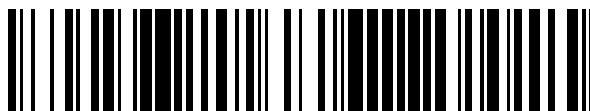


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 747**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013** **PCT/IB2013/058615**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14041526**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013** **E 13801742 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2895189**

54 Título: **Antagonistas peptídicos del receptor de vasopresina-2**

30 Prioridad:

17.09.2012 EP 12306120

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2018

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (20.0%)
Bâtiment "Le Ponant D", 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS (20.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%);
UNIVERSITÉ DE LIÈGE (20.0%) y
UNIVERSITY OF REGENSBURG (20.0%)**

72 Inventor/es:

**GILLES, NICOLAS;
SERVENT, DENIS;
QUINTON, LOÏC;
REINFRANK, HELEN;
WITZGALL, RALPH;
MOUILLAC, BERNARD y
MENDRE, CHRISTIANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 664 747 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas peptídicos del receptor de vasopresina-2

La presente invención se refiere a un grupo novedoso de inhibidores de proteasa básica de veneno de víbora que tienen actividad antagonista del receptor de vasopresina-2 que se pueden utilizar en terapia, diagnóstico, obtención de imágenes médicas, cribado e investigación de fármacos.

Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) constituyen la familia más grande de proteínas integrales de membrana. Se han identificado más de 800 GPCR, cuyos genes subyacentes representan 2 a 3% de las secuencias codificadoras en el genoma humano. Estos receptores participan en la regulación de la mayoría de funciones fisiológicas y son las dianas de aproximadamente 30% de los fármacos actualmente comercializados. Entre los GPCR, el subtipo V2 de receptor de arginina-vasopresina (también conocido como receptor de vasopresina-2, receptor de vasopresina 2, receptor de vasopresina tipo 2 o receptor V2 y abreviadamente AVPR2 o V2R) es considerado como un prototipo de receptores acoplados a la ruta de señalización de la adenosina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular. Este receptor representa un modelo fundamental y terapéutico.

La arginina-vasopresina (AVP), también conocida como hormona anti-diurética, es un péptido cíclico de 9 aminoácidos que se produce en el hipotálamo. Esta hormona ejerce su acción a través de 3 distintos subtipos de receptores: vasopresina 1a (V1aR), vasopresina 1b (V1bR) y vasopresina 2 (V2R). Las acciones de V1aR y V1bR son mediadas a través de sus interacciones con la proteína Gq, de la familia de las proteínas G, que lleva a un aumento en la concentración intracelular de calcio. El V1aR es expresado principalmente en el hígado, células de la musculatura lisa (vasoconstricción), plaquetas, cerebro, retina y órganos reproductores, mientras que el V1bR es expresado principalmente en la glándula pituitaria anterior en donde su estimulación controla el eje corticotrópico en respuesta al estrés. El V1bR también es expresado en el páncreas y glándulas suprarrenales en donde regula la secreción de glucagón, insulina y catecolaminas. El V2R está localizado en el conducto recolector renal en donde está acoplado a la proteína Gs. Las Gs activan la adenilato ciclasa lo que a su vez lleva a un aumento de la producción de AMP cíclico. El cAMP activa la proteína quinasa A la cual fosforila y activa los canales de agua llamados acuaporinas responsables de la reabsorción de agua en los riñones. El V2R también es expresado en el oído interior en donde regula su presión osmótica.

El V2R participa en la regulación de funciones fisiológicas principales y es una diana para el desarrollo de nuevos fármacos terapéuticos para tratar diversas patologías. Los antagonistas de V2R no peptídicos, llamados vaptanos, han sido desarrollados y analizados en numerosos ensayos clínicos, pero la mayoría de ellos no fueron aprobados por las autoridades sanitarias debido a su hepatotoxicidad. Hoy en día, solamente Tolvaptan (OPC-41061) y Conivaptan (YM-087), han sido aprobados por la FDA y/o EMEA.

Condiciones patológicas caracterizadas por hiponatremia eurolémica o hipervolémica

La secreción en exceso de AVP es un factor etiológico clave para enfermedades tales como hiponatremia y explica por qué el uso de antagonistas de V2R es tan eficiente en condiciones patológicas caracterizadas por hiponatremia eurolémica o hipervolémica, tales como SIADH (síndrome de secreción inapropiada de hormonas antidiuréticas), cirrosis hepática e insuficiencia cardíaca congestiva (CHF; Ghail *et al.*, *Cardiology*, 2008,111,147-157). El SIADH es ocasionado por la hipersecreción de AVP lo que lleva a una retención excesiva de agua y en consecuencia a una disminución en la concentración de Na⁺ y un edema en el pulmón y sistema nervioso central. Por sus efectos diuréticos los antagonistas de V2R aumentan o normalizan los niveles de Na⁺ en suero. Tolvaptan (OPC-41061) y Conivaptan (YM-087) han sido aprobados por la FDA y/o EMEA en pacientes diagnosticados con hiponatremia eurolémica e hipervolémica, SIADH, insuficiencia cardíaca congestiva y cirrosis (Arai *et al.*, *Curr Opin Pharmacol.*, 2007, 7, 124-129; Manning *et al.*, *Prog. Brain Res.*, 2008,170,473-412). Los antagonistas de V2R pueden ser potencialmente beneficiosos en otras condiciones patológicas caracterizadas por hiponatremia eurolémica o hipervolémica, tal como edema cerebral (Walcott *et al.*, *Neurotherapeutics*, 2012, 9, 65-72).

Síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada (NSIAD)

El NSIAD se debe a mutaciones de V2R, tales como R137C y R137L, que son responsables de una actividad constitutiva del receptor. Los pacientes presentan hiponatremia y una alta osmolalidad urinaria a pesar de bajos niveles de vasopresina sérica. Los antagonistas de V2R, Satavaptan y Tolvaptan, ya sea en cultivos celulares (Tenenbaum *et al.*, *PLoS One*, 2009, 4, e8333) o en pacientes con NSIAD (Decaux *et al.*, *JASN*, 2007, 18, 606-612) son incapaces de inhibir esta actividad constitutiva.

Diabetes insípida nefrogénica congénita (cNDI)

Esta enfermedad está asociada con mutaciones que inactivan el V2R. Los receptores deficientes son secuestrados dentro de la célula y no pueden ser alcanzados por la AVP circulante. Esto conduce a poliuria con deshidratación severa, en particular en niños. Los antagonistas de V2R (vaptanos) se comportan como los fármacos chaperonas, que son capaces de penetrar en la célula y pueden rescatar los receptores mutantes (Morello *et al.*, *J. Clin. Investigation*, 2000, 105, 887-895). En algunos casos esto permite que el receptor sea estimulado por AVP con el fin

de restaurar el efecto anti-diurético (Bernier *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, 17, 232-243; Robben *et al.*, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2007, 292, 253-260). Los vaptanos fueron analizados en ensayos clínicos pero la mayoría de ellos no fueron aprobados por la FDA debido a su hepatotoxicidad (Manning *et al.*, *Prog. Brain Res.*, 2008, 170, 473-512). Hoy en día, solamente el Tolvaptan ha sido aprobado por la FDA.

5 Enfermedad renal poliquística

La enfermedad renal poliquística se caracteriza por la aparición de numerosos quistes que finalmente llevan a insuficiencia renal en la etapa final en la mayoría de los pacientes. Los pacientes con mutaciones en los genes *PKD1* y *PKD2* son incapaces de concentrar la orina a pesar de tener una alta concentración de vasopresina en la sangre. Los tratamientos actuales disponibles para esta patología son diálisis o trasplante. Se demostró que los antagonistas del V2R desaceleran el curso de la enfermedad en diferentes modelos animales de enfermedad renal poliquística, dominante y recesiva, incluyendo el modelo de ratón *CD1^{pcy/pcy}* (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). El ratón *CD1^{pcy/pcy}* es un modelo para la enfermedad renal quística recesiva autosómica que es causada por una mutación sin sentido en el gen *NPHP3* que codifica la nefrocistina-3, una proteína implicada en el desarrollo y función tubular renal. Esta mutación lleva a la formación de quistes renales y a insuficiencia renal en la etapa final. Asimismo, los ensayos clínicos en fase III en pacientes con enfermedad renal poliquística dominante autosómica demostraron que el Tolvaptan administrado a pacientes durante 3 años disminuía la proliferación de células epiteliales de recubrimiento de quistes (Higashihara *et al.*, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2011, 6, 2499-2507).

Cáncer

Por interacción con arrestina la estimulación de V2R lleva a la activación de las rutas de señalización que implican cAMP y MAP quinasa favoreciendo de esta manera una respuesta proliferante. Por ejemplo, la inyección de AVP en la rata induce la proliferación de células epiteliales tubulares renales que puede ser inhibida por los antagonistas de V2R (Alonso *et al.*, *Endocrinology*, 2009, 150, 239-250). Asimismo, diuréticos tales como los antagonistas de V2R fueron capaces de inhibir la proliferación de células de cáncer renal (Bolignano *et al.*, *Urol. Oncol.*, 2010, 28, 642-647) y de células de cáncer pulmonar (Pequeux *et al.*, *Endocr. Relat. Cancer*, 2004, 11, 871-885). Estos resultados indican que los antagonistas de V2R son buenos candidatos terapéuticos contra diferentes tipos de cáncer.

Trombosis

El factor de Von Willebrand (VWF) está implicado en la hemostasis primaria. Se ha demostrado que la AVP y también el agonista específico de V2R, dDAVP (minirin®), aumentan los niveles de VWF y del factor VIII a través de sus interacciones con V2R (Kaufmann *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2000, 106, 107-116). Un exceso en la coagulación puede llevar a trombosis (coágulos) que podría ser curada por el uso de antagonistas de V2R limitando de esta manera la secreción de factores de coagulación.

Enfermedad de Ménière

En Francia, se estima que la incidencia de la enfermedad de Ménière es de 1/13.300. Su patogénesis es en gran parte desconocida. La hinchazón endolinfática se considera una señal patognomónica. Esta enfermedad podría resultar ya sea de hipersecreción endolinfática o de reabsorción insuficiente. La patología de Ménière del oído interno parece ser el origen de síntomas tales como vértigo, náusea, acúfenos y pérdida de audición. Se cree que el aumento de presión en la cóclea comprende la capacidad de las células ciliares para detectar correctamente las ondas sonoras o los movimientos (Kitahara *et al.*, *J. Neuroendocrinol.*, 2008, 20, 1295-1300). En la actualidad, se utiliza el tratamiento con acetazolamida (diamox) que inhibe la anhidrasa carbónica y actúa como diurético hipocalémico. Al reducir la presión osmótica en el oído interno, el V2R se podría utilizar para tratar la enfermedad de Ménière.

Aunque los vaptanos han demostrado claramente el efecto terapéutico de los antagonistas de V2R sobre varias patologías, su uso terapéutico está limitado por algunas desventajas importantes:

- 45 - Los vaptanos son hepatotóxicos debido a su efecto inhibitor sobre el citocromo CYP3A4. Por esta razón, su uso necesita una monitorización estricta de los pacientes y su administración a largo plazo está limitada. Algunos de ellos solamente se inyectan por vía intravenosa que restringe su uso a pacientes hospitalizados.
- Los vaptanos tienen algo de selectividad solamente para V2R con índice de selectividad V2/V1a que varía de 112 (Satavaptan) a 0,15 (Conivaptan).
- 50 - Los vaptanos son agonistas para la activación de MAP quinasa. Por lo tanto, son incapaces de bloquear completamente las rutas de señalización específicas asociadas con V2R.
- Los vaptanos son muy poco solubles en soluciones tampones fisiológicas y tienen una biodisponibilidad limitada (Bernier *et al.*, *JASN*, 2006, 17,591-).

Por lo tanto, existe la necesidad de antagonistas de V2R novedosos con propiedades mejoradas para uso

terapéutico, particularmente con mayor selectividad para V2R y toxicidad reducida, en comparación con los antagonistas de V2R no peptídicos actualmente disponibles.

Los dominios de Kunitz son los dominios activos de los inhibidores de proteasa de tipo Kunitz. Estos dominios son relativamente pequeños con una longitud de aproximadamente 50 a 60 aminoácidos y una estructura que es un plegamiento alfa y beta rico en disulfuro. La mayoría de las secuencias que tienen este dominio pertenecen a la familia de los inhibidores de tripsina pancreática de Kunitz/bovino que incluye el inhibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI o inhibidor de proteasa básica) y muchos otros miembros, tales como los inhibidores de proteasa básica de veneno de víbora, tales como dendrotoxinas, inhibidores de inter-alfa-tripsina de mamífero, tripstatina, un dominio encontrado en una forma empalmada alternativamente de la proteína amiloide de Alzheimer, dominios en los extremos C terminales de las cadenas alfa-1 y alfa-3 de los colágenos de tipo VI y tipo VII, el precursor del inhibidor de la ruta del factor tisular y el inhibidor de proteasa STI de Kunitz contenido en la semilla de legumbres.

Las dendrotoxinas son un grupo de neurotoxinas aisladas del veneno de la mamba negra (*Dendroaspis polyepis polyepis*) y de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*) que son bloqueadores selectivos de subtipos particulares de canales de potasio controlados por voltaje en las neuronas, potenciando con ello la liberación de acetilcolina en las articulaciones neuromusculares. Debido a su alta potencia y selectividad para los canales de potasio, las dendrotoxinas representan agentes farmacológicos útiles para estudiar la estructura y función de estas proteínas de canales iónicos y para tratar enfermedades humanas (WO 2007/019267). Las dendrotoxinas son proteínas pequeñas que consisten en una sola cadena peptídica de menos de 100 aminoácidos, generalmente de aproximadamente 57-60 aminoácidos, que se pliega en la estructura de Kunitz, es decir, un plegamiento alfa y beta rico en disulfuro constituido por 3 puentes de disulfuro con la conectividad 1-6, 2-4, 3-5 y dispuestos para formar una lámina beta anti-paralela de doble cadena retorcida seguida por una hélice alfa (Berndt *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1993, 234, 735-750).

Los inventores han aislado una toxina novedosa del veneno de la mamba verde y han demostrado que esta toxina, denominada U-Da2a, que es un miembro de los inhibidores de proteasas básicas de veneno de víbora de la familia de inhibidores de tripsina pancreática de Kunitz/bovino, es un antagonista competitivo y selectivo de V2R. Los inventores también han descubierto que el resto de aminoácidos en las posiciones 15 a 18 de la secuencia de U-Da2a es esencial para la actividad antagonista competitiva de la U-Da2a para V2R y que otros inhibidores de proteasas básicas de veneno de víbora que tienen un resto similar en estas posiciones también son antagonistas del V2R, mientras que los inhibidores de proteasas básicas de veneno de víbora que no tienen este resto no son antagonistas de V2R. Estos resultados permiten definir un nuevo grupo de inhibidores de proteasas básicas de veneno de víbora que tienen actividad antagonista de V2R, que incluye dendrotoxinas novedosas y conocidas que tienen este resto específico de aminoácidos.

Como antagonistas peptídicos de V2R, las proteínas de este grupo de inhibidores de proteasas básicas de veneno de víbora se pueden utilizar para diversas aplicaciones, incluyendo terapia, diagnósticos, predicción de la respuesta al tratamiento, obtención de imágenes médicas, cribado e investigación de fármacos. En particular, estas proteínas proveen buenos candidatos terapéuticos para el tratamiento de patologías que implican las rutas de V2R, tales como hiponatremia y enfermedad renal poliquística.

Un aspecto de la invención se refiere a una proteína aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos (I) que es por lo menos 70% idéntica a los residuos 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1, y que comprende:

(i) un resto $X_1X_2X_3X_4$ en las posiciones 15 a 18 de la SEQ ID NO: 1, en la cual X_1 es una asparagina (N), X_2 es una glicina (G), X_3 y X_4 son aminoácidos hidrofóbicos,

(ii) uno a tres puentes de disulfuro entre dos residuos de cisteína, para uso como antagonista del receptor de vasopresina 2 (V2R) en el tratamiento de enfermedades que implican la ruta de V2R.

En la siguiente descripción, se utiliza el código estándar de aminoácidos de una letra. Los aminoácidos hidrofóbicos se refieren a M, W, F, A, V, L, I, Y y P.

La proteína para los diferentes usos de conformidad con la invención, que puede ser natural, recombinante o sintética, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos (I). La secuencia (I) es una toxina farmacológicamente activa que tiene actividad antagonista de V2R competitiva, denominada proteína, péptido o toxina. La proteína para los diferentes usos de conformidad con la invención tiene la estructura de tipo Kunitz típica de las dendrotoxinas, que es una lámina beta anti-paralela de doble cadena retorcida seguida por una hélice alfa, y comprende uno a tres puentes de disulfuro para estabilizar la proteína y contribuir a su conformación estructural.

Estas propiedades pueden ser verificadas fácilmente utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en los ejemplos de la presente solicitud.

La invención abarca el uso de una proteína que comprende o consiste en aminoácidos naturales (20 aminoácidos codificados por genes en una configuración L y/o D) unidos a través de un enlace peptídico, así como peptidomiméticos de dicha proteína en la que el o los aminoácidos y/o el(los) enlace(s) peptídico(s) han sido

reemplazados por análogos funcionales. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos además de dichos 20 aminoácidos codificados por genes. Una lista no limitativa de aminoácidos no codificados se provee en la Tabla 1A del documento US 2008/0234183.

La invención también abarca proteínas modificadas derivadas de las proteínas anteriores por introducción de cualquier modificación en uno o más residuos de aminoácidos, enlaces peptídicos, extremos N-terminales y/o C-terminales de la proteína, en tanto que se mantenga la actividad de antagonista de V2R en la proteína modificada. Estas modificaciones que se introducen en la proteína utilizando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, incluyen, de manera no limitativa: la sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido no proteinogénico (aminoácido D o análogo de aminoácido); la modificación del enlace peptídico, en particular con un enlace del tipo retro o retro-inverso o un enlace diferente del enlace peptídico; la ciclización, y la adición de un grupo químico a la cadena lateral o al extremo o extremos de la proteína, en particular para acoplar un agente de interés a la proteína de la invención. Estas modificaciones se pueden utilizar para marcar la proteína y para aumentar su afinidad para V2R, su biodisponibilidad y/o su estabilidad.

El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia comparada que son idénticos a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 1 después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr la máxima identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se determina después de conformidad con la siguiente fórmula: $\text{Porcentaje de identidad} = 100 \times [1 - (C/R)]$, en la que C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia SEQ ID NO: 1 y la secuencia comparada a lo largo de la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 (es decir, posiciones 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1), en la que constituye una diferencia; (i) cada aminoácido en la secuencia de referencia que no tiene un aminoácido alineado correspondiente en la secuencia comparada, (ii) cada espacio en la secuencia de referencia, y (iii) cada aminoácido alineado en la secuencia de referencia que es diferente de un aminoácido en la secuencia comparada; y R es el número de aminoácidos en la secuencia de referencia a lo largo de la longitud de la alineación con la secuencia comparada, siendo contado también como un aminoácido cualquier espacio creado en la secuencia de referencia.

La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático públicamente disponible, tal como BLAST (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-). Cuando se utiliza dicho programa informático, de preferencia se utilizan los parámetros predeterminados, por ejemplo, para penalización por espacio y penalización por extensión. Para secuencias de aminoácidos el programa BLASTP utiliza como predeterminada una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10.

Por ejemplo, la alineación de Blackelin-3 (SEQ ID NO: 5; 83 aminoácidos) con U-Da2a (SEQ ID NO: 1) presentada en la Figura 1B, muestra que a lo largo de la longitud de alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, es decir la longitud completa de SEQ ID NO: 1 (posiciones 1 a 57 de SEQ ID NO: 1), no hay espacio en la secuencia de referencia, no hay espacio en la secuencia comparada y 23 aminoácidos en la secuencia de referencia que son diferentes de la secuencia de aminoácidos alineada en la secuencia comparada. Por lo tanto, C = 23 y R = 57. El porcentaje de identidad = $100 \times [1 - (23/57)]$. Blackelin-3 comprende una secuencia de aminoácidos que es 60% idéntica a las posiciones 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida, la proteína comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos (I) que es por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los residuos 1 a 57 de SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida, la secuencia (I) comprende un resto $X_1X_2X_3X_4$ seleccionado del grupo que consiste en NGFF y NGLF.

En otra realización preferida, la secuencia (I) tiene hasta 100 aminoácidos, de manera más preferida aproximadamente 60 aminoácidos, y se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y una secuencia que difiere de la SEQ ID NO: 1 por deleciones y/o inserciones dispersadas de uno a cinco aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 y/o sustituciones y/o deleción(es) terminal(es) de 1 a 30, de preferencia de 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 aminoácidos.

La(s) deleción(es) y/o inserción(es) se eligen ventajosamente de: (i) una a cinco deleción(es)/inserción(es) de un solo aminoácido dispersadas en la SEQ ID NO: 1, y (ii) deleción(es) terminal(es) de 1 a 5 aminoácidos en uno o en ambos extremos de la SEQ ID NO: 1. De preferencia la(s) deleción(es) terminal(es) se elige(n) de una deleción N-terminal de 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos y/o una deleción C-terminal de 1 o 2 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La(s) sustitución(es) en la SEQ ID NO: 1 se elige(n) ventajosamente de 1 a 10, de preferencia 1 a 5 sustituciones conservadoras, es decir, sustituciones de un aminoácido por otro que tenga propiedades químicas o físicas similares (tamaño, carga o polaridad), lo cual por lo general no modifica las propiedades funcionales de la proteína. Más preferiblemente, dicha(s) sustitución(es) conservadora(s) se elige(n) dentro de uno de los siguientes cinco grupos: Grupo 1 - residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares (A, S, T, P, G); Grupo 2 - residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (D, N, E, Q); Grupo 3 - residuos polares, cargados positivamente (H, R, K); Grupo 4 - residuos grandes alifáticos, no polares (M, L, I, V, C); y Grupo 5 - residuos grandes, aromáticos (F, Y, W).

Los residuos de cisteína en las posiciones 5 y 55, 14 y 38, y/o 30 y 51 de la SEQ ID NO: 1 ventajosamente no están mutados.

De preferencia, la proteína comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a 5, una variante de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 que comprende una delección N-terminal de 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos y/o una delección C-terminal de 1 o 2 residuos de aminoácidos, y una variante de la SEQ ID NO: 5 o 6 que comprende una delección N-terminal de uno a treinta residuos de aminoácidos y/o una delección C-terminal de uno o dos residuos de aminoácidos. Los ejemplos de dichas proteínas preferidas son las SEQ ID NO: 11 a 13.

En otra realización preferida, la secuencia (I) comprende uno a tres (uno, dos o tres), de preferencia tres, puentes de disulfuro elegidos de los puentes de disulfuro entre C1 y C6, C2 y C4, C3 y C5, en los cuales C1 a C6 son cada uno un residuo de cisteína, numerado respectivamente desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal de dicha secuencia (I). Los ejemplos de dichas proteínas son las SEQ ID NO: 1 y 16, que comprenden tres y dos puentes de disulfuro, respectivamente. De preferencia, C1 está en las posiciones 1 a 31, más preferiblemente 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 (1, 2, 3, 4 o 5) de dicha secuencia (I) y está separada de C6 por 50 ± 2 aminoácidos; C2 y C4, C3 y C5 están separados por 25 ± 2 y 20 ± 2 aminoácidos, respectivamente. Más preferiblemente, C1 a C6 están en las posiciones 5, 14, 30, 38, 51 y 55, respectivamente de la SEQ ID NO: 1. Además, C1 y/o C6 son ventajosamente el primero y el último residuos, respectivamente de dicha proteína.

En otra realización preferida, la proteína es una proteína modificada que carece de los cuatro residuos N-terminales y los dos residuos C-terminales de la SEQ ID NO: 1, en donde la función NH_2 de C1 está químicamente bloqueada, por ejemplo por acetilación, y la función COOH de C6 también está químicamente bloqueada, por ejemplo por amidación. El péptido es un péptido cíclico, que se sabe es mucho más resistente a las exo-proteasas.

En otra realización preferida, la proteína es una proteína modificada en la que uno o más residuos de aminoácidos que actúan como diana para las endoproteasas están remplazados por sus formas D no naturales correspondientes. Por ejemplo, uno o más residuos de arginina y/o lisina que son dianas para tripsina pueden ser remplazados por sus formas no naturales correspondientes.

En otra realización preferida, la proteína es una proteína modificada, en la que uno o más puentes de disulfuro están remplazados por enlaces no naturales. Preferiblemente, dicho enlace no natural es resistente a la reducción, tal como, por ejemplo, un enlazador de tiazolidina. Estos enlazadores aumentan la resistencia de la proteína de la invención a los agentes reductores presentes en los fluidos biológicos.

En otra realización preferida, la proteína es una proteína de fusión o proteína quimérica, que comprende una secuencia (II) fusionada a un extremo de la secuencia (I) y, opcionalmente, otra secuencia (III) fusionada al otro extremo de dicha secuencia (I). La longitud de la proteína no es crítica para la invención en tanto que se mantenga la actividad de antagonista de V2R. Las secuencias (II) y (III) comprenden uno o más de otros restos de proteína/péptido incluyendo los que permiten la purificación, detección, inmovilización y/o direccionamiento celular de la proteína de la invención y/o que aumentan la afinidad para V2R, la biodisponibilidad, la producción en sistemas de expresión y/o la estabilidad de dicha proteína. Estos restos se pueden seleccionar de: (i) un resto de marcaje tal como una proteína fluorescente (GFP y sus derivados, BFP e YFP), (ii) un resto informador tal como una etiqueta enzimática (luciferasa, fosfatasa alcalina, glutatión-S-transferasa (GST), β -galactosidasa), (iii) un resto de unión tal como una etiqueta de epítipo (poliHis6, FLAG, HA, myc), un dominio de unión a DNA, un dominio de unión a hormonas, una etiqueta de poli-lisina para inmovilización sobre un soporte, (iii) un resto para estabilización tal como ZZ, DsBa y DsBb, y (iv) un resto de direccionamiento para dirigir la proteína quimérica hacia un tipo celular o compartimiento celular específico. Además, las secuencias (II) y/o (III) comprenden ventajosamente un enlazador que es lo suficientemente largo para evitar la inhibición de las interacciones entre la secuencia (I) y las secuencias (II) y/o (III). El enlazador también puede comprender un sitio de reconocimiento para una proteasa, por ejemplo, para eliminar las etiquetas de afinidad y los restos de estabilización de la proteína quimérica purificada de conformidad con la presente invención.

En otra realización preferida, la proteína está acoplada a un agente que aumenta su biodisponibilidad, y en particular reduce su eliminación por vía urinaria, tal como, por ejemplo, polietilenglicol.

La invención abarca el uso de un polinucleótido que codifica la proteína en forma expresable o un vector recombinante que comprende dicho polinucleótido. El polinucleótido que codifica la proteína en forma expresable se refiere a una molécula de ácido nucleico que, después que se expresa en una célula o un sistema sin células, da como resultado una proteína funcional.

De conformidad con la invención, la proteína, el polinucleótido y/o el vector pueden estar incluidos en una composición farmacéutica, que comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica se formula para administración por varias vías incluyendo, pero sin limitación, vía oral, parenteral y local. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son los utilizados convencionalmente.

Además, la proteína se puede modificar ventajosamente utilizando medios bien conocidos por los expertos en la técnica, con el fin de cambiar sus propiedades fisiológicas, y en particular con el fin de mejorar su tiempo de semivida en el organismo (glicosilación: HAUBNER R. *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2001, 42, 326-36; conjugación con PEG:

KIM TH. *et al.*, *Biomaterials*, 2002, 23, 2311-7), su solubilidad (hibridación con albúmina: KOEHLER MF. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, 12, 2883-6), su resistencia a proteasas (aminoácidos no naturales (conformación D, por ejemplo)), y/o su absorción intestinal (Lien *et al.*, *TIB*, 2003, 21, 556-).

5 La composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína/polinucleótido/vector, por ejemplo, suficiente para mostrar beneficio al individuo al que se le administra. La dosis farmacéuticamente eficaz depende de la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero (humano o animal) que está siendo tratado, las características físicas del mamífero específico bajo consideración, los medicamentos concurrentes, y otros factores, que serán reconocidos por los expertos en las técnicas médicas.

10 La invención provee también un método para tratar un paciente que necesite tratamiento para una patología que implique la ruta de V2R, que comprende: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína, polinucleótido y/o vector.

15 Las patologías que implican la ruta de V2R incluyen, sin limitaciones: (i) condiciones patológicas caracterizadas por hiponatremia euvolémica o hipovolémica, tal como insuficiencia cardíaca congestiva (CHH), cirrosis, síndrome de secreción inapropiada de hormona anti-diurética (SIADH) y edema cerebral, (ii) síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada (NSIAD), (iii) diabetes insípida nefrogénica congénita (cNDI), (iv) enfermedad renal poliquística, (v) cánceres, incluyendo cánceres renales y de pulmón, (vi) trombosis y (vii) enfermedad de Ménière.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína como un reactivo para diagnóstico u obtención de imágenes que se puede aplicar en obtención de imágenes ópticas, obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) y tomografía por emisión de positrones (PET) para detectar V2R *in situ* (*in vitro* o *in vivo*) bajo condiciones fisiológicas o patológicas o en respuesta a un estímulo endógeno o exógeno, para propósitos de diagnóstico o investigación. La proteína también se utiliza como una herramienta para cribado de fármacos, para cribado de ligandos de V2R, incluyendo agonistas y antagonistas de V2R.

25 En una realización preferida, la proteína se acopla a un agente marcador que produce una señal detectable y/o cuantificable, en particular un agente radioactivo, magnético o luminiscente (radioluminiscente, quimioluminiscente, bioluminiscente, fluorescente o fosforescente). La proteína que se va a marcar puede ser marcada directamente o indirectamente, por medio de enlaces covalentes o no covalentes, utilizando métodos estándares de conjugación que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de agentes marcadores incluyen isótopos radioactivos, tales como tecnecio 99 (^{99}Tc), flúor 18 (^{18}F), tritio (^3H) y yodo (^{125}I); agentes luminiscentes, tales como AlexaFluor, FITC y cianina 3; agentes de contraste paramagnéticos, tales como compuestos de gadolinio, y agentes de contraste superparamagnéticos, tales como nanopartículas de óxido de hierro.

30 En una realización más preferida, la proteína marcada se une covalentemente a un agente radioactivo o fluorescente.

35 El acoplamiento covalente del agente marcador, por ejemplo un agente fluorescente o radioactivo, a la proteína se puede lograr: (i) incorporando el agente marcador en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína durante la síntesis química de la proteína, o (ii) incorporando un grupo reactivo (cisteína libre, biotina, resto azido) en una proteína recombinante o sintética, y después utilizando el grupo para enlazar covalentemente el agente marcador.

Preferiblemente, el agente marcador se une de forma covalente al extremo N-terminal o C-terminal de la proteína ya que los extremos de la proteína no están implicados en su unión a V2R.

40 Un objetivo de la presente invención es también el uso de la proteína, *in vitro*, para diagnosticar una patología que implique un aumento o disminución del nivel de expresión de V2R.

Otro objetivo de la presente invención es la proteína para uso, *in vivo*, para diagnosticar una patología que implique un aumento o disminución del nivel de expresión de V2R.

45 Para aplicaciones de diagnóstico, la proteína marcada se utiliza para visualizar la expresión de V2R, *in situ*, en un tejido de un paciente, y para evaluar su nivel de expresión en comparación con el mismo tipo de tejido proveniente de un individuo sano. La sobre-expresión de V2R es indicativa de una condición patológica, tal como cáncer, mientras que la sub-expresión de V2R es indicativa de una condición patológica, tal como diabetes insípida nefrogénica congénita (cNDI). Una vez que el diagnóstico ha sido establecido, es posible decidir un tratamiento eficaz para el paciente diagnosticado, incluyendo el uso de antagonistas de V2R, por ejemplo, para tratar cáncer o cNDI.

50 Un objetivo de la presente invención es también el uso de la proteína, como una herramienta de investigación para estudiar el V2R.

Otro objetivo de la presente invención es un método para detectar V2R, *in vitro* e *in vivo*, que comprende por lo menos las etapas de:

- poner las células que se han de analizar en contacto con la proteína marcada, y
- detectar las células marcadas.

El marcaje de las células es en particular marcaje fluorescente o marcaje magnético, detectable por cualquier método conocido por los expertos en la técnica (microscopía con fluorescencia, citometría de flujo, obtención de imágenes por resonancia magnética).

- 5 La detección de los receptores, *in vivo*, en el cuerpo de un mamífero (obtención de imágenes celulares), en particular en tiempo real, comprende una etapa previa a la administración de dicho péptido a dicho mamífero (inyección parenteral, administración oral).

Otro objetivo de la presente invención es el uso de la proteína para cribar ligandos de V2R.

Un objetivo de la presente invención es también un método para cribar ligandos de V2R, que comprende:

- 10 - incubar V2R con una molécula de ensayo y la proteína marcada, y
- medir la señal obtenida en presencia y ausencia de la molécula de ensayo, en donde una señal más baja en presencia de la molécula comparada con el control sin la molécula de ensayo indica que la molécula de ensayo es un ligando de V2R.

- 15 El efecto agonista, antagonista de los ligandos identificados sobre V2R se analiza después en células que expresan V2R utilizando ensayos farmacológicos que son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en los ejemplos de la presente solicitud.

Otro objetivo de la presente invención es el uso de la proteína como un agente de cristalización para producir cristales de V2R. Los cristales de V2R se analizan después por difracción de rayos X para determinar la estructura tridimensional del V2R.

- 20 Otro aspecto de la invención es una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos (I) que es por lo menos 70% idéntica a los residuos 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1 y comprende: (i) un resto $X_1X_2X_3X_4$ en las posiciones 15 a 18 de la SEQ ID NO: 1, en donde X_1 es una asparagina (N), X_2 es una glicina (G), X_3 y X_4 son aminoácidos hidrofóbicos, y (ii) por lo menos un puente de disulfuro entre dos residuos de cisteína, y en donde dicha proteína tiene actividad antagonista de V2R.

- 25 La proteína de la invención comprende la proteína de la SEQ ID NO: 1, denominada U-Da2a, proteína U-Da2a, péptido U-Da2a o toxina U-Da2a.

La proteína de la invención pertenece a un subgrupo del grupo de proteínas que se utiliza en la presente invención. Por lo tanto, la proteína de la invención tiene el plegamiento de Kunitz característico de los inhibidores de proteasas básicas de veneno de víbora y actividad antagonista de V2R. La proteína de la invención es una proteína natural, 30 recombinante o sintética que puede ser modificada, quimérica y/o marcada, como se explicó anteriormente para las proteínas utilizadas en la presente invención.

La proteína de la presente invención posee las siguientes características ventajosas diferentes de los antagonistas de V2R no peptídicos conocidos:

- 35 - es un ligando altamente selectivo del V2R con selectividad absoluta para el V2R frente a otros 150 GPCR y 8 canales iónicos cardíacos. Por ejemplo, U-Da2a tiene un índice de selectividad V2R/V1a que es superior a 10.000. Una alta afinidad y fuerte selectividad combinadas pueden permitir reducir las dosis terapéuticas y por consiguiente los efectos colaterales secundarios,

- tiene afinidades nanomolares para el V2R,

- 40 - es el primer antagonista selectivo y competitivo que es capaz de bloquear las tres rutas de señalización principales del V2R, es decir, acumulación de cAMP, reclutamiento de arrestina y fosforilación de MAP quinasa, y por lo tanto puede llevar a una nueva clase de agentes terapéuticos,

- es capaz de llegar a la diana del V2R *in vivo* y de producir un efecto diurético fuerte sin ninguna toxicidad utilizando una dosis diaria saturante durante por lo menos 90 días,

- 45 - como péptido, muestra propiedades adicionales interesantes: sin toxicidad proveniente de los productos de degradación de péptido, una solubilidad en agua perfecta, no debe cruzar la barrera hemato-encefálica y por lo tanto no debe afectar a la función de los receptores en el sistema nervioso central, y es una estructura química guía para la generación de herramientas de diagnóstico.

En una realización preferida, la proteína de la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos (I) que es por lo menos 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a los residuos 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1.

- 50 En otra realización preferida, la secuencia (I) tiene hasta 75 aminoácidos, de manera más preferida aproximadamente 60 aminoácidos, y se selecciona del grupo que consiste en la SED ID NO: 1 y una secuencia que difiere de la SEQ ID NO: 1 por la delección, inserción y/o sustitución de 1 a 15, preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 5 aminoácidos.

La(s) deleción(es) y/o inserción(es) se eligen ventajosamente de: (i) una a cinco deleción(es)/inserción(es) de un solo aminoácido individual dispersadas en la SEQ ID NO: 1, y (ii) deleción(es) terminal(es) de 1 a 5 aminoácidos en uno o en ambos extremos de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la(s) deleción(es) terminal(es) se elige(n) de una deleción N-terminal de 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos y/o una deleción C-terminal de 1 o 2 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La(s) sustitución(es) en la SEQ ID NO: 1 se elige(n) ventajosamente de 1 a 10, preferiblemente 1 a 5 sustituciones conservadoras. Los residuos de cisteína en las posiciones 5 y 55, 14 y 38 y/o 30 y 51 de la SEQ ID NO: 1 ventajosamente no están mutadas.

Preferiblemente, la proteína de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o una variante de la SEQ ID NO: 1 que comprende una deleción N-terminal de 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos y/o una deleción C-terminal de 1 o 2 residuos de aminoácidos. Los ejemplos de dichas proteínas preferidas son las SEQ ID NO: 11 a 13.

En otra realización preferida, la secuencia (I) comprende uno a tres (uno, dos o tres), de preferencia tres, puentes de disulfuro elegidos de los puentes de disulfuro entre C1 y C6, C2 y C4 y C3 y C5, en los cuales C1 a C6 son cada uno un residuo de cisteína, numerado respectivamente desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal de dicha secuencia (I). Los ejemplos de dichas proteínas son las SEQ ID NO: 1 y 16, que comprenden tres y dos puentes de disulfuro, respectivamente. De preferencia, C1 está en las posiciones 1 a 5 (1, 2, 3, 4 o 5) de dicha secuencia (I) y está separado de C6 por 50 ± 2 aminoácidos; C2 y C4, C3 y C5 están separados por 25 ± 2 y 20 ± 2 aminoácidos, respectivamente. Más preferiblemente, C1 a C6 están en las posiciones 5, 14, 30, 38, 51 y 55, respectivamente de la SEQ ID NO: 1. Además, C1 y/o C6 son ventajosamente el primer y el último residuos, respectivamente de dicha proteína.

Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una proteína de la invención. El polinucleótido sintético o recombinante puede ser DNA, RNA o una de sus combinaciones, ya sea de una sola cadena y/o de doble cadena. De preferencia, el polinucleótido comprende una secuencia codificadora que está optimizada para el hospedante en el que se expresa la proteína.

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector recombinante que comprende dicho polinucleótido. Preferiblemente, dicho vector recombinante es un vector de expresión capaz de expresar dicho polinucleótido cuando se transfecta o se transforma en una célula hospedante, tal como una célula de mamífero, bacteriana o fúngica. El polinucleótido se inserta en el vector de expresión en la orientación apropiada y en el marco de lectura correcto para su expresión. Preferiblemente, el polinucleótido está unido operativamente a por lo menos una secuencia reguladora de la transcripción y, opcionalmente a por lo menos una secuencia reguladora de la traducción. Los vectores recombinantes incluyen los vectores usuales utilizados en ingeniería genética y terapia de genes, incluyendo por ejemplo plásmidos y vectores virales.

Un aspecto adicional de la invención provee una célula hospedante transformada con dicho polinucleótido o vector recombinante.

El polinucleótido, vector y célula de la invención son útiles para la producción de la proteína de la invención utilizando técnicas de DNA recombinante bien conocidas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende por lo menos una proteína, polinucleótido y/o vector de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un aspecto adicional de la invención se refiere a una proteína, polinucleótido y/o vector de la invención como un medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un reactivo para diagnóstico que comprende una proteína de la invención, preferiblemente una proteína marcada.

La invención también provee un kit que comprende: (a) un envase que contiene uno o más de: una proteína, polinucleótido, vector recombinante, célula hospedante modificada, composición farmacéutica, reactivo para diagnóstico u obtención de imágenes de la invención, en solución o en forma liofilizada; (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución para reconstitución de la formulación liofilizada; (c) opcionalmente un tercer envase que contiene un receptor V2R aislado o célula hospedante capaz de expresar V2R en solución o en forma liofilizada, y opcionalmente instrucciones para el uso de la(s) solución(es) y/o la reconstitución y/o uso de la(s) formulación(es) liofilizada(s).

El V2R de conformidad con la invención es de cualquier mamífero. Preferiblemente es V2R humano.

El polinucleótido de conformidad con la invención se prepara por los métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, se produce por amplificación de una secuencia nucleica por PCR o RT-PCR, cribando genotecas de DNA genómico por hibridación con una sonda homóloga, o bien por síntesis química total o parcial. Los vectores recombinantes se construyen e introducen en células hospedantes utilizando los métodos convencionales de DNA recombinante e ingeniería genética, que son conocidos en la técnica.

- La proteína se prepara por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, en particular por síntesis en fase sólida o en fase líquida o por expresión de un DNA recombinante en un sistema celular apropiado (eucariota o procariota). Más específicamente, la proteína y sus derivados se pueden sintetizar en fase sólida, de conformidad con la técnica Fmoc, originalmente descrita por Merrifield et al. (*J. Am. Chem. Soc.* 1964, 85: 2149-), y
- 5 purificar por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; la proteína y sus derivados, también se pueden producir a partir de los cDNA correspondientes, obtenidos por cualesquiera medios conocidos por los expertos en la técnica; el cDNA se clona en un vector de expresión eucariota o procariota y la proteína producida en las células modificadas con el vector recombinante se purifica por cualesquiera medios apropiados, en particular por cromatografía de afinidad.
- 10 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, métodos convencionales que están dentro de la habilidad de la técnica. Dichos métodos son explicados detalladamente en la bibliografía.
- Además de las disposiciones anteriores la invención también comprende otras disposiciones que aparecerán en la siguiente descripción, que se refiere a realizaciones ilustrativas del objeto de la presente invención, con referencia a los dibujos anexos en que:
- 15 - La Figura 1 representa la alineación de la secuencia de U-Da2a con otras toxinas conocidas. **A:** Dendrotoxina-B (Dtx-B Ala 27 o Dtx-B-A27; SWISSPROT P00983.1; SEQ ID NO: 2); Dendrotoxina-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); Dendrotoxina-K (Dtx-K; SWISSPROT P00981.2; SEQ ID NO: 8); Alfa-Dendrotoxina (Alfa-Dtx; SWISSPROT P00980.1; SEQ ID NO: 9); inhibidor de tripsina pancreática de bovino (BPTI; SWISSPROT P00974.2; SEQ ID NO: 10). El porcentaje de identidad se indica a la derecha. **B:** Alineación de U-Da2a con Blackelin-3 que ilustra la determinación de identidad en porcentaje.
- 20 - La Figura 2 ilustra la inhibición de unión a ^3H -AVP por U-Da2a en los diferentes subtipos del receptor de vasopresina expresados en células eucariotas. (O) V1aR. (◇) V1bR. (■) V2R.
- La Figura 3 ilustra los efectos de la toxina U-Da2a sobre la producción de cAMP inducida por AVP en células CHO que expresan establemente V2R humano. **A:** Curvas de dosis-respuesta inducidas por AVP en el V2R en ausencia (•) o en presencia de concentraciones crecientes de U-Da2a: 20 nM (■); 60 nM (▲); 150 nM (O); 300 nM (□) y 500 nM (◆). **B:** Representación de Schild de los efectos de la toxina U-Da2a sobre la producción de cAMP inducida por concentraciones crecientes de AVP sobre el V2R. Estos datos acumulativos se obtienen a partir de 3 experimentos independientes.
- 25 - La Figura 4 ilustra el efecto de U-Da2a sobre la movilización de β -arrestina-1-YFP inducida por la acción de AVP sobre el receptor V2R-RLuc en células tsA. **A:** Curvas dosis-respuesta de AVP sobre el V2R en ausencia (•) o en presencia de concentraciones crecientes de U-Da2a: 100 nM (▲); 500 nM (■); 1 μM (▼); 5 μM (O) y 10 μM (Δ). **B:** Representación de Schild de los efectos de la toxina U-Da2a sobre la movilización de β -arrestina-1-YFP para el receptor V2-RLuc inducida por concentraciones crecientes de AVP. Estos datos acumulativos se obtienen a partir de 3 experimentos independientes.
- 30 - La Figura 5 ilustra el efecto de UDa-2a sobre la fosforilación de MAP quinasa inducida por la acción de AVP sobre el V2R en células tsA. **A:** Curvas de dosis-respuesta de AVP sobre el V2R en ausencia (•) o en presencia de concentraciones crecientes de U-Da2a: 0,6 μM (■); 1 μM (▲); 3 μM (◆); 6 μM (O); 10 μM (□); 30 μM (Δ) and 60 μM (◇). **B:** Representación de Schild de los efectos de la toxina U-Da2a sobre la fosforilación de MAP quinasa inducida por concentraciones crecientes de AVP para el receptor V2R. Estos datos acumulativos se obtienen a partir de 3 experimentos independientes.
- 35 - La Figura 6 ilustra el efecto diurético de la toxina U-Da2a en ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$. U-Da2a se inyectó por vía subcutánea e intraperitoneal a ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$ en una sola dosis de 1 $\mu\text{mol/kg}$. Después de la inyección, la orina se recogió durante 24 horas en jaulas metabólicas y se determinó el volumen de orina en el estado basal (recuadro blanco) y después de la inyección de U-Da2a (recuadro negro).
- 40 - La Figura 7 ilustra el efecto de osmolaridad de la toxina U-Da2a en ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$. U-Da2a se inyectó por vía subcutánea e intraperitoneal a ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$ en una sola dosis de 1 $\mu\text{mol/kg}$. Después de la inyección, la orina se recogió durante 24 horas en jaulas metabólicas y se midió la osmolaridad de la orina. Estado basal (recuadro blanco). U-Da2a (recuadro negro).
- 45 - La Figura 8 ilustra el efecto diurético de dosis crecientes de toxina U-Da2a por administración intraperitoneal a ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$. U-Da2a se inyectó por vía intraperitoneal a ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$ en dosis de 0,01 (recuadro blanco), 0,1 (recuadro gris) y 1 (recuadro negro) $\mu\text{mol/kg}$ los días 1, 3 y 5. La orina se recogió durante 24 horas después de la inyección en jaulas metabólicas y se determinó el volumen de orina.
- 50 - La Figura 9 ilustra el efecto de osmolaridad de dosis crecientes de toxina U-Da2a por administración intraperitoneal a ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$. U-Da2a se inyectó por vía intraperitoneal a ratones $\text{CD1}^{\text{pcy/pcy}}$ en dosis de 0,01 (recuadro blanco), 0,1 (recuadro gris) y 1 (recuadro negro) $\mu\text{mol/kg}$ los días 1, 3 y 5. La orina se recogió durante 24
- 55

horas después de la inyección en jaulas metabólicas y se determinó el volumen de orina.

- La Figura 10 ilustra el efecto diurético de U-Da2a en ratones CD1^{pcy/pcy} después de inyecciones i.p. diarias de U-Da2a a 0,1 µmol/kg hasta 99 días. Los días 0 (recuadro vacío), 30 (recuadro gris claro), 70 (recuadro gris oscuro) y 99 (recuadro negro), se recogió la orina durante 24 horas en jaulas metabólicas y se determinó el volumen de orina.

- La Figura 11 ilustra el efecto de osmolaridad de U-Da2a en ratones CD1^{pcy/pcy} después de inyecciones i.p. diarias de U-Da2a a 0,1 µmol/kg hasta 99 días. Los días 0 (recuadro vacío), 30 (recuadro gris claro), 70 (recuadro gris oscuro) y 99 (recuadro negro) días, se recolectó la orina durante 24 horas en jaulas metabólicas y se determinó la osmolaridad de la orina.

- La Figura 12 ilustra el efecto de U-Da2a sobre el peso del riñón en ratones CD1^{pcy/pcy} después de 99 días de inyecciones diarias i.p. de toxina a 0,1 µmol/kg, representando las relaciones peso del riñón/peso corporal, peso del riñón/peso del corazón y peso del corazón/peso corporal. Los ratones se fijaron por perfusión con paraformaldehído al 4%/1x solución salina tamponada con fosfato, se extirparon los riñones y corazones y se pesaron. Estado basal (recuadro blanco). U-Da2a (recuadro negro).

- La Figura 13 ilustra el efecto de U-Da2a sobre el número de quistes en ratones CD1^{pcy/pcy} después de 99 días de inyecciones diarias i.p. de toxina a 0,1 µmol/kg. Los ratones se fijaron por perfusión con paraformaldehído al 4%/1x solución salina tamponada con fosfato, se extirparon los riñones y se incrustaron en parafina. **A:** Cortes transversales de riñón se tiñeron con hematoxilina y eosina. **B:** El número de quistes se determinó utilizando el programa ImageJ y se relacionaron con el tamaño del corte llegando de esta manera al número relativo de quistes. U-Da2a (recuadro gris). Control (NaCl al 0,9%; recuadro negro).

- La Figura 14 ilustra la inhibición de unión a ³H-AVP por U-Da2a y variantes de U-Da2a sobre el subtipo del receptor V2 de vasopresina (V2R) expresado en células eucariotas. (•) AVP. (▲) U-Da2a WT. (□) U-Da2a-delta4-Nter. (◆) U-Da2a-delta2-Nter-delta2-Cter. (▼) U-Da2a-S3K. (○) U-Da2a-N15K, G16A.

- La Figura 15 ilustra la inhibición de unión a ³H-AVP por U-Da2a, Dtx-B-A27S, Dtx-K, DTx-E-R55 sobre el subtipo del receptor V2 de vasopresina (V2R) expresado en células eucariotas.

- La Figura 16 ilustra la inhibición de unión de ³H-AVP sobre V2R por U-Da2a WT (círculo blanco) y U-Da2a C14S,C38S (círculo negro). K_i de U-Da2a WT = 1,03 nM. K_i de U-Da2a C14S,C38S = 6200 nM.

Ejemplo 1. Preparación de U-Da2a y caracterización bioquímica

1) Materiales y métodos

a) Extracción y purificación de la proteína

Un gramo de veneno de *Dendroaspis angusticeps* (LATOXAN, Francia) se separó en 13 fracciones por intercambio iónico (2 x 15 cm) en Source 15S utilizando un gradiente de NaCl de etapas múltiples a 2 mL/min en un purificador Akta (PFIZER, Canadá). La fracción F se purificó adicionalmente por cromatografía en fase inversa (Waters 600) en una columna preparativa (C18, 15 µm, 20 cm, VYDAC, Francia, 20 mL/min), utilizando un gradiente lineal de 0 a 100% de acetonitrilo y ácido trifluoroacético al 0,1% en 100 minutos. La fracción D se purificó finalmente en una columna C18 Vydac (4,6 mm, 5 µm, 15 cm, 1 mL/min) utilizando un gradiente de acetonitrilo al 0,5%/minuto.

b) Caracterización bioquímica

Secuenciación de U-Da2a por degradación de Edman

La secuenciación N-terminal de U-Da2a (200 pmol cargada en un filtro revestido con Biobrene) se efectuó utilizando química de Edman en un secuenciador automático Procise Modelo 492 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.).

Secuenciación por MALDI-TOF con extinción en fuente

Se redujeron 15 µg de U-Da2a purificada con 2 µL de tris(carboxietil)fosfina 100 mM (SIGMA-ALDRICH, St Louis, EE.UU.) para eliminar los puentes de disulfuro. Después de 1 hora a 50°C, la mezcla se purificó en una microcolumna Zip-Tip C₁₈ (MILLIPORE, Billarica, MA, EE.UU.) de conformidad con el protocolo del fabricante. La elución de la toxina reducida se efectuó con 5 µL de acetonitrilo/ácido fórmico (ACN/FA) al 0,2% (50/50, v/v). Se utilizó 1,5-diaminonaftaleno (ACROS, Geel, Bélgica) saturado en acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1% 50/50 (v/v), como la matriz para los experimentos de extinción en fuente. Se mezclaron 1 µL de la solución de toxina y 1 µL de la matriz y se aplicaron como manchas en una placa de MALDI. La fragmentación con extinción en fuente (ISD) se registró con un espectrómetro de masas ULTRAFLEX II MALDI-TOF/TOF (BRUKER DALTONICS, Bremen, Alemania) equipado con un láser Smartbeam de Nd-YAG (MLN 202, LTB). Los espectros se adquirieron entre m/z 900 y 6500 con una potencia de láser ajustada a 55%.

Digestión, huella de la masa del péptido y caracterización C-ter de U-Da2a

300 ng de toxina purificada se disolvieron en 5 μ L de NH_4HCO_3 50 mM (pH 8). Después se añadieron 2 μ L de ditiotreitól (DTT) 250 mM para reducir todos los puentes de disulfuro (30 minutos a 56°C). Los grupos sulfhidrilo se alquilaron después con 2,2 μ L de yodoacetamida (IAA) 500 mM durante una hora, en la oscuridad, a temperatura ambiente. Tanto DTT como IAA se prepararon previamente en NH_4HCO_3 50 mM. Por último, se añadieron 10 ng de tripsina de bovino (relación 1/30) para digerir U-Da2a, durante 4 horas a 37°C. Los péptidos resultantes se desalaron en una microcolumna Zip-Tip C_{18} y se eluyeron con 10 μ L de ACN/FA al 0,2% (50/50, v/v). 1 μ L de esta muestra se aplicó como mancha sobre la placa de MALDI y se mezcló con 1 μ L de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB) utilizado como matriz. El análisis de los péptidos se hizo con el espectrómetro ULTRAFLEX II (véase lo indicado anteriormente). La huella de la masa del péptido se registró desde m/z 500 hasta 3600. Los experimentos de espectrometría de masas en tándem se realizaron utilizando tecnología LIFT-TOF/TOF (Detlev et al, Suckau, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376, 952-965).

Programa informático

Todos los datos se adquirieron gracias a Flex Control 3.0. Los espectros resultantes se analizaron con Biotools 3.2 y Sequence Editor 3.2. Los tres programas informáticos son de BRUKER DALTONICS.

c) Síntesis y procesamiento de la proteína

U-Da2a se sintetizó en un sintetizador de péptidos APPLIED BIOSYSTEMS 433A (Foster City, CA, EE.UU.), se purificó y plegó de conformidad con el método descrito para la toxina muscarínica MT1 (Mourier et al., *Mol Pharmacol*, 2003, 63, 26-35). Brevemente, esto implicó síntesis en fase sólida utilizando una estrategia Fmoc, escisión del péptido y purificación en una columna en fase inversa. El péptido lineal se plegó después durante 24 horas en presencia de glicerol (25%) y glutatión oxidado y reducido (1 mM) en solución tampón Tris a pH 8.

2) Resultados

La presencia de una toxina capaz de unirse a V2R se detectó por cribado de veneno extraído de la víbora *Dendroaspis angusticeps*. Una vez purificada, esta toxina se sometió a secuenciación utilizando dos procedimientos complementarios, degradación de Edman y fragmentación de masas, y se caracterizó bioquímicamente.

La toxina, denominada U-Da2a, es un péptido de 57 aminoácidos: RPSFCNLPVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCKGNANRFSTIEKCRRTC VG (SEQ ID NO: 1) con 3 puentes de disulfuro (Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys5) que pertenece a la familia estructural de Kunitz. Las secuencias más próximas corresponden a otras toxinas de víbora, tales como las dendrotoxinas E, B y K, Mulgin-1 y Blakelin-3 (Figura 1). Estas dendrotoxinas tienen la propiedad de bloquear los canales de potasio dependientes de voltaje.

La síntesis de péptidos en fase sólida permite la síntesis de cantidades grandes de U-Da2a con calidad GMP. El péptido sintético se procesó después con el fin de formar puentes de disulfuro. Este compuesto sintético que tiene las mismas propiedades farmacológicas que el producto natural se utilizó en todos los siguientes experimentos.

Ejemplo 2. Perfil de selectividad de U-Da2a**1) Materiales y métodos***1.1 Ensayos de unión con receptores de vasopresina*

Se adquirieron membranas de células que expresaban los receptores de vasopresina a PERKINELMER (Courtaboeuf, Francia). Los experimentos de unión se efectuaron con ^3H -AVP (PERKINELMER, Courtaboeuf, Francia) en placas de 96 pocillos. Las mezclas de reacción contenían Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl_2 10 mM y 1 g/L de BSA en un volumen final de 100 μ L. Las placas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Las reacciones de unión se detuvieron por filtración a través de un filtro GF/C pre-impregnado en polietilenimina al 0,5% en un recolector de células (PERKINELMER, Courtaboeuf, Francia) y se secaron las placas. Se añadió a cada pocillo Ultimagold O (25 μ L; PERKINELMER) y las muestras se contaron utilizando un contador TopCount (PERKINELMER, Courtaboeuf, Francia) (rendimiento del recuento 55%). La unión no específica se midió en presencia de AVP 1 μ M. Se ajustó una curva de acción de masas de inhibición de un sitio a los datos de unión de inhibición utilizando Kaleidagraph (SYNERGY SOFTWARE, Reading, PA, EE.UU.). Los valores de CI_{50} se convirtieron en K_i para los experimentos de competición utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng et al., *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 3099-3108).

1.2 Ensayos FLIPR

Se realizaron ensayos FLIPR para perfilar U-Da2a respecto a las actividades agonista y antagonista sobre diferentes receptores acoplados a la proteína G (GPCR).

Los valores del porcentaje de activación y el porcentaje de inhibición se determinaron en cada GPCR. Los valores

del porcentaje de activación se determinaron después de la adición inicial de 1 μM de U-Da2a. Asimismo, U-Da2a se incubó a 25°C durante 2 minutos antes de la determinación del porcentaje de inhibición. Los valores del porcentaje de inhibición se determinaron por adición de un agonista de referencia a una concentración estimada CE_{80} . Todos los pocillos se prepararon utilizando solución tampón de ensayo GPCRProfiler® de EMD Millipore. La solución tampón de ensayo GPCRProfiler® era una solución salina equilibrada de Hanks modificada (HBSS) en la que HBSS estaba suplementada para que contuviera HEPES 20 mM y Probenecid 2,5 mM a pH 7,4. El ensayo de agonista se realizó en un instrumento FLIPR^{TETRA} en el que se añadieron a la placa de ensayo U-Da2a, controles de vehículo, y Emax del agonista de referencia después que se estableció una línea base de fluorescencia. El ensayo de agonista duró un total de 180 segundos y se utilizó para evaluar la capacidad de cada compuesto para activar cada GPCR analizado. El ensayo de antagonista se efectuó utilizando valores de potencia de CE_{80} previamente determinados, todos los pocillos del compuesto de muestra pre-incubados (2 minutos) se enfrentaron a concentraciones CE_{80} del agonista de referencia después de establecer una línea base de fluorescencia. El ensayo de antagonista se realizó utilizando la misma placa de ensayo y el mismo aparato que se utilizaron para el ensayo del agonista. Todos los datos de la placa de ensayo se sometieron a las correcciones apropiadas de la línea base. Después que se aplicaron las correcciones de la línea base, se exportaron los máximos valores de fluorescencia y los datos se procesaron para calcular el porcentaje de activación (con respecto a los valores del agonista de referencia de Emax y controles de vehículo), el porcentaje de inhibición (con respecto a los valores de CE_{80} y controles de vehículo), y valores estadísticos adicionales (es decir Z' , porcentaje de variación entre valores de datos duplicados) para evaluar la calidad de cada placa. Cuando fueron rechazados los datos de la placa de ensayo, se realizaron experimentos adicionales.

1.3 Ensayos electrofisiológicos

Se efectuaron ensayos electrofisiológicos para analizar U-Da2a respecto a las actividades sobre los canales iónicos cardiacos (Nav1.5, Cav1.2, Kv4.3/KChIP2, Kv1.5, KCNQ1/mink, Kir2.1, hERG, HCN4) con las plataformas electrofisiológicas IonWorks Quattro e Ion Works HT (MOLECULAR DEVICES) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se preparó U-Da2a en agua a una concentración de 300 μM . La solución de reserva se transfirió a una placa maestra y a placas de ensayo en las que se colocaron 2 μL de la solución por pocillo. En el día del ensayo, se añadieron 198 μL de solución externa que contenía la concentración apropiada de DMSO y se mezclaron completamente. Esto proporcionó una dilución 1:100. Se produjo una dilución adicional 1:3 después de la adición a las células en la plataforma IonWorks, dando una dilución 1:300 en total. En cada placa de ensayo, se reservaron por lo menos 8 pocillos para control de vehículo (DMSO al 0,3%) y por lo menos 8 pocillos para cada control positivo específico para la línea celular analizada. Los controles positivos se analizaron a una concentración de bloqueo máxima y una concentración CI_{50} aproximada. Los compuestos utilizados para controles positivos fueron: Nav1.5 100 μM y Lidocaína 5mM, Kv4.3/KChIP2 20 μM y Quinidina 500 μM , Cav1.2 1 μM y Nitrendipino 100 μM , Kv 1.5 300 μM y 4-AP 10 mM, KCNQ 1/mink 10 μM y cromanol 293B 100 μM , hERG 0,1 μM y Cisaprida 1 μM , HCN4 50 μM y cesio 3mM, Kir2.1 20 μM y bario 500 μM .

2) Resultados

Se efectuaron ensayos de unión en equilibrio en los tres subtipos de receptores de vasopresina utilizando el ligando radio-marcado ³H-AVP. U-Da2a tiene una afinidad entre 2 y 5 nM para el V2R mientras que incluso a una concentración de 1 μM la toxina no inhibió la unión de ³H-AVP a V1aR y V1bR (Figura 2).

Se efectuaron ensayos FLIPR para determinar el perfil de U-Da2a respecto a actividades de agonista y antagonista en 157 GPCR: M1, M2, M3, M4, M5, A1, A2B, A3, alfa1A, alfa1B, alfa1D (D2-79), alfa2A, beta 1, beta 2, beta 3, C3aR, C5aR, AT1, APJ, BB1, BB2, BB3, Bradiquinina B2, CGPR1, CaS, CB1, CB2, ChemR23, CCR1, CCR10, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5 de macaco rhesus, 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, Receptor de Ghrelin, GIP, GLP-1, GLP-2, glucagón, receptor de secretina, 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, receptor de motilina, NMU1, NMU2, NPBW1/GPR7, Y2, Y4, NTR1, FPR1, FPRL1, GPR109A, Delta, Kappa, Mu, 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, PAR activados por Tripsina, PAR activados por Trombina, PTH1, PTH2, 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT4B, 5-HT6, SST2, SST3, SST4, SST5, GPR68/OGR1, SUCNR1/GPR91, NK1, NK2, NK3, TRH, GPR14, V1A, V1B, V2, isoforma larga de PAC1, VPAC1 y VPAC2. La actividad de U-Da2a se detectó únicamente en V2R, antagonizado en 69%, demostrando de esta manera la selectividad de U-Da2a para el receptor de V2R.

Se efectuaron ensayos electrofisiológicos para analizar las actividades U-Da2a sobre los canales iónicos cardiacos Nav1.5, Cav1.2, Kv4.3/KChIP2, Kv1.5, KCNQ1/mink, Kir2.1, hERG y HCN4. U-Da2a no parecía exhibir una inhibición significativa de cualquiera de los canales iónicos a una concentración de 1 μM . Estos resultados demuestran que U-Da2a tiene una actividad única sobre V2R que es diferente e inesperada de la actividad conocida de las dendrotoxinas sobre los canales iónicos cardiacos.

Ejemplo 3. Caracterización *in vitro* de los efectos farmacológicos de U-Da2a

1) Materiales y métodos

1.1. Efecto antagonista competitivo sobre la producción de cAMP inducida por la activación del V2R con vasopresina

Se sembraron en placas de 96 pocillos células CHO transfectadas establemente que expresaban el V2R humano (Cotte *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 29462-68; Phalipou *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 23316-23327). 24 horas después las células se estimularon 24 horas con concentraciones crecientes de AVP en un volumen de 50 µL de medio de incubación que contenía DMEM, BSA al 5% y RO 201724 0,1 mM (CALBIOCHEM N° 557502; MERCK-MILLIPORE), un inhibidor selectivo de fosfodiesterasa específica de cAMP, en ausencia (condición de control) o en presencia de concentraciones crecientes de U-Da2a (condiciones inhibitorias). La medición del cAMP se efectuó utilizando la tecnología de Transferencia de Energía de Resonancia con Fluorescencia Resuelta en Tiempo Homogéneo (HTRF®) desarrollada por CISBIO-INTERNATIONAL, utilizando el kit cAMP Dynamic 2 (CISBIO-INTERNATIONAL). Después de 30 minutos de estimulación a 37°C, las células se lisaron añadiendo al medio de incubación 50 µL de solución tampón para lisis. La solución tampón para lisis contenía cAMP marcado con un fluoróforo aceptor (cAMP-d2) que emite a 665 nm. Después se añadieron 50 µL de solución tampón para lisis que contenía un anticuerpo anti-cAMP marcado con un fluoróforo donador (Anti-cAMP kriptato de europio = AC-K) que emite a 620 nm. En ausencia de cAMP endógeno, la relación de FRET 665/620 es máxima entre cAMP-d2 y AC-K. Tan pronto como el cAMP endógeno es producido por las células después de la estimulación, compete con cAMP-d2 y disminuye la relación 665/620. La concentración de cAMP endógeno se determina por comparación entre la relación 665/620 experimental y una curva estándar establecida con concentraciones conocidas de cAMP. Estas mediciones se efectúan en un lector basado en láser HTRF® Rubystar con el programa informático Rubystar (BMG LABTECH).

1.2 Efecto antagonista competitivo de la toxina U-Da2a sobre la movilización de β-arrestina-1 después de la activación de V2R por vasopresina

Se sembraron en placas de 6 pocillos $2,5 \times 10^6$ células tsA, una línea celular de riñón humano transformada (HEK293) que expresa establemente un antígeno T de SV40 (ECACC) sensible a la temperatura, transfectado transitoriamente con 150 ng del plásmido de expresión pRK5 para hv2Rluc (PHARMINGEN N° 556104, BD BIOSCIENCE; Terrillon *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 2003, 17, 677-691) y con 1 µg de un plásmido de expresión para β-arrestina-1-YFP (β-arrestina clonada en pEYFP-N1 (CLONTECH); Scott *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 3552-3559). 48 horas después de la transfección, las células se lavaron con solución tampón de KREBS que contenía NaCl 146 mM, KCl 4,2 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, 1 mg/mL de glucosa y se volvieron a poner en suspensión en 1 mL de esta solución tampón. Las mediciones de Transferencia de Energía de Resonancia con Bioluminiscencia (BRET™) entre V2-Rluc y β-arrestina-1-YFP se efectuaron en placas de 96 pocillos con un volumen final de 50 µL que contenía 30 µL de suspensión de células (75.000 células), 10 µL de solución tampón de KREBS (condición de control) o la mezcla de ligandos que contenía cualquiera de las concentraciones crecientes de vasopresina (condición de control estimulada) o en presencia de concentraciones crecientes de toxina (condición estimulada con inhibidor). Después se añadieron a la mezcla 10 µL de Coelenterazina h (luciferina de *Renilla*; MOLECULAR PROBES C-6780, INVITROGEN, LIFE TECHNOLOGIES), el sustrato de luciferasa, y se incubó a 37°C antes que se efectuaran las mediciones de BRET en un luminómetro de microplacas (Mithras LB940 BERTHOLD TECHNOLOGIES) utilizando el programa informático MikroWin 2000 (MIKROTEK LABOR SYSTEME, GmbH).

1.3 Efecto antagonista competitivo de la toxina U-Da2a sobre la fosforilación de MAP quinasa después de la activación de V2R por AVP

Se sembraron 10×10^6 células tsA, una línea celular de riñón humano transformada (HEK293) que expresaba establemente un antígeno T de SV40 (ECACC) sensible a la temperatura, transfectado transitoriamente con 500 ng del plásmido de expresión pRK5 para V2R humano (PHARMINGEN N° 556104, BD BIOSCIENCE; Terrillon *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 2003, 17, 677-691) en placas de 96 pocillos recubiertos con poli-ornitina con 75.000 células por pocillo con medio DMEM que contenía suero al 10%. Ocho horas y veinticuatro horas después, las células se privaron de alimento con medio libre de suero y se estimularon otras veintisiete horas más tarde. Las células transfectadas se incubaron durante 10 minutos a 37°C con DMEM (condición de control) o con dosis crecientes de AVP (condición estimulada) o con una mezcla de AVP y toxina (condición estimulada con inhibidor). Después el medio se reemplazó con 50 µL de solución tampón para lisis del kit Cellul'ERK (CISBIO INTERNATIONAL) y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. En una placa de 384 pocillos, a 16 µL de células lisadas se añadieron primero 2 µL del anticuerpo contra ERK fosforilado marcado con el fluoróforo aceptor (AC-ERK-P-d2 que emite a 665 nm) y después 2 µL del anticuerpo contra ERK total marcado con fluoróforo donador (AC-ERK-K que emite a 620 nm). Cuando ocurre la fosforilación de ERK, el aceptor en proximidad cercana al donador puede emitir a 665 nm produciendo la señal FRET. El aumento en la relación 665/620 corresponde al aumento en la fosforilación de MAP quinasa. Dos horas después, se midió el RT-FRET en un lector basado en láser HTRF® Rubystar con el programa informático Rubystar (BMG LABTECH).

2) Resultados

La caracterización *in vitro* de los efectos farmacológicos de U-Da2a demuestra que U-Da2a puede inhibir la

producción de cAMP inducida por activación de V2R de forma competitiva con un coeficiente de Shild de $-0,91 \pm 0,02$, una K_{inact} de $12,0 \pm 0,4$ nM y una PA2 de $7,92 \pm 0,02$ (Figuras 3A y 3B). La U-Da2a también puede inhibir la movilización de β -arrestina-1-YFP en el receptor de hV2-RLuc de forma competitiva con un coeficiente de Shild de $-0,9 \pm 0,2$ y una K_{inact} de 110 ± 50 nM y una PA2 de $7,0 \pm 0,2$ (Figuras 4A y 4B). Por último, U-Da2a puede inhibir la fosforilación de MAP quinasa después de la estimulación con AVP del V2R de forma competitiva con un coeficiente de Shild de $-0,9 \pm 0,2$ y una K_{inact} de 210 ± 80 nM y una PA2 de $6,9 \pm 0,2$ (Figuras 5A y 5B). Estos ensayos celulares funcionales han demostrado las propiedades antagonistas competitivas de U-Da2a hacia las tres principales rutas de señalización del V2R, es decir, la acumulación de cAMP, el reclutamiento de arrestina y la fosforilación de MAP quinasa.

10 **Ejemplo 4: Caracterización *in vivo* de los efectos farmacológicos de U-Da2a**

1) Materiales y métodos

1.1 Experimento de dosis-respuesta

La toxina se disolvió en NaCl al 0,9 % a una concentración de 1 mg/mL. A ratones CD1^{pcy/pcy} adultos (Takahashi *et al*, *J. Urol.*, 1986, 135, 1280-1283, y *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1991, 1, 980-989 y Olbrich *et al*, *Nature Genetics*, 2003, 34, 455-459) y ratones C57BL/6 adultos se inyectaron por vía intraperitoneal y por vía subcutánea la toxina en dosis de 1, 0,1 y 0,01 μ mol de toxina/kg de peso corporal. Uno, tres y cinco días después de la primera inyección los ratones se mantuvieron durante 24 horas en jaulas metabólicas. La orina recogida se centrifugó durante 30 minutos a 14.000 rpm. La osmolaridad de la orina (mOs/kg) se determinó con un osmómetro Knauer, y se midió con una pipeta el volumen de la orina (μ L).

1.2 Experimento de administración a largo plazo

La toxina se disolvió en NaCl al 0,9% a una concentración de 1 mg/mL y se administró por vía intraperitoneal a ratones CD1^{pcy/pcy} adultos en una dosis de 0,1 μ mol/kg/día. Los días 0, 30, 70 y 99, la orina se recogió durante 24 horas en jaulas metabólicas y se determinaron el volumen de la orina y la osmolaridad de la orina.

2) Resultados

Se analizó *in vivo* el efecto de la toxina en la línea de ratón CD1^{pcy/pcy}, un modelo animal de enfermedad poliquística del riñón, en el cual se demostró previamente que los antagonistas de V2R inhibían la formación de quistes. Debido a que U-Da2a es un antagonista específico, selectivo y biodisponible de V2R que inhibe las tres rutas de señalización del V2R, esta toxina representa un fármaco terapéutico valioso contra la enfermedad poliquística del riñón.

En un primer conjunto de experimentos, la toxina se administró por vía intraperitoneal y por vía subcutánea a ratones CD1^{pcy/pcy}, en una dosis individual de 0,1 μ mol/kg. El volumen de la orina para ratones CD1^{pcy/pcy} en estado basal es muy bajo con una osmolaridad alta. Por el contrario, la inyección de U-Da2a i.p. o s.c. a 1 μ mol/kg lleva a un fuerte aumento en el volumen de la orina debido al efecto antagonista de la toxina sobre el V2R lo que lleva a un efecto diurético (Figura 6). El efecto diurético se correlacionó con una fuerte disminución de la osmolaridad (Figura 7), es decir, una disminución de la concentración de sal, debido al aumento del volumen de la orina. Estos resultados demuestran que U-Da2a puede alcanzar su diana *in vivo*, el V2R, ya sea por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. Por razones técnicas, se utilizó la ruta intraperitoneal bien tolerada en los siguientes ensayos.

En un segundo conjunto de experimentos, la toxina se administró por vía intraperitoneal a ratones CD1^{pcy/pcy}, en dosis de 1, 0,1 y 0,01 μ mol de toxina/kg de peso corporal. Se observó un efecto diurético dependiente de la dosis y una disminución de la osmolaridad de la orina después de la inyección de la toxina (Figuras 8 y 9, respectivamente). Una dosis de 0,1 μ mol/kg es suficiente para observar el efecto máximo de la toxina.

En un tercer conjunto de experimentos, la toxina se administró en una dosis de 0,1 μ mol/kg/día durante 99 días. El volumen de la orina y la osmolaridad de la orina se determinaron los días 0, 30, 70 y 99 (Figuras 10 y 11, respectivamente). Ningún efecto tóxico fue detectable después de inyecciones diarias a largo plazo de la toxina (99 días).

EJEMPLO 5: Ensayo clínico para analizar la eficacia de U-Da2a como agente terapéutico contra la formación de quistes en ratones pcy.

1) Materiales y métodos

La toxina se disolvió en NaCl al 0,9% en una concentración de 1 mg/mL. A ratones CD1^{pcy/pcy} de diez semanas de edad se inyectó por vía intraperitoneal la toxina en una dosis de 0,1 μ mol de toxina/kg de peso corporal/día durante 99 días. Después los ratones se fijaron por perfusión con paraformaldehído al 4%/1x solución salina tamponada con fosfato, se extirparon los riñones y corazones y se pesaron. Después, se calculó la relación peso del riñón o el peso del corazón/peso corporal y peso del riñón/peso del corazón para evaluar un efecto de la toxina sobre la formación de quistes. Los riñones se incrustaron en parafina. Los cortes transversales del riñón se tiñeron con hematoxilina y

eosina. Se determinó el número de quistes utilizando el programa ImageJ y se relacionó con el tamaño del corte llegando de esta manera al número relativo de quistes.

2) Resultados

La administración de U-Da2a en una dosis de 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ redujo el peso del riñón en ratones CD1^{pcy/pcy} (Figuras 12). Además, el análisis histológico del riñón demostró que el tratamiento con U-Da2a redujo significativamente el número de quistes (Figura 13).

EJEMPLO 6: Determinación de los residuos de aminoácidos de U-Da2a implicados en la actividad antagonista del V2R

1) Materiales y métodos

Las proteínas se prepararon utilizando los protocolos descritos para U-D2a en el Ejemplo 1 y los ensayos de unión a V2R se efectuaron tal como se describe en el Ejemplo 2.

2) Resultados

Se efectuaron ensayos de unión por competición en las siguientes variantes de U-Da2a y dendrotoxinas conocidas:

- una variante de U-Da2a que tenía una delección N-terminal de 4 residuos de aminoácidos (U-Da2a-delta4 N-ter, SEQ ID NO: 11),
- una variante de U-Da2a que tenía una delección N-terminal de 2 residuos de aminoácidos y una delección C-terminal de 2 residuos de aminoácidos (U-Da2a-delta2 N-ter/delta2 C-ter, SEQ ID NO: 12)
- una variante de U-Da2a que tenía la sustitución S3K (U-Da2a-S3K, SEQ ID NO: 15),
- una variante de U-Da2a que tenía las sustituciones N15K/G16A (U-Da2a-N15K, G16A, SEQ ID NO: 14),
- Dtx-B A27S (SEQ ID NO: 3)
- Dtx-K (SEQ ID NO: 8),
- DtxE R55 (SEQ ID NO: 7), y
- una variante de U-Da2a que tenía las sustituciones C14S y C38S (SEQ ID NO: 16).

Los resultados demuestran que las regiones N-terminal y C-terminal de U-Da2a no son requeridas para unirse a V2R y bloquear su actividad inhibiendo la unión de su ligando natural AVP debido a que las variantes de U-Da2a que tienen delecciones N-terminales y/o C-terminales o sustituciones en la región N-terminal exhiben afinidad similar sobre V2R que U-Da2a (Figura 14 y Tabla 1).

En contraste, los residuos N15 y G16 que se encuentran en posiciones homólogas respecto a las del sitio activo del inhibidor de tripsina pancreática básica (BPTI) pero que corresponden a diferentes aminoácidos (N15, G16 para U-Da2a frente a K15 y A16 en BPTI) son esenciales para unirse a V2R e inhibir su actividad debido a que la variante de U-Da2a con los residuos NG en las posiciones 15 y 16 reemplazados por los residuos K y A exhiben una afinidad 1000 veces menor para V2R (Figura 14 y Tabla I).

Tabla I: Afinidad de unión de los ligandos para V2R

Ligando	K _i (nM $\pm$ SEM)
AVP	1,44 $\pm$ 0,69
U-Da2a-WT	1,03 $\pm$ 0,34
U-Da2a-delta4 N-ter	1,57 $\pm$ 1,20
U-Da2a-delta2 N-ter/delta2 C-ter	3,23 $\pm$ 2,31
U-Da2a-S3K	1,29 $\pm$ 0,34
U-Da2a-N15K, G16A	8030 $\pm$ 1300

Estos resultados fueron confirmados por los ensayos de unión con dendrotoxinas que tenían diferentes residuos en las posiciones 15 y 16, lo que mostraba que DTX-E-R55 que tenía K y A en las posiciones 15 y 16, al igual que BPTI, no era capaz de bloquear V2R, incluso en concentraciones 100 veces más altas respecto a las requeridas para obtener una inhibición del 80% con U-D2a (Figura 15). Similarmente, no se obtuvo ninguna inhibición de V2R con DTX-K que tiene K y R en las posiciones 15 y 16. En contraste, Dtx-B A27S que tenía M y F en las posiciones 15 y 16, tenía capacidades de inhibición de V2R similares a las de U-D2a (Figura 15).

Estos resultados indican que el farmacóforo de U-Da2a está en una posición homóloga a la del sitio activo de BPTI, en el asa ubicada en la parte de la toxina opuesta a la definida por las regiones N-terminal y C-terminal. La actividad antagonista de V2R requiere NG o MF en las posiciones 15 y 16.

Se analizó la importancia de los puentes de disulfuro en la actividad de U-Da2a con la variante U-Da2a C14S, C38S,

5 que carece del segundo puente de disulfuro (entre C2 y C4). Este puente de disulfuro estaba eliminado con relación a la existencia de la toxina plegada de Kunitz única que poseía solamente dos puentes de disulfuro, la Conkunitzina-S1 (Número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot P0C1X2; SEQ ID NO: 17). Esta toxina carece del segundo puente, pero adopta el pliegue de Kunitz 3(10)-beta-beta-alfa canónico y exhibe una actividad sobre el canal de potasio (Buczek *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2006, 62, 980-90).

Los ensayos de unión sobre V2R muestran que la K_i de la U-Da2a de tipo natural es igual a 1,03 nM, mientras que la de la variante C14S,C38S es igual a 6200 nM (Figura 16). Estos resultados muestran que se mejora la actividad antagonista de V2R de la proteína de la invención cuando están presentes en la proteína 3 puentes de disulfuro (entre C1 y C6, C2 y C4 y C3 y C5).

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES

<120> ANTAGONISTAS PEPTÍDICOS DEL RECEPTOR DE VASOPRESINA 2

5

<130> 263EP518

<160> 17

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

15

<213> 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

20

<210> 2

<211> 57

<212> PRT

<213> Dendroaspis polylepis

25

<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

30

<212> PRT

<213> Dendroaspis polylepis

<400> 3

ES 2 664 747 T3

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> Pseudechis australis

<400> 4

Met Ser Ser Gly Gly Leu 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

<210> 5

<211> 83

<212> PRT

<213> Pseudechis australis

<400> 5

Met Ser Ser Gly Gly Leu 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> Dendroaspis polylepis
 5
 <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
 10
 <210> 7
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 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
 15
 <210> 8
 <211> 79
 <212> PRT
 20
 <213> Dendroaspis polylepis
 <400> 8
 Ser Gly His Leu 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
 25
 <210> 9
 <211> 59

ES 2 664 747 T3

<212> PRT

<213> 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

5 Thr Ile Glu Glu Cys Arg Arg Thr Cys Ile Gly
50 55

<210> 10

<211> 100

<212> PRT

10 <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

Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala Ile Gly Pro
85 90 95

15 Trp Glu Asn Leu
100

<210> 11

<211> 53

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

25 <400> 11

ES 2 664 747 T3

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> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<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> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<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> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<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

5 Glu Lys Cys Arg Arg Thr Cys Val Gly
50 55

<210> 15

<211> 57

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

15 <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

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

25

<400> 16

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

30 <211> 60

ES 2 664 747 T3

<212> PRT

<213> Conus striatus

<400> 17

```

5  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

```

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a los residuos 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1, y que comprende:
 - (i) un resto $X_1X_2X_3X_4$ en las posiciones 15 a 18 de la SEQ ID NO: 1, en donde X_1 es una asparagina (N), X_2 es una glicina (G), X_3 y X_4 son aminoácidos hidrofóbicos, y
 - (ii) uno a tres puentes de disulfuro entre dos residuos de cisteína, para uso como antagonista del receptor de vasopresina 2 (V2R) en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en condiciones patológicas caracterizadas por hiponatremia euvolémica o hipovolémica, síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada, diabetes insípida nefrogénica congénita, enfermedad renal poliquística, cánceres, trombosis y enfermedad de Ménière.
2. La proteína para uso en el tratamiento de enfermedades de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha proteína comprende o consiste en una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en: las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4 o 5, una variante de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección N-terminal de uno a cuatro residuos de aminoácidos y/o una delección C-terminal de uno o dos residuos de aminoácidos, y una variante de la SEQ ID NO: 5 que comprende una delección N-terminal de uno a treinta residuos de aminoácidos y/o una delección C-terminal de uno o dos residuos de aminoácidos.
3. Una proteína aislada de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso *in vivo* para diagnosticar una patología que implica un aumento o disminución en el nivel de expresión de V2R.
4. Uso de la proteína aislada de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, *in vitro*, para diagnosticar una patología que implica un aumento o disminución en el nivel de expresión de V2R.
5. Uso de la proteína aislada de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para cribar ligandos de V2R.
6. Uso de la proteína aislada de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, como agente de cristalización para producir cristales de V2R.
7. Una proteína aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70% idéntica a los residuos 1 a 57 de la SEQ ID NO: 1, y que comprende:
 - (i) un resto $X_1X_2X_3X_4$ en las posiciones 15 a 18 de la SEQ ID NO: 1, en donde X_1 es una asparagina (N), X_2 es una glicina (G), X_3 y X_4 son aminoácidos hidrofóbicos, y
 - (ii) uno a tres puentes de disulfuro entre dos residuos de cisteína, y en donde dicha proteína tiene actividad antagonista de V2R.
8. La proteína de conformidad con la reivindicación 7, en donde dicha secuencia comprende una delección N-terminal de uno a cuatro residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y/o una delección C-terminal de uno o dos residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
9. La proteína de conformidad con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde dicha secuencia comprende uno a tres puentes de disulfuro elegidos de puentes de disulfuro entre C1 y C6, C2 y C4 y C3 y C5, en donde C1 a C6 son cada uno un residuo de cisteína, numerados respectivamente desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal de dicha secuencia.
10. La proteína de conformidad con la reivindicación 9, en donde C1 a C6 están en las posiciones 5, 14, 30, 38, 51 y 55, respectivamente de la SEQ ID NO: 1.
11. La proteína de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende o consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y 11 a 13.
12. La proteína de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que está marcada.
13. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.
14. Una célula hospedante modificada con un polinucleótido que codifica una proteína de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o un vector de conformidad con la reivindicación 10.
15. Una composición farmacéutica, que comprende por lo menos: (i) una proteína de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, un polinucleótido que codifica dicha proteína y/o un vector que comprende dicho polinucleótido, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Un reactivo para diagnóstico o para obtención de imágenes que comprende una proteína marcada de conformidad con la reivindicación 12.

A

			% de identidad con SEQ ID NO: 1
U-Da2a	(SEQ ID NO: 1)	RPFCNLVVKPGPCNGFFSAFYYSQNTNKHSTYGGCKGNANRFTIEKCRRTCVG	100
Dtx-B/A27	(SEQ ID NO: 2)	RPYACELIVAAGPCNFFISAFYYSKGANKCYPTTYSGCRGNANRFTIEKCRRTCVV	67
Dtx-E/H55	(SEQ ID NO: 6)	LOHRTFCCLPAEPGCKASIPAFYYNAAKCKQLFHYGGCKGNANRFTIEKCRHACVG	63
Mulgin-1	(SEQ ID NO: 4)	KDRPRFCELPADPGPCNGLFOAFYYNVQVKCKLERYGGCKGNPNTFKTIECKRTCAA	61
Blackel-3	(SEQ ID NO: 5)	KDRPKFCELPADPGPCNGLFOAFYYNVQVKCKLERYGGCKGNPNTFKTIECKRTCAA	60
Dtx-K	(SEQ ID NO: 8)	AAKYCKLPLRIGPCRRKIPSFYKWKAKQCPLFDYSGCGGNANRFTIEKCRRTCVG	54
Alpha-Dtx	(SEQ ID NO: 9)	QPRRKLCILHRNPGRCYDKIPAFYYNQKKQCEERFDWSSCGGNSNRFKTIIEKCRTCIG	53
BPTI	(SEQ ID NO: 10)	RPDFCLEPPYTGPCKARIIRFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA	42

B

U-Da2a	1	RPFCNLVVKPGPCNGFFSAFYYSQNTNKHSTYGGCKGNANRFTIEKCRRTCVG	57
Blackel 3	27	RPFC LP PGPCNG F AFYY KC F YGGCK N N F TIE C R C RPKFCLELPADPGPCNGLFOAFYYNVQVKCKLERYGGCKGNPNTFKTIECKRTCAA	83

Identities = 34/57 (60%), Gaps = 0/57 (0%)

FIGURA 1

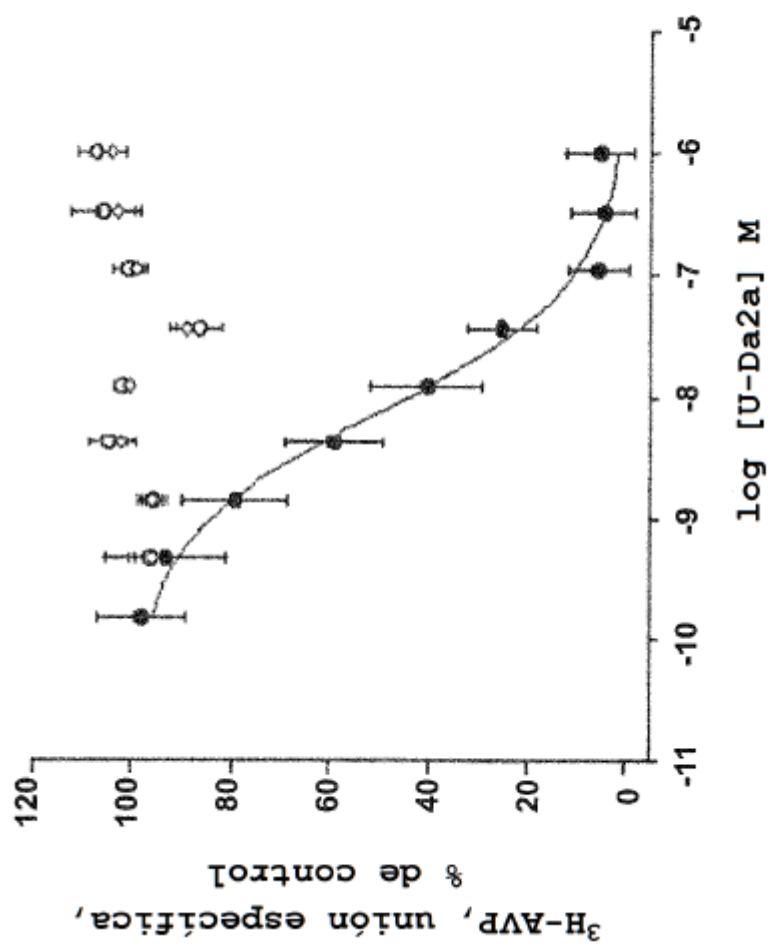


FIGURA 2

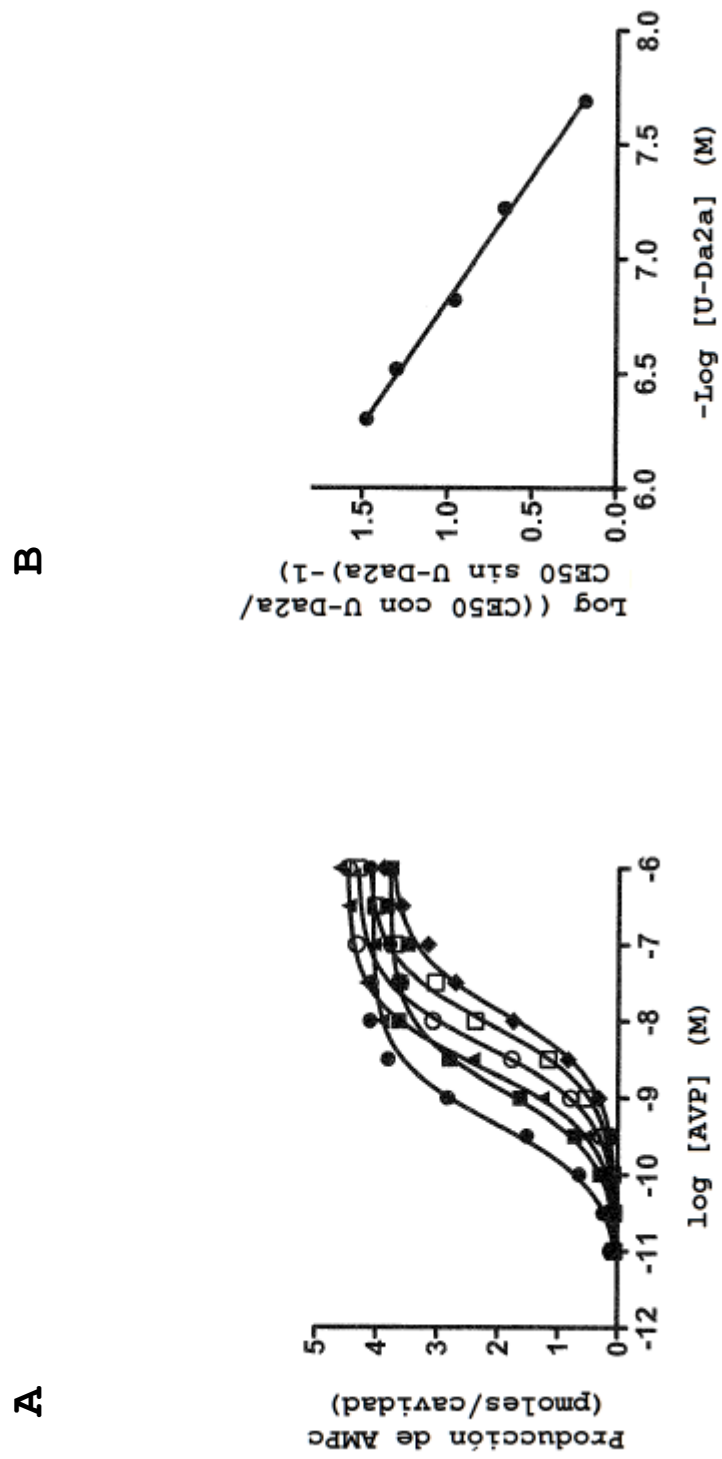


FIGURA 3

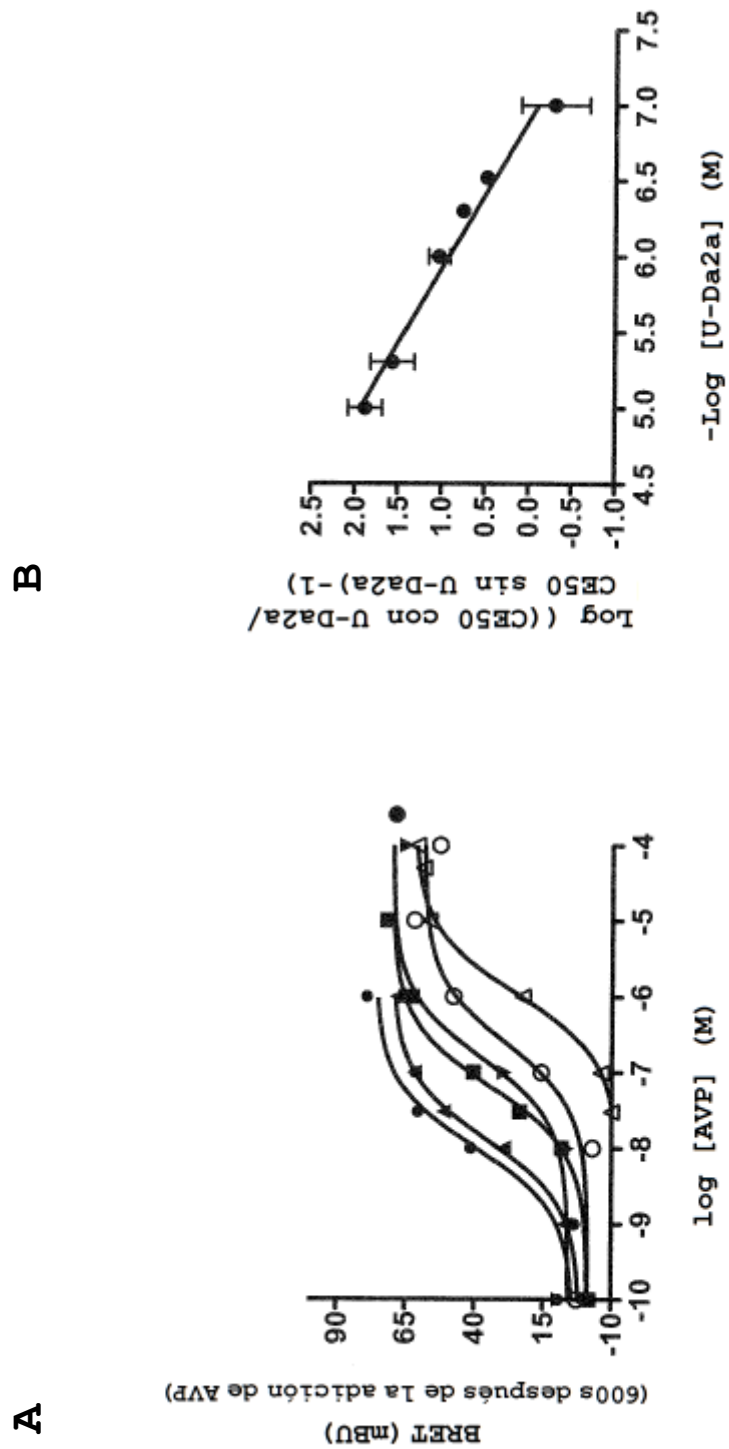


FIGURA 4

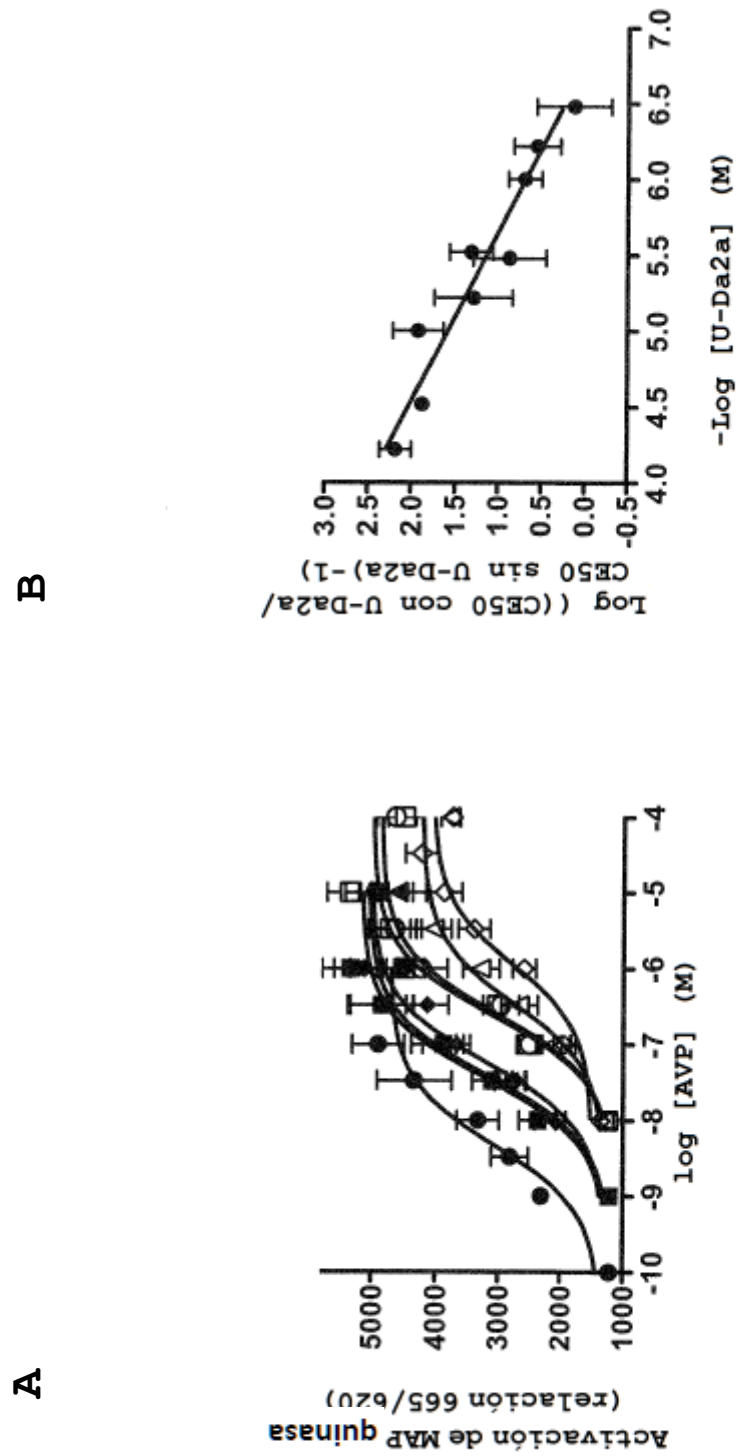


FIGURA 5

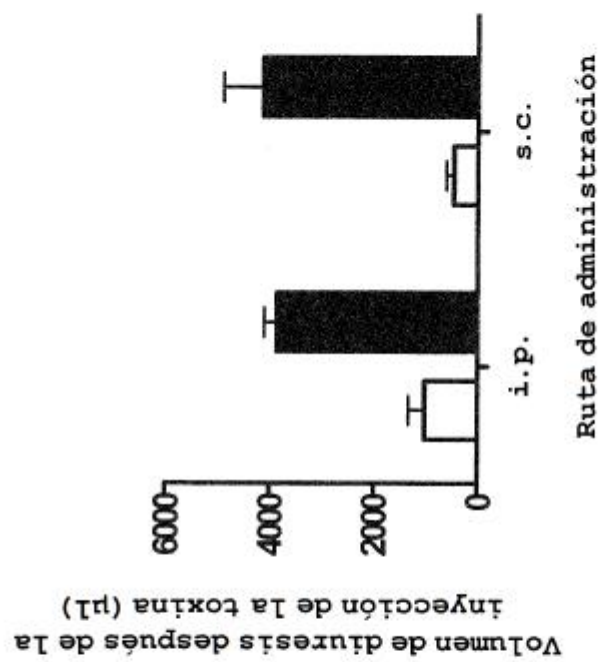


FIGURA 6

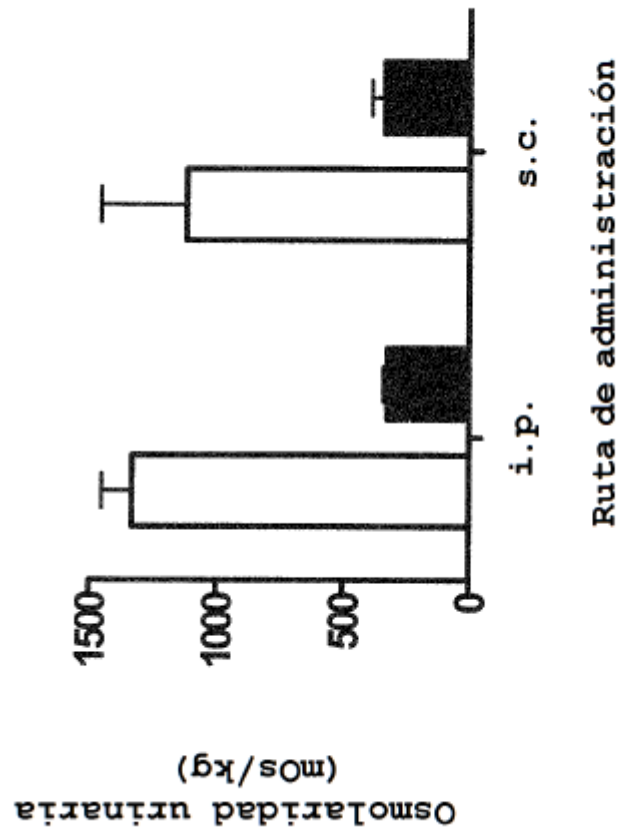


FIGURA 7

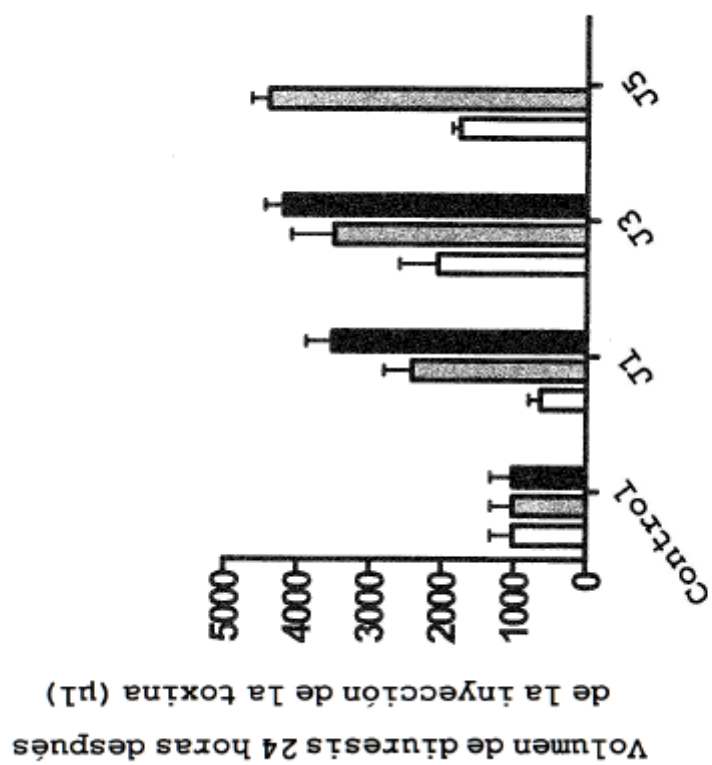


FIGURA 8

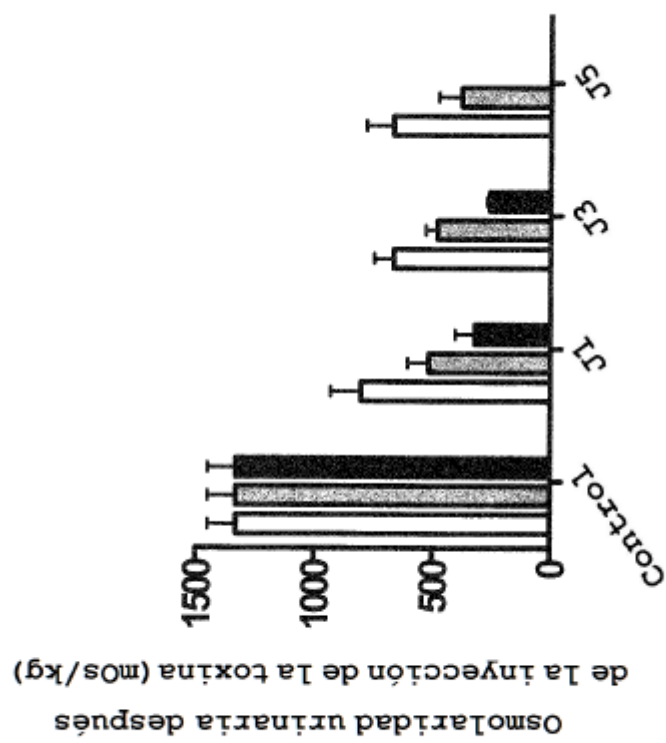


FIGURA 9

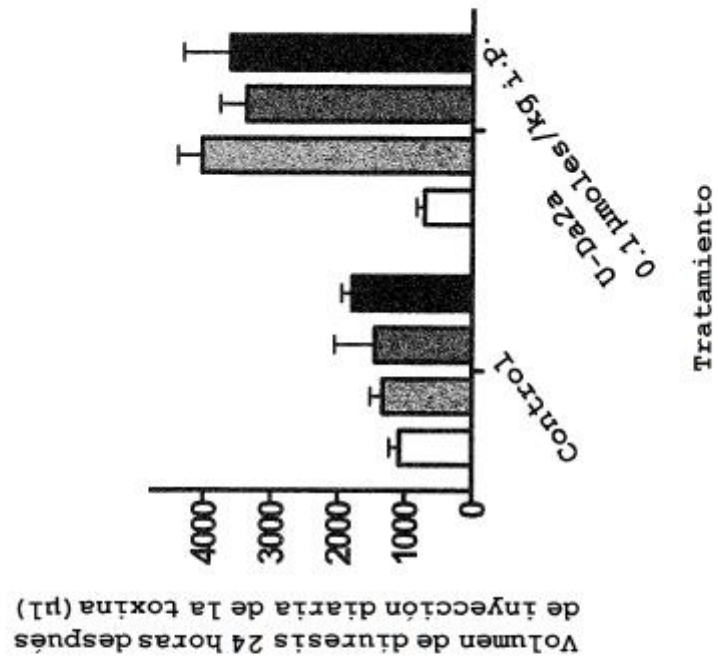


FIGURA 10

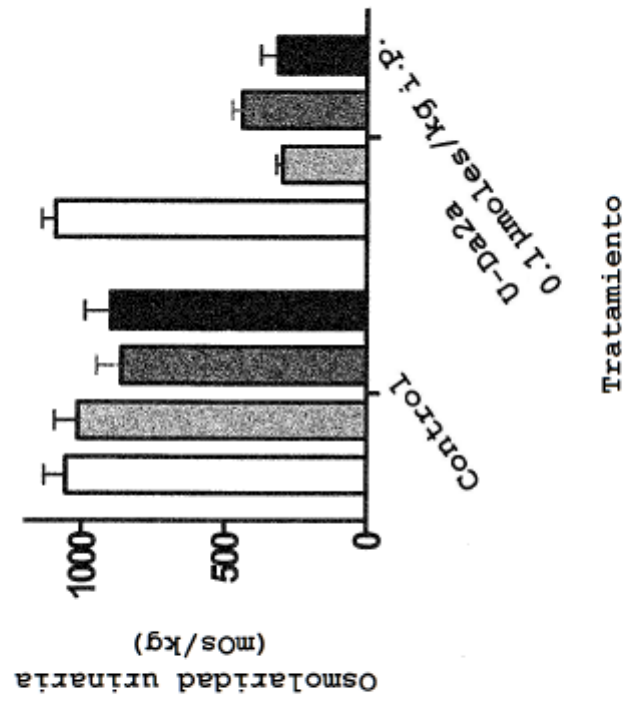


FIGURA 11

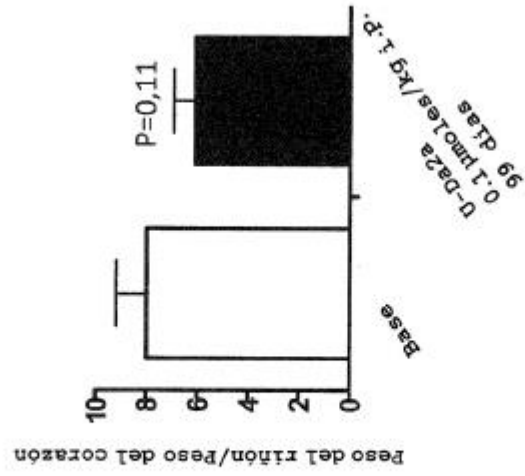
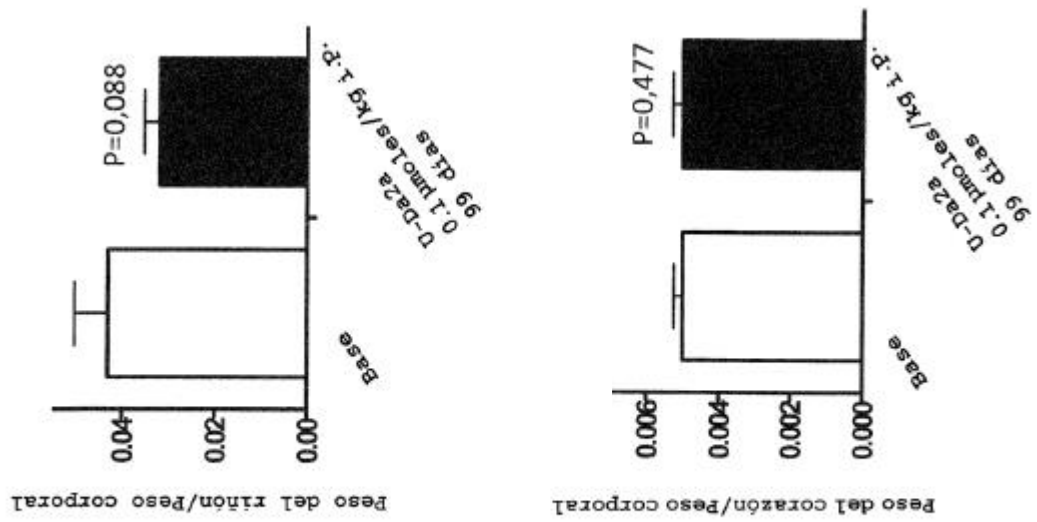
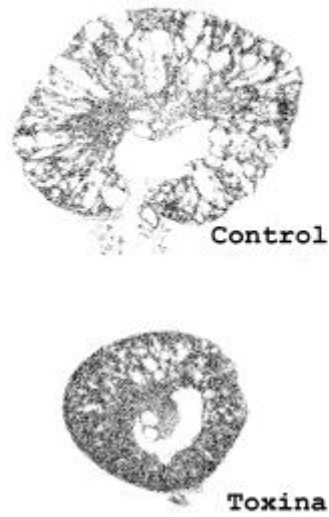


FIGURA 12

A



B

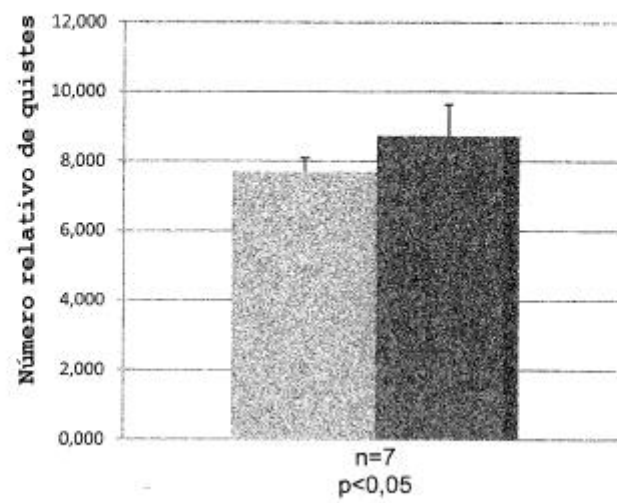


FIGURA 13

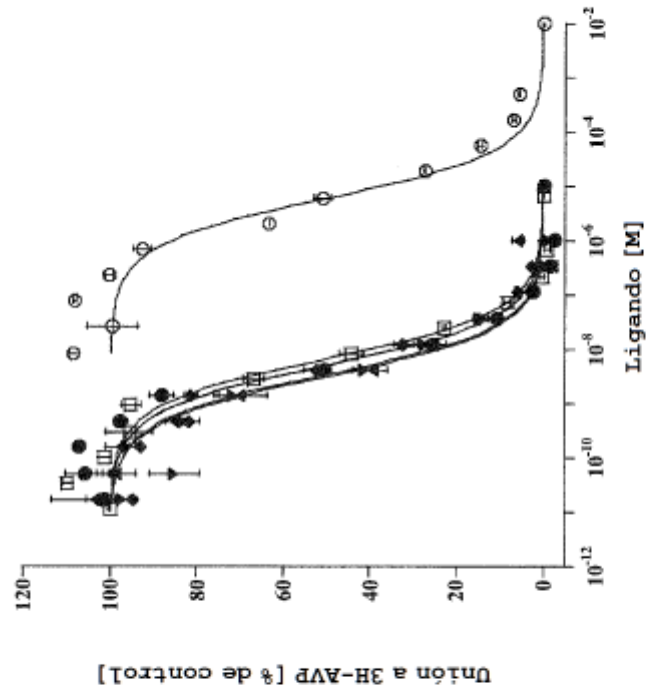


FIGURA 14

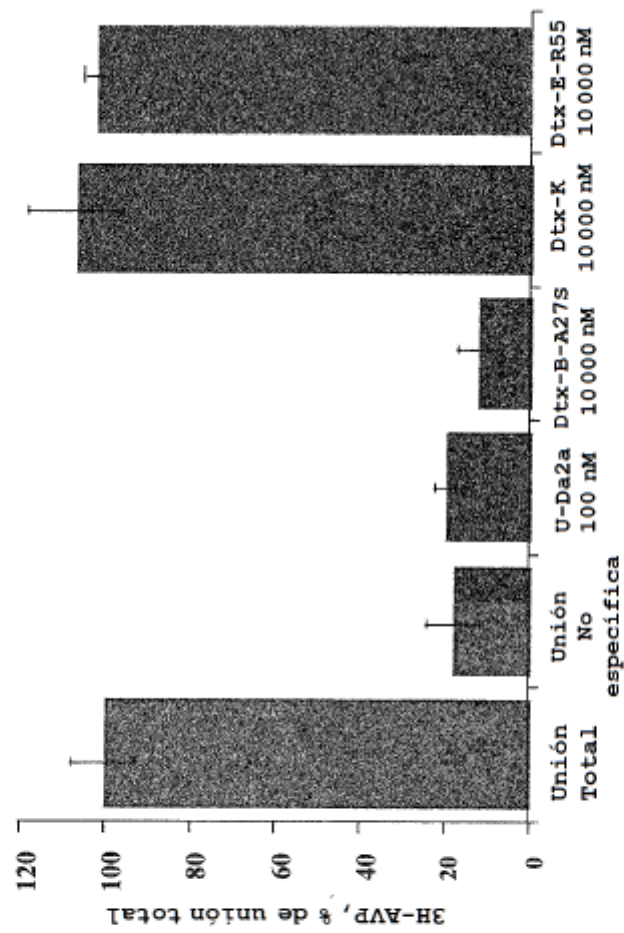


FIGURA 15

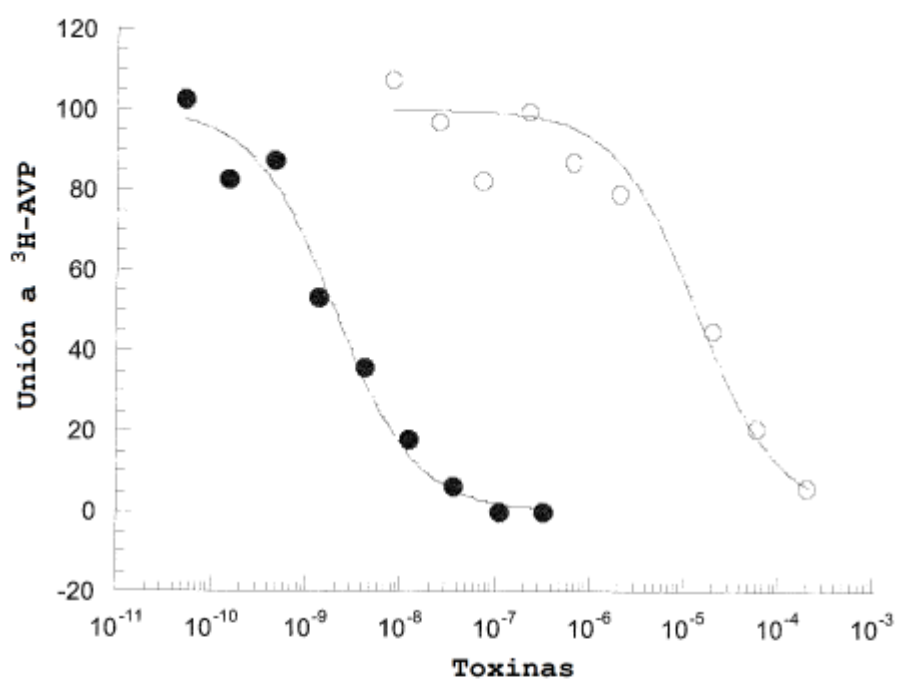


FIGURA 16