



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103159847 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201310127277. 6

(22) 申请日 2013. 04. 12

(73) 专利权人 叶亮

地址 100069 北京市丰台区玉林里 46 号楼 2 层 5 号

专利权人 陈光明  
王洪敏

(72) 发明人 叶亮

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司  
44202

代理人 刘宇峰

(56) 对比文件

US 20020082219 A1, 2002. 06. 27, 全文.

CN 102481330 A, 2012. 05. 30, 全文.

Huges Schweitz. A New Member of the Natriuretic Peptide Family Is Present in the Venom of the Green Mamba (*Dendroaspis angusticeps*). 《THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 1992, 第 267 卷 (第 20 期), 13928-13932.

审查员 杨光

(51) Int. Cl.

C07K 14/575(2006. 01)

C12N 15/16(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

A61K 38/22(2006. 01)

A61P 9/04(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

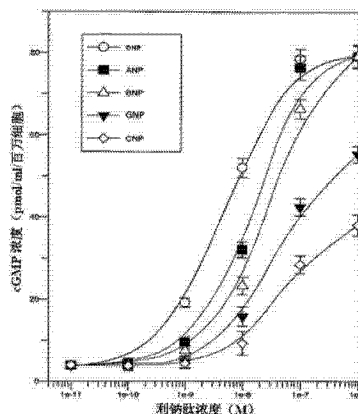
权利要求书1页 说明书10页  
序列表4页 附图9页

(54) 发明名称

一种利钠肽及其基因与用途

(57) 摘要

本发明涉及一种来自蛇类的利钠肽以及编码该多肽的基因。本发明所述的利钠肽是一种来源于东非绿曼巴蛇的利钠肽。本发明所述的利钠肽是一种全新的利钠肽,是利钠肽家族的新成员,称为 GNP,即 G 型利钠肽。本发明还提供了重组利钠肽的制备方法。本发明提供的利钠肽,包括重组利钠肽和人工合成利钠肽,均可应用于制备治疗急性心力衰竭、急性失代偿性心力衰竭、急性心肌梗死冠状动脉介入术后患者、慢性心力衰竭、老年急性前壁心肌梗死合并收缩性心力衰竭患者的药物。



1. 一种来源于东非绿曼巴蛇(*Dendroaspis angusticeps*)的利钠肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。
2. 编码如权利要求 1 所述的利钠肽的基因。
3. 根据权利要求 2 所述的基因,其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。
4. 包含如权利要求 3 所述的基因的重组表达载体。
5. 用如权利要求 4 所述的重组表达载体转化宿主细胞所得的转化体。
6. 从如权利要求 5 所述的转化体中获得的重组利钠肽。
7. 制备如权利要求 6 所述的重组利钠肽的方法,其特征在于,包括以下步骤:培养包含如权利要求 5 所述的转化体,回收所表达的重组利钠肽。
8. 如权利要求 1 所述的利钠肽在制备治疗急性心力衰竭、急性失代偿性心力衰竭、急性心肌梗死冠状动脉介入术后患者、慢性心力衰竭、老年急性前壁心肌梗死合并收缩性心力衰竭患者的药物的用途。
9. 根据权利要求 8 所述的用途,其特征在于:所述的利钠肽是重组利钠肽或者人工合成利钠肽。
10. 一种药物组合物,其特征在于:包括根据权利要求 1 所述的利钠肽或者根据权利要求 6 所述的重组利钠肽,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;所述药物组合物为注射剂或者冻干制剂。

## 一种利钠肽及其基因与用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利钠肽,尤其是涉及一种来自蛇类的利钠肽,以及编码该多肽的基因。

### 背景技术

[0002] 利钠肽(Natriuretic Peptide, NP)是指一类具有较强排钠、利尿、扩血管等生物活性的多肽。这些多肽具有遗传上的同源性和相同的受体系统。

[0003] 目前,从哺乳类动物中获得的利钠肽包括:心钠肽、脑钠肽和 C 型利钠肽。心钠肽主要由心房肌细胞分泌,脑钠肽主要由心室肌细胞分泌,C 型利钠肽主要由血管内皮细胞分泌并在局部发挥血管扩张和抗增殖作用。

[0004] 1981 年加拿大科学家 de Bold 等发现大鼠的心脏提取液具有很强的利钠、利尿作用。一年后,他们确认其有效组分是多肽。在随后的 2-3 年中,利钠肽家族中的第一个成员心钠肽的结构被确认。心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)又称为“心钠素”或“心房利钠肽”,是由心房肌细胞合成并释放的肽类,根据其英文缩写又称为“A 型利钠肽”。人体中的 ANP 由 28 个氨基酸残基组成。ANP 的主要作用是使血管平滑肌舒张和促进肾脏排钠、排水。当心房壁受牵拉时可刺激心房肌细胞释放 ANP。ANP 对肾脏的作用主要有以下几方面:1、对肾小球滤过率的影响。ANP 通过第二信使 cGMP 使血管平滑肌胞质钙离子浓度下降,使入球小动脉舒张,肾小球滤过率增大;2、对集合管的影响。ANP 通过 cGMP 使集合管上皮细胞管腔膜上的钠通道关闭,抑制 NaCl 的重吸收;3、对其他激素的影响。ANP 还抑制肾素、醛固酮和血管升压素的分泌。

[0005] 1988 年日本科学家 Sudoh 等从猪脑分离出利钠肽家族中的第二个成员——脑钠肽。脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, BNP)又称“脑钠素”,根据其英文缩写又称为“B 型利钠肽”。在心力衰竭的病人血液中,脑钠肽、心钠肽都明显升高。脑钠肽实际上主要来源于心室。BNP 具有重要的病理生理学意义,它可以促进排钠、排尿,具较强的舒张血管作用,可对抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的缩血管作用,同 ANP 一样是人体抵御容量负荷过重及高血压的一个主要内分泌系统。心功能障碍能够极大地激活利钠肽系统,心室负荷增加导致 BNP 释放。

[0006] C 型利钠肽(C-type Natriuretic Peptide, CNP)是 Sudoh 等于 1990 年从猪脑中提取的第 3 个利钠肽家族成员,因其具有较强的抑制血管重构和一定的扩血管作用而受到广泛的关注。

[0007] 研究表明,利钠肽的核心结构是一个由 17 个氨基酸形成的通过一对半胱氨酸二硫键连接的环状结构,该核心结构对于利钠肽与受体的结合以及其生物活性是非常重要的。

[0008] 研究表明,利钠肽的生理药理机理是:作用于心血管系统和泌尿系统;与血管平滑肌及内皮细胞的鸟苷酸环化酶受体结合,刺激细胞内第二信使 cGMP 浓度升高;促进平滑肌细胞舒张;扩张动脉和静脉;降低体循环血管阻力;增加血管的通透性;增加静脉容

量;改善血流动力学;降低全身动脉压、右房压、肺毛细血管楔压;降低心脏前后负荷;是肾素-血管紧张素-醛固酮系统的天然拮抗剂;拮抗内皮素、去甲肾上腺素和醛固酮的活性;扩张肾小球的入球小动脉、收缩出球小动脉,增加肾小球毛细血管阻力,增加肾小球滤过率,促进肾小管钠和水的转运,发挥排钠、利尿作用。利钠肽的特点是:没有正性肌力作用;不强制性地增强心肌的收缩能力;不增加心肌耗氧量;没有目前扩血管药和利尿药物对于血压和心率改变的副作用。因此,利钠肽的潜在临床适应症包括:急性心力衰竭、急性失代偿性心力衰竭、急性心肌梗死冠状动脉介入术后患者、慢性心力衰竭、老年急性前壁心肌梗死合并收缩性心力衰竭患者等。

[0009] 目前,国内外已经开发出重组人脑钠肽药物。这些药物是人工合成的产品,与心室肌分泌的天然脑钠肽具有相同的 32 个氨基酸序列。

[0010] 美国 Scios 公司(现归属强生公司)于 2001 年 9 月上市销售奈西立肽(Nesiritide),商标名“Natreacor”,它是首个上市的重组人脑利钠肽(rhBNP)。奈西立肽具有明确的扩血管和排钠利尿作用,已在美国获准用于治疗急性失代偿性心力衰竭。临床研究表明,奈西立肽可改善心力衰竭病人的血流动力学,改善心力衰竭病人的临床症状。

[0011] 我国目前也有两家企业生产和销售研发重组人脑利钠肽药品,一家是西藏诺迪康股份有限公司(上市公司简称:西藏药业),商品名“新活素”,另一家是苏州苏兰生物医药科技开发有限公司,商品名“布罗纳泰”,均为冻干粉针剂。这两种药品均在 2005 年获批上市销售,是心血管类国家一类新药,用于治疗休息或轻微活动时呼吸困难的急性心力衰竭患者。据报道,“新活素”于 2010 年 4 月完成四期临床试验,5 月底进入国家首部《急性心力衰竭诊断和治疗指南》。

[0012] 据报道,美国每年心衰的发病率为 0.23-0.27%,而我国每年因急性心力衰竭而住院的患者人数不少于 200 万人,并且每年以 10% 的比例增加,随着生活水平继续上升和人口老龄化,患病人数将持续上升。重组人脑利钠肽为急性心衰的抢救用药,其中 90% 以上的患者可以使用此药。

[0013] 在非哺乳类动物中,也发现了类似结构和功能的利钠肽,例如, Schweitz 等于 1992 年从东非绿曼巴蛇(*Dendroaspis angusticeps*, 又称 Green Mamba)的蛇毒中分离得到 D 型利钠肽(Dendroaspis Natriuretic Peptide, DNP);Ho 等于 1997 年从南美银环蛇(*Micrurus corallinus*)的蛇毒中分离得到 M 型利钠肽(Micrurus Natriuretic Peptide, MNP),从鳗鱼心脏中分离到 V 型利钠肽(Ventricle Natriuretic Peptide, VNP)(Takei 等, 1991)。相比于 ANP、BNP 和 CNP,其他利钠肽的研究报道较少。

[0014] 东非绿曼巴蛇(*Dendroaspis angusticeps*)为眼镜蛇科曼巴蛇属的一种,被认为是目前爬行速度最快的蛇之一,也是非洲草原最令人敬畏的毒蛇之一,被称为“东非死神”。绿曼巴蛇浑身绿得像一根翠竹,头和身子一般细,能灵活的在树枝间跳跃。绿曼巴蛇的毒素不及黑曼巴蛇(*Dendroaspis polylepis*),但它们同样继承了快速运动的先天优势,成为一种以速度和毒液取胜的蛇。

[0015] 因此,本发明致力于从东非绿曼巴蛇的蛇毒腺组织中寻找新的利钠肽。

## 发明内容

[0016] 本发明的目的是提供了一种新的利钠肽,它是从东非绿曼巴蛇(*Dendroaspis*

*angusticeps*, 又称 Green Mamba) 的蛇毒腺组织中的天然多肽的基础上获得的多肽。

[0017] 本发明所述的利钠肽是一种来源于东非绿曼巴蛇 (*Dendroaspis angusticeps*) 的利钠肽, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 全长 125 个氨基酸, 其中包括 25 个氨基酸的信号肽和 38 个氨基酸的成熟肽。

[0018] 将本发明所分离得到的成熟利钠肽与同样来源的已报道的 DNP 成熟肽相比, 它们均为 38 个氨基酸, 但两者间的同源性仅为 36.80%。本发明所述的利钠肽虽然在氨基酸序列上不同于其他已知的利钠肽, 但同样具有利钠肽的核心结构即由 17 个氨基酸形成的通过一对半胱氨酸二硫键连接的环状结构, 因此, 本发明所述的利钠肽是一个全新的天然利钠肽, 是利钠肽家族的新成员。本发明将该全新的利钠肽称为 GNP (G 来自 Green Mamba), 也就是 G 型利钠肽。为简化说明, 以下用 GNP 表示本发明所述的利钠肽。

[0019] 根据现有技术, 可以从本发明所公开的氨基酸序列中推导出编码本发明所述的利钠肽的基因序列, 因此, 所有可以编码本发明所述的利钠肽即 GNP 的基因均落入本发明的保护范围之内。发明人也从构建的蛇毒腺组织 cDNA 文库中获得编码 GNP 的基因序列。

[0020] 优选地, 编码本发明所述的利钠肽即 GNP 的基因, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。SEQ ID NO: 2 显示了发明人从东非绿曼巴蛇的蛇毒腺组织新鲜分离的 mRNA 构建 cDNA 文库然后克隆得到的编码 GNP 的全长 cDNA 序列, 其中, 5'-UTR (5' 非翻译区) 为 150bp, 3'-UTR (3' 非翻译区) 为 160bp, 开放阅读框编码 125 个氨基酸和 1 个终止子, 包括 25 个氨基酸的信号肽和 38 个氨基酸的成熟肽。

[0021] 根据本发明的一个具体实施例, 利用基因工程的方法, 在大肠杆菌表达系统中表达并纯化出重组 GNP 多肽。在该实施例中, 采用含 GST (谷胱甘肽 S-转移酶) 的 pGEX-6P-3 载体, 表达出 GNP 蛋白前体, 并裂解得到 GNP 成熟肽。本领域技术人员可以根据本发明所揭示的原理和方法, 采用任意已知的原核或真核表达系统来表达出重组 GNP 多肽。因此, 包含本发明所述的编码 GNP 的基因的重组表达载体, 以及采用该重组表达载体转化宿主细胞所得的转化体, 以及从所述的转化体中获得的重组利钠肽, 均落入本发明的保护范围之内。

[0022] 本领域技术人员可以根据本发明所揭示的原理和方法, 针对任意的采用包含本发明所述的编码 GNP 的基因的重组表达载体转化宿主细胞所得的转化体, 可选择合适的培养条件培养所述的转化体, 并通过合适的提取方法回收所表达的重组利钠肽即重组 GNP。这些制备本发明所述的重组 GNP 的方法均落入本发明的保护范围之内。

[0023] 根据本发明的具体实施例, 本发明所述的 GNP 被应用于 PC12 细胞 (大鼠肾上腺细胞)、RASMC 细胞 (大鼠主动脉平滑肌细胞) 和 HCD 细胞 (人肾皮质集合管细胞), 研究该多肽刺激 cGMP 分泌的效果。PC12 和 HCD 细胞均主要表达 NPRA (利钠肽受体 A), 而 RASMC 细胞则主要表达 NPRB (利钠肽受体 B)。根据本发明所提供的细胞水平的实验结果, 可以惊喜地发现, GNP 在上述三种细胞中均可有效刺激 cGMP 分泌, 也就是, GNP 可激活两种利钠肽受体即 NPRA 与 NPRB, 虽然效果稍低于 ANP 和 CNP。因此, 本发明所述的 GNP 具有较强排钠、利尿、扩血管等生物活性。类似于前述的“奈西立肽”和“新活素”, 本发明提供的利钠肽, 包括重组利钠肽和人工合成利钠肽, 均可应用于制备治疗急性心力衰竭、急性失代偿性心力衰竭、急性心肌梗死冠状动脉介入术后患者、慢性心力衰竭、老年急性前壁心肌梗死合并收缩性心力衰竭患者的药物。

[0024] 本发明还提供了一种药物组合物, 它包括本发明所述的利钠肽, 包括重组利钠肽

和人工合成利钠肽,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0025] 根据本发明所述的药物组合物的进一步特征,所述药物组合物可以是注射剂,也可以是冻干制剂。

[0026] 本发明对于所述利钠肽 GNP 的生理药理研究以及其开发应用确立了良好的基础。

#### 附图说明

[0027] 图 1 是本发明所述的利钠肽即 GNP 的全长 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列的分析图。

[0028] 图 2A 是 ANP ( $1 \times 10^{-6}$  M) 在 PC12 细胞中促使 cGMP 分泌的柱形图。

[0029] 图 2B 是 GNP ( $1 \times 10^{-6}$  M) 在 PC12 细胞中促使 cGMP 分泌的柱形图。

[0030] 图 3 是五种利钠肽在 PC12 细胞中促使 cGMP 分泌的曲线图。

[0031] 图 4 显示 GNP ( $1 \times 10^{-6}$  M) 在 RASMC 细胞中促使 cGMP 分泌的柱形图。

[0032] 图 5 显示了五种利钠肽在 RASMC 细胞中促使 cGMP 分泌的曲线图。

[0033] 图 6A 是 ANP ( $1 \times 10^{-6}$  M) 在 HCD 细胞中促使 cGMP 分泌的柱形图。

[0034] 图 6B 是 GNP ( $1 \times 10^{-6}$  M) 在 HCD 细胞中促使 cGMP 分泌的柱形图。

[0035] 图 7 是五种利钠肽在 HCD 细胞中促使 cGMP 分泌的曲线图。

[0036] 图 8 是 pGEX-6P-3 载体的图谱。图中箭头显示了前切割蛋白酶(Prescission Protease)的切割位点。

[0037] 图 9 是 GNP 蛋白前体的 SDS-PAGE 凝胶电泳图。在该图中,泳道 1 是蛋白质分子量标准;泳道 2 是从前切割蛋白酶消化柱内洗脱的第一蛋白片段;泳道 3 是第二蛋白片段;泳道 3 是第三蛋白片段。

#### 具体实施方式

[0038] 实施例一:GNP 的 cDNA 克隆和基因分析

[0039] 采用 Invitrogen 公司的快速 mRNA 提取试剂盒从东非绿曼巴蛇的新鲜分离的蛇毒腺组织中提取得到 mRNA,然后采用 Clontech 公司的 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒构建蛇毒腺组织的 cDNA 文库。该试剂盒采用 5' 和 3' RACE 技术来进行 cDNA 末端快速克隆。

[0040] 5' RACE 的引物:SEQ ID NO: 3

[0041] 5' -TGGTCGATCTTGTGGCCGAAGCAGCCAT-3' 。

[0042] 3' RACE 的引物:SEQ ID NO: 4

[0043] 5' -TAGACTCGCGTCGTATGAAGGGGCTGGA-3' 。

[0044] 切胶回收 RACE 产物,得到一种新的利钠肽即本发明所述的 GNP 的全长 cDNA 序列。

[0045] GNP 的全长 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列可参见图 1 和序列列表。该 cDNA 全长 718bp,其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。其中,5'-UTR (5'非翻译区)为 150bp,3'-UTR (3'非翻译区)为 160bp,开放阅读框编码 125 个氨基酸和 1 个终止子,包括 25 个氨基酸的信号肽和 38 个氨基酸的成熟肽。本发明所述的利钠肽即 GNP 的氨基酸序列(即成熟肽序列)为 SEQ ID NO:1,其修饰产物,例如部分氨基酸发生去除、取代、修饰或加成后所产生的产物,也包括在本发明所述的保护范围之内。

[0046] 为证实在第一链 cDNA 中存在上述全长的 cDNA,采用基于 5'端和 3'端设计的两个

引物,以第一链 cDNA 为模板进行 PCR。

[0047] 正向引物:SEQ ID NO: 5

[0048] 5'-CTATAGGGCAAGCAAGCAGTGGTAAC-3'

[0049] 反向引物:SEQ ID NO: 6

[0050] 5'-CTGCGGATGGGGTGTGGGGTGTCC-3'

[0051] 将 PCR 产物克隆后进行测序,结果确认 GNP 的全长 cDNA 确实存在于蛇毒腺组织中。

[0052] 在 GNP 的基因分析中有以下值得关注之处:

[0053] 1. 在 3'-UTR 存在两个 ATTTA 结构域,这种序列曾在 BNP 和 CNP 的 cDNA 中发现(但在 ANP 中不存在),其功能是使 mRNA 不稳定,并被认为是设计用于对生理反应做出快速反应。

[0054] 2. GenBank BLAST 检索显示,在 GNP 与 MNP 的信号肽之间有相当显著的相似性,25 个氨基酸中有 23 个相同。这大概是因为它们所来自的东非绿曼巴蛇与南美银环蛇都属于毒蛇。

[0055] 根据 GNP 基因推导的理论氨基酸序列(一级结构)为:

[0056] KSTPDGCFGHKLDPIGHSHGLGCPGAGPHPKPTPGAGR (38aa)。

[0057] 在 GNP 的蛋白分析中有以下值得关注之处:

[0058] 1. 尽管 GNP 与 DNP 均为 38 个氨基酸,且都来自东非绿曼巴蛇,但两者间的同源性仅为 36.80%。GNP 与其他已知的利钠肽在序列上的区别更大。

[0059] 2. 在信号肽与成熟肽之间,GNP 与 DNP 存在一个非常相似的氨基酸序列,在 26 个氨基酸中有 24 个相同,这大概是因为它们所来自的东非绿曼巴蛇的毒腺。

[0060] 3. 与其他利钠肽的报道类似,GNP 的核心结构也是由 17 个氨基酸形成的通过一对半胱氨酸二硫键连接的环状结构。

[0061] 综上所述,本发明所得到的 GNP 是一个全新的天然利钠肽,是利钠肽家族的新成员。

[0062] 实施例二:GNP 蛋白的人工合成和分析

[0063] 发明人根据实施例一的分析结果进行 GNP 蛋白的人工合成,并委托上海生化所对发明人所提供的合成多肽样品进行分子量分析(质谱法)、纯度分析(HPLC法)、N端测序测试分析、多肽分子内二硫键是否存在和二硫键定位分析。

[0064] 1. 分子量分析

[0065] 样品状态:固体。

[0066] 检测方法:质谱法。

[0067] 所用主要仪器:质谱仪。

[0068] 分析测试结果:

[0069] 质谱分子量 3690.5146      3690.5146

[0070] 理论分子量 3689.7900      3689.79。

[0071] 2. 纯度分析

[0072] 样品状态:固体。

[0073] 检测依据:中国药典 2010 版三部附录 III B 高效液相色谱法。

[0074] 所用主要仪器 :HPLC (Agilent, 1200 型)。

[0075] 分析测试结果 :样品经 HPLC 分析,以峰面积归一法计算样品主峰纯度为 :97.34% (反相)。

[0076] 3. N 端测序测试分析

[0077] 实测序列与理论序列比对如下 :

[0078] 理论序列 :

[0079] K-S-T-P-D-G-C-F-G-H-K-L-D-P-I-G-S-H-S-G-L-G-C-P-G-A-G-P-H-P-K-P-T-P-G-A-G-R (38aa) ;

[0080] 实测序列 :

[0081] NH<sub>2</sub>-K-S-T-P-D-G-C-F-G-H-K-L-D-P-I-G-S-H-S-G-L-G-C-P-G-A-G-P-H-P-K-P-T-P-G-A-G-R (38aa)。

[0082] 4. 多肽分子内二硫键是否存在和二硫键定位分析

[0083] 二硫键是重要的蛋白质翻译后修饰形式,也是一种比较特殊的修饰。蛋白质分析通过各种链间和链内的半胱氨酸连接在一起,对蛋白质分子保持正确的高级结构,维持必要的生物活性至关重要。因此在蛋白质类药物的生物化学分析中,二硫键一直是关心的重点。在本发明中,结合多肽分子在溶液内酶解和 LCMSMS,对供试品的二硫键配对方式进行了分析,明确了供试品的各种链内二硫键配对方式,并提供了确定二硫键配对方式的试验证据,包括一级和二级质谱数据等。

[0084] 供试品状态 :固体。

[0085] 理论配对方式为 :Cys7 与 Cys23。

[0086] 实验仪器 :

[0087] 1) LTQ-velos, Thermofinnigan

[0088] 2) MDLC, GE Healthcare

[0089] 3) 4800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX。

[0090] 实验原理 :本实验中对二硫键的检测,将 MALDI-TOF/TOF 和 LCMSMS 技术相结合,从分子量,一级和二级离子等方面准确有效的对二硫键进行确证。一方面,使用 AB SCIEX 4800 MALDI-TOF/ TOF 对供试品相对分子质量进行测试,准确可靠的获得蛋白质相对分子质量信息。另一方面,使用 LCMSMS 质谱技术对二硫键配对的多肽分子进行解析,结合软件和附加的人工解析,并进行了还原前后目标二硫键多肽分子的色谱质谱图分析,高度准确可靠的获得了二硫键配对的信息。

[0091] 实验方法

[0092] 1) chymotrypsin 酶解及还原。

[0093] 2) MALDI-TOF/TOF 点样。

[0094] 3) MALDI-TOF/TOF 测试样品 :在正离子模式下选择线性方法测试样品分子量。

[0095] 4) MALDI-TOF/TOF 质谱数据及图谱处理

[0096] 4800 MALDI-TOF/TOF 产生的原始数据及图谱由 4000 Series Explorer V3.5 软件导出。

[0097] 5) 毛细管高效液相色谱

[0098] 酶解后的肽段通过 GE 公司的 Ettan MDLC 进行分离,再通过 Thermo LTQ-Velos 进



进行测试。

[0099] 6) LCMSMS 质谱鉴定。

[0100] 7) LCMSMS 质谱数据处理

[0101] 肽段质谱图谱先由计算机软件查库匹配,再由人工匹配验证肽段二级质谱,最后确定二硫键的连接方式。

[0102] 实验结果和分析

[0103] 本实验首先通过 MALDI TOF/TOF 技术确定多肽分子的相对分子质量并对 MS2 图谱进行序列确证。

[0104] 分子量的检测结果为:还原前分子量约为 3688.75Da;IAA 还原及烷基化后分子量约为 3804.98Da;以上还原前后的分子量测试结果与该多肽的理论分子量相符。

[0105] 为进一步确定该多肽分子的氨基酸序列是否与理论序列一致,通过采集二级图谱,并将 MS2 图谱与理论序列进行匹配来验证,匹配结果发现该二级图谱与供试品多肽理论序列吻合。

[0106] 进一步通过人工匹配 MS2 图谱,确定二硫键的连接方式。通过匹配发现供试品中存在和理论配对方式相符的 1 对二硫键,为:Cys7~Cys23。

[0107] 由于现代生物质谱的灵敏度非常高,在二硫键分析中的微量错配也可能在 MS2 鉴定数据中得到假阳性的结果,因此对需要确定的二硫键配对的色谱质谱图(XICs)的效果的确认工作就显得很重要。本实验对二硫键配对形式的 XICs 进行了分析并计算还原前后信号分峰面积,进一步对理论配对的二硫键进行确证。

[0108] 从 XICs 图谱分析可得,由 MS2 图谱初步确认的二硫键 Cys7~Cys23 所在肽段分子信号强度在还原后较还原前下降显著,进一步说明二硫键 Cys7~Cys23 的确存在,而不是假阳性的结果。

[0109] 结论

[0110] 综上所述,供试品 GNP 多肽(批号:GNP20120817)中存在 1 对与理论相符的二硫键,为 Cys7~Cys23。

[0111] 实施例三:在 PC12 细胞上的 cGMP 分泌实验

[0112] 实验材料:PC12 细胞(一种大鼠肾上腺细胞),商业购买。

[0113] 根据已有报道,在 PC12 细胞中,NPRA(利钠肽受体 A)与 NPRB(利钠肽受体 B)的比例是 3:1,也就是,以 NPRA 为主。

[0114] 本实验研究了由包括 GNP 在内的 5 种利钠肽家族成员在 PC12 细胞上对 cGMP 分泌的刺激效果。其中,GNP 是来自实施例二所人工合成的样品,其他 4 种利钠肽,均来源于商业购买或者学者馈赠。

[0115] 实验一:在 24 孔培养板上培养 PC12 细胞至每孔  $1 \times 10^6$  细胞,分别加入  $1 \times 10^{-6}$ M 的 ANP 和 GNP。在每个时间点取出 6 个不同孔的培养液进行 cGMP 浓度分析(采用免疫测定法)。

[0116] 图 2A 与图 2B 分别显示 ANP( $1 \times 10^{-6}$ M)与 GNP( $1 \times 10^{-6}$ M)在 PC12 细胞中促使 cGMP 分泌的动态过程。经比较可见,在给药后 2-4 小时,cGMP 浓度都达到峰值,虽然 GNP 实验中的峰值比 ANP 实验中的峰值低,但在达到峰值后,GNP 实验的药效消减比 ANP 实验更慢(在 8 小时后仍维持较高峰值)。

[0117] 实验二:在 24 孔培养板上培养 PC12 细胞至每孔  $1 \times 10^6$  细胞,分别加入每个浓度的 ANP、BNP、CNP、DNP 和 GNP,在 2 小时培育后,取出孔内的培养液进行 cGMP 浓度分析(采用免疫测定法)。

[0118] 图 3 显示了五种利钠肽在 PC12 细胞中促使 cGMP 分泌的曲线。如图所示,在低浓度时,各种利钠肽之间的刺激效果相差不大;在利钠肽浓度达到  $1 \times 10^{-9}$ M 以上时,各自的促 cGMP 分泌效果开始分化,而 GNP 的刺激能力居中游,虽低于 ANP、BNP 和 DNP,但显著高于 CNP。

[0119] 本实施例的上述实验证明,GNP 可有效作用于 NPRA 以刺激 cGMP 分泌。

[0120] 实施例四:在 RASMC 细胞上的 cGMP 分泌实验

[0121] 实验材料:RASMC 细胞(一种大鼠主动脉平滑肌细胞),商业购买。

[0122] 根据已有报道,在 RASMC 细胞中,NPRA 与 NPRB 的比例是 1:3,也就是,以 NPRB 为主。

[0123] 本实验研究了由包括 GNP 在内的 5 种利钠肽家族成员在 RASMC 细胞上对 cGMP 分泌的刺激效果。

[0124] 实验一:在 24 孔培养板上培养 RASMC 细胞至每孔  $1 \times 10^6$  细胞,分别加入  $1 \times 10^{-6}$ M 的 ANP 和 GNP。在每个时间点取出 6 个不同孔的培养液进行 cGMP 浓度分析(采用免疫测定法)。

[0125] 图 4 显示 GNP ( $1 \times 10^{-6}$ M)在 RASMC 细胞中促使 cGMP 分泌的动态过程。由图可见,在给药后 2-4 小时,cGMP 浓度达到峰值,在 8 小时后仍维持较高峰值,药效消减较慢。由于 ANP 只作用于 NPRA,所以在 RASMC 细胞实验中无效果。

[0126] 实验二:在 24 孔培养板上培养 RASMC 细胞至每孔  $1 \times 10^6$  细胞,分别加入每个浓度的 ANP、BNP、CNP、DNP 和 GNP,在 2 小时培育后,取出孔内的培养液进行 cGMP 浓度分析(采用免疫测定法)。

[0127] 图 5 显示了五种利钠肽在 RASMC 细胞中促使 cGMP 分泌的曲线。如图所示,在低浓度时,各种利钠肽之间的刺激效果相差不大;在利钠肽浓度达到  $1 \times 10^{-8}$ M 以上时,各自的促 cGMP 分泌效果开始分化,而 GNP 的刺激能力居中游,虽低于 CNP,但显著高于 ANP、BNP 和 DNP。

[0128] 本实施例的上述实验证明,GNP 可有效作用于 NPRB 以刺激 cGMP 分泌。

[0129] 实施例五:在 HCD 细胞上的 cGMP 分泌实验

[0130] 实验材料:HCD 细胞(一种人肾皮质集合管细胞),商业购买。

[0131] 根据已有报道,在 HCD 细胞中,NPRA (利钠肽受体 A)与 NPRB (利钠肽受体 B)的比例是 3:1,也就是,以 NPRA 为主。

[0132] 本实验研究了由包括 GNP 在内的 5 种利钠肽家族成员在 PC12 细胞上对 cGMP 分泌的刺激效果。

[0133] 实验一:在 24 孔培养板上培养 HCD 细胞至每孔  $1 \times 10^6$  细胞,分别加入  $1 \times 10^{-6}$ M 的 ANP 和 GNP。在每个时间点取出 6 个不同孔的培养液进行 cGMP 浓度分析(采用免疫测定法)。

[0134] 图 6A 与图 6B 分别显示 ANP ( $1 \times 10^{-6}$ M)与 GNP ( $1 \times 10^{-6}$ M)在 HCD 细胞中促使 cGMP 分泌的动态过程。经比较可见,在给药后 2-4 小时,cGMP 浓度都达到峰值,虽然 GNP 实验中的峰值比 ANP 实验中的峰值低,但在达到峰值后,GNP 实验的药效消减比 ANP 实验更慢(在 8

小时后仍维持较高峰值)。

[0135] 实验二:在 24 孔培养板上培养 HCD 细胞至每孔  $1 \times 10^6$  细胞,分别加入每个浓度的 ANP、BNP、CNP、DNP 和 GNP,在 2 小时培育后,取出孔内的培养液进行 cGMP 浓度分析(采用免疫测定法)。

[0136] 图 7 显示了五种利钠肽在 HCD 细胞中促使 cGMP 分泌的曲线。如图所示,在低浓度时,各种利钠肽之间的刺激效果相差不大;在利钠肽浓度达到  $1 \times 10^{-9}$ M 以上时,各自的促 cGMP 分泌效果开始分化,而 GNP 的刺激能力居中游,虽低于 ANP、BNP 和 DNP,但显著高于 CNP (几乎没效果)。

[0137] 本实施例的上述实验证明,GNP 可有效作用于 NPRA 以刺激 cGMP 分泌。

[0138] 综合实施例二至四的结果分析,在 NPRA 占优势的细胞中,ANP、BNP、DNP 的刺激效果较明显,而在 NPRB 占优势的细胞中,CNP 的刺激效果较明显,这说明已知的利钠肽家族成员都是偏重于某一种受体。可以惊喜地发现,本发明所述的 GNP 对两种受体 NPRA 和 NPRB 的作用效果都很明显,这表明新的 GNP 是一种可同时结合两种受体 NPRA 和 NPRB 而发挥作用的利钠肽。

[0139] 实施例六:重组 GNP 的制备

[0140] 本实施例利用基因工程的方法,在大肠杆菌表达系统中表达出重组 GNP 多肽。

[0141] 采用在大肠杆菌(*E. coli*)中高效表达融合蛋白的质粒,即含 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)的 pGEX-6P-3 载体,该载体是已商品化的质粒,其图谱参见图 8。该载体表达的蛋白是由 26 kDa GST 与目标蛋白组成的融合蛋白。该载体在 GST 结构域和多克隆位点之间编码了 PreScission 蛋白酶的识别位点,有一个前切割蛋白酶(Prescission Protease)识别位点,用于从融合蛋白中特异性切割目标蛋白。

[0142] 利用 PCR 方法在 GNP 蛋白前体(preproGNP)基因的两端加上 BamH I 和 Not I 酶切位点,因此将插入 pGEX-6P-3 载体。将 GNP 蛋白前体基因与 GST 在 pGEX-6P-3 载体内融合后,在大肠杆菌 BL21 细胞内高水平诱导表达。诱导剂为 IPTG,也可通过盐来诱导,这样可实现低成本的大量表达。

[0143] 然后,利用谷胱甘肽琼脂糖(Glutathione Sepharose)填料通过亲和层析从大肠杆菌细胞裂解液中纯化出 GST-GNP 的融合蛋白,其分子量为 37.80 kDa,再通过前切割蛋白酶进行柱内一步式消化,洗脱获得 GNP 蛋白前体,其分子量为 11.80 kDa。图 9 显示了 GNP 蛋白前体的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果(凝胶采用 SimplyBlue™ SafeStain 染色)。通过细菌蛋白酶的作用,可使 GNP 蛋白前体发生蛋白裂解,进一步得到 GNP 成熟肽。

[0144] 本发明也可采用其他原核表达系统来进行表达和纯化,例如,可采用了带有 Poly-His 标签的表达质粒,它们广泛用于获得纯化的重组蛋白;还可选用以下表达载体:pET、pUCH33 等,或者商业化销售的其他载体;选用以下原核表达菌株:大肠杆菌 BL21、大肠杆菌 JM109 等,或作为或者商业化销售的其他宿主细胞。

[0145] 本发明也可采用其他真核表达系统来进行表达和纯化,例如,选用以下胞内型载体:PA0815、PPIC3K、PPICZ、PHW010、PGAPZ,或者选用以下分泌型载体:PPIC9K、PPICZ $\alpha$ 、PGAPZ $\alpha$ ,或者商业化销售的其他载体;选用以下真核表达菌株或细胞:毕赤酵母菌 KM71、MC100-3、SMD1168、SMD1165、SMD1163 等,或作为或者商业化销售的其他宿主细胞。

[0146] 实施例七:药物制剂

[0147] 本发明可以将实施例六所制备的重组 GNP 作为活性成分,或者将实施例二所制备的人工合成 GNP 作为活性成分,调配于药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂中,调整至灌装浓度,过滤除菌、除热原、灌装,制成注射剂,进一步可制成冻干粉针剂。有关工艺可参考本领域的药学常规工艺。

[0148] 参照目前国内外对于重组人脑利钠肽药品的研究和应用,本发明所制备的重组 GNP 药品以及人工合成 GNP 药品,经临床试验后,也可用于制备治疗急性心力衰竭、急性失代偿性心力衰竭、急性心肌梗死冠状动脉介入术后患者、慢性心力衰竭、老年急性前壁心肌梗死合并收缩性心力衰竭患者的药物。

## 序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 叶亮 ;陈光明 ;王洪敏

<120> 一种利钠肽及其基因与用途

<130>

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Dendroaspis angusticeps

<400> 2

Met Val Gly Leu Ser Arg Leu Ser Gly Val Gly Leu Leu Leu Val Leu  
1                   5                   10                   15

Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Asp Gly Lys Ser Pro Pro Gln Ala Leu  
                  20                   25                   30

His Lys Pro Pro Pro Ala Leu Ser Ala Pro Ser Arg Leu Met Gly Ala  
                  35                   40                   45

Leu Arg Pro Asp Ser Lys Gln Ser Arg Ala Ser Trp Asp Arg Met Val  
                  50                   55                   60

His Pro Glu Pro His Val Gly Gly Gly Gly Thr Gly Val Asp Ser Arg  
65                   70                   75                   80

Arg Met Lys Gly Leu Asp Lys Lys Ser Thr Pro Asp Gly Cys Phe Gly  
                  85                   90                   95

His Lys Leu Asp Pro Ile Gly Ser His Ser Gly Leu Gly Cys Pro Gly

	100	105	110	
Ala Gly Pro His Pro Lys Pro Thr Pro Gly Ala Gly Arg				
	115	120	125	
<210> 2				
<211> 718				
<212> DNA				
<213> <i>Dendroaspis angusticeps</i>				
<400> 1				
gaggcaaacg agcgtagctc gacgagagac gctcctgcag cgacagcacc cggctcggct				60
ctcttcggct cagctggctc gcaccctega ggattcatct ctctctctct ctctctctct				120
tccacctgca cttecgcage ccggggaag atg gtc ggc ctc tcc cgt ctg tcg				173
		Met Val Gly Leu Ser Arg Leu Ser		
		1	5	
ggc gtc ggg ctg ctg ctg gtg ctg gcc ctg ctg cct ctc gcc ctc gat				221
Gly Val Gly Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Asp				
10	15	20		
ggg aag tcg ccg cct cag gcg ctg cac aag cct ccg ccg gct ctc tca				269
Gly Lys Ser Pro Pro Gln Ala Leu His Lys Pro Pro Pro Ala Leu Ser				
25	30	35	40	
gcg ccg tca cgg ctc atg ggg gct ttg cgc ccc gac agc aag cag tca				317
Ala Pro Ser Arg Leu Met Gly Ala Leu Arg Pro Asp Ser Lys Gln Ser				
45	50	55		
cgg gcc tcc tgg gac cgg atg gtg cac cct gag ccc cat gta gga ggc				365
Arg Ala Ser Trp Asp Arg Met Val His Pro Glu Pro His Val Gly Gly				
60	65	70		
ggc ggc act ggg gta gac tcg cgt cgt atg aag ggg ctg gac aag aaa				413
Gly Gly Thr Gly Val Asp Ser Arg Arg Met Lys Gly Leu Asp Lys Lys				

75	80	85	
agc acg ccc gat ggc tgc ttc ggc cac aag ctc gac ccc atc ggc agt			461
Ser Thr Pro Asp Gly Cys Phe Gly His Lys Leu Asp Pro Ile Gly Ser			
90	95	100	
cat agc ggc ttg ggc tgc ccg ggc gcc ggg ccc cac ccg aag cca aca			509
His Ser Gly Leu Gly Cys Pro Gly Ala Gly Pro His Pro Lys Pro Thr			
105	110	115	120
cct ggt gca ggt cgt tga agggacac cccacacccc atccgcagac atttctggac			565
Pro Gly Ala Gly Arg *			
125			
atcccctgca gtcacccggg gccccactg gcctgacccc caagggccac ccacagctgt			625
tggaacgagg gtatatattg tttataaaga gatatttata aaaaatacta ataattttat			685
ttatggaac gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa			718

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

tggtcgatct tgtggccgaa gcagccat

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tagactcgcg tcgtatgaag gggctgga

28

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

ctatagggca agcaagcagt ggtaac

26

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

ctgcgatgg ggtgtgggt gtcc

24



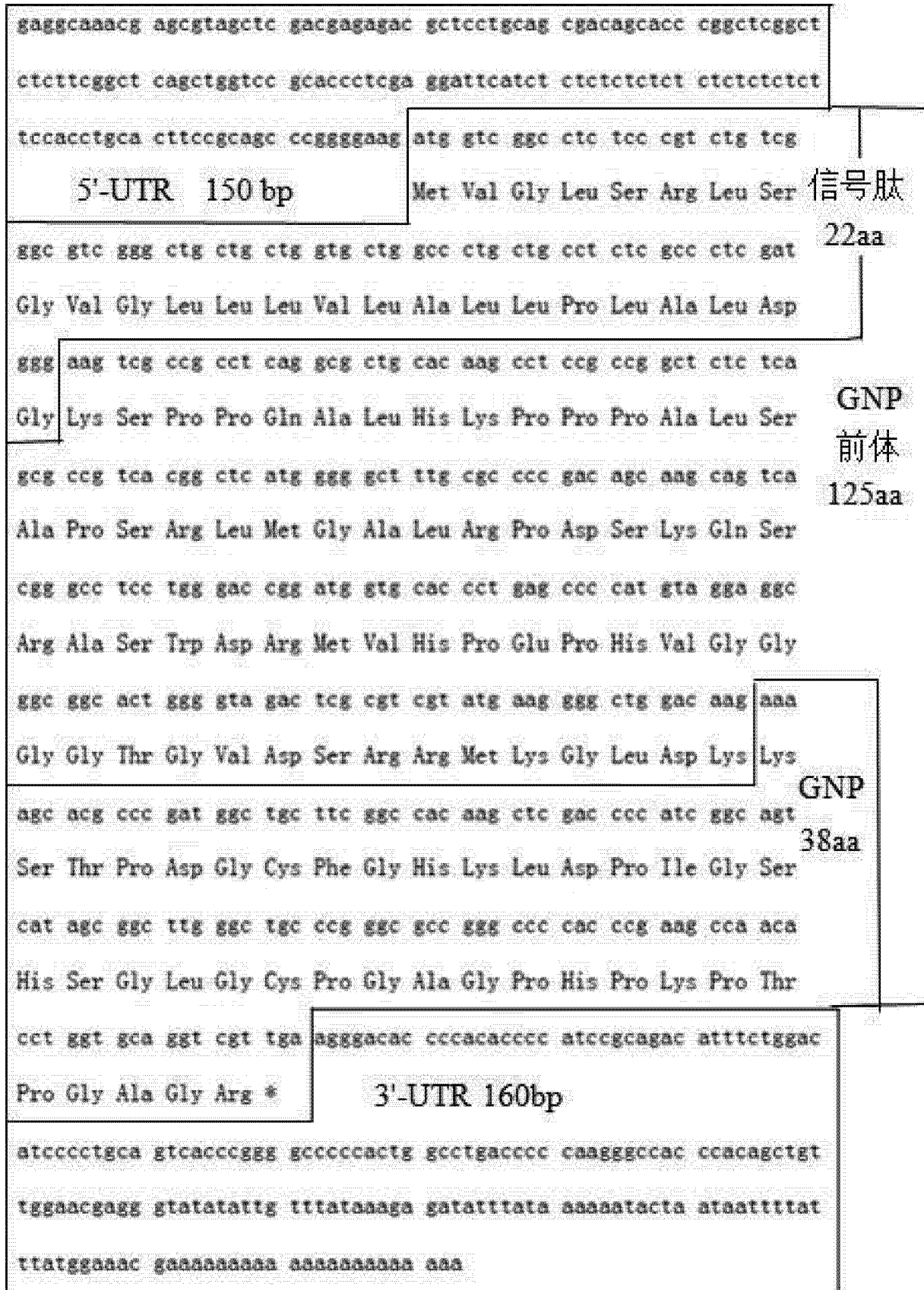


图 1

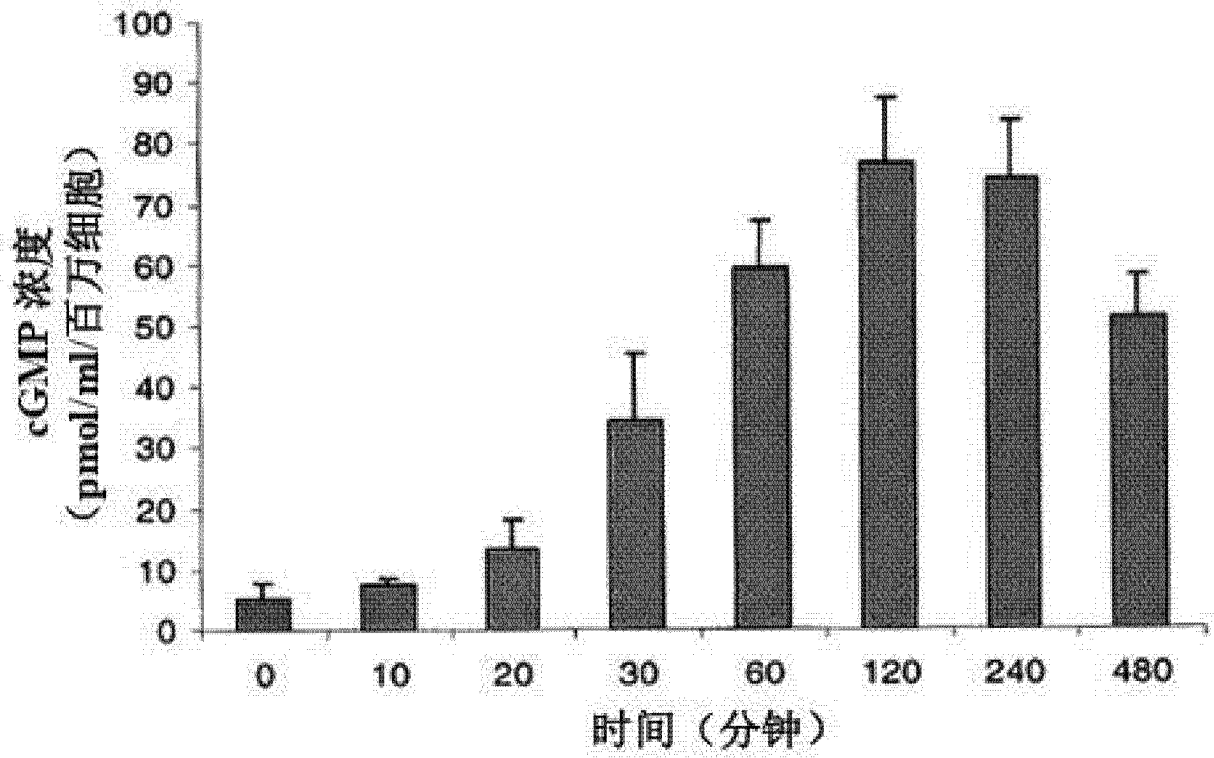


图 2A

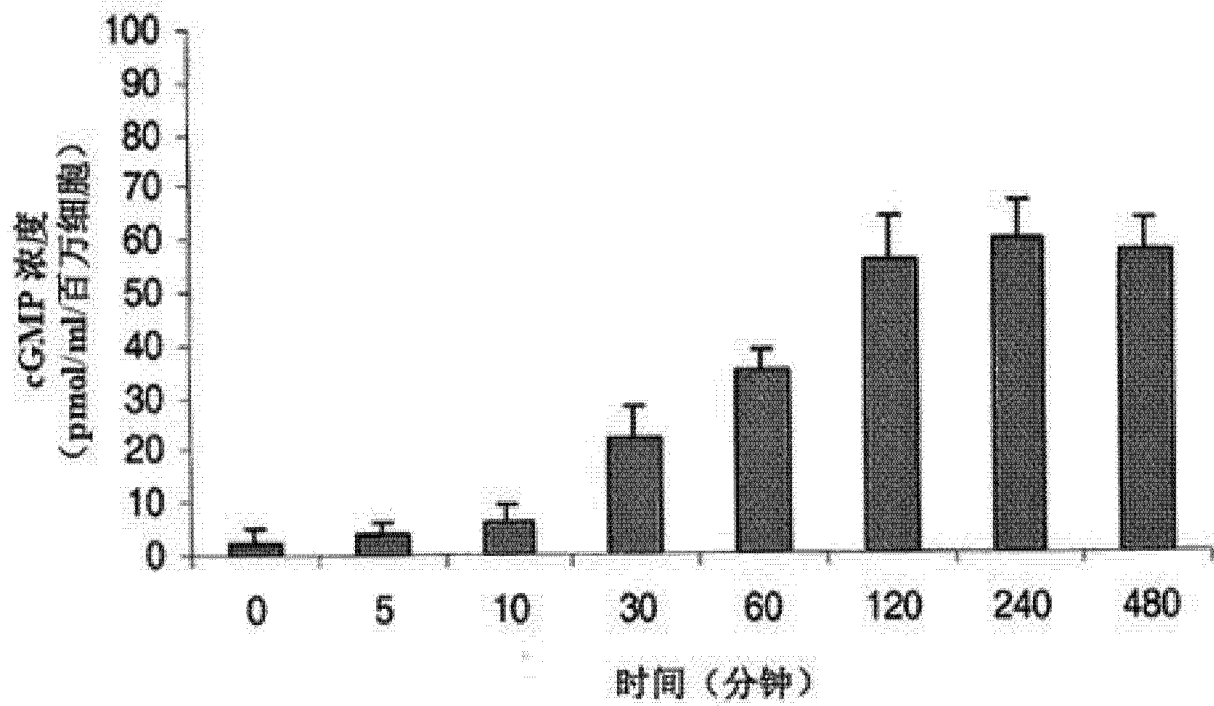


图 2B

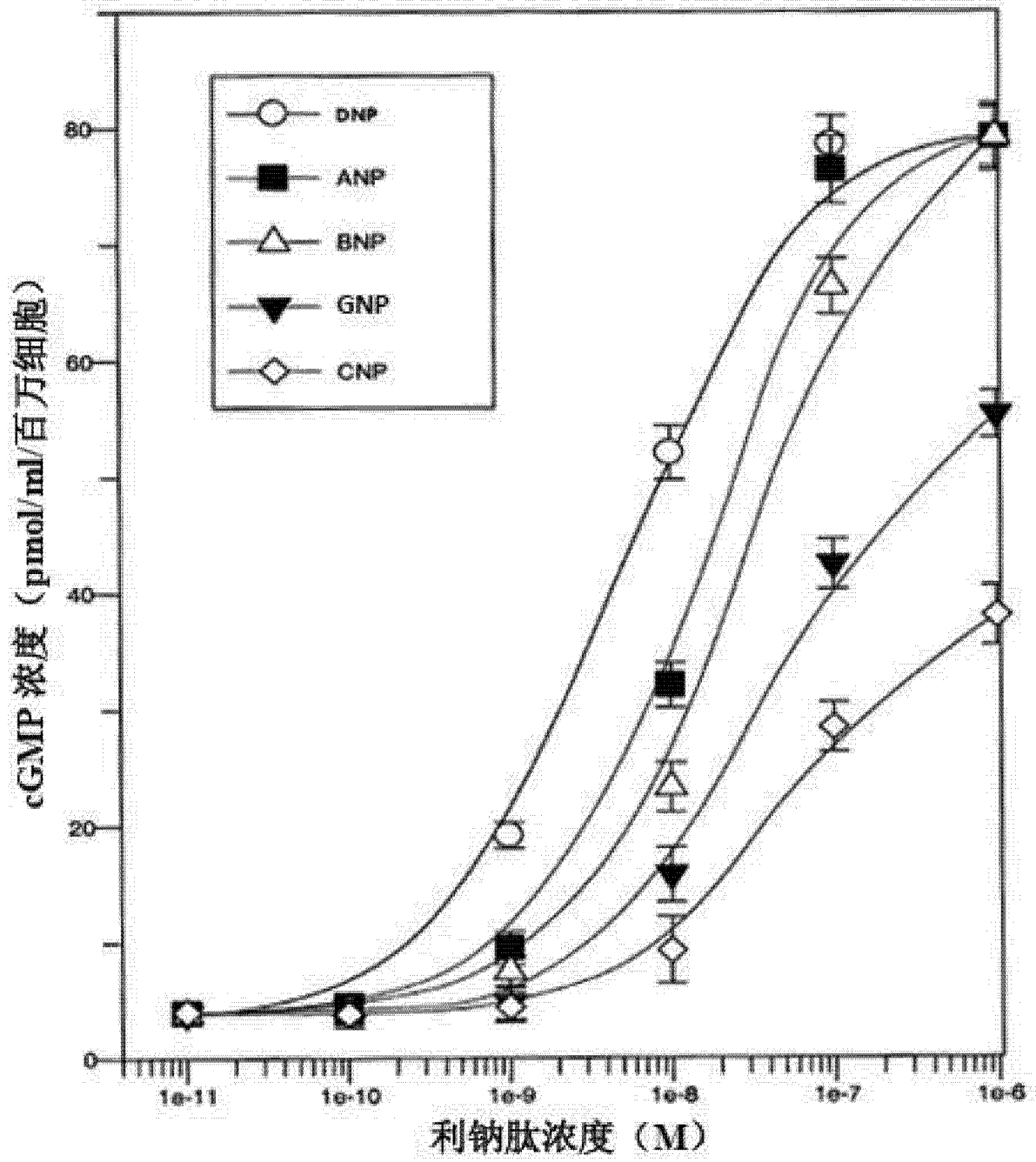


图 3

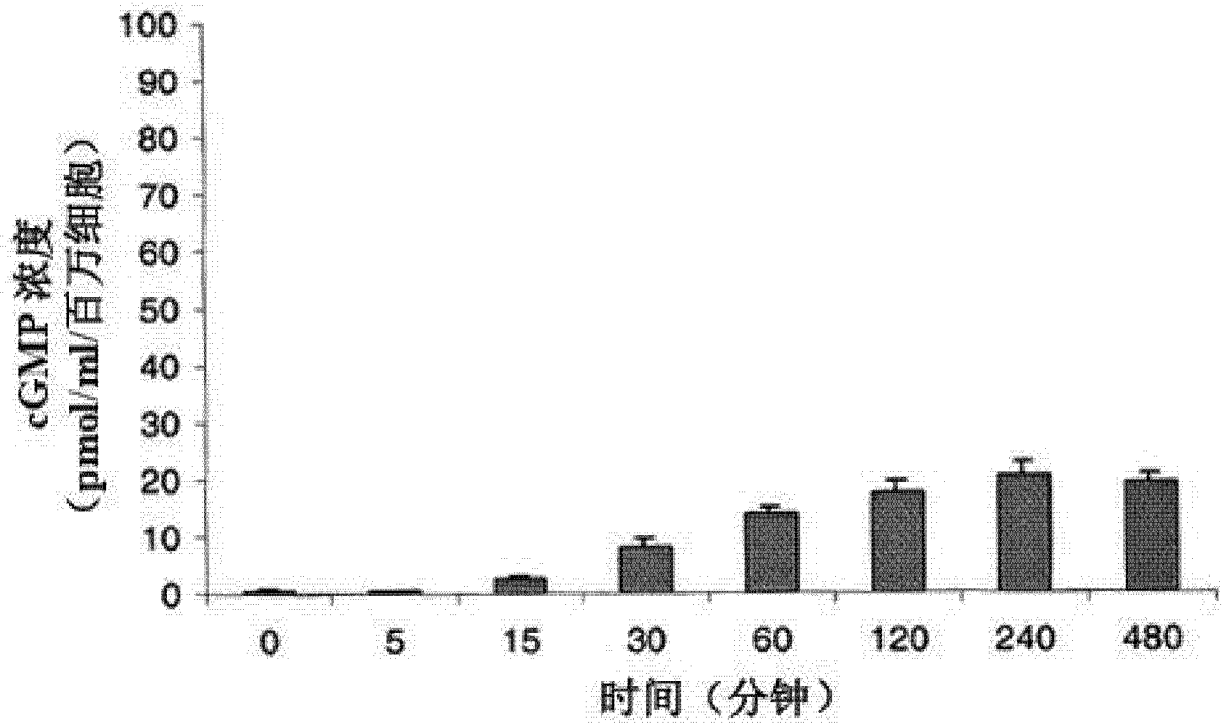


图 4

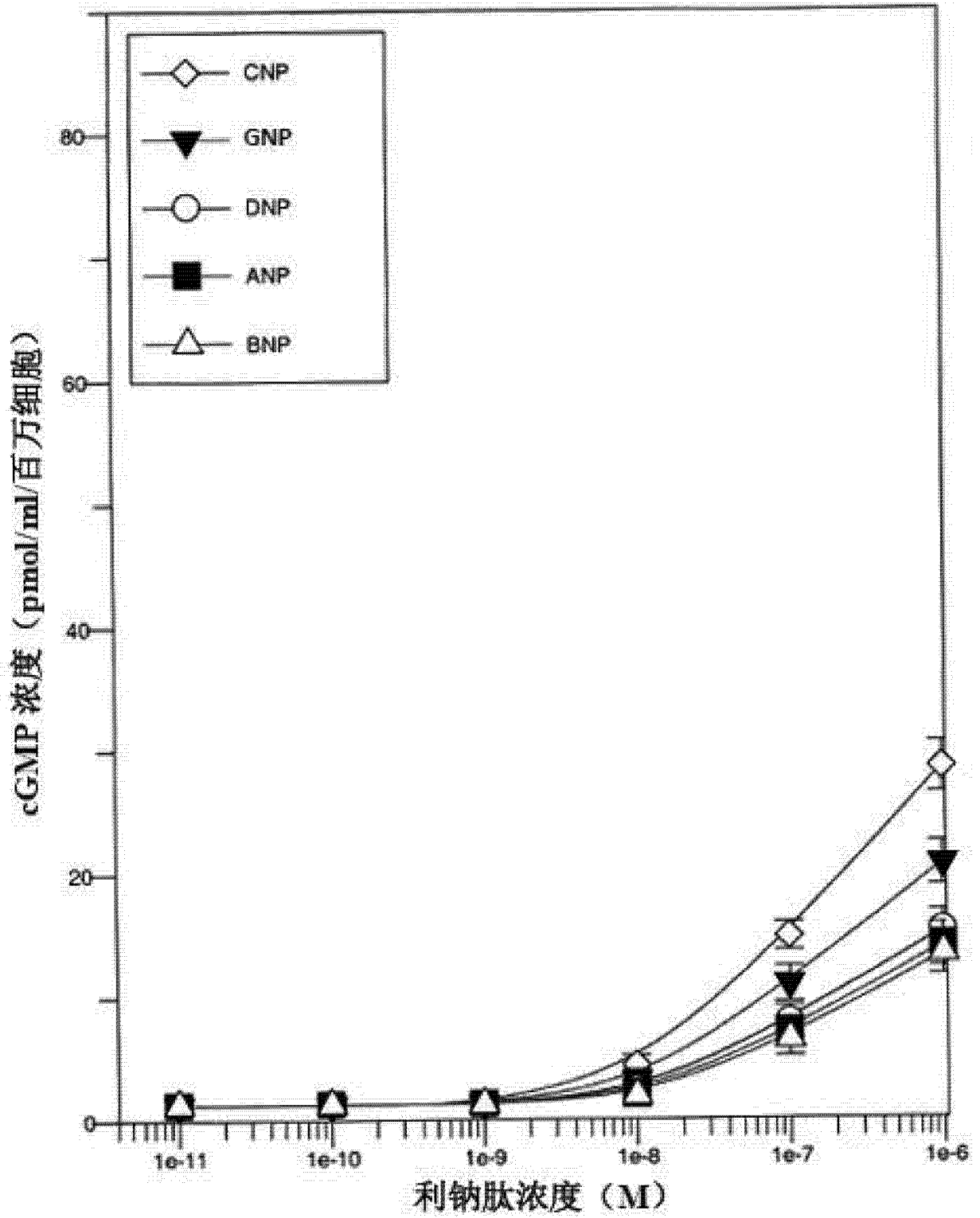


图 5

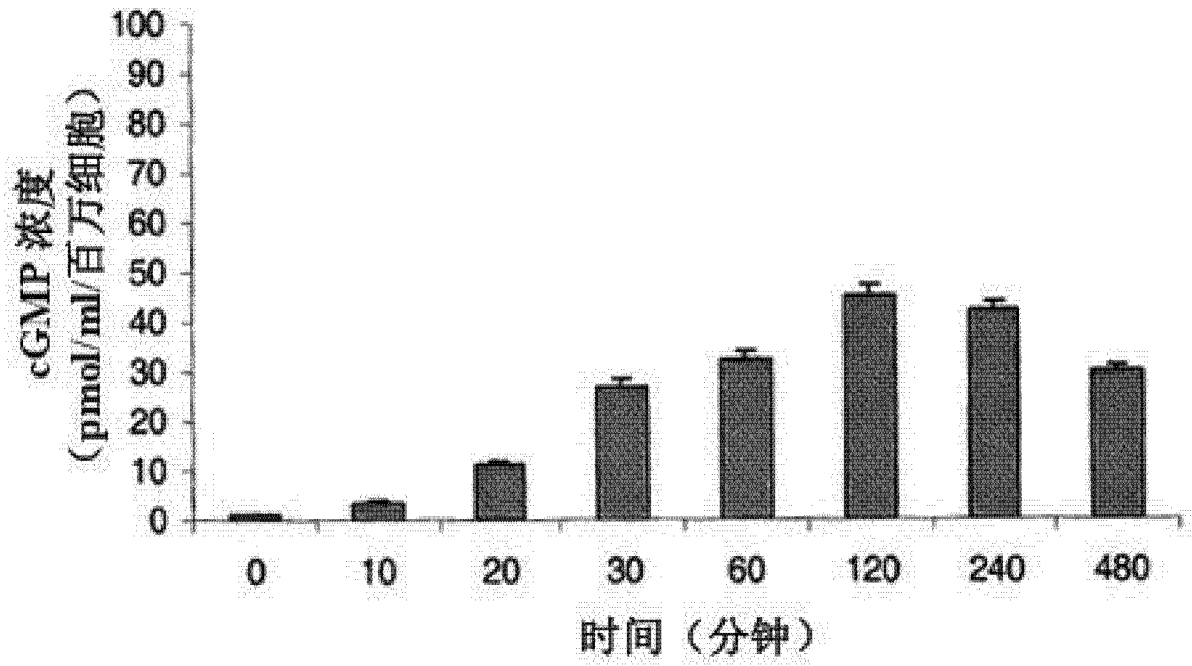


图 6A

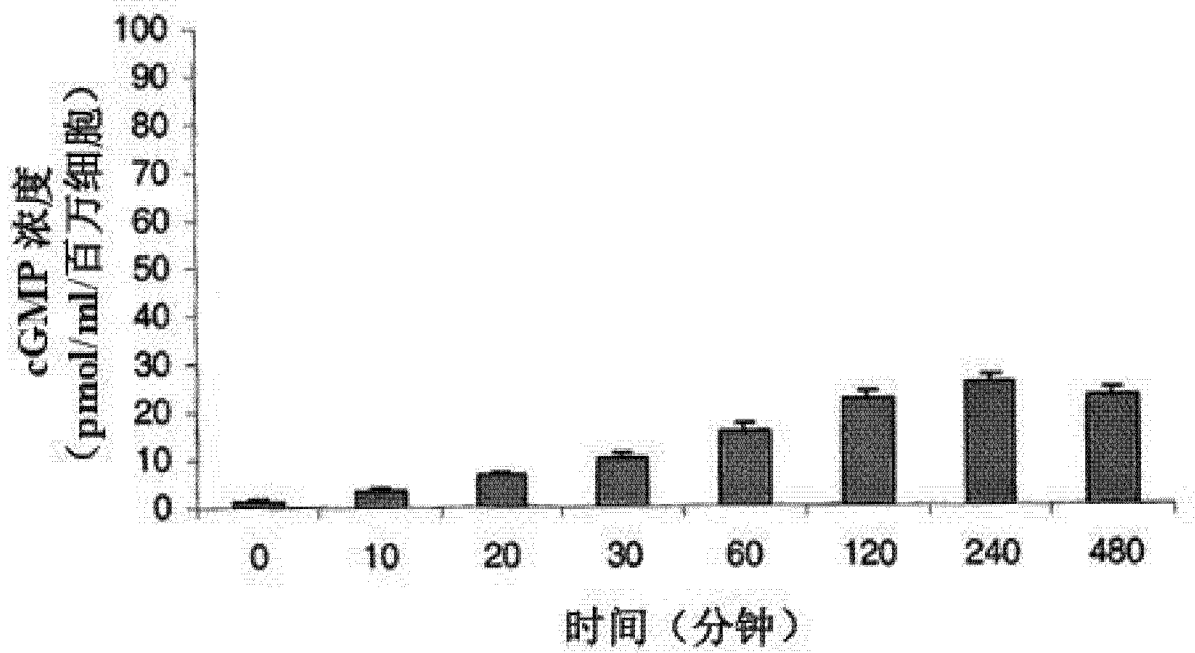


图 6B

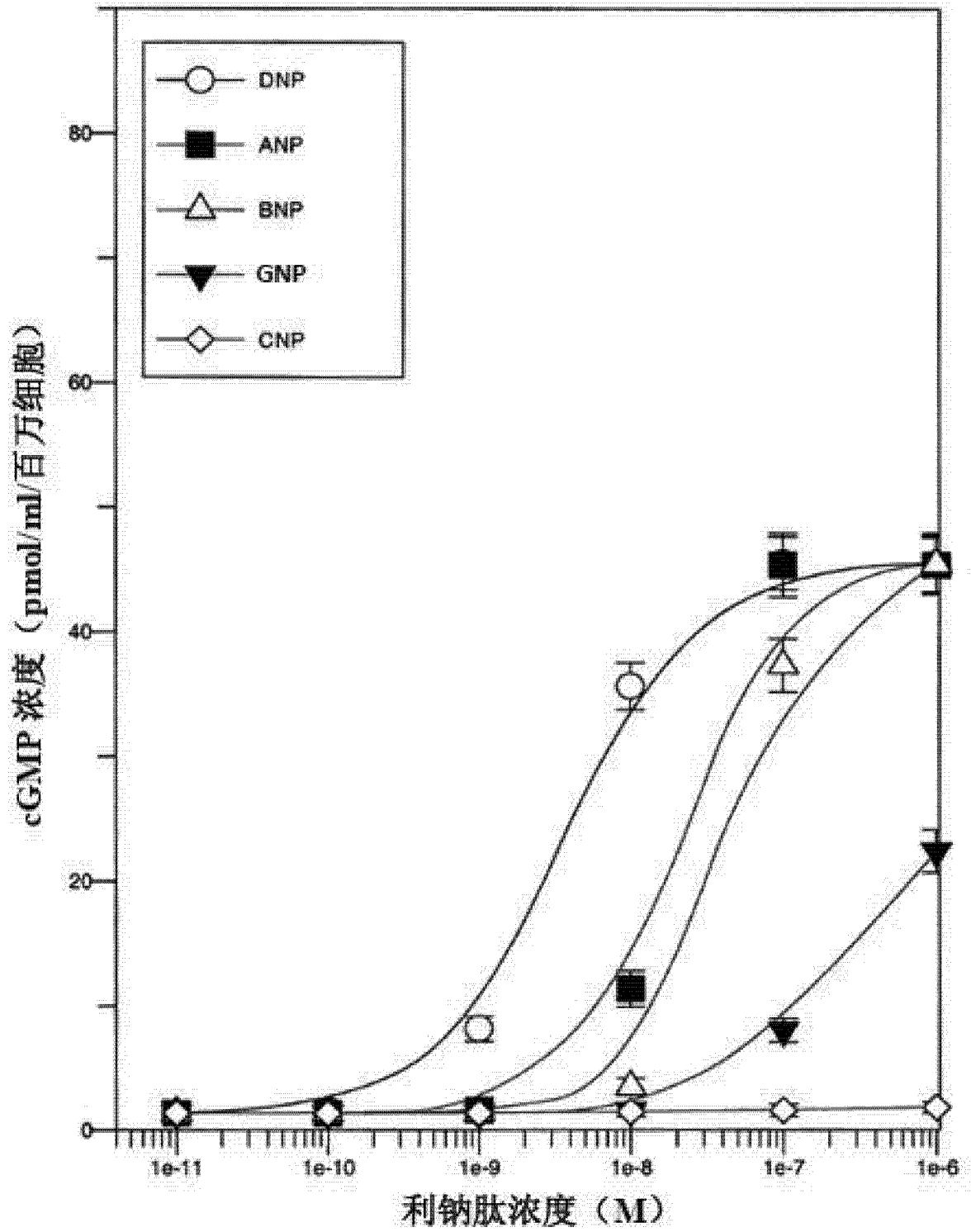


图 7

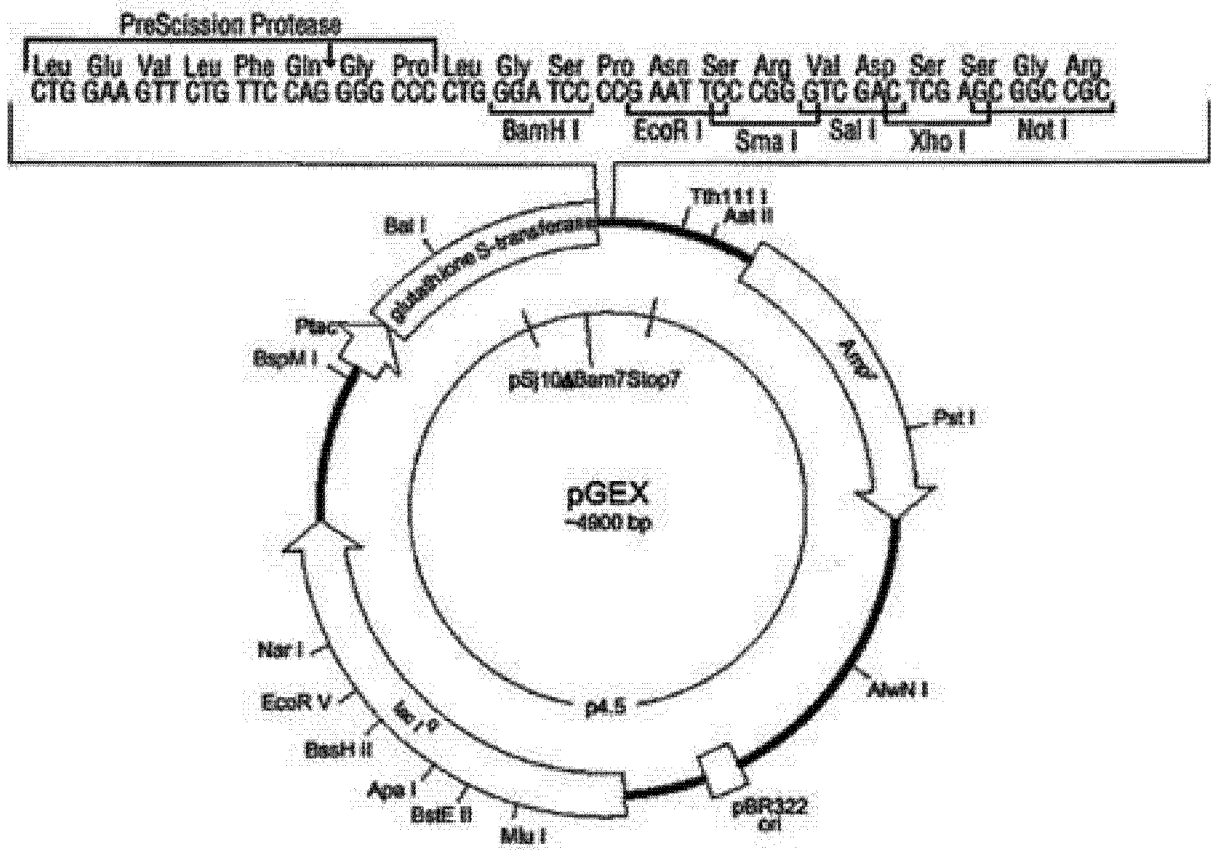


图 8



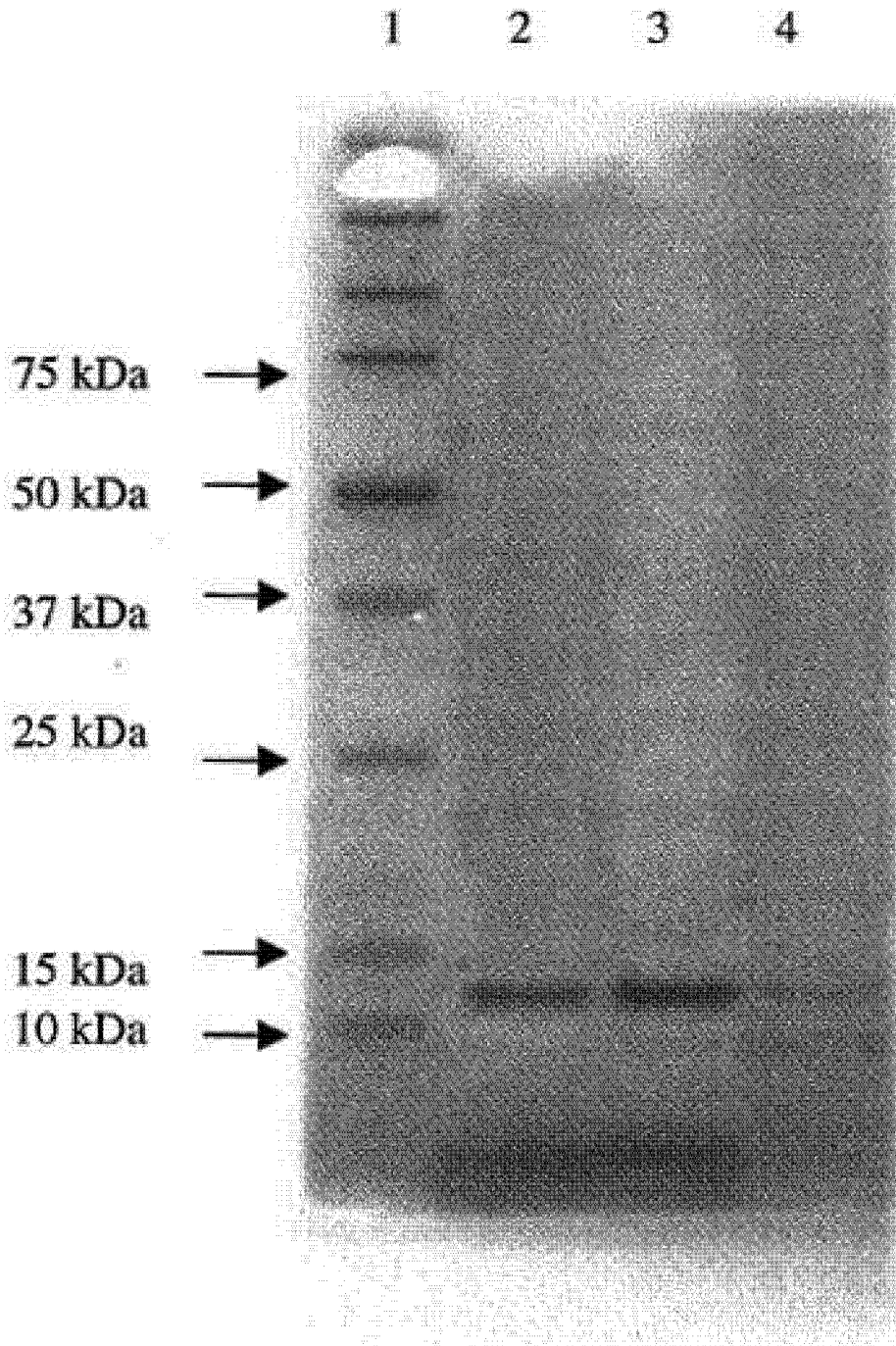


图 9