(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103906761 B
(45)授权公告日 2016.12.21

(21)申请号 201280052262.1

(22)申请日 2012.08.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103906761 A

(43)申请公布日 2014.07.02

(30)优先权数据
61/529,113 2011.08.30 US
61/648,718 2012.05.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.04.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/051734 2012.08.21

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/032784 EN 2013.03.07

(73)专利权人 梅约医学教育与研究基金会
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 C·Y·W·李 J·C·小伯内特

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 沈端

(51)Int.Cl.
C07K 14/58(2006.01)
A61K 38/22(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2008/089532 A1,2008.07.31,全文.
CN 101541957 A,2009.09.23,全文.
Candace Y.W. Lee et al..Designer Natriuretic Peptides.《J Investig Med.》.2009,第57卷(第1期),第18-21页.
Nívia M. Santiago et al..Lifetime Overproduction of Circulating Angiotensin-(1-7) Attenuates Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction and Remodeling.《Hypertension》.2010,第55卷(第4期),第889-896页.
Robson A.S. Santos et al..Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas.《PNAS》.2003,第100卷(第14期),第8258-8263页.
Ivana Lula et al..Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its b-cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies.《PEPTIDES》.2007,第28卷(第11期),第2199-2210页.

审查员 皇甫洁琼

权利要求书1页 说明书22页
序列表15页 附图27页

(54)发明名称

利钠多肽

(57)摘要

本文提供涉及利钠多肽的方法和物质,以及利钠多肽在治疗心血管疾病和/或肾脏疾病中的应用。例如,提供含有利钠肽(如ANP、BNP、CNP、URO或DNP)的至少一个氨基酸区段(如N末端尾部、环结构、C末端尾部,或其组合)和血管紧张素多肽的一个氨基酸区段(如Ang-(1-7))的嵌合多肽。

CN 103906761 B

1.一种多肽,所述多肽由SEQ ID NO:44、45或61组成。

2.如权利要求1所述的多肽,其特征在于,所述多肽由SEQ ID NO:44组成。

3.如权利要求1所述的多肽,其特征在于,所述多肽由SEQ ID NO:45组成。

4.如权利要求1所述的多肽,其特征在于,所述多肽由SEQ ID NO:61组成。

利钠多肽

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年5月18日提交的美国临时申请序列号61/648,718和2011年8月30日提交的美国临时申请序列号61/529,113的优先权。在先申请的公开内容被视作本申请公开的一部分(并通过引用纳入本文)。

[0003] 关于联邦资助的研究的声明

[0004] 本发明在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号HL036634和HL076611的资助下完成。政府享有该发明中的某些权利。

[0005] 背景

[0006] 本文涉及利钠多肽。例如,本文提供了涉及利钠多肽的方法和物质,以及利钠多肽在治疗心血管疾病和肾脏疾病中的应用。

[0007] 利钠多肽是能够产生利钠作用(尿中钠排泄增加)的多肽。这类多肽可由脑、心、肾和/或血管组织产生。人类中的利钠多肽家族包括心脏激素心房利钠肽(ANP)、B型利钠肽(BNP)、C型利钠肽(CNP)和利尿素(URO)。利钠多肽通过鸟苷酸环化酶受体(即ANP、BNP和URO的NPR-A;以及CNO的NPR-B)和第二信使3'5'环单磷酸鸟苷(cGMP)起作用(Kuhn,Circ.Res.,93:700-709(2003);Tawaragi等,Biochem.Biophys.Res.Commun.,175:645-651(1991);以及Komatsu等,Endocrinol.,129:1104-1106(1991))。

发明内容

[0008] 本文提供涉及利钠多肽的方法和物质,以及利钠多肽在治疗心血管疾病和/或肾脏疾病中的应用。例如,本文提供嵌合多肽,所述嵌合多肽具有利钠肽(如ANP、BNP、CNP、URO或树眼镜蛇属(Dendroaspis)利钠肽(DNP))的至少一个氨基酸区段(如N末端尾部、环结构、C末端尾部或其组合),和血管紧张素多肽的氨基酸区段(如Ang-(1-7))。

[0009] 如本文所述,嵌合多肽可被设计成含有Ang-(1-7)氨基酸序列连接为CNP环结构的C末端,连接方式导致嵌合多肽具有刺激人心脏成纤维细胞产生cGMP的能力。这些结果表明,嵌合多肽可被设计成含有血管紧张素多肽的氨基酸区段(如Ang-(1-7))和利钠肽(如ANP、BNP、CNP、URO或树眼镜蛇属(Dendroaspis)利钠肽(DNP))的至少一个氨基酸区段(如N末端尾部、C末端尾部或其组合),以使所述嵌合多肽能够显示活性(如激活cGMP产生的能力)的方式进行所述设计。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽能显示利尿活性、利钠活性、激活cGMP的能力、提高肾小球滤过率的能力、减少肾素生成的能力、减少血管紧张素生成的能力、减少醛固酮生成的能力、降低心脏充盈压异常升高的能力、优化肾血流的能力,或其组合。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可以是嵌合利钠多肽。

[0010] 总的来说,本文的一方面涉及一种长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序):(a)SEQ ID NO:2中所列序列或SEQ ID NO:2中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代,(b)SEQ ID NO:3中所列序列或SEQ ID NO:3中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代,以及(c)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活

性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:2中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:3中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。

[0011] 在另一方面，本文件涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或主要由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:4中所列序列或SEQ ID NO:4中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，(b)SEQ ID NO:5中所列序列或SEQ ID NO:5中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，以及(c)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:4中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:5中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。

[0012] 在另一方面，本文涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:6中所 列序列或SEQ ID NO:6中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，(b)SEQ ID NO:7中所列序列或SEQ ID NO:7中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，以及(c)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:6中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:7中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。

[0013] 在另一方面，本文涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:8中所列序列或SEQ ID NO:8中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，(b)SEQ ID NO:9中所列序列或SEQ ID NO:9中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代以及(c)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:8中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:9中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。

[0014] 在另一方面，本文涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:10中所列序列或SEQ ID NO:10中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，(b)SEQ ID NO:11中所列序列或SEQ ID NO:11中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代以及(c)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:10中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:11中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。

[0015] 在另一方面，本文涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，(b)SEQ ID NO:2中所列序列或SEQ ID NO:2中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代以及(c)SEQ ID NO:12中所列序列或SEQ ID NO:12中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:2中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:12中所列序列。

[0016] 在另一方面，本文涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ

ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，(b)SEQ ID NO:5中所列序列或SEQ ID NO:5中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，以及(c)SEQ ID NO:13中所列序列或SEQ ID NO:13中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:5中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:13中所列序列。

[0017] 在另一方面，本文涉及长度为10～14个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:12中所列序列或SEQ ID NO:12中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:12中所列序列。所述多肽可不具有环结构。

[0018] 在另一方面，本文涉及长度为10～16个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:13中所列序列或SEQ ID NO:13中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:13中所列序列。所述多肽可不具有环结构。

[0019] 在另一方面，本文涉及长度为19～25个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:30中所列序列或SEQ ID NO:30中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:30中所列序列。所述多肽可不具有环结构。

[0020] 在另一方面，本文涉及长度为10～14个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:12中所列序列或SEQ ID NO:12中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺 失或取代。所述多肽可具有cGMP激活特性。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:12中所列序列。所述多肽可不具有环结构。

[0021] 在另一方面，本文涉及长度为10～16个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:13中所列序列或SEQ ID NO:13中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:13中所列序列。所述多肽可不具有环结构。

[0022] 在另一方面，本文涉及长度为19～25个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:30中所列序列或SEQ ID NO:30中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。

所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:30中所列序列。所述多肽可不具有环结构。

[0023] 在另一方面，本文涉及长度为20～28个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:7中所列序列或SEQ ID NO:7中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:7中所列序列。所述多肽可不具有连接至环结构的C末端尾部。

[0024] 在另一方面，本文涉及长度为20～28个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:36中所列序列或SEQ ID NO:36中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:36中所列序列。所述多肽可不具有连 接至环结构的N末端尾部。

[0025] 在另一方面，本文涉及长度为20～28个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:36中所列序列或SEQ ID NO:36中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:36中所列序列。所述多肽可不具有连接至环结构的C末端尾部。

[0026] 在另一方面，本文涉及长度为20～28个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:7中所列序列或SEQ ID NO:7中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，以及(b)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:7中所列序列。所述多肽可不具有连接至环结构的N末端尾部。

[0027] 在另一方面，本文涉及长度为17～50个氨基酸残基的多肽。所述多肽包含，或基本由以下序列组成(按照从氨基末端至羧基末端的顺序)：(a)SEQ ID NO:2中所列序列，SEQ ID NO:4中所列序列，SEQ ID NO:6中所列序列，SEQ ID NO:8中所列序列，SEQ ID NO:10中所列序列，SEQ ID NO:2中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:4中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:6中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:8中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:10中所列序列带不超过三个添加、缺失或取代；(b)SEQ ID NO:3中所列序列，SEQ ID NO:5中所列序列，SEQ ID NO:7中所列序列，SEQ ID NO:9中所列序列，SEQ ID NO:11中所列序列，SEQ ID NO:3中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:5中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:7中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:9中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代，SEQ ID NO:11中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代；以及(c)SEQ ID NO:1中所列序列或SEQ ID NO:1中所列序列带不超过两个添加、缺失或取代。所述多肽可具有cGMP激活性质。所述多肽可包含SEQ ID NO:2、4、6、8或10中所列序

列。所述多肽可包含SEQ ID NO:3、5、7、9或11中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:1中所列序列。所述多肽可包含SEQ ID NO:43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58或59中所列序列带不超过五个添加、缺失或取代。所述多肽的长度可以是17～45个氨基酸残基、17～40个氨基酸残基、17～35个氨基酸残基、20～50个氨基酸残基、25～50个氨基酸残基、20～45个氨基酸残基、20～40个氨基酸残基、20～35个氨基酸残基、25～45个氨基酸残基、25～40个氨基酸残基或25～35个氨基酸残基。

[0028] 除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明从属领域中普通技术人员所理解的含义一致。下文描述了合适的方法和材料，但可使用与本文所描述的相似或相同的方法和材料来实施本发明。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用全文纳入本文。在存在抵触的情况下，以本说明书(包括定义)为准。此外，材料、方法和实施例仅是说明性的，并不应视作限制。

[0029] 本发明的一项或多个实施方式的细节列于附图和下文的描述。本发明的其他特性、目的和优势可由附图和说明书，以及权利要求书显而易见。

附图说明

[0030] 图1是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽包含利钠肽的N末端和环结构以及血管紧张素多肽的区段的C末端。图1所示的血管紧张素多肽的氨基酸区段(DRVYIHP;SEQ ID NO:1)可被称为血管紧张素-(1-7)或Ang-(1-7)。所述N末端和环结构可具有任何合适的利钠肽的序列，所述利钠肽包括但不限于ANP、BNP、CNP、DNP和URO。“A”表示利钠肽N末端的氨基酸序列，“B”表示利钠肽环结构的氨基酸序列，而“C”表示Ang(1-7)的氨基酸序列，其可形成嵌合多肽的C末端。

[0031] 图2是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:43)包含ANP的N末端和环结构以及C末端Ang-(1-7)。图2所示ANP的N末端区段的氨基酸序列(SLRRSS;SEQ ID NO:2)可被称为$ANP_{N末端}$，而图2所示ANP的环结构区段的氨基酸序列(CFGGRMDRIGAQ-SGLGC;SEQ ID NO:3)可被称为$ANP_{环}$。

[0032] 图3是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:44) 包含BNP的N末端和环结构以及C末端Ang-(1-7)。图3所示BNP的N末端区段的氨基酸序列(SPKMVQGSG;SEQ ID NO:4)可被称为$BNP_{N末端}$，而图3所示BNP的环结构区段的氨基酸序列(CFGRKM-DRISSSSGLGC;SEQ ID NO:5)可被称为$BNP_{环}$。具有SEQ ID NO:44所列氨基酸序列的嵌合多肽可被称为BNP-Ang1-7。

[0033] 图4是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:45)包含CNP的N末端和环结构以及C末端Ang-(1-7)。图4所示CNP的N末端区段的氨基酸序列(GLSKG;SEQ ID NO:6)可被称为$CNP_{N末端}$，而图4所示CNP的环结构区段的氨基酸序列(CFGLKLDRIG-SMSGLGC;SEQ ID NO:7)可被称为CNP $_{环}$。图4所示嵌合多肽可被称为cAng或cANG。

[0034] 图5是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:46)包含DNP的N末端和环结构以及C末端Ang-(1-7)。图5所示DNP的N末端区段的氨基酸序列(EVKYDP;SEQ ID NO:8)可被称为$DNP_{N末端}$，而图5所示DNP的环结构区段的氨基酸序列(CFGHKIDRINHVS-NLGC;SEQ ID NO:9)可被称为$DNP_{环}$。

[0035] 图6是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:47)包含URO的N末端和环结构以及C末端Ang-(1-7)。图6所示URO的N末端区段的氨基酸序列(TAPRSLRRSS;SEQ ID NO:10)可被称为$URO_{N末端}$，而图6所示URO的环结构区段的氨基酸序列(CFGG-RMDRIGAQSGLGC;SEQ ID NO:11)可被称为$URO_{环}$。

[0036] 图7是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:48)包含BNP的N末端($BNP_{N末端}$)、ANP的环结构($ANP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0037] 图8是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:49)包含CNP的N末端($CNP_{N末端}$)、ANP的环结构($ANP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0038] 图9是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:50)包含DNP的N末端($DNP_{N末端}$)、ANP的环结构($ANP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0039] 图10是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:51)包含URO的N末端($URO_{N末端}$)、ANP的环结构($ANP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0040] 图11是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:52)包含ANP的N末端($ANP_{N末端}$)、BNP的环结构($BNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0041] 图12是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:53)包含CNP的N末端($CNP_{N末端}$)、BNP的环结构($BNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0042] 图13是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:54)包含DNP的N末端($DNP_{N末端}$)、BNP的环结构($BNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0043] 图14是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:55)包含URO的N末端($URO_{N末端}$)、BNP的环结构($BNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0044] 图15是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:56)包含ANP的N末端($ANP_{N末端}$)、CNP的环结构($CNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0045] 图16是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:57)包含BNP的N末端($BNP_{N末端}$)、CNP的环结构($CNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0046] 图17是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:58)包含DNP的N末端($DNP_{N末端}$)、CNP的环结构($CNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0047] 图18是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:59)包含URO的N末端($URO_{N末端}$)、CNP的环结构($CNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)。

[0048] 图19是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:60)包含N末端Ang-(1-7)以及ANP的环结构($ANP_{环}$)和ANP的C末端。图19所示ANP的C端区段的氨基酸序列(NSFRY;SEQ ID NO:12)可被称为$ANP_{C末端}$。

[0049] 图20是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:61)包含N末端Ang-(1-7)以及BNP的环结构($BNP_{环}$)和BNP的C末端。图20所示BNP的C末端区段的氨基酸序列(KVLRRH;SEQ ID NO:13)可被称为$BNP_{C末端}$。具有SEQ ID NO:61所列氨基酸序列的嵌合多肽可被称为Ang1-7BNP。

[0050] 图21的图表显示当人心脏成纤维细胞接触ANP(10^{-6}M)、BNP(10^{-6}M)、CNP(10^{-6}M)或cANG(10^{-6}、10^{-8}或10^{-10}M)时产生的cGMP水平(pmol/mL)。

[0051] 图22的图表显示人心脏成纤维细胞在单独接触或在A-71915(1μM，NPR-A阻断剂(参见例如Kumar等，Hypertension，29(1Pt2):414-21(1997)))或NPR-B抗体(1:100稀释)存

在下接触ANP(10^{-6}M)、BNP(10^{-6}M)、CNP(10^{-6}M)或cANG(10^{-6}、10^{-8}或10^{-10}M)时，生成的cGMP水平(pmol/mL)。

[0052] 图23是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:27)包含N末端Ang-(1-7)和ANP的C末端($ANP_{C末端}$)且不具有环结构。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-ANP-CT。

[0053] 图24是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:28)包含N末端Ang-(1-7)和BNP的C末端($BNP_{C末端}$)且不具有环结构。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-BNP-CT。

[0054] 图25是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:29)包含N末端Ang-(1-7)和DNP的C末端($DNP_{C末端}$)且不具有环结构。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-DNP-CT。图25所示DNP的C末端区段的氨基酸序列(PSLRDPRPNAPSTSA;SEQ ID NO:30)可被称为$DNP_{C末端}$。

[0055] 图26是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:31)包含ANP的C端($ANP_{C末端}$)作为N末端区段接以C末端Ang-(1-7)且不具有环结构。所述多肽可被称为ANP-CT-Ang-(1-7)。

[0056] 图27是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:32)包含BNP的C端($BNP_{C末端}$)作为N末端区段接以C末端的Ang-(1-7)且不具有环结构。所述多肽可被称为BNP-CT-Ang-(1-7)。

[0057] 图28是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:33)包含DNP的C末端($DNP_{C末端}$)作为N末端区段接以C末端Ang-(1-7)且不具有环结构。所述多肽可被称为DNP-CT-Ang-(1-7)。

[0058] 图29是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:34)包含N末端Ang-(1-7)以及环结构($CNP_{环}$)且不具有C末端尾部。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-CNPR1。

[0059] 图30是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:35)包含CNP的反向环结构以及C末端Ang-(1-7)且不具有N末端尾部。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-CNPR2。图30所示的CNP的反向环结构区段的氨基酸序列(CGLGSMSGIRDLKLGFC;SEQ ID NO:36)可被称为反向-$CNP_{环}$。

[0060] 图31是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:37)包含N末端Ang-(1-7)以及反环结构(反-$CNP_{环}$)且不具有C末端尾部。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-CNPR3。

[0061] 图32是一些实施方式的嵌合多肽的结构示意图，所示嵌合多肽(SEQ ID NO:38)包含环结构($CNP_{环}$)以及C末端Ang-(1-7)且不具有N末端尾部。所述多肽可被称为Ang-(1-7)-CNPR4。

[0062] 图33包含的图表显示采用指定量(10^{-6}、10^{-8}或10^{-10}M)的BNP(BNP1-32，图33A)、Ang1-7BNP(图33B)或BNP-Ang1-7(图33C)处理HEK293细胞所产生的 cGMP水平。HEK293细胞经稳定转染以表达NPR-A(即GC-A)。

[0063] 图34包含的图表显示采用指定量(10^{-6}、10^{-8}或10^{-10}M)的BNP(BNP1-32，图34A)、Ang1-7BNP(图34B)或BNP-Ang1-7(图34C)处理HEK293细胞所产生的cGMP水平。HEK293细胞

经稳定转染以表达NPR-B(即GC-B)。

[0064] 图35包含的图表显示采用指定量(10^{-6}、10^{-8}或10^{-10}M)的Ang1-7处理HEK293细胞所产生的cGMP水平。HEK293细胞经稳定转染以表达NPR-A(即GC-A)(左图)或NPR-B(即GC-B)(右图)。

具体实施方式

[0065] 本文提供涉及利钠多肽的方法和物质,以及利钠多肽在治疗心血管疾病和/或肾脏疾病中的应用。例如,本文提供含有利钠多肽(如ANP、BNP、CNP、URO或DNP)的至少一个氨基酸区段(如N末端尾部、环结构、反环结构、C末端尾部,或其组合)和血管紧张素多肽(如Ang-(1-7)、Ang-(1-8)或Ang-(1-9))的氨基酸区段的嵌合多肽。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可被用于增加有需要的对象的利钠活性(natriuretic activity)。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可用于增加血浆cGMP水平、尿cGMP排泄、净肾脏cGMP生成、尿流、尿钠排泄、尿钾排泄、血细胞比容、血浆BNP免疫活性、肾血流和/或血浆ANP免疫活性。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可被用于降低肾血管阻力、钠的近端和远端部分再吸收、平均动脉压、肺毛细血管楔压、右心房压、肺动脉压、血浆肾素活性、血浆血管紧张素II水平、血浆醛固酮水平、肾灌注压和/或体循环血管阻力。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可用于治疗、抑制和/或预防心脏重塑和缺血再灌注损伤,尤其是在急性心肌梗塞(AMI)和/或急性心力衰竭(AHF)之后。例如,本文提供的嵌合多肽可用于增加血浆cGMP,这是减轻缺血再灌注损伤方面的应用中所需的(Padilla等,Cardiovasc.Res.,51:592-600(2001))。

[0066] 如本文所述,可将嵌合多肽设计成包含利钠多肽的至少一个氨基酸区段(如N末端尾部、环结构、反环结构、C末端尾部,或其组合)和血管紧张素多肽的氨基酸区段。利钠肽或"NP"的示例包括但不限于:ANP、BNP、CNP、URO和DNP。本文提供的嵌合多肽可以包括血管紧张素多肽(如人类血管紧张素多肽)的任何合适的氨基酸区段。例如,本文提供的嵌合多肽可包括SEQ ID NO:1中所列的序列。在一些情况中,本文提供的嵌合多肽可以包括全长血管紧张素 多肽(如全长人类血管紧张素多肽)。例如,本文提供的嵌合多肽可以包括如下序列:DRVYIHPFHL(SEQ ID NO:14)。

[0067] 本文提供的嵌合多肽可以包括利钠肽的环结构。环结构的示例包括但不限于:$ANP_{环}$、$BNP_{环}$、$CNP_{环}$、$DNP_{环}$和$URO_{环}$。在一些情况下,可以采用含有一个或多个(如一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多)氨基酸添加、缺失或取代的$ANP_{环}$、$BNP_{环}$、$CNP_{环}$、$DNP_{环}$或$URO_{环}$。例如,可采用含两个氨基酸取代的$ANP_{环}$或$BNP_{环}$作为本文提供的嵌合多肽的环结构。

[0068] 在一些情况下,本文提供的嵌合多肽包括利钠肽的反环结构。反环结构的示例包括但不限于:反-$ANP_{环}$(CGLGSQAGIRDMRGGFC;SEQ ID NO:39)、反-$BNP_{环}$(CGLGSSSSIRDMKRGFC;SEQ ID NO:40)、反-$CNP_{环}$、反-$DNP_{环}$(CGLNSVHNIRDIKHGFC;SEQ ID NO:41)和反-$URO_{环}$(CGLGSQAGIRDMRGGFC;SEQ ID NO:42)。在一些情况下,可以采用含一个或多个(如一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个)氨基酸添加、缺失或取代的反-$ANP_{环}$、反-$BNP_{环}$、反-$CNP_{环}$、反-$DNP_{环}$和反-$URO_{环}$。例如,可采用含两个氨基酸取代的反-$ANP_{环}$或反-$BNP_{环}$作为本文提供的嵌合多肽的环结构。

[0069] 在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可包括血管紧张素多肽的任何合适的氨基酸区段,作为含有所述环结构或反环结构的那些多肽相对于环结构或反环结构的N末端部分

或C末端部分。例如，本文提供的嵌合多肽可包括血管紧张素多肽的氨基酸区段(如Ang-(1-7))，随后是环结构和可任选的利钠肽的C末端(如$ANP_{C末端}$、$BNP_{C末端}$或$DNP_{C末端}$)。在一些情况下，可任选的利钠肽N末端(如$ANP_{N末端}$或$BNP_{N末端}$)之后可以是利钠肽的环结构和血管紧张素多肽的氨基酸区段(如Ang-(1-7))。

[0070] 在一些情况下，本文提供的嵌合多肽可包括血管紧张素的任何合适的氨基酸区段，作为N末端部分或作为C末端部分连接至利钠肽的N末端(如$ANP_{N末端}$、$BNP_{N末端}$、$CNP_{N末端}$、$DNP_{N末端}$或$URO_{N末端}$)或C末端(如$ANP_{C末端}$、$BNP_{C末端}$或$DNP_{C末端}$)且不具有环或反环结构。例如，本文提供的嵌合多肽可包括血管紧张素多肽的氨基酸区段(如Ang-(1-7))，随后是利钠肽的C末端(例如，$ANP_{C末端}$或$BNP_{C末端}$)且不具有环或反环结构。在一些情况下，利钠肽的C末端($ANP_{C末端}$或$BNP_{C末端}$)后可以是血管紧张素的氨基酸区段(如Ang-(1-7))且不具有环或反 环结构。

[0071] 参见图1，本文提供的嵌合多肽可包括利钠肽的N末端和环结构以及C末端Ang-(1-7)。在一些情况下，所述利钠肽的N末端和环结构可以来自相同利钠肽(参见如图2～6)或不同利钠肽(参见如图7～18)。例如，本文提供的嵌合多肽可如图3所示含有$BNP_{N末端}$接以$BNP_{环}$接以Ang-(1-7)或可如图11所示含有$ANP_{N末端}$接以$BNP_{环}$接以Ang-(1-7)。在一些情况下，本文提供的嵌合多肽可包括N末端Ang-(1-7)接以利钠肽的环结构和C末端，如图19和20所示。

[0072] 在一些情况下，本文提供的嵌合多肽中所包含的NP的N末端、环结构、反环结构和/或C末端可在一个或多个位置(如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个位置)上包含变体(如取代、添加或缺失)。可如本文所述制备并修饰这类变体NP序列，如相对于天然NP氨基酸序列含有一个或多个氨基酸取代的那些。在一些情况下，氨基酸取代可通过选择不显著改变对维持特定性质所起作用的取代来进行，所维持的性质有：(a)取代区域的肽骨架结构、(b)靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c)侧链的大小。例如，天然产生的残基可基于侧链性质分组如下：(1)疏水氨基酸(正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)；(2)中性亲水氨基酸(半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸)；(3)酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)；(4)碱性氨基酸(天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸)；(5)影响链取向的氨基酸(甘氨酸和脯氨酸)；以及(6)芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)。这些组内的取代可视作保守取代。有用的取代的非限制性示例包括但不限于：缬氨酸取代丙氨酸、赖氨酸取代精氨酸、谷氨酰胺取代天冬酰胺、谷氨酸取代天冬氨酸、丝氨酸取代半胱氨酸、天冬酰胺取代谷氨酰胺、天冬氨酸取代谷氨酸、脯氨酸取代甘氨酸、精氨酸取代组氨酸、亮氨酸取代异亮氨酸、异亮氨酸取代亮氨酸、精氨酸取代赖氨酸、亮氨酸取代甲硫氨酸、亮氨酸取代苯丙氨酸、甘氨酸取代脯氨酸、苏氨酸取代丝氨酸、丝氨酸取代苏氨酸、酪氨酸取代色氨酸、苯丙氨酸取代酪氨酸和/或亮氨酸取代缬氨酸。

[0073] 可用于制备本文提供的嵌合多肽的NP序列的变体N末端部分的示例包括但不限于：SAPRSLRRSS(SEQ ID NO:15)、TVPRSLRRSS(SEQ ID NO:16)、TAGRSLRRSS(SEQ ID NO:17)、TAPKSLRRSS(SEQ ID NO:18)、TLRRSS(SEQ ID NO:19)、SIRRSS(SEQ ID NO:20)、SLKRSS(SEQ ID NO:21)和SLRKSS(SEQ ID NO:22)。可用于制备本文提供的嵌合多肽的NP序列的变体C末端部分的示例包括但不限于：KVLRRR(SEQ ID NO:23)、KVLRKH(SEQ ID NO:24)、KVLKRH(SEQ ID NO:25)和KVIRRH(SEQ ID NO:26)。

[0074] 可在用于制备本文提供的嵌合多肽的NP氨基酸序列内的任何位置进行保守取代的其它示例包括但不限于表1所列情形。

[0075] 表1保守氨基酸取代的示例

[0076]

原始残基	示例取代
丙氨酸	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸
精氨酸	赖氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺
天冬酰胺	谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸
天冬氨酸	谷氨酸
半胱氨酸	丝氨酸
谷氨酰胺	天冬酰胺
谷氨酸	天冬氨酸
甘氨酸	脯氨酸
组氨酸	天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸
异亮氨酸	亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、正亮氨酸
亮氨酸	正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸
赖氨酸	精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺
甲硫氨酸	亮氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸
苯丙氨酸	亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸
脯氨酸	甘氨酸
丝氨酸	苏氨酸
苏氨酸	丝氨酸
色氨酸	酪氨酸
酪氨酸	色氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸
缬氨酸	异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸、正亮氨酸

[0077] 在一些情况下，用于制备本文提供的嵌合多肽的NP氨基酸序列可包括一个或多个非保守取代。非保守取代通常表示采用上文某一类别中的成员替代另一类别中的成员。这类产出是提供大量这类化合物或这类化合物的替代实施方式所需的。可通过分析肽变体的特定活性来容易地确定氨基酸的改变是否导致功能性多肽。

[0078] 本文提供的嵌合多肽可具有任何合适的序列。例如，多肽可包括SEQ IDNO:2、3和1中所列的序列。在一些情况下，本文提供的嵌合多肽可包含：(a) 与SEQ ID NO:1中所列序列比对存在三个或更少(例如两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列，以及(b)与$ANP_{环}$、$BNP_{环}$、$CNP_{环}$、$DNP_{环}$或$URO_{环}$的序列比对存在五个或更少(例如四个或更少、三个或更少、两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列。在一些情况下，本文提供的嵌合多肽可包含：(a)与SEQ ID NO:1中所列序列比对存在三个或更少(例如两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列，其后是(b)与$ANP_{环}$、$BNP_{环}$、$CNP_{环}$、$DNP_{环}$或URO 环的序列比对存在五个或更少(例如四个或更少、三个或更少、两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列，其后是(c)与$ANP_{C末端}$、$BNP_{C末端}$或$DNP_{C末端}$的序列相比存在五个或更少(例如四个或更少、三个或更少、两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列。在一些情况下，本文提供的嵌合多肽可包含(a)与$ANP_{N末端}$、$BNP_{N末端}$、$CNP_{N末端}$、$DNP_{N末端}$或$URO_{N末端}$的序列比对

存在五个或更少(例如四个或更少、三个或更少、两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列,其后是(b)与ANP环、BNP环、CNP环、DNP环或URO环的序列比对存在五个或更少(例如四个或更少、三个或更少、两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列,其后是与SEQ ID NO:1中所列序列比对存在三个或更少(例如两个或更少、一个或零个)氨基酸添加、缺失、取代或其组合的氨基酸序列。

[0079] 本文提供的嵌合多肽可具有任何合适的长度。例如,本文提供的嵌合多肽的长度可以是20～55(如24～55、24～45、25～45、26～44、27～43、28～42、29～41、30～40、31～39、23～35、25～30或30～35)个氨基酸残基。应理解,长度为20～55个氨基酸残基的多肽指长度介于20和55个氨基酸残基之间的多肽。

[0080] 可采用任何合适的试验方法(包括但不限于本文所述那些)来分析本文提供的嵌合多肽以及包含带有保守和/或非保守取代(如相对于天然ANP、BNP、CNP、DNP或URO)的变体NP序列、ANP、BNP、CNP、DNP或URO的区段或这类变体的区段的多肽的生物学活性。例如,具有本文所述变体NP氨基酸序列的嵌合多肽的活性可通过检测其对心脏成纤维细胞(CF)产生的cGMP水平的影响或通过测试其抑制CF增殖的能力来进行体外评价。举例来说,可在人 类CF中进行这类实验,如别处所述(Tsuruda等,Circ.Res.91:1127-1134(2002))。可使细胞接触待评估的多肽(如10^{-11}～10^{-6}M),并可采用竞争性RIA cGMP试剂盒(马萨诸塞州波士顿的帕金埃尔默公司(Perkin-Elmer))来分析样品的cGMP。对于CF增殖研究,可采用心肌营养素-1来诱导细胞增殖。可向经心肌营养素-1刺激的CF添加待评估的多肽,以测定其对细胞增殖的影响。可采用例如比色溴脱氧尿苷(BrdU)细胞增殖ELISA(印第安纳州印第安纳波利斯的罗氏公司(Roche))来检测并测定细胞增殖。

[0081] 在一些情况下,可体内评估本文提供的嵌合多肽,包含带有保守和/或非保守取代(如相对于天然ANP、BNP、CNP、DNP或URO)的变体NP序列,ANP、BNP、CNP、DNP或URO的区段或这类变体的区段的多肽,例如测定其对动物中某些因素的影响,这些因素例如肺毛细血管楔压、右心房压、平均动脉压、尿钠排泄、尿流、近端和远端部分钠的再吸收、血浆肾素活性、血浆cGMP水平、尿cGMP排泄、净肾脏cGMP生成、肾小球滤过率和左心室质量。在一些情况下,可在诱导性心肌梗塞(如冠状动脉结扎诱导的心肌梗塞)之后评估这类参数。

[0082] 在一些实施方式中,本文提供的嵌合多肽可以通过半胱氨酸残基之间的二硫键来成环(参见例如图1～20描述的结构)。在一些实施方式中,半胱氨酸上的巯基基团可被其他基团(如$-CH_2CH_2-$)替代。举例来说,为用$-CH_2-$基团替代巯基,可用α氨基丁酸来替代半胱氨酸残基。举例来说,可生成这类环状模拟多肽,如别处所述(Lebl和Hruby,Tetrahedron Lett.,25:2067(1984)和美国专利号4,161,521)。

[0083] 在一些情况下,可使丝氨酸或苏氨酸的OH与天冬氨酸或谷氨酸的羧基反应形成酯或酰胺桥以产生含$-CH_2CO_2CH_2-$结构的桥。在一些情况下,可使赖氨酸的侧链与天冬氨酸或谷氨酸反应获得酰胺以生成含$-CH_2C(O)NH(CH)_4-$结构的桥。用于合成这些桥的方法在他处有所描述(参见例如Schiller等,Biochem.Biophy.Res.Comm.,127:558(1985)以及Schiller等,Int.J.Peptide Protein Res.,25:171(1985))。其他形成桥的氨基酸残基和反应描述于例如美国专利号4,935,492。在一些情况下,可采用包含非肽键的肽模拟物来连接本文提供的嵌合多肽的氨基酸残基,如他处所述(参见例如Spatola等,Life Sci.,38:1243(1986);Spatola,Vega Data,1(3)(1983);Morley,Trends Pharm.Sci.,463-468

(1980);Hudson等,Int.J.Pept.Prot.Res.,14:177(1979);Spatola,收录于《氨基酸肽和蛋白质的化学与生物化学》(Chemistry and Biochemistry of Amino Acid Peptides and Proteins),B.Weinstein编,纽约的马塞尔德克公司(Marcel Dekker),第267页(1983);Hann,J.Chem.Soc.Perkin Trans.,1:307(1982);Almquist等,J.Med.Chem.23:1392(1980);Jennings-White等,Tetrahedron Lett.,23:2533(1982);欧洲专利申请EP45665;Holladay等,Tetrahedron Lett.,24:4401(1983);以及Hruby,Life Sci.,31:189(1982))。

[0084] 在一些情况下,本文提供的嵌合多肽的氨基酸序列与参比序列(如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或61)之间具有至少85%(如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同性。

[0085] 序列相同性百分比如下计算:确定比对的氨基酸序列(使靶氨基酸序列与已鉴定的氨基酸序列对齐)中匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以已鉴定的氨基酸序列(如SEQ ID NO:3)的氨基酸数目,并乘以100。匹配位置表示比对的氨基酸序列中的相同位置上出现相同氨基酸的位置。也可确定任何核酸序列的序列相同性百分比。

[0086] 采用包含BLASTN2.0.14版和BLASTP2.0.14版的BLASTZ独立版本中的BLAST2Sequences(B12seq)程序将靶氨基酸序列与已鉴定氨基酸序列(如SEQ ID NO:3)比对以确定序列相同性百分比。该BLASTZ独立版本可在万维网(World Wide Web)的Fish&Richardson的网址(fr.com/blast)或美国政府的国家生物科技信息中心(ncbi.nlm.nih.gov)获取。可在BLASTZ附带的自述文件中找到解释如何使用B12seq程序的说明。

[0087] B12seq采用BLASTN或BLASTP算法进行两条序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较蛋白质序列。为比较两条核酸序列,选项设置如下:-i设为含有第一条待比对核酸序列的文件(如C:\seq1.txt);-j设为含有第二条待比对核酸序列的文件(如C:\seq2.txt);-p设为blastn;-o设为任意所需文件名(如C:\output.txt);-q设为-1;-r设为2;其他选项为默认设定。以下命令将生成含两条序列间比较的输出文件:C:\B12seq-i c:\seq1.txt-jc:\seq2.txt-p blastn-o c:\output.txt-q-1-r2。如果靶序列与已鉴定序列的任何部分具有同源性,则所指定的输出文件将以排列后序列的形式显示这些同源区域。如果靶序列与已鉴定序列的任何部分均不具有同源性,则所指定的输出文件将不会显示排列后序列。

[0088] 例如,如果(1)靶序列与SEQ ID NO:3中所列序列比较,且(2)B12seq程序显示靶序列与SEQ ID NO:3中所列序列的某一区域对齐且匹配数目为15,那么该氨基酸靶序列与SEQ ID NO:3的相同性百分比为88.2(即15÷17x100=88.2)。应注意,相同性百分比值四舍五入至十分位。例如78.11、78.12、78.13和78.14向下四舍五入至78.1,而78.15、78.16、78.17、78.18和78.19向上四舍五入至78.2。还应注意长度值始终为整数。

[0089] 本文提供的嵌合多肽可采用任何合适的方法(包括固相合成)来制备并可采用手动技术或自动技术(例如采用加利福尼亚州福斯特城的应用生物系统公司(Applied BioSystems)的肽合成仪或加利福尼亚州圣拉斐尔的生物探索公司(Biosearch Inc)的自动肽合成仪)生成。半胱氨酸之间的二硫键可采用KCN通过对线性多肽的轻度氧化来引入,

如别处所述(美国专利号4,757,048)。在一些情况下,可如本文所述重组生成本文提供的嵌合多肽。

[0090] 在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可以是基本纯的多肽。本文所用关于多肽的术语"基本纯"表示所述多肽基本不含其他多肽、脂质、碳水化合物和核酸。在一些情况下,基本纯的多肽可以是至少60%纯的多肽或任何化学合成多肽。基本纯的多肽可以是至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%纯。在非还原聚丙烯酰胺凝胶中,基本纯的多肽通常呈现单一主条带。

[0091] 本文提供的嵌合多肽的羧基基团的盐可通过如下制备:使所述多肽接触所需碱的一种或多种等同物,所述碱例如金属氢氧化物碱(如氢氧化钠)、金属碳酸盐或碳酸氢盐碱(如碳酸钠或碳酸氢钠)或胺碱(如三乙胺、三乙醇胺等)。本文提供的嵌合多肽的酸加成盐的制备可通过使多肽接触无机或有机酸的一种或多种等价物(如盐酸)来进行。

[0092] 本文提供的嵌合多肽的羧基基团的酯的制备可采用能将羧酸或前体转化为酯的任何合适方法来进行。例如,使用梅里菲尔德(Merrifield)合成技术时,一种制备本文提供的嵌合多肽的酯的方法是:在所需醇存在下并视树脂而定在碱性或酸性条件下,从树脂切割完整的多肽。然后,所述多肽的C末端可在多肽与树脂分离时直接酯化,而无需分离游离酸。

[0093] 本文提供的嵌合多肽的酰胺的制备可采用能将羧酸基团或前体转化为酰胺的技术来进行。一种用于在C末端羧基基团处形成酰胺的方法包括:采用合适的胺从固态载体上切割所述多肽,或在醇存在下进行切割,以生成酯,随后采用所需的胺进行氨解。

[0094] 本文提供的嵌合多肽氨基基团的N-酰基衍生物可采用N-酰基受保护的氨基酸进行最终缩合,或通过酰化受保护或未保护多肽来制得。O-酰基衍生物的制备可通过例如酰化游离羟基肽或肽树脂来进行。无论何种酰化均可采用标准酰化试剂如酰基卤、酸酐、酰基咪唑等来进行。如需要,可一同进行N-和O-酰化。

[0095] 在一些情况下,本文提供的嵌合多肽可通过使其连接至聚合物如聚乙二醇(PEG)或通过与另一种多肽如白蛋白的融合来修饰。例如,可通过赖氨酸残基将一种或多种PEG连接至本文提供的嵌合多肽。与PEG或另一种合适的聚合物的连接,或与白蛋白或另一种合适多肽的融合可导致经修饰嵌合多肽的半衰期比未经修饰的嵌合多肽长。不受具体机制的限制,血清半衰期延长的原因可以是经修饰嵌合多肽的蛋白质降解减少、免疫识别降低或细胞清除降低。可采用任何合适的方法,通过连接PEG(也称作"PEG化")或其他聚合物来修饰嵌合多肽,所述聚合物包括但不限于他处所述的那些(美国专利号6,884,780;Cataliotti等,Trends Cardiovasc.Med.,17:10-14(2007);Veronese和Mero,BioDrugs,22:315-329(2008);Miller等,Bioconjugate Chem.,17:267-274(2006);以及Veronese和Pasut,Drug Discov.Today,10:1451-1458(2005))。通过与白蛋白融合来修饰嵌合多肽的方法示例包括但不限于他处所述的那些(美国专利公开号20040086976以及Wang等,Pharm.Res.,21:2105-2111(2004))。

[0096] 术语"心脏重塑"表示可伴随心肌梗塞、急性心力衰竭或其他疾病发生的心脏的影响。其包括例如心脏扩张、心肌细胞肥大和心肌纤维化(即间质成纤维细胞增殖)。可采用本文提供的嵌合多肽来抑制或预防伴随心肌梗塞或急性心力衰竭发生的心脏重塑。在一些情况下,心脏重塑减少的指示性参数可包括以下一种或多种:心脏卸负荷(cardiac

unloading)(即心脏内压力降低)、肾小球滤过 率(GFR)提高、血浆肾素活性(PRA)降低、血管紧张素II水平降低、心脏成纤维细胞增殖减少、左心室(LV)肥大减少、LV质量(指示纤维化和肥大减少)降低、肺毛细血管楔压(PCWP,对左心房压的间接度量)降低、右心房压降低、平均动脉压降低、醛固酮水平(指示抗纤维化作用)降低、心室纤维化减少、射血分数提高,以及LV收缩末期内径减小。为确定本文提供的嵌合多肽能否抑制或减少心脏重塑,可使用本领域公知和/或例如本文描述的方法来评估这类参数中的一种或多种(如在使用嵌合多肽治疗之前和之后)。相比于应用来自其他物种的氨基酸序列,应用人类氨基酸序列构建本文提供的嵌合多肽能够使蛋白质治疗中可见的免疫原性风险最小化(Haller等,Clin.Pharmacol.Ther.,84:624-7(2008);以及Leader等,Nat.Rev.Drug Discov.,7:21-39(2008))。

[0097] 诸如急性心肌梗塞(AMI)或急性心力衰竭(AHF)的疾病会导致肾脏损伤以及心脏损伤。在一些情况下,本文提供的嵌合多肽能够保护肾脏在AMI和AHF发生后免受损伤。良好肾脏活动的指示性参数包括:例如,钠的近端部分重吸收(PFRNa)降低、钠的远端部分重吸收(DFRNa)降低、尿钠排泄(UNaV)增加以及尿流(UV)增加。可评估这类参数中的任何一种或多种(如在使用嵌合多肽治疗前后)以确定所述嵌合多肽是否具有肾脏保护作用。评估这些参数的方法在本领域中公知,也在本文中有描述。

[0098] 在一些情况下,本文提供的嵌合多肽能够抑制或减少例如AMI和AHF后发生的心脏重塑。能够抑制心脏重塑的嵌合多肽是能够使指示心脏重塑被抑制或减少的一种或多种参数变化至少10%的嵌合多肽。为确定具体的嵌合多肽是否具有这类性质,可以进行本领域公知、包括本文中所述的测定。包含变体NP序列的嵌合多肽可具有对应野生型NP序列的至少约10%(如至少约10%、15%、20%、25%、33%、40%、50%、60%、67%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或大于100%)的生物活性。

[0099] 核酸、载体和宿主细胞

[0100] 本文还提供编码本文提供的嵌合多肽的核酸,以及包含所述核酸的表达载体,和包含所述核酸和/或表达载体的宿主细胞。本文所用术语“核酸”表示RNA和DNA,包括cDNA、基因组DNA和合成(如化学合成)的DNA。核酸分子可以是双链或单链(即正义或反义单链)。核酸包括,例如编码本文提供的嵌 合多肽的cDNA。

[0101] “分离的核酸”是指与脊椎动物基因组中存在的其他核酸分子(包括脊椎动物基因组中通常位于所述分离的核酸的一侧或两侧的核酸)相分离的核酸。提及核酸时,本文所用的术语“分离的”也包括任何非天然形成的核酸序列,这类非天然形成的序列无法在自然界中找到并且在天然形成的基因组中没有直接的连续序列。

[0102] 分离的核酸可以是例如DNA分子,限制条件是在天然产生的基因组中常规发现与该DNA分子直接侧接的核酸序列之一被移除或缺失。因此,分离的核酸包括但不限于:独立于其他序列以单独分子形式存在的DNA分子(如化学合成核酸、或由PCR或限制性内切酶处理生成的cDNA或基因组DNA片段)以及纳入载体、自主复制质粒、病毒(如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或疱疹病毒)的DNA,或原核生物或真核生物基因组DNA内的DNA。此外,分离的核酸可包括经工程改造的核酸,如作为杂交或融合核酸的部分的DNA分子。在例如cDNA文库或基因组文库中的数百至数百万的其他核酸中存在的核酸,或者包含基因组DNA限制性酶切消化产物的凝胶切片不被视作分离的核酸。

[0103] 可使用标准技术产生分离的核酸分子，所述技术包括但不限于常规分子克隆和化学核酸合成技术。例如，可使用聚合酶链式反应(PCR)技术来获得包含编码血管紧张素多肽或NP的核苷酸序列的分离的核酸。PCR指酶扩增靶核酸的过程或技术。通常使用感兴趣区域末端或其末端之外的序列信息来设计寡核苷酸引物，其序列与待扩增模板的相反链一致。PCR可用于从DNA以及RNA(包括全基因组DNA和全细胞RNA的序列)扩增特定序列。引物长度通常为14～40个核苷酸，但也可以是10个至数百个核苷酸的长度范围。一般的PCR技术在例如《PCR引物：实验室操作手册》(PCR Primer:A Laboratory Manual)，Dieffenbach和Dveksler主编，冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press，1995年)中有描述。采用RNA作为模板来源时，可使用反转录酶合成互补DNA(cDNA)链。也可采用连接酶链式反应、链置换扩增、自维持序列扩增或基于核酸序列的扩增来获得分离的核酸。参见例如Lewis(1992)Genetic Engineering News12:1；Guatelli等(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:1874-1878；以及Weiss(1991)Science254:1292。

[0104] 分离的核酸也可以合成为单个核酸分子(如采用亚磷酰胺技术以3'至5'反 向进行自动DNA合成)或一系列寡核苷酸。例如，可以合成包含所需序列的一对或多对长寡核苷酸(如>100个核苷酸)，每对包含序列互补的短区段(如约15个核苷酸)，从而在寡核苷酸对退火时可形成双链体(duplex)。DNA聚合酶用于延伸寡核苷酸，导致每个寡核苷酸对生成单一的双链核酸分子，随后将其连入载体。

[0105] 也可通过诱变来获得分离的核酸(如编码变体NP的核酸)。例如，可通过PCR采用标准技术(包括寡核苷酸指导诱变和定点诱变)来诱变参比序列。参见《分子生物学简明操作流程》(Short Protocols in Molecular Biology)，第8章，绿色出版协会(Green Publishing Associates)和约翰韦利森公司(John Wiley&Sons)，Ausubel等主编，1992。本文提供了变体NP的非限制性示例。

[0106] 包含编码NP的核酸分子或其核酸互补体的核苷酸序列的来源可从任何真核来源获得(包括总RNA或多聚A^+RNA)，所述真核来源包括爬行动物(如蛇)或哺乳动物(如人、大鼠、小鼠、狗、牛、马、绵羊、山羊或猫)细胞来源，可通过本领域公知的方法从所述来源获得cDNA。核酸分子的其他来源包括源自任何真核细胞来源(包括哺乳动物来源)的基因组文库。

[0107] 可采用标准方法鉴定并分离编码天然NP的核酸分子，所述标准方法例如Sambrook等，《分子克隆：实验室操作手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)，纽约的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)(1989)。例如，可使用反转录PCR(RT-PCR)从包含感兴趣RNA序列的经分离RNA(如人类组织中提取的总RNA)中分离并克隆NP cDNA。其他鉴定、分离和克隆NP cDNA的方法包括例如筛选cDNA文库。

[0108] 还提供包含诸如本文所述核酸的载体。“载体”是复制子，如质粒、噬菌体或粘粒，其中可插有另一DNA区段以使所插入的区段能够进行复制。“表达载体”是包含一种或多种表达控制序列的载体，而“表达控制序列”是控制和调节另一DNA序列转录和/或翻译的DNA序列。

[0109] 在表达载体中，核酸(如编码本文提供的嵌合多肽的核酸)可操作性地连接至一条或多条表达控制序列。本文所述的“操作性地连接”表示纳入遗传构建体从而表达控制序列有效控制感兴趣的编码序列的表达。表达控制序列的示例包括启动子、增强子和转录终止

区。启动子是由DNA分子区域组成的表达控制序列，其通常在转录起始位点上游的100～500个核苷酸内(通常靠近RNA聚 合酶II的起始位点)。为了将编码序列置于启动子的控制之下，需要将所述多肽的翻译阅读框的翻译起始位点设置在所述启动子下游的1～约50个核苷酸处。增强子提供关于时间、位点和水平的表达特异性。与启动子不同，增强子可以在相距转录位点不同距离的位置发挥作用。增强子还可位于转录起始位点的下游。在细胞中，当RNA聚合酶能够将编码序列转录为mRNA，mRNA随后可被翻译为所述编码序列编码的蛋白质时，则编码序列被“操作性地连接”至表达控制序列并在其“控制下”。

[0110] 合适的表达载体包括但不限于：来源于例如噬菌体、杆状病毒、烟草花叶病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、腺病毒和腺相关病毒的质粒和病毒载体。多种载体和表达系统可在市场上从如下公司购得，如威斯康星州麦迪逊的诺瓦基公司(Novagen)、加州帕洛阿尔托的克隆泰克公司(Clontech)、加利福尼亚州拉荷亚市的司查塔基公司(Stratagene)和加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰/生命技术公司(Invitrogen/Life Technologies)。

[0111] 表达载体可包括设计为便于对经表达的核苷酸序列进行后续操作(如纯化或定位)的标签序列。通常将标签序列(如绿色荧光蛋白(GFP)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、多聚组氨酸、c-myc、血细胞凝集素或Flag™标签(康涅狄格州纽黑文的柯达公司(Kodak))与被编码的多肽融合表达。可将这类标签插入所述多肽内的任何位置，包括羧基或氨基末端。

[0112] 本文还提供包含本文提供的核酸或载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”意在包括原核和真核细胞，所述细胞中可导入重组核酸或载体(如表达载体)。本文所用的“转化”和“转染”涵盖通过多种技术之一将核酸分子(如载体)导入细胞。尽管不限于具体技术，本领域中已充分建立了多种这类技术。用于转化和转染宿主细胞的合适方法可见于例如Sambrook等，《分子克隆：实验室操作手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第2版)，纽约的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)(1989)。例如，磷酸钙沉淀、电穿孔、热击、脂质体转染、显微注射和病毒介导的核酸转移可用来将核酸导入细胞。此外，裸DNA可直接体内递送至细胞，如别处所述(美国专利号5,580,859和5,589,466)。

[0113] 检测多肽

[0114] 本文件还提供检测本文提供的嵌合多肽的方法和物质。这类方法和物质可用于监控接受嵌合多肽进行治疗的哺乳动物体内的嵌合多肽的水平。例如，可采用一种或多种抗体对本文提供的嵌合多肽(如图2～20和23～32中所列的任一嵌合多肽)进行免疫学检测。本文所用术语“抗体”包括能够结合本文提供的嵌合多肽的表位决定簇的完整分子及其片段。术语“表位”表示抗原上的抗原决定簇，其能与抗体的对位(paratope)结合。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成，并且通常具有特定的三维结构特性，以及特定的电荷特性。表位通常具有至少五个连续氨基酸(连续表位)或者可以是限定特定结构的一组不连续氨基酸(如构象表位)。术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体、人源化或嵌合抗体、单链Fv抗体片段、Fab片段和F(ab)$_2$片段。多克隆抗体是被免疫动物血清内含有的抗体分子的异质群体。单克隆抗体是针对抗原特定表位的抗体的同质群体。

[0115] 可采用已知技术生成对本文提供的嵌合多肽(如图2～20和23～32中所列的任一嵌合多肽)有特异亲和性的抗体片段。例如，可通过胃蛋白酶消化抗体分子生成F(ab')2片段，并且通过还原F(ab')2片段的二硫键桥以生成Fab片段。在一些情况下，可构建Fab表达

文库。参见例如Huse等,Science,246:1275(1989)。,抗体或其片段一旦生成,即可就其对本文提供的嵌合多肽的识别使用标准免疫测定方法(包括ELISA技术、放射性免疫测定和免疫印记)进行检测。参见《分子生物学简明操作流程》(Short Protocols in Molecular Biology),第11章,绿色出版协会(Green Publishing Associates)和约翰韦利森公司(John Wiley&Sons),Ausubel等主编,1992。

[0116] 在免疫学测定中,对本文提供的嵌合多肽有特异亲和性的抗体或与这类抗体结合的二抗可被直接或间接标记。合适的标记物包括但不限于:放射性核素(如^{125}I、^{131}I、^{35}S、^{3}H、^{32}P、^{33}P或^{14}C),荧光基团(如荧光素、FITC、PerCP、若丹明或PE),发光基团(如Qdot™,加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen)提供的纳米粒),吸收特定波长光的化合物,或者酶(如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)。抗体可通过用生物素偶联来间接标记,随后用标记有上述分子的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白来检测。标记物的检测或定量方法取决于该标记物的性质并且是本领域中公知的。检测用品的示例包括但不限于:X射线胶片、放射性计数器、闪烁计数器、分光光度计、比色计、荧光计、发 光计和光密度计。这些方式的组合(包括"多层"测定)为本领域的技术人员所熟知且可被用于提高测定的灵敏度。

[0117] 用于检测本文提供的多肽的免疫测定可以多种已知形式进行,包括夹心试验、竞争试验(竞争性RIA)或桥联免疫测定。参见例如美国专利号5,296,347;4,233,402;4,098,876;和4,034,074。检测本文提供的嵌合多肽的方法通常包括:使生物样品接触与本文提供的嵌合多肽结合的抗体,并检测嵌合多肽与抗体的结合。例如,可采用本领域公知的多种方法将对本文提供的嵌合多肽具有特异亲和性的抗体固定在固体基质上,随后使其接触生物样品。可采用表面等离子体共振现象来检测嵌合多肽与固体基质上抗体的结合,该现象导致结合之后表面等离子体共振的强度改变,这种改变能够被合适的装置定性或定量地检测,如Biacore仪器(瑞典拉普革坦(Rapsgatan,Sweden)的比亚科国际公司(Biacore International AB))。在一些情况下,可如上文诉述标记并检测抗体。可使用已知量的本文提供的嵌合多肽生成标准曲线以协助对嵌合多肽水平的定量。

[0118] 在一些实施方式中,可采用固定有捕获抗体的固态基质的"夹心"法试验来检测本文提供的嵌合多肽是否存在或检测其水平。可使所述固态基质接触生物学样品,从而该样品内任何感兴趣的嵌合多肽均能结合至所述固定化的抗体。可使用对嵌合多肽具有特异亲和性的"检测"抗体来确定与抗体结合的嵌合多肽是否存在或检测其水平。在一些实施方式中,可采用对ANP、BNP、CNP、DNP、URO或血管紧张素多肽以及本文提供的嵌合多肽有结合亲和性的捕获抗体。在该实施方式中,可采用对本文提供的具体嵌合多肽(如图2～20和23～32中所列的任一嵌合多肽)具有特异结合亲和性的检测抗体。应理解,在夹心法试验中,捕获抗体与检测抗体不应结合至同一表位(或多克隆抗体的表位范围)。因此,如果采用单克隆抗体作为捕获抗体,则检测抗体可以是另一种能够结合至与捕获单克隆抗体所结合表位物理上分隔或仅部分重叠的表位的单克隆抗体,或者能够结合至不同于捕获单克隆抗体所结合表位或此外;另有结合表位的多克隆抗体。如果采用多克隆抗体作为捕获抗体,则检测抗体可以是结合至与捕获多克隆抗体所结合表位物理上分隔或仅部分重叠的表位的单克隆抗体,或者结合至不同于捕获多克隆抗体所结合表位或此外另有结合表位的多克隆抗体。夹心法试验的形式可以是夹心ELISA试验、夹心Western印迹试验或夹心免疫磁性检测试验。

[0119] 抗体(如捕获抗体)能够结合的合适固态基质包括但不限于:微量滴定板、试管、膜(如尼龙或硝化纤维膜)和珠或颗粒(例如琼脂糖、纤维素、玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、磁性或可磁化的珠或颗粒)。使用自动化的免疫测定系统时,磁性或可磁化的颗粒尤为有用。

[0120] 可通过标准方法产生对本文提供的嵌合多肽具有特异亲和性的抗体。例如,嵌合多肽可按上述方法重组产生或化学合成,并用于免疫宿主动物,包括兔、鸡、小鼠、豚鼠或大鼠。例如,可使用图2～20和23～32中所列的任一嵌合多肽来免疫动物。可用于增强免疫应答的不同佐剂取决于宿主物种,并且包括弗氏佐剂(Freund's adjuvant)(完全或不完全)、矿物胶(诸如氢氧化铝)、表面活性物质(诸如卵磷脂)、复合多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔戚血蓝素和二硝基酚。单克隆抗体可以使用本文提供的嵌合多肽和标准杂交瘤技术制备。具体而言,单克隆抗体可采用通过培养中的连续细胞系生成抗体分子的任何技术来获得,例如Kohler等,Nature,256:495(1975)中所述的技术,人类B细胞杂交瘤技术(Kosbor等,Immunology Today,4:72(1983);Cole等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:2026(1983))以及EBV杂交瘤技术(Cole等,《单克隆抗体与癌症治疗》("Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy"),Alan R.Liss,Inc.,第77-96页(1983))。此类抗体可以是任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亚类。产生所述单克隆抗体的杂交瘤可在体外和体内培养。

[0121] 在一些情况下,可使用针对NP序列或血管紧张素多肽序列的抗体或两种抗体类型的组合来检测本文提供的嵌合多肽(如图2～20和23～32中任一所列的嵌合多肽)。

[0122] 用于检测本文提供的嵌合多肽的其它技术包括质谱光度技术,诸如电喷雾离子化(ESI)以及基质辅助激光解析离子化(MALDI)。参见例如Gevaert等,Electrophoresis,22:1645-51(2001);Chaurand等,J.Am.Soc.Mass Spectrom.,10:91-103(1999)。用于这类应用的质谱可从加利福尼亚州福斯特城的应用生物系统公司(Applied Biosystems);马萨诸塞州比勒利卡的布鲁克道尔顿公司(Bruker Daltronics)以及加利福尼亚州森尼韦尔的安法玛西亚公司(Amersham Pharmacia)处获得。

[0123] 用于给予的组合物与方法

[0124] 可将本文提供的嵌合多肽(如图2～20和23～32中任一所列的嵌合多肽)或本文提供的嵌合多肽的编码核酸纳入组合物中以给予哺乳动物(如罹患AMI或AHF或有此风险的人类)。用于配制和之后给予治疗性组合物的方法为本领域技术人员所熟知。剂量通常取决于对象对该化合物的反应,疗程持续数日至数月或直至达到合适的反应。本领域普通技术人员可按常规确定最适剂量、给药方法和重复率。最适剂量可根据嵌合多肽的相对功效而变化,且一般可基于在体外和/或体内动物模型中有效的EC_{50}指标来估计。包含本文提供的嵌合多肽或本文提供的核酸的组合物可在每天、每周、每月或间隔更长时间给予一次或多次,或者可以持续给予一段时间(如数小时、数天或数周)。例如,本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物可以如下方式给予心肌梗塞患者:在或大致在再灌注时以至少约0.01ng多肽/kg体重～约100mg多肽/kg体重剂量给予,或者可在或大致在再灌注时以输注方式开始持续给予1～7天(例如,以约0.01ng多肽/kg/分钟～约0.5μg多肽/kg/分钟的剂量)。

[0125] 可将嵌合多肽或核酸混合、封装、复合,或在其它情况下与其他分子、分子结构或化合物的混合物(例如脂质体、受体或细胞靶向分子)联用,或以口服、局部或其他制剂辅助

摄取、分布和/或吸收。

[0126] 在一些实施方式中，组合物可包含本文提供的嵌合多肽以及药学上可接受的运载体。举例来说，药学上可接受的运载体包括：药学上可接受的溶剂、悬浮剂或用于递送抗体至对象的任何其它药理学惰性运载体。当与一种或多种治疗性化合物和给定药物组合物的任何其它组分合并时，药学上可接受的运载体可以是液态或固态，且可根据计划的给药方式选择以提供所需的量、稳定性及其他适当输送和化学性质。药学上可接受的运载体通常包括但不限于：水；盐水溶液；粘结剂(如聚乙烯吡咯烷酮和羟丙甲纤维素)；填充剂(如乳糖、葡萄糖或其他糖、明胶或硫酸钙)；润滑剂(如淀粉、聚乙二醇或醋酸钠)；崩解剂(如淀粉或羧甲淀粉钠)；以及湿润剂(如月桂基磺酸钠)。

[0127] 可通过多种方法给予包含本文提供的嵌合多肽的药物组合物，所述方法取决于需要局部还是全身治疗。给予方式可以是，例如肠胃外(如通过皮下、囊内、心室内、肌内或腹腔内注射，或通过静脉(i.v.)滴注)；口服；局部(如透皮、舌下、眼或鼻内)；或肺部(如通过吸入或吹入粉末或气溶胶)，或可将这类方式联用。给药可以是快速的(如通过注射)或持续一段时间(如缓慢输注或用缓释剂型 给予)。

[0128] 用于肠胃外、囊内或心室内给药的组合物和制剂包括无菌水溶液(如无菌生理盐水)，其也可包含缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂(如渗透促进剂、运载体化合物和其他药学上可接受的运载体)。

[0129] 用于口服的组合物和制剂包括例如粉末剂或颗粒剂、水或非水性介质中的悬浮剂或溶液、胶囊剂、冲剂或片剂。这类组合物也可纳入增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘结剂。

[0130] 药物组合物包括但不限于：溶液、乳液、水性悬浮液和包含脂质体的制剂。这些组合物可由多种组分生成，所述组分包括例如预制液体、自乳化固体或自乳化半固体。乳液制剂对于口服递送治疗性组合物尤为有用，这是由于该剂型易于配制且其具有增溶、吸收及生物利用度功效。脂质体的特别有用之处在于其在药物递送方面具有特异性和持久作用。

[0131] 组合物还可包含常规见于药物组合物中的其它附属组分。因此，组合物还可包括相容的药物活性物质，例如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂，或多种剂型的物理配制过程中有用的附加材料，如色素、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。此外，可将组合物与辅助剂混合，所述辅助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲液、色素、调味料、渗透促进剂和芳香物质。然而，这类材料在添加时不应过度干扰组合物其他组分(如本文提供的嵌合多肽)的生物学活性。

[0132] 在一些情况下，可将本文提供的嵌合多肽制成缓释剂型。在一些情况下，可采用包衣、包膜或保护性基质来包含一种或多种本文提供的嵌合多肽。这类包衣、包膜或保护性基质可用于被覆留置装置，如支架、导管和腹膜透析管。在一些情况下，可将本文提供的嵌合多肽纳入聚合物质、脂质体、微乳液、微粒、纳米粒或蜡质中。

[0133] 可根据制药工业中熟知的常规技术来制备本文公开的药物制剂，所述制剂可方便地以单位剂型形式存在。这类技术包括将活性成分(如本文提供的嵌合多肽)与所需一种或多种药物运载体混合的步骤。通常使活性成分与液体运载体或细分的固体运载体或以上两种运载体均匀且充分地混合，随后必要时使产品成形。需要时可对制剂灭菌，前提是灭菌方法不会干扰制剂内所含分子(如本文提供的嵌合多肽)的有效性。

[0134] 减少或抑制心脏重塑的方法

[0135] 本文还提供了本文提供的嵌合多肽在例如AHF和AMI的治疗中的应用。例如，可对哺乳动物(如人类或非人类哺乳动物)给予本文提供的嵌合多肽以减少或抑制如心肌梗塞后可能发生的心脏重塑。例如，在一些实施方式中，可对经诊断患有AMI的哺乳动物给予本文提供的嵌合多肽或本文提供的组合物。可以任何适当剂量给予所述嵌合多肽或组合物，这取决于多种因素，所述因素包括但不限于所选试剂、疾病、目的是预防还是治疗。给予可以是局部给予或全身性给予。

[0136] 在一些实施方式中，本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物的给药剂量可以是至少约0.01ng多肽/kg～约100mg多肽/kg体重(如约10ng多肽/kg～约50mg多肽/kg、约20ng多肽/kg～约10mg多肽/kg、约0.1ng多肽/kg～约20ng多肽/kg、约3ng多肽/kg～约10ng多肽/kg或约50ng多肽/kg～约100μg多肽/kg体重)，但其他剂量也可提供有益的结果。在一些实施方式中，可以在或大致在再灌注时(即闭塞动脉打开时)开始以持续静脉输注的方式给予本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物，并持续一至七天(如一、二、三、四、五、六或七天)。这类组合物的给药剂量可以是，例如，约0.1ng多肽/kg/分钟～约500ng多肽/kg/分钟(如约0.5ng多肽/kg/分钟、约1ng多肽/kg/分钟、约2ng多肽/kg/分钟、约3ng多肽/kg/分钟、约5ng多肽/kg/分钟、约7.5ng多肽/kg/分钟、约10ng多肽/kg/分钟、约12.5ng多肽/kg/分钟、约15ng多肽/kg/分钟、约20ng多肽/kg/分钟、约25ng多肽/kg/分钟、约30ng多肽/kg/分钟、约50ng多肽/kg/分钟、约100ng多肽/kg/分钟或约300ng多肽/kg/分钟)。在一些实施方式中，可在再灌注之前(如再灌注之前约一小时)给予本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物，可以给予一个或多个独立剂量或者在再灌注之前约一小时开始持续输注。例如，可在再灌注之前约一小时、约45分钟、约30分钟或约15分钟给予组合物。在一些情况下，可在再灌注之后(如再灌注之后约10小时内)给予本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物，可以给予一个或多个独立剂量或者在再灌注之后约10小时内开始持续输注。例如，可在再灌注之后约一小时、约两小时、约三小时、约四小时、约五小时、约六小时、约七小时、约八小时、约九 小时、约十小时给予本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物。

[0137] 在一些实施方式中，本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物可在第一时间段经由第一途径(如静脉)给予，随后在第二时间段经由另一途径(如局部或皮下)给予。例如，本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物可通过静脉以约0.1ng多肽/kg/分钟～约300ng多肽/kg/分钟的剂量(如约1ng多肽/kg/分钟～约15ng多肽/kg/分钟、约3ng多肽/kg/分钟～约10ng多肽/kg/分钟或约10ng多肽/kg/分钟～约30ng多肽/kg/分钟)对哺乳动物(如人)给予一至七天(如一、二、三、四、五、六或七天)，随后可通过皮下以约10ng多肽/kg/天～约100ng多肽/kg/天的剂量(如约10ng多肽/kg/天、约20ng多肽/kg/天、约25ng多肽/kg/天、约30ng多肽/kg/天、约50ng多肽/kg/天或约100ng多肽/kg/天)对该哺乳动物给药5～30天(如7、10、14、18、21、24或27天)。

[0138] 本文提供的方法可包括对哺乳动物给予有效量的本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物。本文所用术语“有效量”指足以使哺乳动物受体心脏重塑减少和/或肾脏保护的一种或多种(如一、二、三、四、五、六、七、八、九或十种)指示性参数改变至少10％(如10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、

95%、99%或100%)的分子或组合物的量。例如,有效量的本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物指:能够使射血分数、GFR、尿钠排泄(UNaV)或尿流(UV)提高至少10%,和/或能够使PRA、LV质量、CF增殖、PCWP、RAP、MAP、醛固酮水平、LV肥大、心室纤维化、LV收缩末期内径、PFRNa或DFRNa降低至少10%,和/或能够导致心脏卸负荷的量。在一些实施方式中,方法可包括给予哺乳动物一定量的本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物,所述量足以使哺乳动物受药者心脏重塑减少和/或肾脏保护的一种或多种指示性参数变化至少50%。

[0139] 举例来说,在一些实施方式中,"有效量"的本文提供的嵌合多肽或包含本文提供的嵌合多肽的组合物可以是能够使受治疗哺乳动物中PRA和MAP降低且GFR和UV提高至少10%的量,比较基准是给予嵌合多肽或组合物之前或未给予嵌合多肽或组合物的哺乳动物中这些参数的水平(如前次心肌梗塞发作 中观察到的这些参数的水平)。

[0140] 以下实施例旨在进一步描述本发明,而非限制权利要求中所述本发明的范围。

[0141] 实施例

[0142] 实施例1-cANG诱导cGMP产生

[0143] 委托合成的cANG具有图4中所列的序列,并且经高效液相色谱和质谱确定分子量为3080.6Da。人心脏成纤维细胞(CF;加利福尼亚州圣迭戈的ScienCell公司)培养于来自该生产商的成纤维细胞培养基(加利福尼亚州圣迭戈的ScienCell公司)中,其中补充有成纤维细胞生长血清(FGS)、胎牛血清(FBS)和Pen/Strep。细胞在80～90%融合时被处理。实验仅采用1～4代细胞。为进行环GMP测定,如之前文献中所述处理细胞(Huntley等,J.Cell.Physiol.,209(3):943-9(2006))。简单地说,使细胞在含20mmol/L N-[2-羟乙基]哌嗪-N'[2-乙烷磺酸]、0.1%牛血清白蛋白和0.5mmol/L3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma))的汉克斯(Hank's)平衡盐溶液中孵育。经处理的细胞接受10^{-6}M、10^{-8}M或10^{-10}M的NP或cANG10分钟。在6%TCA中裂解细胞并超声10分钟。样品以四倍体积的醚提取四次、干燥并重溶在500mlcGMP测定缓冲液中。

[0144] 采用竞争性RIA cGMP试剂盒(马萨诸塞州波士顿的帕金埃尔默公司(Perkin-Elmer))测定样品。简单地说,使样品和标准品与100mL抗人cGMP多克隆抗体和I^{125}-抗原孵育18小时。向所述样品添加环GMP测定缓冲液,随后2500rpm离心20分钟。吸出游离部分,对结合部分计数并测定浓度。根据稀释因子和蛋白质浓度校正样品,数值表示为皮摩尔/mL。该测定对cGMP具有高度特异性,显示与ANP、BNP、CNP和内皮素-1之间没有交叉活性,且与cAMP、GMP、GDP、ATP和GTP之间的交叉反应性小于0.001%。

[0145] 与采用ANP、BNP和CNP处理CF类似,采用cANG处理CF导致cGMP生成(图20和21)。这些结果表明Ang1-7的添加不会干扰受体结合和cGMP生成。

[0146] 实施例2-BNP-Ang1-7和Ang1-7BNP诱导cGMP产生

[0147] 分别合成具有图3和图20所列序列的BNP-Ang1-7和Ang1-7BNP。

[0148] 使用Lipofectamine(纽约州格兰德岛的英杰公司(Invitrogen))稳定转染HEK293细胞以表达NPR-A(GC-A)或NPR-B(GC-B)。使经转染的细胞保持在补充有10%胎牛血清、100U/mL青霉素、100U/mL链霉素和250μg/mL G418的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)中。试剂购自纽约州格兰德岛的英杰公司(Invitrogen)。

[0149] 以下操作用于进行细胞刺激和cGMP测定。将细胞置于6孔板中并如他处所述处理(Tsuruda等,Circulation Research,91:1127-1134(2002))。简单地说,使细胞在包含20mmol/L N-[2-羟乙基]哌嗪-N'[2-乙烷磺酸]、0.1%牛血清白蛋白和0.5mmol/L3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma))的汉克斯(Hank's)平衡盐溶液中孵育。对经处理的细胞给予10^{-10}M、10^{-8}M或10^{-6}M的BNP-Ang1-7和Ang1-7BNP10分钟。细胞在300μL6%TCA中裂解并超声10分钟。样品经四倍体积的醚提取四次、干燥并重溶在500ml cGMP测定缓冲液中。采用竞争性RIA cGMP试剂盒(马萨诸塞州波士顿的帕金埃尔默公司(Perkin-Elmer))测定样品,如他处所述(Steiner等,J.Biol.Chem.,247:1106-1113(1972))。根据稀释因子和蛋白质浓度校正样品,数值表示为皮摩尔cGMP/孔。与ANP、BNP、CNP和内皮素-1之间没有交叉反应性,与cAMP、GMP、GDP、ATP和GTP之间的交叉反应性小于百分之0.001。

[0150] 与BNP类似(图33A),将NPR-A^+HEK293细胞暴露至BNP-Ang1-7或Ang1-7BNP也会诱导cGMP生成(图33B和33C)。BNP-Ang1-7或Ang1-7BNP均未诱导NPR-B^+HEK293细胞中的cGMP生成(图34B和34C)。在暴露至BNP的NPR-B^+HEK293细胞中可观察到极少量的cGMP生成(图34A)。Ang1-7与NPR-A^+HEK293细胞(图35,左图)或NPR-B^+HEK293细胞(图35,右图)接触未诱导cGMP生成。

[0151] 这些结果表明BNP-Ang1-7和Ang1-7BNP均会诱导cGMP生成。这些结果也表明,使Ang1-7在N末端位置或C末端位置连接至利钠多肽或利钠多肽的成分(如利钠多肽的环结构)不会干扰利钠多肽或利钠多肽组分结合其利钠多肽受体并诱导cGMP生成的能力。

[0152] 其他实施方式

[0153] 需要理解的是,当结合详细说明描述本发明时,前文中的描述旨在说明而非限制附加权利要求所定义的本发明范围。权利要求的范围包含其他方面、优势和修改。

序列表

<110> 梅约医学教育与研究基金会

<120> 利钠多肽

<130> 07039-1021WO1

<150> US 61/648,718
<151> 2012-05-18

<150> US 61/529,113
<151> 2011-08-30

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows 4.0 版

<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1
[0001] Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2
Ser Leu Arg Arg Ser Ser
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3
Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15
Cys

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4
Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5
Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15
Cys

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6
Gly Leu Ser Lys Gly
1 5

[0002]

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7
Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15
Cys

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> 窄头树眼镜蛇(Dendroaspis angusticeps)

<400> 8
Glu Val Lys Tyr Asp Pro
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 窄头树眼镜蛇(Dendroaspis angusticeps)

<400> 9
Cys Phe Gly His Lys Ile Asp Arg Ile Asn His Val Ser Asn Leu Gly
1 5 10 15

Cys

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10
Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11
Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15
Cys

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
[0003] <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12
Asn Ser Phe Arg Tyr
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13
Lys Val Leu Arg Arg His
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
1 5 10

<210> 15

<220>

<223> 合成肽

<400> 15
000

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16
Thr Val Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0004]
<400> 17
Thr Ala Gly Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 18
Thr Ala Pro Lys Ser Leu Arg Arg Ser Ser
1 5 10

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 19
Thr Leu Arg Arg Ser Ser
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20
Ser Ile Arg Arg Ser Ser
1 5

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 21
Ser Leu Lys Arg Ser Ser
1 5

[0005]

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 22
Ser Leu Arg Lys Ser Ser
1 5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 23
Lys Val Leu Arg Arg Arg
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 24
Lys Val Leu Arg Lys His
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 25
Lys Val Leu Lys Arg His
1 5

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0006]

<400> 26
Lys Val Ile Arg Arg His
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 27
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Asn Ser Phe Arg Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 28
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Lys Val Leu Arg Arg His

1 5 10

<210> 29
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Pro Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro Asn
1 5 10 15
Ala Pro Ser Thr Ser Ala
20

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> 窄头树眼镜蛇(Dendroaspis angusticeps)

<220>
<223> 合成肽

<400> 30
Pro Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro Asn Ala Pro Ser Thr Ser Ala
[0007] 1 5 10 15

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 31
Asn Ser Phe Arg Tyr Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
1 5 10

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 32
Lys Val Leu Arg Arg His Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
1 5 10

<210> 33

<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 33
Pro Ser Leu Arg Asp Pro Arg Pro Asn Ala Pro Ser Thr Ser Ala Asp
1 5 10 15
Arg Val Tyr Ile His Pro
20

<210> 34
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 34
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
1 5 10 15
Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

[0008]

<210> 35
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 35
Pro His Ile Tyr Val Arg Asp Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
1 5 10 15
Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 36
Cys Gly Leu Gly Ser Met Ser Gly Ile Arg Asp Leu Lys Leu Gly Phe
1 5 10 15
Cys

<210> 37
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 37
Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15
Cys Pro His Ile Tyr Val Arg Asp
20

<210> 38
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 38
Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15
[0009] Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 39
Cys Gly Leu Gly Ser Gln Ala Gly Ile Arg Asp Met Arg Gly Gly Phe
1 5 10 15
Cys

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 40

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

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 41
Cys Gly Leu Asn Ser Val His Asn Ile Arg Asp Ile Lys His Gly Phe
1 5 10 15
Cys

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0010]

<400> 42
Cys Gly Leu Gly Ser Gln Ala Gly Ile Arg Asp Met Arg Gly Gly Phe
1 5 10 15
Cys

<210> 43
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 43
Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly
1 5 10 15
Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25 30

<210> 44
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 44
Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
1 5 10 15
Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His
20 25 30
Pro

<210> 45
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 45
Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15
Met Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25

[0011]

<210> 46
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 46
Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly His Lys Ile Asp Arg Ile Asn
1 5 10 15
His Val Ser Asn Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25 30

<210> 47
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 47
Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met
1 5 10 15
Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile
20 25 30
His Pro

<210> 48
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 48
Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp
1 5 10 15
Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His
20 25 30
Pro

<210> 49
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 49
[0012] Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15
Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 50
Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly
1 5 10 15
Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25 30

<210> 51
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 51
Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met
1 5 10 15
Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile
20 25 30
His Pro

<210> 52
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 52
Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser
1 5 10 15
Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25 30

<210> 53
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

[0013]

<220>
<223> 合成肽

<400> 53
Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
1 5 10 15
Ser Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 54
Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser
1 5 10 15
Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25 30

<210> 55
<211> 34
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 55
Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Arg Lys Met
1 5 10 15
Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile
20 25 30
His Pro

<210> 56
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 56
Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
1 5 10 15
Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
20 25 30

[0014]

<210> 57
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 57
Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp
1 5 10 15
Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile His
20 25 30
Pro

<210> 58
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 58
Glu Val Lys Tyr Asp Pro Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

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

<210> 59
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 59
Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu
1 5 10 15
Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Asp Arg Val Tyr Ile
20 25 30
Pro

<210> 60
<211> 29
<212> PRT
[0015] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 60
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile
1 5 10 15
Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20 25

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 61
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile
1 5 10 15
Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Tyr Leu Arg Arg His
20 25 30

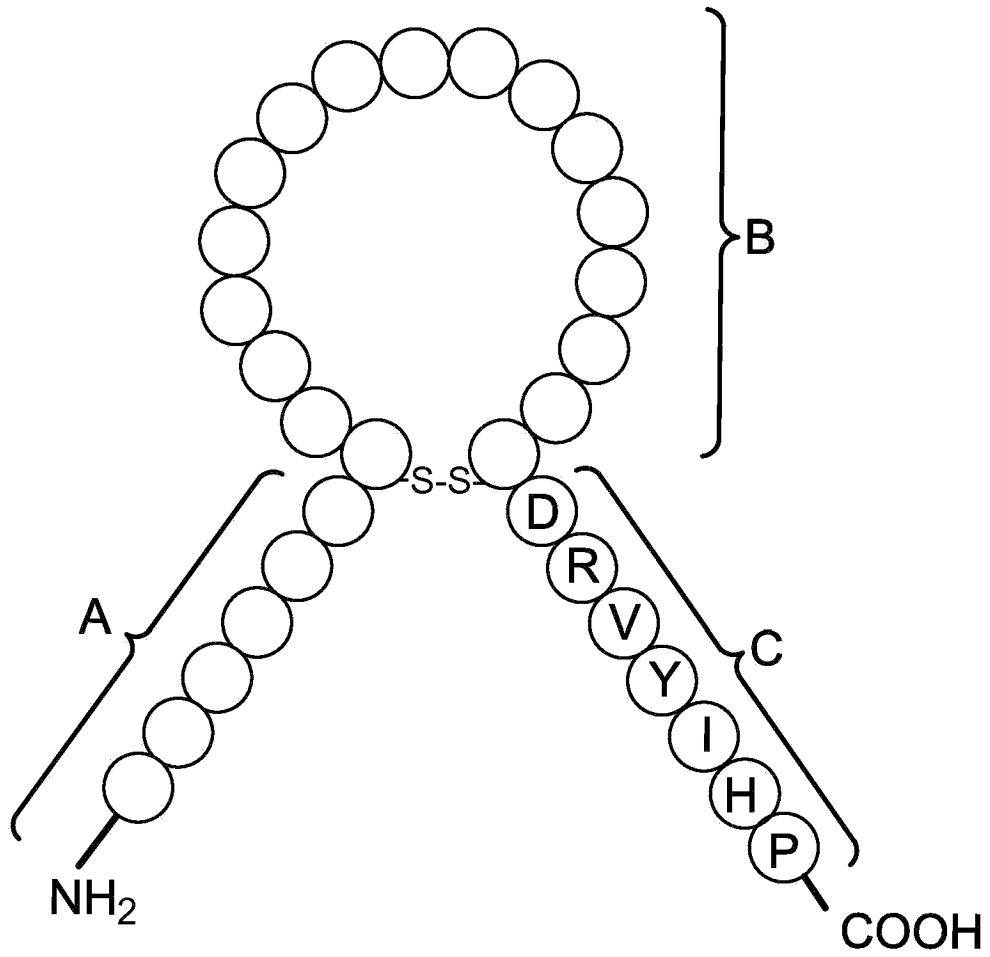


图1

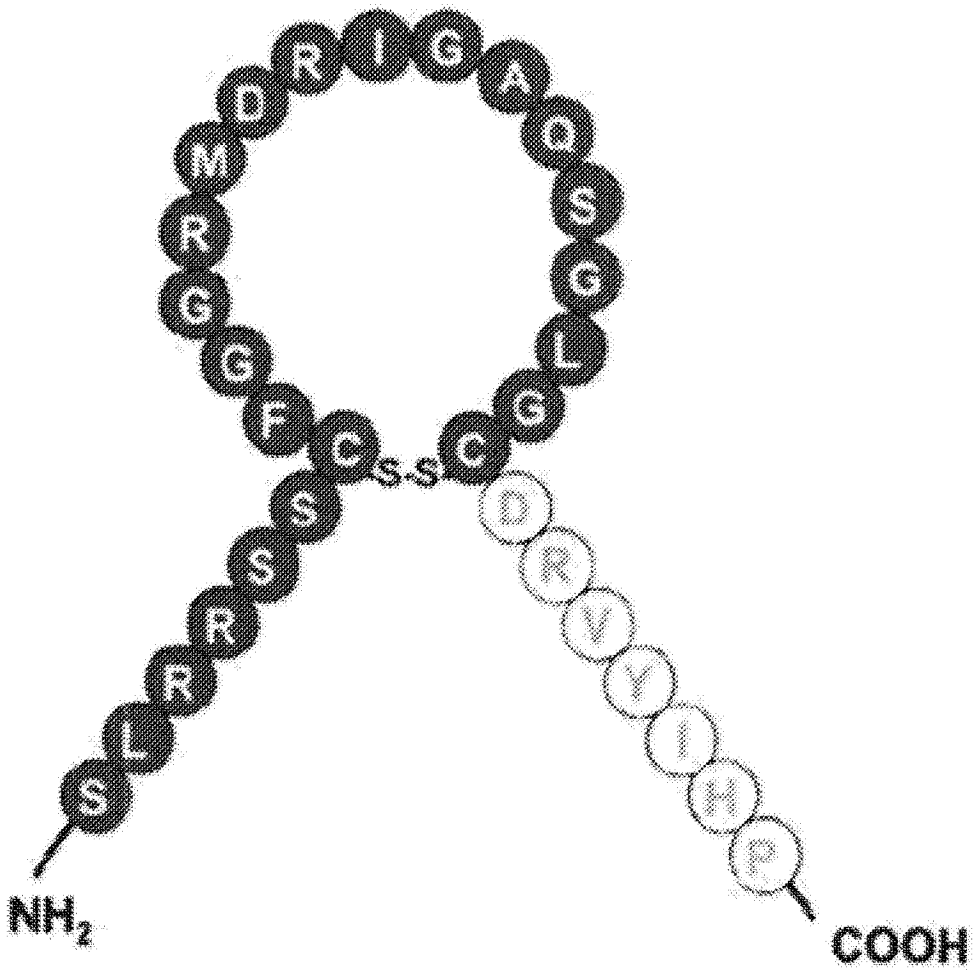


图2

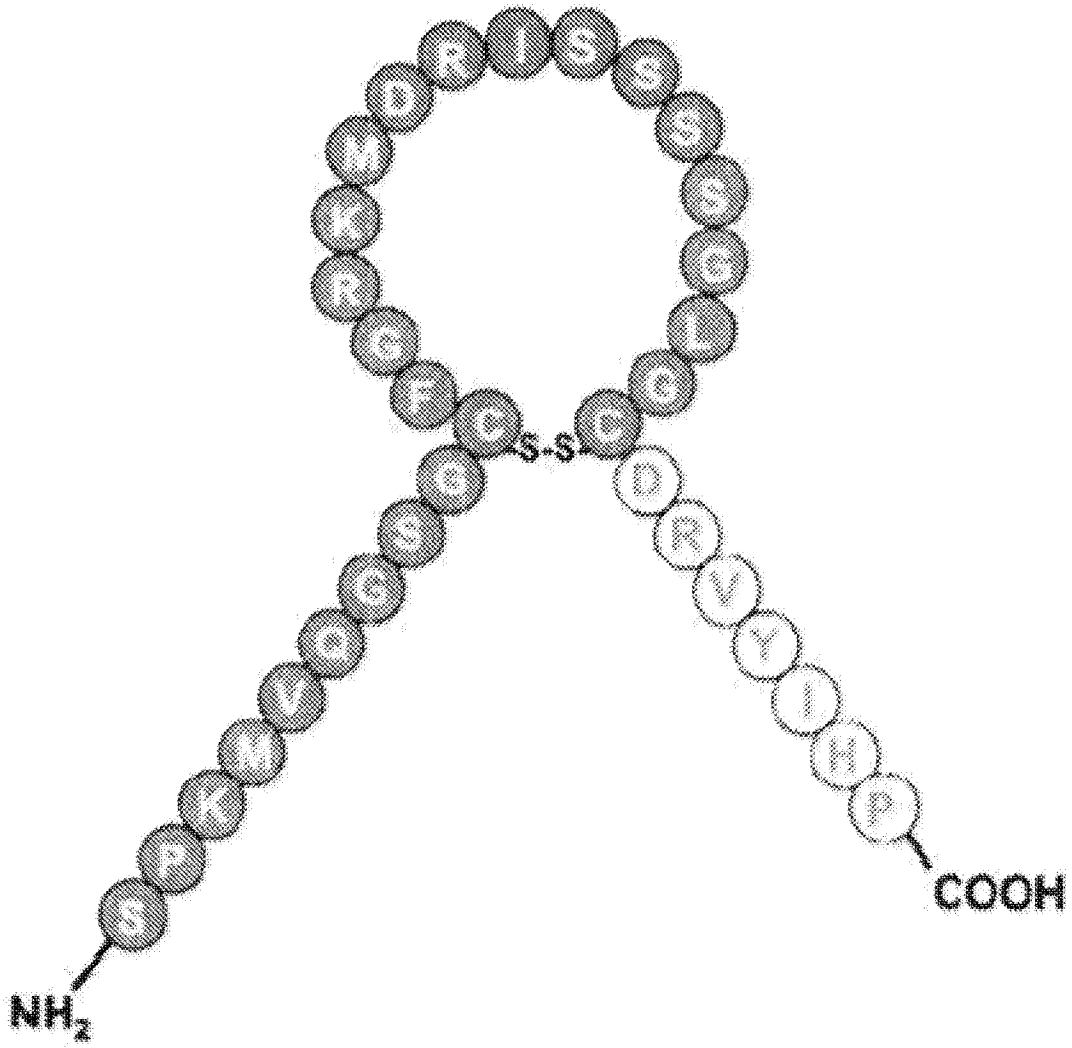


图3

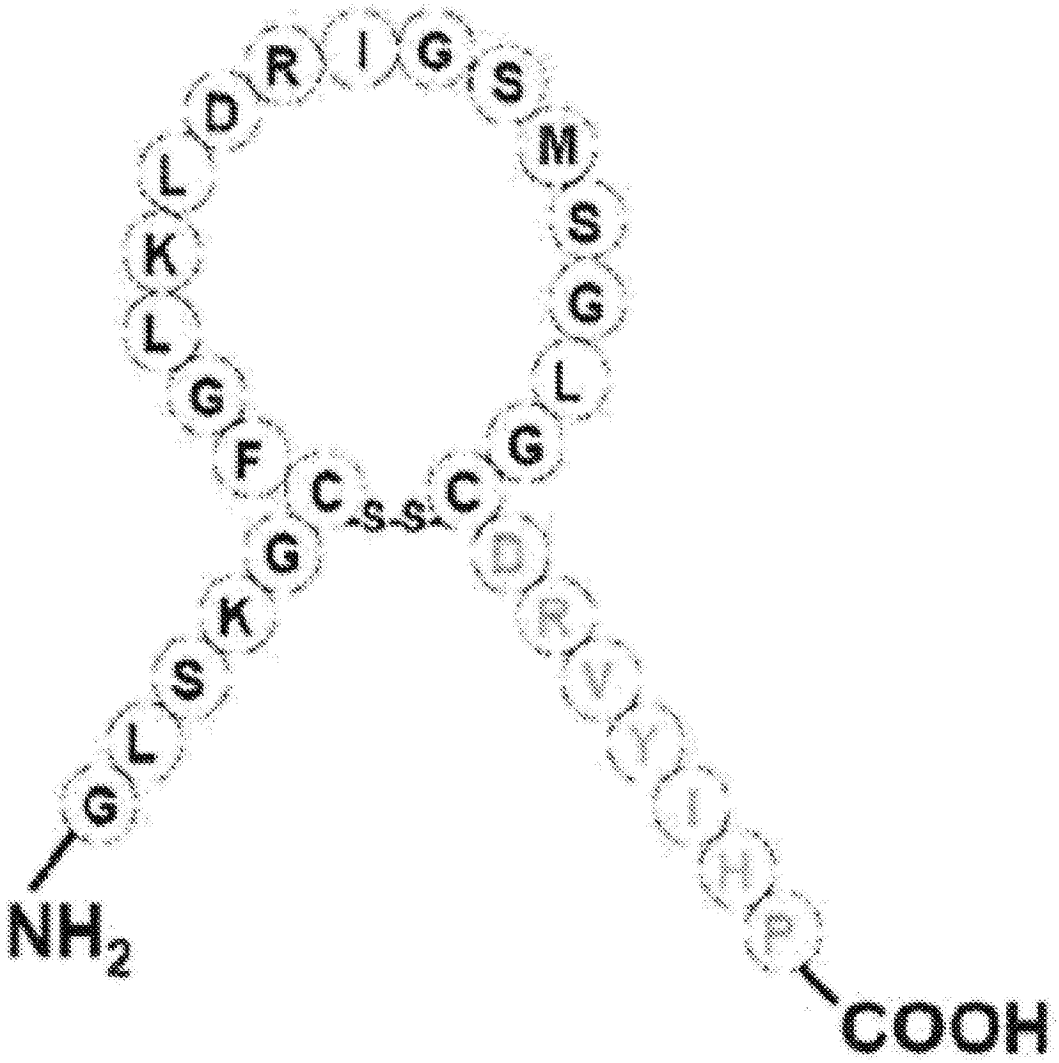


图4

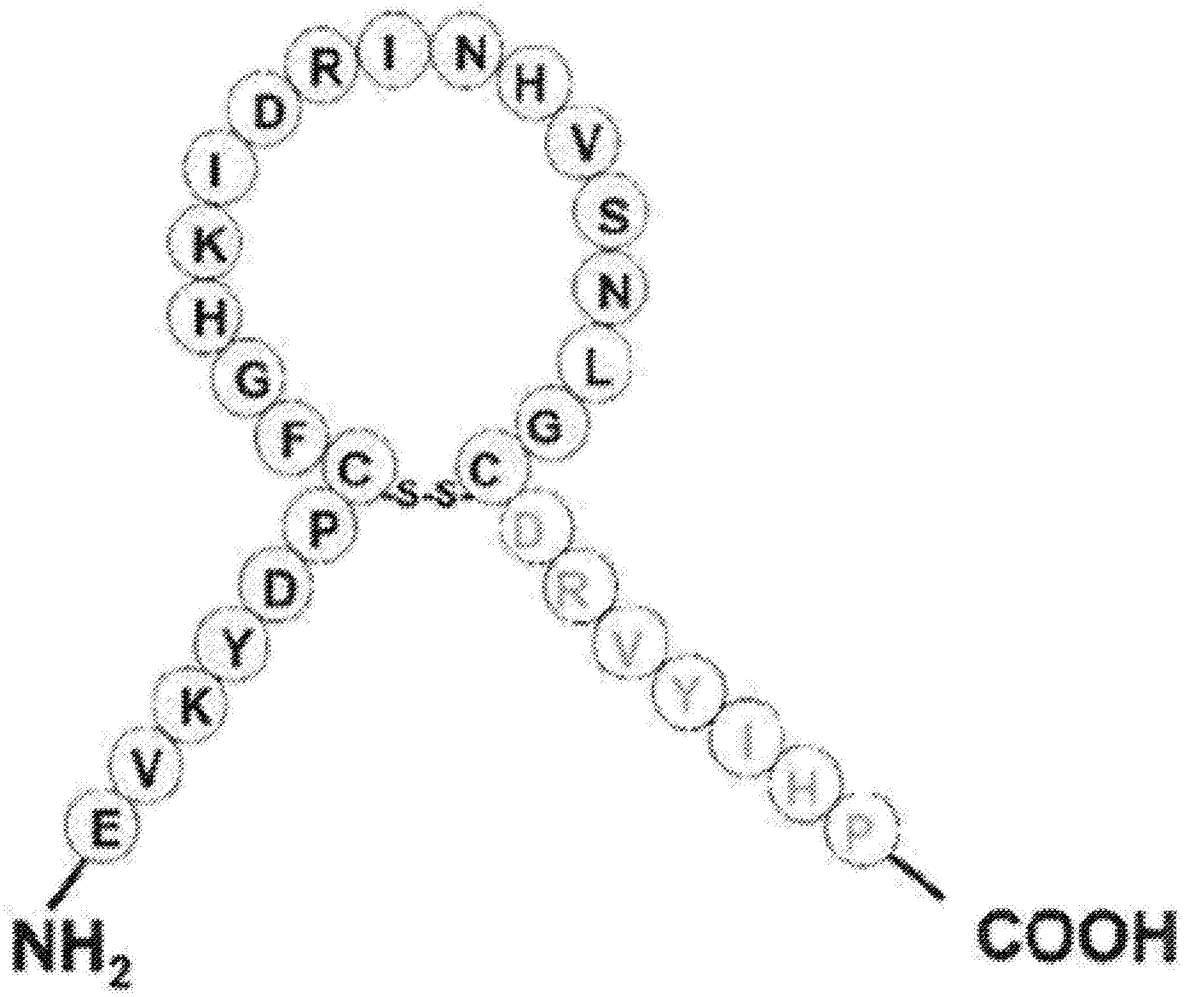


图5

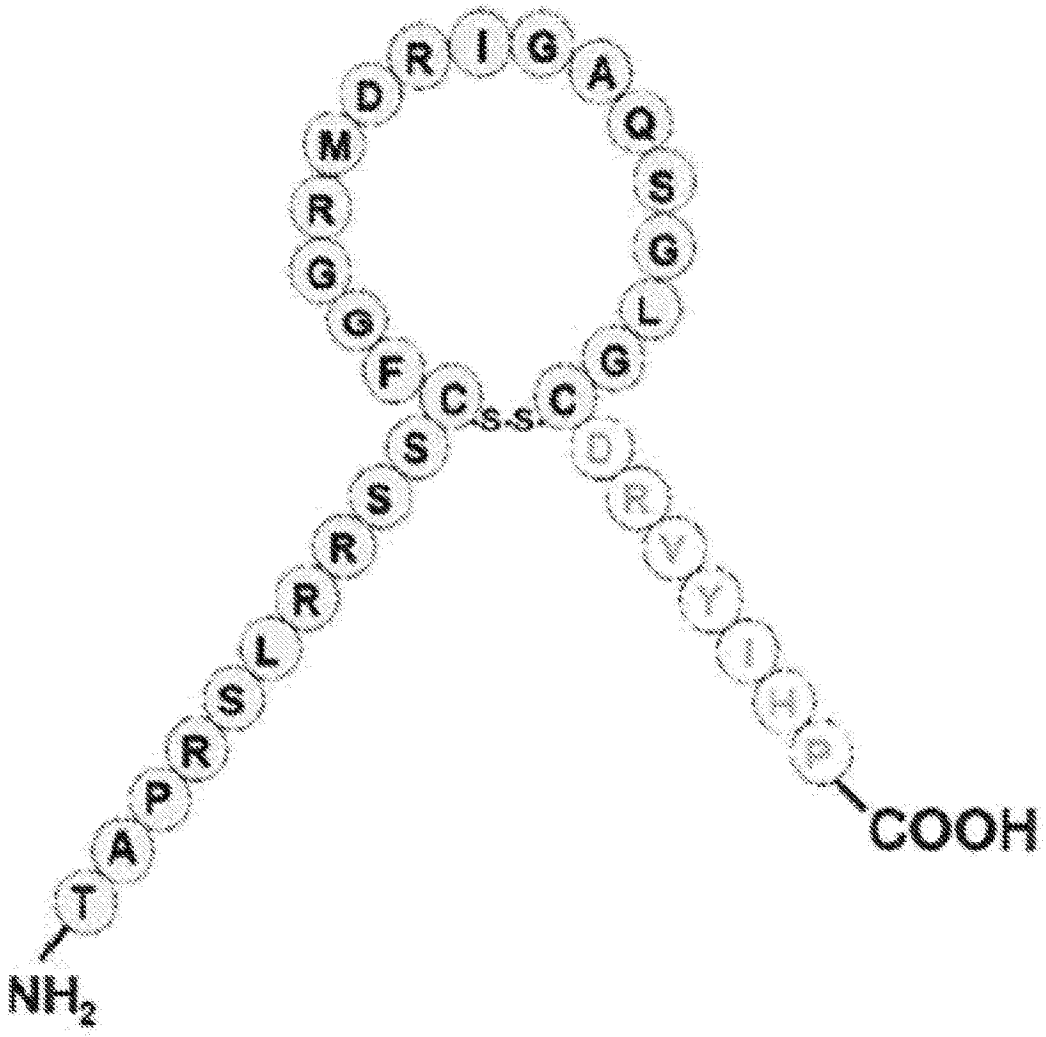


图6

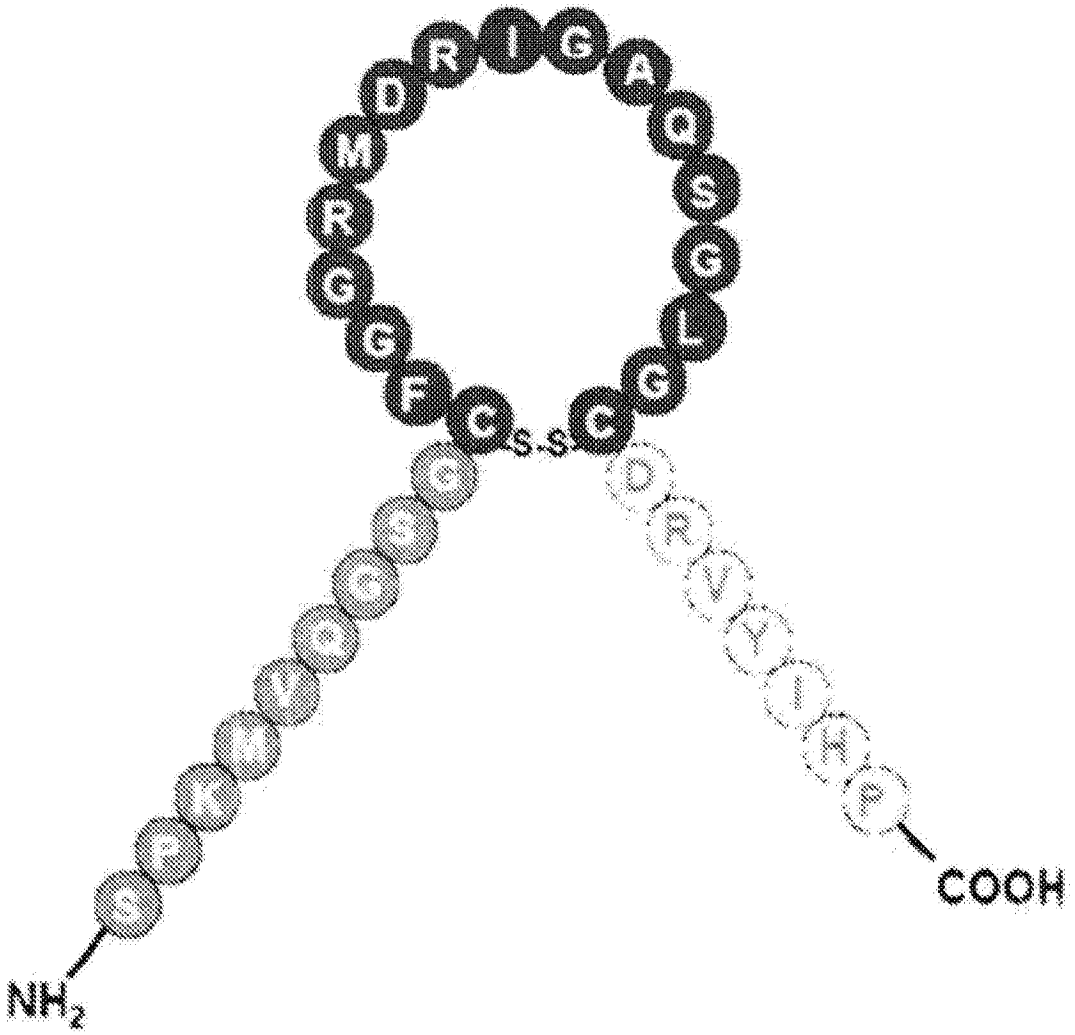


图7

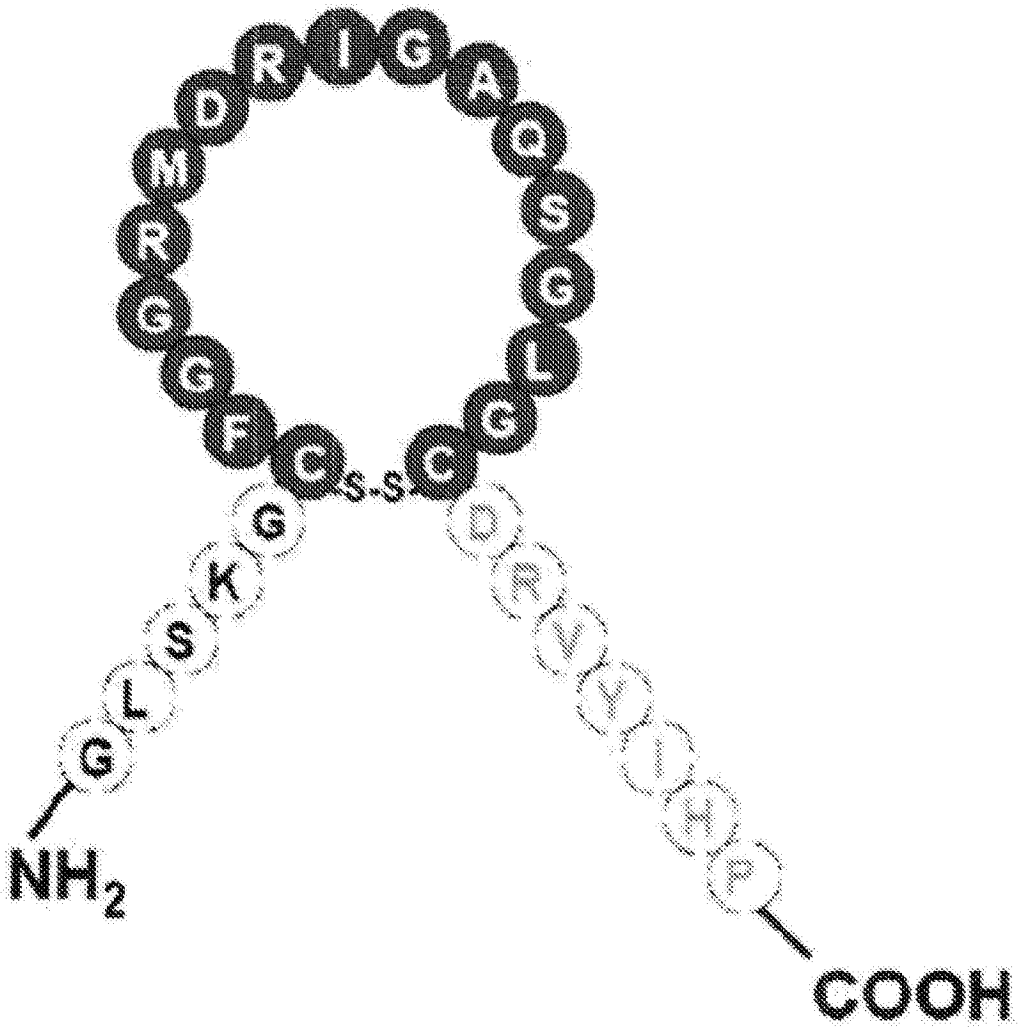


图8

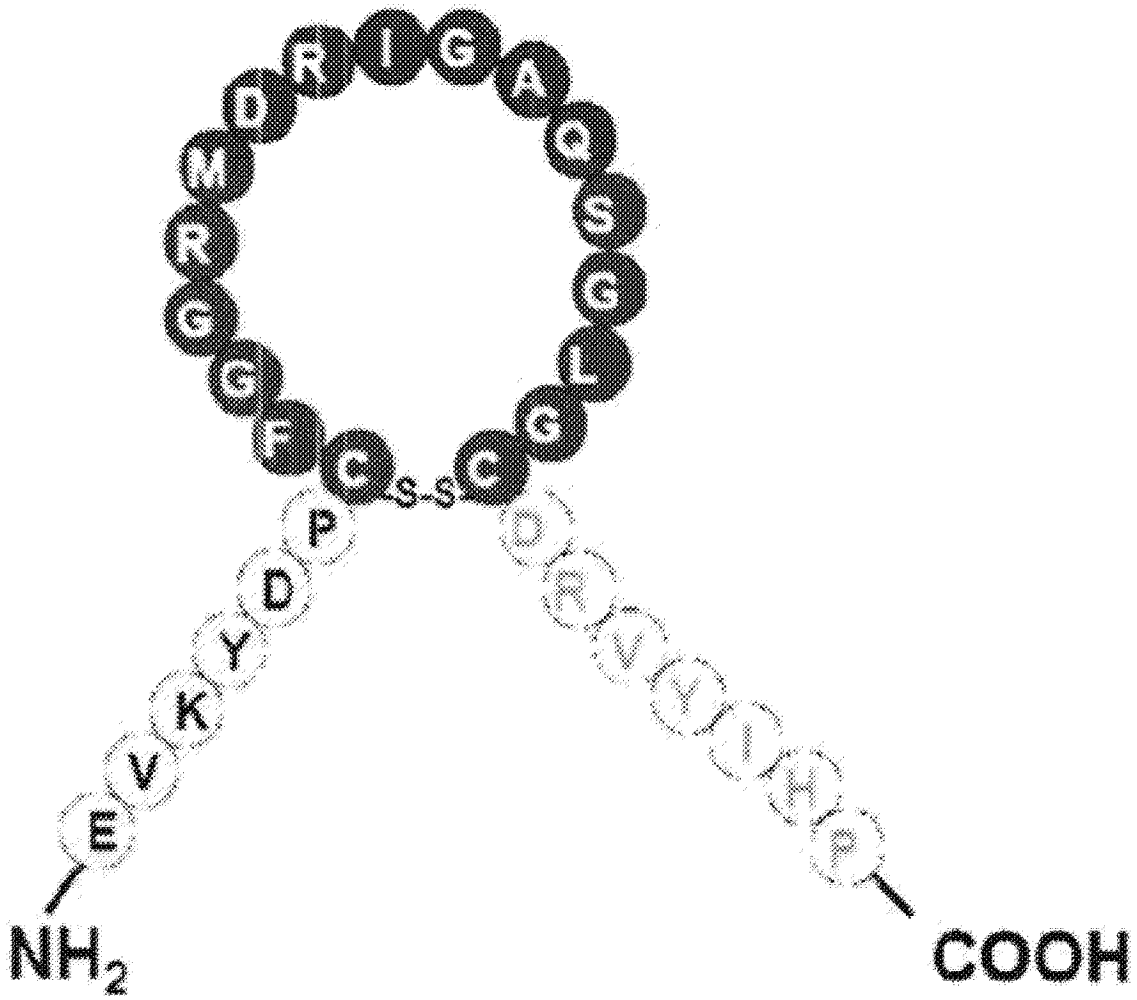


图9

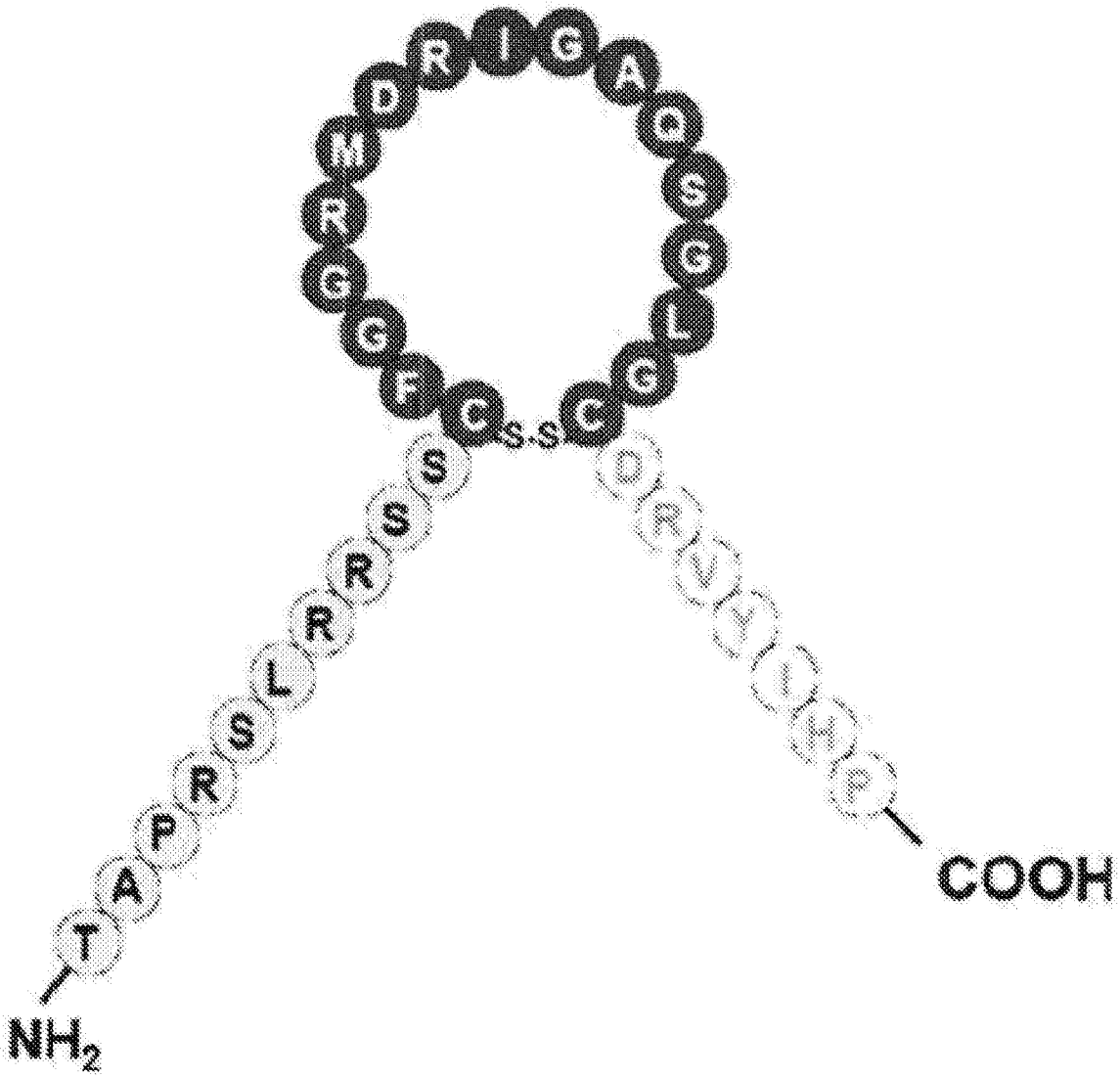


图10

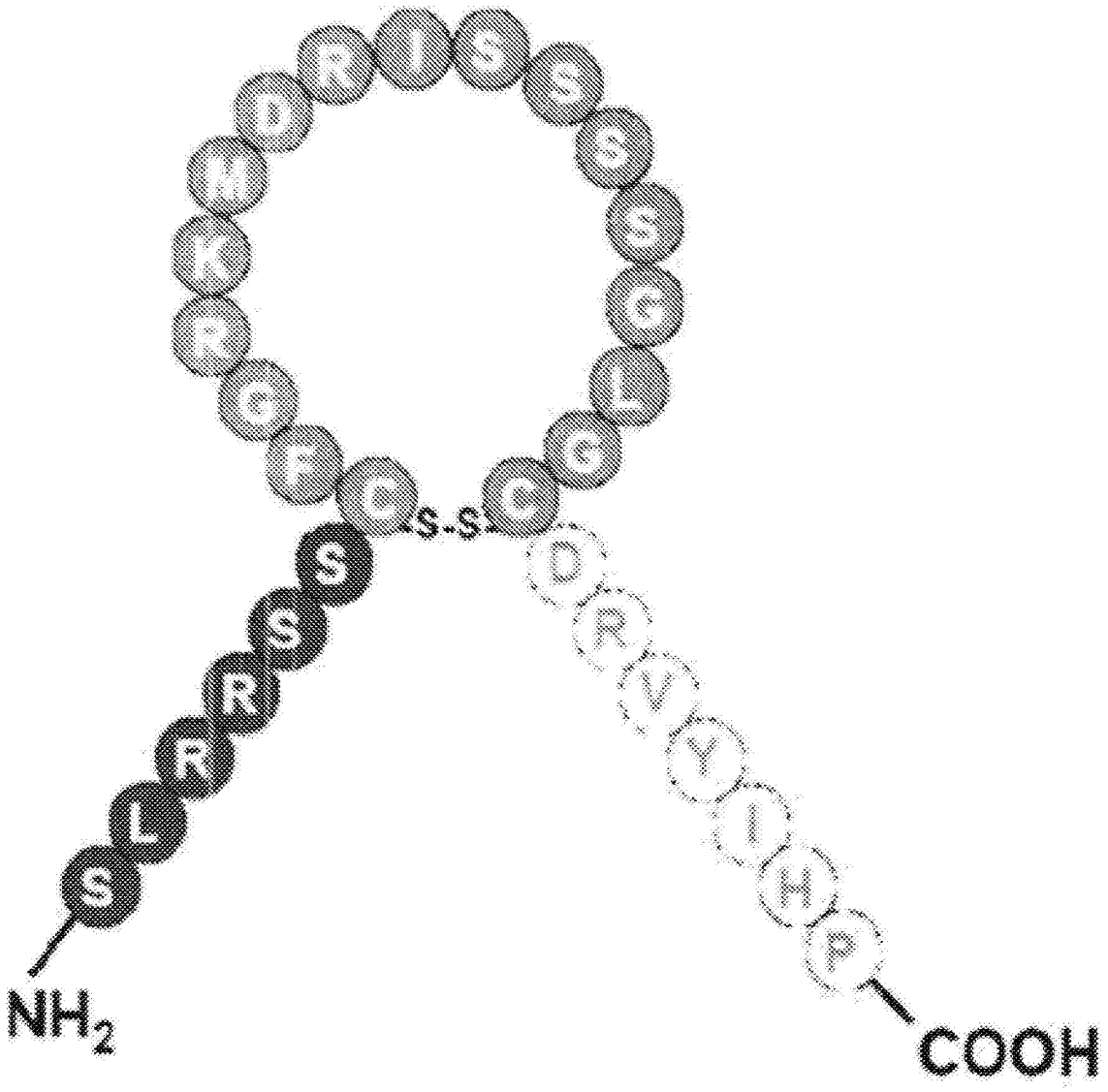


图11

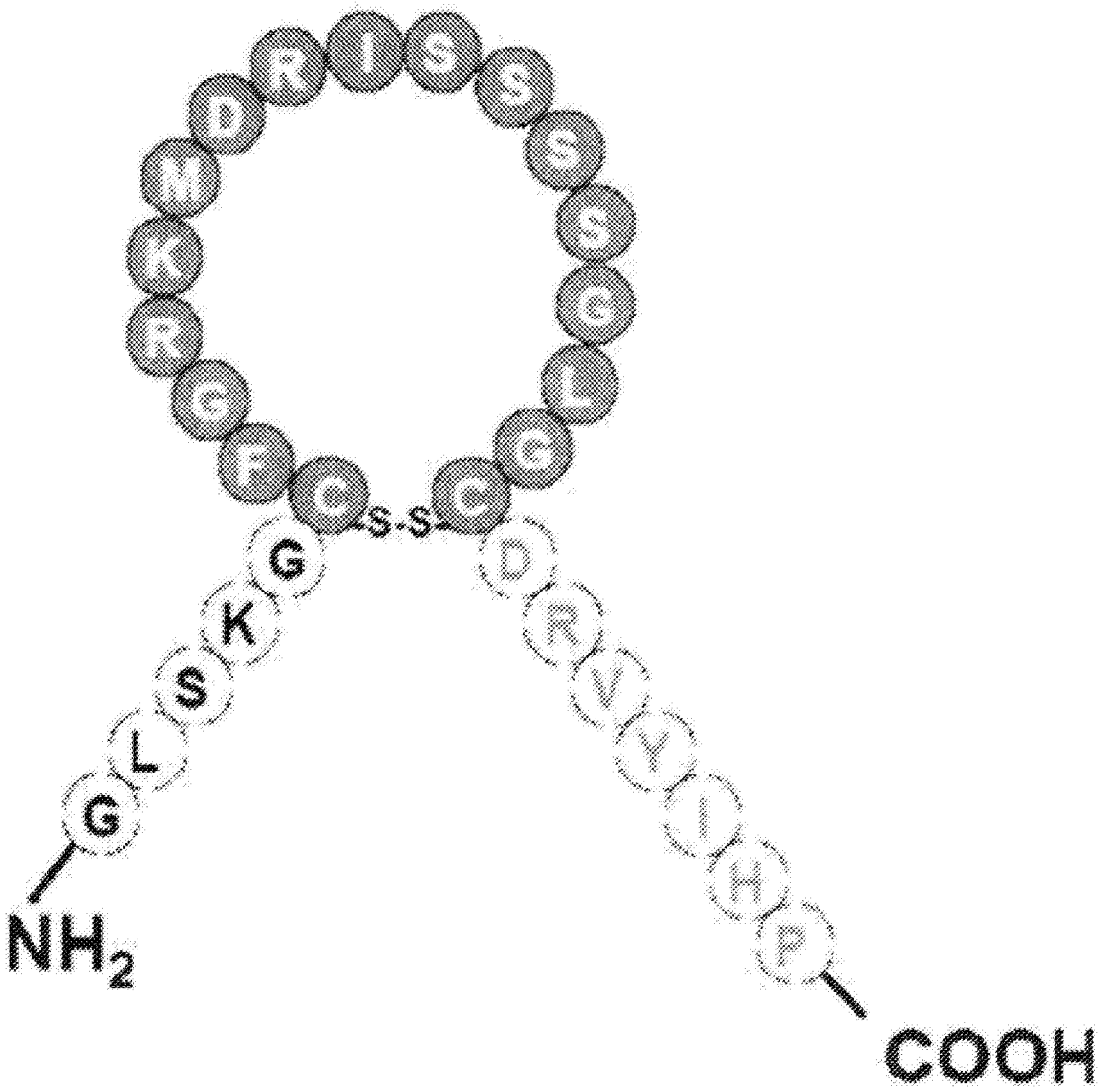


图12

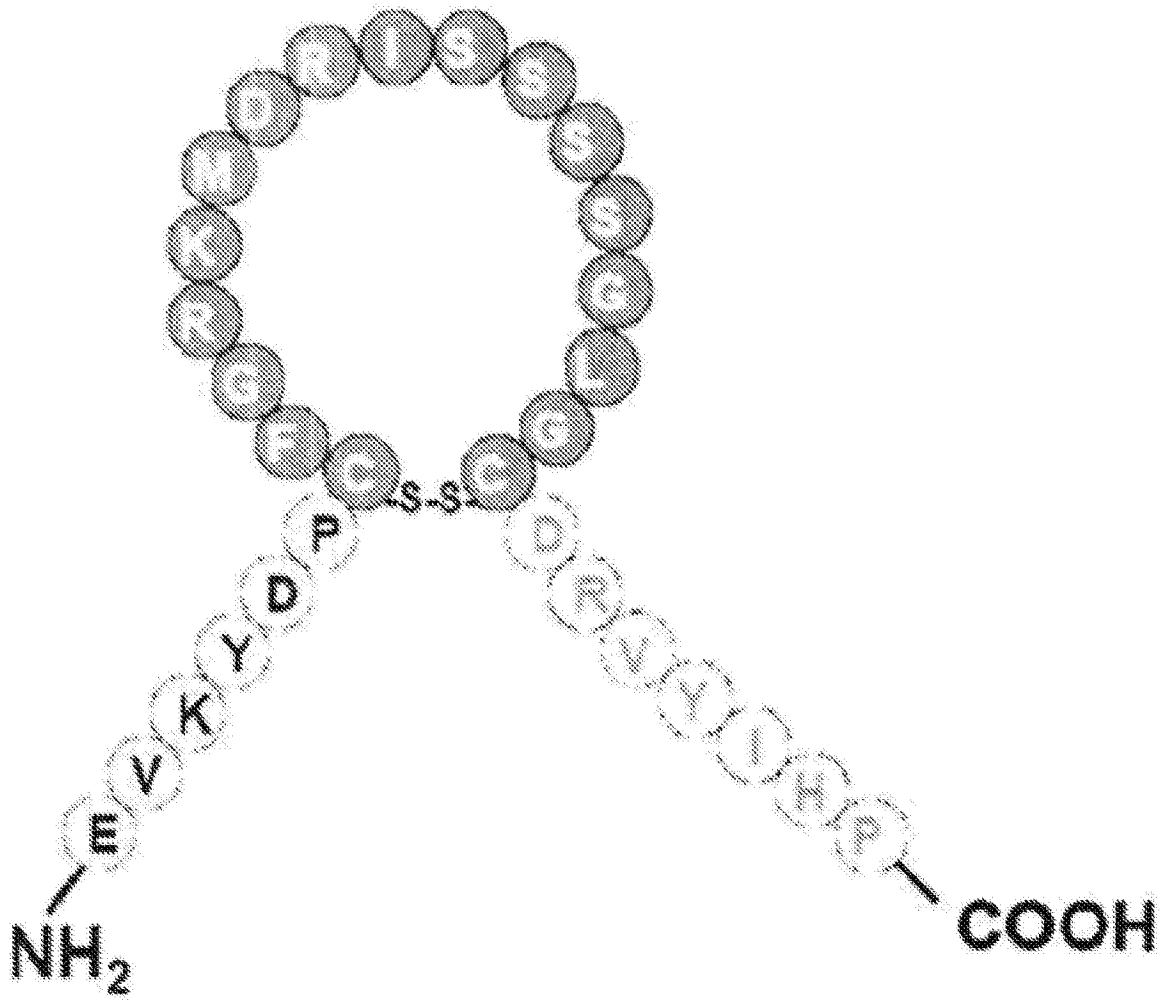


图13

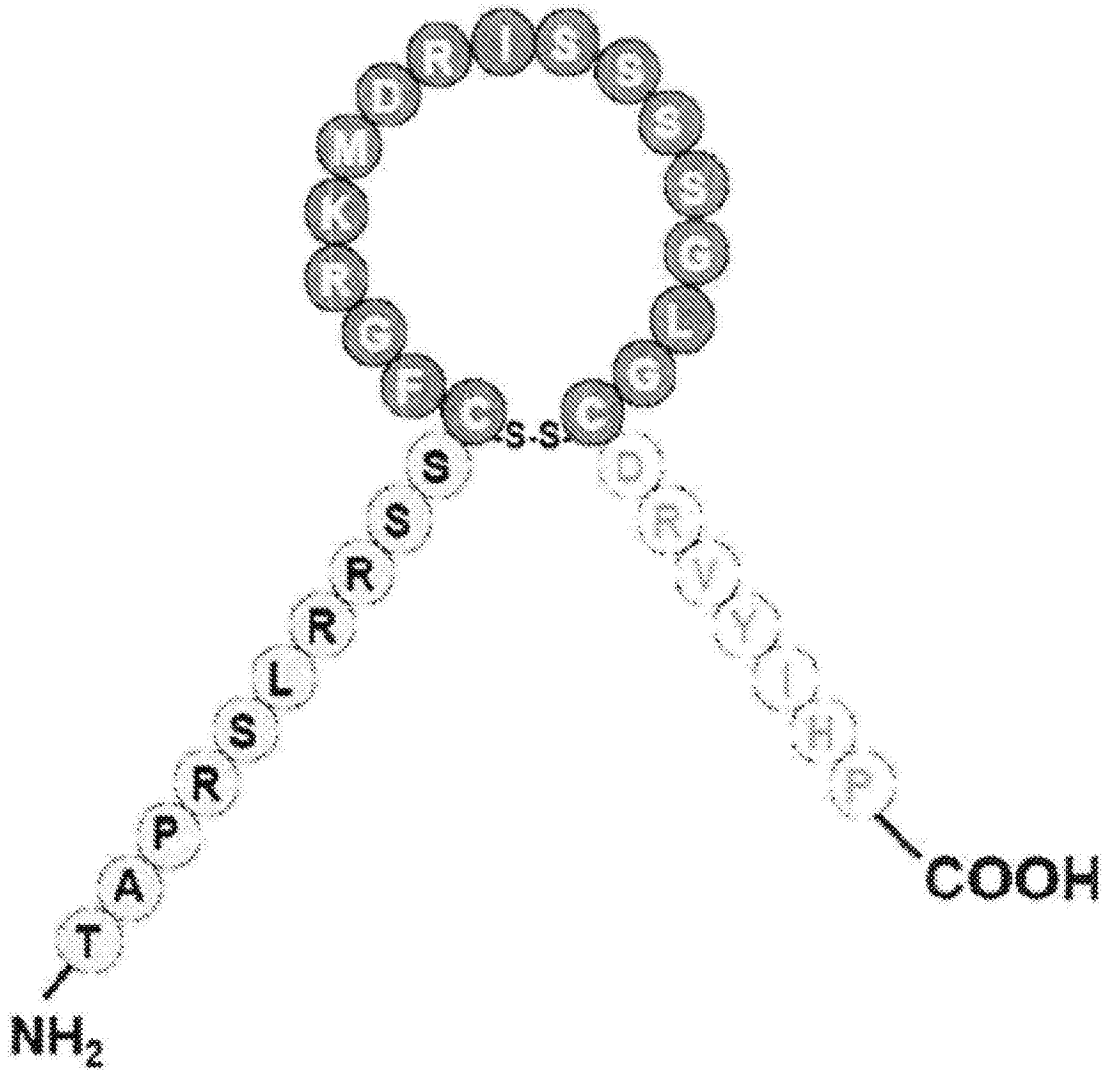


图14

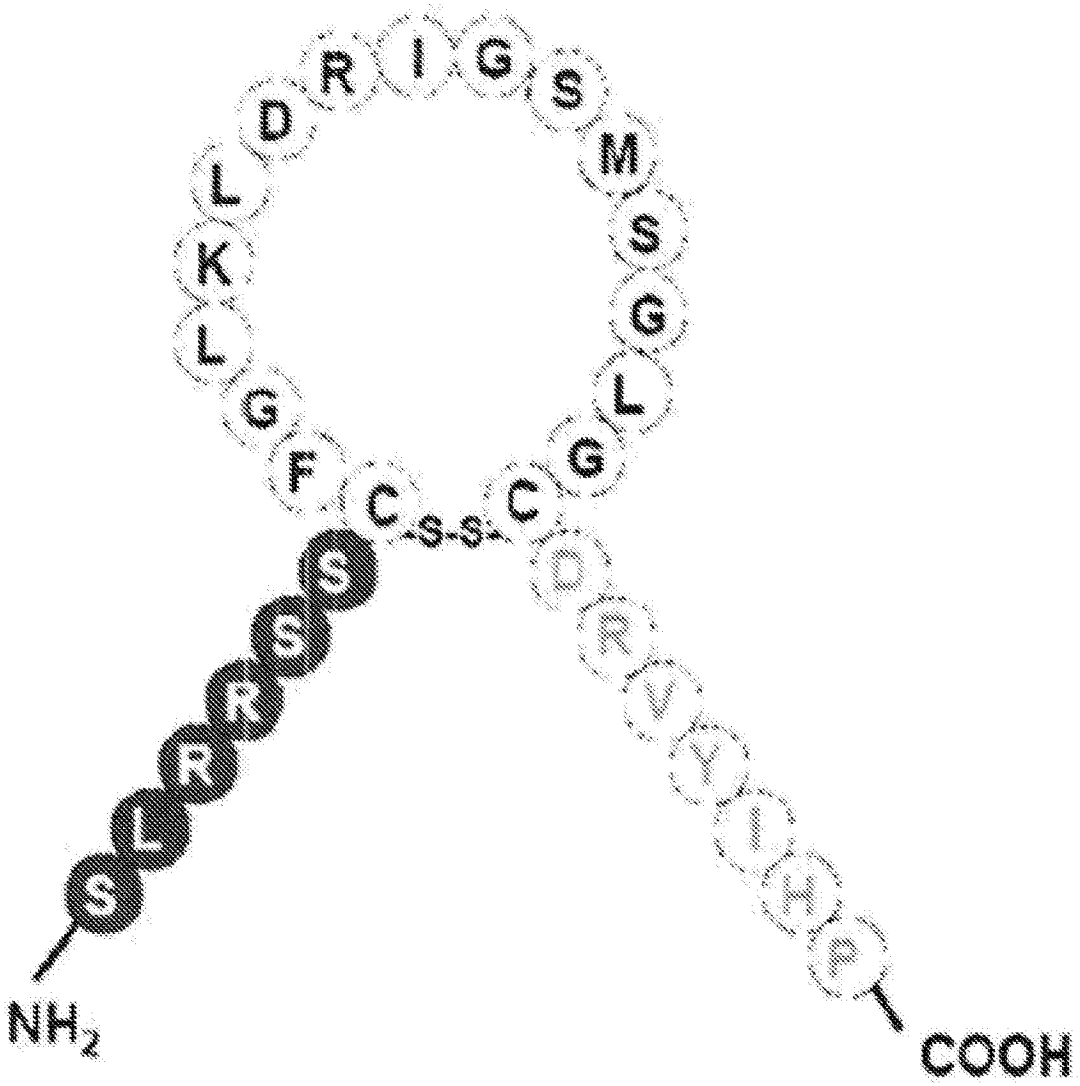


图15

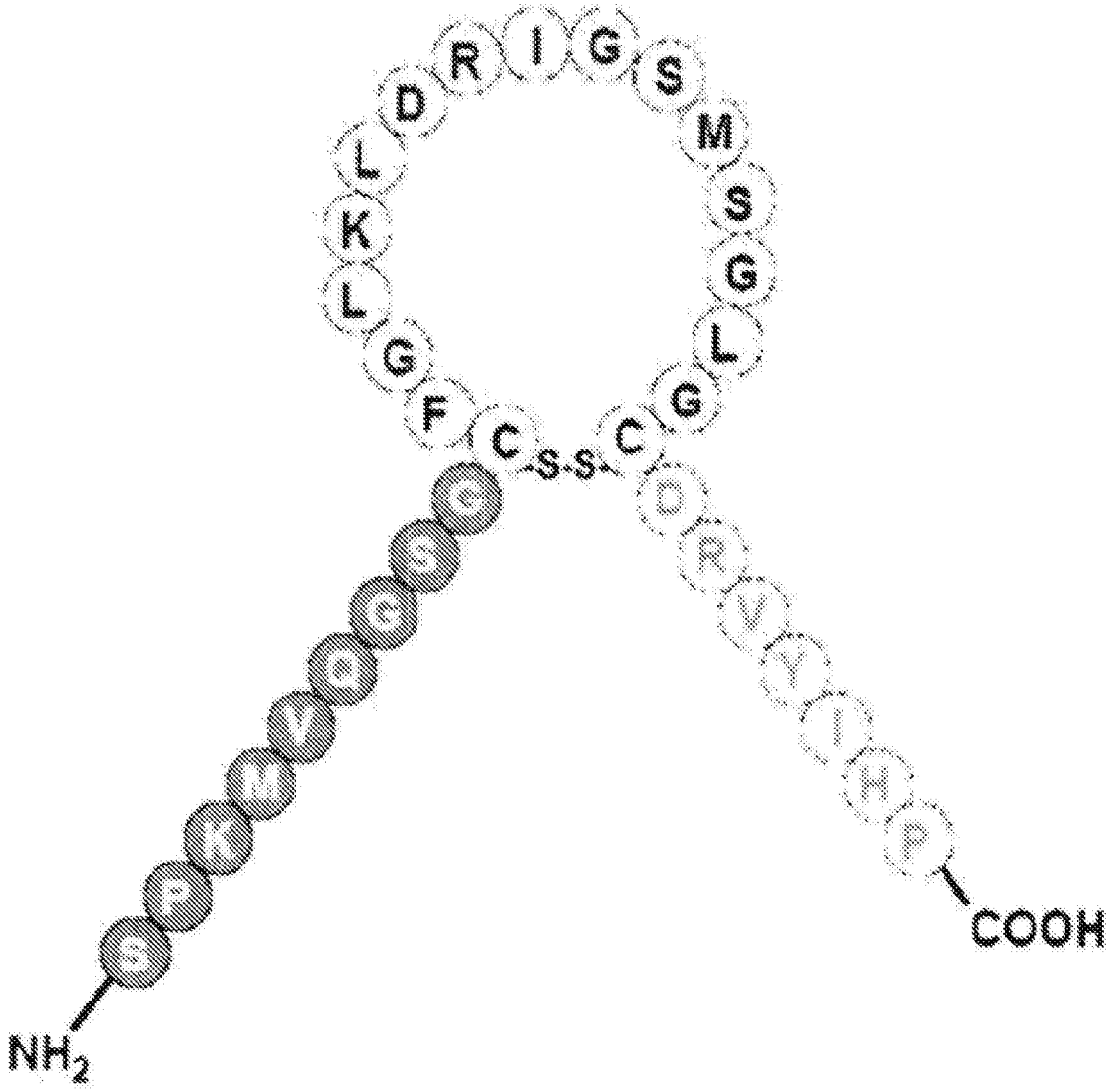


图16

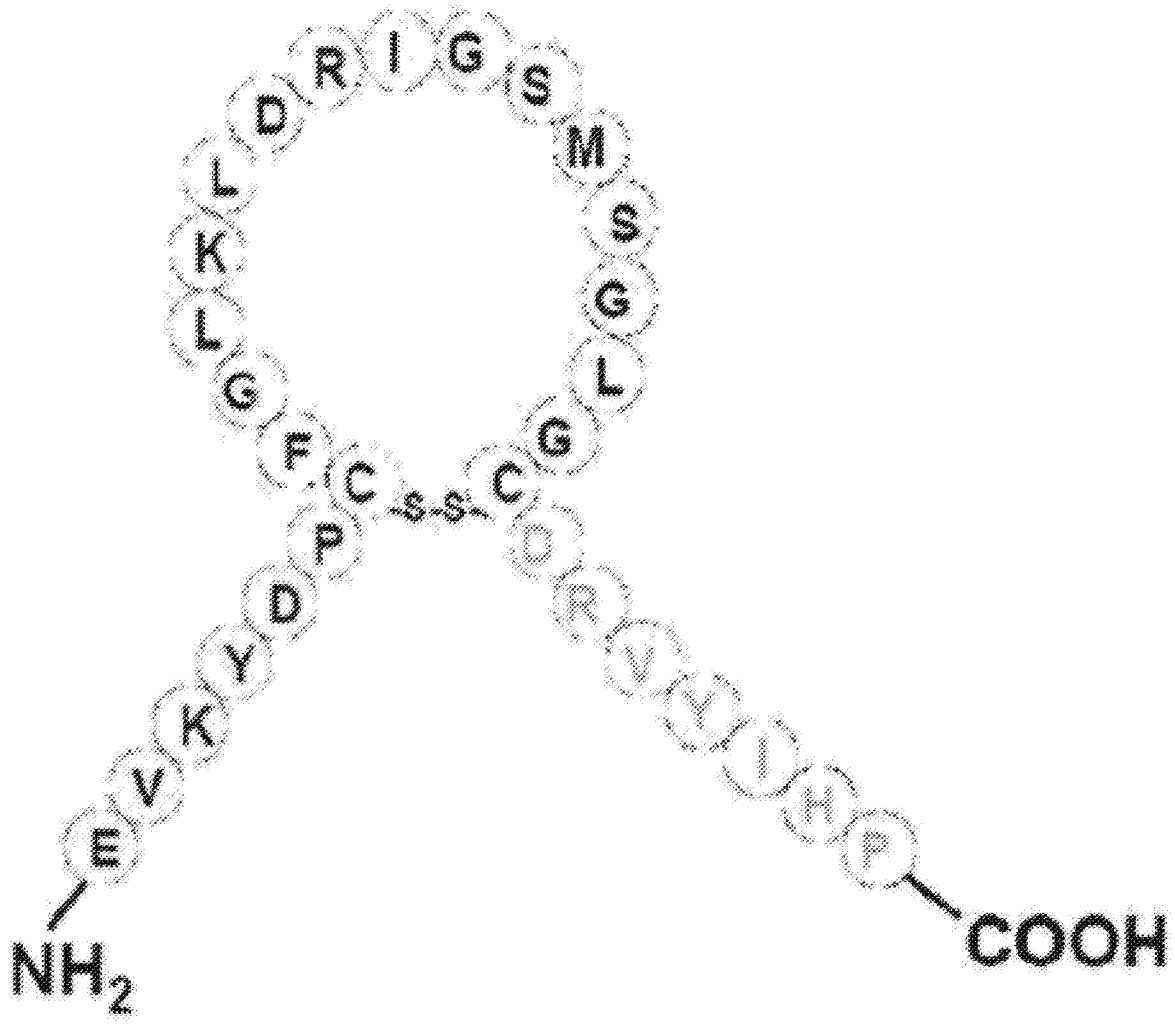


图17

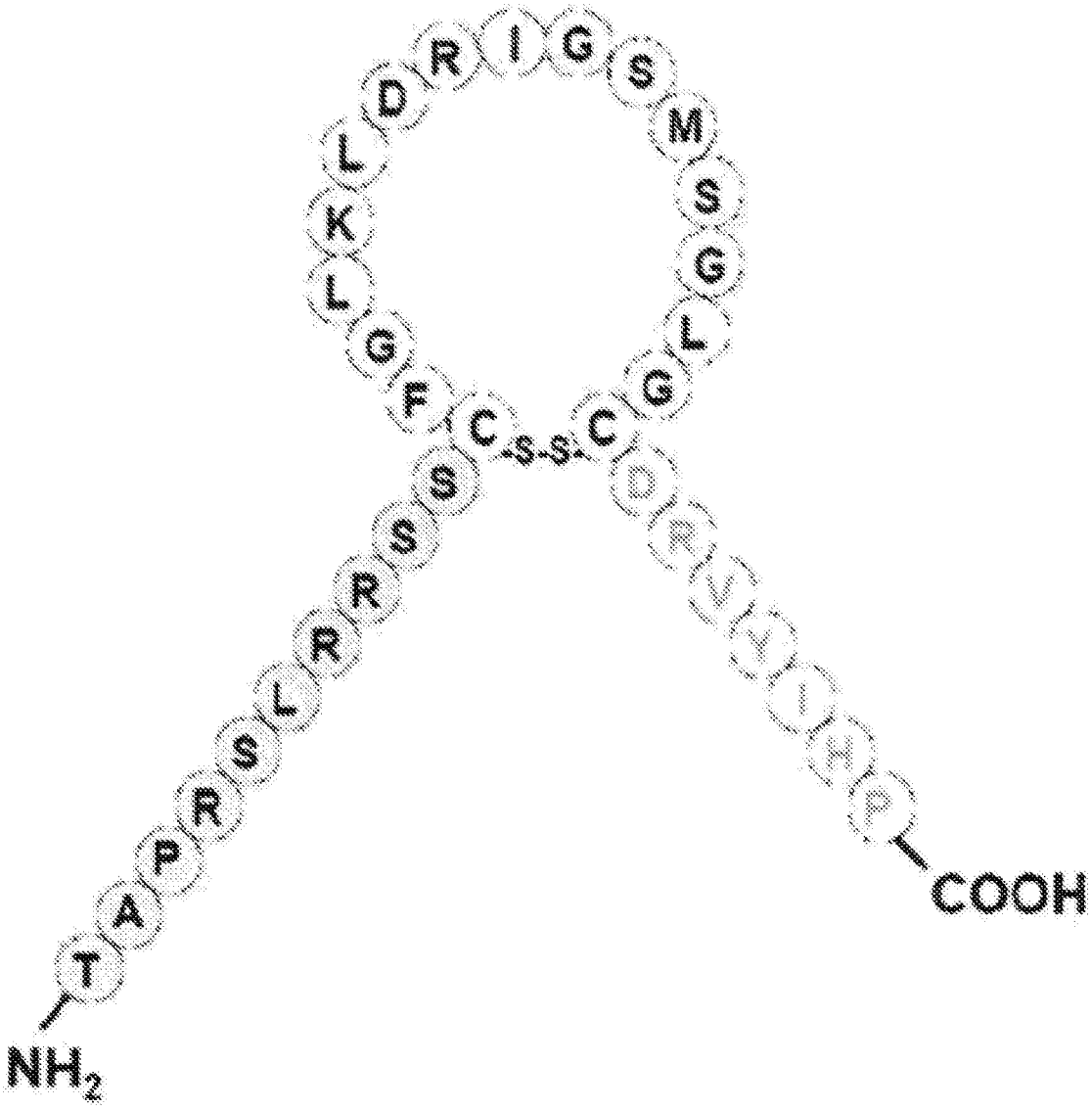


图18

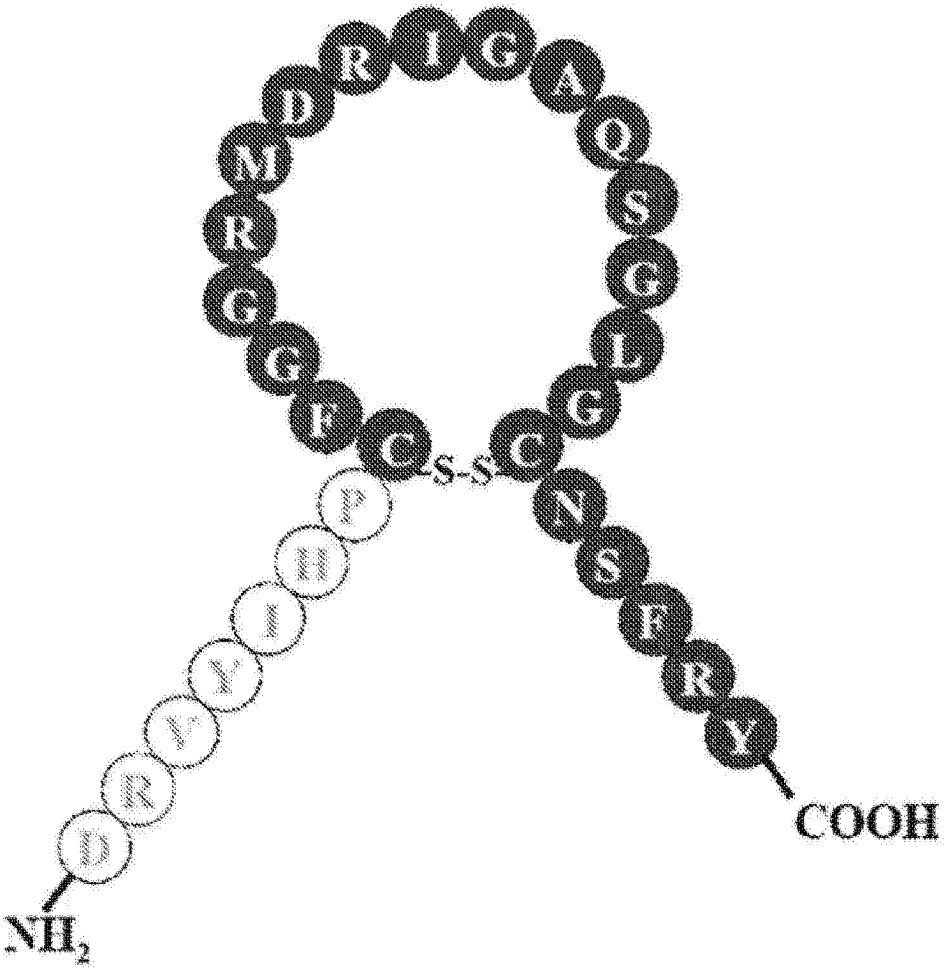


图19

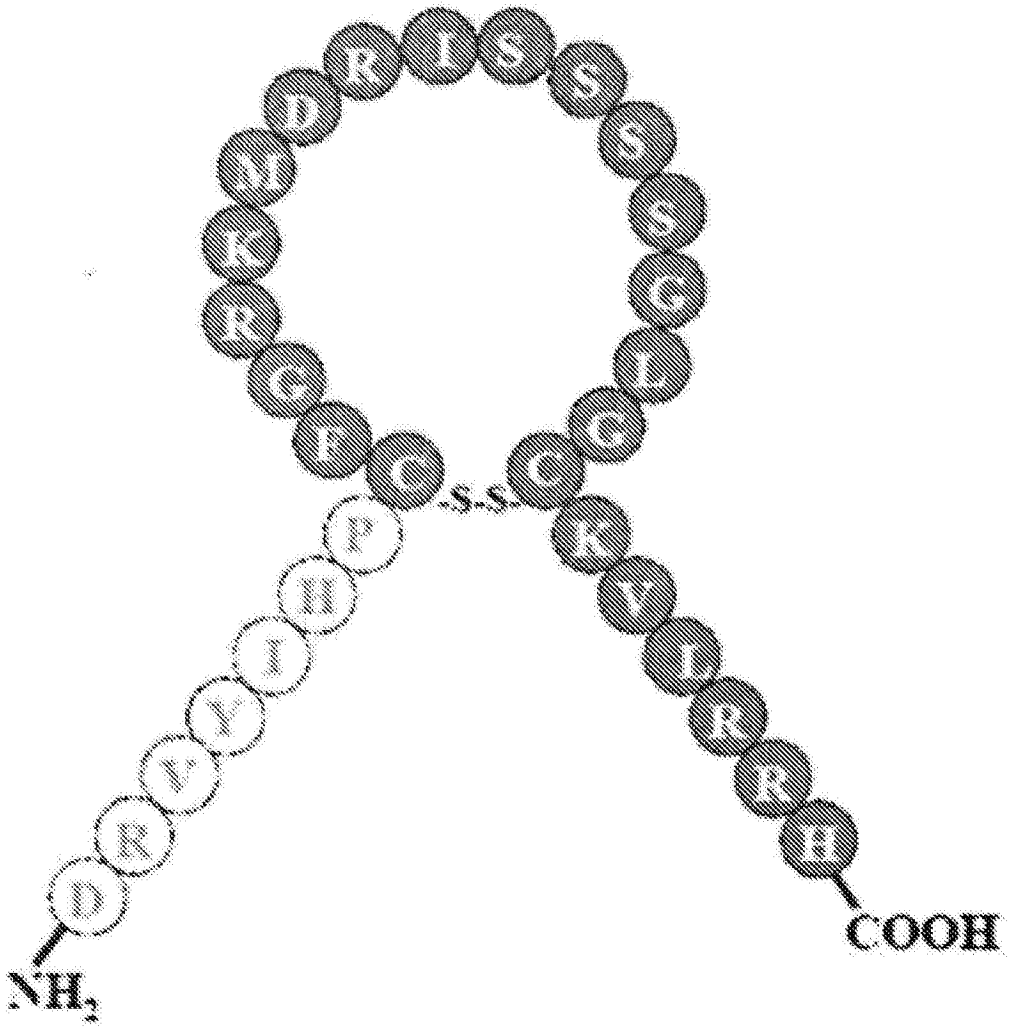


图20

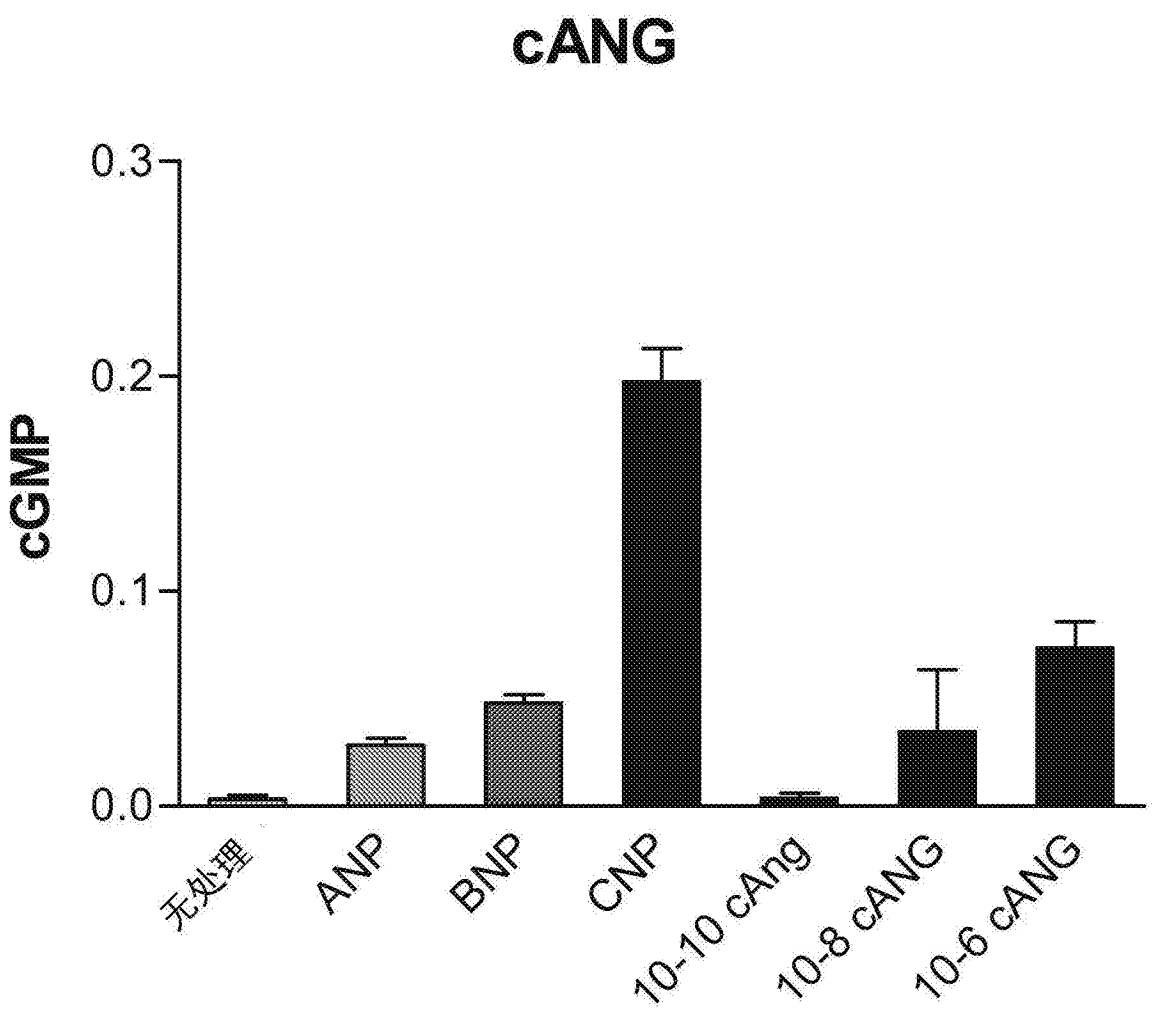

cANG
cGMP
0.3
0.2
0.1
0.0
无处理
ANP
BNP
CNP
10-10 cAng
10-8 cANG
10-6 cANG

图21

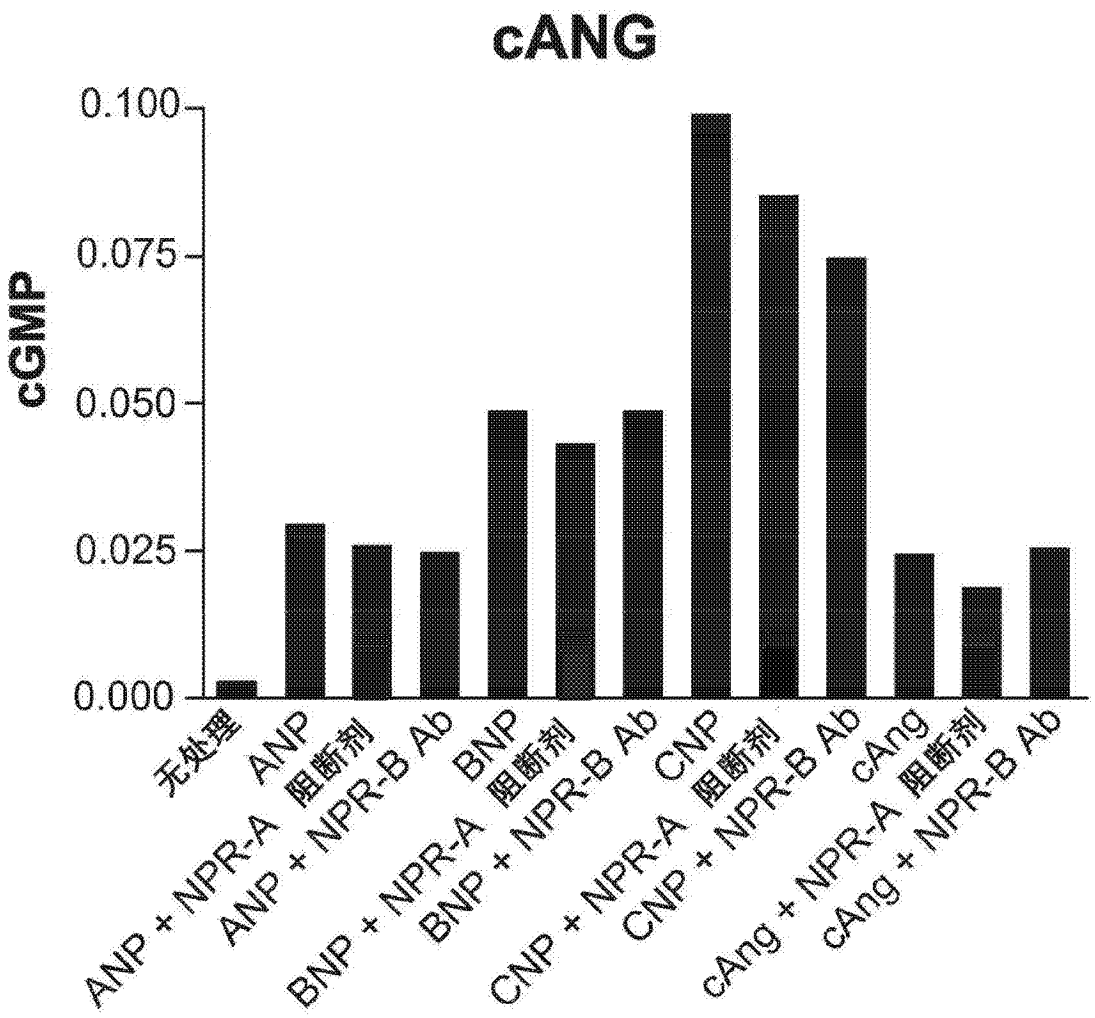


图22



图23



图 24



图 25



图26



图27



图28

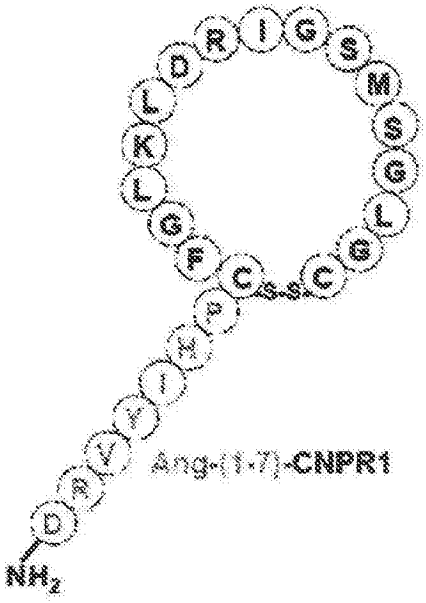


图29

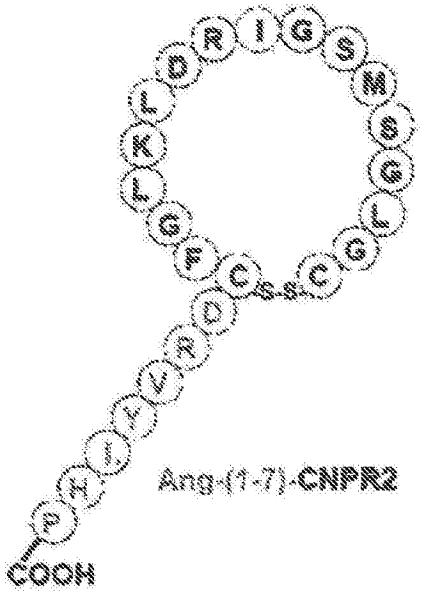


图30

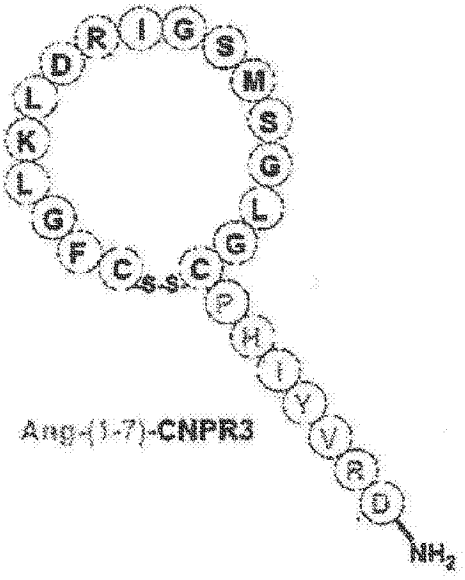

R I G S M S G L G C P H I Y V R D NH2
D L K L G F C S-S
Ang-(1-7)-CNPR3

图31

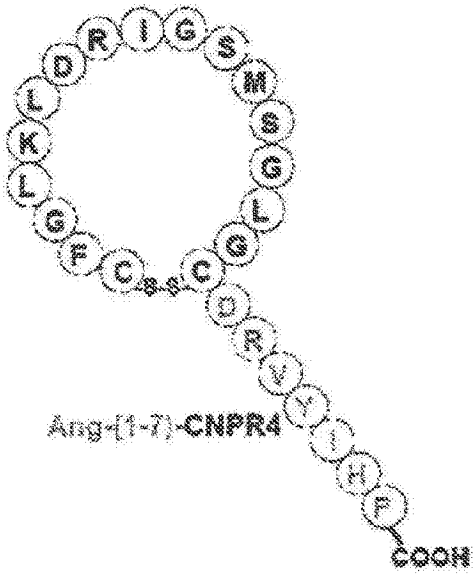

R I G S M S G L G C D R V Y I H F COOH
D L K L G F C S-S
Ang-(1-7)-CNPR4

图32

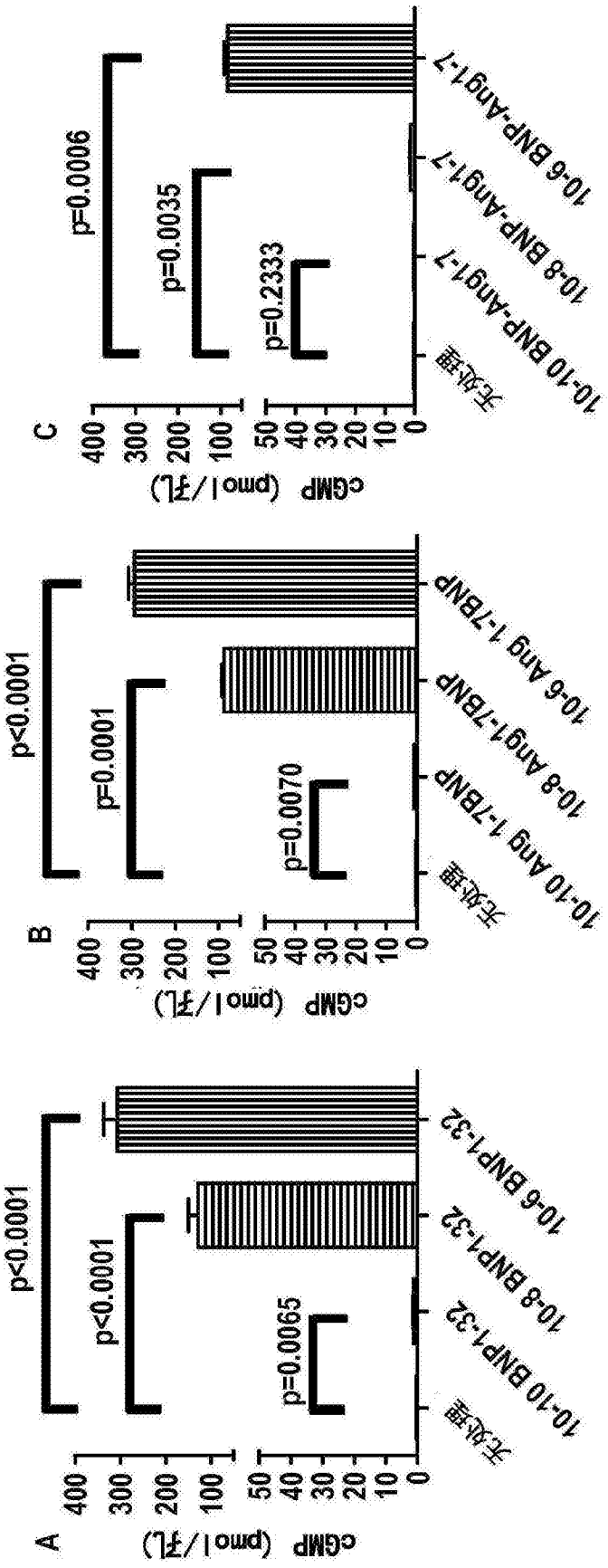

A
cGMP (pmol/孔)
400
300
200
100
50
40
30
20
10
0
p<0.0001
p<0.0001
p=0.0065
无处理
10-10 BNP1-32
10-8 BNP1-32
10-6 BNP1-32
B
cGMP (pmol/孔)
p<0.0001
p=0.0001
p=0.0070
无处理
10-10 Ang 1-7BNP
10-8 Ang1-7BNP
10-6 Ang 1-7BNP
C
cGMP (pmol/孔)
p=0.0006
p=0.0035
p=0.2333
无处理
10-10 BNP-Ang1-7
10-8 BNP-Ang1-7
10-6 BNP-Ang1-7

图33

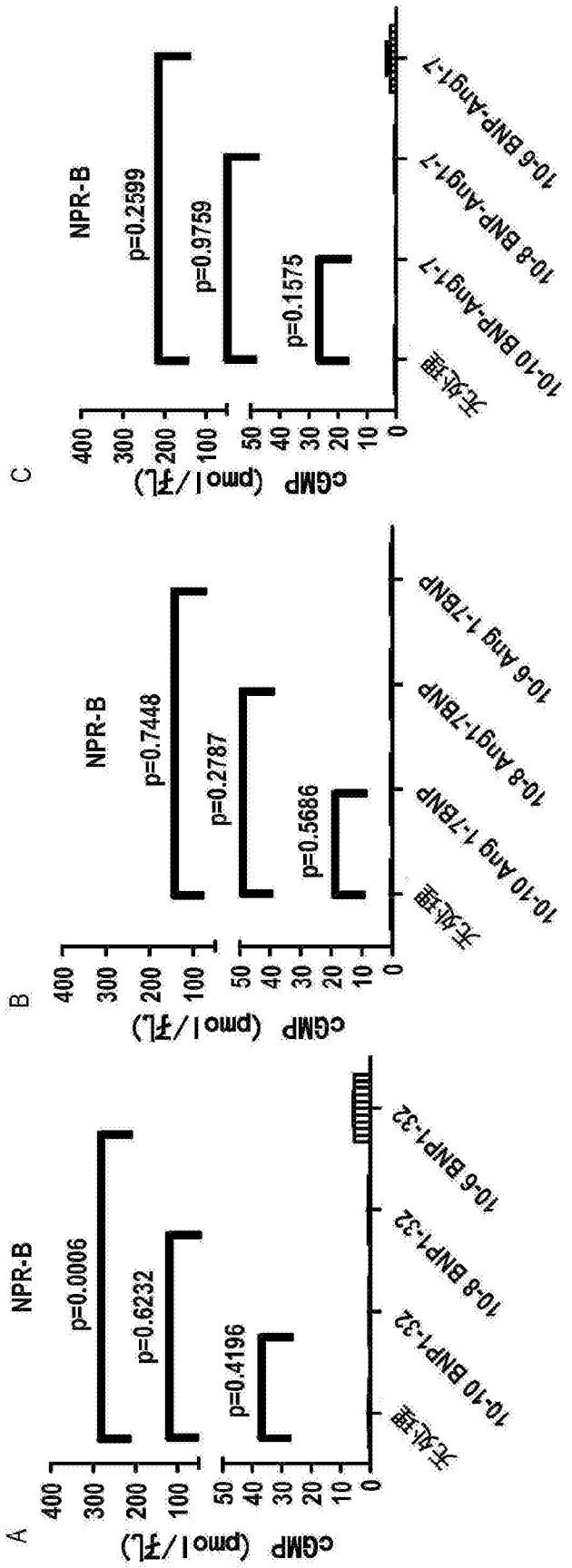

A
B
C
cGMP (pmol/孔)
NPR-B
p=0.0006
p=0.6232
p=0.4196
p=0.7448
p=0.2787
p=0.5686
p=0.2599
p=0.9759
p=0.1575
无处理
10-10 BNP1-32
10-8 BNP1-32
10-6 BNP1-32
10-10 Ang 1-7BNP
10-8 Ang1-7BNP
10-6 Ang 1-7BNP
10-10 BNP-Ang1-7
10-8 BNP-Ang1-7
10-6 BNP-Ang1-7

图34

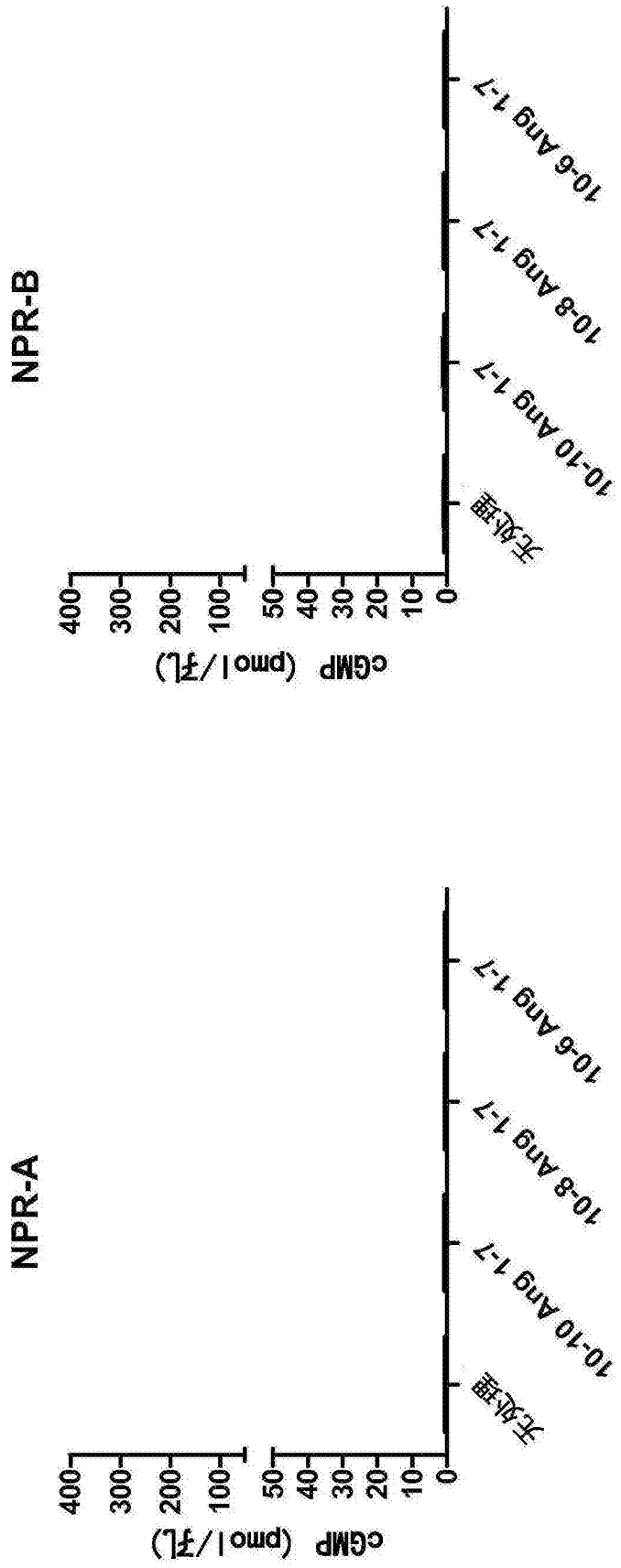

NPR-B
cGMP (pmol/孔)
0
10
20
30
40
50
100
200
300
400
无处理
10-10 Ang 1-7
10-8 Ang 1-7
10-6 Ang 1-7
NPR-A
cGMP (pmol/孔)
0
10
20
30
40
50
100
200
300
400
无处理
10-10 Ang 1-7
10-8 Ang 1-7
10-6 Ang 1-7

图35