



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105683212 B

(45)授权公告日 2020.03.17

(21)申请号 201480045998.5

(22)申请日 2014.08.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105683212 A

(43)申请公布日 2016.06.15

(30)优先权数据
61/868,560 2013.08.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2014/084725 2014.08.19

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/024503 EN 2015.02.26

(73)专利权人 香港理工大学
地址 中国香港九龙红磡育才道11号

(72)发明人 陈声

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 王为

(51)Int.Cl.

C07K 14/195(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

(56)对比文件

CN 102139099 A, 2011.08.03,

CN 1461308 A, 2003.12.10,

宋孚洋等.重组肉毒神经毒素A 轻链(BoNT/A LC)突变体的构建、表达与活性分析.《生命科学研究》.2011,第15卷(第3期),263-267.

Neil F. Fairweather等.PRODUCTION OF BIOLOGICALLY-ACTIVE LIGHT-CHAIN OF TETANUS TOXIN IN ESCHERICHIA-COLI - EVIDENCE FOR THE IMPORTANCE OF THE C-TERMINAL 16 AMINO-ACIDS FOR FULL BIOLOGICAL-ACTIVITY.《FEBS LETTERS》.1993,第323卷(第3期),218-222.

审查员 王雨方

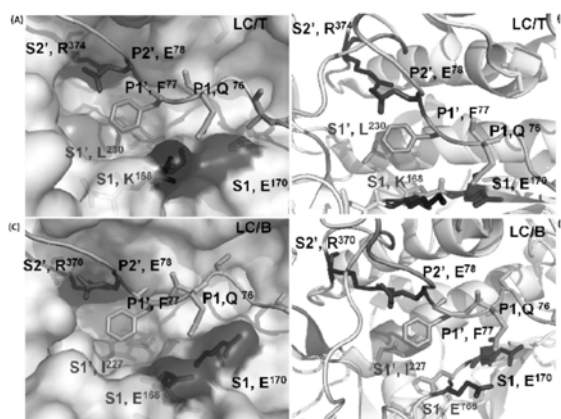
权利要求书1页 说明书16页
序列表10页 附图6页

(54)发明名称

高催化活性的基因改造梭菌属神经毒素

(57)摘要

本发明提供用于调节肉毒杆菌神经毒素及破伤风神经毒素的活性的方法。在一个实施例中,本发明提供具活性的破伤风神经毒素轻链(LC/T)和肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)的衍生物,或具活性的整个破伤风神经毒素和肉毒杆菌神经毒素的衍生物。在另一个实施例中,本发明提供用于改善当前使用肉毒杆菌神经毒素的疗法的方法。在另一个实施例中,本发明提供应用肉毒杆菌神经毒素或肉毒杆菌神经毒素的轻链于各种治疗或美容用途的新颖方法。在一个实施例中,本发明提供的方法用于减少肉毒杆菌神经毒素于各种用途出现的免疫耐药性。



1. 一种经改造的肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白,其特征在于,所述轻链蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.:2的氨基酸序列所示。
2. 一种包含权利要求1所述的轻链蛋白的组合物,其特征在于,所述轻链蛋白与第二种蛋白融合或偶合,所述第二种蛋白为源自肉毒杆菌神经毒素的重链。
3. 一种组合物,其特征在于,包含权利要求1所述的轻链蛋白和一个药学可接受的载体。
4. 包含权利要求1所述的经改造的肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白在制备改善或治疗受试者的疾病或状况的药物中的应用,所述疾病或状况选自:斜视、颈部肌张力障碍、痉挛、腋窝多汗症、痉挛性发声困难、颞下颌关节症、慢性糖尿病性神经病、创伤愈合和不随意肌收缩。
5. 一种经改造的破伤风神经毒素轻链蛋白,其特征在于,所述轻链蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.:4或5的氨基酸序列所示。
6. 一种包含权利要求5所述的轻链蛋白的组合物,其特征在于,所述轻链蛋白与第二种蛋白融合或偶合,所述第二种蛋白为源自破伤风神经毒素的重链。
7. 权利要求6所述的组合物,其特征在于,所述组合物作为分子标记用于研究神经元的胞吐作用。
8. 一种组合物,其特征在于,包含权利要求5所述的轻链蛋白和一个药学可接受的载体。

高催化活性的基因改造梭菌属神经毒素

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求以2013年8月21日提交的美国临时专利申请号61/868,560为优先权基础,所述优先权文件的所有内容及公开都以引用方式被纳入本申请中。

[0003] 本申请引用了多篇参考文献及出版物。所述参考文献及出版物的所有内容都以引用方式被纳入本申请中以便更能全面地描述与本发明相关的现有技术。

技术领域

[0004] 本发明涉及包括肉毒杆菌神经毒素和破伤风神经毒素的梭菌属神经毒素的改造,以及这些神经毒素及其衍生物的用途。

背景技术

[0005] 梭菌属神经毒素(Clostridia Neurotoxins,CNTs)是其中一种最毒害人类的蛋白毒素。例如,肉毒杆菌神经毒素(Botulinum Neurotoxin,BoNT)会引起弛缓性麻痹并导致肉毒中毒,破伤风神经毒素(Tetanus Neurotoxin,TeNT)则会引发痉挛性麻痹。梭菌属神经毒素的分子量约150kDa,是一个具有典型A-B链-结构/功能特性的双链蛋白,其中B区域(结合区域)与哺乳动物细胞的表面分子先结合,A区域(活性区域)随后转位至细胞内的位置(1)。梭菌属神经毒素由三个功能区域组成:N-末端的催化区域(轻链,LC)、中间的转运区域(重链,HCT)及C-末端的受体结合区域(重链,HCR)(2)。梭菌属神经毒素属于锌金属蛋白酶,能够切割SNARE蛋白(Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment REceptor,可溶性NSF附着受体),SNARE蛋白干扰突触小泡与质膜融合,最终阻止神经细胞分泌神经传导物质(1,3)。哺乳动物神经元的胞吐作用是由一种SNARE蛋白质复合物所带动,该蛋白质复合物由囊泡SNARE蛋白囊泡相关膜蛋白-2(vesicle associated membrane protein-2,VAMP2)以及两种质膜SNARE蛋白,SNAP25(分子量为25kDa的突触体相关蛋白 Synaptosome-Associated Protein)和突触融合蛋白1a(syntaxin 1a)所形成(4)。BoNT共有七个血清型(血清型A-G)能切割三种SNARE蛋白其中一种的某些特定氨基酸残基:BoNT血清型B、D、F和G及TeNT能切割VAMP2,BoNT血清型A及E能切割SNAP25,和BoNT血清型C能切割SNAP25和突触融合蛋白1a(3,5-7)。

[0006] BoNTs最被广泛使用于蛋白治疗。早在1989年,BoNT血清型A(BoNT/A)经美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗斜视、眼睑痉挛、面肌痉挛,也可用于颈部肌张力障碍、化妆品、眉间面部线条及腋窝多汗症。由于BoNT血清型A对治疗肌张力障碍和其他与不随意肌活动有关的毛病有效,并且符合安全性,BoNT血清型A在眼科、胃肠道科、泌尿外科、骨科、皮肤科、分泌及痛症各个领域已被批准作为实验性使用或药品标示外使用(8-17)。FDA于2000年12月11日批准肉毒杆菌神经毒素血清型B(MYOBLLOC™)用于治疗患有颈部肌张力障碍的患者,以减少与此病相关的头部位置异常和颈部疼痛的严重性(18,19)。

[0007] BoNT对治疗不随意肌的痉挛及收缩、美容或其它应用只有暂时性的效果,因此需要重复注射BoNT。在一些患者中,BoNT可诱发针对BoNT毒素的中和抗体的产生,并降低

BoNT的可用性。由此引起的免疫耐药性限制了BoNT的成效,或会使病人对进一步治疗毫无反应(9,10,20-26)。虽然患者对BoNT治疗产生免疫耐药性的确切百分比不详,但相比BoNT血清型B的治疗,通常较少患者对BoNT血清型A的治疗产生免疫耐药性(9,26)。这可能是由于BoNT血清型A复合物所使用的剂量比BoNT血清型B复合物的较低(27)。BoNT中和抗体多见于接受颈部肌张力障碍或痉挛治疗的患者,这是由于治疗此病症需要更大剂量的毒素和定期给药。至于治疗喉张力障碍、眼睑痉挛的患者或化妆品用途,由于需要较小的BoNT剂量,中和抗体不太常见(9,28,29)。降低治疗剂量或有助减少产生BoNT治疗的免疫耐药性。

[0008] 迄今为止仍未有方案能有效处理BoNT免疫耐药性的问题。过往曾有研究试图阻遏涉及诱导中和抗体的BoNT表位。研究人员将取自耐药患者的中和抗体与BoNT血清型A和BoNT血清型B的不同区域的反应,从而确定一系列可能涉及诱导中和抗体的免疫原区(39-41)。有报告指肽与单甲氧基聚乙二醇(mPEG)缀合能抑制针对肽的免疫反应。BoNT血清型A的重链区域(HC/A)有较强的免疫反应,研究人员将BoNT/A重链与mPEG缀合,并在小鼠接受BoNT/A治疗前施用该缀合物以进行预先免疫。结果显示,某些mPEG缀合物减少了中和抗体的产生(42),表示该预先免疫程序或可临床应用于免疫耐药的患者。

[0009] 由于BoNT的治疗特性和免疫耐药性相互关联,改造BoNT成为更高活性的毒素以降低其治疗所需剂量是克服免疫耐药性最好的方法。Rummel等人将BoNT血清型B重链区域中用来结合神经节苷脂的模序修改,相比原型毒素,改造后的毒素的结合和毒性提升高达三倍(43)。然而,BoNT的受体结合区域经改造后有可能影响结合作用的选择性。此外,改造结合区域不一定可以显著增加毒素的效力以避免产生免疫耐受性。相反,改造轻链(LC)以改变BoNT活性或更有助于避免产生免疫耐受性。因此,有必要改造梭菌属神经毒素,如肉毒杆菌神经毒素,以提高其治疗效果。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了调节肉毒杆菌神经毒素及破伤风神经毒素的活性的方法。

[0012] 在一个实施例中,本发明的方法通过提升毒素的催化活性以增强破伤风神经毒素轻链(LC/T)和肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)的底物识别。

[0013] 在一个实施例中,本发明提供肉毒杆菌神经毒素和破伤风神经毒素的衍生物及其应用。

[0014] 在一个实施例中,本发明提供破伤风神经毒素轻链(LC/T)的衍生物或整个破伤风神经毒素的衍生物,这些衍生物的活性被更改。

[0015] 在一个实施例中,本发明提供破肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/T)的衍生物或整个肉毒杆菌神经毒素的衍生物,这些衍生物的活性被更改。

[0016] 在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)的衍生物或肉毒杆菌神经毒素衍生物可以在各种治疗、化妆品或其它应用中使用。在另一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)的衍生物或肉毒杆菌神经毒素衍生物用于治疗减少肉毒杆菌神经毒素的免疫耐药性。

[0017] 在另一个实施例中,本发明提供了使用肉毒杆菌神经毒素以改善当前的疗法的方法。在另一个实施例中,本发明提供了将肉毒杆菌神经毒素的衍生物或肉毒杆菌神经毒素的轻链衍生物应用于各种治疗或美容用途的方法。

附图说明

[0018] 图1所示的为破伤风神经毒素轻链 (LC/T) 和肉毒杆菌神经毒素轻链 (LC/B) 的S2'，

[0019] S1'和S1口袋,以及VAMP2的P位点。图1显示了位于口袋并与VAMP2不同P位点交互的氨基酸残基。图1A示出的是LC/T和VAMP2产生相互作用的残基,其中LC/T以表面模型来表示。图1B示出的是LC/T和VAMP2产生相互作用的残基,其中LC/T以卡通模型来表示。图1C示出的是LC/B和VAMP2产生相互作用的残基,其中LC/B以表面模型来表示。图1D示出的是LC/B和VAMP2产生相互作用的残基,其中LC/B以卡通模型来表示。以下为VAMP2的P位点和LC/T的S2',S1'和S1口袋的命名方法:形成VAMP2可切键的两个残基从C-末端到N-末端被命名为P1-P1'。从P1到C-末端方向的残基被指定为P2,P3等,而从P1'到N-末端方向的残基被指定为P2',P3'等。识别特定P位点的LC/T或LC/B口袋以相应的S口袋命名。识别VAMP2的P2'位点(即E⁷⁸)的LC/T和LC/B S2'口袋分别由R³⁷⁴和R³⁷⁰组成。识别VAMP2的P1'位点(即F⁷⁷)的LC/T和LC/B S1'口袋分别由L²³⁰和I²²⁷组成。识别VAMP2的P1位点(即Q⁷⁶)的LC/T和LC/B S1口袋分别由K¹⁶⁸NE¹⁷⁰和E¹⁶⁸NE¹⁷⁰组成。

[0020] 图2所示的为LC/T、LC/B及其衍生物裂解VAMP2的催化活性。图2A示出的为LC/T及其衍生物裂解VAMP2的活性。图2B示出的为LC/B及其衍生物裂解VAMP2的活性。误差线为每个实验重复三次的标准差。

[0021] 图3所示的为LC/B、LC/T及LC/T衍生物[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]的S1'口袋残基的方位。图3A比较位于S1'口袋的残基LC/B(I²²⁷)、LC/T(L²³⁰)及LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I](I²³⁰)的方位。其中线表示肽的主链骨架,而棒则表示残基。图3B示出的为S1'口袋的相对平坦的位置,当中包括LC/B的I²²⁷(黑色)及LC/T的[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]的I²³⁰(灰色)。图3C所示的为LC/T的S1'口袋的隆起表面(以网状曲面来表示),当中包含L²³⁰。图3D所示的为LC/T的S1'口袋的隆起表面(以固定表面来表示),当中包含L²³⁰。

[0022] 图4所示的为LC/T(图4A)、LC/B(图4B)及LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I](图4C)的S1'和S2'口袋中残基之间的距离。S1'残基侧链和S2'残基侧链之间的距离使用PyMOL程式测量。LC/T的R³⁷⁴和L²³⁰两者之间的距离约7.2 Å,LC/B的R³⁷⁰和I²²⁷两者之间的距离约7.9 Å,LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]的I²³⁰和R³⁷⁴两者之间的距离约8.3 Å。

[0023] 图5所示的为重组LC/B、LC/T及其衍生物裂解内源性VAMP2的结果。图5A显示LC/T及LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]裂解内源性VAMP2的结果。图5B显示LC/B及LC/B[S²⁰¹P]裂解内源性VAMP2的结果。在每个图中,上图所示的是分析VAMP2裂解的蛋白印迹结果,当中使用针对VAMP2的抗体和针对肌动蛋白的抗体。下图则表示蛋白印迹分析的量化结果。

发明内容

[0024] 为了提高BoNT的治疗效果及减少诱导BoNT的中和抗体,将BoNT改造成为更强力的衍生物是非常有用的,这可以减低BoNT于各种治疗及应用中的有效剂量。

[0025] 通过研究肉毒杆菌神经毒素及破伤风神经毒素的底物识别及特异性,本发明将肉毒杆菌神经毒素及破伤风神经毒素改造成新的衍生物,以提高其活性和底物特异性。

[0026] 本发明中对肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)和破伤风神经毒素轻链(LC/T)的底物识别口袋中的活性部位进行比较和分析。

[0027] 在一个实施例中,本发明提供了通过提升催化活性以优化破伤风神经毒素轻链(LC/T)和肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)的底物识别。

[0028] 在一个实施例中,本发明提供了调节肉毒杆菌神经毒素及破伤风神经毒素的活性的方法。

[0029] 在一个实施例中,本发明提供增强了活性的肉毒杆菌神经毒素轻链(LC/B)的衍生物或整个肉毒杆菌神经毒素的衍生物。在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素包含SEQ ID NO.:1的多肽。在另一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素衍生物的氨基酸序列带有一个或多个改变。在一个实施例中,肉毒杆菌神经毒素的衍生物包含位于SEQ ID NO.:1第201位的氨基酸的改变,所述氨基酸由丝氨酸serine(S²⁰¹)改变为脯氨酸proline(P²⁰¹)。在另一个实施例中,肉毒杆菌神经毒素衍生物[S²⁰¹P]包括SEQ ID NO.:2的序列。

[0030] 在一个实施例中,肉毒杆菌神经毒素的衍生物包括位于SEQ ID NO.:1第263位的丙氨酸alanine的改变。在另一个实施例中,肉毒杆菌神经毒素的衍生物包括位于SEQ ID NO.:1第264位的异亮氨酸isoleucine的改变。

[0031] 在一个实施例中,本发明提供破伤风神经毒素轻链(LC/T)的衍生物或整个破伤风神经毒素的衍生物。在一个实施例中,本发明所述的破伤风神经毒素包括SEQ ID NO.:3的多肽。在另一个实施例中,本发明所述的破伤风神经毒素衍生物的氨基酸序列带有一个或多个改变。在一个实施例中,破伤风神经毒素的衍生物包含位于SEQ ID NO.:3第230位的氨基酸的改变,所述氨基酸由亮氨酸leucine(L²³⁰)改变为异亮氨酸isoleucine(I²³⁰)。在另一个实施例中,破伤风神经毒素的衍生物包括位于SEQ ID NO.:3第168位的氨基酸的改变,所述氨基酸由赖氨酸lysine(K¹⁶⁸)改变为谷氨酸glutamate(E¹⁶⁸)。在一个实施例中,破伤风神经毒素衍生物[L²³⁰I]包括SEQ ID NO.:4的序列。

[0032] 在另一个实施例中,破伤风神经毒素的衍生物包括以下改变:位于SEQ ID NO.:3第230位的亮氨酸leucine(L²³⁰)改变为异亮氨酸isoleucine(I²³⁰)及位于SEQ ID NO.:3第168位的赖氨酸lysine(K¹⁶⁸)改变为谷氨酸glutamate(E¹⁶⁸)。在一个实施例中,破伤风神经毒素的衍生物[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]包括SEQ ID NO.:5的序列。

[0033] 肉毒杆菌神经毒素B轻链的原型(LC/B)(SEQ ID NO.1):

[0034] MPVTINNFNYNDPIDNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNK SSGIFN RDVCEYYDPDYLTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPYLGDR RVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASRE GFGGIMQMKFCPEYVSFVNNVQENKGASIFNR RGYFSDPALILMHელიHVLHGLYGIKV DDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKV LQNFRGIVDRLNK VLVCSIDPNININIYKNKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYK IKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKE HLAVYKIQMCKSV

[0035] 肉毒杆菌神经毒素B轻链的衍生物(LC/B)(SEQ ID NO.2):

[0036] MPVTINNFNYNDPIDNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNK SSGIFN RDVCEYYDPDYLTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLEMIINGIPYLGDR RVPLEEFNTNIASVTVNKLI SNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASRE GFGGIMQMKFCPEYVPVFNQENKGASIFNR RGYFSDPALILMHელიHVLHGLYGIKV DDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKV LQNFRGIVDRLNK VLVCSIDPNININIYKNKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYK

IKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKE HLAVYKIQMCKSV

[0037] 破伤风神经毒素轻链的原型(LC/T) (SEQ ID NO.3):

[0038] MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFNP PSSLIE
GASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNS YSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQ
DPSGATTKSAMLNLIIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDNK NYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLT
IGKSKYFQDPALLMH¹ELIHVLHG LYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPI²SAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLY
EKTLNDYKAI ANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYG³FTEIE LGKK
FNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM⁴RVNTN AFRNVDGSGLVSKLI

[0039] 破伤风神经毒素轻链的衍生物(LC/T) (SEQ ID NO.4):

[0040] MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFNP PSSLIE
GASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNS YSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQ
DPSGATTKSAMLNLIIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDNK NYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLT
IGKSKYFQDPALILMH¹ELIHVLHGL YGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPI²SAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLY
EKTLNDYKAIA NKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYG³FTEIEL GKK
FNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM⁴RVNTNA FRNVDGSGLVSKLI

[0041] 破伤风神经毒素轻链的衍生物(LC/T) (SEQ ID NO.5):

[0042] MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFNP PSSLIE
GASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNS YSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQ
DPSGATTKSAMLNLIIIFGPGPVLN¹NEVRGIVLRVDNK NYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLT
IGKSKYFQDPALILMH¹ELIHVLHGL YGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPI²SAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLY
EKTLNDYKAIA NKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYG³FTEIEL GKK
FNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNM⁴RVNTNA FRNVDGSGLVSKLI

[0043] 在一个实施例中,本发明提供了包含肉毒杆菌神经毒素或破伤风神经毒素的衍生物的药物组合物。在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素或破伤风神经毒素及其衍生物与一个或多个辅助多肽融合或偶合,所述辅助多肽来自肉毒杆菌神经毒素、破伤风神经毒素或其他生物。在一个实施例中,与本发明所述的毒素融合或偶合的辅助多肽是天然的或重组的多肽。在另一个实施例中,与本发明所述的毒素融合或偶合的辅助多肽是人造多肽。

[0044] 在一个实施例中,本发明所述肉毒杆菌神经毒素或破伤风神经毒素的轻链(LC)和重链(HC)及其衍生物的DNA被克隆到相同的表达载体中,从而表达包含轻链和重链的融合蛋白。在一个实施例中,轻链和重链均源自于相同的毒素血清型。在另一个实施例中,轻链和重链源自于不同的毒素血清型。

[0045] 在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素衍生物在药物、临床或美容过程中使用。在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素衍生物用于治疗或改善各种疗法或其它应用的疾病或状况。在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素衍生物用于新颖的治疗,这些治疗产生肉毒杆菌神经毒素免疫耐药性的机会较低。

[0046] 在一个实施例中,本发明所述的肉毒杆菌神经毒素衍生物用于用于治疗或改善斜视、眼睑痉挛、半面痉挛、颈部肌张力障碍、痉挛、眉间面部线条、腋窝多汗症、下泌尿道毛病、胃肠道毛病、痉挛性发声困难、颞下颌关节症、流涎、慢性糖尿病性神经病、创伤愈合、

阴道痉挛、肌肉骨骼疼痛、涉及到不随意骨骼肌活动障碍如不随意肌痉挛和 收缩、或任何其他适用的疾病或状况。

[0047] 在一个实施例中,本发明提供使用本发明所述的肉毒杆菌神经毒素衍生物以改善或治疗疾病或状况的方法,所述方法给受试者施用有效剂量的衍生物。在另一个实施例中,本发明提供改善当前使用肉毒杆菌神经毒素的治疗方法。

[0048] 在一个实施例中,本发明提供应用具有增强治疗功效或药性的肉毒杆菌神经毒素的方法。在另一个实施例中,本发明提供减少各种涉及肉毒杆菌神经毒素的治疗和应用 中产生肉毒杆菌神经毒素免疫耐药性的方法。

[0049] 在一个实施例中,本发明所述的破伤风神经毒素的衍生物可以用作分子标记或有效工具以研究中央神经元的胞吐作用机制。

[0050] 本发明提供一种经改造的肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白,该肉毒杆菌神经毒素的氨基酸序列为SEQ ID NO.:1,该轻链蛋白包含一个或多个如SEQ ID NO.:1所示的氨基酸 的变异。

[0051] 在一个实施例中,本发明所述的经改造肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白,其氨基酸变异选自:Ser²⁰¹,Ala²⁶³和Ile²⁶⁴。

[0052] 在一个实施例中,本发明所述的经改造肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白包含SEQ ID NO.:2的氨基酸序列。

[0053] 本发明提供一种包含本发明所述的经改造肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白的组合物,该轻链蛋白与一个或多个的第二种蛋白融合或偶合,该第二种蛋白为源自肉毒杆菌神经毒素或其他生物的蛋白。

[0054] 在一个实施例中,本发明所述的第二种蛋白是天然蛋白或人工蛋白。

[0055] 本发明提供一种组合物,该组合物包含本发明所述的经改造肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白和一个药学可接受的载体。

[0056] 本发明提供一种用于改善或治疗受试者的疾病或状况的方法,该方法包含给予受试者有效份量的本发明所述的经改造肉毒杆菌神经毒素轻链蛋白。

[0057] 在一个实施例中,本发明所述的疾病或状况选自:斜视,眼睑痉挛,半面痉挛,颈部肌张力障碍,痉挛,眉间面部线条,腋窝多汗症,不随意肌痉挛,下泌尿道毛病,胃肠道毛病,痉挛性发声困难,颞下颌关节症,慢性糖尿病性神经病,创伤愈合,阴道痉挛,肌肉骨骼疼痛和不随意肌收缩。

[0058] 在一个实施例中,本发明的改善或治疗疾病或状况的方法,该受试者产生较低的免疫耐药性。在另一个实施例中,该受试者相比接受原型肉毒杆菌神经毒素治疗的受试者产生较少的肉毒杆菌神经毒素的免疫耐药性。

[0059] 本发明提供一种经改造的破伤风神经毒素轻链蛋白,该破伤风神经毒素的氨基酸序列为SEQ ID NO.:3,该轻链蛋白包含一个或多个如SEQ ID NO.:3所示的氨基酸的变异。

[0060] 在一个实施例中,本发明所述所述的破伤风神经毒素轻链蛋白,其氨基酸变异选自:Lys¹⁶⁸和Leu²³⁰。

[0061] 在一个实施例中,本发明所述的破伤风神经毒素轻链蛋白,包含SEQ ID NO.:4或5的氨基酸序列。

[0062] 本发明提供一种包含本发明所述的经改造破伤风神经毒素轻链蛋白的组合物,该

轻链蛋白与一个或多个的第二种蛋白融合或偶合,该第二种蛋白为源自伤风神经毒素或其他生物的蛋白。

[0063] 在一个实施例中,本发明所述的第二种蛋白是天然蛋白或人工蛋白。

[0064] 在一个实施例中,本发明提供一种包含本发明所述的经改造破伤风神经毒素轻链蛋白的组合物,该组合物作为分子标记用于研究神经元的胞吐作用。

[0065] 本发明提供一种组合物,该组合物包含本发明所述的经改造破伤风神经毒素轻链蛋白和一个药学可接受的载体。

[0066] 本发明提供一种用于改善或治疗受试者的疾病或状况的方法,该方法包含给予受试者有效份量的本发明所述的经改造破伤风神经毒素轻链蛋白。

[0067] 通过引用以下的实验细节可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员应理解所提供的实施例仅作为说明作用,而非限制本发明的范围。本发明的范围将由随后的权利要求所界定。

[0068] 在本申请中的,过渡语“包含”与‘包括’、‘含有’或‘以…为特征’是同义的,是包括性或开放式的,当中并不排除有另外未列举的元素或方法步骤。

具体实施方式

[0069] 实施例1

[0070] 肉毒杆菌神经毒素和破伤风神经毒素的改造

[0071] 用于蛋白表达的质粒构建

[0072] 表达LC/T(1-436)(破伤风神经毒素登陆号:X06214.1)、LC/B(1-440)(肉毒杆菌神经毒素登陆号:AB084152.1)和VAMP2(1-97)的质粒,及随后的蛋白表达和纯化根据文献所描述的来进行(30-32)。pLC/T、pLC/B和pVAMP2的定点突变根据文献所描述的使用QuikChange(Stratagene公司)来进行(30,31)。质粒被测序以确认突变成功及确保开放读序框(Open Reading Frame,ORFs)没有其他突变。突变蛋白如前所述的步骤生产及纯化(30-33)。

[0073] 测定LC/B和LC/T裂解VAMP2的线性速度和动力学常数

[0074] 线性速度的反应物(10 μ l)如前所述的步骤进行(30,31,33)。VAMP2蛋白(5 μ M)与带有不同LC/T、LC/B或其衍生物浓度的10mM三羟甲基氨基甲烷及盐酸溶液(Tris-HCl)(pH 7.6)及20mM的氯化钠(NaCl)置于37 $^{\circ}$ C温育10分钟。通过加入SDS-PAGE缓冲液停止反应,使用SDS-PAGE分离VAMP2及其裂解产物。通过光密度测定VAMP2被裂解的数量。 K_m 及 k_{cat} 使用相同的测定法测定,其中VAMP2浓度调整至1-300 μ M以达至由LC/T及其衍生物进行大约10%裂解。使用Michaelis-Menten方程(反应速度与底物浓度的关系)对实验数据进行拟合,使用GraphPad程序(圣地亚哥,加州)获得动力学常数。进行至少五个独立的实验,以确定每个蛋白的动力学常数。

[0075] 补偿性测定实验

[0076] 根据文献所描述的方法确定LC/T的补偿性突变对裂解VAMP2及其变体VAMP2[F⁷⁷D]的影响(31)。简单地说,5 μ M的VAMP2或VAMP2变体与LC/T或其衍生物一起温育。使用SDS-PAGE分离未裂解的VAMP2及裂解的VAMP2并将之量化。将反应中的原型LC/T或其衍生物的数量与VAMP2裂解百分比制作关系图表。然后计算裂解50%VAMP2或VAMP2突变体所需

的LC浓度 (EC₅₀)。

[0077] LC结晶和结构鉴定

[0078] LC/T衍生物[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]经悬滴蒸气扩散法结晶。LC/T[K168E,L230I]以7.5 mg/ml的浓度储存在10mM三羟甲基氨基甲烷(Tris)及20mM氯化钠(HCl) (pH 7.9)

[0079] 的缓冲液中。每个悬滴含有1μl的蛋白溶液和1μl母液(250mM硝酸镁(Mg(NO₃)₂)及15% 聚乙二醇3350(PEG 3350))。在16℃下温育4-5天直至晶体成熟。收集晶体并在添加有20% 甘油的母液中冷冻保护,用作收集数据。使用Rigaku MicroMaxTM-007HF X-射线衍射仪在100K的温度下收集数据并使用iMOSFLM处理数据(34)。该晶体的空间群属于单斜组C222,晶胞参数为 $a = 105.38 \text{ \AA}$, $b = 176.83 \text{ \AA}$, $c = 57.36 \text{ \AA}$,并衍射至 2.6 \AA 。每个不对称的单元中有一个分子。以LC/T(PDB ID:1Z7H)作为同源性模型,采用CCP4i程式套件的PHASER模块利用分子置换方法得到LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]的结构(35)。随后使用CCP4的REFMAC模块的进行结构修正(36)。利用WINCOOT进行人手结构重建。最终所得的结构保藏在蛋白质数据库(PDB),编号为4J1L。

[0080] 利用重组LC/T、LC/B及其衍生物裂解源自Neuro2A细胞的VAMP

[0081] 以添加有10%新生小牛血清、1.4%碳酸氢钠和0.5%青霉素-链霉素的MEM培养基(minimum essential medium),在37℃及5%二氧化碳下培养Neuro2A细胞。收集融合细胞,并在冰上用25号规格的针头反复抽放20至30次以裂解细胞。裂解产物以2500rpm离心5分钟沉淀细胞核及完整的细胞,收集上清液进行实验。细胞裂解物与不同数量的LC(反应物体积为10μl)在37℃温育10分钟后,加入等量的SDS-PAGE样品缓冲液停止反应,并在100℃下将混合物加热10分钟。使用针对VAMP2的抗体和针对肌动蛋白的抗体进行蛋白印迹(Western blot)以分析VAMP的裂解。

[0082] 结果

[0083] BoNT血清型B和TeNT在同一个可切键切割VAMP2,但具有不同的底物水解效率,LC/B的活性比LC/T高约20倍。在过往LC/B和LC/T识别VAMP2的研究中,发现两种LC用来识别VAMP2的活性位点有类似的布局。两个LC系统的主要区别在于P2'-S2'底物的识别位点(33,38)。VAMP2的P2'位点的突变(E⁷⁸改变为alanine,[E⁷⁸A]),减少LC/B裂解约8倍,但减少LC/T裂解约240倍,这表明VAMP2的E⁷⁸在LC/B和LC/T的底物裂解有不同的作用(33)。

[0084] LC/B和LC/T的S2'口袋的生化特性分析显示,LC/B及LC/T的口袋分别由R³⁷⁰和R³⁷⁴形成(图1)。补偿性突变实验显示LC/B的R³⁷⁰直接与VAMP2的E⁷⁸产生相互作用,但似乎没有证据显示LC/T的R³⁷⁴与VAMP2的E⁷⁸之间有相互作用(38)。这些研究数据促使本发明研究LC/B和LC/T在VAMP2(E⁷⁸)的P2'位点识别底物的不同机制。

[0085] 优化LC/T和LC/B的S1'口袋以增强其催化活性

[0086] 图1示出LC/B及LC/T与底物VAMP2相互作用的活性位点。比较LC/B及LC/T的结构,揭示两个轻链的S2'口袋是相似的,并包括一个精氨酸残基(LC/B为R³⁷⁰,LC/T为R³⁷⁴),然而其S1'口袋是不同的。LC/B的S1'口袋由F⁹⁵、V²⁰⁰、S²⁰¹、L²²⁶及I²²⁷组成,而LC/T的S1'口袋由F¹⁹⁹、V²⁰⁴、P²⁰⁵、L²²⁹、L²³⁰及L²³¹组成。当S1'口袋残基突变为丙氨酸,对LC/B底物水解没有影响,除了I²²⁷A使k_{cat}数值减少大约80倍,但没有改变K_m数值(38)。对于LC/T, S1'口袋的残基突变没有影响底物水解,除了LC/T[L²³⁰A]或LC/T[P²⁰⁵A]的突变使k_{cat}数值减少大约30倍,但不影响K_m数值(38)。在S1'口袋中的残基,LC/T的P²⁰⁵与LC/B的S²⁰¹结构排列一致,而LC/T

的L²³⁰与LC/B的I²²⁷结构排列一致(图1)。LC/B及LC/T的S1'口袋的不同成分不仅可能引致不同VAMP2的P1'位点识别,还可能引致不同的P2'位点识别,并进一步影响LC/B及LC/T本身已经不同的催化活性。

[0087] 将LC/B及LC/T的S1'口袋中氨基酸残基互换已进行突变。LC/T[P²⁰⁵S]的突变使 k_{cat} 数值减少大约80倍,但没有改变 K_m 数值。LC/T[L²³⁰I]的突变使 k_{cat} 数值提高大约20倍,但 K_m 数值相近(表1,图2A)。上述数据表明,脯氨酸和异亮氨酸是形成LC/T的S1'口袋的最佳残基,用于与VAMP2位点的氨基酸F⁷⁷进行相互作用。

[0088] 为了证实上述假设,对LC/B的S1'口袋的氨基酸残基亦进行了互换。LC/B[I²²⁷L]的突变使 k_{cat} 数值减少大约590倍,但没有改变 K_m 数值。LC/B[S²⁰¹P]的突变使 k_{cat} 数值提高大约10倍,但没有改变 K_m 数值(表1,图2B)。上述数据进一步证实,脯氨酸和异亮氨酸是构成LC/B及LC/T的S1'口袋的最佳残基,并意味着现时LC/B及LC/T的底物识别口袋还未被优化。优化这些口袋可以改善毒素的催化活性。为了验证改变LC/B及LC/T的S1'口袋并不会改变其底物特异性,本实施例研究了上述四个突变体裂解VAMP2[F⁷⁷D]的活性。VAMP2的F⁷⁷是LC/B及LC/T切键活动的关键氨基酸残基,该残基的突变可能会影响LC/B及LC/T的裂解活性。由于上述LC/B及LC/T的突变体都不能裂解VAMP2[F⁷⁷D],意味着LC/B及LC/T的突变体经突变后其VAMP2底物特异性没有改变(图2A-B)。

[0089] 表1

[0090] LC/B和LC/T及其衍生物裂解VAMP2的动力学常数

[0091]

| LCs | LC 口袋 | LC 衍生物 | K_m (μ M) | k_{cat} (S ⁻¹) | k_{cat}/K_m (S ⁻¹ • μ M ⁻¹) |
|------|----------------|--|------------------|------------------------------|---|
| LC/B | | 原型-LC/B (Wt-LC/B) | 1.7±0.3 | 1.1 | 6.5×10 ⁻¹ |
| | S1' 互换 | S ²⁰¹ P | 1.6±0.2 | 11.5 | 7.2 |
| | S1' 互换 | I ²²⁷ L | 1.6±0.4 | 1.8×10 ⁻³ | 1.1×10 ⁻³ |
| LC/T | | 原型-LC/T (Wt-LC/T) | 4.1±0.2 | 1.6×10 ⁻¹ | 3.9×10 ⁻² |
| | S1' 互换 | P ²⁰⁵ S | 4.4±0.4 | 2.1×10 ⁻³ | 4.7×10 ⁻⁴ |
| | S1' 互换 | L ²³⁰ I | 4.2±0.2 | 4.1 | 9.7×10 ⁻¹ |
| | S1, S1' 互换 | K ¹⁶⁸ E, L ²³⁰ I | 4.0±0.4 | 15.9 | 4.0 |
| | S3, S1, S1' 互换 | K ¹⁶⁸ E, L ²³⁰ I, R ¹⁸⁸ M | ND | ND | ND |

[0092] ND: 不确定, 由于酶不活跃, 以致不能确定动力学常数。

[0093] 优化LC/T的S1'口袋能达至最佳的P2'位点识别

[0094] 由于S1'及S2'口袋接近, LC/B及LC/T的S1'口袋的不同成分可能与LC/B及LC/T的S2'口袋之间的不同特性有关联。虽然LC/B及LC/T的S2'口袋两者都包括一个精氨酸残基, 先前的研究指出, LC/B的R³⁷⁰及VAMP的E⁷⁸有直接的相互作用, 而LC/T的R³⁷⁴与VAMP的E⁷⁸则没有直接的相互作用(38)。此外, 当位于VAMP的P2'位点的E⁷⁸突变为丙氨酸(E⁷⁸A)时, 对LC/B的裂解相比LC/T裂解的影响较小(38)。

[0095] 本发明改造LC/T以优化其S1'口袋, 创造了LC/T[L²³⁰I]并测试其切割VAMP2E⁷⁸R的

活性。如表2所示,裂解50%VAMP2所需的LC/T浓度为约120nM (EC₅₀)。可是,即使LC/T的浓度高达36,000nM,LC/T仍不能裂解VAMP2E⁷⁸R。LC/T[L²³⁰I]裂解VAMP2的效率比原型LC/T(Wt-LC/T)高约24倍;虽然LC/T[L²³⁰I]裂解VAMP2E⁷⁸R的效率与Wt-LC/T裂解VAMP2的效率相近,LC/T[L²³⁰I]裂解VAMP2E⁷⁸R的效率比原型LC/T(Wt-LC/T)高约360倍(表2)。上述数据显示,优化LC/T的S1'口袋可以增加LC/T对P2'位点由E⁷⁸突变为R⁷⁸的耐受性。LC/T的S1'口袋未被优化亦可能解释为何P2'位点E⁷⁸突变对LC/T底物裂解的影响比LC/B底物裂解更大。先前的研究显示,LC/B的S2'口袋残基(R³⁷⁰)和VAMP2形成盐桥并产生相互作用,而LC/T的S2'口袋残基(R³⁷⁴)和VAMP2之间没有相互作用(38)。为了测试究竟LC/B和LC/T两者不同的S2'-P2'相互作用是否由于S1'口袋的组成未被优化,本实施例测试了LC/T[L²³⁰I, R³⁷⁴E]切割VAMP2E⁷⁸R的效率。LC/T[L²³⁰I, R³⁷⁴E]不能裂解VAMP2,但LC/T[L²³⁰I, R³⁷⁴E]能够裂解VAMP2E⁷⁸R而且效率高于LC/T(表2)。数据显示,LC/T的S1'口袋结构较不合适,不利于LC/T的R³⁷⁴和VAMP2的E⁷⁸的直接相互作用。

[0096] 表2

[0097] LC/T裂解VAMP2及VAMP2E⁷⁸R的补偿性突变实验结果

| | VAMP2 | | VAMP2 (E ⁷⁸ R) | |
|--|------------------|------------------|---------------------------|------------------|
| | EC ₅₀ | 活性比率 (WT:衍生物) | EC ₅₀ | 活性比率 (WT:衍生物) |
| [0098] LC/T | 120 nM | | >36000 nM | |
| LC/T(L ²³⁰ I) | 5 nM | 24 | 100 nM | >360 |
| LC/T(K ¹⁶⁸ E, L ²³⁰ I) | 1.2 nM | 100 | 24 nM | >1440 |
| LC/T(L ²³⁰ I, R ³⁷⁴ E) | >36000 nM | <1/300 | 50 nM | >720 |

[0099] EC₅₀指裂解50%VAMP2或VAMP2E⁷⁸R所需的LC蛋白浓度。

[0100] 优化S1'及S1底物识别口袋进一步提高LC/T的活性

[0101] 先前的研究确定两个残基有助于提升LC/T的活性(38)。S1口袋残基突变(LC/T[K¹⁶⁸E]),和S3口袋残基突变(LC/T[R¹⁸⁸M]),被发现可提高LC/T的催化活性(38)。本实施例将上述两个突变加到LC/T[L²³⁰I]中以测试这些突变的组合如何影响LC/T的活性。双突变的突变体LC/T[K¹⁶⁸E, L²³⁰I]的k_{cat}数值提高,但其K_m数值没有改变,显示它比原型LC/T(Wt-LC)裂解VAMP2的活性高约100倍(表1,图2A)。三重突变的突变体LC/T[K¹⁶⁸E, L²³⁰I, R¹⁸⁸M]刚未有观察到切割VAMP2的活性。这三个残基均位于LC/T的活性部位,同时突变三个残基可能影响LC/T的正确构象因而丧失活性(表1)。

[0102] LC/T L²³⁰侧链的方向影响识别P1'及P2'位点的优化

[0103] 异亮氨酸和亮氨酸是疏水氨基酸,很可能通过疏水相互作用与VAMP2F⁷⁷产生相互作用。然而,在LC/B和LC/T的情况下,我们发现LC/B和LC/T S1'口袋中的异亮氨酸的相互作用较为显着。这可能是由于该异亮氨酸残基在口袋内具有不同的定向并有利于与VAMP2F⁷⁷的相互作用。LC/B和LC/T S1'口袋的结构分析显示LC/B的I²²⁷的定向比LC/T的L²³⁰更平坦。位于LC/T的亮氨酸较大,可能将VAMP2F⁷⁷残基向外推,从而限制了R³⁷⁴和VAMP2的E⁷⁸之间的相互作用。而LC/B的异亮氨酸的定向更平坦,可以提供最佳位置让VAMP2的F⁷⁷和E⁷⁸嵌合到LC/B的活性部位,因而有利于I²²⁷-F⁷⁷和R³⁷⁰-E⁷⁸的相互作用。

[0104] 本实施例解构了LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]的晶体结构并将之与原型LC/T(WT-LC/T)的晶体结构比较。图3A显示LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]结构中L²³⁰I的Fo-Fc电子密度。LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]与原型LC/T(WT-LC/T)两者的结构可以一致地对齐,均方根差(Root Mean Square Deviation,RMSD)为0.150(即421个原子中有370个对齐),表示LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]的整体构象与原型LC/T(WT-LC/T)相近。LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]亦与原型LC/B(WT-LC/B)的结构一致地对齐,均方根差为0.750(即421个原子中有341个原子对齐)。分析结果显示,LC/T的亮氨酸突变成异亮氨酸将S1'口袋弄平至与LC/B相若的位置(图3)。最重要的是,LC/T的L²³⁰和R³⁷⁴的侧链之间的距离估计为7.2 Å(图4A),LC/B的I²²⁷和R³⁷⁰的侧链之间的距离为7.9 Å(图4B)。当L²³⁰突变成异亮氨酸(L²³⁰I)时,LC/T的I²³⁰和R³⁷⁴侧链之间的距离为8.3 Å(图4C),比原型LC/T(WT-LC/T)的L²³⁰和R³⁷⁴的侧链距离7.2 Å为大(图4A)。这些数据进一步确认识别VAMP2的P1'和P2'位点的效率取决于LC/B和LC/T其S1'和S2'口袋之间的距离。S1'和S2'口袋之间更广阔的空间有利容纳VAMP2的P1'位点残基F⁷⁷和P2'位点残基E⁷⁸进入这两个口袋。

[0105] 表3

[0106] LC/T [K¹⁶⁸E,L²³⁰I]晶体参数衍射数据

[0107]

| | LC/T [K ¹⁶⁸ E, L ²³⁰ I] |
|-------------------------------|---|
| 数据收集 | |
| 空间群 | C222 |
| 晶胞参数(Å) | |
| <i>a</i> | 105.38 |
| <i>b</i> | 176.83 |
| <i>c</i> | 57.36 |
| 分辨范围(Å) | 52.69-2.60 (2.74-2.60) |
| 总反射数目 | 113923 |
| 独立反射数目 | 16451 |
| I/σ | 13.9 (3.9) |
| 完整性(%) | 97.7 (97.4) |
| <i>R</i> _{merge} (%) | 9.5(18.1) |

[0108]

| 结构修正 | |
|--|-------------|
| 分辨范围(Å) | 48.12-2.60 |
| $R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%) | 23.76/26.64 |
| 键长均方根差(Å)/键角(°) | 0.015/1.838 |
| 反射数目 | 15636 |
| 工作集 | 14815 |
| 测试集 | 821 |
| 原子数目 | 3317 |
| 蛋白质原子 | 3179 |
| 水分子 | 138 |
| 平均B因子(Å ²) | |
| 主链 | 34.52 |
| 侧链 | 34.36 |
| 水分子 | 32.88 |

[0109] LC/T、LC/B及其衍生物裂解内源性VAMP2的活性

[0110] 为了测试LC/T衍生物裂解神经细胞中天然底物VAMP2的活性,本实施例将各种LC/T衍生物与取自Neuro2A的细胞裂解物一同温育。如图5A所示,LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]裂解Neuro2A细胞的内源性VAMP2的活性较原型LC/T(Wt-LC/T)的活性高。相近地,如图5B所示,LC/B[S²⁰¹P]裂解内源性VAMP2的活性亦较原型LC/B(Wt-LC/B)的活性高。

[0111] 如图5A和5B的直方图所示,LC/T及LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]裂解内源性VAMP2的活性比LC/B及LC/B[S²⁰¹P]的更低,即使LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]裂解重组VAMP2的活性比原型LC/B(Wt-LC/B)的稍高。神经元复杂的识别VAMP2机制或可解释在此观察的现象。在神经元中,VAMP2与SNAP25和突触融合蛋白1a(syntaxin 1a)形式SNARE复合物。因此,除了VAMP2相对LC/B和LC/T的可及性外,其他因素亦可能影响毒素裂解天然VAMP2的效率。先前有关LC/A的研究发现,除了底物识别区域外,LC/A亦在SNARE复合物以外的其他位点与SNAP25产生相互作用以取得与SNAP25的初始接触(45)。这将需要进一步的研究以找出位于SNARE复合物中的VAMP2是否对LC/B和LC/T有不同的可及性。

[0112] 总括而言,这些数据表明LC/B比LC/T对天然VAMP2底物有更高的裂解活性,意味著LC/B比LC/T更合适于在人类治疗中使用。

[0113] 讨论

[0114] 血清型A轻链(LC/A)的活性位点残基的突变[K¹⁶⁵L],可提高底物水解4倍(44)。此外,S4口袋突变[R¹⁸⁸M],可提高LC/T底物水解大约5倍(38)。本发明提供LC/B和LC/T的比较研究并展示改造梭菌属神经毒素轻链以提高毒素活性的可能性。

[0115] 本发明发现LC/T的S1口袋的赖氨酸(K¹⁶⁸)改变为谷氨酸(E¹⁶⁸)可提高裂解VAMP2的速率至与LC/B相若的水平。

[0116] 优化LC/T底物识别口袋

[0117] 本发明发现,S1'口袋对LC/B和LC/T两种毒素的催化活性最为重要。LC/T的亮氨酸-230(L²³⁰)的侧链比LC/B的异亮氨酸-227(I²²⁷)大,因此不利容纳位于VAMP2P1'和P2'位点的残基,并显著地影响其催化活性(图3-4)。突变体LC/T[L²³⁰I]比原型LC/T(Wt-LC/T)具有高约25倍的催化活性(表2)。

[0118] 本发明的发现说明肉毒杆菌神经毒素各个口袋在识别VAMP2上有密切的关系。例如,未被优化的S1'口袋能影响S2'口袋识别VAMP2。突变体LC/T[L²³⁰I]具有高约25倍的催化活性,而双突变体LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]则具有高约100倍的催化活性(表2)。

[0119] 优化LC/B的S1'和S1底物识别口袋

[0120] LC/B的天然残基异亮氨酸-227(I²²⁷)有利于裂解VAMP2。然而,LC/B的S1口袋中的天然丝氨酸-201(S²⁰¹)似乎比LC/T中相应的脯氨酸残基(P²⁰⁵)较不合适。本发明发现,LC/B[S²⁰¹P]突变可以提高LC/B的活性多于10倍(表1)。

[0121] 比较LC/B和LC/T对重组VAMP2和天然VAMP2的活性

[0122] 本发明发现,LC/T[L²³⁰I]及LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]裂解重组VAMP2的活性比原型毒素的更高(表2)。本研究还发现,LC/T[K¹⁶⁸E,L²³⁰I]裂解Neuro2A细胞中原有的VAMP2的活性比原型毒素更高(图5A)。本发明更具活性的LC/T衍生物可以作为更有用的工具以研究中央神经元的胞吐作用机制。

[0123] 本发明显示LC/B[S²⁰¹P]裂解重组VAMP2的活性比原型毒素的活性高于10倍(表1),对裂解Neuro2A中原有的VAMP2亦具有更高的活性(图5B)。本发明所述LC/B衍生物可以代替现时在各种治疗、化妆品或其它应用中使用的LC/B蛋白,或发展成为新颖疗法以尽量减低BoNT的免疫耐药性。

[0124] 参考:

[0125] 1.Montecucco,C.,and Schiavo,G.(1994)Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins,Mol Microbiol 13,1-8.

[0126] 2.Davletov,B.,Bajohrs,M.,and Binz,T.(2005)Beyond BOTOX:advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins,Trends Neurosci 28,446-452.

[0127] 3.Montecucco,C.,and Schiavo,G.(1993)Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases,Trends Biochem Sci 18,324-327.

[0128] 4.Brunger,A.T.(2005)Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins,Q Rev Biophys 38,1-47.

[0129] 5.Schiavo,G.,Benfenati,F.,Poulain,B.,Rossetto,O.,Polverino de Laureto,P.,DasGupta,B. R.,and Montecucco,C.(1992)Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin,Nature 359,832-835.

[0130] 6.Schiavo,G.,Malizio,C.,Trimble,W.S.,Polverino de Laureto,P.,Milan,G.,Sugiyama,H., Johnson,E.A.,and Montecucco,C.(1994)Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond,J Biol Chem 269, 20213-20216.

[0131] 7.Schiavo,G.,Rossetto,O.,Benfenati,F.,Poulain,B.,and Montecucco,C.(1994)Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus,Ann N Y Acad Sci 710,65-75.

[0132] 8.Glogau,R.G.(2002)Review of the use of botulinum toxin for hyperhidrosis and cosmetic purposes,Clin J Pain 18,S191-197.

[0133] 9.Atassi,M.Z.(2004)Basic immunological aspects of botulinum toxin

therapy, *MovDisord* 19 Suppl 8, S68-84.

[0134] 10. Atassi, M.Z., and Oshima, M. (1999) Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins, *Crit Rev Immunol* 19, 219-260.

[0135] 11. Cheng, C.M., Chen, J.S., and Patel, R.P. (2006) Unlabeled uses of botulinum toxins: a review, part 2, *Am J Health Syst Pharm* 63, 225-232.

[0136] 12. Ascher, B., and Rossi, B. (2004) [Botulinum toxin and wrinkles: few side effects and effective combining procedures with other treatments], *Ann Chir Plast Esthet* 49, 537-552.

[0137] 13. Bell, K.R., and Williams, F. (2003) Use of botulinum toxin type A and type B for spasticity in upper and lower limbs, *Phys Med Rehabil Clin N Am* 14, 821-835.

[0138] 14. Benedetto, A.V. (2004) Commentary: Botulinum toxin in clinical medicine: part II, *Clin Dermatol* 22, 1-2.

[0139] 15. Mahajan, S.T., and Brubaker, L. (2007) Botulinum toxin: from life-threatening disease to novel medical therapy, *Am J Obstet Gynecol* 196, 7-15.

[0140] 16. Mahant, N., Clouston, P.D., and Lorentz, I.T. (2000) The current use of botulinum toxin, *J Clin Neurosci* 7, 389-394.

[0141] 17. Thant, Z.S., and Tan, E.K. (2003) Emerging therapeutic applications of botulinum toxin, *Med Sci Monit* 9, RA40-48.

[0142] 18. Figgitt, D.P., and Noble, S. (2002) Botulinum toxin B: a review of its therapeutic potential in the management of cervical dystonia, *Drugs* 62, 705-722.

[0143] 19. Brashear, A. (2001) Botulinum toxin type B: a new injectable treatment for cervical dystonia, *Expert Opin Investig Drugs* 10, 2191-2199.

[0144] 20. Goschel, H., Wohlfarth, K., Frevert, J., Dengler, R., and Bigalke, H. (1997) Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies—therapeutic consequences, *Exp Neurol* 147, 96-102.

[0145] 21. Dolimbek, B.Z., Jankovic, J., and Atassi, M.Z. (2002) Cross reaction of tetanus and botulinum neurotoxins A and B and the boosting effect of botulinum neurotoxins A and B on a primary anti-tetanus antibody response, *Immunol Invest* 31, 247-262.

[0146] 22. Jankovic, J., Vuong, K.D., and Ahsan, J. (2003) Comparison of efficacy and immunogenicity of original versus current botulinum toxin in cervical dystonia, *Neurology* 60, 1186-1188.

[0147] 23. Atassi, M.Z., and Dolimbek, B.Z. (2004) Mapping of the antibody-binding regions on the HN-domain (residues 449-859) of botulinum neurotoxin A with antitoxin antibodies from four host species. Full profile of the continuous antigenic regions of the H-chain of botulinum neurotoxin A, *Protein J* 23, 39-52.

[0148] 24. Jankovic, J. (2004) Botulinum toxin in clinical practice, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 951-957.

- [0149] 25. Jankovic, J. (2004) Treatment of cervical dystonia with botulinum toxin, *Mov Disord Suppl* 8, S109-115.
- [0150] 26. Jankovic, J. (2006) Botulinum toxin therapy for cervical dystonia, *Neurotox Res* 9, 145-148.
- [0151] 27. Brashear, A., Lew, M.F., Dykstra, D.D., Comella, C.L., Factor, S.A., Rodnitzky, R. L., Trosch, R., Singer, C., Brin, M.F., Murray, J.J., Wallace, J.D., Willmer-Hulme, A., and Koller, M. (1999) Safety and efficacy of NeuroBloc (botulinum toxin type B) in type A- responsive cervical dystonia, *Neurology* 53, 1439-1446.
- [0152] 28. Swope, D., and Barbano, R. (2008) Treatment recommendations and practical applications of botulinum toxin treatment of cervical dystonia, *Neurol Clin* 26 Suppl 1, 54-65.
- [0153] 29. Comella, C.L. (2008) The treatment of cervical dystonia with botulinum toxins, *J Neural Transm* 115, 579-583.
- [0154] 30. Chen, S., and Barbieri, J.T. (2007) Multiple pocket recognition of SNAP25 by botulinum neurotoxin serotype E, *J Biol Chem* 282, 25540-25547.
- [0155] 31. Chen, S., Kim, J.J., and Barbieri, J.T. (2007) Mechanism of substrate recognition by botulinum neurotoxin serotype A, *J Biol Chem* 282, 9621-9627.
- [0156] 32. Chen, S., and Wan, H.Y. Molecular mechanisms of substrate recognition and specificity of botulinum neurotoxin serotype F, *Biochem J* 433, 277-284.
- [0157] 33. Chen, S., Hall, C., and Barbieri, J.T. (2008) Substrate recognition of VAMP-2 by botulinum neurotoxin B and tetanus neurotoxin, *J Biol Chem* 283, 21153-21159.
- [0158] 34. Powell, H.R. (1999) The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1690-1695.
- [0159] 35. (2008) Molecular replacement. Proceedings of the CCP4 study weekend, University of Reading, United Kingdom, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64, 1-140.
- [0160] 36. Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003) A graphical user interface to the CCP4 program suite, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1131-1137.
- [0161] 37. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- [0162] 38. Chen, S., Karalewitz, A.P., and Barbieri, J.T. (2012) Insights into the different catalytic activities of Clostridium neurotoxins, *Biochemistry* 51, 3941-3947.
- [0163] 39. Dolimbek, B.Z., Aoki, K.R., Steward, L.E., Jankovic, J., and Atassi, M.Z. (2007) Mapping of the regions on the heavy chain of botulinum neurotoxin A (BoNT/A) recognized by antibodies of cervical dystonia patients with

immuno-resistance to BoNT/A, *Mol Immunol* 44, 1029–1041.

[0164] 40. Atassi, M.Z., Dolimbek, B.Z., Jankovic, J., Steward, L.E., and Aoki, K.R. (2008) Molecular recognition of botulinum neurotoxin B heavy chain by human antibodies from cervical dystonia patients that develop immuno-resistance to toxin treatment, *Mol Immunol* 45, 3878–3888.

[0165] 41. Atassi, M.Z., Jankovic, J., Steward, L.E., Aoki, K.R., and Dolimbek, B.Z. (2012) Molecular immune recognition of botulinum neurotoxin B. The light chain regions that bind human blocking antibodies from toxin-treated cervical dystonia patients. Antigenic structure of the entire BoNT/B molecule, *Immunobiology* 217, 17–27.

[0166] 42. Dolimbek, B.Z., Aoki, K.R., and Atassi, M.Z. (2011) Reduction of antibody response against botulinum neurotoxin A by synthetic monomethoxypolyethyleneglycol-peptide conjugates, *Immunol Lett* 137, 46–52.

[0167] 43. Foster, K.A. (2009) Engineered toxins: new therapeutics, *Toxicon* 54, 587–592.

[0168] 44. Ahmed, S.A., Olson, M.A., Ludivico, M.L., Gilsdorf, J., and Smith, L.A. (2008) Identification of residues surrounding the active site of type A botulinum neurotoxin important for substrate recognition and catalytic activity, *Protein J* 27, 151–162.

[0169] 45. Chen, S., and Barbieri, J.T. (2011) Association of botulinum neurotoxin serotype A light chain with plasma membrane-bound SNAP-25, *J Biol Chem* 286, 15067–15072.

序列表

<110> 香港理工大学

<120> 高催化活性的基因改造梭菌属神经毒素

<130> 1845-PCT-CN

<140>

<141>

<150> PCT/CN2014/084725

<151> 2014-08-19

<150> 61/868,560

<151> 2013-08-21

<160> 5

<210> 1

<211> 440

<212> PRT

<213> 肉毒杆菌

[0001] <220>

<221>

<222>

<223> 肉毒杆菌神经毒素B轻链的氨基酸序列

<400> 1

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp
1 5 10 15

Asn Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr
20 25 30

Gly Arg Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile
35 40 45

Ile Pro Glu Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn
50 55 60

Lys Ser Ser Gly Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp
65 70 75

Pro Asp Tyr Leu Asn Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln
80 85 90

Thr Met Ile Lys Leu Phe Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly
95 100 105

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Glu | Lys | Leu | Leu | Glu | Met | Ile | Ile | Asn | Gly | Ile | Pro | Tyr | Leu | Gly | |
| | | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 | |
| | Asp | Arg | Arg | Val | Pro | Leu | Glu | Glu | Phe | Asn | Thr | Asn | Ile | Ala | Ser | |
| | | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 | |
| | Val | Thr | Val | Asn | Lys | Leu | Ile | Ser | Asn | Pro | Gly | Glu | Val | Glu | Arg | |
| | | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 | |
| | Lys | Lys | Gly | Ile | Phe | Ala | Asn | Leu | Ile | Ile | Phe | Gly | Pro | Gly | Pro | |
| | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | 165 | |
| | Val | Leu | Asn | Glu | Asn | Glu | Thr | Ile | Asp | Ile | Gly | Ile | Gln | Asn | His | |
| | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | 180 | |
| | Phe | Ala | Ser | Arg | Glu | Gly | Phe | Gly | Gly | Ile | Met | Gln | Met | Lys | Phe | |
| | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | 195 | |
| | Cys | Pro | Glu | Tyr | Val | Ser | Val | Phe | Asn | Asn | Val | Gln | Glu | Asn | Lys | |
| | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 | |
| | Gly | Ala | Ser | Ile | Phe | Asn | Arg | Arg | Gly | Tyr | Phe | Ser | Asp | Pro | Ala | |
| | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | |
| | Leu | Ile | Leu | Met | His | Glu | Leu | Ile | His | Val | Leu | His | Gly | Leu | Tyr | |
| | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| [0002] | Gly | Ile | Lys | Val | Asp | Asp | Leu | Pro | Ile | Val | Pro | Asn | Glu | Lys | Lys | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Phe | Phe | Met | Gln | Ser | Thr | Asp | Ala | Ile | Gln | Ala | Glu | Glu | Leu | Tyr | |
| | | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| | Thr | Phe | Gly | Gly | Gln | Asp | Pro | Ser | Ile | Ile | Thr | Pro | Ser | Thr | Asp | |
| | | | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | |
| | Lys | Ser | Ile | Tyr | Asp | Lys | Val | Leu | Gln | Asn | Phe | Arg | Gly | Ile | Val | |
| | | | | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | |
| | Asp | Arg | Leu | Asn | Lys | Val | Leu | Val | Cys | Ile | Ser | Asp | Pro | Asn | Ile | |
| | | | | | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | |
| | Asn | Ile | Asn | Ile | Tyr | Lys | Asn | Lys | Phe | Lys | Asp | Lys | Tyr | Lys | Phe | |
| | | | | | 320 | | | | | 325 | | | | | 330 | |
| | Val | Glu | Asp | Ser | Glu | Gly | Lys | Tyr | Ser | Ile | Asp | Val | Glu | Ser | Phe | |
| | | | | | 335 | | | | | 340 | | | | | 345 | |
| | Asp | Lys | Leu | Tyr | Lys | Ser | Leu | Met | Phe | Gly | Phe | Thr | Glu | Thr | Asn | |
| | | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | 360 | |
| | Ile | Ala | Glu | Asn | Tyr | Lys | Ile | Lys | Thr | Arg | Ala | Ser | Tyr | Phe | Ser | |
| | | | | | 365 | | | | | 370 | | | | | 375 | |
| | Asp | Ser | Leu | Pro | Pro | Val | Lys | Ile | Lys | Asn | Leu | Leu | Asp | Asn | Glu | |

| | | | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----|--|-----|
| | 380 | | 385 | | 390 |
| Ile Tyr Thr Ile | Glu Glu Gly Phe Asn | Ile Ser Asp Lys Asp | Met | | |
| | 395 | 400 | 405 | | |
| Glu Lys Glu Tyr | Arg Gly Gln Asn Lys | Ala Ile Asn Lys Gln | Ala | | |
| | 410 | 415 | 420 | | |
| Tyr Glu Glu Ile | Ser Lys Glu His Leu | Ala Val Tyr Lys Ile | Gln | | |
| | 425 | 430 | 435 | | |
| Met Cys Lys Ser | Val | | | | |
| | 440 | | | | |

<210> 2
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221>
 <222>
 <223> 肉毒杆菌神经毒素B轻链的衍生物的氨基酸序列

 <400> 2

[0003]

| | | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| Met Pro Val Thr | Ile Asn Asn Phe Asn Tyr | Asn Asp Pro Ile Asp |
| 1 | 5 | 10 15 |
| Asn Asn Asn Ile | Ile Met Met Glu Pro | Pro Phe Ala Arg Gly Thr |
| | 20 | 25 30 |
| Gly Arg Tyr Tyr | Lys Ala Phe Lys Ile | Thr Asp Arg Ile Trp Ile |
| | 35 | 40 45 |
| Ile Pro Glu Arg | Tyr Thr Phe Gly Tyr | Lys Pro Glu Asp Phe Asn |
| | 50 | 55 60 |
| Lys Ser Ser Gly | Ile Phe Asn Arg Asp | Val Cys Glu Tyr Tyr Asp |
| | 65 | 70 75 |
| Pro Asp Tyr Leu | Asn Thr Asn Asp Lys | Lys Asn Ile Phe Leu Gln |
| | 80 | 85 90 |
| Thr Met Ile Lys | Leu Phe Asn Arg Ile | Lys Ser Lys Pro Leu Gly |
| | 95 | 100 105 |
| Glu Lys Leu Leu | Glu Met Ile Ile Asn | Gly Ile Pro Tyr Leu Gly |
| | 110 | 115 120 |
| Asp Arg Arg Val | Pro Leu Glu Glu Phe | Asn Thr Asn Ile Ala Ser |
| | 125 | 130 135 |

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| | Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn Pro Gly Glu Val Glu Arg | 140 | 145 | 150 |
| | Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile Phe Gly Pro Gly Pro | 155 | 160 | 165 |
| | Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly Ile Gln Asn His | 170 | 175 | 180 |
| | Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln Met Lys Phe | 185 | 190 | 195 |
| | Cys Pro Glu Tyr Val Pro Val Phe Asn Asn Val Gln Glu Asn Lys | 200 | 205 | 210 |
| | Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro Ala | 215 | 220 | 225 |
| | Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr | 230 | 235 | 240 |
| | Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys | 245 | 250 | 255 |
| | Phe Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr | 260 | 265 | 270 |
| [0004] | Thr Phe Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp | 275 | 280 | 285 |
| | Lys Ser Ile Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val | 290 | 295 | 300 |
| | Asp Arg Leu Asn Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile | 305 | 310 | 315 |
| | Asn Ile Asn Ile Tyr Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe | 320 | 325 | 330 |
| | Val Glu Asp Ser Glu Gly Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe | 335 | 340 | 345 |
| | Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn | 350 | 355 | 360 |
| | Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser | 365 | 370 | 375 |
| | Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys Asn Leu Leu Asp Asn Glu | 380 | 385 | 390 |
| | Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile Ser Asp Lys Asp Met | 395 | 400 | 405 |
| | Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile Asn Lys Gln Ala | | | |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| | 410 | 415 | 420 |
| | Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr Lys Ile Gln | | |
| | 425 | 430 | 435 |
| | Met Cys Lys Ser Val | | |
| | 440 | | |
| | <210> 3 | | |
| | <211> 436 | | |
| | <212> PRT | | |
| | <213> 破傷風梭菌 | | |
| | <220> | | |
| | <221> | | |
| | <222> | | |
| | <223> 破伤风神经毒素轻链的氨基酸序列 | | |
| | <400> 3 | | |
| | Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn | | |
| | 1 5 10 15 | | |
| | Asn Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu | | |
| | 20 25 30 | | |
| [0005] | Asp Ile Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile | | |
| | 35 40 45 | | |
| | Val Pro Glu Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn | | |
| | 50 55 60 | | |
| | Pro Pro Ser Ser Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro | | |
| | 65 70 75 | | |
| | Asn Tyr Leu Arg Thr Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr | | |
| | 80 85 90 | | |
| | Met Val Lys Leu Phe Asn Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu | | |
| | 95 100 105 | | |
| | Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn | | |
| | 110 115 120 | | |
| | Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val | | |
| | 125 130 135 | | |
| | Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro Ser Gly Ala Thr Thr Lys | | |
| | 140 145 150 | | |
| | Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe Gly Pro Gly Pro Val | | |
| | 155 160 165 | | |

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu Arg Val Asp Asn | 170 | 175 | 180 |
| Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser Ile Met Gln | 185 | 190 | 195 |
| Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn Val Ile | 200 | 205 | 210 |
| Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe Gln | 215 | 220 | 225 |
| Asp Pro Ala Leu Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His | 230 | 235 | 240 |
| Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser | 245 | 250 | 255 |
| Lys Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu | 260 | 265 | 270 |
| Glu Leu Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile | 275 | 280 | 285 |
| Asp Ile Lys Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys | 290 | 295 | 300 |
| [0006] Ala Ile Ala Asn Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro | 305 | 310 | 315 |
| Asn Ile Asp Ile Asp Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr | 320 | 325 | 330 |
| Gln Phe Asp Lys Asp Ser Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp | 335 | 340 | 345 |
| Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu | 350 | 355 | 360 |
| Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr | 365 | 370 | 375 |
| Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys Ile Pro Asn Leu Leu Asp | 380 | 385 | 390 |
| Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe Asn Ile Glu Ser Lys | 395 | 400 | 405 |
| Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met Arg Val Asn Thr | 410 | 415 | 420 |
| Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val Ser Lys Leu | 425 | 430 | 435 |
| Ile | | | |

<210> 4
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221>
 <222>
 <223> 破伤风神经毒素轻链的衍生物的氨基酸序列

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Met | Pro | Ile | Thr | Ile | Asn | Asn | Phe | Arg | Tyr | Ser | Asp | Pro | Val | Asn | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Asn | Asp | Thr | Ile | Ile | Met | Met | Glu | Pro | Pro | Tyr | Cys | Lys | Gly | Leu | |
| | | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| | Asp | Ile | Tyr | Tyr | Lys | Ala | Phe | Lys | Ile | Thr | Asp | Arg | Ile | Trp | Ile | |
| | | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | |
| | Val | Pro | Glu | Arg | Tyr | Glu | Phe | Gly | Thr | Lys | Pro | Glu | Asp | Phe | Asn | |
| | | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | |
| [0007] | Pro | Pro | Ser | Ser | Leu | Ile | Glu | Gly | Ala | Ser | Glu | Tyr | Tyr | Asp | Pro | |
| | | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | |
| | Asn | Tyr | Leu | Arg | Thr | Asp | Ser | Asp | Lys | Asp | Arg | Phe | Leu | Gln | Thr | |
| | | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 | |
| | Met | Val | Lys | Leu | Phe | Asn | Arg | Ile | Lys | Asn | Asn | Val | Ala | Gly | Glu | |
| | | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | 105 | |
| | Ala | Leu | Leu | Asp | Lys | Ile | Ile | Asn | Ala | Ile | Pro | Tyr | Leu | Gly | Asn | |
| | | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 | |
| | Ser | Tyr | Ser | Leu | Leu | Asp | Lys | Phe | Asp | Thr | Asn | Ser | Asn | Ser | Val | |
| | | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 | |
| | Ser | Phe | Asn | Leu | Leu | Glu | Gln | Asp | Pro | Ser | Gly | Ala | Thr | Thr | Lys | |
| | | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 | |
| | Ser | Ala | Met | Leu | Thr | Asn | Leu | Ile | Ile | Phe | Gly | Pro | Gly | Pro | Val | |
| | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | 165 | |
| | Leu | Asn | Lys | Asn | Glu | Val | Arg | Gly | Ile | Val | Leu | Arg | Val | Asp | Asn | |
| | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | 180 | |
| | Lys | Asn | Tyr | Phe | Pro | Cys | Arg | Asp | Gly | Phe | Gly | Ser | Ile | Met | Gln | |
| | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | 195 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Met | Ala | Phe | Cys | Pro | Glu | Tyr | Val | Pro | Thr | Phe | Asp | Asn | Val | Ile | |
| | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 | |
| | Glu | Asn | Ile | Thr | Ser | Leu | Thr | Ile | Gly | Lys | Ser | Lys | Tyr | Phe | Gln | |
| | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | |
| | Asp | Pro | Ala | Leu | Ile | Leu | Met | His | Glu | Leu | Ile | His | Val | Leu | His | |
| | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | Gly | Leu | Tyr | Gly | Met | Gln | Val | Ser | Ser | His | Glu | Ile | Ile | Pro | Ser | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Lys | Gln | Glu | Ile | Tyr | Met | Gln | His | Thr | Tyr | Pro | Ile | Ser | Ala | Glu | |
| | | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| | Glu | Leu | Phe | Thr | Phe | Gly | Gly | Gln | Asp | Ala | Asn | Leu | Ile | Ser | Ile | |
| | | | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | |
| | Asp | Ile | Lys | Asn | Asp | Leu | Tyr | Glu | Lys | Thr | Leu | Asn | Asp | Tyr | Lys | |
| | | | | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | |
| | Ala | Ile | Ala | Asn | Lys | Leu | Ser | Gln | Val | Thr | Ser | Cys | Asn | Asp | Pro | |
| | | | | | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | |
| | Asn | Ile | Asp | Ile | Asp | Ser | Tyr | Lys | Gln | Ile | Tyr | Gln | Gln | Lys | Tyr | |
| | | | | | 320 | | | | | 325 | | | | | 330 | |
| [0008] | Gln | Phe | Asp | Lys | Asp | Ser | Asn | Gly | Gln | Tyr | Ile | Val | Asn | Glu | Asp | |
| | | | | | 335 | | | | | 340 | | | | | 345 | |
| | Lys | Phe | Gln | Ile | Leu | Tyr | Asn | Ser | Ile | Met | Tyr | Gly | Phe | Thr | Glu | |
| | | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | 360 | |
| | Ile | Glu | Leu | Gly | Lys | Lys | Phe | Asn | Ile | Lys | Thr | Arg | Leu | Ser | Tyr | |
| | | | | | 365 | | | | | 370 | | | | | 375 | |
| | Phe | Ser | Met | Asn | His | Asp | Pro | Val | Lys | Ile | Pro | Asn | Leu | Leu | Asp | |
| | | | | | 380 | | | | | 385 | | | | | 390 | |
| | Asp | Thr | Ile | Tyr | Asn | Asp | Thr | Glu | Gly | Phe | Asn | Ile | Glu | Ser | Lys | |
| | | | | | 395 | | | | | 400 | | | | | 405 | |
| | Asp | Leu | Lys | Ser | Glu | Tyr | Lys | Gly | Gln | Asn | Met | Arg | Val | Asn | Thr | |
| | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | | 420 | |
| | Asn | Ala | Phe | Arg | Asn | Val | Asp | Gly | Ser | Gly | Leu | Val | Ser | Lys | Leu | |
| | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | 435 | |
| | Ile | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 436 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |

<213> 人工序列

<220>

<221>

<222>

<223> 破伤风神经毒素轻链的衍生物的氨基酸序列

<400> 5

[0009]

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn
1 5 10 15

Asn Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu
20 25 30

Asp Ile Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile
35 40 45

Val Pro Glu Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn
50 55 60

Pro Pro Ser Ser Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro
65 70 75

Asn Tyr Leu Arg Thr Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr
80 85 90

Met Val Lys Leu Phe Asn Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu
95 100 105

Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn
110 115 120

Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val
125 130 135

Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro Ser Gly Ala Thr Thr Lys
140 145 150

Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe Gly Pro Gly Pro Val
155 160 165

Leu Asn Glu Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu Arg Val Asp Asn
170 175 180

Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser Ile Met Gln
185 190 195

Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn Val Ile
200 205 210

Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe Gln
215 220 225

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Asp | Pro | Ala | Leu | Ile | Leu | Met | His | Glu | Leu | Ile | His | Val | Leu | His | |
| | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | Gly | Leu | Tyr | Gly | Met | Gln | Val | Ser | Ser | His | Glu | Ile | Ile | Pro | Ser | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Lys | Gln | Glu | Ile | Tyr | Met | Gln | His | Thr | Tyr | Pro | Ile | Ser | Ala | Glu | |
| | | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| | Glu | Leu | Phe | Thr | Phe | Gly | Gly | Gln | Asp | Ala | Asn | Leu | Ile | Ser | Ile | |
| | | | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | |
| | Asp | Ile | Lys | Asn | Asp | Leu | Tyr | Glu | Lys | Thr | Leu | Asn | Asp | Tyr | Lys | |
| | | | | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | |
| | Ala | Ile | Ala | Asn | Lys | Leu | Ser | Gln | Val | Thr | Ser | Cys | Asn | Asp | Pro | |
| | | | | | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | |
| | Asn | Ile | Asp | Ile | Asp | Ser | Tyr | Lys | Gln | Ile | Tyr | Gln | Gln | Lys | Tyr | |
| | | | | | 320 | | | | | 325 | | | | | 330 | |
| [0010] | Gln | Phe | Asp | Lys | Asp | Ser | Asn | Gly | Gln | Tyr | Ile | Val | Asn | Glu | Asp | |
| | | | | | 335 | | | | | 340 | | | | | 345 | |
| | Lys | Phe | Gln | Ile | Leu | Tyr | Asn | Ser | Ile | Met | Tyr | Gly | Phe | Thr | Glu | |
| | | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | 360 | |
| | Ile | Glu | Leu | Gly | Lys | Lys | Phe | Asn | Ile | Lys | Thr | Arg | Leu | Ser | Tyr | |
| | | | | | 365 | | | | | 370 | | | | | 375 | |
| | Phe | Ser | Met | Asn | His | Asp | Pro | Val | Lys | Ile | Pro | Asn | Leu | Leu | Asp | |
| | | | | | 380 | | | | | 385 | | | | | 390 | |
| | Asp | Thr | Ile | Tyr | Asn | Asp | Thr | Glu | Gly | Phe | Asn | Ile | Glu | Ser | Lys | |
| | | | | | 395 | | | | | 400 | | | | | 405 | |
| | Asp | Leu | Lys | Ser | Glu | Tyr | Lys | Gly | Gln | Asn | Met | Arg | Val | Asn | Thr | |
| | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | | 420 | |
| | Asn | Ala | Phe | Arg | Asn | Val | Asp | Gly | Ser | Gly | Leu | Val | Ser | Lys | Leu | |
| | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | 435 | |
| | Ile | | | | | | | | | | | | | | | |

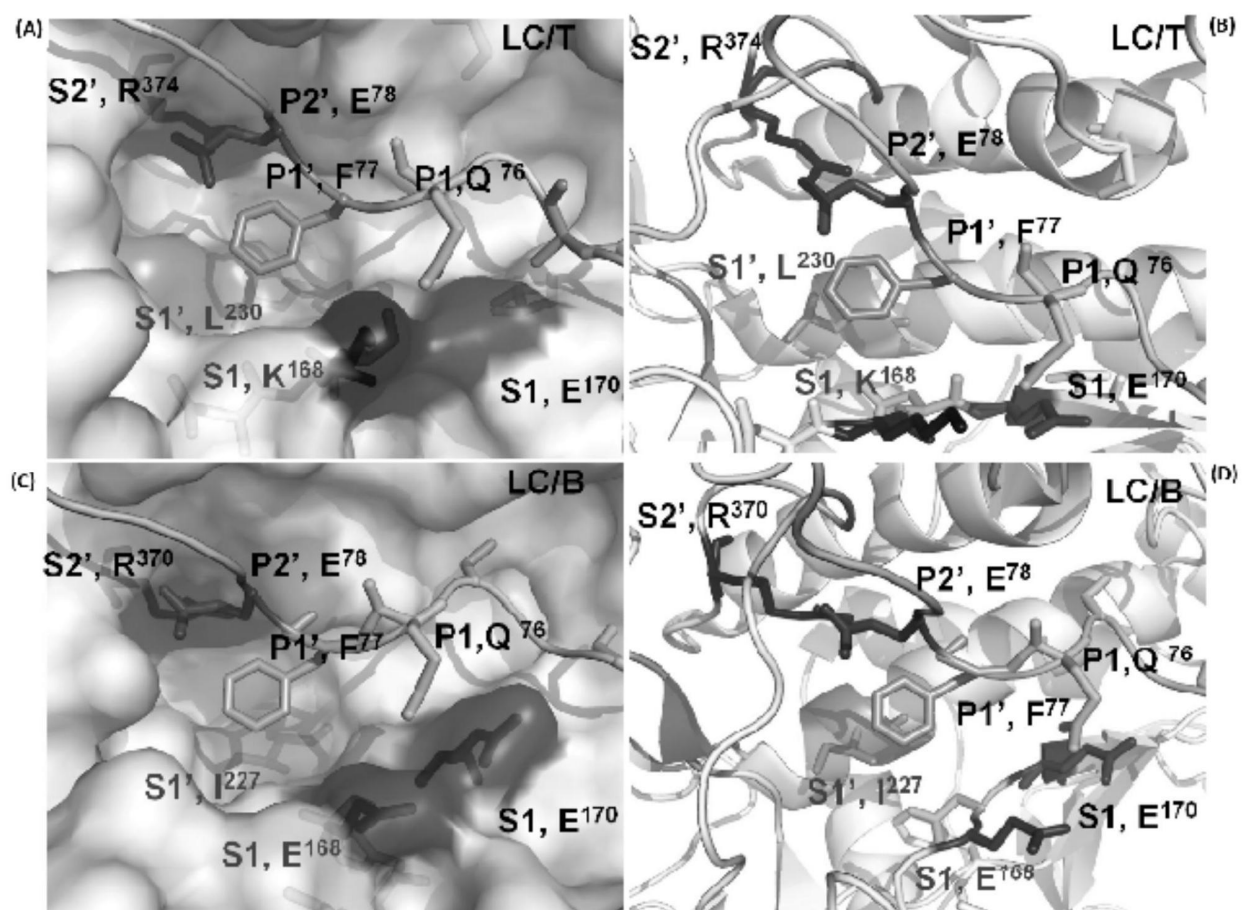


图1

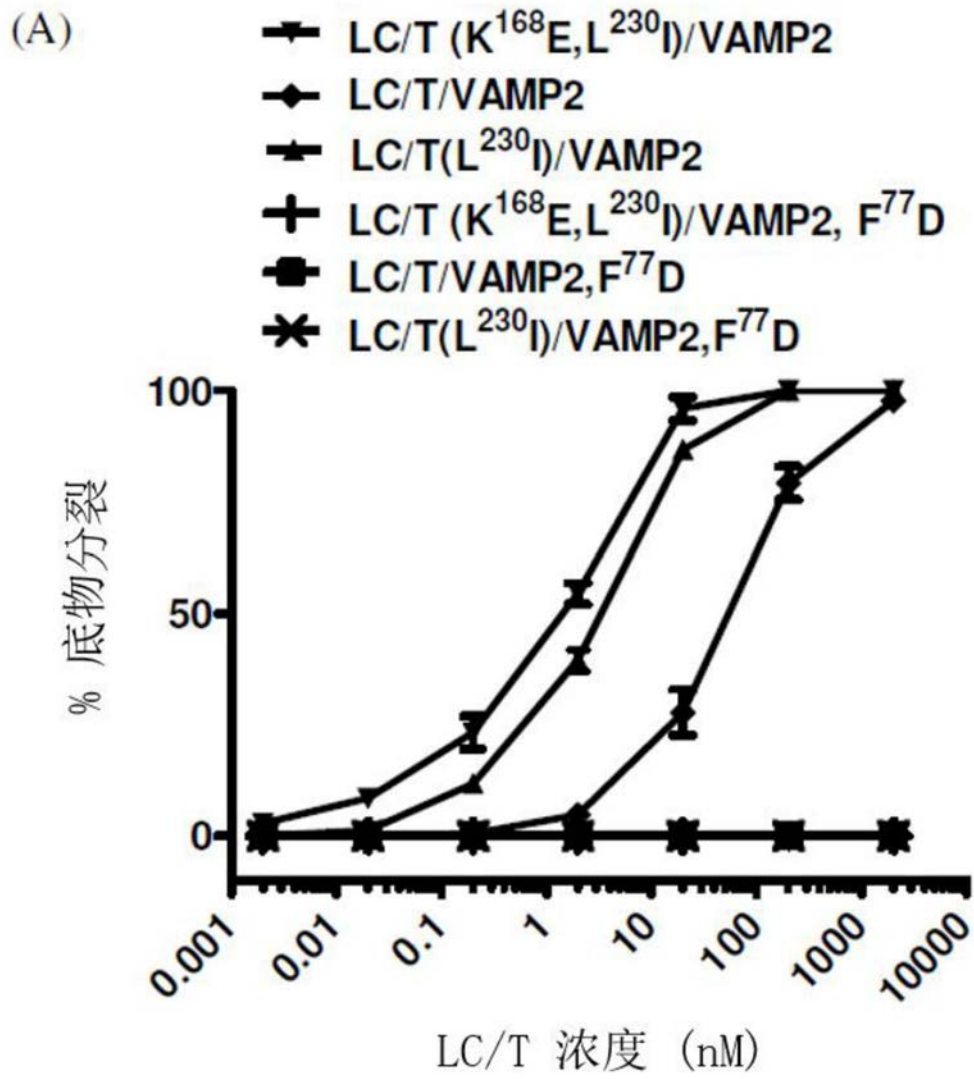


图2

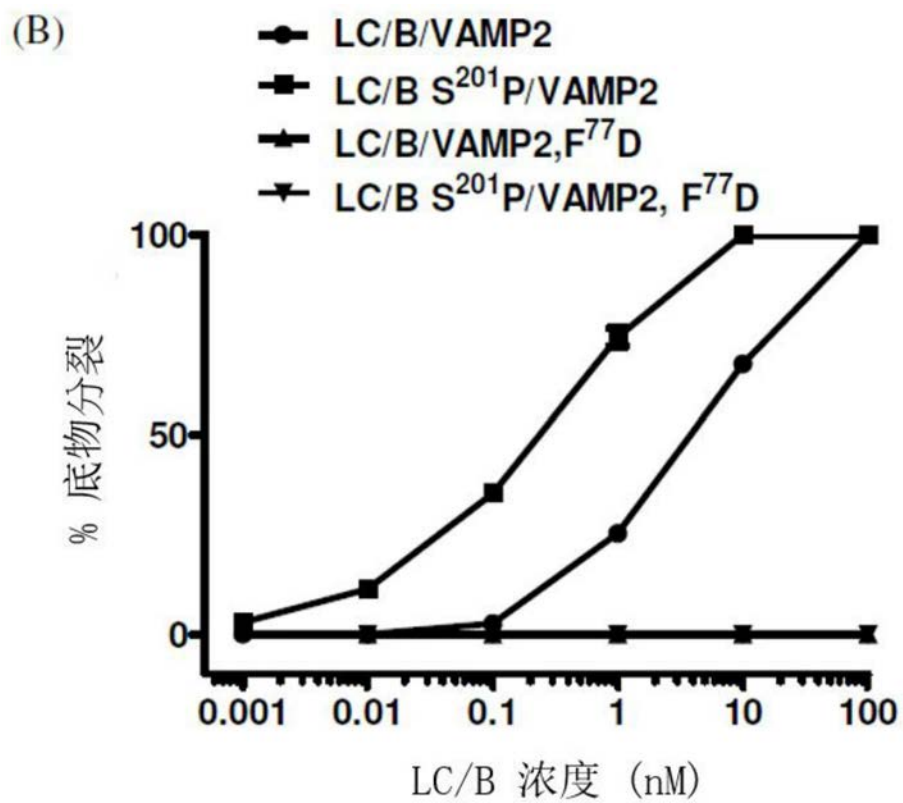


图2(续上页)

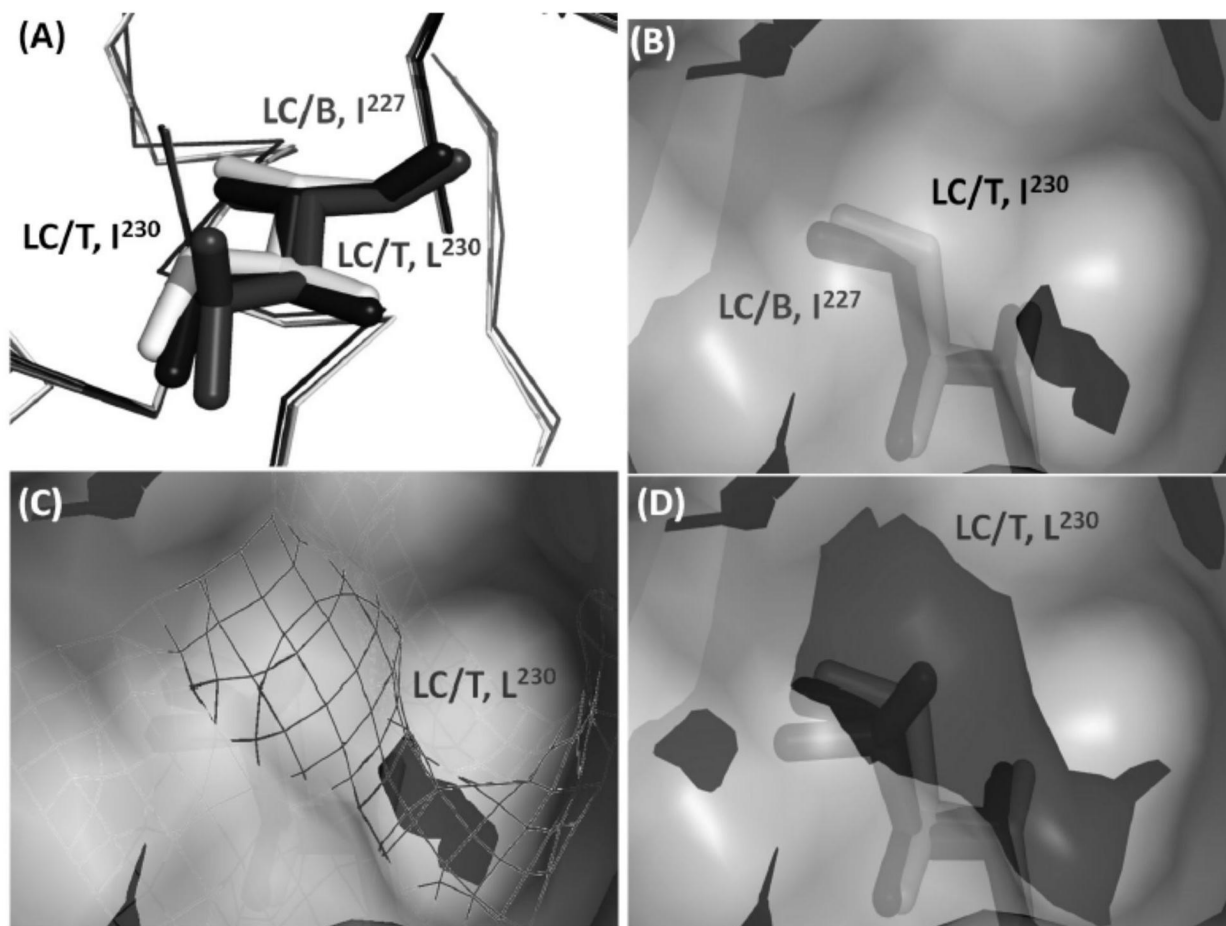


图3

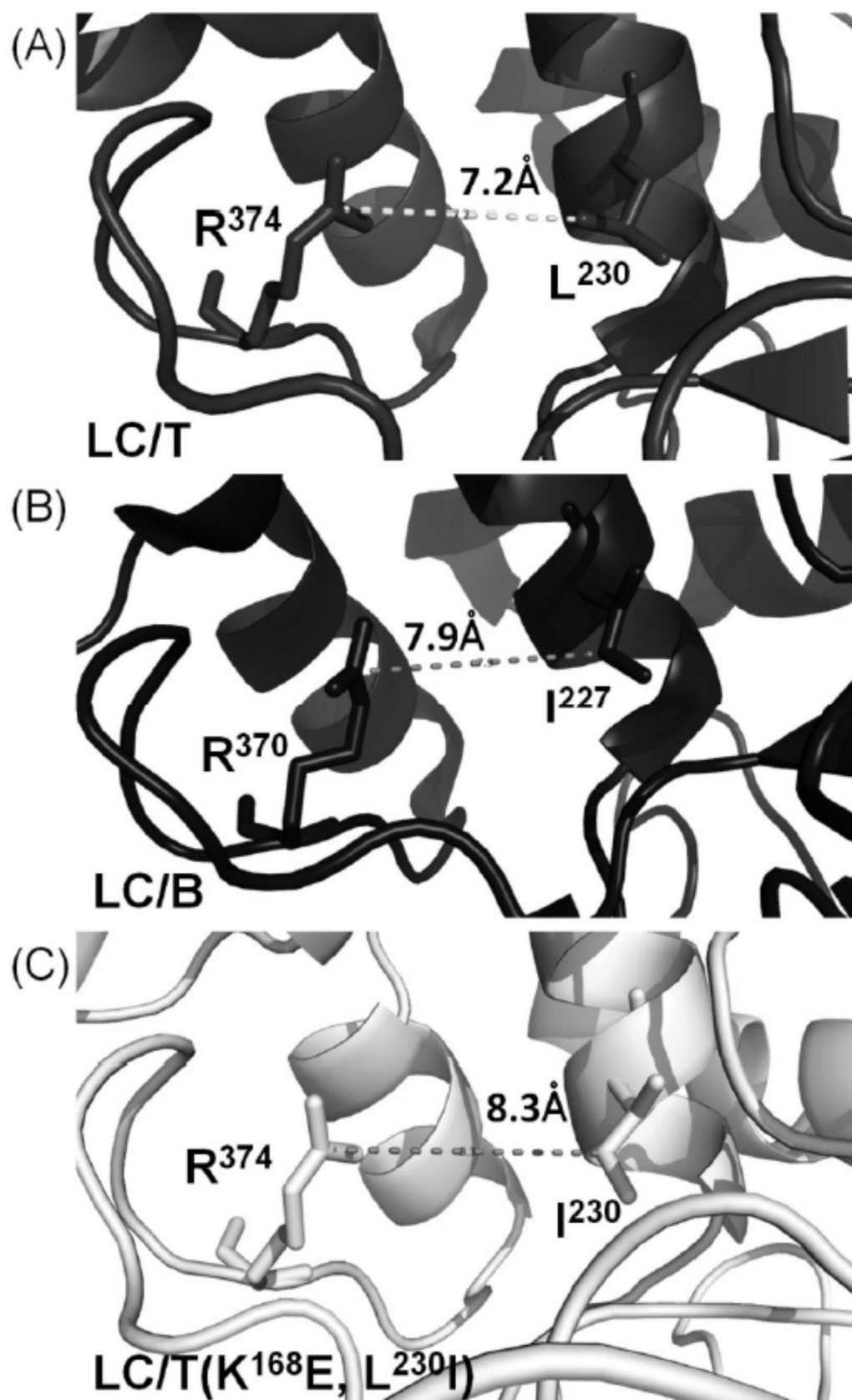


图4

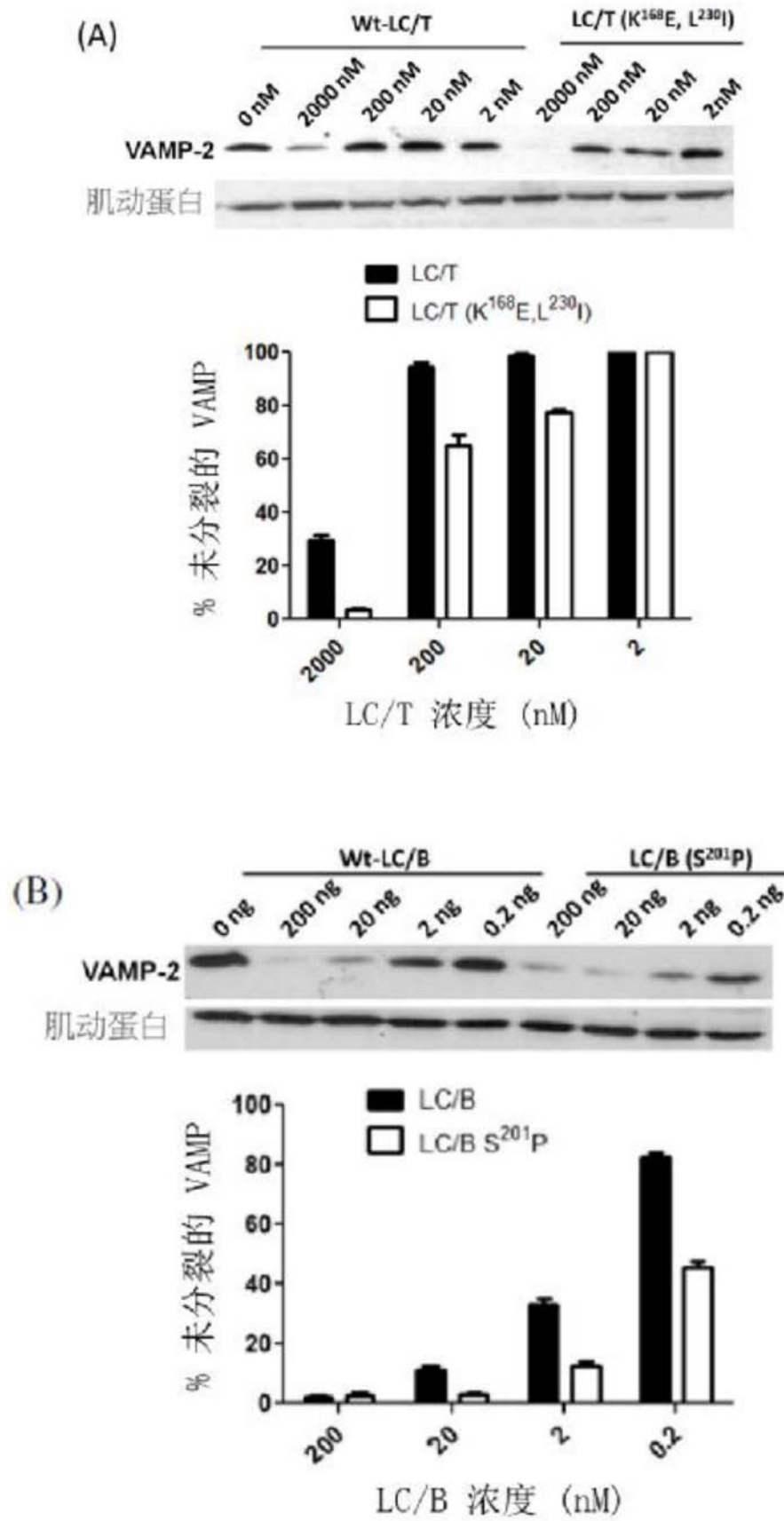


图5