



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101906152 A

(43) 申请公布日 2010.12.08

(21) 申请号 200910205690.3

(22) 申请日 2005.06.28

(30) 优先权数据

2004-189801 2004.06.28 JP

2004-295405 2004.10.07 JP

(62) 分案原申请数据

200580029185.8 2005.06.28

(71) 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 西川喜代孝

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈昕

(51) Int. Cl.

*C07K 14/00* (2006.01)

*A61K 38/16* (2006.01)

*A61P 39/02* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 7 页

(54) 发明名称

STX2 抑制性肽以及 Vero 毒素中和剂

(57) 摘要

本发明涉及 STX2 抑制性肽以及 Vero 毒素中和剂;STX2 抑制性肽,其特征在于,在 3 分子的赖氨酸 (Lys) 的结合了肽的分子核结构部分上形成至少 7 个氨基酸的肽键所构成的肽基序,该肽基序是在序列上有 2 处至少 2 个碱性氨基酸结合的簇部,在 C-末端侧引入了碱性氨基酸。

1. STX2抑制性肽,其特征在于,在3分子的赖氨酸(Lys)的结合了肽的分子核结构部分上形成至少7个氨基酸的肽键所构成的肽基序,该肽基序是在序列上有2处至少2个碱性氨基酸结合的簇部,在C-末端侧引入了碱性氨基酸。

2. 权利要求1的STX2抑制性肽,其特征在于,作为簇部的碱性氨基酸至少含有精氨酸(Arg)。

3. 权利要求2的STX2抑制性肽,其特征在于,簇部是Arg-Arg或者Arg-Arg-Asn。

4. 权利要求1~3中任一项的STX2抑制性肽,其特征在于,N-末端侧是疏水性氨基酸。

5. 权利要求1~3中任一项的STX2抑制性肽,其特征在于,引入了下述4种氨基酸序列的肽基序中的至少一种:

(1)FRRNRRN(序列号1)

(2)PPRRRRR(序列号2)

(3)PPRRNRR(序列号3)

(4)KRRNPRR(序列号4)。

6. 权利要求1~5中任一项的STX2抑制性肽,其特征在于,肽基序通过间隔分子被结合入。

7. 权利要求6的STX2抑制性肽,其特征在于,间隔分子是具有肽或者氨基和羧基的、具有碳原子数4~10个的烃链结构的分子。

8. 权利要求1~7中任一项的STX2抑制性肽,其特征在于,肽基序具有末端修饰分子。

9. 权利要求8的肽,其特征在于,末端修饰分子是不具有电荷的分子。

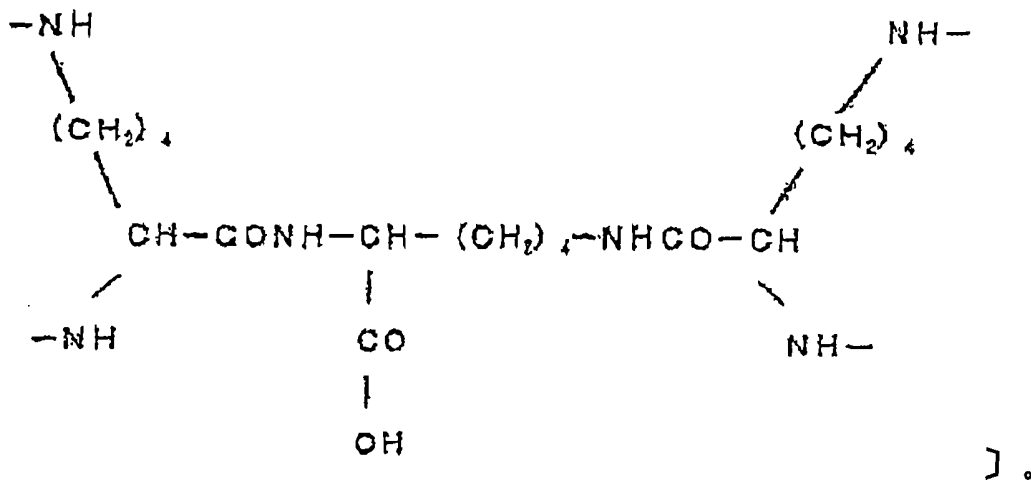
10. 权利要求1的肽,其特征在于,肽基序也可以具有氨基酸测序用分子。

11. 下式(a)(b)任一项表示的权利要求8或者9的肽:

(Met-Ala-Xo-Ala-AHA-)<sub>4</sub>-3Lys (a)

(乙酰-Xo-AHA-)<sub>4</sub>-3Lys (b)

(式中,AHA表示氨基己烷羧酸基,Xo表示前述的肽基序(1)(2)(3)(4)的任何一个,3Lyos表示下式的结构:



12. Vero 毒素中和剂,其特征在于,含有权利要求1~11中任一项的肽作为有效成分。

## STX2 抑制性肽以及 Vero 毒素中和剂

[0001] 本发明为申请号 200580029185.8、申请日 2005 年 6 月 28 日、发明名称“毒素中和性肽的筛选方法和 STX2 抑制性肽以及 Vero 毒素中和剂”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及能够抑制 Vero 毒素或者霍乱毒素、百日咳毒素等毒素的毒素中和性肽的筛选方法。

[0003] 此外,本发明还涉及 STX2 抑制性肽和 Vero 毒素中和剂。此外,更具体地讲,涉及竞争性地抑制 Vero 毒素向细胞的附着、能够有效地抑制 Vero 毒素的 STX2 抑制性肽、和能够经口给予的新型的 Vero 毒素中和剂。

### 背景技术

[0004] 肠道出血性大肠杆菌 O157:H7 产生的 Vero 毒素是属于与来自赤痢菌的志贺毒素类似的细菌毒素的 AB<sub>5</sub> 家族的蛋白质,已知这些毒素,识别各种目的脏器的血管内皮细胞上的球丙糖酰基鞘氨醇 (globotriaosylceramide, Gb<sub>3</sub>, Gal α -4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) 中的 globo 三糖部分,通过附着摄取到细胞内,显示出毒性。

[0005] 并且,这样的志贺样毒素存在 2 种,这些毒素能够引起毒素出血性大肠炎或者其后的一系列的微小血管障碍这样的严重并发症(例如:溶血性尿毒综合症(HUS))等。作为 STX1 所表示的毒素,与志贺氏赤痢菌(*Shigella dysenteriae* Type I)产生的志贺毒素具有相同的氨基酸序列。另一方面,STX2 所表示的毒素被认定与 STX1 具有 50%~60%的氨基酸序列一致性。它们的毒性虽然在它们的氨基酸序列上稍有差别,不过通过蛋白质合成抑制展示出细胞毒性或者肠道毒性等活性。Stx 是由 2 种亚单位(A 和 B)构成的 AB<sub>5</sub> 型的毒素,1 分子的 A 亚单位周围通过疏水键包围着 5 分子的 B 亚单位。承担毒素活性的是 A 亚单位,B 亚单位承担着与细胞表面上存在的糖链受体结合的作用。通过毒素的 X 射线结晶结构分析等得到详细的研究可知,在 1 分子的 B 亚单位中存在 3 个糖链结合部位。即,根据在 1 分子的 STX2 中存在 5 分子的 B 亚单位,可以推测能够提供共计 15 个结合部位。

[0006] 即,STX 分类成 STX1 和 STX2 的两个家族,引起严重综合症的几乎都是 STX2 产生菌,在临床上 STX2 这一方面更加重要。所以,当务之急是开发针对 STX2 的抑制剂。这些 STX 以 A-B<sub>5</sub> 型毒素形式,其中的 B 亚单位通过与细胞膜上的受体 Gb<sub>3</sub>(globotriaosylceramide: Gal α (1-4)-Gal β (1-4)-Glc β 1-Ceramide) 的结合被摄取到细胞内部。此外,B 亚单位五聚体特异地识别 Gb<sub>3</sub> 的糖链部分(Globo 三糖:Gal α (1-4)-Gal β (1-4)-Glc β 1-)。所以,Globo 三糖的高密度聚集的化合物能够以高亲和力结合 STX,成为抑制其作用的 STX 抑制剂。

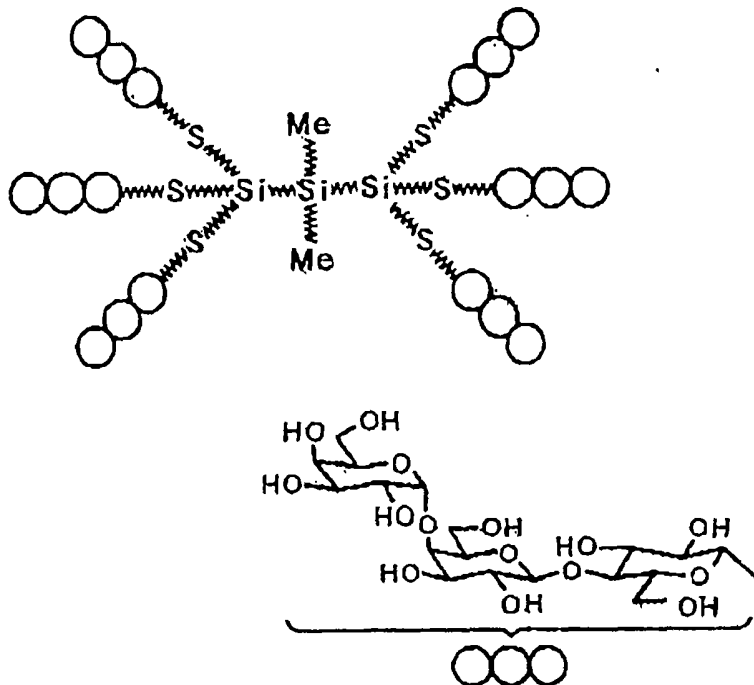
[0007] 随着这样的毒素的亚单位构成及其功能的阐明,选择性地抑制具有向细胞表层上的糖链受体的结合功能的 B 亚单位结合的方法引人关注,开展了从各种观点出发的研究。

[0008] 本申请的发明人也进行了能对如前所述的毒素的糖链结合部位有效地进行糖链结合的、抑制毒素向宿主细胞粘附的人工糖链簇的构建。并且,到现在为止,提出了以碳硅

烷为糖链承载骨架的枝型化合物群,或者水溶性聚合物化合物(专利文献1~2,非专利文献1)。

[0009] 例如,下式所示的 SUPER TWIG(1)6等。该物质是首次在 O157:H7 感染实验中被证明有效的化合物。

[0010]



[0011] 包括 SUPER TWIG,到目前为止 STX 抑制剂的开发是根据下述理念进行的:为了使之在生物体内发挥抑制活性,着眼于如何使作为 STX 结合单位的 globo 三糖积聚。可是, globo 三糖单独对 STX 的亲合性 ( $K_d$ ) 是  $10^{-3}M$ ,不一定高,而且化学合成极其困难。这成为临床应用的障碍。所以,为了进行能够临床应用的药物开发,有必要开发比 globo 三糖更容易合成的、对 STX 的结合能力优良的新型的 STX 结合单位。

[0012] 并且,推测上述那样的课题并非 Vero 毒素所特有的,而是被认为是 Vero 毒素 STX 以外的、在受体结合部具有亚单位结构的霍乱毒素 (A-B5 型) 受体:GM1、毒素原性大肠杆菌易热性痢疾的致病毒素 LT(A-B5 型) 受体:GM1、百日咳毒素 (A-B5 型) 受体、炭疽菌毒素 (7 聚体型) 受体:具有 VWA 结构域的蛋白 (anthrax toxin receptor) 等的情况下共有的。

[0013] 在这样的情况下,本申请的发明人进行了构建这些毒素的受体的处方物质的研究

[0014] 专利文献 1:WO 02/02588

[0015] 专利文献 2:特愿 2004-108483 号申请

[0016] 非专利文献 1:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002 ;99 :7669-74

## 发明内容

[0017] 本发明在以上所述的背景下,发明人以迄今为止所做的研究为基础,为了实现容易合成的、并能有效抑制 Vero 毒素等的在受体结合部分具有亚单位结构的毒素中和剂,以提供新的筛选方法为课题。

[0018] 此外,本发明以迄今为止发明人所做的研究为基础,以提供容易合成、并能有效抑

制 Vero 毒素的新的 STX 抑制剂,即, Vero 毒素中和剂为课题。

[0019] 本申请的发明人为了解决上述课题,进行了针对实现毒素中和性肽的可能性的研究。注意力集中在肽上的主要原因是合成相对容易,应用到药物中的安全性通常较高。

[0020] 作为发明人辛苦研究的结果,为了解决上述课题,本申请首先提供了下述毒素中和性肽的筛选方法,更为具体的是提供了 STX2 抑制性肽和 vero 毒素中和剂。

[0021] 第 1:毒素中和性肽的筛选方法,该方法是筛选能够中和在受体结合部具有多个亚单位结构的毒素的肽,其特征在于,该方法包括:

[0022] (1) 通过导入突变确定受体结合位点,

[0023] (2) 根据将通过肽文库法得到的与野生型亚单位结合的肽基序与前述结合位点功能性缺失的突变体结合的肽基序的对比得到的氨基酸选择比,确定结合位点特异性肽基序。

[0024] 第 2:毒素中和性肽的筛选方法,其特征在于,多次重复上述 (2) 的步骤,依次确定氨基酸选择比较高的结合位点特异性的肽基序。

[0025] 第 3:毒素中和性肽的筛选方法,其特征在于,在上述 (2) 的步骤中,使用形成多个赖氨酸 (Lys) 键合的核结构,其末端的氨基酸上结合多个肽文库的、多价的一级肽文库。

[0026] 第 4:毒素中和性肽的筛选方法,其特征在于,在上述的多价的一级肽文库中,肽文库通过间隔分子,结合于末端氨基上。

[0027] 第 5:STX2 抑制性肽形成特征在于,在 3 分子的赖氨酸 (Lys) 的结合了肽的分子核结构部分上形成至少 7 个氨基酸的肽键所构成的肽基序,该肽基序是在该序列上有 2 处至少 2 个碱性氨基酸结合的簇部,在 C- 末端侧引入了碱性氨基酸。

[0028] 第 6:STX2 抑制性肽,其特征在于,作为簇部的碱性氨基酸至少含有精氨酸 (Arg)。

[0029] 第 7:STX2 抑制性肽,其特征在于,簇部是 Arg-Arg 或者 Arg-Arg-Asn。

[0030] 第 8:STX2 抑制性肽,其特征在于,N- 末端侧是疏水性氨基酸。

[0031] 第 9:STX2 抑制性肽,其特征在于,在 3 分子的赖氨酸 (Lys) 的结合了肽的分子核结构部分上引入了下述 4 种氨基酸序列的肽基序中的至少一种:

[0032] (1) FRRNRRN (序列号 1)

[0033] (2) PPPRRRR (序列号 2)

[0034] (3) PPRRNRN (序列号 3)

[0035] (4) KRRNPRR (序列号 4)。

[0036] 第 10:STX2 抑制性肽,其特征在于,肽基序通过间隔分子被引入。

[0037] 第 11:STX2 抑制性肽,其特征在于,间隔分子是肽或者具有氨基和羧基的、具有 4 ~ 10 个碳原子数的烃链结构的分子。

[0038] 第 12:STX2 抑制性肽,其特征在于,肽基序具有末端修饰分子。

[0039] 第 13:STX2 抑制性肽,其特征在于,末端修饰分子是不具有电荷的分子。

[0040] 第 14:STX2 抑制性肽,其特征在于,肽基序也可以具有氨基酸测序用分子。

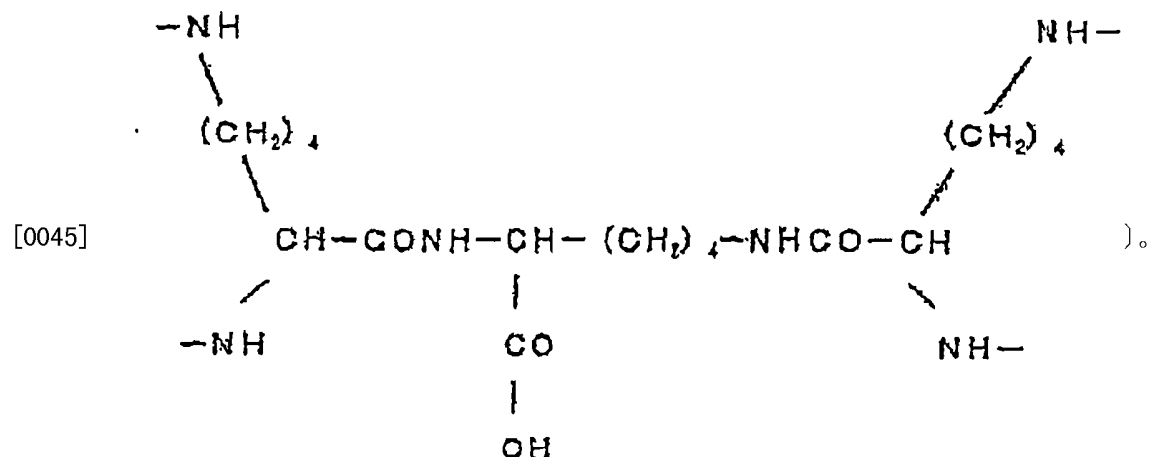
[0041] 第 15:STX2 抑制性肽,其由下式 (a) (b) 任一项表示的权利要求 12 或者 13 的:

[0042] (Met-Ala-Xo-Ala-AHA-)<sub>4</sub>-3Lys (a)

[0043] (乙酰-Xo-AHA-)<sub>4</sub>-3Lys (b)

[0044] (式中, AHA 表示氨基己烷羧酸基 (aminohexanecarboxylic acidgroup), Xo 表示

前述的肽基序 (1) (2) (3) (4) 的任何一个, 3Lys 表示下式的结构:



[0046] 第 16 :Vero 毒素中和剂, 其特征在于, 含有前述任一项的肽作为有效成分。

#### 附图说明

[0047] 图 1 是肽基序 (1) FRRNRRN (序列号 1) 化合物的质谱图。

[0048] 图 2 是肽基序 (2) PPPRRRR (序列号 2) 化合物的质谱图。

[0049] 图 3 是肽基序 (3) PPRRNR (序列号 3) 化合物的质谱图。

[0050] 图 4 是肽基序 (4) KRRNPRR (序列号 4) 化合物的质谱图。

[0051] 图 5 是没有肽基序的 Met-Ala 化合物的质谱图。

[0052] 图 6 是例示了 STX2B 亚单位的亲和力的图。

[0053] 图 7 是例示了对 vero 细胞的 STX2 的细胞毒性的抑制效果的图。

#### 具体实施方式

[0054] 本发明具有前述的特征, 以下针对具体实施方式进行说明:

[0055] < 毒素中和性肽的筛选 >

[0056] 首先, 基本的情况是在本发明的毒素中和性肽的筛选方法中, 如上述第 1 的发明所述, 包括下述的步骤:

[0057] (1) 通过导入突变确定受体结合位点,

[0058] (2) 根据将通过肽文库法得到的与野生型亚单位结合的肽基序与前述结合位点功能性缺失的突变体结合的肽基序的对比得到的氨基酸选择比, 确定结合位点特异性肽基序。

[0059] 作为更优选的实施方式, 考虑多次重复上述 (2) 的步骤, 依次根据氨基酸选择比, 确定结合位点特异性高的肽基序。

[0060] 此外, 根据已知亚单位与受体间的结合存在簇 (cluster) 效果, 期望上述 (2) 的步骤的起始 (一级) 肽文库, 作为与该簇效果相对应的肽文库, 使之通过多个氨基酸的结合而具有核结构。

[0061] 对于这样的核结构, 例如, 从例如其设计或者合成的容易性、以及由此为了得到实际的簇效果的分子大小的观点出发, 认为使用多个赖氨酸 (Lys), 例如优选使用 2 ~ 5 个键合的, 使肽文库自身成为多价的肽文库。

[0062] 即,在上述(2)的步骤中,使用形成多个赖氨酸(Lys)键合的核结构,其末端氨基酸结合了多个肽文库的、多价的一级肽文库。该多价的一级肽文库中,肽文库与可以通过间隔分子结合在末端的氨基上。这种情况下,例如,间隔分子的一个优选的例子是具有肽或者氨基和羧基的、具有4~10个碳原子的烃链结构的分子。

[0063] 此外,上述步骤(1)中的受体结合位点的确定,可以确定为对应于已知的位点,也可以确定为实际上导入突变对受体于结合产生很大影响的位点。本申请的发明人等,在Vero毒素STX的情况下,发现已经将受体结合位点确定为globo三糖的结合。

[0064] <Vero毒素中和性肽的筛选和STX2抑制性肽>

[0065] 所以,下面针对表示Vero毒素的抑制性肽的筛选的例子,更详细地对本发明进行说明。

[0066] O157:H7等的肠道出血性大肠杆菌的感染不仅引起出血性大肠炎,而且有时使溶血性尿毒症综合症(HUS)或者脑部疾病并发,进一步这些综合症成为导致患者死亡的最大原因。Vero毒素(Shiga toxin;Stx)被认为是肠道出血性大肠杆菌产生的主要的致病因子,在血中,侵入的Vero毒素导致的肾或者脑的微小血管内皮的障碍是上述综合症的原因。所以,期待着强有力地吸附在肠道内产生的STX的、抑制STX向血中入侵的STX吸附剂、或者结合已经入侵到血中的极其微量的STX的、抑制其作用的STX中和剂就成为肠道出血性大肠杆菌感染症的有效治疗药。

[0067] 进行这样的大肠杆菌Vero毒素中和性的肽的筛选时,可以根据发明人对上述的SUPER TWIG(1)6的分子结构和作用机制之间的关系的关系的详细研究进行。

[0068] 下面,进行详细的说明。

[0069] 1)对SUPER TWIG(1)6的STX1B以及2B的结合位点的确定

[0070] B亚单位单体之一上存在名为位点1、2、3的3种的globo三糖结合位点。所以已知在B亚单位五聚体上共计能够结合15个的go1ob三糖。为了开发新的STX结合单位,首先以哪个位点作为靶点是非常重要的问题。所以,向各位点导入一个、二个、三个的突变,制备各种突变体B亚单位,将这些突变体于SUPER TWIG(1)6间的结合亲和性进行比较研究。其结果表明在SUPER TWIG(1)6与STX1B亚单位的结合使用“位点1和2”或者“单独的位点3”,此外与STX2B亚单位的结合仅仅使用“单独的位点3”。也就是可以判定,为了开发临床上更为重要的针对STX2的新型结合单位,可以使用位点3为靶点。

[0071] 2)新型的STX结合单位的开发

[0072] 考虑到临床上的重要性以及前述1)中明确的结合位点的特异性,针对将能够结合到STX2B亚单位的、抑制STX2的毒性的新型物质作为具有肽结构的物质进行探索。着眼于肽的最大的理由是,其合成比较容易,常规的作为药物使用没有大的障碍,此外,开发出其变体、衍生物的可能性大。

[0073] 从这样的观点出发,为了进行活性肽的探索,进行了肽文库的新开发。

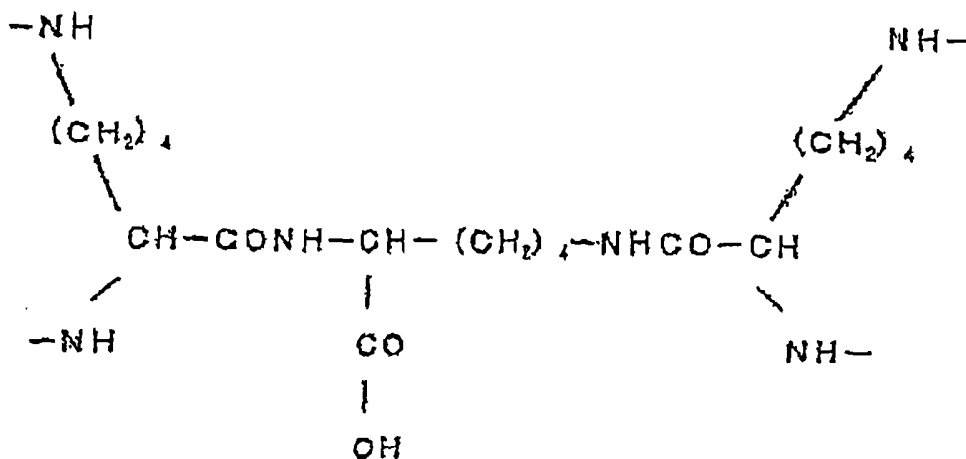
[0074] 即,根据1)得到的发现,通过从与野生型STX2B亚单位结合的肽基序中扣除与位点3功能性缺失的突变体STX2B亚单位结合的肽基序,确定能够与STX2B亚单位的位点3特异性结合的基序。

[0075] 即,首先,发明人已经开发了确定对蛋白激酶的催化部位等的功能区域直接结合的基序的方法、肽文库法(K.Nishikawa et al., Mol, Cell,6,969-2000)。所以,鉴于该肽

文库法知识,在 Vero 毒素中和剂中,利用在如上所述的 B 亚单位五聚体与 Globo 三糖之间的结合的簇效果,开发了基于将肽文库自体多价化的新概念的肽文库。

[0076] 首先,考虑到上述的 SUPER TWIG(1)6 中的核分子结构的大小等,作为为了使肽文库能多价地使用的核结构,使用了下式所示的将 3 个赖氨酸 (Lys) 结合的结构,合成了通过间隔子将 4 个肽文库结合的化合物。

[0077]



[0078] 该化合物是在上述式子的 Lys 核分子结构的末端氨基上,结合式: MAXXXXA-AHA-(序列号 5) 所示的 4 个肽文库 (Xaa-Xaa-Xaa-Xaa) 的物质: (MAXXXXA-AHA)<sub>4</sub>-3Lys。对于该化合物,式中的 AHA 表示氨基-己酸,构成间隔分子。

[0079] AHA (Amino-hexanoic acid) 以 6 个碳原子的长度,为了与 SUPERTWIG 的最佳条件吻合而使用。此外,末端的 MA (Met-Ala) 是进行氨基酸测序时候,为了清楚地检查是否进行了测序而在筛选时导入的。在 AHA- 前面的 A (Ala) 也是基于同样的理由。其形状、核结构上存在的分枝链间的距离、库的价数、库间的距离、这所有的点都按照满足 SUPERTWIG 的最佳结构来设计。此外,对得到的化合物进行氨基酸测序的时候,能够确认在氨基酸简并的位置,使用的 19 种氨基酸 (除了 Cys) 被有效地随机化了。

[0080] 使用该第一肽文库,首先确定与野生型 STX2B 亚单位结合的肽基序,还确定与位点 3 突变体 STX2B 亚单位结合的肽基序。即,首先,将附在珠子上的 2B 以及 2B 突变体 (32A) 分别调整到 3 ~ 5mg,分别装入柱子中,制备亲和柱。

[0081] 向其中加入 50mg 左右的一级筛选用多肽文库: (MAXXXXA-AHA)<sub>4</sub>-3Lys,使之充分结合。之后,用 PBS 等充分洗涤,洗去未结合的库。

[0082] 最后,用 30% 的醋酸洗脱残留在柱子中的库。将回收的级分干燥,进行氨基酸序列分析。结果,对于各个简并位置,得到了哪个氨基酸以哪种强度被选择出来的数值化的结果。19 种氨基酸全部值加到一起为 1 进行标准化。

[0083] 并且,使用 2B 的时候,如上述得到的、各简并位置的各氨基酸的值除以使用野生型: W32A 的时候,如上述得到的对应简并位置的对应的氨基酸的值。结果将该氨基酸在 2B 中是否以与 W32A 相比几倍地被选择出进行数值化。最终,可以通过将前者基序中存在的各氨基酸的选择比用后者的基序中存在的对应的氨基酸的选择比相除,确定 STX2B 亚单位的位点 3 特异的结合基序。

[0084] 对其他 18 种氨基酸进行同样的研究,最后,将 19 种氨基酸的值加在一起为 19 进



行标准化。此时,将各氨基酸之间没有选择性差异的值定为 1,通常,判断当该值一旦超过 1.5,就可以认为是强的选择性。表示该结果的为表 1。并且,在下面的表 1~表 4,还有在图 6~图 7 中,将氨基酸用一个字母进行标记。

[0085] 表 1:对 2B 亚单位的结合基序的第一级筛选

简并位置				
	1	2	3	4
[0086]	R (2.1)		N (2.0)	
	K (1.7)	R (1.8)	R (1.7)	R (1.8)
	F (1.5)	K (1.7)	K (1.7)	K (1.8)
		N (1.7)		N (1.5)

[0087] 然后,以得到的基序为基础,制备如表 2 所示的 2 次库。实际上,因为在一级筛选中选择出了 Arg、Asn、Phe 等,将这些氨基酸作为固定位置导入到二级筛选中。于是,因为增加了对作为库整体的 2B 亚单位的结合性,容易得到更特异的基序。

[0088] 表 2:用于第二级筛选的肽文库

[0089] 简并位置 1234567

[0090] (MA-XXXXXXX-A-AHA)<sub>4</sub>-3Lys

[0091] XRXNXX

[0092] XXXRXXX

[0093] XXXNXXX

[0094] 使用该二级肽文库,与上述同样确定与野生型 STX2B 亚单位结合的肽基序、还有与位点 3 突变体 STX2B 亚单位结合的肽基序。通过将前者的基序中存在的各氨基酸的选择比用后者的基序中存在的对应的氨基酸的选择比相除,能够确定比用一级肽文库得到的基序具有更高选择性的、STX2B 亚单位的位点 3 特异性的结合基序。该结果如表 3 所示。

[0095]

表 3

		位置						
库		1	2	3	4	5	6	7
R X N		P (1.5)	P (1.3)	R	R (1.4)	N	R (2.1)	R (3.0)
			R (1.2)		I (1.3)		W (1.4)	W (1.4)
X R X		P (1.4)	P (1.4)	P (1.3)	R	R (1.5)	R (1.9)	R (2.3)
		I (1.3)	R (1.2)	R (1.2)				
		W (1.2)	W (1.2)	W (1.2)				
		Y (1.2)	V/I (1.2)	V/I (1.2)				
X N X		K (1.7)	R (1.8)	R (1.8)	N	P (1.4)	R (1.8)	R/N (1.8)
		R (1.6)	P (1.4)	N (1.5)		R (1.3)	N (1.4)	D (1.3)
		P (1.5)	N (1.4)	P (1.4)			D (1.3)	
		F (1.4)						

[0096] 得到的肽基序,是下面所述的氨基酸序列:

[0097] (1)FRRNRRN(序列号 1)

[0098] (2)PPRRRRR(序列号 2)

[0099] (3)PPRRNRR(序列号 3)

[0100] (4)KRRNPRR(序列号 4)

[0101] 并且,对于基序 (1)FRRNRRN(序列号 1),即使进行二级筛选,尽管选出了碱性氨基酸、Pro、疏水性氨基酸,作为最佳的基序选出了对于各个位置为最高数值的氨基酸,因为未

反映出优选疏水性氨基酸的信息,所以作为通过各库得到的一致的序列导入 Phe。

[0102] 所以,合成了将得到的基序向 3 个 Lys 结合而成的前述式子的分子核结构上作为 Met-Ala-Xo-Ala-AHA-(Xo 表示前述的任何一个基序,AHA 表示同如前所述)引入的化合物。此时,Lya3 的核结构因为以与珠子结合的状态在市场上销售,所以,用常规的氨基酸合成装置从 C 末端依次合成,即,在 3Lys 的式子中,一级延伸 4 个链。AHA 也因为具有氨基和羰基,所以可以同样地使用氨基酸合成装置。

[0103] 对于这些化合物,通过质量分析进行鉴定。图 1、图 2、图 3 以及图 4 表示的分别是前述的肽基序 (1)、(2)、(3)、(4) 的情况下的质谱。此外,图 5 作为参照,表示的是不含有任何前述肽基序的化合物 (Met-Ala)<sub>3</sub>:Met-Ala-Ala-AHA- 的情况下的质谱。

[0104] <STX2 抑制性肽和 Vero 毒素中和剂>

[0105] 针对以上的各个化合物对 STX2B 亚单位的亲和性进行研究的时候,表示出以高的亲和性结合。此外,阐明了能够有效地抑制对 Vero 细胞的 STX2 的细胞毒性。

[0106] 表 4 和图 6 表示了对 STX2B 亚单位的亲和性。测定方法如下所示。

[0107] 即,首先,将图 6 所示量的合成肽包被到 ELISA 用的塑料平板上。用 1% 的 BSA 封闭后,加入 0.1microgram/ml 的野生型 2B-His 或者位点 3 突变体 W32A-His,在室温下使之结合 1 小时。洗涤后,用对结合的各 2B 亚单位使用抗 STX2 多克隆抗体的 ELISA 法进行检测。

[0108] 图 6 中的小图表示对于已知量的野生型 2B-His 或者位点 3 突变体 W32A-His,抗 STX2 多克隆抗体都同样地反应。

[0109] 此外,图 7A 表示了对 Vero 细胞的 STX2 细胞毒性的抑制效果。在该图 7 的结果的测定中,在培养的 Vero 细胞中使 1pg/ml 的 STX2、以及各浓度的各合成肽存在,培养 3 天,将培养后的生存的细胞用 WST 分析 (cell viability assay kit) 进行定量。

[0110] 将在 STX2(-) 的条件下的定量值定义为 100%,STX2、1pg/ml 单独的情况 (也就是,没有抑制剂) 定义为 0% 进行表示。

[0111] 此外,图 7B 表示的是以 E. coli 0157:H7 感染的小鼠作为对象的验证结果。顺序如下所示。即,第 0 天“蛋白质卡路里缺乏小鼠中,用致死量的 E. coli 0157:H7 N-9 株进行胃内感染。第 2 天~第 4 天:向小鼠中每天 2 次,进行试样肽、三糖类似物 (按照体重计,75 μg/g) 或者仅仅是生理盐水的胃内给药。第 2 天~第 5 天:PPR-tet 或者 PPP-tet (按照体重计,225g/g) 每天 2 次,进行胃内给药。

[0112] 确认了本发明的试样肽的优良的作用效果。

[0113] 另外,图 6 和图 7 中的表示的含义,MA 表示不含有上述肽基序 (1) (2) (3) (4) 中的任何一种,图 5 表示用质谱参考化合物 (Met-Ala)<sub>3</sub>:Met-Ala-Ala-AHA 作为对照的情况。此外,图 7 中的 PPR-tet 等表示的含义与表 4 中表示的相对应。

[0114] 表 4:合成的肽对 His 标签的 Stx 2B 亚单位的结合动力学分析

	$K_b$ ( $\mu\text{M}$ of unit)	$\text{RU}_{\text{max}}$ (AU)
P P R R N R R	2.7	1,350
P P P R R R R	3.2	1,250
K R R N P R R	2.1	1,290
F R R N R R N	1.7	1,490
MA	ND	ND
<b>SUPER TWIG (1)<sub>4,6</sub></b>	<b>1.1</b>	<b>640</b>

[0116] 对于前述例示的化合物,将AHA(amino-hexanoic acid)作为间隔分子,并且该AHA和肽基序Xo之间介入的Ala以及肽基序Xo末端修饰分子Met-Ala是为了确认氨基酸序列而导入的,这些也可以是各种各样的。间隔分子的AHA作为具有氨基和羧基的为6个碳原子长度的物质是通过与SUPER TWIG的对比研究而选择出的,其实该碳原子数更优选为6个,在4~10个的范围内也可以。

[0117] 此外,只要不损害肽基序Xo和分子核结构部分3Lys的STX2抑制活性,间隔分子也可以使用其他的各种分子。

[0118] 此外,对于用于在筛选时的氨基酸测序而导入的末端的Met-Ala以及结合AHA的Ala,也可以使用其他的适合的物质。这些因为不具有STX2的抑制活性,在筛选后是不需要的。不过,当基序的末端露出NH<sub>2</sub>的时候会提供正电荷,所以从电荷调节的观点出发,优选末端存在MA或者其他的物基团。这些基团通常不带有电荷,而且不会对疏水性带来很大影响的基团是非常优选考虑的。

[0119] 可以考虑各种这样的修饰等。

[0120] 例如,可以考虑为了抑制伴随经口给药的消化道内的蛋白酶的分解,以稳定为目的将N-末端的Met的NH<sub>2</sub>基用乙酰基进行保护。

[0121] 还有,发明人确认的时候,一旦乙酰基化,在体外的STX2导致抑制细胞抑制活性的作用(活性)增大了大约5倍。并且,通过感染实验也确认了效果的增强。

[0122] 根据这些情况,例如将(乙酰-Xo-AHA)<sub>4</sub>3Lys、或者乙酰变更成其他的保护基,或者将AHA变更成别的间隔子的情况,此外,不使用间隔子的情况,也优选考虑。

[0123] 并且,通过本发明人的研究,对于通过如上所述的筛选法而导出的STX2抑制性肽,作为表达其活性的物质还发现了多种变体。

[0124] 即,发现可以考虑更常规地,作为STX2抑制性肽,在赖氨酸(Lys)3分子的结合了肽的分子核结构部分上形成由至少7个氨基酸的肽键构成的肽基序,该肽基序是在序列上有2处簇部,每个簇部结合了至少2个碱性氨基酸,例如:精氨酸(Arg)、或赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)键合的,在C-末端侧是导入到肽基序的碱性氨基酸。

[0125] 其中,作为构成簇部的碱性氨基酸,考虑优选含有精氨酸(Arg)。为此,例如,优选簇部的为-Arg-Arg-、-Arg-Arg-Asn-等。

[0126] 此外,本发明的STX2抑制性肽中,优选C-末端侧是碱性氨基酸,例如精氨酸(Arg)

等, N- 末端侧是疏水性氨基酸, 例如是脯氨酸 (Pro) 等。

[0127] 优选 C- 末端侧是碱性氨基酸, 是出于下述原因考虑的, 因为结合方的 STX2B 亚单位的 Glogo 三糖结合部位 3(Site 3) 附近存在酸性氨基酸的簇, 所以二者通过静电相互作用能够增加亲和性。此外, 优选 N- 末端侧是疏水性氨基酸的理由是, 与在 STX2B 亚单位的 Glogo 三糖结合部位 3(Site3) 起着中心性作用的 Trp 与疏水性相互作用。

[0128] 出于上述考虑, 在本发明中作为优选之一提供了上述的 (1) (2) (3) (4) 的肽基序。

[0129] 另外, 本发明中的肽基序, 考虑到分子大小对 STX2 抑制作用的效果, 由如上所述的至少 7 个氨基酸构成, 如果在上述的 7 个以上, 只要不对 STX2 抑制性造成大的损失, 作为药物等的应用, 还可以是更多个氨基酸。此外, 即使具有如上所述的各种间隔子或者末端修饰基也勿需多言。

[0130] 并且, 在本发明中, 如上所述, 作为以具有 STX2 抑制活性的肽为有效成分的 Vero 毒素中和剂, 可以采用各种剂型, 在经口给药的途径中, 也可以与赋形剂等一起成形, 作为片剂或者粉末使用, 也可以作为与纯化水等的组合物作为液体制剂使用。对于这些组合物或者剂型, 可以使用包括以往公知的各种的配合成分, 也可以采用其中使用的各种方法。

[0131] 对于作为 Vero 毒素中和剂的给药量, 自从发现大肠杆菌 O157:H7 感染以来, 通常考虑按照体重计算为 5 ~ 500mg/kg 左右的处方。当然根据症状只要适宜即可。

[0132] 另外, 近年来, 发现了很多的微量且具有强大的生理活性的肽, 此外, 由于基因重组技术或者细胞融合等的生物技术的迅速进步, 能够实现肽的大量供给, 正在开展将这些生理活性肽作为医药品进行疾病治疗应用的尝试。可是, 已知将这样的肽性医药品即使经口给药也不能得到很好的吸收率。其原因被认为是这些肽性医药品被消化道内的消化酶或者蛋白质分解酶迅速地分解, 或者因为是水溶性的高分子, 所以难以透过消化道粘膜。为此, 这些药品的给药方法, 目前现状在临床上几乎全部局限于肌肉给药、皮下给药以及静脉内给药等通过注射进行给药的方法。不过发现这些通过注射进行的给药存在在患者中伴随着痛苦, 或者应激反应或者中毒反应等的严重副作用的缺点。所以, 最近, 作为代替这样的注射的给药途径, 包括经口给药在内的经粘膜给药引人注目, 不过, 目前的现状是与注射相比, 很难得到充分的吸收率。所以, 目前, 为了改善经口以及经粘膜给药后的生理活性肽的吸收率, 对各种方法进行了尝试。将其进行大致分类, 可以分成 (1) 吸收促进剂或者蛋白质分解酶抑制剂等的制剂添加物的利用, (2) 药物的新型的给药途径的开发, (3) 药物的分子结构修饰, (4) 药物的剂型改进。

[0133] 在本发明中, 作为实际应用的药物给药的时候, 为了能够经口给药, 基于至今为止的技术知识, 可以使用各种各样的形态。例如, 可以使用作为吸收促进剂的代表性的表面活性剂或胆汁酸、螯合剂、脂肪酸等烃类, 或者添加作为蛋白质分解酶抑制剂的甘胆酸钠、杆菌肽、大豆胰蛋白酶抑制剂、卡莫司他、抑酞酶等, 或者使之被脂质体或者乳剂所包含, 封入胶囊中使用等使用适当的方法。

[0134] 产业上的可利用性

[0135] 根据本发明的方法, 可以筛选如前所述的对 Vero 毒素或者霍乱毒素、百日咳毒素、炭疽菌毒素等的受体结合部具有亚单位结构的毒素具有抑制性的、作为肽合成容易的、作为治疗药物的有效的毒素中和性肽, 并可以提供这些肽。

[0136] 还有, 如前所述的本发明的肽具有 STX2 抑制性, 作为肽合成容易, 能够提供作为

肠道出血性大肠杆菌感染症的治疗药物的有效的 Vero 毒素中和剂。

- [0137] 序列表
- [0138] <110> 独立行政法人科学技术振兴机构
- [0139] <120> 毒素中和性肽的筛选方法、STX2 抑制性肽和 Vero 毒素中和剂
- [0140] <130>
- [0141] <150>JP 2004-189801
- [0142] <151>2004-06-28
- [0143] <150>JP 2004-295405
- [0144] <151>2004-10-07
- [0145] <160>5
- [0146] <210>1
- [0147] <211>7
- [0148] <212>PRT
- [0149] <213> 人工序列
- [0150] <220>
- [0151] <223> 人工序列的描述 :合成寡肽
- [0152] <400>1
- [0153] Phe Arg Arg Asn Arg Arg Asn
- [0154] 1 5
- [0155] <210>2
- [0156] <211>7
- [0157] <212>PRT
- [0158] <213> 人工序列
- [0159] <220>
- [0160] <223> 人工序列的描述 :合成寡肽
- [0161] <400>2
- [0162] Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg
- [0163] 1 5
- [0164] <210>3
- [0165] <211>7
- [0166] <212>PRT
- [0167] <213> 人工序列
- [0168] <220>
- [0169] <223> 人工序列的描述 :合成寡肽
- [0170] <400>3
- [0171] Pro Pro Arg Arg Asn Arg Arg
- [0172] 1 5
- [0173] <210>4
- [0174] <211>7

- [0175] <212>PRT  
[0176] <213> 人工序列  
[0177] <220>  
[0178] <223> 人工序列的描述 :合成寡肽  
[0179] <400>4  
[0180] Lys Arg Arg Asn Pro Arg Arg  
[0181] 1 5  
[0182] <210>5  
[0183] <211>8  
[0184] <212>PRT  
[0185] <213> 人工序列  
[0186] <220>  
[0187] <223> 人工序列的描述 :合成寡肽  
[0188] <220>  
[0189] <223>Xaa :任何氨基酸  
[0190] <220>  
[0191] <223>Aha :氨基己酸  
[0192] <400>5  
[0193] Met Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Ala-Aha  
[0194] 1 5

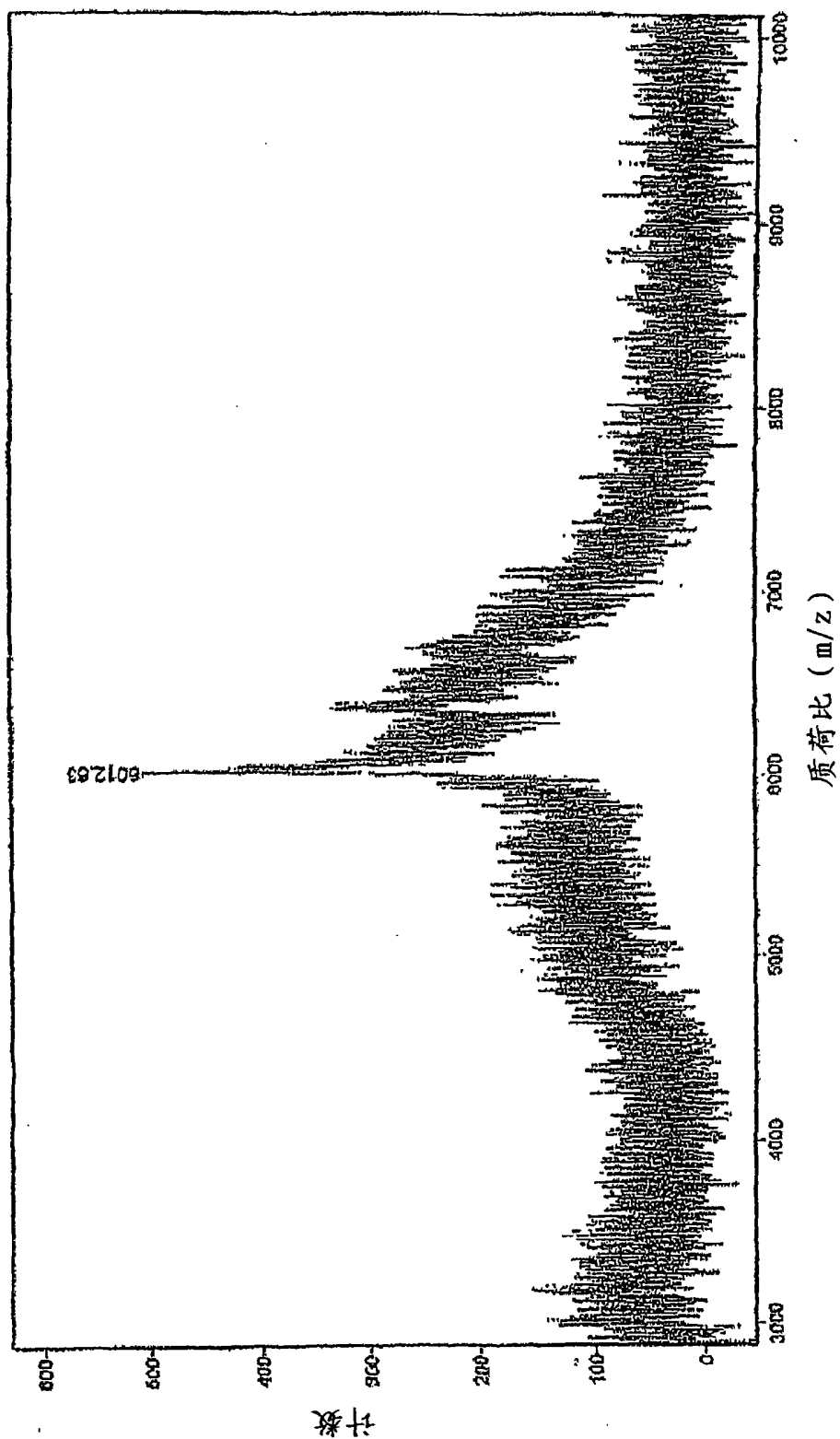


图 1



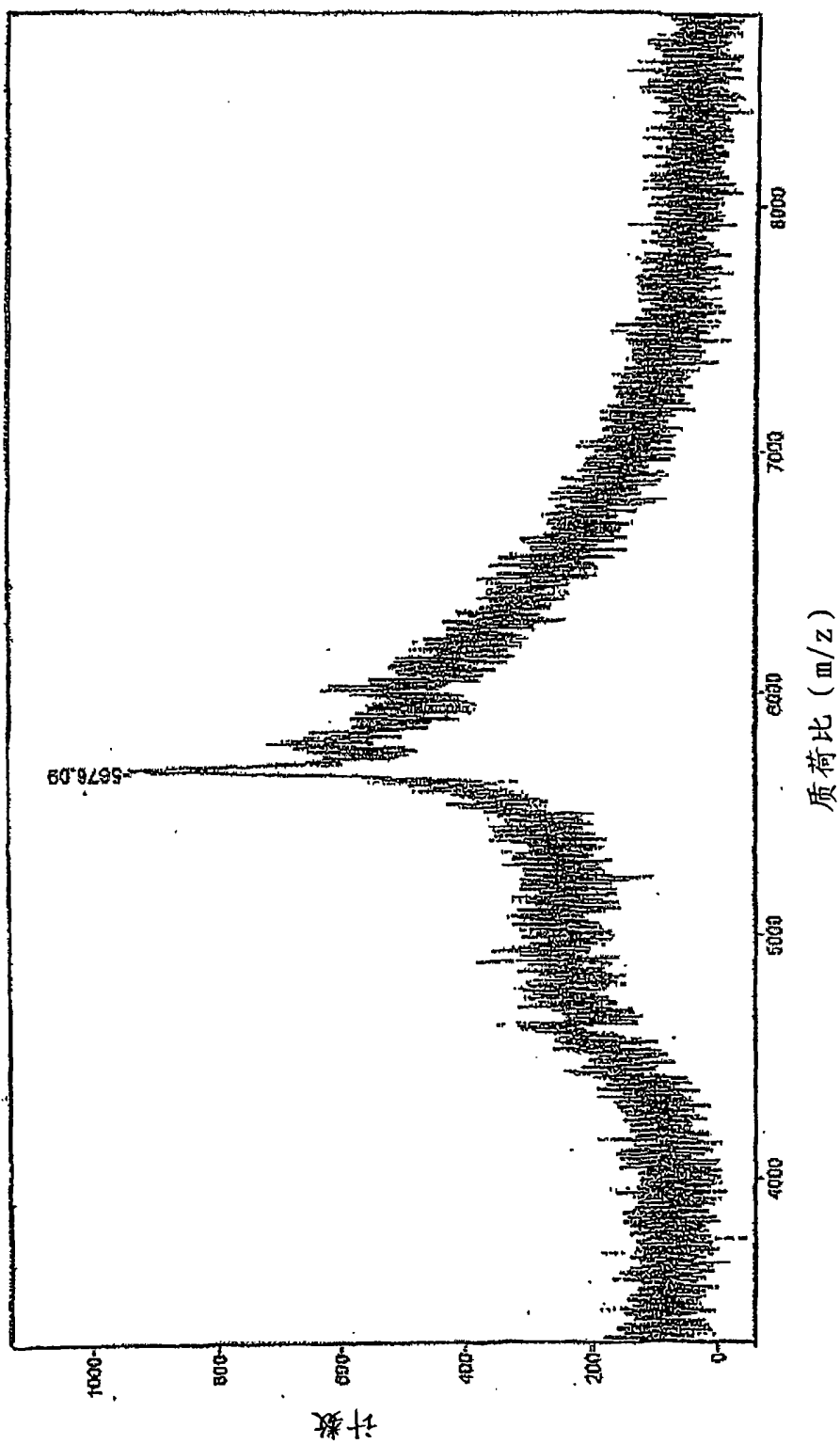


图 2

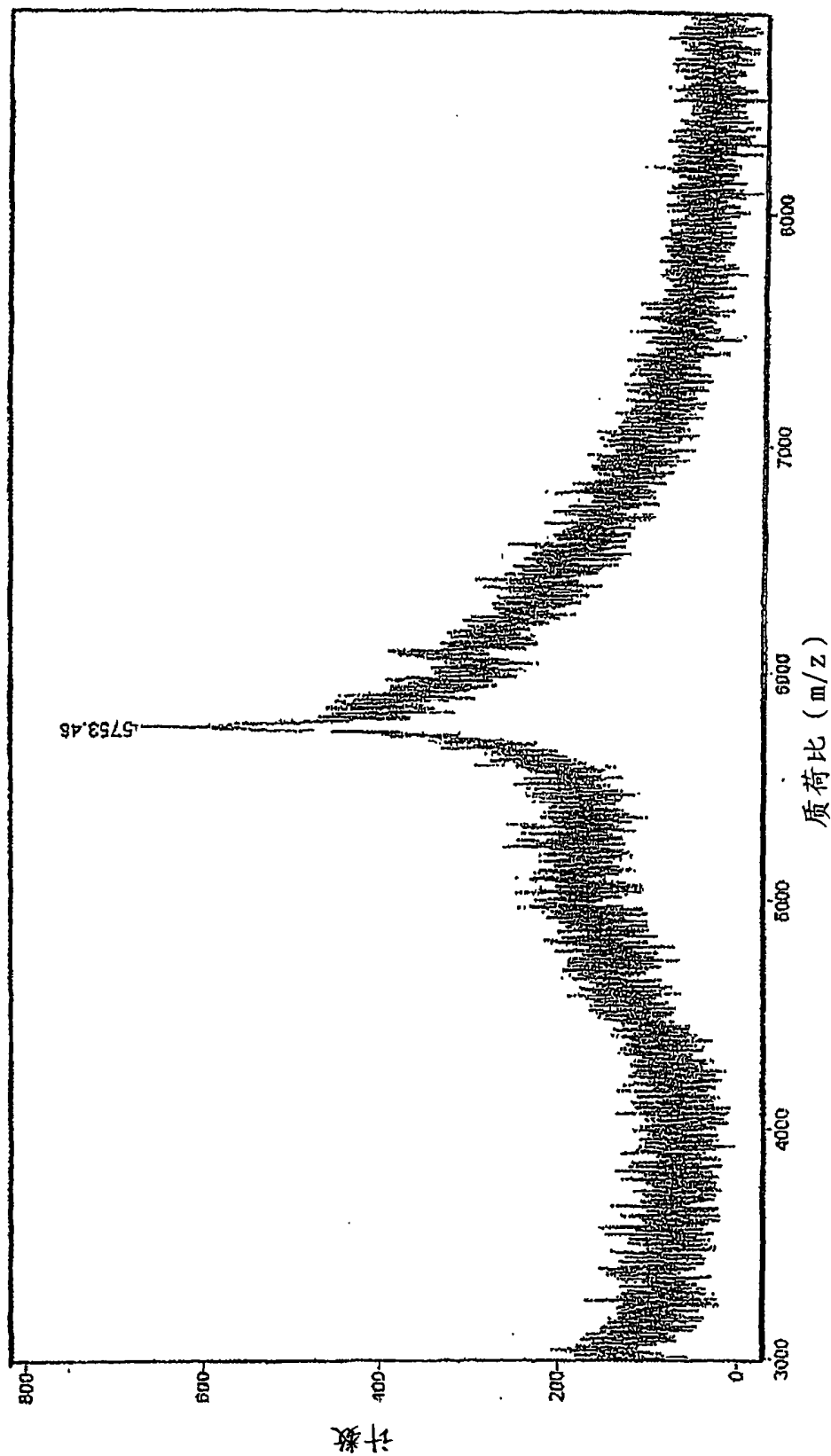


图 3

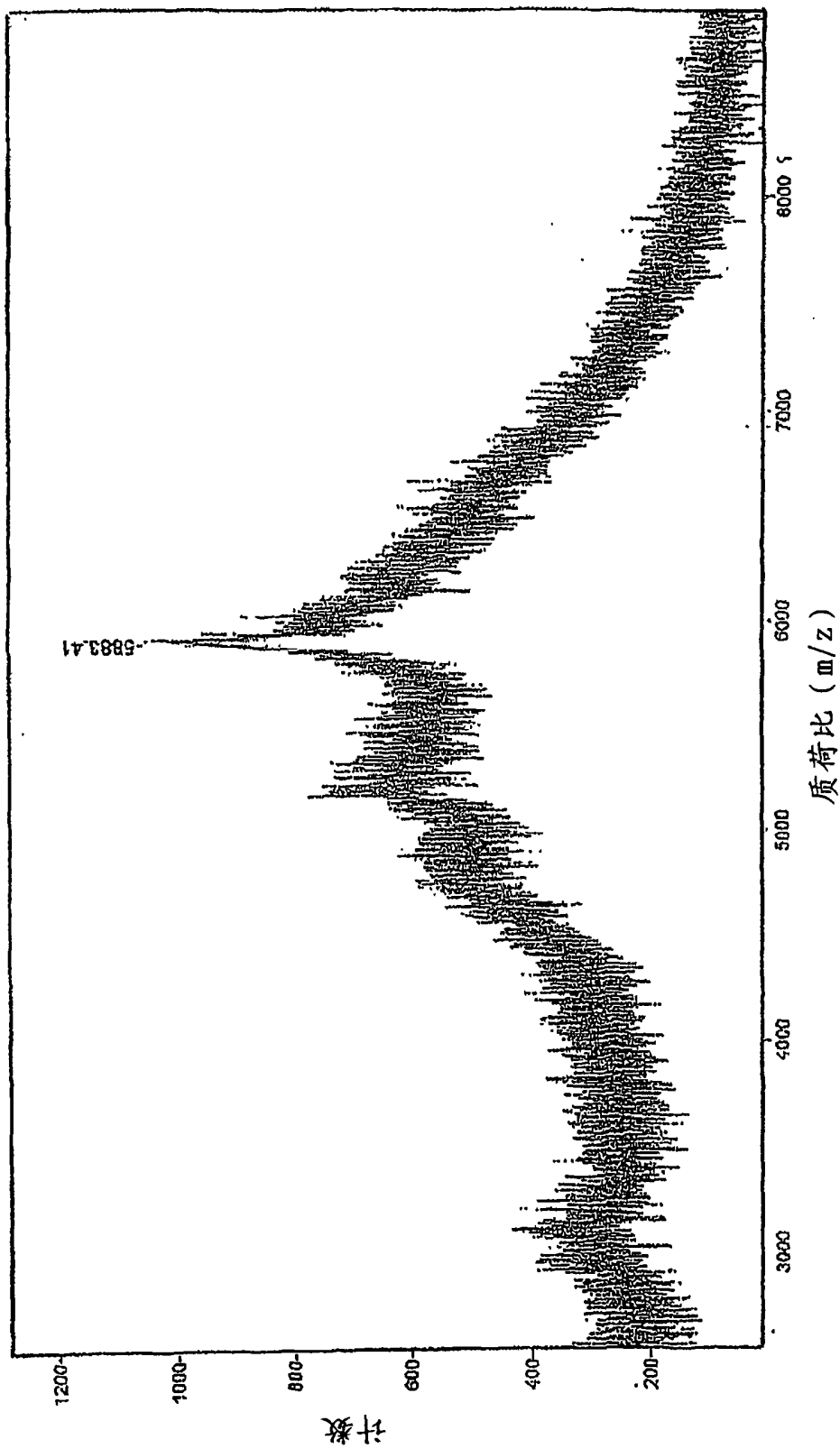


图 4

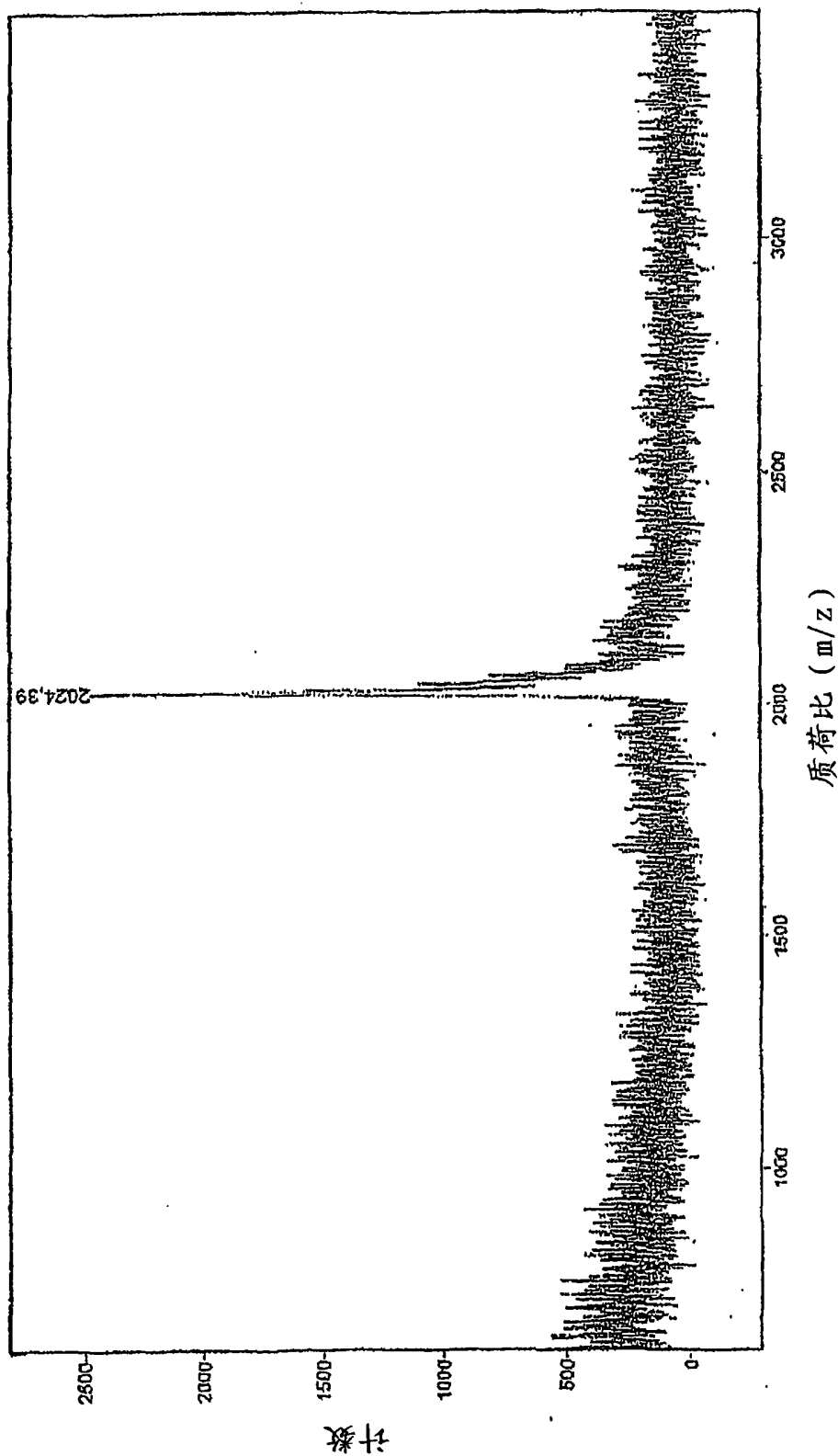


图 5

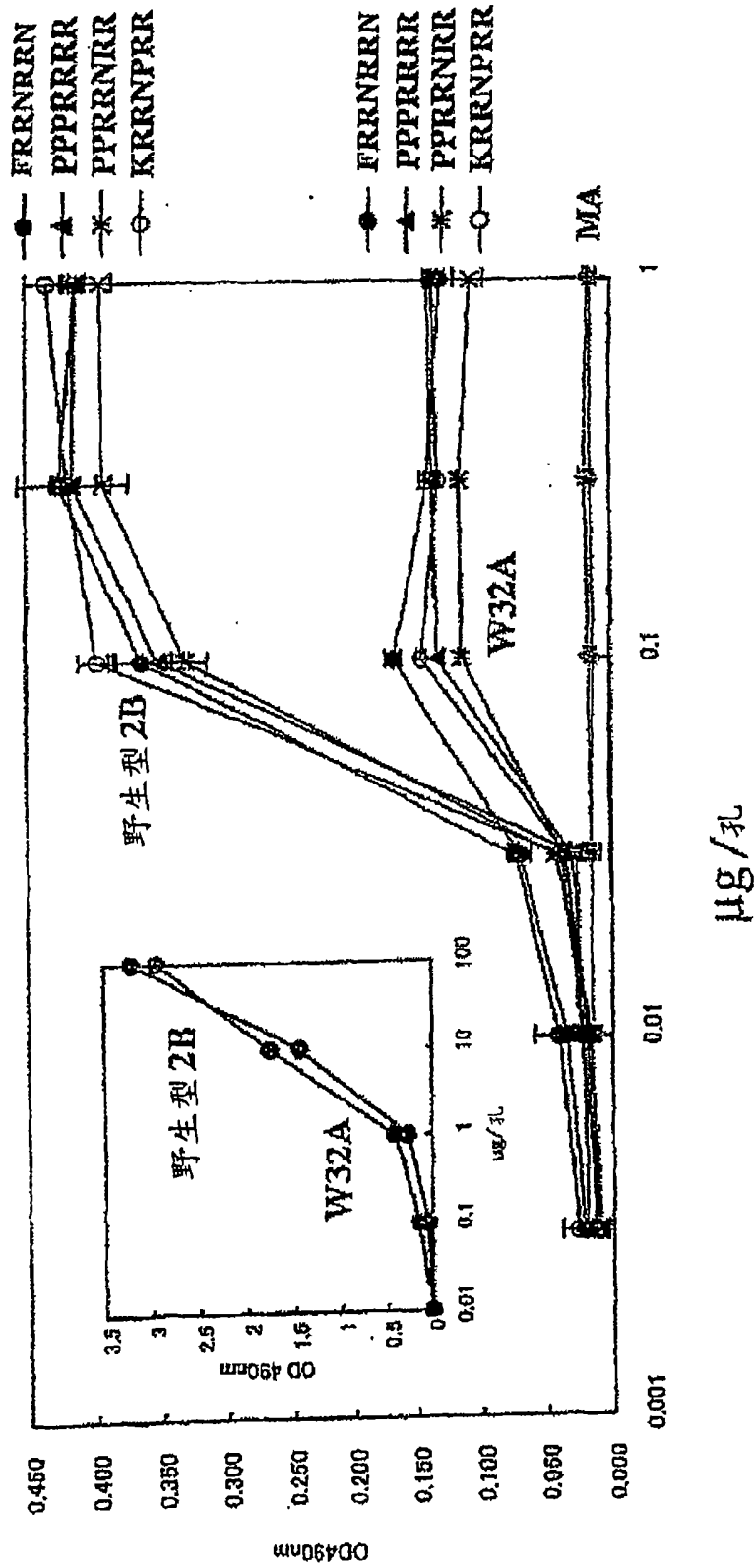


图 9

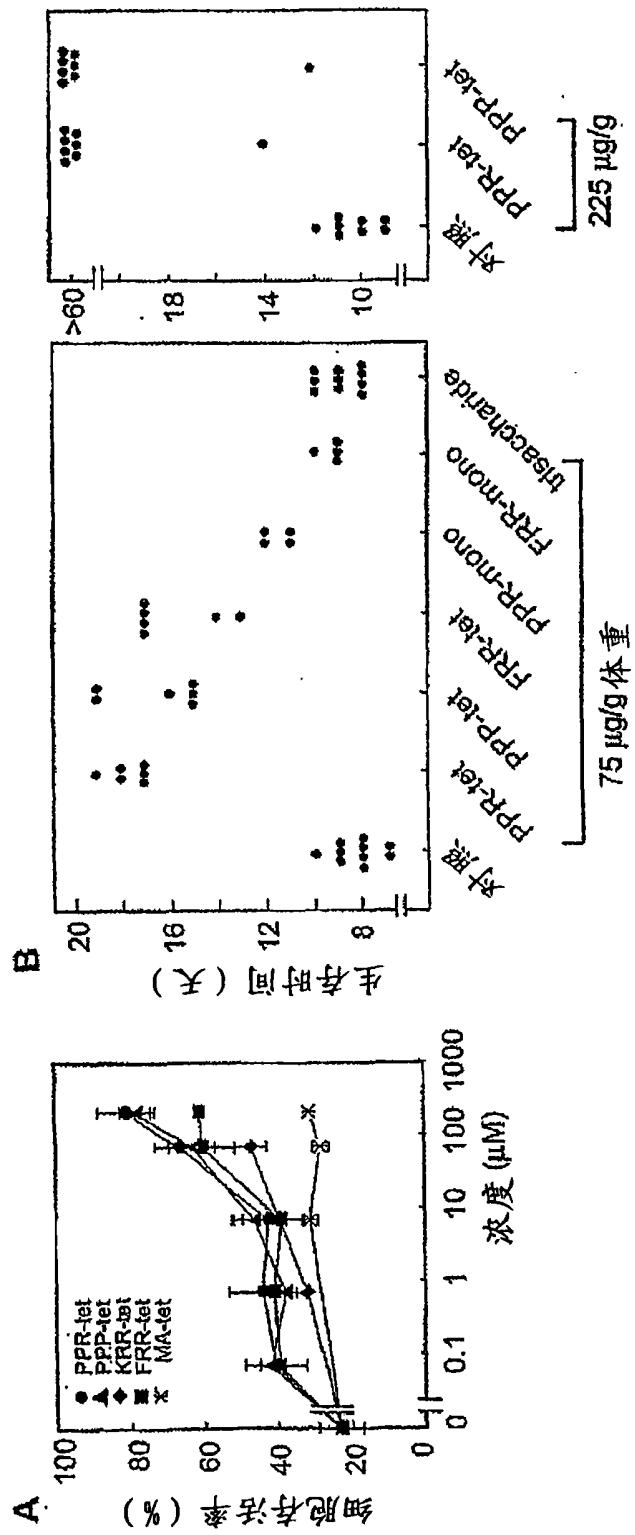


图 7