



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106554393 A

(43) 申请公布日 2017. 04. 05

(21) 申请号 201510623351. 2

(22) 申请日 2015. 09. 25

(71) 申请人 香港理工大学深圳研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区高新技术产业园南区香港理工大学产学研大楼 611 室

(72) 发明人 郭九标 陈声

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所

44237

代理人 张全文

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页

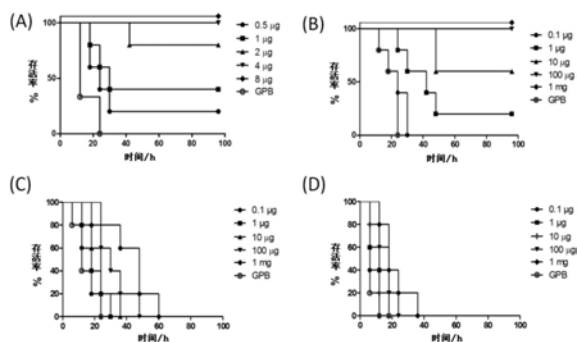
序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂及其筛选方法

(57) 摘要

本发明适用于生物技术应用研究领域, 提供了一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂, 所述多肽抑制剂为同时含有靶向 A 型肉毒神经素上的底物结合区域和活性区域, 且所述多肽抑制剂为 R1、R2、R197C、R1-RXF 中的一种, 其中, 所述 R1-RXF 包括 R1-RGF 和所述 R1-RGF 氨基酸序列中的 G 被 A、F、I、L、P 或 W 中的一个替代后分别获得的 R1-RAF、R1-RFF、R1-RIF、R1-RLF、R1-RPF 和 R1-RWF。



1. 一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,其特征在於,所述多肽抑制剂为同时含有靶向 A 型肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域,且所述多肽抑制剂为 R1、R2、R197C、R1-RXF 中的一种,其中,所述 R1-RXF 包括 R1-RGF 和所述 R1-RGF 氨基酸序列中的 G 被 A、F、I、L、P 或 W 中的一个替代后分别获得的 R1-RAF、R1-RFF、R1-RIF、R1-RLF、R1-RPF 和 R1-RWF,且所述 R1、R2、R197C、R1-RGF 中第 80 位开始的氨基酸序列分别为:

R1:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQ  
VSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF;

R2:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQ  
VSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCWTKFL;

R197C:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQ  
VSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANC;

R1-RGF:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQ  
VSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF。

2. 如权利要求 1 所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,其特征在於,所述 R1、R2、R197C、R1-RXF 中含有突变位点,所述突变位点包括 T<sup>190</sup>V、T<sup>190</sup>F、H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>L、R<sup>180</sup>F、H<sup>162</sup>D 和 R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、E<sup>183</sup>F、E<sup>194</sup>L、E<sup>194</sup>F、D<sup>186</sup>N、D<sup>186</sup>H 中的至少一种。

3. 如权利要求 2 所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,其特征在於,所述多肽抑制剂包括突变位点分别为 H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、D<sup>186</sup>H、T<sup>190</sup>V、H<sup>162</sup>D 和 T<sup>190</sup>V 的 R1;突变位点分别为 H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、D<sup>186</sup>H、T<sup>190</sup>V、H<sup>162</sup>D 和 T<sup>190</sup>V 的 R2;突变位点分别为 H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>F、R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、D<sup>186</sup>H、T<sup>190</sup>V 的 R197C。

4. 如权利要求 3 所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,其特征在於,所述多肽抑制剂为含有突变位点 R<sup>180</sup>L 的 R1、含有突变位点 T<sup>190</sup>V 的 R2 中的一种,所述 R<sup>180</sup>L 的 R1、T<sup>190</sup>V 的 R2 第 80 位开始的氨基酸序列依次为:

R<sup>180</sup>L 的 R1:

LGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQ  
SGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDLIMEKADSNKTRIDEANCRRGF;

T<sup>190</sup>V 的 R2:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQ  
VSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKVRIDEANCWTKFL。

5. 一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法,包括以下步骤:

以 BoNT/A 的底物 SNAP25 (141-206) 为模板,进行定点突变获得突变体,对所述突变体进行筛选,获得水解效率高于所述底物 SNAP25 (141-206) 的所述突变体的有利突变位点;

提供多肽抑制剂模板,并将所述有利突变位点整合到多肽抑制剂模板中获得突变多肽抑制剂,得到包括所述多肽抑制剂模板和突变多肽抑制剂的第一多肽抑制剂;

量化分析所述第一多肽抑制剂对 LC/A 的抑制效果,通过 IC<sub>50</sub> 值、K<sub>i</sub> 值分析筛选第二

多肽抑制剂；

量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果，筛选第三多肽抑制剂。

6. 如权利要求 5 所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法，其特征在于，所述多肽抑制剂模板分别为 R1、R2、R197C 和 R1-RXF。

7. 如权利要求 5 所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法，其特征在于，所述定点突变包括对所述 SNAP25 中的下述位点进行突变：SNAP25(T190V)、SNAP25(T190F)、SNAP25(H162D)、SNAP25(R180L)、SNAP25(R180F)、SNAP25(M202F)、SNAP25(H162D, R180L)、SNAP25(E183L)、SNAP25(E183F)、SNAP25(E194L)、SNAP25(E194F)、SNAP25(D186N)、SNAP25(D186H)、SNAP25(T190V, M202F)。

8. 如权利要求 5-7 任一所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法，其特征在于，在量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果步骤前，还包括对所述第二多肽抑制剂进行末端处理，具体方法为：在对所述第二多肽抑制剂的氮末端中引入多聚精氨酸。

9. 如权利要求 5-7 任一所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法，其特征在于，还包括在筛选所述第三多肽抑制剂步骤后，在动物水平上检验所述第三多肽抑制剂对 A 型肉毒神经毒素的抑制作用。

10. 如权利要求 5-7 任一所述的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法，其特征在于，所述量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果的方法为：

提供 Neuro-2A 细胞，并转染所述 Neuro-2A 细胞；

用不同浓度的所述第二多肽抑制剂处理转染后的所述 Neuro-2A 细胞 24-48 小时，收集细胞并以 SDS-PAGE 和 western blotting 检测分析所述 Neuro-2A 细胞中天然 SNAP25 被水解情况，并以 AlphaEaseFC 软件定量被水解的底物，分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果。

## A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂及其筛选方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术应用研究领域,尤其涉及一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂及其筛选方法。

### 背景技术

[0002] 梭状神经毒素 (Clostridial Neurotoxins, CNTs) 是导致人类中毒的最强蛋白质类毒素之一,其中,肉毒神经毒素 (Botulinum Neurotoxins, BoNTs) 导致肌肉松弛性麻痹,破伤风神经毒素 (Tetanus Neurotoxin, TeNT) 导致痉挛性麻痹。对 BoNTs 而言,目前已有七种不同血清型 (依次命名为 A 至 G 型) 获得分离鉴定,它们专一性地靶向神经细胞,并特异性地水解位于神经突触细胞膜上或囊泡膜上的底物,从而抑制神经递质 (比如乙酰胆碱) 的释放,导致疾病。

[0003] BoNTs 七种肉毒神经毒素血清型中, A、B、E 和 F 型能引起人肉毒中毒症状,其中 A 型的毒性最强,致死剂量可以低至微克级。美国 CDC (Center for Disease Control and Prevention) 把 BoNTs 定义为 A 类试剂和潜在的生物恐怖武器。另一方面,基于 BoNTs 中毒具有可逆性、局部性和持久性等特点,一些 BoNT/A (如 BOTOX) 和 BoNT/B (如 MYOBLOC™) 类衍生药物已获得批准用于治疗诸如斜视、眼睑痉挛和用于美容等领域。

[0004] 然而,目前市场上的 BoNTs 类衍生药物具有较多缺点,其中,引起广泛关注的如导致免疫抵抗反应和操作不慎导致死亡等。迄今为止仍然没有有效的治疗 BoNTs 中毒的方法,而其中抗毒药物的研发至关重要。在过去几十年里,众多科研人员的工作逐渐揭示了 CNTs 的底物识别机制,基于这些研究成果,可以设计高通量抑制剂筛选的分析技术,研发针对轻链区域的小分子抑制剂以及多肽或拟肽类抑制剂。在靶向 BoNTs 活性区域的小分子抑制剂的研发方面,目前通过直接高通量筛选化合物库、计算机辅助的小分子设计技术、天然化合物筛选和先导化合物库筛选等方法鉴定出了一些具有抑制效果的候选化合物,不过它们最高的抑制效果也只在微摩 ( $\mu\text{M}$ ) 水平,和 BoNTs 的底物具有相似的亲和力 ( $K_m$  值),所以不可能研发成抑制剂。另外,基于天然化合物的、靶向 BoNTs 底物结合区域的抑制剂的研发也未能取得较好成果。分析认为,导致小分子抑制的研发未取得较好成果的原因可能是 BoNTs 独特的底物识别机制:它们需要识别并结合到底物上较长的区域后才能实现底物的有效水解。所以未来小分子抑制剂的进一步研发应该综合考虑这些因素。

[0005] 在多肽或拟肽类抑制剂研发方面,目前最有前景的多肽抑制剂的抑制效果可达纳摩 (nM) 水平,这些多肽抑制剂的抑制原理是作用于 BoNTs 活性区域上负责底物识别的关键位点,比如锌原子等。不过由于这些多肽类抑制剂也是只靶向 BoNTs 活性区域,因此它们和 BoNTs 的亲和力有限,从而限制了抑制效果的进一步提高。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,以期解决目前多肽抑制剂在临床用药上的空白、同时解决目前还没有活性较高的同时含有靶向肉毒神经

毒素上的底物结合区域和活性区域的多肽类抑制剂的问题。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法,旨在解决现有技术还没有同时含有靶向肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域的高效多肽类抑制剂及其筛选方法的问题。

[0008] 本发明是这样实现的,一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,所述多肽抑制剂为同时含有靶向 A 型肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域,且所述多肽抑制剂为 R1、R2、R197C、R1-RXF 中的一种,其中,所述 R1-RXF 包括 R1-RGF 和所述 R1-RGF 氨基酸序列中的 G 被 A、F、I、L、P 或 W 中的一个替代后分别获得的 R1-RAF、R1-RFF、R1-RIF、R1-RLF、R1-RPF 和 R1-RWF,且所述 R1、R2、R197C、R1-RGF 中第 80 位开始的氨基酸序列分别为:

[0009] R1:

[0010] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF;

[0011] R2:

[0012] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCWTKFL;

[0013] R197C:

[0014] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANC;

[0015] R1-RGF:

[0016] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRGF。

[0017] 以及,一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法,包括以下步骤:

[0018] 以 BoNT/A 的底物 SNAP25(141-206) 为模板,进行定点突变获得突变体,对所述突变体进行筛选,获得水解效率高于所述底物 SNAP25(141-206) 的所述突变体的有利突变位点;

[0019] 提供多肽抑制剂模板,并将所述有利突变位点整合到多肽抑制剂模板中获得突变多肽抑制剂,得到包括所述多肽抑制剂模板和突变多肽抑制剂的第一多肽抑制剂;

[0020] 量化分析所述第一多肽抑制剂对 LC/A 的抑制效果,通过 IC<sub>50</sub> 值、K<sub>i</sub> 值筛选第二多肽抑制剂;

[0021] 量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果,筛选第三多肽抑制剂。

[0022] 本发明提供的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,同时含有靶向 A 型肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域,对 LC/A 具有较好的抑制效果,有望发展成为临床应用药物。

[0023] 本发明提供的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法,在对肉毒神经毒素底物识别机制充分理解的基础上,通过提供同时含有靶向肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域的多肽类抑制剂模板并引进有利突变为位点,然后依次进行对 LC/A 的抑制效果的量化分析、在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果的量化分析,获得具有较高抑制效果的多肽抑制剂,有望发展为临床应用药物提供新的途径。

## 附图说明

[0024] 图 1 是本发明实施例提供的 R12-R1 (R<sup>180</sup>L) (A)、R12-R2 (T<sup>190</sup>V) (B)、R12-R197C (C) 和 R12-R1-RGF (D) 在细胞水平上对 LC/A(1-425) 的抑制效果图；

[0025] 图 2 是本发明实施例提供的 R12-R1-RGF 在动物水平上对 BoNT/A 感染的预防效果图。

## 具体实施方式

[0026] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0027] 本发明实施例提供了一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂，所述多肽抑制剂为同时含有靶向 A 型肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域，且所述多肽抑制剂为 R1、R2、R197C、R1-RXF 中的一种。其中，所述 R1-RXF 中的 X 表示 G 存在被上述 A、F、I、L、P 或 W 中的一个替代或未被替代的多种情形，具体的，当其中的 G 未被取代时，命名为 R1-RGF；当其中的 G 被 A 取代时，命名为 R1-RAF；当其中的 G 被 F 取代时，命名为 R1-RFF；当其中的 G 被 I 取代时，命名为 R1-RIF；当其中的 G 被 L 取代时，命名为 R1-RLF；当其中的 G 被 P 取代时，命名为 R1-RPF；当其中的 G 被 W 取代时，命名为 R1-RWF。即所述 R1-RXF 包括 R1-RGF 和所述 R1-RGF 氨基酸序列中的 G 被 A、F、I、L、P 或 W 中的一个替代后分别获得的 R1-RAF、R1-RFF、R1-RIF、R1-RLF、R1-RPF 和 R1-RWF。

[0028] 本发明实施例所述 R1、R2、R197C、R1-RGF 中第 80 位开始的氨基酸序列分别为：

[0029] R1：

[0030] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF；

[0031] R2：

[0032] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCWTKFL；

[0033] R197C：

[0034] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANC；

[0035] R1-RGF：

[0036] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRGF。

[0037] 进一步的，所述 R1、R2、R197C、R1-RXF 中含有突变位点，所述突变位点包括 T<sup>190</sup>V、T<sup>190</sup>F、H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>L、R<sup>180</sup>F、H<sup>162</sup>D 和 R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、E<sup>183</sup>F、E<sup>194</sup>L、E<sup>194</sup>F、D<sup>186</sup>N、D<sup>186</sup>H 中的至少一种。含有上述突变位点的所述 R1、R2、R197C、R1-RXF，对 BoNT/A 的底物 SNAP25 (141-206) 具有较高的水解效率。

[0038] 更进一步的，所述多肽抑制剂包括突变位点分别为 H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、D<sup>186</sup>H、T<sup>190</sup>V、H<sup>162</sup>D 和 T<sup>190</sup>V 的 R1；突变位点分别为 H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、D<sup>186</sup>H、T<sup>190</sup>V、H<sup>162</sup>D 和 T<sup>190</sup>V 的 R2；突变

位点分别为 H<sup>162</sup>D、R<sup>180</sup>F、R<sup>180</sup>L、E<sup>183</sup>L、D<sup>186</sup>H、T<sup>190</sup>V 的 R197C。优选的上述多肽抑制剂以及所述 R1、R2、R197C、R1-RXF，对 LC/A 的抑制实验中表现出较好的 IC<sub>50</sub> 值、Ki 值，即对 LC/A 的抑制效果较优异。

[0039] 作为最优实施例，所述多肽抑制剂为含有突变位点 R180L 的 R1、含有突变位点 T190V 的 R2、R197C、R1-RGF。该优选的多肽抑制剂，其在细胞水平上表现出较佳的抑制作用，其中，R1-RGF 的细胞水平抑制效果最为优异。所述 R<sup>180</sup>L 的 R1、T<sup>190</sup>V 的 R2 第 80 位开始的氨基酸序列依次为：

[0040] R<sup>180</sup>L 的 R1：

[0041] LGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDLIMEKADSNKTRIDEANCRRGF；

[0042] T<sup>190</sup>V 的 R2：

[0043] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKVRIDEANCWTKFL。

[0044] 本发明实施例提供的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂，同时含有靶向 A 型肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域，对 LC/A 具有较好的抑制效果，有望发展成为临床应用药物。

[0045] 本发明实施例所述 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂可以通过下述方法筛选获得。

[0046] 相应的，本发明实施例还提供了一种 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法，包括以下步骤：

[0047] S01. 以 BoNT/A 的底物 SNAP25(141-206) 为模板，进行定点突变获得突变体，对所述突变体进行筛选，获得水解效率高于所述底物 SNAP25(141-206) 的所述突变体的有利突变位点；

[0048] S02. 提供多肽抑制剂模板，并将所述有利突变位点整合到多肽抑制剂模板中获得突变多肽抑制剂，得到包括所述多肽抑制剂模板和突变多肽抑制剂的第一多肽抑制剂；

[0049] S03. 量化分析所述第一多肽抑制剂对 LC/A 的抑制效果，通过 IC<sub>50</sub> 值、Ki 值筛选第二多肽抑制剂；

[0050] S04. 量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果，筛选第三多肽抑制剂。

[0051] 具体的，上述步骤 S01 中，由于所述 LC/A(BoNT/A 的轻链部分，氨基酸长度为 1-425) 和所述底物 SNAP25(141-206) 之间在某些位点的识别并不是最佳的，因此，所述底物 SNAP25(141-206) 还存在改善的空间。有鉴于此，本发明实施例以 BoNT/A 的底物 SNAP25(141-206) 为模板，进行定点突变获得 SNAP25(141-206) 的突变体，从中筛选水解效率高于所述底物 SNAP25(141-206) 的有利突变位点。具体的，所述定点突变利用定点突变技术实现。作为优选实施例，所述定点突变包括对所述 SNAP25 中的下述位点进行突变：SNAP25(T<sup>190</sup>V)、SNAP25(T<sup>190</sup>F)、SNAP25(H<sup>162</sup>D)、SNAP25(R<sup>180</sup>L)、SNAP25(R<sup>180</sup>F)、SNAP25(M<sup>202</sup>F)、SNAP25(H<sup>162</sup>D, R<sup>180</sup>L)、SNAP25(E<sup>183</sup>L)、SNAP25(E<sup>183</sup>F)、SNAP25(E<sup>194</sup>L)、SNAP25(E<sup>194</sup>F)、SNAP25(D<sup>186</sup>N)、SNAP25(D<sup>186</sup>H)、SNAP25(T<sup>190</sup>V, M<sup>202</sup>F)，其中括号内的内容表示突变位点，如 SNAP25(T<sup>190</sup>V) 表示在 SNAP25 氨基酸序号为 190 位的 T 突变为 V，SNAP25(H<sup>162</sup>D, R<sup>180</sup>L) 表示

在 SNAP25 氨基酸序号为 162 位的 H 突变为 D、同时,氨基酸序号为 180 位的 R 突变为 L。

[0052] 作为一个具体实施例,所述定点突变并筛选水解效率高于所述底物 SNAP25(141-206) 的有利突变位点的方法为:构建含有编码 SNAP25(141-206) 蛋白的相应基因的重组载体,并利用定点突变技术改变拟突变的位点并获得 SNAP25(141-206) 的突变体重组蛋白;以 GST 标签融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达相应重组蛋白,并利用 Sepharose 4B(Amersham Biosciences) 亲和介质分离纯化得到具有较高纯度和浓度的融合蛋白,其中, LC/A(1-425) 融合蛋白的表达纯化可参照文献 Sheng Chen 等 2007. JBC. 282:9621-9627 实现;将 LC/A(1-425) 和 SNAP25(141-206) 或突变体在反应体系 (10mM Tris-HCl pH 7.6 和 20mM NaCl) 中混合,放置 37°C 恒温培养箱中 20min,加入 SDS-PAGE 样品缓冲液终止反应。使用 SDS-PAGE 和 densitometry 对各样品进行分析,获得 LC/A(1-425) 对 SNAP25(141-206) 及其突变体的水解活性数据,结果如下表 1 所示。由表 1 可见,某些 SNAP25 的突变体,如 SNAP25(H162D) 和 SNAP25(R180L) 等,能够提高 LC/A 对其的水解活性。

[0053] 表 1

[0054]

SNAP25 及突变体	水解 90% SNAP25 及突变体 所需 LC/A 的量(ng)	LC/A 的相对活性
		(SNAP25 衍生物/野生型 SNAP25)
wt SNAP25 (141-206)	10	1
SNAP25 (T <sup>190</sup> V)	1	10
SNAP25 (T <sup>190</sup> F)	1	10
SNAP25 (H <sup>162</sup> D)	0.5	20
SNAP25 (R <sup>180</sup> L)	0.5	20
SNAP25 (R <sup>180</sup> F)	1	10
SNAP25 (M <sup>202</sup> F)	1	10
SNAP25 (H <sup>162</sup> D, R <sup>180</sup> L)	1	10
SNAP25 (E <sup>183</sup> L)	1	10

[0055]



SNAP25 (E <sup>183</sup> F)	1	10
SNAP25 (E <sup>194</sup> L)	1	10
SNAP25 (E <sup>194</sup> F)	1	10
SNAP25 (D <sup>186</sup> N)	1	10
SNAP25 (D <sup>186</sup> H)	1	10
SNAP25 (T <sup>190</sup> V, M <sup>202</sup> F)	1	10

[0056] 上述步骤 S02 中,作为优选实施例,所述多肽抑制剂模板同时含有靶向 A 型肉毒神经素上的底物结合区域和活性区域。该优选的所述多肽抑制剂模板类型,具有更高的抑制效果潜力,有望发展成为临床应用药物。

[0057] 根据发明人反复研究发现:所述 LC/A 几乎不能水解 SNAP25 (Q197C) 突变体,而且所述 LC/A 要实现底物的有效水解还需要底物 SNAP25 上的 80-110 区域的帮助。在此基础上,作为具体优选实施例,提供了四种不同类型的所述多肽抑制剂模板,分别命名为 R1、R2、R197C、R1-RXF,所述 R1、R2、R197C、R1-RXF 的氨基酸序列如上所述,此处不再赘述。

[0058] 利用定点突变技术将所述有利突变位点整合到所述多肽抑制剂模板中后,得到包括所述多肽抑制剂模板和突变多肽抑制剂的第一多肽抑制剂。

[0059] 上述步骤 S03 中,量化分析所述第一多肽抑制剂对 LC/A 的抑制效果,获得各所述多肽抑制剂对所述 LC/A 的 IC<sub>50</sub>和 Ki 参数,结果如下表 2 所示,所述 IC<sub>50</sub>和 Ki 分别表示半抑制浓度和抑制常数。其中,IC<sub>50</sub>的数据为至少三次重复实验的平均值;IC<sub>50</sub>和 Ki 之间的换算公式为: $K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_M)$ ,其中 LC/A(1-425)的 K<sub>M</sub>值约为 16 μM;Δ 表示来源自文献 Kumar G 等,2012, Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 68:511-520 的四肽抑制剂的参数,以此作为本发明中其他抑制剂的参考;\* 表示本发明实施例研发的抑制剂的参数。由表 2 可见,R1 (R<sup>180</sup>L)、R2 (T<sup>190</sup>V)、R197C 和 R1-RGF 表现出很好的抑制效果。

[0060] 表 2

[0061]

多肽抑制剂	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)
	0.9	0.358 <sup>Δ</sup>
RRGF	912.5±0.19	719.57±0.15*
R1	17.15±0.83	13.52±0.17
R1 (H <sup>162</sup> D)	0.64±0.17	0.5±0.13
R1 (R <sup>180</sup> L)	0.28±0.44	0.22±0.35
R1 (E <sup>183</sup> L)	20.40±0.03	16.08±0.02
R1 (D <sup>186</sup> H)	17.69±0.09	13.95±0.07
R1 (T <sup>190</sup> V)	14.72±0.06	11.61±0.04
R1 (H <sup>162</sup> D, T <sup>190</sup> V)	0.60±0.29	0.48±0.23
R2	15.71±0.05	12.39±0.04
R2 (H <sup>162</sup> D)	1.11±0.44	0.88±0.35
R2 (R <sup>180</sup> L)	13.96±0.30	11.01±0.24
R2 (E <sup>183</sup> L)	60.86±1.29	47.99±1.02
R2 (D <sup>186</sup> H)	14.47±0.004	11.41±0.003
R2 (T <sup>190</sup> V)	1.13±0.20	0.89±0.16
R2 (R <sup>180</sup> L, T <sup>190</sup> V)	54.40±0.48	42.90±0.38
R197C	2.22±0.31	1.75±0.24
R197C (H <sup>162</sup> D)	5.24±0.28	4.13±0.22
R197C (R <sup>180</sup> F)	27.09±0.34	25.71±0.32
R197C (R <sup>180</sup> L)	4.78±0.49	3.77±0.39

[0062]

R197C (E <sup>183</sup> L)	18.75±0.72	14.78±0.55
R197C (D <sup>186</sup> H)	0.28±0.39	0.22±0.32
R197C (T <sup>190</sup> V)	6.36±0.18	6.04±0.17
R1-RGF	0.0021±0.002	0.0017±0.0012
R1-RAF	20.42±0.09	16.10±0.71
R1-RFF	57.73±1.02	45.52±0.80
R1-RIF	26.88±0.76	21.20±0.60
R1-RLF	0.93±1.02	0.73±0.80
R1-RPF	13.01±2.11	10.26±1.67
R1-RWF	3.72±0.16	2.93±0.12

[0063] 根据所述第一多肽抑制剂对所述 LC/A 的 IC<sub>50</sub>和 Ki 参数结果,筛选第二多肽抑制剂。本发明实施例中,筛选获得第二多肽抑制剂遵循 IC<sub>50</sub>和 Ki 值越低越好的原则;进一步的,优选所有第一多肽抑制剂中对所述 LC/A 的 IC<sub>50</sub>和 Ki 最小的多肽抑制剂,如 R1-RGF。

[0064] 进一步的,上述步骤 S04 中,对上述步骤获得的所述第二多肽抑制剂进行量化分析,获得其在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果。为了保证后续细胞水平和动物水平的抑制效果分析,进而获得具有较好抑制效果的抑制剂,作为优选实施例,在量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果步骤前,还包括对所述第二多肽抑制剂进行末端处理,以帮助所述多肽抑制剂穿过细胞膜进入细胞内发挥作用。所述末端处理的具体方法为:在对所述第二多肽抑制剂的氮末端中引入多聚精氨酸,即 R12。

[0065] 作为另一个优选实施例,所述量化分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果的方法为:

[0066] 提供 Neuro-2A 细胞,并转染所述 Neuro-2A 细胞;

[0067] 用不同浓度的所述第二多肽抑制剂处理转染后的所述 Neuro-2A 细胞 24-48 小时,收集细胞并以 SDS-PAGE 和 western blotting 检测分析所述 Neuro-2A 细胞中天然 SNAP25 被水解情况,并以 AlphaEaseFC 软件定量被水解的底物,分析所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果。筛选第三多肽抑制剂,即用于本发明实施例的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂。本发明实施例中,筛选获得第三多肽抑制剂,通过所述第二多肽抑制剂在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果的比较,筛选抑制效果较好的多肽抑制剂。作为优选实施例,在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果可以抑制至少 8 倍半数致死剂量 (LD50) 的 BoNT/A。进一步的,优选所有第二多肽抑制剂中在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果最好的多肽抑制剂,如 R1-RGF。

[0068] 作为具体优选实施例,将最具潜力的 4 个多肽抑制剂 R1 (R<sup>180</sup>L)、R2 (T<sup>190</sup>V)、R197C

和 R1-RGF 进行细胞水平上对 LC/A 的抑制效果分析,结果如图 1 所示,由图可见,所筛选出来的 4 个多肽抑制剂均表现出比较理想的细胞水平上的抑制效果,其中, R12-R1-RGF 的抑制效果最为显著。

[0069] 进一步的,为了验证获得的所述第三多肽抑制剂的抑制效果,本发明实施例还包括在筛选第三多肽抑制剂步骤后,在动物水平上检验所述第三多肽抑制剂对 A 型肉毒神经毒素的抑制作用。作为一个具体实施例,为了进一步分析 R12-R1-RGF 在动物水平上对 BoNT/A 感染的预防效果,将步骤 S04 中获得的抑制效果最好的所述 R12-R1-RGF 抑制剂与不同半数致死剂量的 BoNT/A 混合感染小鼠,观察小鼠中毒和死亡情况,结果如图 2 所示,其中, A-D 分别不同半数致死剂量 ( $LD_{50}$ ) 的 BoNT/A 与不同浓度的 R12-R1-RGF 抑制剂混合后感染小鼠, (A) 2 倍  $LD_{50}$ , (B) 4 倍  $LD_{50}$ , (C) 8 倍  $LD_{50}$  和 (D) 16 倍  $LD_{50}$ , GPB 为对照组。由图 2 可见,多肽抑制剂 R12-R1-RGF 表现出较好的保护小鼠免受 BoNT/A 感染的效果。

[0070] 本发明实施例提供的 A 型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂的筛选方法,在对肉毒神经毒素底物识别机制充分理解的基础上,通过提供同时含有靶向肉毒神经毒素上的底物结合区域和活性区域的多肽类抑制剂模板并引进有利突变为位点,然后依次进行对 LC/A 的抑制效果的量化分析、在细胞水平上对 LC/A 的抑制效果的量化分析,获得具有较高抑制效果的多肽抑制剂,有望发展为临床应用药物提供新的途径。

[0071] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

## 序列表

<110> 香港理工大学深圳研究院  
 <120> A型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂及其筛选方法  
 <130> 2015  
 <160> 6  
 <170> PatentIn version 3.5  
  
 <210> 1  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <400> 1  
 Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu  
 1                    5                    10                    15  
  
 Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly  
                   20                    25                    30  
  
 Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met  
                   35                    40                    45  
  
 Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu  
                   50                    55                    60  
  
 Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn  
 65                    70                    75                    80  
  
 Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn

[0002]

85

90

95

Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg

100

105

110

Ile Asp Glu Ala Asn Cys Arg Arg Gly Phe

115

120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 2

Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu

1

5

10

15

Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly

20

25

30

Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met

35

40

45

Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu

50

55

60

Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn

65

70

75

80

Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn

[0003]

85

90

95

Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg

100

105

110

Ile Asp Glu Ala Asn Cys Trp Thr Lys Phe Leu

115

120

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 3

Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu

1

5

10

15

Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly

20

25

30

Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met

35

40

45

Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu

50

55

60

Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn

65

70

75

80

Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn

[0004]

85

90

95

Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg

100

105

110

Ile Asp Glu Ala Asn Cys

115

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 4

Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu

1

5

10

15

Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly

20

25

30

Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met

35

40

45

Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu

50

55

60

Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn

65

70

75

80

Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn

[0005]



85

90

95

Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg

100

105

110

Ile Asp Glu Ala Asn Cys Arg Gly Phe

115

120

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 5

Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys

1

5

10

15

Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val

20

25

30

Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala

35

40

45

Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn

50

55

60

Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu

65

70

75

80

Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg

[0006]

	85	90	95
Gln Ile Asp Leu Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile			
	100	105	110
Asp Glu Ala Asn Cys Arg Arg Gly Phe			
	115	120	
<210> 6			
<211> 123			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<400> 6			
Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu			
1	5	10	15
Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly			
	20	25	30
Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met			
	35	40	45
Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu			
	50	55	60
Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn			
65	70	75	80
Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn			

[0007]

85

90

95

Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Val Arg

100

105

110

Ile Asp Glu Ala Asn Cys Trp Thr Lys Phe Leu

115

120

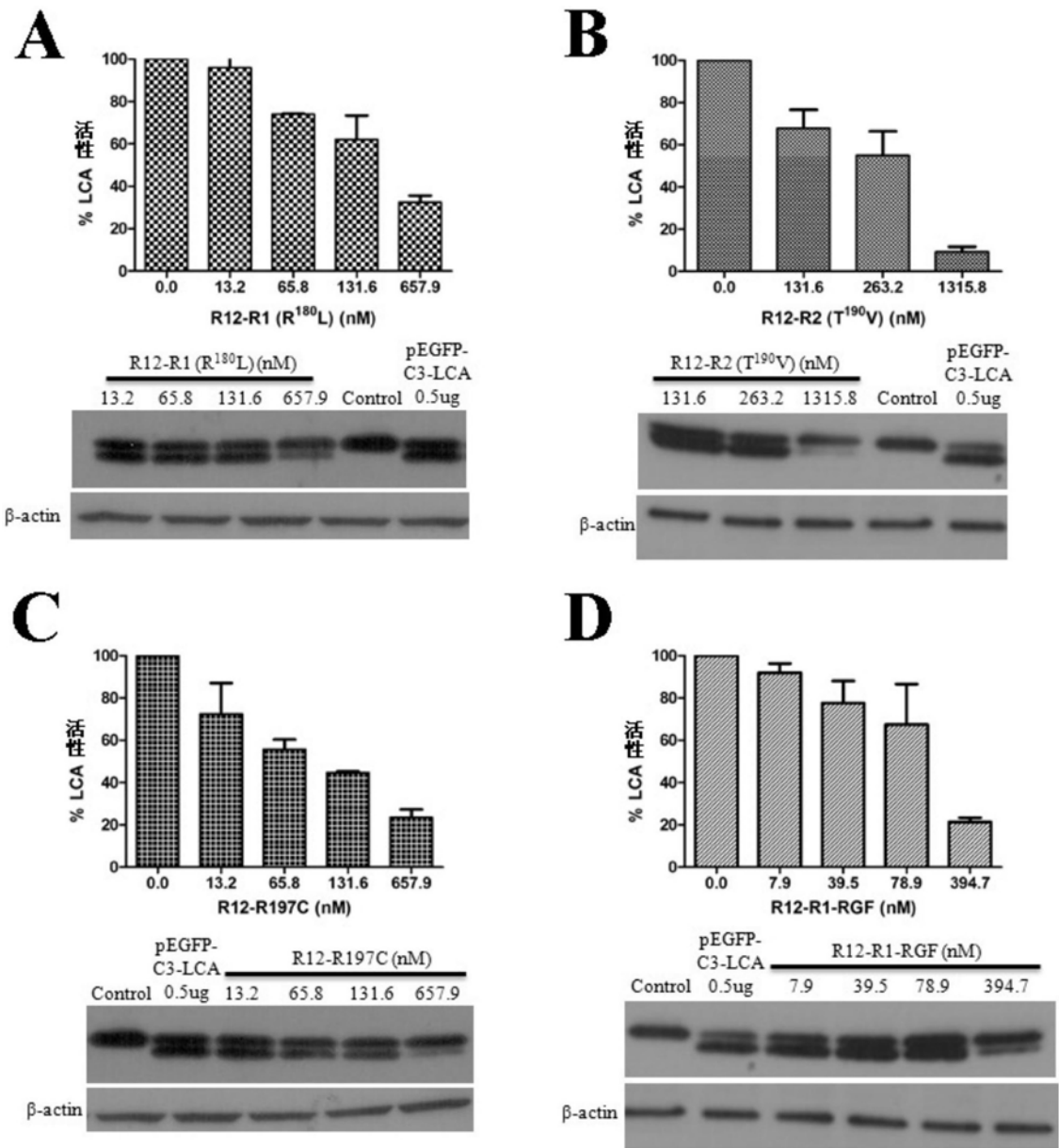


图 1

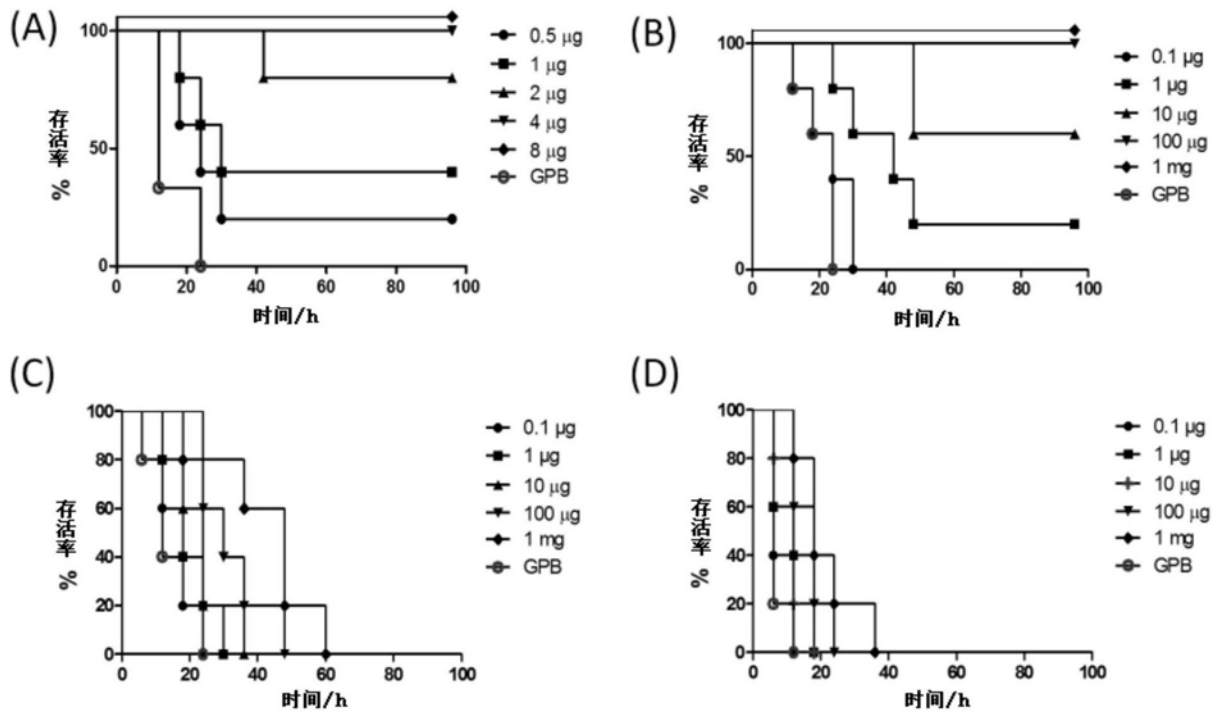


图 2