



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106554393 B

(45) 授权公告日 2020.10.27

(21) 申请号 201510623351.2

审查员 杜润超

(22) 申请日 2015.09.25

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106554393 A

(43) 申请公布日 2017.04.05

(73) 专利权人 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1页 说明书9页

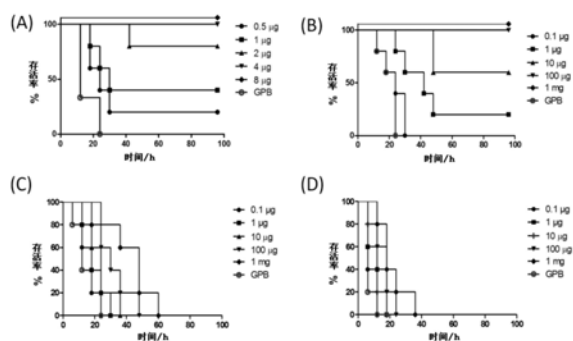
序列表7页 附图2页

(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。



1. 一种A型肉毒神经毒素底物型多肽抑制剂,其特征在于,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-RXF,其中,所述R1-RXF为R1-RGF或所述R1-RGF氨基酸序列中的G被L替代后获得的R1-RLF,且所述R1-RGF的氨基酸序列为:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTDARENEMDENLE
QVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRGF;

所述R1-RLF的氨基酸序列为:

DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTDARENEMDENLE
QVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRLF。

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,其特征在于,所述R1-RXF中含有突变位点,所述突变位点包括T¹⁹⁰V、T¹⁹⁰F、H¹⁶²D、R¹⁸⁰L、R¹⁸⁰F、H¹⁶²D和R¹⁸⁰L、E¹⁸³L、E¹⁸³F、E¹⁹⁴L、E¹⁹⁴F、D¹⁸⁶N、D¹⁸⁶H中的至少一种。

3. 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,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 (H162D, R180L)、SNAP25 (E183L)、SNAP25 (E183F)、SNAP25 (E194L)、SNAP25 (E194F)、SNAP25 (D186N)、SNAP25 (D186H);

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,得到第一多肽抑制剂,其中,所述多肽抑制剂模板为权利要求1所述的R1-RXF,所述R1-RXF包括R1-RGF和所述R1-RGF氨基酸序列中的G被L替代后获得的R1-RLF;

量化分析所述第一多肽抑制剂对LC/A的抑制效果,通过IC₅₀值、K_i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。

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。

5. 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。

6. 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(μM)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] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF;

[0011] R2:

[0012] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCWTKFL;

[0013] R197C:

[0014] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANC;

[0015] R1-RGF:

[0016] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF。

[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IC₅₀值、K_i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 (R¹⁸⁰L) (A)、R12-R2 (T¹⁹⁰V) (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] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRRGF；

[0031] R2：

[0032] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCWTKFL；

[0033] R197C：

[0034] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANC；

[0035] R1-RGF：

[0036] DLGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMD
ENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANCRGF。

[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T¹⁹⁰V、T¹⁹⁰F、H¹⁶²D、R¹⁸⁰L、R¹⁸⁰F、H¹⁶²D和R¹⁸⁰L、E¹⁸³L、E¹⁸³F、E¹⁹⁴L、E¹⁹⁴F、D¹⁸⁶N、D¹⁸⁶H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H¹⁶²D、R¹⁸⁰L、E¹⁸³L、D¹⁸⁶H、T¹⁹⁰V、H¹⁶²D和T¹⁹⁰V的R1；突变位点分别为H¹⁶²D、R¹⁸⁰L、E¹⁸³L、D¹⁸⁶H、T¹⁹⁰V、H¹⁶²D和T¹⁹⁰V的R2；突变位点分别为H¹⁶²D、R¹⁸⁰F、R¹⁸⁰L、E¹⁸³L、D¹⁸⁶H、T¹⁹⁰V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IC₅₀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R¹⁸⁰L的R1、T¹⁹⁰V的R2第80位开始的氨基酸序列依次为:

[0040] R¹⁸⁰L的R1:

[0041] LGKFCGLCVCPCNKLKSSDAYKKAWGNNQDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDLIMEKADSNKTRIDEANCRRGF;

[0042] T¹⁹⁰V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IC₅₀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 (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),其中括号内的内容表示突变位点,如SNAP25 (T¹⁹⁰V) 表示在SNAP25氨基酸序号为190位的T突变为V,SNAP25 (H¹⁶²D,R¹⁸⁰L) 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℃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

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 ¹⁹⁰ V)	1	10
SNAP25 (T ¹⁹⁰ F)	1	10
SNAP25 (H ¹⁶² D)	0.5	20
SNAP25 (R ¹⁸⁰ L)	0.5	20
SNAP25 (R ¹⁸⁰ F)	1	10
SNAP25 (M ²⁰² F)	1	10
SNAP25 (H ¹⁶² D, R ¹⁸⁰ L)	1	10
SNAP25 (E ¹⁸³ L)	1	10

[0054]

	SNAP25 (E ¹⁸³ F)	1	10
	SNAP25 (E ¹⁹⁴ L)	1	10
	SNAP25 (E ¹⁹⁴ F)	1	10
[0055]	SNAP25 (D ¹⁸⁶ N)	1	10
	SNAP25 (D ¹⁸⁶ H)	1	10
	SNAP25 (T ¹⁹⁰ V, M ²⁰² 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IC₅₀和K_i参数,结果如下表2所示,所述IC₅₀和K_i分别表示半抑制浓度和抑制常数。其中,IC₅₀的数据为至少三次重复实验的平均值;IC₅₀和K_i之间的换算公式为: $K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_M)$, 其中LC/A (1-425) 的K_M值约为16μM; 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 (R¹⁸⁰L)、R2 (T¹⁹⁰V)、R197C和R1-RGF表现出很好的抑制效果。

[0060] 表2

	多肽抑制剂	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)
[0061]	RRGF	0.9	0.358 ^Δ
		912.5±0.19	719.57±0.15*
	R1	17.15±0.83	13.52±0.17
	R1 (H ¹⁶² D)	0.64±0.17	0.5±0.13
	R1 (R ¹⁸⁰ L)	0.28±0.44	0.22±0.35
	R1 (E ¹⁸³ L)	20.40±0.03	16.08±0.02
	R1 (D ¹⁸⁶ H)	17.69±0.09	13.95±0.07
	R1 (T ¹⁹⁰ V)	14.72±0.06	11.61±0.04
	R1 (H ¹⁶² D, T ¹⁹⁰ V)	0.60±0.29	0.48±0.23
	R2	15.71±0.05	12.39±0.04
	R2 (H ¹⁶² D)	1.11±0.44	0.88±0.35
	R2 (R ¹⁸⁰ L)	13.96±0.30	11.01±0.24
	R2 (E ¹⁸³ L)	60.86±1.29	47.99±1.02
	R2 (D ¹⁸⁶ H)	14.47±0.004	11.41±0.003
	R2 (T ¹⁹⁰ V)	1.13±0.20	0.89±0.16
	R2 (R ¹⁸⁰ L, T ¹⁹⁰ V)	54.40±0.48	42.90±0.38
	R197C	2.22±0.31	1.75±0.24
	R197C (H ¹⁶² D)	5.24±0.28	4.13±0.22
	R197C (R ¹⁸⁰ F)	27.09±0.34	25.71±0.32
	R197C (R ¹⁸⁰ L)	4.78±0.49	3.77±0.39

	R197C (E ¹⁸³ L)	18.75±0.72	14.78±0.55
	R197C (D ¹⁸⁶ H)	0.28±0.39	0.22±0.32
	R197C (T ¹⁹⁰ 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
[0062]	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IC₅₀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IC₅₀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IC₅₀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 (R¹⁸⁰L)、R2 (T¹⁹⁰V)、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(LD₅₀)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LD₅₀, (B) 4倍LD₅₀, (C) 8倍LD₅₀和 (D) 16倍LD₅₀,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。

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

[0001] 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

	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	
	<210> 2		
	<211> 123		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<400> 2		
	Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu		
[0002]	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		

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

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

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

[0003]

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

	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		
	<210> 4		
	<211> 121		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<400> 4		
	Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu		
[0004]	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		

	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	
	<210> 5		
	<211> 121		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<400> 5		
	Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys		
[0005]	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		

	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		
[0006]	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		

	85	90	95
	Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Val Arg		
[0007]	100	105	110
	Ile Asp Glu Ala Asn Cys Trp Thr Lys Phe Leu		
	115	120	

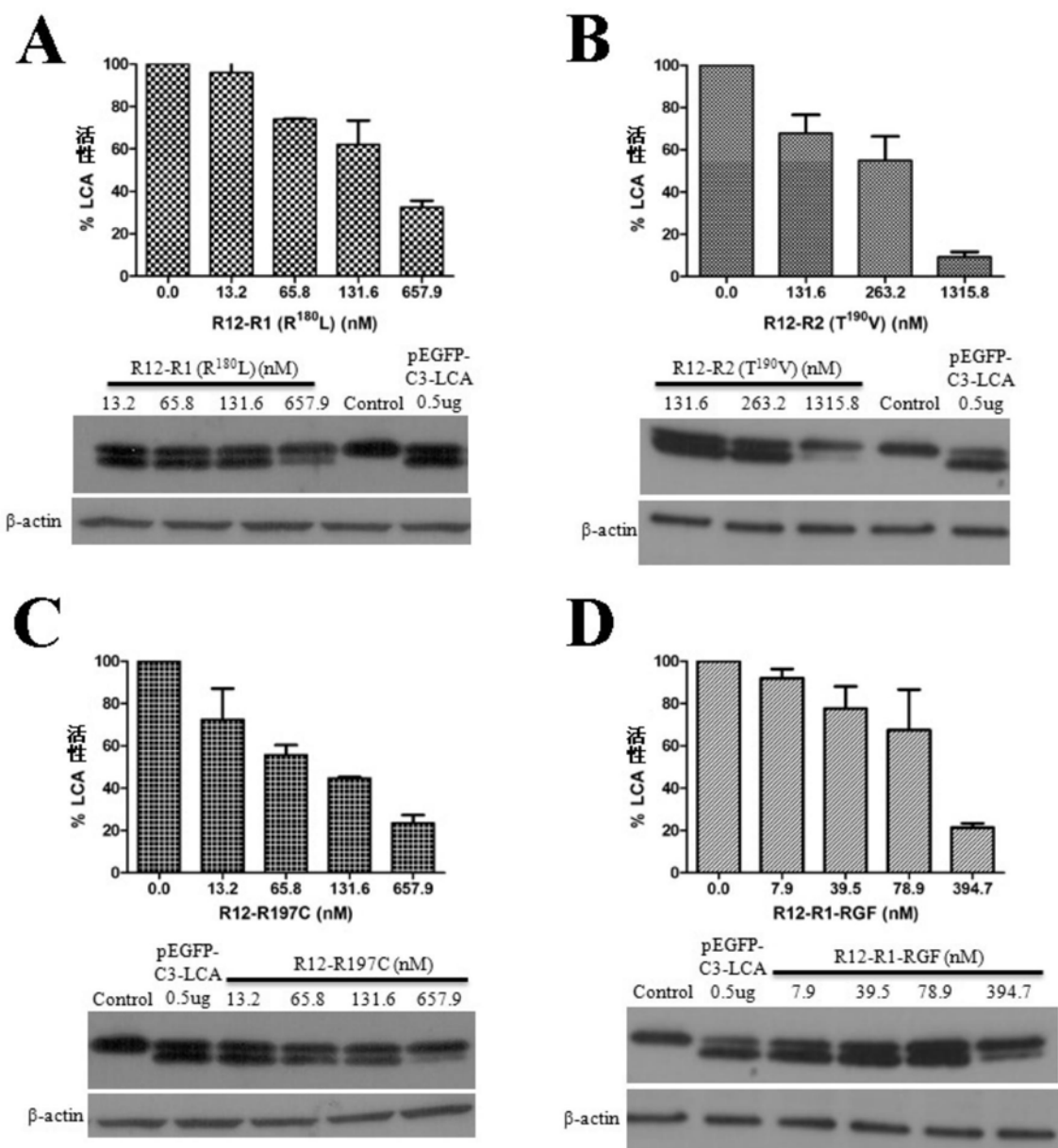


图1

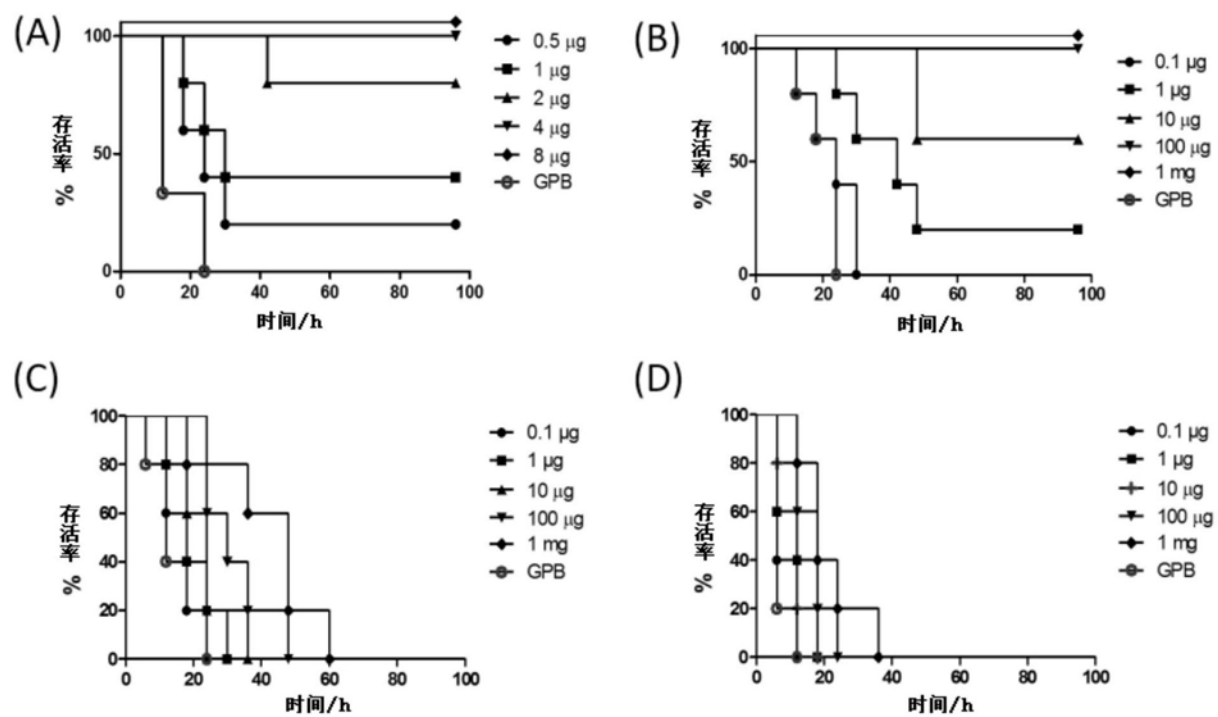


图2