

使用时活化的单链多肽

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种使用时活化的单链多肽，具体涉及一种单链多肽、及其相应的应用、编码其的核酸、及其制备方法。

背景技术

目前，通过一些具有特异性切割成分的毒素分子，可以实现例如以下方面的应用：

(1) 治疗应用：面肌痉挛、特发性眼睑痉挛、痉挛性斜颈、痉挛性脑瘫、脑卒中后肢体痉挛、震颤及其他各类肌张力障碍的疾病的治疗；

(2) 微创整形领域的应用：

包括眉间纹、额纹、鱼尾纹等各类动态性皱纹的除皱；眉毛高低的调整、颈肌放松、下颌缘提升、颈部条索注射等面部轮廓的美化；

缩小咬肌、缩小腓肠肌、缩小斜方肌等身体轮廓的塑形。

然而，目前还没有一种能安全有效生产和安全有效使用的能实现前述功效的产品。

发明内容

本发明提供一种在进入特定使用部位再高度被活化、减毒且能更安全方便生产的单链多肽、及其相应的应用、编码其的核酸、及其制备方法。

为此，本发明提供了以下的技术方案：

本发明提供一种单链多肽，其特征在于，包括：第一结构域、中间氨基酸序列区域、以及第二结构域，其中，所述中间氨基酸序列区域在所述第一结构域与所述第二结构域之间，所述中间氨基酸序列区域序列含有至少一个第一酶切割位点，所述第一酶切割位点被设计为能被人体特定部位存在的第一蛋白酶高度特异性切割，所述单链多肽在所述第一酶切割位点被所述第一蛋白酶切割后转化为能抑制信息物质的释放的活化形式。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第一结构域具有大约为 50kDa 的分子量，所述第二结构域具有大约为 100kD 的分子量，所述第一结构域具有切割活性。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述信息物质为细胞间信息物质，优选为神经递质、内分泌激素、局部化学介质以及气体信号分子中的任意一种，更优选地所述信息物质为乙酰胆碱。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第一结构域为能够切割靶标细胞的胞吐融合器的蛋白的非毒性细胞蛋白酶或其片段；所述第二结构域具有结合部分和转运部分，所述结合部分能与所述靶标细胞受体结合并通过受体介导的胞吞作用以进入所述靶标细胞的内体，所述转运部分能转运所述第一结构域进入靶标细胞的胞质溶胶；

优选地，所述第一酶切割位点在所述第一结构域与所述转运部分之间，和/或所述结合部分为羧基端，具有大约为 50kD 的分子量，所述转运部分为氨基端，具有大约为 50kD 的分子量；

另一优选地，所述胞吐融合器的蛋白为神经元的 snare 蛋白，和/或所述靶结合位点为神经元的突触前膜上的受体。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第一结构域至少包括梭状芽孢杆菌神经毒素 L 链的一部分；

优选地，其梭状芽孢杆菌神经毒素 L 链的部分是肉毒梭菌亚型 A、B、C、D 以及 E 其中之一的神经毒素 L 链或由其衍生而来，和/或，所述第一结构域含有与 SEQIDNO:10 具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99% 或 100% 一致性的氨基酸序列，或含有与 11-16 中任意一个具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99% 或 100% 一致性的氨基酸序列去除天然存在

的酶切序列；和/或

第二个结构域至少包括至少包括一部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链，优选地其部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链是以下一种神经毒素重链或由其衍生而来：肉毒梭菌(*C.Botulinum*)亚型 A、肉毒梭菌亚型 B，肉毒梭菌亚型 C，肉毒梭菌亚型 D，肉毒梭菌亚型 E，肉毒梭菌亚型 F，肉毒梭菌亚型 G，巴氏梭菌(*C.Baratii*)和丁酸梭菌(*C.Butyricum*)；或其部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链是破伤风梭菌(*C.Tetani*)的神经毒素 H 链或由其衍生而来，和/或

所述第二结构域含有与 SEQIDNO:17-23 中任意一具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或 100%的一致性氨基酸序列。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述的第一结构域与所述中间氨基酸序列区域区域之间的 linker (L1) 的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个；和/或所述中间氨基酸序列区域区域与所述第二结构域之间的 linker (L2) 的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第一蛋白酶不是存在于人体消化道内的蛋白酶，

优选地，所述人体特定部位为人体皮肤组织，和/或 至少一个所述第一蛋白酶选自以下：

表皮特异性激肽释放酶(KLKs)蛋白酶（例如 KLK5、KLK6、KLK7）、SASPase 蛋白酶、Caspase 蛋白酶（例如 Caspase-14）、Furin 蛋白酶以及它们各自的保留了酶切活性的变体中的任意一种或多种；和/或，

所述第一酶切割位点含有与 SEQIDNO:1-4、SEQ ID NO:50 以及 SEQ ID NO:51 中任意一个具有至少 50%、60%、85%、90%、99%或 100%的一致性的氨基酸序列。

其中，SEQ ID NO:50 以及 SEQ ID NO:51 中，RXXR 和 RRXX 中的“X”为任意的氨基酸，优选地，RXXR 中的 XX 为 RK、TK 或 TR；RRXX 中的“XX”为 SV 或 KR。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征，还包括：增加表达量的信号肽、用于定量的定量蛋白以及标签蛋白中的任意一种或多种，进一步地，对所述信号肽、所述定量蛋白以及所述标签蛋白中的一种或多种分别进行如下限定：所述信号肽含有与 SEQIDNO:24 具有至少 80%、85%、90%、99%或 100%的一致性的氨基酸序列；所述定量蛋白为荧光蛋白；

所述标签蛋白为 His 标签、GST 标签、MBP 标签以及 Strep-tagII 标签中的一种或多种。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征，还包括：分别位于所述第一结构域的 N 端和所述第二结构域的 C 端的两个第二酶切割位点，且切割所述第二酶切割位点的第二蛋白酶不能对所述第一酶切割位点进行切割。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第一酶切割位点和/或所述第二酶切割位点通常情况下也不会被通过宿主细胞体内表达所述单链多肽或通过由来自宿主细胞的细胞提取物参与的体外合成体系合成所述单链多肽中接触的蛋白酶切割。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第二酶切割位点被设计为针对所述第二蛋白酶有高度特异性，优选地，所述第二蛋白酶选自非人肠激酶、烟草蚀刻病毒蛋白酶、来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的蛋白酶、来源于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的蛋白酶、来源于鼻病毒的蛋白酶、木瓜蛋白酶、昆虫木瓜蛋白酶的同源物或甲壳动物木瓜蛋白酶的同源物；和/或

所述第二酶切割位点含有与 SEQIDNO:5-9 中任意一个具有至少 85%、90%、99%或 100%一致性的氨基酸序列。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述中间氨基酸序列区域序列还包括 XTXS，所述 X 非 K 氨基酸，优选地：所述 X 为 Q 氨基酸；和/或

所述中间氨基酸序列区域序列的结构从 N 端到 C 端为：

XTXS-linker (L3) -至少一个第一酶切割位点，进一步地，L3 的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个或 0-5 个，更进一步地，所述第一酶切割位点为 1 个。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：当所述第二结构域含有与 SEQIDNO:17 具有至少 80%、

85%、90%、95%、99%或 100%的一致性氨基酸序列时，所述第二结构域氨基酸序列的与所述 SEQIDNO:17 的第 423 对应的位点的赖氨酸被突变成非赖氨酸。

本发明提供的单链多肽，还具有这样的特征：其中，所述第一结构域、所述中间氨基酸序列区域以及所述第二结构域从 N 端到 C 端连接；和/或当所述第一酶切割位点为多个时，多个所述第一酶切割位点从 N 端到 C 端顺序连接，所有所述第一酶切割位点中具有相同酶切位点或各个第一酶切割位点各不相同，且多个所述酶切位点之间的 linker (L4) 的氨基酸数量均为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

本发明还提供一种如前所述的单链多肽的应用：所述应用包括以下中的任意一种或多种：护肤、整形、塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗。

本发明还提供一种如前所述的单链多肽在制备特定用途的制品或药物中的应用：所述特定用途的包括以下中的任意一种或多种：护肤、整形、塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗。

本发明还提供一种单链多肽的制品或药物，其特征在于，包括：如前所述的单链多肽，优选地，所述制品或药物具有的应用包括以下中的任意一种或多种：护肤、整形、塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗；

另一优选地，所述制品或药物，被通过涂抹、喷雾、外敷或注射的方式进入人体特定部位进行应用。

本发明还提供一种核酸，其特征在于，包括：编码如前所述的单链多肽的核苷酸序列。

本发明还提供一种载体，其特征在于，包括：如前所述的核酸。

本发明还提供一种宿主细胞，其特征在于：整合有前述的核酸和/或包括前述的载体。

本发明提供的宿主细胞，还具有这样的特征：所述宿主细胞来自原核细胞或真核细胞，进一步地，所述细胞选自下组：大肠杆菌细胞、人源细胞、中国仓鼠、卵巢细胞、昆虫细胞、麦胚细胞、兔网织红细胞以及酵母细胞中的一种或多种的组合。

本发明提供的宿主细胞，还具有这样的特征：其中，所述宿主细胞选自酵母细胞，进一步地，所述酵母细胞选自：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，所述克鲁维酵母属酵母选自：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

本发明还提供一种体外无细胞合成体系，其特征在于：以编码前述的单链多肽的 mRNA 或 DNA 为模板，合成所述单链多肽。

本发明提供的体外无细胞合成体系，还具有这样的特征，包括以下中的任意一种或多种：

(1) 编码所述单链多肽的 mRNA 或 DNA 模板；

(2) 细胞提取物，所述细胞提取物为酵母细胞提取物，再进一步地，所述细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取物来源的菌株为：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母；

(3) 以下组分中的任意一种或多种：

氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

本发明还提供一种前述的单链多肽的制备方法，其特征在于：

以编码前述的单链多肽的 mRNA 或 DNA 为模板进行体外合成反应得到所述单链多肽，

优选地，在包括前述的体外无细胞合成体系的反应体系中进行所述体外合成反应，

进一步地，所述的 DNA 模板与参与所述体外合成反应的其他成分的体积比的范围为 1:10-1:50 或 1:20-1:40 或 1:25-1:35 或 1:30。

本发明提供的制备方法，还具有这样的特征：其中，所述无细胞体外合成体系包括：酵母细胞提取物、氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂；

进一步地：

所述酵母细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取物来自包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母。

本发明提供的制备方法，还具有这样的特征：其中，所述酵母细胞提取物占整个所述无细胞体外蛋白质合成体系的体积的 50-80%。

本发明提供的制备方法，还具有这样的特征：还包括：将得到的包括第二酶切割位点的所述单链多肽用第二蛋白酶酶切得到仅包括第一结构域、中间氨基酸序列区域以及第二结构域的单链多肽。

本发明还一种前述的核酸或前述的载体或前述的宿主细胞或前述的体外无细胞合成体系在制备前述的单链多肽中的应用。

发明作用与效果

本发明提供的一种使用时活化的单链多肽，具体涉及一种单链多肽、及其相应的应用、编码其的核酸、及其制备方法，具有至少以下优势：

(1) 本发明提供的单链多肽，在第一结构域与第二结构域之间的存在的第一酶切割位点，设计为被存在于人体特定部位的第一蛋白酶高度特异性切割，这样，可以在特定部位使用时，第一酶切割位点进入该特定使用部位后，才高度被存在于该人体特定部位的第一蛋白酶高度特异性切割才转化为活化形式，相比目前出厂前已经活化的方式，大大提高了使用安全，特别是使用于皮肤组织时，由于安全，可以通过涂抹等方式安全便捷地实现使用，提高了产品的可用性、实用性以及普遍性；

(2) 进一步地，由于第一蛋白酶不存在于人消化道内，即使误食也不会被活化，进一步提高了使用安全；

(3) 而且，由于单链多肽的第一酶切割位点被设计为被存在于该人体特定部位的第一蛋白酶高度特异性切割，然后单链多肽才高度转化为活化形式，使得生产更加安全，不只是保证了上游生产的安全，而且也保证了下游产品生产的安全，特别是作为以编码本发明的单链多肽的 mRNA 或 DNA 为模板进行体外合成本发明的单链多肽时，不会出现细胞内表达合成的方式中所用的菌株泄露导致的一些风险，并且周期短，方法简单，成本低，进一步提高了安全性和实用性。

附图说明

图 1 中为实施例 7 中 pH8.0 条件洗脱纯化后得到的改造后蛋白的电泳图；

图 2 为动物实验中效果打分参考图；

图 3 为实施例 7 的动物实验结果图；

图 4 和图 5 为实施例 6 中分别展示了不同浓度底物 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 与底物 CFP-SNAP25(66aa)-YFP 的底物转换率；

图 6 为实施例 6 中比较 TEV 单酶切产物和双酶切产物的活性效果，以排除 TEV 酶的影响的结果图；

图 7 为实施例 6 中比较双酶切产物和 KLK5 酶的活性效果，以排除 KLK5 酶的影响的结果图；

图 8 为实施例 6 中，多个第一酶切割位点的单酶切的体外活性检测；

图 9 为实施例 8 中 LD50 的检测结果图；

图 10 为实施例 9 中 ED50 的检测结果图。

具体实施方式

以下结合附图来说明本发明的具体实施方式。对于实施例中所用到的具体方法或材料，本领域技术人员可以在本发明技术思路的基础上，根据已有的技术进行常规的替换选择，而不仅限于本发明实施例的具体记载。

实施例中所使用的方法如无特殊说明，均为常规方法；所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

1、单链多肽的说明

信号传导是指将细胞外信息传递到细胞内的过程。是细胞通信的基本概念，强调信号的产生、分泌与传送，即信息物质从合成的细胞中释放出来，然后进行传递。受体在识别相应配体（第一信使）并与之结合后，细胞内环磷酸腺苷（cAMP）、环磷酸鸟苷（cGMP）、钙离子、肌醇磷脂（第二信使）等物质增加，参与细胞的各种生物调控过程，将获得的信息增强、分化、整合并传递给效应器，才能发挥特定的生理功能或药理效应。

人体细胞之间的信息转导可通过相邻细胞的直接接触来实现，但更重要的也是更为普遍的则是通过细胞分泌各种化学物质来调节自身和其他细胞的代谢和功能，因此在人体中，信息传导通路通常是由分泌释放信息物质的特定细胞、信息物质（包含细胞间与细胞内的信息物质和运载体、运输路径等）以及靶细胞（包含特异受体等）等构成。

信息物质可分为细胞间信息物质与细胞内信息分子。

凡由细胞分泌的调节靶细胞生命活动的化学物质统称为细胞间信息物质，即第一信使，按照细胞分泌信息物质的方式又可将细胞间信息物质分为神经递质、内分泌激素、局部化学介质和气体信号分子。在细胞内传递细胞调控信号的化学物质称为细胞内信息物质，其组成多样化。通常将 Ca^{2+} 、cAMP、cGMP、DAG、IP₃、Cer、花生四烯酸及其代谢物等这类在细胞内传递信息的小分子化合物称为第二信使。负责细胞核内外信息传递的物质称为第三信使，能与靶基因特异序列结合，发挥着转录因子或转录调节因子的作用。

神经递质（neurotransmitter）是神经元之间或神经元与效应器细胞如肌肉细胞、腺体细胞等之间传递信息的信息物质。根据神经递质的化学组成特点，主要有胆碱类（乙酰胆碱，英文名，acetylcholine，简称 Ach）、单胺类（去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺）、氨基酸类（兴奋性递质如谷氨酸和天冬氨酸；抑制性递质如 γ -氨基丁酸、甘氨酸和牛磺酸）和神经肽类等。

乙酰胆碱（Ach）的合成主要是在胆碱能神经末梢内进行。当神经冲动到达神经末梢时，囊泡膜与突触前膜相融合将乙酰胆碱释放入突触间隙，激动突触后膜上相应受体，引起一系列生理效应。同时，乙酰胆碱由神经末梢部位的胆碱酯酶（ChE）水解为胆碱和乙酸而灭活。部分胆碱再一次被胆碱能神经末梢摄取，又参与合成新的乙酰胆碱。

现有研究已经证明，通过抑制乙酰胆碱的传递，可以导致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛，可以调节肌张力亢进和运动障碍疾病以及动态性皱纹；此外，还可通过导致肌肉废用性萎缩而缩小肌肉体积，以进行身体塑形。

非细胞毒性的蛋白酶通过蛋白水解切割称为 SNARE 蛋白的细胞内转运蛋白发挥作用（参见 Gerald K(2002)—Cell and Molecular Biology”(第 4 版)John Wiley&Sons,Inc.）。

首字母缩略词 SNARE 源自术语可溶性 NSF 附着受体(Soluble NSF Attachment Receptor)，其中，NSF 表示 N-乙基马来酰亚胺敏感性因子，也即 N-ethylmaleimide-SensitiveFactor。

SNARE 蛋白是细胞内小泡融合体所必需的，并且因此是经由小泡转运从细胞分泌分子所必需的。非细胞毒性的蛋白酶功能是锌依赖性内肽酶活性并且展示对于 SNARE 蛋白的高底物特异性。SNARE 蛋白与分泌囊泡的膜或细胞膜关联，并通过介导分泌囊泡与细胞膜的融合来促进分子的胞吐作用，从而允许将囊泡的内容物排出细胞外。针对神经元 SNARE 的切割会阻止神经递质的释放，从而导致瘫痪。因此，一旦非细胞毒性的蛋白酶被递送到所要的靶标细胞，非细胞毒性的蛋白酶就能够抑制由所要的靶标细胞的细胞分泌。

突触末梢的 3 种蛋白，突触小泡膜上的蛋白 synaptobrevinVAMP、突触前膜上的蛋白 syntaxin 和 SNAP-25 都被称为 SNARE 蛋白。

本发明提供的单链多肽，包括：第一结构域、中间氨基酸序列区域、以及第二结构域，。

中间氨基酸序列区域与第一结构域之间，可以间隔有氨基酸（linker， $L1>0$ ），也可以直接连接

(L1=0)，同样地，第一切割位点与第二结构域之间，可以间隔有氨基酸（linker，L2>0），也可以直接连接（L2=0）。

在一示例中，所述的第一结构域与所述中间氨基酸序列区域之间的 linker（L1）的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

在一示例中，所述中间氨基酸序列区域与所述第二结构域之间的 linker（L2）的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

所述中间氨基酸序列区域序列含有至少一个所述第一酶切割位点，当多个第一酶切割位点时：

这些第一酶切割位点之间可以有相同的、全部相同、或相互之间各不相同；

多个所述第一酶切割位点从 N 端到 C 端顺序连接；

多个所述酶切位点之间的 linker（L4）的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

所述第一酶切割位点被设计为能被人体特定部位的第一蛋白酶高度特异性切割，所述单链多肽在所述第一酶切割位点被所述第一蛋白酶切割后转化为活化形式，活化形式的所述单链多肽能抑制前述的信息物质的释放。

人体特定部位，也即在人体使用时单链多肽进入人体的部位，例如消化道、皮肤组织、细胞等。使用时，进入人体特定部位的方式，可以是多种，例如对于皮肤组织，可以是涂抹、外敷、喷雾以及注射等方式。

本文的高度特异性切割，指通常情况下，酶切割位点主要被相应特定的蛋白酶识别切割，不能被其他的蛋白酶切割，也即在多数条件下，酶切割位点和相应的蛋白酶具有唯一对应性。

具体到“第一酶切割位点被设计为能被存在于单链多肽被使用的人体特定部位的第一蛋白酶高度特异性切割”，指第一酶切割位点，在多数条件下，与存在于人体特定部位的某一种或几种第一蛋白酶具有唯一对应性，例如，当使用部位为消化道，则与存在于消化道中的某一种或几种蛋白酶具有唯一对应性，又例如，当使用部位为皮肤组织，则与存在于皮肤组织中的某一种或几种蛋白酶具有唯一对应性。

这样，单链多肽只有被使用在存在前述的第一蛋白酶的人体特定部位时，例如，涂抹到皮肤表面，进入皮肤组织，通过存在于皮肤组织的对第一酶切割位点高度特异性的第一蛋白酶对第一酶切割位点的酶切割作用，使得所述单链多肽转化为能抑制信息物质释放的活化形式。

所述单链多肽的活化形式为：所述第一结构域和所述第二结构域通过二硫键连接的双链结构。活化形式下，通过二硫键被还原，由此产生了具有切割活性的产物，使得能抑制例如神经递质的信息物质的释放。本文所指的切割活性，是对例如参与细胞胞吐作用的小泡和/或质膜缔合的蛋白进行切割：

实质上，就是第一结构域与第二结构域通过该中间氨基酸序列区域间隔开，而且该中间氨基酸序列区域含有第一酶切割位点，但是不含有非野生存在的酶切氨基酸序列，也即非天然存在于第一结构域和第二结构域之间的酶切的氨基酸序列（野生存在的酶切氨基酸序列或者天然存在的酶切氨基酸序列，指的是指这种单链多肽里，天然存在的，可以通过对这个天然存在的酶切氨基酸序列的酶切，第一结构域和第二结构域从单链变成双链的活性结构），相当于用第一酶切割位点替代了野生存在酶切氨基酸序列的作用，使得能够在第一蛋白酶高度特异性作用下，才被切割。例如，当第一结构域为肉毒 A 型的轻链、第二结构域为肉毒 A 型的轻链时，所述中间氨基酸序列区域不含有“KTKSLDKGYNK”这段天然会被酶切的序列（天然酶切位点序列）。

在一示例中，信息物质为乙酰胆碱。

经实验证实，单链多肽的活化形式，也即前述的双链结构，能起到例如对肌肉的松弛作用，也即具有抑制例如神经递质的信息物质的传递功能。

优选地，所述第一结构域、所述第一酶切割位点以及所述第二结构域的各个部分从 N 端到 C 端

连接。

在一示例中，所述第一结构域具有大约为 50kDa 的分子量，所述第二结构域具有大约为 100kD 的分子量。

在一具体示例中，本发明设计的单链多肽，第一结构域为能够切割靶标细胞的胞吐融合器的蛋白的非毒性细胞蛋白酶或其片段，在一示例中，细胞是神经元细胞，所述胞吐融合器的蛋白为神经元的 snare 蛋白，和/或所述靶结合位点为神经元的突触前膜上的受体。

当胞吐融合器的蛋白为神经元细胞的 SNARE 蛋白，通过切割 SNARE 蛋白，例如阻止乙酰胆碱神经递质的释放，阻断胆碱能神经传导的生理功能。

在一示例中，SNARE 蛋白选自：VAMP、syntaxin 和 SNAP-25。

第二结构域具有结合部分和转运部分：

结合部分能与靶标细胞受体结合并通过受体介导的胞吞作用被接收在靶标细胞的体内，例如，结合神经末梢突触前膜外受体（ectoreceptors）。

转运部分能转运第一结构域进入靶标细胞的胞质溶胶。

通过第二结构域的结合部分与靶标细胞受体结合并通过受体介导的胞吞作用被接收在靶标细胞的体内，转运部分将第一结构域进入靶标细胞的胞质溶胶，在胞质溶胶中，通过对二硫键的还原作用，切割掉第二结构域，第一结构域被释放到胞质溶胶中，从而对 SNARE 蛋白进行切割，抑制神经递质的释放，由此导致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛，进而调节肌张力亢进和运动障碍疾病以及动态性皱纹；并实现导致肌肉废用性萎缩而缩小肌肉体积，以进行身体塑形。

结合部分为羧基端，具有大约为 50kD 的分子量，所述转运部分为氨基端，具有大约为 50kD 的分子量。

在一示例中，第一结构域至少包括梭状芽孢杆菌神经毒素 L 链的一部分，优选地其梭状芽孢杆菌神经毒素 L 链的部分是肉毒梭菌亚型 A、B、C、D 以及 E 其中之一神经毒素 L 链或其衍生而来；和/或，

所述第一结构域含有与 SEQIDNO:10 具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或 100%一致性的氨基酸序列，或含有与 11-16 中任意一个具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或 100%一致性的氨基酸序列基础上去除天然存在的酶切序列；

在一示例中，所述第二结构域至少包括一部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链：

优选地，其部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链是以下一种神经毒素重链或其衍生而来：肉毒梭菌（*C.Botulinum*）亚型 A、肉毒梭菌亚型 B，肉毒梭菌亚型 C，肉毒梭菌亚型 D，肉毒梭菌亚型 E，肉毒梭菌亚型 F，肉毒梭菌亚型 G，巴氏梭菌（*C.Baratii*）和丁酸梭菌（*C.Butyricum*）；或其部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链是破伤风梭菌（*C.Tetani*）的神经毒素 H 链或其衍生而来；和/或

所述第二结构域含有与 SEQIDNO:17-23 中任意一具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或 100%的一致性氨基酸序列。

进一步地，第一蛋白酶不是存在于人体消化道内的蛋白酶，也即人体消化道内的没有能高度特异性切割第一酶切割位点的蛋白酶，或者说，大多数正常条件下，第一酶切割位点不能被人体消化道内存在的蛋白酶切割，这样，避免了使用时被误食进入消化道引起的中毒问题，保证了使用安全。

本文提及的消化道，指从自口腔延续为咽、食管、胃、小肠、大肠、终于肛管的很长的肌性管道，包括口腔、咽、食道、胃、小肠（十二指肠、空肠、回肠）、大肠（盲肠、阑尾、结肠、直肠）和肛管等部。

在一示例中，所述人体特定部位为人的皮肤组织，也即人体皮肤组织的中存在第一蛋白酶。

本文的“皮肤组织”是指身体的整个“皮肤”，包括头皮和粘膜。表皮为皮肤的最外层，它覆盖全身并有保护作用。

皮肤组织的层次可分三大部分：表皮、真皮、皮下组织：

（一）表皮

表皮为皮肤的最外层，它覆盖全身并有保护作用。表皮没有血管（因此划伤后不会出血），但有许多微小的神经末梢。表皮按细胞形态可分为5层，由外至内依次为：角质层、透明层、颗粒层、棘细胞层、基底层。

1、角质层

角质层为表皮的最外层，由4—8层薄且扁平的死亡角化细胞重叠堆积而成。

2、透明层

透明层为2—3层扁平、无核、透明的角化细胞构成。

3、颗粒层

颗粒层由2—5层较厚的扁平细胞核构成。其特征是这些细胞无分裂能力几乎接近死亡，细胞内可见到透明角脂蛋白颗粒。此层有折射光线的作用，可减少紫外线射入体内。

4、棘细胞层

棘细胞层有4—10层带棘的多角形细胞构成，是表皮中最厚的一层。此层各细胞间存有空隙。在细胞间有葡萄糖氨基聚糖。此糖具有亲水性，利于与周围进行物质交换。胞质内还有颗粒状的磷脂和酸性粘多糖，是淋巴液循环和物质交换的场所。其含有许多感觉神经末梢，有感知外界各种刺激的组织液，并可为细胞提供营养。

5、基底层

基底细胞层为表皮的最内层，与真皮呈波浪式相接，由2—4层不同形状的细胞构成。此层是表皮的增殖部分，增殖后的新细胞向外层推移，并逐渐分化为其他各层细胞。

（二）真皮

真皮中细胞成分有成纤维细胞，巨噬细胞及肥大细胞等[2]。胶原纤维，弹性纤维和基质都是由成纤维母细胞分泌产生的。网状纤维是幼稚的胶原纤维，并非一独立成分。真皮组织的厚薄与其纤维组织和基质的多少关系密切，并与皮肤的致密性，饱满度，松弛和起皱现象密切相关，近年来受到越来越多的美容皮肤科学家的关注。

1. 胶原纤维 是真皮结缔组织中最丰富的成分。在表皮下，表皮附属器和血管附近的胶原纤维细小且无一定走向，真皮其他部位的胶原纤维均结合成束。在真皮越往上部越细，越往下越粗。在真皮中部和下部，胶原束的方向几乎与皮面平行，并互相交织在一起，在一个水平面上向各种方向延伸。胶原纤维认为与皮肤老化关系最为密切的真皮有形成分。

2. 网状纤维 可以看作是新生的纤细的胶原纤维。在胚胎时期，网状纤维出现最早。在正常成人皮肤中，网状纤维稀少，仅见于表皮下，汗腺，皮脂腺，毛囊和毛细血管周围。表皮下网状纤维排列呈网状。每个脂肪周围也有网状纤维围绕。在创伤愈合或成纤维细胞增生活跃的病变而有新胶原形成等情况下，网状纤维可以大量增生。

3. 弹力纤维 较胶原纤维细得多, 呈波浪状。弹性纤维在真皮部最粗, 其排列方向和胶原束相同, 可以缠绕在胶原束之间, 与表皮平行。在表皮下的乳头体中, 细小的弹性纤维几乎呈垂直方向上升至表皮下, 终止于表皮真皮交界的下方。弹性纤维主要与皮肤弹性关系密切。

4. 基质为一种无定型物质, 充满于胶原纤维和胶原束之间的间隙内。正常真皮内基质主要含非硫酸盐酸性黏多糖, 如玻璃酸(又称透明质酸)。在正常皮肤中含量虽然很少, 但由于其可以吸收是其1000倍的水, 所以在皮肤抗皱抗老化方面具有重要意义。

5. 细胞: 真皮中含有成纤维细胞, 肥大细胞, 组织细胞, 淋巴细胞及少量真皮突状细胞, 黑色素细胞, 朗格汉斯细胞。成纤维细胞能产生胶原纤维, 弹力纤维, 网状纤维和基质。同时在皮肤组织深层损伤后是主要的组织修复细胞。

(三) 皮下组织

皮下组织是皮肤以下的疏松结缔组织和脂肪组织, 连接皮肤与肌肉, 常称为浅筋膜。皮下组织介于皮肤与深部组织之间, 使皮肤有一定的可动性。

皮下组织由疏松结缔组织和脂肪小叶构成, 其上接真皮, 下与筋膜、肌肉腱膜或骨膜相连。脂肪细胞胞浆透明, 核偏于细胞内缘。脂肪细胞聚集形成一级小叶, 许多一级小叶构成二级小叶, 二级小叶周围有纤维间隔或称小梁。脂肪间隔中含有血管、淋巴管、神经、小汗腺和顶泌汗腺等。

在一示例中, 第一蛋白酶选自以下中的任意一种或多种:

表皮特异性激肽释放酶(KLKs, 人激肽释放酶相关肽酶)(例如 KLK5、KLK6、KLK7)、SASPase、Caspase-14、Furin 蛋白酶。

表皮特异性激肽释放酶(KLKs), 属于丝氨酸蛋白酶家族, 在颗粒层表达, KLKS 是一种分泌性胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶, 似乎在人类皮肤中表达最丰富, 特别是在皮肤的上层棘层和颗粒层中, 角质形成细胞在此处经历终末分化并转化为扁平的砖状结构, 形成角质层, 最外层的表皮层和外界环境的屏障[1]。

[1]Debela 等人, J Mol Biol, 373, 1017-1031 (2007); 和 Tan 等人, J Med Chem. 2015 年 1 月 22 日; 58(2):598-612 (2014)。

KLKs 由 15 个不同的基因编码, 每个基因包含 5 个外显子, 并在人类 19 号染色体上串联排列, 15 个人类 KLK 基因位于染色体 19q13.4 上, 构成人类基因组中最大的连续丝氨酸蛋白酶簇。这些基因通常由五个编码外显子组成, 在某些情况下由一个或两个 5' 非编码外显子组成, 编码激肽释放酶相关肽酶 KLK1 至 KLK15。所有 KLK 基因都编码含有 224-237 个残基的胰凝乳蛋白酶或胰蛋白酶样催化结构域的单链前原蛋白[2]。

[2] Debela 等人, Biol Chem 389, 623-632 (2008)。

在 KLK 家族的 15 个成员中, 其中有 11 个在皮肤中表达, 其范围仅限于表皮和皮肤附属物。基因表达分析表明, KLK1 和 KLK11 是皮肤中表达最高的 KLKs。KLK4、KLK5、KLK6、KLK7 和 KLK13 中度表达, 而 KLK8 的 mRNA 在稳态条件下很少检测到[3]。在表达位置方面, KLK6、KLK9、KLK10、KLK13 和 KLK14 的 mRNAs 似乎严格限于健康表皮的颗粒层, 而 KLK1、KLK4 和 KLK11 的 mRNAs 则同时存在于角质形成细胞的棘层和基底层。

大多数在表皮中表达的 KLK 基因也同时在皮肤附属物中表达[3]。在蛋白质水平上, KLKs 通常在表皮分布更广泛。KLK5 存在于颗粒层和角质层中, 而 KLK6 存在于整个表皮中, 但仅在颗粒层上部富集。KLK7 在表皮基底层和上层颗粒中均被检测到, 但在两者之间的区域几乎检测不到。

[3] N. Komatsu, M. Takata, N. Otsuki, T. Toyama, R. Ohka, K. Takehara, K. Saijoh, Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages, J. Invest. Dermatol. 121 (2003) 542 - 549. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12363.x>。

另外, 已在角质层和颗粒层以及健康皮肤的附属物中观察到 KLK8 和 KLK13[4, 5]。因此, 蛋白质的分布比基因表达更宽, 表明 KLK 在表皮中的扩散。在所有 KLKs 中, KLK14 似乎对皮肤最具特异性, 在其他组织中含量较低, 但在皮肤中的含量相对较高, 在全部蛋白质中的含量为 250ng/g[6, 7]。

[4] N. Komatsu, K. Saijoh, T. Toyama, R. Ohka, N. Otsuki, G. Hussack, K. Takehara, E.P. Diamandis, Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases, *Br. J. Dermatol.* 153 (2005) 274 – 281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06754.x>.

[5] M. Kishibe, Y. Bando, R. Terayama, K. Namikawa, H. Takahashi, Y. Hashimoto, A. Ishida-Yamamoto, Y. Jiang, B. Mitrovic, D. Perez, H. Iizuka, S. Yoshida, Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5834 – 5841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607998200>.

[6] J.L.V. Shaw, E.P. Diamandis, Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids, *Clin. Chem.* 53 (2007) 1423 – 1432. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.088104>.

[7] C.A. Borgoño, I.P. Michael, J.L.V. Shaw, L. Luo, M.C. Ghosh, A. Soosaipillai, L. Grass, D. Katsaros, E.P. Diamandis, Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 2405 – 2422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608348200>.

SASPase 是一种在人体皮肤中发现的蛋白酶, 分子量为 28 kDa。SASPase 在人皮肤的颗粒层中特异性表达, 并通过自溶产生 14 kDa 的蛋白质。据报道, 重组 SASPase 显示出自溶活性以及降解外源性底物, 例如胰岛素和酪蛋白。然而, 它在表皮中的功能尚未确定[8]。

[8] Bernard D. 等人, *J. Invest. Dermatol.* 125, 278-287, 2005

Caspase 家族属于半胱氨酸蛋白酶, 相当于线虫中的 ced-3, 具有高度同源性。这些蛋白酶均有以下特点: ①总是在天冬氨酸之后切断底物, 所以命名为 Caspase (cysteine aspartate-specific protease)。②酶活性依赖于半胱氨酸残基的亲核性。③通常以酶原的形式存在, 为由两大、两小亚基两两组成的异四聚体。大、小亚基由同一基因编码, 在受到激活后前体被切割, 产生两个活性亚基。这些蛋白酶是引起细胞凋亡的关键酶, 一旦信号转导途径被激活, Caspase 被活化, 随后发生凋亡蛋白酶的级联反应。细胞内的酶被激活, 可降解细胞内的重要蛋白质, 最终导致细胞不可逆地走向凋亡。

Caspase-14 (CASP14) 是半胱氨酸蛋白酶家族中的一员, 它在皮肤角质层的形成和调控中发挥着关键的作用。

弗林蛋白酶是一种细胞内切蛋白酶, 通过切割通常为 RX(K/R)R 形式的碱性残基簇, 以蛋白水解方式激活分泌通路区室中的大量前蛋白底物。

在一示例中, 所述第一酶切割位点含有与 SEQ ID NO:1-4、SEQ ID NO:50 (RXXR) 以及 SEQ ID NO:51 (RRXX) 中任意一个具有至少 50%、60%、85%、90%、99% 或 100% 的一致性的氨基酸序列。

其中, SEQ ID NO:5049 以及 SEQ ID NO:51 中, RXXR 和 RRXX 中的 “X” 为任意的氨基酸。优选地, RXXR 中的 XX 为 RK、TK 或 TR; RRXX 中的 “XX” 为 SV 或 KR。

在一示例中, 本发明提供的单链多肽, 其特征在于, 还包括: 增加表达量的信号肽、用于定量的定量蛋白以及标签蛋白中的一种或多种。

进一步的, 对信号肽、定量蛋白以及标签蛋白中的一种或多种分别进行如下各自相应的限定:

所述信号肽含有与 SEQ ID NO:24 具有至少 85%、90%、99% 或 100% 的一致性的氨基酸序列;

所述定量蛋白为荧光蛋白;

所述标签蛋白为 His 标签、GST 标签、MBP 标签以及 Strep-tagII 标签中的一种或多种, 或含有与 SEQ ID NO:25 具有至少 85%、90%、99% 或 100% 的一致性的氨基酸序列。

“对信号肽、定量蛋白以及标签蛋白中的一种或多种分别进行如下各自相应的限定”, 例如只是对信号肽、定量蛋白以及标签蛋白中的信号肽进行对应的上述限定, 又例如是对信号肽、定量蛋白以及标签蛋白均分别做了各自对应的上述限定, 再例如, 是对信号肽、定量蛋白以及标签蛋白重任意两个分别做了各自对应的上述限定, 等等。

在一示例中, 单链多肽还包括: 分别位于第一结构的 N 端和第二结构的 C 端的两个第二酶切割

位点，且切割第二酶切割位点的第二蛋白酶不能对第一酶切割位点进行切割，这样，能通过对两个第二酶切割位点的酶切，将单链多肽中第一结构域、第一酶切割位点以及第二结构域以外的其他部分切割去除，例如将信号肽、定量蛋白、标签蛋白等去除，以得到仅剩第一结构域、第一酶切割位点以及第二结构域的单链多肽。

在一示例中，第一酶切割位点和/或第二酶切割位点也不会通常情况下被通过宿主细胞体内表达单链多肽或通过由来自宿主细胞的细胞提取物参与的体外合成体系合成单链多肽中接触的蛋白酶切割，也即通过宿主细胞体内表达得到单链多肽时，或通过由宿主细胞提取物参与的体外合成体系合成单链多肽时，第一酶切割位点和/或第二酶切割位点，通常情况下，不会被该两种方式中接触到的蛋白酶切割，这样，当第一切割位点满足该前提时，在生产中不至于被容易活化，保证了一定的生产安全性，当第二酶切割位点满足该前提时，能根据需要，保持单链多肽的一定结构，例如能在生产得到单链多肽的过程中，由于带有标签蛋白，方便生产中对产物进行纯化。

在一示例中，第二酶切割位点被设计为针对第二蛋白酶有高度特异性，也即如前，该第二酶切割位点与该第二蛋白酶具有唯一对应性，这样，使得第二酶切割位点在大多数正常情况下（也即通常情况下），只能被特定的第二蛋白酶切割，而不会在生产中被随意切割，以使得单链多肽在第二酶切割位点被切割前，保证一定的结构。

进一步地，第二蛋白酶不是通常会出现的酶，例如不是人体内的蛋白酶，本文的人体内的蛋白酶，指不是人体内通常出现的蛋白酶。这样，减少了例如生产中由于接触人体内的蛋白酶发生切割，在不恰当的时候改变了结构。

在一示例中，优选地，第二蛋白酶选自非人肠激酶、烟草蚀刻病毒蛋白酶、来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的蛋白酶、来源于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的蛋白酶、来源于鼻病毒的蛋白酶、木瓜蛋白酶、昆虫木瓜蛋白酶的同源物或甲壳动物木瓜蛋白酶的同源物。

在一示例中，第二酶切割位点含有与 SEQIDNO:5-9 中任意一具有至少 85%、90%、99%或 100%的氨基酸序列。其中，SEQ ID NO:6: EXXYXQS/G 中的 X 指任意的氨基酸。

在一示例中，当所述第二结构域含有与 SEQIDNO:17 具有至少 80%、85%、90%、95%、99%或 100%的一致性氨基酸序列时，所述第二结构域氨基酸序列中与所述 SEQIDNO:17 的第 423 对应位点的赖氨酸被突变成非赖氨酸。例如，赖氨酸被突变为天冬酰胺、谷氨酸或丙氨酸，由此防止第二结构域被 Trypsin 酶切失去活性。

本文第 423 对应位点的赖氨酸，对于含有与 SEQIDNO:17 完全一致（也即 100%的一致性）的氨基酸序列时，就指的是第 423 位点的赖氨酸，对于其他未含有与 SEQIDNO:17 完全一致性的氨基酸序列时，指的是此时的氨基酸序列中，与 SEQIDNO:17 的第 423 位编号具有合理错位范围内的赖氨酸的位点编号，这里的合理错位范围，指对于本领域技术人员而言，在氨基酸序列的一致性，也即与作为比较的氨基酸序列的同源性达到 80%以上时，与作为比较的氨基酸序列相比，向 N 末端或 C 末端，位点编号会有一定的错位，这种错位是可接受的。

例如，相比 SEQIDNO:17 的序列，与 SEQIDNO:17 具有至少 80%一致性的氨基酸序列，在相比 SEQIDNO:17 的第 423 的位点错位为 5 个位点时的氨基酸为赖氨酸，5 个位点这个错误范围属于可接受的范围，所以本领域技术人员可以认为，该位点的位点编号 427，即为第 423 对应位点的赖氨酸。

在一示例中，所述中间氨基酸序列区域序列还包括 XTXS，所述 X 非 K 氨基酸，优选地：所述 X 为 Q 氨基酸。

在一优选示例中，所述中间氨基酸序列区域序列的结构从 N 端到 C 端为：

XTXS-linker (L3) -至少一个第一酶切割位点：同样地，当所述第一酶切割位点为多个时，所有所述第一酶切割位点中具有相同酶切位点或相互之间各不相同，优选地，多个所述第一酶切割位点从 N 端到 C 端顺序连接。进一步地，L3 的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个或 0-5 个。

本文的第一结构域、中间氨基酸序列区域（当中间氨基酸序列区域只有第一酶切割位点时）以及第二结构域的连接没有特别的限制，优选地，从 N 端到 C 端连接。

2、应用

本发明提供的前述的单链多肽，在以下任意一种或多种中进行应用：护肤、整形、塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗。

具体地，本发明还提供单链多肽的制品或药物，其包括：前述的单链多肽，优选地，单链多肽制品被用于以下任意一种或多种用途中：护肤、整形、塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗。

另外，上述的单链多肽的制品或药物在使用时，可以通过例如涂抹、喷雾、外敷或注射等方式从特定部位进入，例如通过涂抹进入皮肤组织，进入后，在特定部位第一切割位点被特定的第一蛋白酶切割，单链多肽转化为活化形式，从而起到作用。

3、本发明还提供一种核酸，包括：编码前述的单链多肽的核苷酸序列。

本发明还提供一种载体，包括上述的核酸。

本发明还提供一种宿主细胞，包括上述核酸和/或上述的载体。其中，宿主细胞来自原核细胞或真核细胞，进一步地，细胞选自下组：大肠杆菌细胞、人源细胞、中国仓鼠、卵巢细胞、昆虫细胞、麦胚细胞、兔网织红细胞以及酵母细胞中的一种或多种的组合。

更进一步地，宿主细胞选自酵母细胞，再进一步地，酵母细胞选自：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，克鲁维酵母属酵母选自：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

本发明还提供一种体外无细胞合成体系，包括：以编码前述的单链多肽的 mRNA 或 DNA 模板，合成所述单链多肽。

在一示例中，体外无细胞合成体系包括以下中的任何一种或多种：

- (1) 编码前述单链多肽的 mRNA 或 DNA 模板；
- (2) 细胞提取物，所述细胞提取物为酵母细胞提取物；

在一示例中，细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取物来源的菌株为：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母；

- (3) 以下组分中的任意一种或多种：
氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

4、单链多肽的制备方法：

以编码前述的单链多肽的 mRNA 或 DNA 模板进行体外合成反应应得到。

在一示例中，在包括前述的体外无细胞合成体系的反应体系中进行所述体外合成反应，优选地，DNA 模板与参与所述体外合成反应的其他成分的体积比的范围为 1:10-1:50 或 1:20-1:40 或 1:25-1:35 或 1:30。

在一示例中，无细胞体外合成体系包括：酵母细胞提取物、氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

在一示例中，酵母细胞提取物来自下组：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个

个的组合；较佳地，的酵母细胞提取物来自包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母。

在一示例中，酵母提取物占整个无细胞体外合成体系的体积的 50-80%。

本发明通过前述的体外合成反应表达和纯化前述的单链多肽，周期短，操作方便，而且因为使用的是加入 mRNA 或 DNA 模板的体外制备方法，用质粒改造基因的 DNA 模板即可，不存在有毒的菌株泄露的风险。

在一示例中，单链多肽的制备方法还包括：将得到的单链多肽或得到后经纯化的单链多肽用第二蛋白酶酶切得到仅包括第一结构域、第一酶切割位点以及第二结构域的单链多肽。

本发明中无细胞体外合成体系包括体外翻译体系、体外转录翻译体系(IVTT 体系)等。

体外蛋白合成反应，是指在体外无细胞合成体系中合成蛋白的反应，至少包括翻译过程。包括但不限于 IVTT 反应(体外转录翻译反应)。本发明中，优选 IVTT 反应。IVTT 反应，对应 IVTT 体系，是在体外将 DNA 转录翻译为蛋白质(Protein)的过程，因此，我们还将这类的体外蛋白合成体系称为 D2P 体系、D-to-P 体系、D_to_P 体系、DNAto-Protein 体系；相应的体外蛋白制备方法，还称为 D2P 方法、D-to-P 方法、D_to_P 方法、DNA-to-Protein 方法。

本发明的实施例的体外合成反应中，无细胞体外合成体系、模板、质粒、目标蛋白、体外合成反应(孵育反应)、各种制备方法、各种检测方法等技术要素，还可以各自独立地从下述文献中选择合适的实施方式或实施方法，包括但不限于 CN111484998A、CN106978349A、CN108535489A、CN108690139A、CN108949801 A、CN108642076A、CN109022478A、CN109423496A、CN109423497A、CN109423509A、CN109837293A、CN109971783A、CN109988801A、CN109971775A、CN110093284A、CN110408635A、CN110408636A、CN110551745A、CN110551700A、CN110551785A、CN110819647A、CN110845622A、CN110938649A、CN110964736A 等文献。除非和本发明目的相冲突，否则，这些文献及其引用文献以全部内容、全部目的被引用。

以下，基于肉毒毒素 A 型来源，结合各个实验实施例，进一步说明本发明的内容。

实施例 1 DNA 模板准备

1、目的质粒构建：

(1) 构建式含有编码如式一蛋白结构的核苷酸序列的目的质粒：

SP-8His-F2-LC-D (KTKS-F1) -HC-F2-EGFP-8His (式一， N 端到 C 端连接)；

式中的 D 表示中间氨基酸序列区域，KTKS 为天然 A 型肉毒酶切位点的一部分，F1 表示本发明设计的第一酶切割位点，分别对应 KLK5、KLK7、SASPase、Caspase-14 几个不同的第一蛋白酶；

F2 为第二酶切割位点，对应的第二蛋白酶，本实施例中的第二蛋白酶为 TEV 酶；

SP 为信号肽，8His 为标签蛋白；EGFP，荧光蛋白，定量用；

LC 为第一结构域，本实施例中，LC 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10；HC 为第二结构域，本实施例中，HC 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:17；

HC 的第 423 位赖氨酸突变为天冬酰胺。

表 1 的引物分别对应编码不同第一蛋白酶对应的上述蛋白结构的核苷酸序列；

根据表 1 的各个引物对，通过 PCR 的 QuickChange 法获得正确的序列，并转化得到不同的目的质粒。

表 1	
引物名称	5'-3'序列
KLK5-F	TACAGATCTAGAATCGTT GCTTTGAACGACTTGTGTATC

KLK5-R	AACGATTCTAGATCTGTAAGACTTGGTCTTAGAGGTGATG
KLK7-F	AAGCACTTGTACTCTAAC GCTTTGAACGACTTGTGTATC
KLK7-R	GTTAGAGTACAAGTGCTTAGACTTGGTCTTAGAGGTGATG
SASPase-F	GTTTCTCAAGTTTACCCAATCGTTCAA GCTTTGAACGACTTGTGTATC
SASPase-R	TGGGTAAACTTGAGAAACAGACTTGGTCTTAGAGGTGATG
Caspase-14-F	GGTGGTTGGGAACACGACGGTATCGCTTTC GCTTTGAACGACTTGTGTATC
Caspase-14-R	GTGTTCCCAA CCACCAGACT TGGTCTTAGA GGTGATG

(2) 对上述结构式一的蛋白结构，对原始天然肉毒 A，从 LC 起进行第 438 和第 440 位的赖氨酸突变成丙氨酸的改造，构建相应的改造后目的质粒，也即中间氨基酸序列区域 D 为 QTQS-F1。

表 2 的引物分别对应进行改造后，编码不同第一蛋白酶对应的改造后的蛋白结构的核苷酸序列。

通过 PCR 的 QuickChange 法获得正确的序列，并转化得到不同的目的质粒。

表 2	
引物名称	5'-3'序列
KLK5-2Q-F	CTCAGACCCAGTCTGGTGGT TACAGATCTAGAATCGTT GCTTTGAACGAC
KLK5-2Q-R	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
KLK7-2Q-F	CTCAGACCCAGTCTGGTGGT AAGCACTTGTACTCTAAC GCTTTGAACGAC
KLK7-2Q-R	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
SASPase-2Q-F	CTCAGACCCAGTCT GGTGGT GTTTCTCAAGTTTACCCAATCGTTCAA GC
SASPase-2Q-R	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
Caspase-14-2Q-F	CTCAGACCCAGTCTGGTGGT TGGGAACAC
Caspase-14-2Q-R	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC

(3) 质粒的转化

各个目的质粒的转化依照以下进行：

将 1 μl 目的质粒加入 20 μl 的 DH5 α 中，于冰上放置 30min，42℃热激 45s，冰上放置 2min，加入 500 μl 培养基，37℃振荡培养 1h (200 rpm)。吸取 100 μl 到 LB (含抗) 平板，37℃倒置培养 12~16 h，拿出置于 4℃冰箱保存。

(4) 对转化后的质粒进行抽提后扩增：

扩增体系：终浓度为 20-30 μM 的随机引物，0.05-0.15 μg/mL 的质粒模 板，0.5-1mM 的 dNTP，2 × BSA，1 × phi29 反应缓冲液 (成分为 50mM Tris-HCl ,10mM MgCl₂ ,10mM(NH₄)₂SO₄ ,4mM DTT ,pH7.5)；

扩增体系 10ml 为例：

将扩增体系 10ml、质粒终浓度为 4ng/μl、0.05-0.1mg/mL 的 phi29DNA 聚合酶 5μl 混合，37℃、30rpm 反应 2 小时，然后采用 1%琼脂糖胶进行电泳鉴定。

实施例 2，体外无细胞蛋白质合成 (IVTT)

体外无细胞蛋白质合成体系：终浓度为 22mM pH 为 7.4 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸，30-150mM 醋酸钾，1.0-5.0mM 醋酸镁，1.5-4mM 核苷三磷酸混合物(腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸)，0.08-0.24mM 的氨基酸混合物(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸)，25mM 磷酸肌酸，1.7mM 二硫苏糖醇，0.27mg/mL 磷酸肌酸激酶，0.027-0.054mg/mL T7RNA 聚合酶，1%-4%的聚乙二醇，0.5%-2%的蔗糖，最后加入 50-80% 体积的酵母细胞提取物。

本实施例的酵母细胞提取物来自乳酸克鲁维酵母。

更具体的，采用康码（上海）生物科技有限公司蛋白质工厂的 Standard 产品进行 IVTT 反应：

将实施例 1 得到的扩增产物（DNA 模板）按与体外无细胞蛋白体系体积比为 1:30，加入到无细胞体外蛋白质合成体系中，在 30±2 度恒温箱 100rpm 反应 3~6h。

实施例 3 对体外合成的蛋白进行纯化：依照下述步骤进行纯化：

- (1) 确定磁珠用量：磁珠用量为体外无细胞蛋白质合成体系用量的 1%。
 - (2) 磁珠清洗：使用前用水洗三次，每次涡旋 15 秒，用磁力架收集磁珠，每次水的用量为磁珠用量的 5-10 倍。
 - (3) 目的蛋白与磁珠结合：把洗好的磁珠和 IVTT 产物在大烧杯中混合，4 度 100rpm 结合 1 小时，收集磁珠至离心管中。
 - (4) 洗杂：用 30mM 咪唑洗涤载有蛋白的磁珠 3 次每次 180rpm 10 分钟，洗涤液的用量为磁珠体积的 3-5 倍。
 - (5) 用 280mM 咪唑洗脱液洗脱：洗脱液的用量为磁珠用量的 2 倍。
 - (6) 离心分离：离心去除残余的磁珠，第一次 5 分钟，12000rpm：
- 其中，(4) - (5) 的洗脱是在 pH8.0 下。

实施例 4 对纯化结果进行电泳

第一蛋白酶为 KLK5 的改造后的蛋白电泳结果图 1 所示。

图 1 中，“+”表示进行了相应动作，“-”表示缺少相应动作。二硫键还原剂能对二硫键还原，活化后的单链多肽第一结构域和第二结构域之间的二硫键被还原后，会分成第一结构域和第二结构域两个部分，分别是 50kDa 和 100kDa 大小，二硫键还原成功，表示体外合成得到了具有可以活化的单链多肽蛋白。

由图 1 可以看出，改造后，也即对 LC 进行第 438 和第 440 位的赖氨酸突变成丙氨酸的改造（中间氨基酸序列区域为（QTQS-F1））：

pH8.0 纯化能得到相应的蛋白，未酶切前，即使采用二硫键还原剂，大小大于 150kDa，说明得到了相应的蛋白，且说明第一酶切割位点未被酶切时，不会产生活化；

只对第二酶切割位点切割，进行二硫键还原后，得到的大小接近 150kDa，说明对第二酶切割位点的酶切成功，得到了只剩下第一结构域、第一酶切割位点以及第二结构域的部分，并且第一酶切割位点未被酶切时，不会产生活化；

对第一酶切割位点和第二酶切割位点均进行切割，同时采用二硫键还原剂还原，出现了 100kDa 和 50kDa 的大小，对比上述，说明第一酶切割位点被切割后，确实能转化为第一结构域和第二结构域通过二硫键连接的双链结构的活化形式。

改造前，洗脱，没有得到纯化蛋白的电泳图，说明保留的天然切割位点，容易被断裂。

实施例 5 酶切方法

对前述实施例得到的纯化蛋白：

TEV 单酶切：纯化好的蛋白于 3mM GSH, 0.3mM GSSG, 20~30℃，TEV 酶酶切过夜。

双酶切: 纯化好的蛋白, 在 20~30℃, KLK5 酶酶切至少 8 小时, 然后加入 3mM GSH, 0.3mM GSSG, 20~30℃, TEV 酶酶切过夜。

实施例 6 酶切产物体外活性检测实验

为了简单高效准确的检测酶切产物在体外的活性, 我们采用的是荧光共振能量转移 (FRET) 的方法, 即在供体和受体相互靠得很近 (1-10 nm) 时, 将光子能从一个受激发的荧光团 (供体) 转移到另一个荧光团 (受体)。本实验采用的是 CFP-作用底物酶切位点-YFP 结构的底物系统, 当正常状态下用 433nm 的激发光激发时, 可以在 527nm (黄光) 处接收到发射光信号, 当有活性的酶切产物存在时, 因为底物系统被酶切产物切断, 此时用 433nm 的激发光激发时, 会在 476nm (蓝光) 处接收到发射光信号。通过蓝光与黄光比值的变化就可以计算出酶切产物切割底物的活性。

(一) 双酶切产物对不同底物的活性效果

1. **实验目的:** 测试酶切产物对于 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 底物蛋白与 CFP-SNAP25(66aa)-YFP 底物蛋白的切割效果。

2. **实验过程**

2.1 试剂

2.1.1 HEPES;

2.1.2 NaCl;

2.1.3 DTT;

2.1.4 Zn(OAc)₂ ;

2.1.5 纯化水;

2.1.6 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 1.9mg/mL (55.72kDa);

2.1.7 CFP-SNAP25(66aa)-YFP 2.8mg/mL (61.22kDa);

2.1.8 双酶切 700ug/mL;

2.1.9 Na₂CO₃

2.2 耗材

2.2.1 50 ml 离心管;

2.2.2 384 孔酶标板;

2.2.3 200 μl 枪头;

2.2.4 10 μl 枪头;

2.2.5 1.5 ml EP 管。

2.3 设备

2.3.1 酶标仪;

2.3.2 1ml 移液器;

2.3.3 200 μl 移液器;

2.3.4 10 μl 移液器;

2.3.5 PH 计;

2.3.6 分析天平。

2.4 对底物切割效果的测定流程

2.4.1 配制切割反应缓冲 buffer: 先用分析天平称取 0.1835g Zn (OAc)₂, 然后加入超纯水用超纯水定容到 50ml, 配制成 20mM 的 Zn (OAc)₂ 溶液备用;

2.4.2 用分析天平分别称取 0.5958g HEPES; 0.0146g NaCl; 0.0154g DTT 并放入 50ml 离心管中, 并加入 50ul 的 20mM 的 Zn (OAc)₂ 溶液, 然后加入超纯水到 45ml 左右并混匀。

2.4.3 接下去用 1M 的 Na₂CO₃ 溶液调节 PH, 将溶液 PH 调节至 7.4, 最后用 50ml 容量瓶将切割缓冲 buffer 定容, 得到切割反应体系备用;

2.4.4 将两个底物蛋白，放在冰上化冻；

2.4.5 打开酶标仪及其控制电脑，并将酶标仪反应腔内温度调至 37 度；

2.4.6 每个切割反应的终反应体系为 50ul，分别设定了不同的底物与双酶切产物的不同比例（浓度比）：8:1；5:1；2.5:1。

2.4.7 在 1.5mlEP 管按上述比例配制好终反应体系：在底物：酶为 8：1 的反应体系中双酶切产物的浓度为 140ug/ml，底物浓度为 1120ug/ml；底物：双酶切产物为 5：1 的反应体系中双酶切产物的浓度为 140ug/ml，底物浓度为 700ug/ml；底物：双酶切产物为 2.5：1 的反应体系中双酶切产物的浓度为 140ug/ml，底物浓度为 350ug/ml，总体系为 50ul，将底物与双酶切产物加完后，用切割反应缓冲 buffer 补足，并混匀，并分别设置两个分别只加 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 底物蛋白与 CFP-SNAP25(66aa)-YFP 底物蛋白但不双酶切产物的空白对照；

2.4.8 混匀后将终反应体系加入到 384 酶标板中并将酶标板在酶标仪中震动混匀 2 分钟；

2.4.9 震动混匀后调整至反应程序，每两分钟读数一次，持续时间 3 小时，其读数设置为激发光 433nm，接收光 476nm，激发光 433nm，接收光 526nm，两个不同波长的激发光都需要测量；

2.4.10 3 小时读数后，取出酶标板，并在不同的样品孔中分别加入 3ul 0.25% Trypsin 用于终止反应，加入 0.25% Trypsin 后将酶标板放入酶标仪中开始读数，每一分钟读数一次，持续时间半小时。其读数设置为激发光 433nm，接收光 476nm，激发光 433nm，接收光 526nm，两个不同波长的激发光都需要测量。

2.5 清场

2.5.1 记录完整。

2.5.2 废弃物归类丢弃：废弃物将被弃至化学废弃物储存箱。

3. 结果及分析

图 4 和图 5 分别展示了不同浓度底物 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 与底物 CFP-SNAP25(66aa)-YFP 的底物转换率，可以看出在一定时间范围内，底物转化率与时间呈线性关系，所以双酶切产物对两个的切割效果是符合预期的，初步证明双酶切产物体外实验具有效果；

但底物 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 的线性关系明显好于 CFP-SNAP25(66aa)-YFP，也即底物蛋白 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 相较于底物蛋白 CFP-SNAP25(66aa)-YFP 具有更好的转化率；

另外，图 4 和图 5 显示，底物与双酶切产物比在 8:1，5:1 处具有良好的线性关系，且底物与双酶切产物比在 5:1 处在 2 个小时左右达到了平台期，而底物与酶比在 8:1 时间偏久，所以后续实验采用底物与酶切产物浓度比将采用 5:1 左右。

（二）TEV 单酶切影响

本次主要是比较 TEV 单酶切产物和双酶切产物的活性效果，以排除 TEV 酶的影响。

实验方法与“（一）双酶切产物对不同底物的活性效果”的相同，不同地是，本次只选用了底物 CFP-SNAP25(17aa)-YFP，体系中底物蛋白 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 蛋白的浓度为 800ug/ml，以 TEV 单酶切产物（原液浓度 700ug/ml）与双酶切产物做对比实验，单酶切产物与双酶切产物的浓度均为 140ug/ml（底物与酶切产物浓度比接近 5:1），并设置两个只加 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 底物蛋白不加酶切产物的空白对照。

图 6 显示了双酶切产物对于底物的转化率在一定时间范围内呈现线性关系，而 TEV 单酶切产物对于底物基本上没有活性效果，此次实验评估了单酶切产物中残留的 TEV 酶对于底物不存在活性，并且 TEV 酶酶切后不影响单链多肽的活性。

（三）KLK5 酶的影响

本次主要是比较双酶切产物和 KLK5 酶的活性效果，以排除 KLK5 酶的影响。

1.实验目的：本次测试 KLK5 酶的影响

2.实验过程

2.1 试剂

2.1.1 HEPES;

2.1.2 NaCl;

2.1.3 DTT;

2.1.4 Zn(OAc)₂;

2.1.5 纯化水;

2.1.6 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 26.8mg/mL (55.72kDa);

2.1.7 双酶切产物 671ug/mL;

2.1.8 KLK5 酶 530ug/mL;

2.1.9 Na₂CO₃;

2.1.10 Tween80。

2.2 耗材

2.2.1 50 ml 离心管;

2.2.2 384 孔酶标板;

2.2.3 200 μ l 枪头;

2.2.4 10 μ l 枪头;

2.2.5 1.5 ml EP 管。

2.3 设备

2.3.1 酶标仪;

2.3.2 1ml 移液器;

2.3.3 200 μ l 移液器;

2.3.4 10 μ l 移液器;

2.3.5 PH 计;

2.3.6 分析天平。

2.4 对底物切割效果的测定流程

2.4.1 配制切割反应缓冲 buffer，先用分析天平称取 0.1835g Zn (OAc)₂，然后加入超纯水用超纯水定容到 50ml，配制成 20mM 的 Zn (OAc)₂ 溶液备用；

2.4.2 用分析天平分别称取 0.5958g HEPES; 0.0146g NaCl; 并放入 50ml 离心管中, 并加入 500ul 的 20mM 的 Zn (OAc)₂ 溶液 (此时溶液 Zn (OAc)₂ 的终浓度为 200uM)，再加入 0.1% Tween80 (50ml 体系中加入 50ul 100% 的 Tween80) 然后加入超纯水到 45ml 左右并混匀；

2.4.3 接下去用 1M 的 Na₂CO₃ 溶液调节 PH，将溶液 PH 调节至 7.4, 最后用 50ml 容量瓶将切割反应缓冲 buffer 定容得到反应体系，备用。定容好后分别取 10ml 的不含 DTT 的反应体系加入空管中，然后称取相应量的 DTT 粉末，并加入反应体系中，将其配置成 0.5mM DTT 的缓冲体系备用；

2.4.4 将 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 底物蛋白放在冰上化冻；

2.4.5 打开酶标仪及其控制电脑，并将酶标仪反应腔内温度调至 37 度；

2.4.6 在 1.5ml EP 管配制好各个终反应体系：体系中底物蛋白 CFP-SNAP25(17aa)-YFP 蛋白的浓度为 800ug/ml, 双酶切产物的浓度为 140ug/ml, 其余多余的体积用上述配置的缓冲液补足至 50ul; 在 KLK5 酶切组中底物蛋白浓度为 800ug/ml, 不加双酶切产物，只加 KLK5 酶，且 KLK5 酶浓度为 1.4ug/ml (与双酶切产物中余留的 KLK5 酶浓度保持一致)，并设置两个只加

CFP-SNAP25(17aa)-YFP 底物蛋白不加双酶切产物的空白对照；

2.4.7 混匀后将终反应体系加入到 384 酶标板中并将酶标板在酶标仪中震动混匀 2 分钟；

2.4.8 震动混匀后调整至反应程序，每两分钟读数一次，持续时间 3 小时，其读数设置为激发光 433nm，接收光 476nm，激发光 433nm，接收光 526nm，两个不同波长的激发光都需要测量；

2.4.9 3 小时读数后，取出酶标板，并在不同的样品孔中分别加入 3ul 0.25%Trypsin 用于终止反应，加入 0.25%Trypsin 后将酶标板放入酶标仪中开始读数，每一分钟读数一次，持续时间半小时。其读数设置为激发光 433nm，接收光 476nm，激发光 433nm，接收光 526nm，两个不同波长的激发光都需要测量。

2.5 清场

2.5.1 记录完整。

2.5.2 废弃物归类丢弃：废弃物将被弃至化学废弃物储存箱。

图 7 显示了双酶切产物对于底物的转化率在一定时间范围内呈现线性关系，而 KLK5 酶对于底物基本上没有活性效果，此次实验评估了单酶切产物中余留的 KLK5 酶对于底物不存在活性，证明本发明提供的单链多肽，经酶切后，通过二硫键的还原，能起到活性作用。

（四） 多个第一酶切割位点的体外活性检测

1.按下构建：SP-8His-F2-LC-D（F11-F12）-HC-F2-EGFP-8His：

该结构与式一不同的是，D 中含有两个第一酶切割位点，分别如下：

蛋白编号	中间氨基酸序列区域（D）
FA	RRSVGSGYRSRIV
FB	GSGRRKRGSGYRSRIV
FC	GSRRSVGGYRSRIV
FD	RRSVGGYRSRIV

对该实施例结构得到的肉毒蛋白，只进行 TEV 酶切（单酶切），同时以进行 TEV 和 KLK5 的双酶切（HD）、不含肉毒蛋白只有 KLK5 酶的做对照（negative control），进行体外活性检测：

2.实验过程

2.1 试剂

2.1.1 HEPES

2.1.2 NaCl

2.1.3 DTT

2.1.4 Zn(OAc)2

2.1.5 纯化水

2.1.6 FP1-SNAP25(17aa)-FP2 26.8mg/mL (55.72kDa)；

2.1.7 双酶切（将 HD 的第一酶切割位点和第二酶切位点均酶切得到）：671ug/mL（Double digestion）

2.1.8 单酶切（只酶切 TEV 位点）：FA：336ug/mL；FB：277ug/mL；FC：110ug/mL；FD：427ug/mL；HD（第一酶切割位点只有 KLK5）：100ug/mL；

2.1.9 KLK5 酶 530ug/mL；2.1.10 Na2CO3

2.1.11 Tween80

2.1.12 BSA

2.1.13 HCl

2.1.14 PMSF

2.2 耗材

2.2.1 50 ml 离心管

2.2.2 384 孔酶标板

2.2.3 200 μ l 枪头2.2.4 10 μ l 枪头

2.2.5 1.5 ml EP 管

2.3 设备

2.3.1 酶标仪

2.3.2 1ml 移液器

2.3.3 200 μ l 移液器2.3.4 10 μ l 移液器

2.3.5 PH 计

2.3.6 分析天平

2.4 健美肽 150 酶活测定流程

2.4.1 配制健美肽 150 酶切缓冲 buffer, 先用分析天平称取 0.1835g $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, 然后加入超纯水用超纯水定容到 50ml, 配制成 20mM 的 $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ 溶液备用。

2.4.2 用分析天平分别称取 0.5958g HEPES; 0.0146g NaCl; 0.0154g DTT 并放入 50ml 离心管中, 并加入 50ul 的 20mM 的 $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ 溶液, 再加入 0.1% Tween80 (50ml 体系中加入 50ul 100% 的 Tween80) 然后加入超纯水到 45ml 左右并混匀。此外配制其他缓冲体系, 测试缓冲体系 2, 其他所有条件不变将 Zn^{2+} 浓度提高 10 倍提高到 200uM; 测试缓冲体系 3, 不加 Tween80, 此外其他所有条件不变将 PH 用 1M 的 HCL 调节至 5, 测试缓冲体系 4, 不加 Tween80, 此外其他所有条件不变添加 1% BSA; 测试缓冲体系 5, 不加 Tween80, 此外其他所有条件不变添加 1% BSA, 并添加 1mM 的 PMSF。

2.4.3 接下去用 1M 的 Na_2CO_3 溶液调节 PH (缓冲体系 2 中已调节至 PH=5, 故不需再调节 PH, 其他体系正常调节 PH), 将溶液 PH 调节至 7.4, 最后用 50ml 容量瓶将酶切缓冲 buffer 定容, 备用。

2.4.4 将 FP1-SNAP25(17aa)-FP2 底物蛋白放在冰上化冻。

2.4.5 打开酶标仪及其控制电脑, 并将酶标仪反应腔内温度调至 37 度。

2.4.6 每个酶切体系为 50ul, 此次实验为了验证 5 个单酶切的健美肽酶活酶, 以及优化健美肽 150 酶切体系。

2.4.7 在 1.5ml EP 管配制好各个反应体系, 体系中底物蛋白 FP1-SNAP25(17aa)-FP2 蛋白的浓度为 800ug/ml, 健美肽 150 的浓度为 140ug/ml, 其余多余的体积用酶切缓冲 buffer 补足至 50ul, 在 KLK5 酶切组中底物蛋白浓度为 800ug/ml, 不加健美肽 150, 只加 KLK5 酶, 且 KLK5 酶浓度为 1.4ug/ml (与双酶切中 KLK5 酶浓度保持一致), 并设置两个只加 FP1-SNAP25(17aa)-FP2 底物蛋白不加健美 150 的空白对照。

2.4.8 混匀后将反应体系加入到 384 酶标板中并将酶标板在酶标仪中震动混匀 2 分钟。

2.4.9 震动混匀后调整至反应程序, 每两分钟读数一次, 持续时间 3 小时, 其读数设置为激发光 433nm, 接收光 476nm, 激发光 433nm, 接收光 526nm, 两个不同波长的激发光都需要测量。

2.4.10 3 小时读数后, 取出酶标板, 并在不同的样品孔中分别加入 3ul 0.25% Trypsin 用于终止反应, 加入 0.25% Trypsin 后将酶标板放入酶标仪中开始读数, 每一分钟读数一次, 持续时间半小时。其读数设置为激发光 433nm, 接收光 476nm, 激发光 433nm, 接收光 526nm, 两个不同波长

的激发光都需要测量。

2.5 清场

2.5.1 记录完整。

2.5.2 废弃物归类丢弃：废弃物将被弃至化学废弃物储存箱。

图 8 中显示了在含有 Tween80 的酶切体系中双酶切肉毒蛋白对于底物有明显的酶切效果，单酶切检测的 FA, FB, FC, FD, HD (只有一个第一酶切割位点 KLK5) 肉毒蛋白对于底物没有酶切效果 (也即只酶切了 TEV 酶，中间两个酶切位点未酶切，都没有活性)，KLK5 在含有 Tween80 的酶切体系中基本上也没有酶活。

实施例 6 证明，本发明提供的单链多肽，由于第一酶切割位点的存在，需要经高度特异性的第一蛋白酶进行酶切后，才能被高度活化。

实施例 7 双酶切后制备的产物实验

(1) 药效实验

A、注射组实验操作

对按实施例 1 得到的改造后的目的质粒，按实施例 1-3 的方法制备得到单链多肽(pH8.0 洗脱纯化得到)，根据实施例 4 的双酶切得到的蛋白，进行以下实验：

购买 3 周龄左右 (13-15g) 的雌性 CD-1 小鼠，进行实验。首先将小鼠转移到动物房适应 3 天。适应完成后，对小鼠进行注射制剂实验。接着用磷酸盐缓冲液稀释原液蛋白到 1-0.01ng/ml 配制好作为注射剂，配制好后的注射剂对小鼠进行注射实验，用手将小鼠抓牢，用手指将小鼠左后腿固定，找到小鼠腓肠肌位置，在小鼠腓肠肌位置注射 50 μ l 注射制剂，注射 3 只小鼠作为平行实验，注射完后，先观察一下小鼠状态，若正常则将小鼠放回笼中。每天观察比较小鼠后腿左右肢的并指情况。

B、涂抹组实验操作

对按实施例 1-3 制备得到的单链多肽，根据实施例 4 的双酶切得到的蛋白，与油酸、丙二醇、吐温 80 等混合后作为涂抹制剂 (涂抹制剂的配置具体参见申请号为 202310178312.0 的中国专利)，进行以下实验：

购买 3 周龄左右 (13-15g) 的雌性 CD-1 小鼠，进行实验。首先将小鼠转移到动物房适应 3 天。适应完成后，对小鼠进行涂抹制剂实验。涂抹制剂配制好后对小鼠进行涂抹实验。首先通过腹腔注射三溴乙醇将小鼠麻醉，然后用宠物剃毛器将小鼠左后腿的毛清理干净把小鼠腓肠肌位置暴露出来，清理完成后对于小鼠进行制剂涂抹，每个制剂涂抹 200 μ l，(先在小鼠腓肠肌位置涂抹 100 μ l，待其晾干后再涂抹 100 μ l) 每组制剂选取 3 只小鼠进行平行实验，涂抹完成后，观察一下小鼠状态，并等制剂干后将小鼠放回笼中。每天观察比较小鼠后腿左右肢的并指情况，并按照第一次涂抹的剂量对小鼠进行制剂涂抹。

参照图 2，对两组供试品的试验效果进行打分：图中左侧是未用制品的参照图，右侧是用制品的变化参照图，分值分 0、1、2、3、4 以及 5，共 5 种。分值越高，说明效果越好。

实验结果如图 3 所示，其中，图中显示的注射浓度为 0.3ng/ml、涂抹组蛋白浓度为 10 μ g/ml。

根据实验结果可以看出：

(1) 注射组单次给药，在给药第 3 天显示出最强的药效，在给药后第 5 天基本恢复；

(2) 涂抹组连续给药 11 天，在给药后第 5 天显示出最强效果，在停止给药后，药效持续时间明显

比注射给药组要长。

(2) 急性口毒实验-灌胃实验

购买 3 周龄左右（13-15g）的雌性 CD-1 小鼠，进行实验。首先将小鼠转移到动物房适应 3 天。适应完成后，对小鼠进行灌胃实验。接着分别前述的注射剂和涂抹制剂对小鼠进行灌胃处理。

具体地，用手将小鼠抓牢，用 1ml 的注射器吸取 300μl 的注射剂或涂抹制剂，并用 8 号灌胃针对小鼠进行灌胃处理，灌胃 3 只小鼠进行平行实验，灌胃完成后，观察一下小鼠状态，若小鼠状态正常则将小鼠放回笼中。每天观察小鼠行为状态，并记录小鼠体重。

实验结果：无论是注射剂还是涂抹制剂的小鼠均没有死亡，且体重增长趋势与对照组相同。

实施例 8 不酶切的实验

(1) 按实施例 1 的方式，构建式含有编码如式一蛋白结构的核苷酸序列的目的质粒：

LC-D-HC（式二， N 端到 C 端连接）；

式中的 D 表示中间氨基酸序列区域，中间氨基酸序列区域含有的第一酶切割位点分别对应 KLK5、KLK7、SASPase、Caspase-14 几个不同的第一蛋白酶， LC 为第一结构域，本实施例中，LC 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10；HC 为第二结构域，本实施例中，HC 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:17。

具体结构如表 3 所示：

表 3	
蛋白编号	结构
FeHD	L-furin(RRKR)-GG-KLK5-H
FfHDB	L-furin(RTRR)-GG-KLK5-H
FfHDS	L-furin(RTKR)-GG-KLK5-H
HD	L-QTQS-SGG-KLK5-H
KCK5S (KLK5S)	L-QTQS-GG-KLK5-H
m2	L-GI-furin(RRKR)-SVSH-KLK5-H
m4	L-furin(RRKR)-SVSH-KLK5-H
m6	L-furin(RTKR)-SVS-KLK5-H
NTF17	L-furin(RTRR)-SVS-KLK5-H
NTF23	L-furin(RTRR)-GG-H
NTF24	L-furin(RTKR)-GG-H
NTF25	L-furin(RRSV)-GG-H
NTF26	L-furin(RRKR)-GG-H
NTF27	L-QTQS-KLK7-H
NTF28	L-QTQS-SASPase-H
NTF29	L-QTQS-Caspase-14a-H
NTF32K	L-furin（RTKR）-GG-KLK5-H
对照 1	L-QTQS-TEV-H
对照 2	L-QTQS-GG-H

按实施例 2-3 对表 3 的结构得到的扩增产物（DNA 模板）进行表达和纯化，得到各个蛋白。

进行电泳，跑胶结果显示得到的各个蛋白的无明显切割，证明在体外未接触特定的第一蛋白酶时，不容易被活化。

(1) 涂抹实验

1. 材料与动物

- 1.1 样品信息：各个样品蛋白，配置浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 的制剂。样品均避光、冷藏 (2°C – 8°C) 保存。
- 1.2 动物品系：CD1 小鼠，来源：浙江维通利华实验动物技术有限公司，雌鼠 24 只，18–22g，SPF 级，引入日期：20230407，实验动物生产许可证号：SCXK (浙) 2019–0001，实验动物质量合格证号：20220714Abzz0619000520，实验动物使用许可证号：SYXK (沪) 2022–0015。
- 1.3 饲料来源：上海普路腾生物科技有限公司，SPF 级小鼠维持饲料，生产许可证：沪饲证 (2018) 04001。

2 方法

2.1 检测方法：DAS (Digit Abduction Score) 小鼠后趾外展评分检测去神经化程度，按图 2 的标准进行评分。

2.2 试验方法：将配制好的样品蛋白取出恢复至室温。将小鼠随机分组，2.5%三溴乙醇腹腔注射麻醉小鼠，麻醉后剃去腓肠肌所在皮肤毛发，10%乙醇擦拭，将供试品溶液分别在 CD-1 小鼠的腓肠肌处涂抹，每个样品涂抹 3 只，每只涂抹 0.2ml，连续涂抹 7 天，涂抹后连续观察，每日记录小鼠死亡结果以及并指结果，根据并指评分标准，检测作用的强弱。

结论：结果证实，表 3 中的蛋白，涂抹后，相比对照 1 和对照 2，能起到的作用效果时间早、且维持时间长。

(2) LD50

1.材料与动物

- 1.1 样品信息：FfHDS (健美肽 150(Ff), Km-JMT-0150)，无色透明液体，避光、冷藏 (2°C – 8°C) 保存。
- 1.2.动物品系：CD1 小鼠，来源：浙江维通利华实验动物技术有限公司，雌鼠 25 只，18–22g，SPF 级，引入日期：20230217，实验动物生产许可证号：SCXK (浙) 2019–0001，实验动物质量合格证号：20220714Abzz0619000520，实验动物使用许可证号：SYXK (沪) 2022–0015。
- 1.3 饲料来源：上海普路腾生物科技有限公司，SPF 级小鼠维持饲料，生产许可证：沪饲证 (2018) 04001。

2.方法

2.1 检测方法：《中国药典》2020 版第四部通则 3533 A 型肉毒毒素效价测定。

2.2 试验方法：用 0.9%氯化钠溶液将健美肽 150(Ff) 750ug/mL，按相同的等比间隔稀释至 6 个稀释度，稀释后其浓度依次为 2ng/ml, 1ng/ml, 0.5ng/ml, 0.25ng/ml, 0.125ng/ml, 0.0625ng/ml，对应给药剂量为 38.46ng/kg, 19.23ng/kg, 9.62ng/kg, 4.81ng/kg, 2.40ng/kg, 1.20ng/kg。用稀释好的供试品溶液分别注射 26–30 日龄雌性昆明小鼠 (SPF 级)，共注射 6 个供试品浓度梯度，除第一个浓度注射 5 只，其余每个稀释度注射 4 只，每只腹腔注射 0.5ml，并分别标记为 1, 2, 3, 4, 5, 6。注射后连续观察 5 天，每日记录小鼠死亡结果，根据 4 天动物存活率的剂量反应曲线，计算供试品的生物效价结果。

3.结果

数据处理采用 Excel，作图软件采用 GraphPad (见图 9)，计算方法采用改良寇氏法公式：

$$LD_{50} = \log^{-1} [X_m - i(\Sigma p - 0.5)] :$$

其中 X_m ：最大剂量组剂量对数值； i ：相邻两组剂量高剂量与低剂量之比的对数（相邻两组对数剂量的差值）； p ：各组动物死亡率； Σp ：各组动物死亡率之总和。

计算结果：LD50=6.8ng/kg，效价单位为 0.136ng/U（每只小鼠按 20g 计算）（也即 LD50）。

结果远小于天然肉毒的效价。（Rossetto, O.; Montecucco, C. Tables of Toxicity of

Botulinum and Tetanus Neurotoxins. Toxins 2019, 11, 686. [CrossRef] [PubMed])

肉毒杆菌神经毒素(“BoNT”,七种免疫学上不同的亚型,A-G)和破伤风神经毒素(“TeNT”)是已知的按重量计毒性最大的物质,当通过静脉内或肌肉内途径给药时,LD50 范围为 0.5-2.5 ng/kg(National Institute of Occupational Safety and Health, “Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (R-TECS),” Cincinnati, Ohio: National Institute of Occupational Safety and Health (1996))。

野生肉毒 A (天然肉毒 A) 的毒性,是我们设计的多肽的近 20 倍。

(3) ED50

1. 实验目的: ED50 测定

2. 实验过程

2.1 试剂耗材

2.1.1 0.9 %氯化钠溶液

2.1.2 Km-JMT-0150 (FfHDs, 健美肽 150(Ff)) 750ug/mL;

2.1.3 26-30 日龄雌性 SPF 级 CD-1 小鼠 (浙江维通利华实验动物技术有限公司)

2.1.4 1 ml 医用注射器

2.1.5 纯化水

2.1.6 50 ml 离心管

2.1.7 1 ml 枪头

2.1.8 200 μ l 枪头

2.1.9 10 μ l 枪头

2.1.10 1.5 ml EP 管

2.1.11 小鼠饲料

2.1.12 小鼠玉米芯垫料

2.1.13 小鼠饮用纯化水

2.2 设备

2.2.1 超净工作台

2.2.2 1ml 移液器

2.2.3 200 μ l 移液器

2.2.4 10 μ l 移液器

2.3 Km-JMT-0150 小鼠 ED50 实验操作

2.3.1 实验前准备

2.3.1.1 实验所需的一次性医用注射器,适龄的 CD-1 小鼠,不同浓度梯度的 Km-JMT-0150 准备好。

2.3.1.2 超净工作台 30 分钟紫外灭菌。

2.3.1.3 在《动物实验记录》中记录本次实验的信息。

2.3.2 供试品制备

不同梯度浓度 Km-JMT-0150 的制备:用 0.9 %氯化钠溶液将 Km-JMT-0150 按相同的等比间隔稀释至 8 个稀释度,稀释后其浓度依次为 1.68 ng/ml, 0.84 ng/ml, 0.42 ng/ml, 0.21 ng/ml, 0.105 ng/ml, 0.0525 ng/ml, 0.02625 ng/ml, 0.013125 ng/ml, 并分别标记为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8。

2.3.3 实验方法

2.3.3.1 选取 4 周雌性 SPF 级 CD-1 小鼠 24 只,对小鼠进行称重,并观察其生存状态,以备腓肠肌注射用。

2.3.3.2 抓取小鼠:右手抓取鼠尾提起,置于鼠笼或实验台向后拉,在其向前爬行时,用左

手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤，将鼠体置于左手心中，把后肢拉直，以无名指按住鼠尾，小指按住后腿，将小鼠抓牢。

2.3.3.3 将小鼠抓牢后，取稀释好 8 个不同梯度的健美 150 通过腓肠肌注射，注射到 CD-1 小鼠中，每个梯度的健美肽 150 分别注射 3 只，腓肠肌注射剂量为 60 μl。

2.3.3.4 在注射后连续观察 5 天，每日观察小鼠的并指情况并记录。并且根据动物并指最严重那一天的动物并指率的剂量反应曲线，计算供试品的 ED50 结果。

2.3.4 注意事项

2.3.4.1 不同梯度 Km-JMT-0150 的配制稀释时需要充分混匀后进行倍比稀释。

2.3.4.2 小鼠腓肠肌注射时应注意将注射器针头与腓肠肌呈 90° 角迅速刺入腓肠肌 0.3 厘米进行注射。

2.3.4.3 注射完成后为了防止漏液，轻微旋转针头，再缓缓拔出。

2.4 清场

2.4.1 将完成注射的小鼠放回鼠笼中，将废弃的针头放入锐器盒，其他垃圾放入生物危废垃圾桶内。

2.4.2 使用 75 %酒精棉球擦拭超净工作台台面，将台面擦拭干净。

3. 结果及分析

图 10 是该实验的 ED50 反应曲线，通过小鼠并指情况（前述的评分标准）与小鼠腓肠肌注射剂量对数之间作图得出，通过反应曲线计算出 Km-JMT-0150 的 ED50（评分 2 分的剂量）为 256.9pg/kg=0.2569.ng/kg。

通过对于小鼠的并指现象观察，可以发现在腓肠肌注射 Km-JMT-0150 后，第 48 小时，小鼠的并指情况最为严重。小鼠的并指情况越重后期恢复时间越慢，相反当小鼠并指情况越轻，恢复时间越快。

计算 Km-JMT-0150 的安全边际（safety marginLD50/ED50）：近 27。

而野生型 BoNT A1 的安全边际为 13。

可见，我们提供了毒性相比野生大大降低、更好的安全边际。

本文前述提及的序列，汇总如表 4 所示。

表 4		
名称	序列号	氨基酸序列或核苷酸序列
第一酶切割位点（KLK5 酶可切割）	SEQ ID NO:1	YRSRIV
第一酶切割位点（KLK7 酶可切割）	SEQ ID NO:2	KHLYSN
第一酶切割位点（SASPase 酶可切割）	SEQ ID NO:3	VSQVYPIVQ
第一切割位点（Caspase-1	SEQ ID NO:4	WEHDGIAE

4 酶可切割)		
第二酶切割位点	SEQ ID NO:5	DDDK
第二酶切割位点(TEV酶切)	SEQ ID NO:6	ENLYFQS
第二酶切割位点	SEQ ID NO:7	HY
第二酶切割位点	SEQ ID NO:8	YH
第二酶切割位点	SEQ ID NO:9	LEVLFGQP
第一结构(A轻链)	SEQ ID NO:10	MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMGPVKAFKIHNKIWWIPERDFTFTNPEE GDLNPPPEAKQVPVSYDDSTYLSTDNEKDNYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLSIVR GIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIHQFECKSFGHEVL NLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHR LYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSEELRTFGGHDAAKFDLSQENEFRLYYYN KFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKM LTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLNNTNLAANF NGQNTNINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVRGITS
第一结构(B轻链)	SEQ ID NO:11	MPVTINNFNNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPED FNKSSGIFNRDVCYYDDPDYLTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLLMIINGI PYLGDRRVPLEEFNTNIAVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDI GIQNHFAASREGFGGIMQMKFCPEYVSFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHLE IHVLHGLYGIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDK VLQNFGRGIVDRNLKVLVCISDPNININIKKFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLY KSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYSFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEGFNISDKNMEK EYRGQNKAINKQAYEESKEHLAVYKIQMCKSVR
第一结构(C轻链)	SEQ ID NO:12	MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNL NKPPRVTPSKSGYYDPNYLSTDSDKDTFLKEIKLFRINSREIGEELIYRLSTDIPFPG NNNTPINTDFDVFNSVDVKTRQGNNWVKTGSIINPSVIITGPRENHIDPETSTFKLT NNTFAAQEGFGALSISPRFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHLELHHA MHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKA LDYYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVEL YNELTQIFTEFNIAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNV LFMGQNLSRNPALRKVNPNMMLYLFKFKCHKAIIDGR
第一结构(D轻链)	SEQ ID NO:13	MTWVPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIPQNKLTTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNP SKPPRPTSKYQSYDDPSYLSDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYLTVGSPF MGDSSTPEDTFDFTRHTTNAVEKFENGSKWVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLTQ GQQSNPSFEGFTLSILKVAPEFLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMTDPVIALMHLETHS LHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKA LGHYKDIKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNFTGNFVVNIDKFNSLY

		SDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNLTKGFNI ENSGQNIERNPALQKLSSESVDLFTKVCLRLTKNSR
第一结构 (E 轻链)	SEQ ID NO:14	MPTINSFNNDPVNNRTILYIKPGGCQQFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTIPQDFLPPTS LKNGDSSYYDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLGRILLEELSKANPYLGND NTPDGDFIINDASAVPIQFSNGSQSILLPNVIIMGAEPDLFETNSSNISLRNNYMPSNH GFGSIAIVTFSPEYSFRFKDMSMNEFIQDPALTMHELIHSLHGLYGAKGITTGYTTTQ KQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTDLNIITSAQSNDIYTNNLADYKKIASKLSKVQVSNP LLNPYKDVFEAKYGLDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTFDLATKFQVKCRQTY IGQYKYFKLSNLLNDSIYNISEGYNNLNKVNFRGQANLNPRITPITGRGLVKKIIR FCKNIVSVKGIR
第一结构 (F 轻链)	SEQ ID NO:15	MPVAINSFNNDPVNDDTILYMQIPYEEKSKKYKAFEIMRNVWIIPERNVIGTIPQDFLPPTS DFDPPASLKNSSAYYDPNYLTTDAEKDRYLKTTIKLFRKINSNPAGKVLLQEISYAK PYLGNDHTPIDEFSPVTRTTSVNIKLSTNVESMMLNLLVLGAGPDIFESCCYPVRKLI DPDVVYDPSNYGFGSINIVTFSPEYEYTFNDISGGHNSSTESFIADPAISLAHELIHAL HGLYGARGVTYEETIEVKQAPLMIAEKPIRLEEFLTGGQDLNIITSAKKEIYNLL ANYEKIATRLSEVNSAPPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYK KLYSFTESDLANKFKVKCRNTYFIKYEFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRG QSIKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVFKCKSVIPRKGTK
第一结构 (G 轻链)	SEQ ID NO:16	MPVNIKXFNNDPINDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQPDQ FNASTGVFSKDVYEEYDPTYLKTDAEKDKFLKTMIKLFNRINSKPSGQRLLDMIVD AIPYLGNASTPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQIKGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTD SMIMNGHSPISEGFGARMIRFCPSCLNVFNNVQENKDTISFRRAYFADPALTMH ELIHVLHGLYGIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPVISPSTDMNIY NKALQNFQDIANRLNIVSSAQSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFD KLYKALMFGFTETNLAGEYGKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKN LKTEFNGQNKAVNKEAYEEISLEHLVIYRIAMCKPVMYKNTGK
第二结构 (A 重链)	SEQ ID NO:17	ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQYYLTF NFDNEPENISNIENSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHGS RIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSE VSTTDKIADITHIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALV SYIANKVLTVTIDNALSKEKNEKWDDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLRKKMKEALE NQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSY LMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYTYDNRGTLIGQVDRKDKVNNLTSTDIPF QLSKYVDNQRLSTFTEYNNIINTSILNLRYESNHLIDLRYASKINIGSKVNFDPIDK NQIQLFNLESSKIEVILKNAIVNSMYENFSTFWIRIPKYFNSISLNNEYTIINCME NSGWKVS LN YGEIITLQDTQEIQRVVKYSQMINISDYINRWIFVTITNRLNNS KIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGCRDTHRYIWKYFNLFDKELNEKEIK DLYDNQSN SGILKDFWGDYLYQYDKPYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGP RGVMTTNIYLNSSLYRGTKFIKKYASGNKDNVRNNDRVYINVVKNKEYRLAT NASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFI GFHQFNNAIKLVASNWYNRQIERSSRTLGCSEWIFVDDGWERPL
第二结构 (B 重链)	SEQ ID NO:18	APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKSKNERIEYDTQSNYIENRSSINELIDTNLSKI ELPSENTESLTDNFVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFPLDIRDISLTSSFDD

		ALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVDDFVIEANKSSTMDKIADI SLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLSEYIDNKN KIIKTIDNALTKRDEKWDIMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEE IIKYKYNIESEKEKSNINIDFNDINSKLEGINQAIDNINDFINECSVSYLMKKMIPLA VEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVDKYLKTHPFDLSTMYTNTI LIEIFNKYNSEILNNILNLRDNNLIDLSGYGANVEVYDGVKLNKQFKLTSSTN SEIRVTQNQNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTHNCIKNNSGWKISI RGNRIIWTLDINGKTKSVFFEYSIREDISDYINRWFFVTITNNSDNAKIYINGKLESNI DIKNIGEVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNIKEIYKIQSYSEYLDK FWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSSVGEILTRSKYNQNSNYINRNLVI GEKFIIRKSNSSQINDDIVRKEDYIYLDFFNSNREWRVYAYKDFKEEEKKFLFLANY DSNEFYKTIQIKEYDEQPTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGHRFYESGIVLKDYKNYF CISKWYLKEVKRKPYNPNLGCNWQFIPKDEGWIE
第二结构 (C 重链)	SEQ ID NO:19	SLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDFLRKDINEETEVIYYPDNVSDQVILS KNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVLYNSYYLESQKLSDNVE DFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMWANDVVEDFTTNILRK DTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVTVGTILLEAFPEFTIPALGAFVIY SKVQERNEIHKIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNY QAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTY LFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIIVGEVDKLLAKVNSNFQNTIPFNI FSYTNSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDVQLNPIFP FDFKLGSSGEDRGKVIIVTQENIVYNSMYESFISFWIRINKWVSNLPGYTHDSVKN NSGWSIGHSNFLVFTLKQNEDESEQSINFSDISNAPGYNKWWFVTVTNMGMNM KIYINGKLIDTIKVKELTGINFSTITFEINKIPDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELD GKDINILFNSLQYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTR RNNNDFNEGYKIIKIRGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADN HSTEDIYAIGLREQTKDINDNIIIFIQPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRF RLGGDWYRHNLYVPTVKQGNYSLESTSTHWGFVPVSE
第二结构 (D 重链)	SEQ ID NO:20	DDSTCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESILDGQVPIN PEIVDPLLPNVMEPLNLPGEIVFYDDITKYVDYLSYSSYYLESQKLSNNVENITLTT SVEEALGYSNKIYTFLPSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLLLEGFPFTIPALGVFTFYSSIQE REKIIKTIENCLEQVRKRWKDSYQWMVSNWLSRITTQFNHINYQMYDSLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKN MLPKVIDELNKFDRKTTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFS YTNSLLKDIINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDNVQLNTIYTND FKLSSSGDKIIVNLNNILYSAIYENSSVSFWIKSKDLTNSHNEYTHINSIEQNSGWKLC IRNGNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSESLSHTGYTNKWWFVTVTNMIGYMKLYINGE LKQSQKIEDLDEVKLDKTIVFGIDENIDENQMLWIRDFNIFSKELSNEDINIVYEGQIL RNVIKDYWGNPLKFDTEYYIINDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPITIKS VSDKNPYSRILNGDNIIHMLYNSRKYMIIRDTDTIYATQGGECSQNCVYALKLQSN LGNYGIGIFSINKIVSKNKYCSQIFSSFRENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNY ETKLLSTSSFWKFISRDPGWVE

第二结构 (E 重链)	SEQ ID NO:21	KSICIEINNGELFFVASSENSYNDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVILNFNSESAP GLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYLDAQKVPEGENNVNL TSSIDTALLEQPKIYTFSSSEFINNVNKPVQAALFVGWIQQVLVDFTTEANQKSTVDK IADISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDALELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGS SDNKNKVIKAINNALKERDEKWKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQN QVNALKAIIESKYSYNTLEEKNELTNKYDIEQIENELNQKVSAMNNIDRFLTESSISY LMKLINEVKINKLREYDENVKTYLLDYIHKHSILGESQQELNSMVIDTLNNSIPFKL SSYTDDKILISYFNKFFKRIKSSSVLNMRYKNDKYVDTSQYDSNININGDVYKYPTN KNQFGIYNDKLSEVNISQNDYIYDNKYKNFSISFWVRIPNYDNKIVNVNNEYTIINC MRDNNSGWKVSLNHNEIHWTLQDNSGINQKLAFNYGNANGISDYINKWIFVTITND RLGDSKLYINGNLIDKKSILNLGNIHVSNDILFKIVNCSTRYIGIRYFNIFDKELDETE IQTLYNNEPNANILKDFWGNLYLLYDKEYLLNVLKPNNFNRRDSTLSINNIRSTIL LANRLYSGIKVKIQRVNNSSNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLLPLYADTATTNKEK TIKISSSGNRFNQVVVMNSVGNCTMNFKNNGNNGNIGLLGFKADTVVASTWYYTHM RDNTNSNGFFWNFISEEHGWQEK
第二结构 (F 重链)	SEQ ID NO:22	APPRLCIRVNNSEFFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNNNYRNNLDEVILDYNSQ TIPQISNRTLNTLVQDNSYVPRYDSNGTSEIEEYDVVDNFVFFYLHAQKVPEGETNIS LTSSIDTALLEESKDIFFSSEFIDTINKPVNAALFIDWISKVIRDFTTEATQKSTVDKIA DISLIVPYVGLALNIIIEAEKGNFEEAFELLGVGILLEFVPELTIPVILVFTIKSYIDSYEN KNKAIAKAINNSLIEREAKWKEIYSWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAI KTAIEYKYNNTSDEKNRLESEYNINNIEEELNKKVSLAMKNIERFMTESSISYLMK LINEAKVGKLLKYDNHVKSDDLNYILDHRSILGEQTNELSDLVTSTLNSSIPFELSSY TNDKILIIYFNRLYKKIKDSSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGNVYIYSTNRNQFGI YNSRLSEVNIAQNNDIYNSRYQNFSISFWVRIPKHYKPMNHNREYTIINCMGNNNS GWKISLRTVRDCEIHWTLQDTSNGKENLIFRYEELNRISNYINKWIFVTITNRLGNS RIYINGNLIVEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGCDDITYVGIRYFKVFNTELDKEIETLY SNEPDPSILKNYWGNYLLYNKKYYLFNLLRKDKYITLNSGILNINQQRGVTEGSVFL NYKLYEGVEVIIRKNGPIDISNTDNFVRKNDLAYINVVDRGVEYRLYADTKSEKEKII RTSNLNDSLGQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGSNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRR NTSSNGCFWSSISKENGWKE
第二结构 (G 重链)	SEQ ID NO:23	SEQCIHVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETIAYNTQNNTIENNFSIDQLILDNDLSSGI DLPNENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDGDSLFEYLHAQTFPSNIENLQLTNSL NDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLFVNWVKGVIDDFTSESTQKSTIDKVS DVSIIPIYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIGGAAILMEFIPELIVPIVGFFTLESYVGNK GHIIMTISNALKKRDQKWTDMYGLIVSQWLSTVNTQFYTIKERMYNALNNQSQAIE KIIDQYNRYSEEDKMNNINIDFNIDFKLNQSNLAINNIDDFINQCSISYLMNRMIPL AVKKLKDFFDNLKRDLLIYIDTNELYLLDEVNILKSKVNRHLKDSIPFDLSLYTKDT ILIQVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIFNDIGNGQFKLNNS ENSNTAHQSKFVVYDSMFDNFSINFVVRTPKYNNNDIQTYLQNEYTIISCIKNDSG WKVSIKGNRIIWLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINKWFSITITNDRLGNANIYIN GSLKKSEKILNLDRISSNDIDFKLINCTDTTKFVWIKDFNIFGRELNATEVSSLYWIQ SSTNTLKDFWGNPLRYDTQYYLFNQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTNFNNAAINY QNLYLGLRFIHKKASNRNINNDNIVREGDYIYLNIDNISDESRYVYVLVNSKEIQTQL FLAPINDDPTFYDVLQIKKYYEKTYNQCILCEKDTKTFGLFGIGKFVKDYGYVWD

		TYDNYFCISQWYLRRISENINKLRLGCNWQFIPVDEGWTE
SP	SEQ ID NO:24	MITETSSPFRSIFSHSGK
His 标签	SEQ ID NO:25	HHHHHHHHH
EGFP	SEQ ID NO:26	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVP WPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQKNGIKANFKIR HNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEF VTAAGITLGMDELYK
KLK5-F	SEQ ID NO:27	TACAGATCTAGAATCGTT GCTTTGAACGACTTGTGTATC
KLK5-R	SEQ ID NO:28	AACGATTCTAGATCTGTAAGACTTGGTCTTAGAGGTGATG
KLK7-F	SEQ ID NO:29	AAGCACTTGACTCTAAC GCTTTGAACGACTTGTGTATC
KLK7-R	SEQ ID NO:30	GTTAGAGTACAAGTGCTTAGACTTGGTCTTAGAGGTGATG
SASPase-F	SEQ ID NO:31	GTTTCTCAAGTTTACCCAATCGTTCAA GCTTTGAACGACTTGTGTATC
SASPase-R	SEQ ID NO:32	TGGGTAAACTTGAGAAACAGACTTGGTCTTAGAGGTGATG
Caspase-14-F	SEQ ID NO:33	GGTGGTTGGGAACACGACGGTATCGCTTTC GCTTTGAACGACTTGTGTATC
Caspase-14-R	SEQ ID NO:34	GTGTTCCCAA CCACCAGACT TGGTCTTAGA GGTGATG
KLK5-2Q-F	SEQ ID NO:35	CTCAGACCCAGTCTGGTGGT TACAGATCTAGAATCGTT GCTTTGAACGAC
KLK5-2Q-R	SEQ ID NO:36	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
KLK7-2Q-F	SEQ ID NO:37	CTCAGACCCAGTCTGGTGGT AAGCACTTGACTCTAAC GCTTTGAACGAC
KLK7-2Q-R	SEQ ID NO:38	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
SASPase-2Q-F	SEQ ID NO:39	CTCAGACCCAGTCT GGTGGT GTTCTCAAGTTTACCCAATCGTTCAA GC

SASPase-2Q -R	SEQ ID NO:40	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
Caspase-14-2 Q-F	SEQ ID NO:41	CTCAGACCCAGTCTGGTGGT TGGGAACAC
Caspase-14-2 Q-R	SEQ ID NO:42	ACCAGACTGGGTCTGAGAGGTGATGATACCTCTAACACAC
SNAP25 酶 切位点 17-aa (187-203)	SEQ ID NO:43	SNKTRIDEANQRATKML
SNAP25 酶 切位点 66-aa (141-206)	SEQ ID NO:44	ARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEAN QRATKMLGSG
CFP	SEQ ID NO:45	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP WPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIR HNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLVLEFV TAAGITHGMDELYK
YFP	SEQ ID NO:46	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP WPTLVTTFTGYGLQCFARYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKI RHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDHMLVLE FVTAAGITHGMDELYK
CFP-SNAP2 5/17aa-YFP	SEQ ID NO:47	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP WPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIR HNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLVLEFV TAAGITHGMDELYKSNKTRIDEANQRATKMLMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGH KFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFTGYGLQCFARYPDHMKRH DFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILG HKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV LLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDHMLVLEFVTAAGITHGMDELYK
CFP-SNAP2 5/66aa-YFP	SEQ ID NO:48	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP WPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIR HNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLVLEFV TAAGITHGMDELYKARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMALDMGNEIDTQNRQIDRIM EKADSNKTRIDEANQRATKMLGSGMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE GEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFTGYGLQCFARYPDHMKRHDFFKSAM PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNY

		NSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYL SYQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK
SNAP25	SEQ ID NO:49	MAEDADMRNELEEMQRRADQLADESLESTRMLQLVEESKDAGIRTLVMLDEQG EQLDRVEEGMNHINQDMKEAEKNLKD LGKCCGLFICPCNKLKSSDAYKKAWGNN QDGVVASQPARVVDEREQMAISGGFIRRV TNDARENEMDENLEQVSGIIGNLRHMA LDMGNEIDTQNRQIDRIMEKADSNKTRIDEANQRATKMLGSG
第一酶切割 位点（Furin 蛋白酶可切 割）	SEQ ID NO:50	RXXR
第一酶切割 位点（Furin 蛋白酶可切 割）	SEQ ID NO:51	RRXX

权 利 要 求 书

1.一种单链多肽，其特征在于，包括：第一结构域、中间氨基酸序
列区域、以及第二结构域，
其中，
所述中间氨基酸序列区域在所述第一结构域与所述第二结构域
5 之间，

所述中间氨基酸序列区域序列含有至少一个第一酶切割位点，
所述第一酶切割位点被设计为能被人体特定部位存在的第一蛋白酶
高度特异性切割，所述单链多肽在所述第一酶切割位点被所述第一
蛋白酶切割后转化为能抑制信息物质的释放的活化形式。
10

2.根据权利要求 1 所述的单链多肽，其特征在于：
其中，所述第一结构域具有大约为 50kDa 的分子量，所述第二结
构域具有大约为 100kD 的分子量，所述第一结构域具有切割活性。
15

3.根据权利要求 1 或 2 所述的单链多肽，其特征在于：
其中，所述信息物质为细胞间信息物质，优选为神经递质、内分
泌激素、局部化学介质以及气体信号分子中的任意一种，更优选
地所述信息物质为乙酰胆碱。
20

4.根据权利要求 1-3 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：
其中，所述第一结构域为能够切割靶标细胞的胞吐融合器的蛋

白的非毒性细胞蛋白酶或其片段；

所述第二结构域具有结合部分和转运部分，

所述结合部分能与所述靶标细胞受体结合并通过受体介导的胞吞作用以进入所述靶标细胞的内体，所述转运部分能转运所述第一

5 结构域进入靶标细胞的胞质溶胶；

优选地，所述第一酶切割位点在所述第一结构域与所述转运部分之间，和/或所述结合部分为羧基端，具有大约为 50kD 的分子量，所述转运部分为氨基端，具有大约为 50kD 的分子量；

另一优选地，所述胞吐融合器的蛋白为神经元的 snare 蛋白，和/或
10 所述靶结合位点为神经元的突触前膜上的受体。

5. 根据权利要求 1-4 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：

其中，所述第一结构域至少包括梭状芽孢杆菌神经毒素 L 链的一部分：
15

优选地，其梭状芽孢杆菌神经毒素 L 链的部分是肉毒梭菌亚型 A、B、C、D 以及 E 其中之一的神经毒素 L 链或由其衍生而来，和/或，所述第一结构域含有与 SEQIDNO:10 具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99% 或 100% 一致性的氨基酸序列，或含有与 11-16 中任意一个具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99% 或 100% 一致性的氨基酸序列
20 去除天然存在的酶切序列；和/或

第二个结构域至少包括至少包括一部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链，优选地其部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链是以下一种神经毒素重链或由其衍生而来：肉毒梭菌(*C.Botulinum*)亚型 A、肉毒梭菌亚型 B，肉毒梭菌亚型 C，肉毒梭菌亚型 D，肉毒梭菌亚型 E，肉毒梭菌亚型 F，肉毒梭菌亚型 G，巴氏梭菌(*C.Baratii*)和丁酸梭菌(*C.Butyricum*)；或其部分梭状芽孢杆菌神经毒素 H 链是破伤风梭菌(*C.Tetani*)的神经毒素 H 链或由其衍生而来，和/或

所述第二结构域含有与 SEQIDNO:17-23 中任意一具有至少 35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或 100% 的一致性氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1-7 任意一项所述的单链多肽，其特在于：

其中，所述的第一结构域与所述中间氨基酸序列区域区域之间的 linker (L1) 的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个；和/或

所述中间氨基酸序列区域区域与所述第二结构域之间的 linker (L2) 的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

7. 根据权利要求 1-6 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：

其中，所述第一蛋白酶不是存在于人体消化道内的蛋白酶，

优选地，所述人体特定部位为人体皮肤组织，和/或 至少一个所述第一蛋白酶选自以下：

表皮特异性激肽释放酶(KLKs)蛋白酶（例如 KLK5、KLK6、KLK7）、SASPase 蛋白酶、Caspase 蛋白酶（例如 Caspase-14）、Furin 蛋白酶以及它们各自的保留了酶切活性的变体中的任意一种或多种；和/或，

5 所述第一酶切割位点含有与 SEQIDNO:1-4、SEQ ID NO:50 以及 SEQ ID NO:51 中任意一个具有至少 50%、60%、85%、90%、99% 或 100%的一致性的氨基酸序列。

其中，SEQ ID NO:50 以及 SEQ ID NO:51 中，RXXR 和 RRXX 中的“X”为任意的氨基酸，优选地，RXXR 中的 XX 为 RK、TK
10 或 TR；RRXX 中的“XX”为 SV 或 KR。

8.根据权利要求 1-7 任意一项所述的单链多肽，其特征在于，还包括：

增加表达量的信号肽、用于定量的定量蛋白以及标签蛋白中的
15 任意一种或多种，

进一步地，对所述信号肽、所述定量蛋白以及所述标签蛋白中的一种或多种分别进行如下限定：

所述信号肽含有与 SEQIDNO:24 具有至少 80%、85%、90%、99%或 100%的一致性的氨基酸序列；

20 所述定量蛋白为荧光蛋白；

所述标签蛋白为 His 标签、GST 标签、MBP 标签以及 Strep-tagII 标签中的一种或多种。

9.根据权利要求 1-8 任意一项所述的单链多肽，其特征在于，还包括：

分别位于所述第一结构域的 N 端和所述第二结构域的 C 端的两个第二酶切割位点，且切割所述第二酶切割位点的第二蛋白酶不能对所述第一酶切割位点进行切割。

10.根据权利要求 1-9 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：

其中，所述第一酶切割位点和/或所述第二酶切割位点通常情况下也不会被通过宿主细胞体内表达所述单链多肽或通过由来自宿主细胞的细胞提取物参与的体外合成体系合成所述单链多肽中接触的蛋白酶切割。

11.根据权利要求 9 或 10 所述的单链多肽，其特征在于：

其中，所述第二酶切割位点被设计为针对所述第二蛋白酶有高度特异性，

优选地，所述第二蛋白酶选自非人肠激酶、烟草蚀刻病毒蛋白酶、来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的蛋白酶、来源于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的蛋白酶、来源于鼻病毒的蛋白酶、木瓜蛋白酶、昆虫木瓜蛋白酶的同源物或甲壳动物木瓜蛋白酶的同源物；和/或

所述第二酶切割位点含有与 SEQIDNO:5-9 中任意一个具有至少

85%、90%、99%或 100%一致性的氨基酸序列。

12.根据权利要求 1-11 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：

其中，所述中间氨基酸序列区域序列还包括 XTXS，所述 X 非 K

5 氨基酸，优选地：所述 X 为 Q 氨基酸；和/或

所述中间氨基酸序列区域序列的结构从 N 端到 C 端为：

XTXS-linker (L3) -至少一个第一酶切割位点，进一步地，L3
的氨基酸数量为 0-20 个或 0-10 个或 0-5 个，更进一步地，所述第
一酶切割位点为 1 个。

10

13.根据权利要求 1-12 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：

当所述第二结构域含有与 SEQIDNO:17 具有至少 80%、85%、
90%、95%、99%或 100%的一致性氨基酸序列时，所述第二结构域
氨基酸序列的与所述 SEQIDNO:17 的第 423 对应的位点的赖氨酸被
15 突变成非赖氨酸。

14.根据权利要求 1-13 任意一项所述的单链多肽，其特征在于：

其中，所述第一结构域、所述中间氨基酸序列区域以及所述第
二结构域从 N 端到 C 端连接；和/或

20

当所述第一酶切割位点为多个时，多个所述第一酶切割位点从
N 端到 C 端顺序连接，所有所述第一酶切割位点中具有相同酶切位
点或各个第一酶切割位点各不相同，且多个所述酶切位点之间的

linker (L4) 的氨基酸数量均为 0-20 个或 0-10 个氨基酸或 0-5 个。

15. 一种如权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽的应用：

所述应用包括以下中的任意一种或多种：护肤、整形、塑形，
5 以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗。

16. 一种如权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽在制备特定用途
的制品或药物中的应用：

所述特定用途的包括以下中的任意一种或多种：护肤、整形、
10 塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗。

17. 一种单链多肽的制品或药物，其特征在于，包括：

权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽，

优选地，所述制品或药物具有的应用包括以下中的任意一种或
15 多种：护肤、整形、塑形，以及通过致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛
发挥治疗；

另一优选地，所述制品或药物，被通过涂抹、喷雾、外敷或注
射的方式进入人体特定部位进行应用。

20 18. 一种核酸，其特征在于，包括：

编码权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽的核苷酸序列。

19.一种载体，其特征在于，包括：

权利要求 18 所述的核酸。

20.一种宿主细胞，其特征在于：

5 整合有权利要求 18 所述的核酸和/或包括权利要求 19 所述的载体。

21.根据权利要求 20 所述的宿主细胞，其特征在于：

所述宿主细胞来自原核细胞或真核细胞，进一步地，所述细胞
选自下组：大肠杆菌细胞、人源细胞、中国仓鼠、卵巢细胞、昆虫
10 细胞、麦胚细胞、兔网织红细胞以及酵母细胞中的一种或多种的组
合。

22.根据权利要求 21 所述的宿主细胞，其特征在于：

其中，所述宿主细胞选自酵母细胞，进一步地，所述酵母细胞
15 选自：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另
一优选例中，所述克鲁维酵母属酵母选自：乳酸克鲁维酵母、马克
斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

23.一种体外无细胞合成体系，其特征在于：

20 以编码权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽的 mRNA 或
DNA 为模板，合成所述单链多肽。

24. 根据权利要求 23 所述的体外无细胞合成体系，其特征在于，包括以下中的任何一种或多种：

(1) 编码所述单链多肽的 mRNA 或 DNA 模板；

(2) 细胞提取物，所述细胞提取物为酵母细胞提取物，再进一步地，所述细胞提取物来源于酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一种或多种的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取物来源于克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母；

(3) 以下组分中的任意一种或多种：

氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

25. 一种权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽的制备方法，其特征在于：

以编码权利要求 1-14 任意一项所述的单链多肽的 mRNA 或 DNA 为模板进行体外合成反应得到所述单链多肽，

优选地，在包括权利要求 23 或 24 所述的体外无细胞合成体系的反应体系中进行所述体外合成反应，

进一步地，所述的 DNA 模板与参与所述体外合成反应的其他成分的体积比的范围为 1:10-1:50 或 1:20-1:40 或 1:25-1:35 或 1:30。

26. 根据权利要求 25 所述的制备方法，其特征在于：

其中，所述无细胞体外合成体系包括：酵母细胞提取物、氨

基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、
聚乙二醇以及水性溶剂；

进一步地：

所述酵母细胞提取物来源于酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维
5 酵母中的任意一种或多种的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取
物来源于克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母。

27. 根据权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于：

其中，所述酵母细胞提取物占整个所述无细胞体外蛋白质合
10 成体系的体积的 50-80%。

28. 根据权利要求 25-27 任意一项所述的制备方法，其特征在于，
还包括：

将得到的包括第二酶切割位点的所述单链多肽用第二蛋白酶酶切，
15 得到仅包括第一结构域、中间氨基酸序列区域以及第二结构域的单
链多肽。

29. 一种如权利要求 18 所述的核酸、权利要求 19 所述的载体
、权利要求 20-22 任意一项所述的宿主细胞以及权利要求 23 或
20 24 所述的体外无细胞合成体系在制备权利要求 1-13 任意一项所述的
单链多肽中的应用。