10 15

Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser Phe Thr
20 25 30

Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile Glu Lys
35 40 45

Cys Arg Arg Thr Cys
50

<210> 13

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Cys Asn Gly Phe Phe Ser Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser Phe Thr Tyr Gly
20 25 30

Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile Glu Lys Cys Arg
35 40 45

Arg Thr Cys
50

<210> 14

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

Arg Pro Ser Phe Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Phe Phe Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser
20 25 30

Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile
35 40 45

Glu Lys Cys Arg Arg Thr Cys Val Gly
50 55

<210> 15

<211> 57

[0005]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 15

Arg Pro Lys Phe Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Cys Asn Gly
1 5 10 15

Phe Phe Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser
20 25 30

Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile
35 40 45

Glu Lys Cys Arg Arg Thr Cys Val Gly
50 55

<210> 16
<211> 57
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 16

[0006]

Arg Pro Ser Phe Cys Asn Leu Pro Val Lys Pro Gly Pro Ser Asn Gly
1 5 10 15

Phe Phe Ser Ala Phe Tyr Tyr Ser Gln Lys Thr Asn Lys Cys His Ser
20 25 30

Phe Thr Tyr Gly Gly Ser Lys Gly Asn Ala Asn Arg Phe Ser Thr Ile
35 40 45

Glu Lys Cys Arg Arg Thr Cys Val Gly
50 55

<210> 17
<211> 60
<212> PRT
<213> 细线芋螺 (Conus striatus)

<400> 17

Lys Asp Arg Pro Ser Leu Cys Asp Leu Pro Ala Asp Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Lys Ala Glu Lys Arg Ile Tyr Tyr Asn Ser Ala Arg Lys Gln Cys
20 25 30

Leu Arg Phe Asp Tyr Thr Gly Gln Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Arg
35 40 45

Arg Thr Tyr Asp Cys Gln Arg Thr Cys Leu Tyr Thr
50 55 60

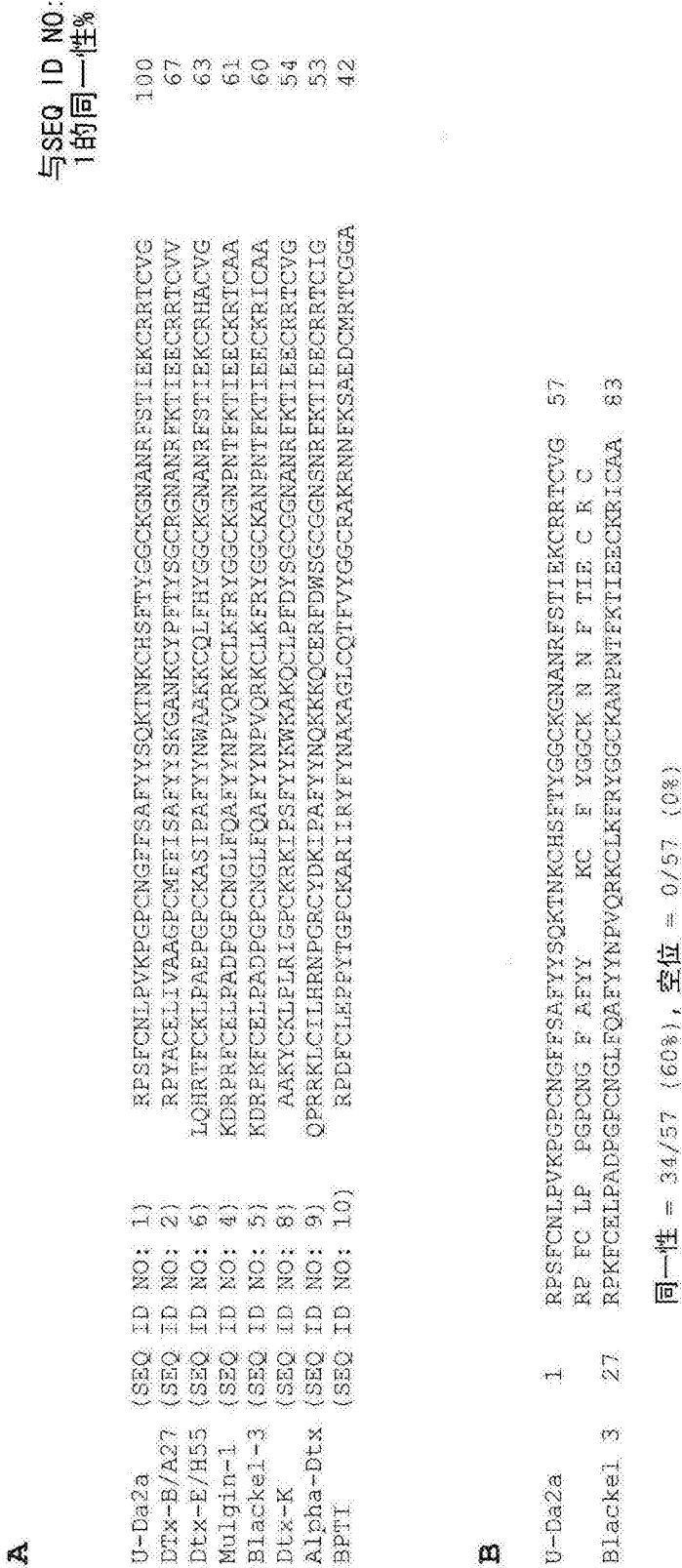


图1

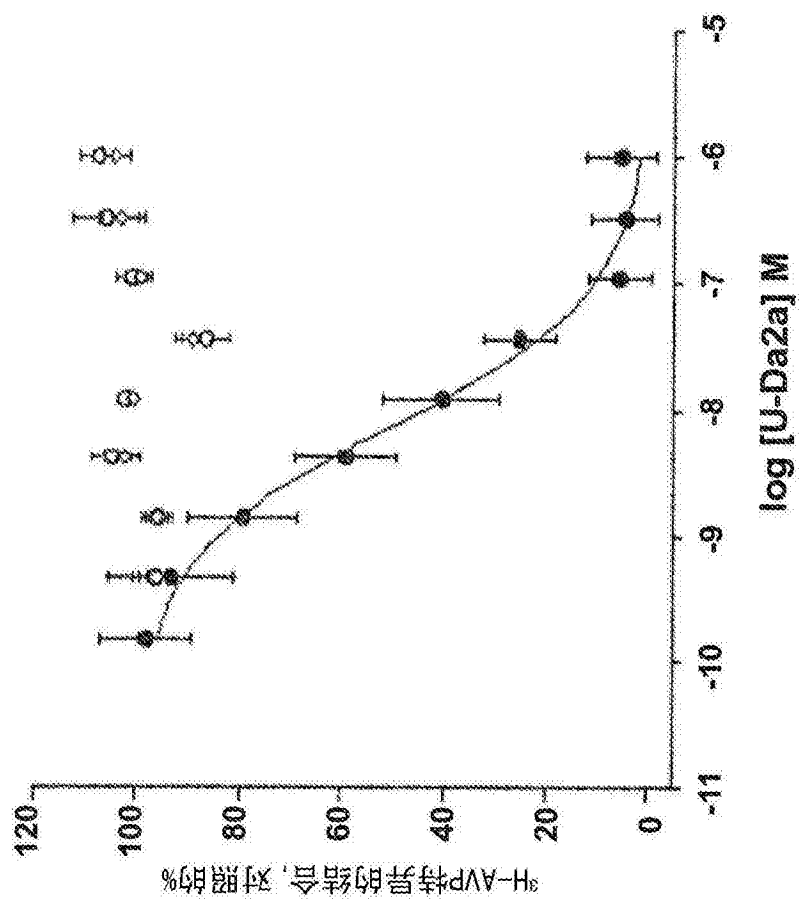


图2

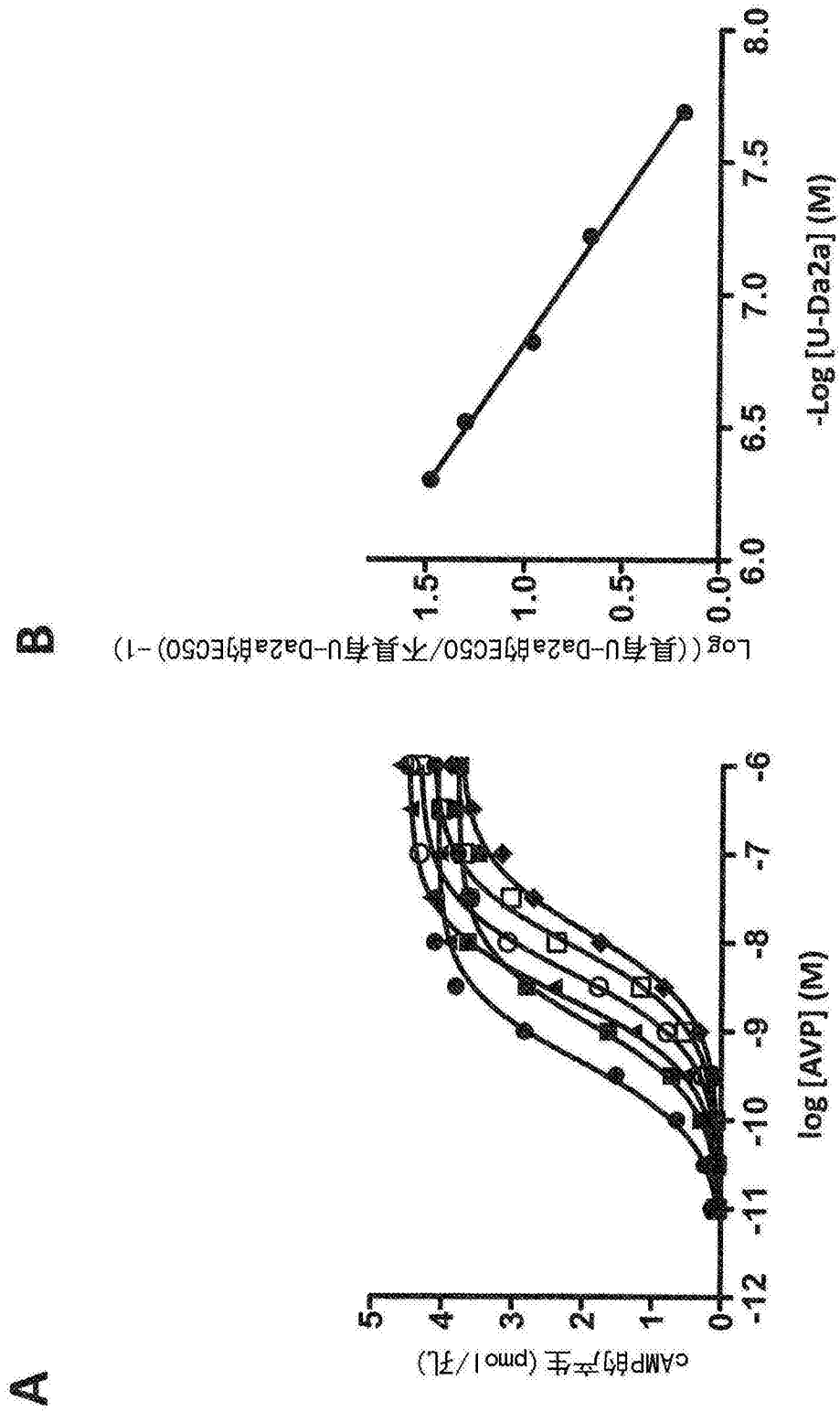


图3

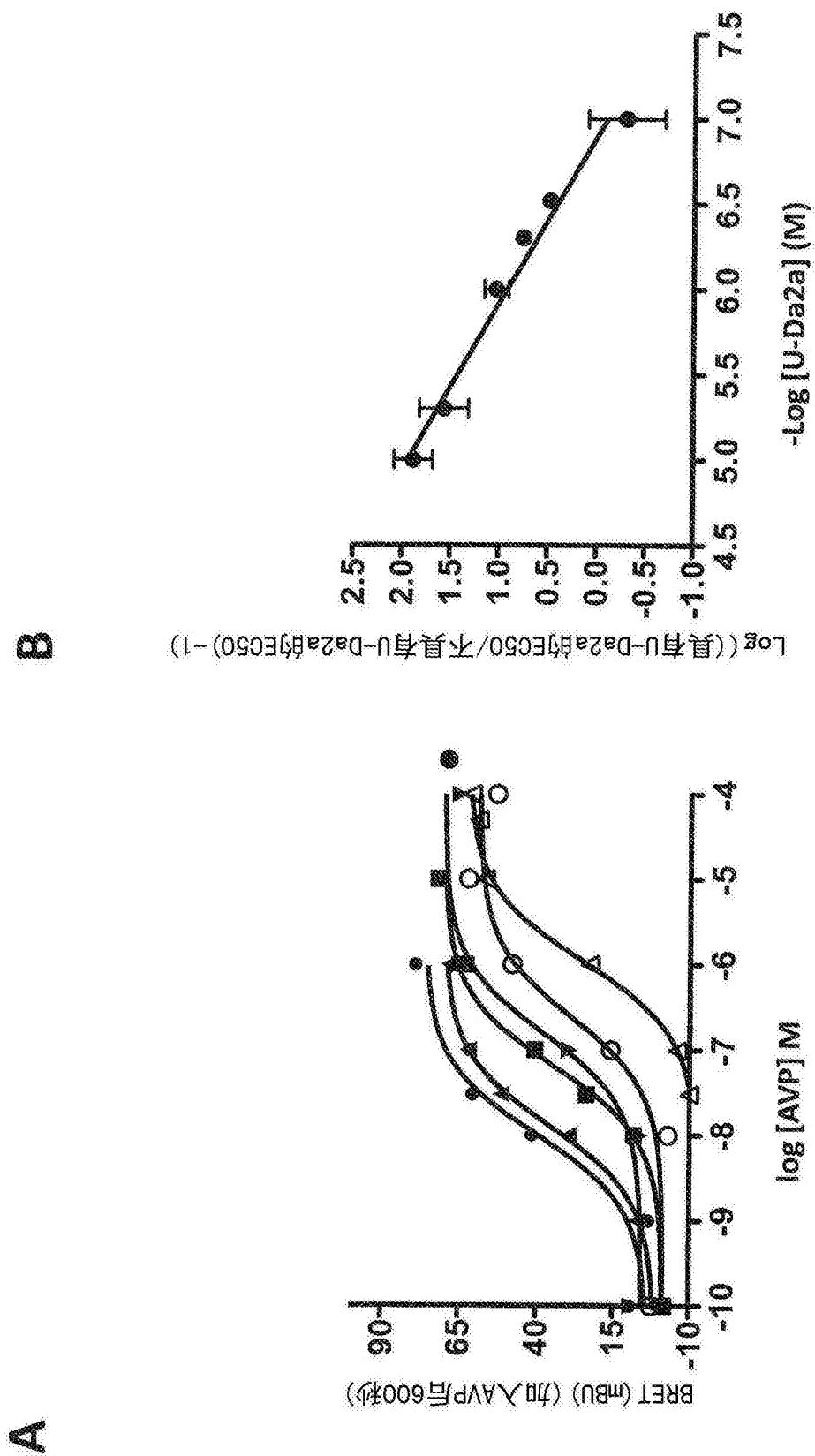


图4

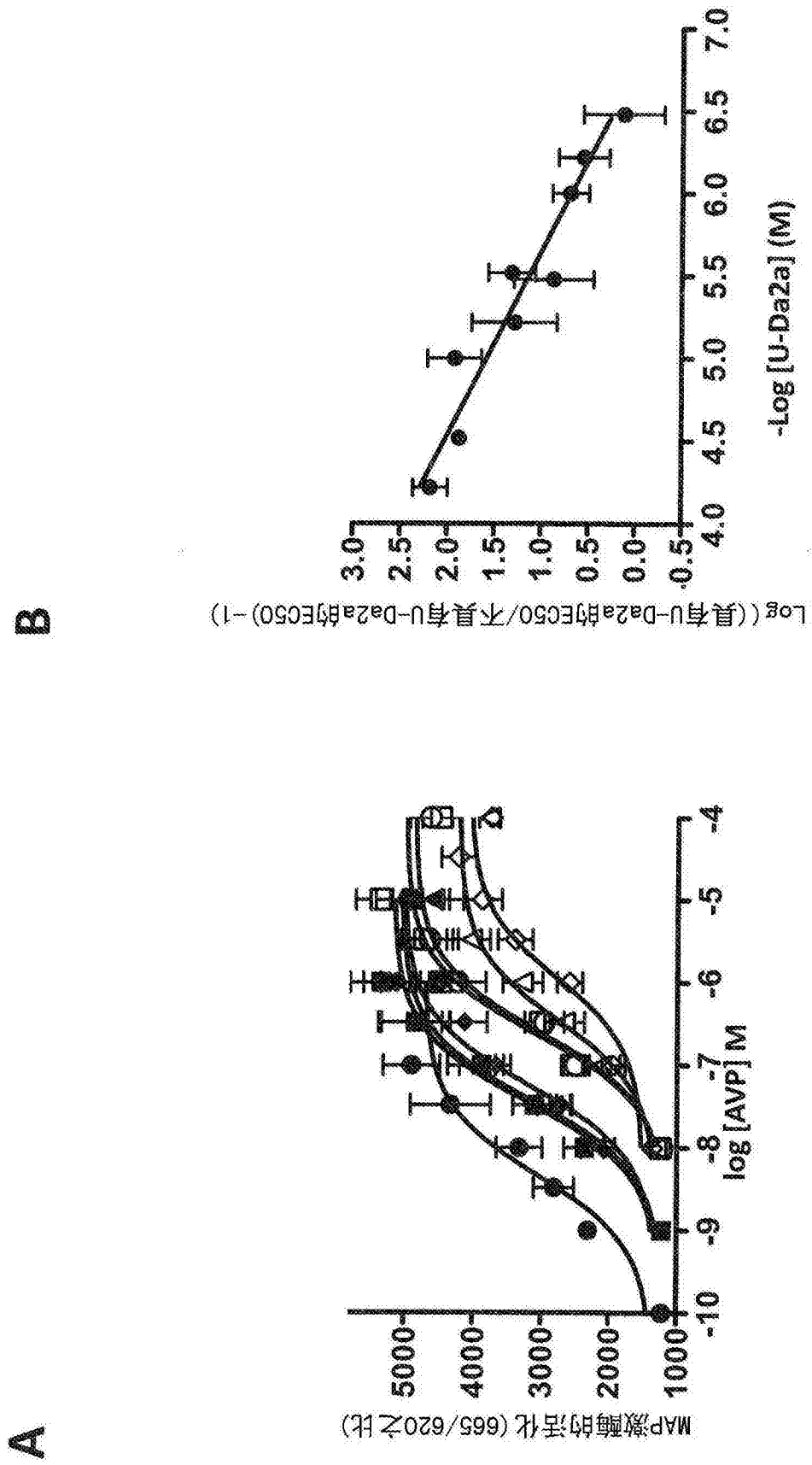


图5

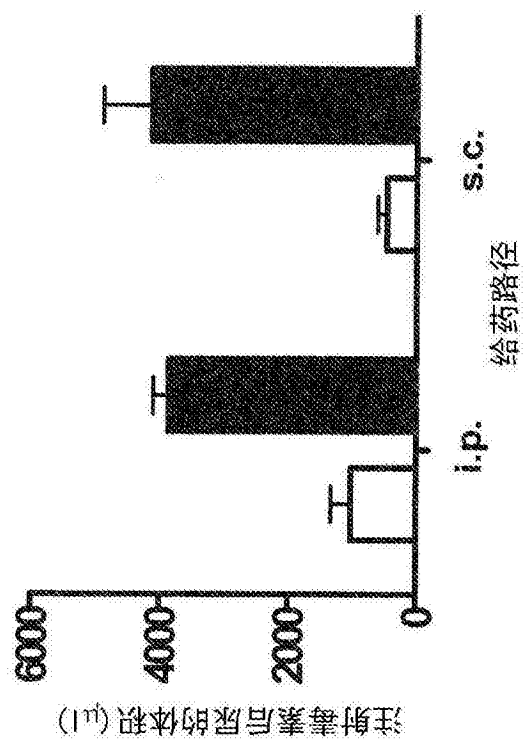


图6

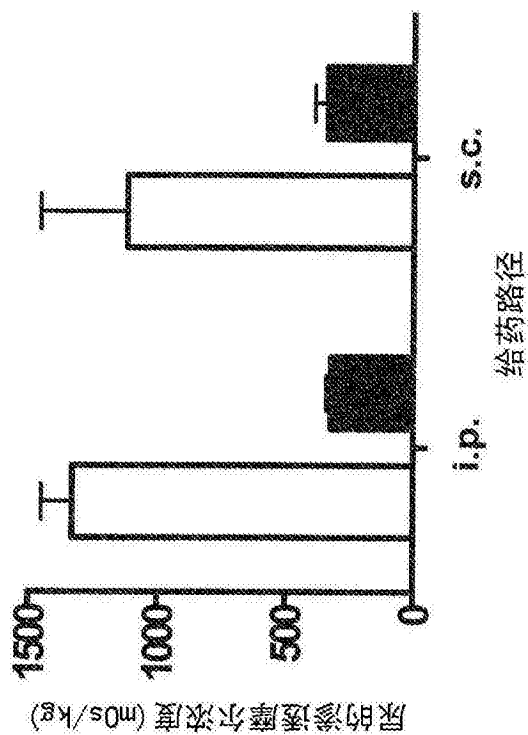


图7

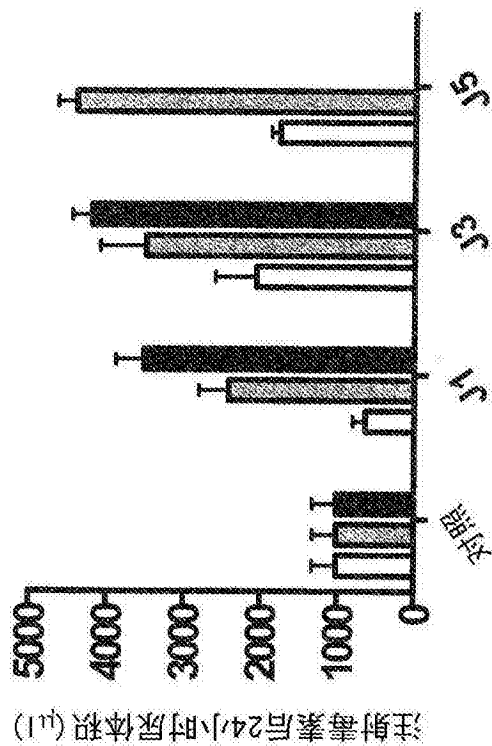


图8

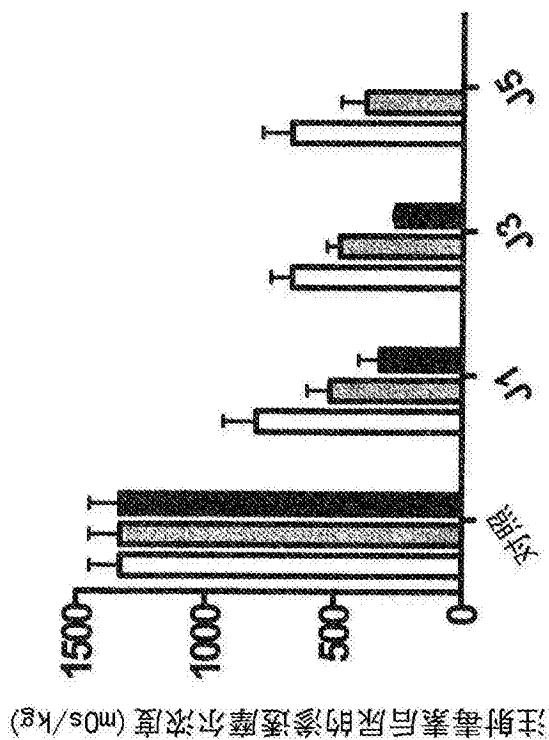


图9

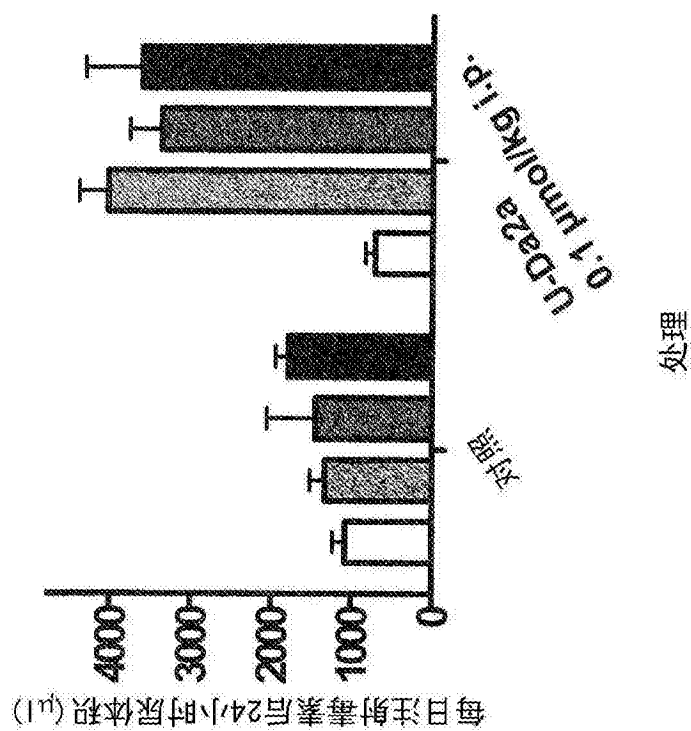


图10

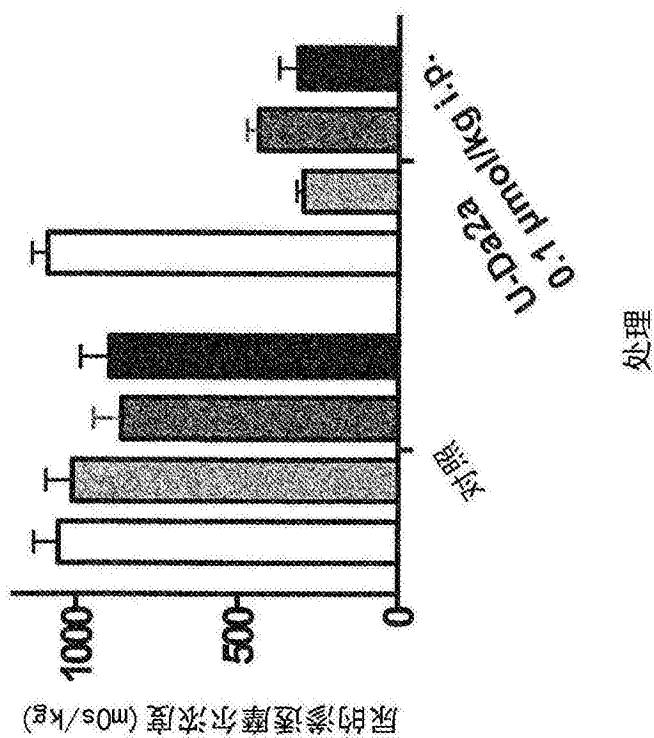


图11

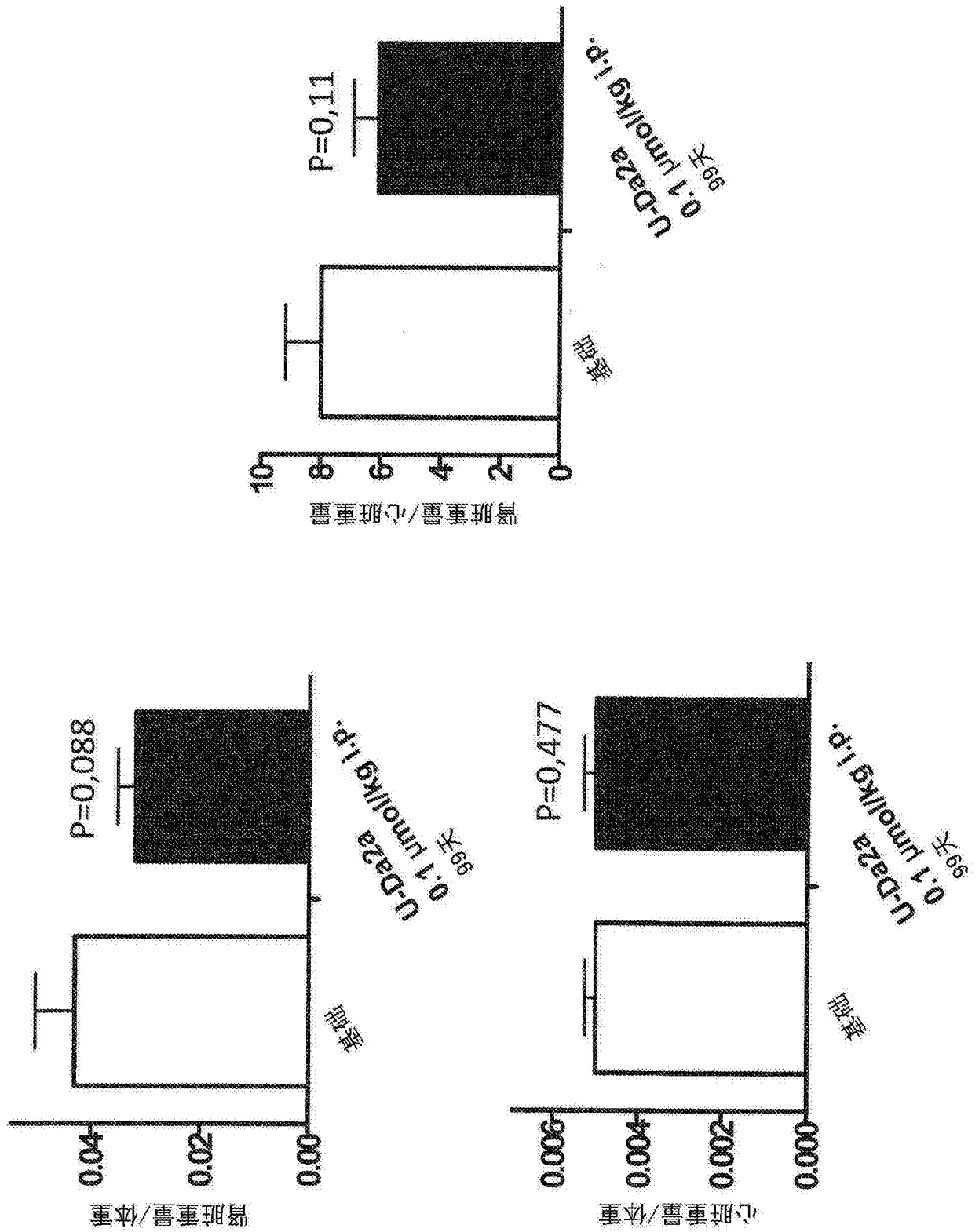


图12

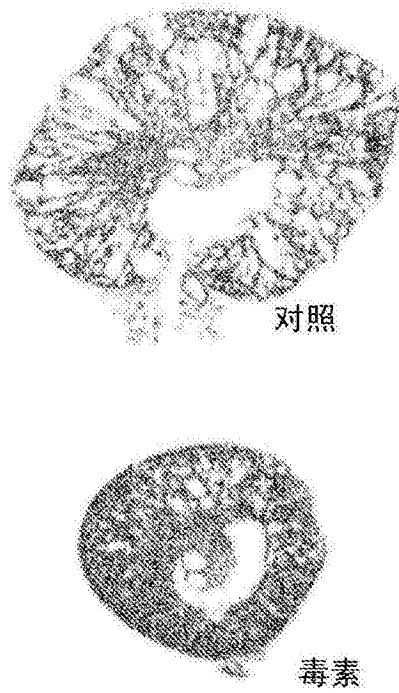
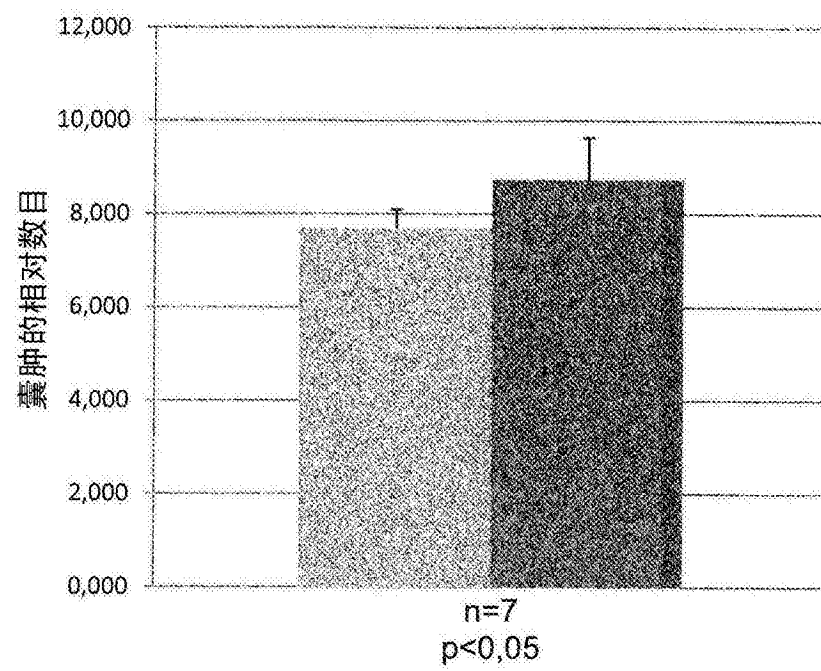
A**B**

图13

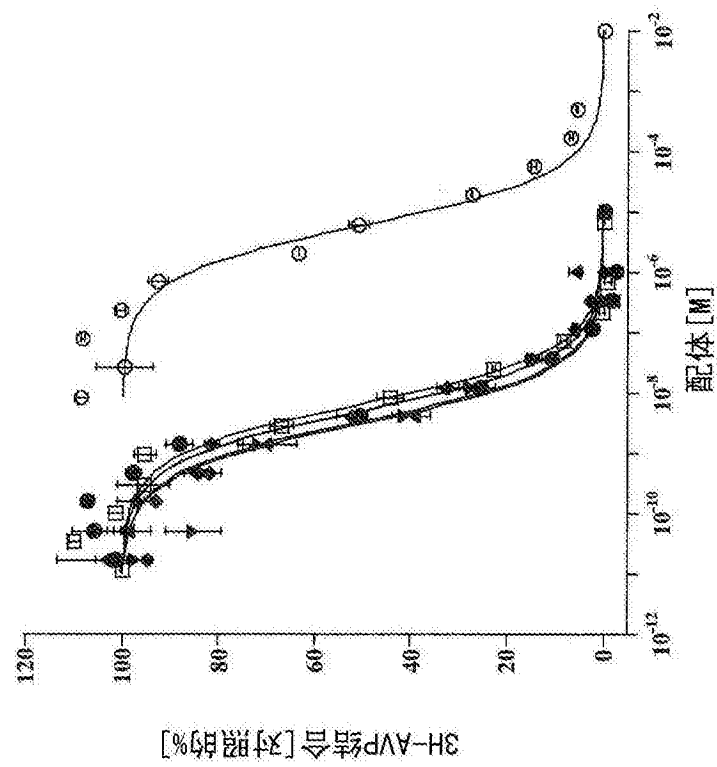


图14

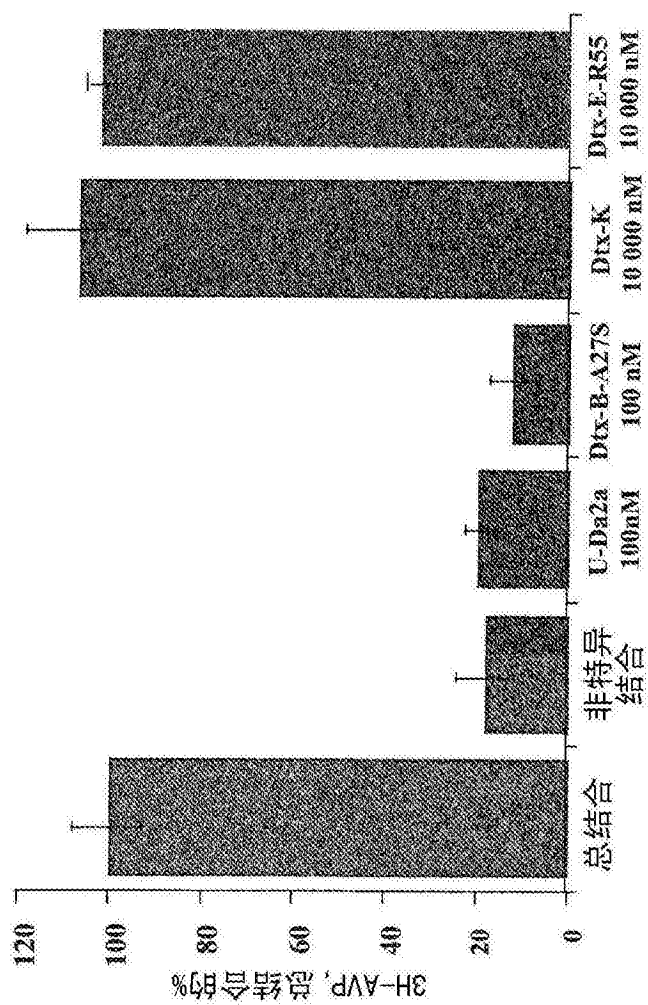


图15

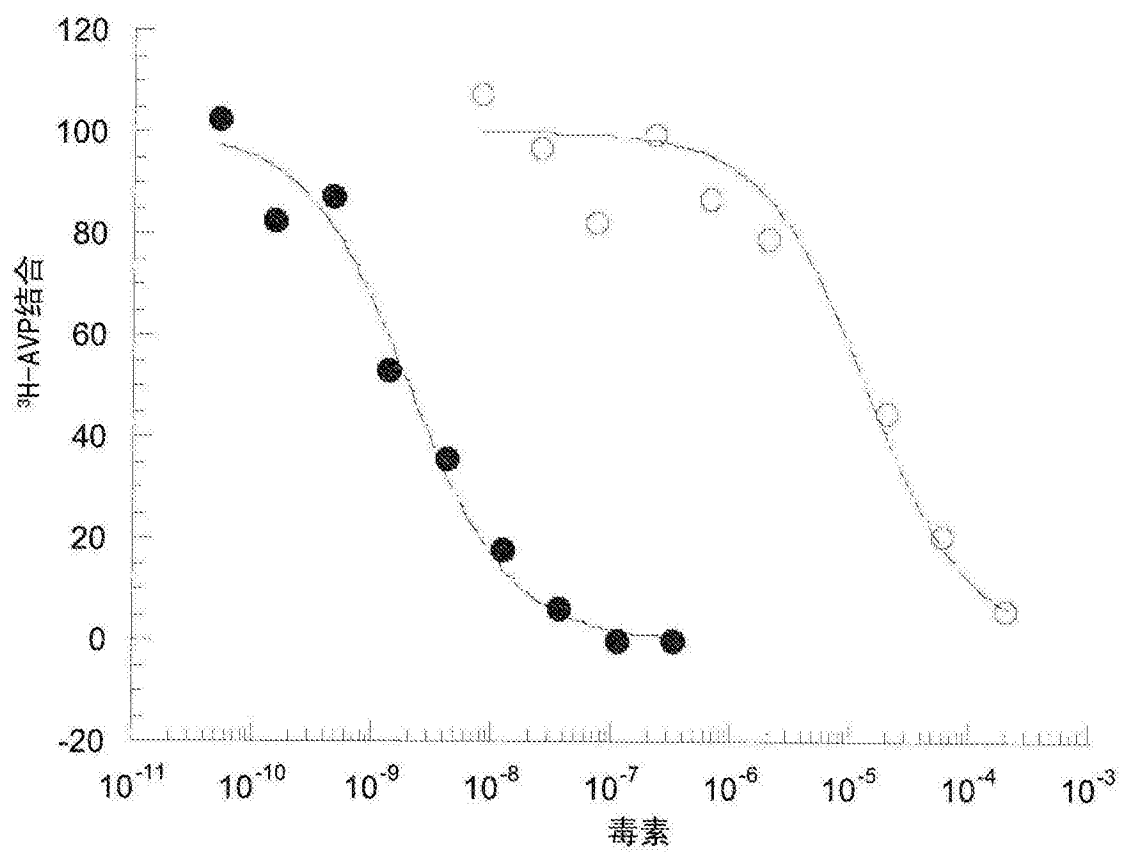


图16