

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014年2月13日 (13.02.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/023129 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 7/08 (2006.01) A61P 25/04 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 25/34 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) A61P 25/36 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C07K 1/04 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) C07K 1/06 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/077363

(22) 国际申请日: 2013年6月18日 (18.06.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201210277619.8 2012年8月7日 (07.08.2012) CN
201210325531.9 2012年9月6日 (06.09.2012) CN
201210347966.3 2012年9月19日 (19.09.2012) CN

(71) 申请人: 海南大学 (HAINAN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。

(72) 发明人: 罗素兰 (LUO, Sulan); 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。长孙东亭 (ZHANG-SUN, Dongting); 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。吴勇 (WU, Yong); 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。朱晓鹏 (ZHU, Xiaopeng); 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。胡远艳 (HU, Yuanyan); 中国海南省海口市

人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。邢晖 (BING, Hui); 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。麦金托什·J·迈克尔 (MCINTOSH, J., Michael); 中国海南省海口市人民路58号海南大学热带生物资源教育部重点实验室, Hainan 570228 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: α -CONOTOXIN PEPTIDE, AND MEDICAL COMPOSITION AND PURPOSE THEREOF

(54) 发明名称: α -芋螺毒素肽、其药物组合物及用途

(57) Abstract: Provided are a new α -conotoxin peptide, and a medical composition and a purpose thereof. Further provided are a propeptide, a nucleic acid construct, an expression vector, a transformed cell and a fusion protein of the conotoxin peptide. Disclosed are a method for blocking an acetylcholine receptor and a pharmaceutical purpose of the conotoxin peptide. The α -conotoxin peptide can distinctively block the acetylcholine receptor (nAChRs, such as $\alpha 3\beta 2$ nAChRs, $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR, or $\alpha 3\beta 4$ nAChR, or $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR), has activity in treating diseases such as neuralgia, addiction, parkinsonism, dementia, schizophrenia, and cancers, and can be used to prepare medicine such as medicine for analgesia, smoking cessation, and drug treatment, medicine related to mental diseases and cancer treatment, and neuroscience tool medicine.

(57) 摘要: 提供了一种新的 α -芋螺毒素肽、其药物组合物及用途。还提供了所述芋螺毒素肽的前肽、其核酸构建体、其表达载体和转化的细胞及其融合蛋白。公开了一种阻断乙酰胆碱受体的方法, 以及所述芋螺毒素肽的制药用途。公开的 α -芋螺毒素肽能够特异地阻断乙酰胆碱受体 (nAChRs, 例如 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs, $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR 或 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 或 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR); 具有治疗神经痛、成瘾、帕金森症、痴呆、精神分裂症、癌症等疾病的活性; 可用于制备镇痛与戒烟戒毒药物、有关精神疾病与癌症治疗药物, 以及神经科学工具药等。

WO 2014/023129 A1

α -芋螺毒素肽、其药物组合物及用途

技术领域

本发明属于生物化学和分子生物学领域，涉及一种新的 α -芋螺毒素肽、其药物组合物、其制备方法及其用途。本发明还涉及所述芋螺毒素肽的前肽、其核酸构建体、其表达载体和转化的细胞、以及其融合蛋白。本发明还涉及一种阻断乙酰胆碱受体的方法、以及所述芋螺毒素肽的制药用途。

背景技术

生活在热带海洋中的肉食性软体动物芋螺 (Conus) 分泌的芋螺毒素或芋螺肽 (Conotoxin, Conopeptide, CTx)，具有调节各种离子通道的特殊功能，在临床上已显示出了重要价值。芋螺毒素通常含有 10 - 46 个氨基酸，富含二硫键，生物活性强，能特异地作用于动物细胞膜上的受体和离子通道。尤其是对电压门控或配体门控离子通道 (包括少数 G-蛋白相关受体等) 具有较高的选择性。芋螺毒素按其前体蛋白的内质网信号肽序列的相似性，以及半胱氨酸模式，分为不同的基因家族，至今，所有已知的芋螺毒素可分为 19 个超家族，分别为 A、B、C、D、S、M、I1、I2、I3、J、L、O1、O2、O3、P、T、V、Y、K (Sulan Luo, Sean Christensen, Dongting Zhangsun, Yong Wu, Yuanyan Hu, Xiaopeng Zhu, Sandeep Chhabra, Raymond S. Norton, and J. Michael McIntosh. A Novel Inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptors from *Conus vexillum* Delineates a New Conotoxin Superfamily. PLoS ONE, (2013) 8(1): e54648 (1-10); Kaas Q, Yu R, Jin AH, Dutertre S and Craik DJ. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research* (2012) [Ahead of print]; Ye M, Khoo KK, Xu S, Zhou M, Boonyalai N, Perugini MA, Shao X, Chi C, Galea CA, Wang C & Norton RS. A helical conotoxin

from *Conus imperialis* has a novel cysteine framework and defines a new superfamily. *Journal of Biological Chemistry* (2012) 287, 14973-14983)。芋螺毒素按其受体靶位可分为 α 、 ω 、 μ 、 δ 等多种药理学家族。每个超家族根据受体靶类型，又可分为 α 、 αA 、 κA (A-超家族)， ω 、 δ 、 κ 、 μO (O-超家族)， μ 、 ψ 、KM (M-超家族) 等家族 (亚型)。

其中， α -芋螺毒素是目前发现的选择性最好的烟碱乙酰胆碱受体 (nAChRs) 亚型特异阻断剂。因此， α -芋螺毒素及其作用靶点 nAChRs 在多种疾病机理的研究，以及药物研发方面具有极其重要的价值。 α -芋螺毒素是人们最早发现的一类芋螺毒素，通常分子质量较小，一般由 12 - 19 个氨基酸残基组成，富含二硫键。 α -芋螺毒素种类繁多，活性多样，结构变化复杂。通过其高度保守的信号肽序列、药理学活性及半胱氨酸模式可对 α -芋螺毒素进行分类。 α -芋螺毒素的半胱氨酸模式为 CC-C-C，其中天然肽的二硫键连接方式为 C1-C3 与 C2-C4，称为球形异构体 (globular isomer)，二硫键间形成 2 个 loop 环。含有 4 个半胱氨酸的 α -芋螺毒素线性肽氧化折叠后往往产生 3 种异构体，除了 C1-C3 与 C2-C4 间的天然肽二硫键连接方式 (球形异构体) 外，另外两种异构体分别是带状异构体 (ribbon isomer) 与 珠子状异构体 (bead isomer)。带状异构体的二硫键连接方式为 C1-C4 与 C2-C3；珠子状异构体的二硫键连接方式为 C1-C2 与 C3-C4。球形异构体具有完全的生物活性，带状异构体有时通过不同的作用机制也发挥生物活性，珠子状异构体活性往往减小。二硫键间形成 2 个 loop 环，根据二三及三四半胱氨酸间氨基酸数量不同又可把 α -芋螺毒素分为 $\alpha_{3/5}$ ， $\alpha_{4/7}$ ， $\alpha_{4/6}$ ， $\alpha_{4/4}$ 和 $\alpha_{4/3}$ 等多种亚家族，每个 loop 的特征和残基组成的不同是毒素作用于不同受体亚型的基础 (Ulens C, Hogg RC, Celie PH, et al. Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3615-20; McIntosh, J. M.; Santos, A. D.; Olivera, B. M., *Conus* peptides targeted

to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual review of biochemistry* 1999,68, 59-88; Terlau, H.; Olivera, B. M., Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological reviews* 2004,84 (1), 41-68. Gehrman J, Alewood PF, Craik DJ. Structure determination of the three disulfide bond isomers of alpha-conotoxin GI: a model for the role of disulfide bonds in structural stability. *J Mol Biol.* 1998, 278(2):401-15; Grishin AA, Wang CI, Muttenthaler M, Alewood PF, Lewis RJ, Adams DJ. Alpha-conotoxin AuIB isomers exhibit distinct inhibitory mechanisms and differential sensitivity to stoichiometry of alpha3beta4 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 2010, 285 (29): 22254-63) 。

烟碱乙酰胆碱受体(nAChRs)是动物界普遍存在的具有重要生理作用和临床研究意义的细胞膜蛋白，是人类最早发现的一类受体，可分为两类：肌肉型乙酰胆碱受体和神经型乙酰胆碱受体。nAChRs是细胞膜上的变构膜蛋白，介导众多中枢和外周神经系统的生理功能，包括学习、记忆、成瘾、应答、镇痛和运动控制等。nAChRs激活多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺、 γ -氨基丁酸等多种神经递质的释放。已证实 nAChRs 是筛选诊断和治疗一大类重要疾病药物的关键靶点，这些疾病包括疼痛、烟酒和毒品成瘾、智障、痴呆、精神分裂症、中枢神经紊乱、癫痫症、帕金森病、精神病、神经肌肉阻滞、重症肌无力、抑郁症、高血压、心率不齐、哮喘、肌肉松弛、中风、乳腺癌和肺癌等。至今对于上述疾病还没有对症治疗的药物。常用的非选择性的 nAChRs 激动剂如烟碱，虽然可以缓解上述神经疾病的症状，但它们对心脏和胃肠道产生强烈的副作用，且有成瘾性。因此，开发针对 nAChRs 各种亚型具有高选择性的配体药物是治疗上述疾病的关键所在 (Livett BG, Sandall DW, Keays D, Down J, Gayler KR, Satkunanathan N, Khalil Z. Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon*,

2006, 48(7):810-829; Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8(9): 733-50; Layla A, McIntosh JM. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Acta Pharmacol Sin* 2009 Jun; 30 (6): 771-783.) .

然而,要开发这样的药物的前提是,要获得可以特异结合 nAChRs 各种亚型的选择性化合物,作为工具药来研究和鉴定各种亚型的精细组成和生理功能,或直接作为相关疾病的治疗药物。另外,在乳腺癌与小细胞肺癌中,肿瘤细胞膜上烟碱乙酰胆碱受体的激活促进肿瘤细胞增殖,用药物阻断这些受体的激活,可有效地进行早期诊断,或治疗这些灾难性癌症。

nAChRs 由不同的 α 和 β 亚基组装成很多种亚型,每种亚型都有截然不同的药理学特征。其中肌肉型乙酰胆碱受体由 5 个亚基构成,含 2 个 $\alpha 1$ 亚基,1 个 β 亚基,1 个 δ 亚基和 1 个 γ 或 ϵ 亚基, γ 或 ϵ 亚基取决于其是否为胎儿或成体的乙酰胆碱受体。哺乳动物神经型 nAChRs 亚型比肌肉型 nAChRs 复杂得多,至少有 8 种 α 亚基、3 种 β 亚基,分别为 $\alpha 2$ - $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ (在雏鸡中存在 $\alpha 8$)、以及 $\beta 2$ - $\beta 4$ 。其中 $\alpha 2$, $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 可以分别同 $\beta 2$ 或者 $\beta 4$ 结合,形成功能性受体,比如 $\alpha 2\beta 2$ 、 $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 2\beta 4$ 等; $\alpha 9$ 与 $\alpha 10$ 结合形成功能性受体 $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs。此外, $\alpha 7$ 和 $\alpha 9$ 可以形成同源多聚体。由于缺乏针对各种亚型的高选择性配体化合物,要研究和阐明各种各样的 nAChRs 亚型的精细结构和功能面临诸多挑战。

药物成瘾既是医疗难题亦是严重的社会问题。烟瘾是由烟草中的烟碱(尼古丁)引起的,其体内受体就是烟碱乙酰胆碱受体(nAChRs) (Azam L, McIntosh JM. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30(6): 771-783)。研究表明,表达在多巴胺能(DA)神经元的 nAChRs

是治疗神经精神疾病，如烟碱、吗啡与可卡因等的成瘾、帕金森病、痴呆、精神分裂症、抑郁等的药物作用靶点(Larsson, A.; Jerlhag, E.; Svensson, L.; Soderpalm, B.; Engel, J. A., Is an alpha-conotoxin MII-sensitive mechanism involved in the neurochemical, stimulatory, and rewarding effects of ethanol? *Alcohol* 2004,34 (2-3), 239-50. Jerlhag, E.; Egecioglu, E.; Dickson, S. L.; Svensson, L.; Engel, J. A., Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *European neuropsychopharmacology*, 2008,18 (7), 508-18)。阻断 $\alpha 3\beta 2$ 和 $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs 的 α -芋螺毒素 MII 可部分和区别性地阻断纹状体中烟碱引起的多巴胺释放，突触前的 nAChRs 至少包含 2 类亚型，即 MII-敏感型与 MII-不敏感型，调控多巴胺神经元的 DA 释放(Kaiser SA, Soliakov L, Harvey SC, Luetje CW, Wonnacott S. Differential inhibition by α -conotoxin-MII of the nicotinic stimulation of [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. *J Neurochem* 1998; 70: 1069-76)。新近研究报道，阻断含有 $\alpha 3\beta 4$ 或 $\alpha 6\beta 2$ 的 nAChRs 可有效防止烟瘾和吗啡毒瘾的发作，显著抑制吸烟和吸毒的欲望 (Brunzell DH, Boschen KE, Hendrick ES, Beardsley PM, McIntosh JM. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens shell regulate progressive ratio responding maintained by nicotine. *Neuropsychopharmacology*, 2010;35(3):665-673.)。

此外，DA 神经元中含有 $\alpha 6$ 亚基的 nAChRs 表达量非常高，由于缺乏 $\alpha 6^*$ nAChRs 特异的药理学分子探针， $\alpha 6$ nAChR 在成瘾中所具有的重要作用的机制还不清楚。哺乳动物脑中纹状体上的 $\alpha 6\beta 2^*$ -nAChRs 亚型被认为是治疗烟瘾和毒瘾的药物作用靶点(Exley, R.; Clements, M. A.; Hartung, H.; McIntosh, J. M.; Cragg, S. J., Alpha6-containing

nicotinic acetylcholine receptors dominate the nicotine control of dopamine neurotransmission in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2008,33 (9), 2158-66). $\alpha 6$ 亚基在脑中并不是广泛分布的,但却在中脑部分的多巴胺能神经元区域富集表达,这个区域是与愉快、奖赏与心情控制密切相关的区域,这意味着 $\alpha 6^*$ nAChRs 在药物引起的成瘾与情绪控制等的调控中起关键作用 (Yang, K. C., G. Z. Jin, et al. (2009). Mysterious alpha6-containing nAChRs: function, pharmacology, and pathophysiology. *Acta Pharmacol Sin* 30(6): 740-751. Klink, R.; de Kerchove d'Exaerde, A.; Zoli, M.; Changeux, J. P., Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *The Journal of neuroscience*,2001,21 (5), 1452-63. Azam, L.; Winzer-Serhan, U. H.; Chen, Y.; Leslie, F. M., Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *The Journal of comparative neurology* 2002,444 (3), 260-74. Champtiaux, N.; Gotti, C.; Cordero-Erausquin, M.; David, D. J.; Przybylski, C.; Lena, C.; Clementi, F.; Moretti, M.; Rossi, F. M.; Le Novere, N.; McIntosh, J. M.; Gardier, A. M.; Changeux, J. P., Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *The Journal of neuroscience*, 2003,23 (21), 7820-9. Pons, S.; Fattore, L.; Cossu, G.; Tolu, S.; Porcu, E.; McIntosh, J. M.; Changeux, J. P.; Maskos, U.; Fratta, W., Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *The Journal of neuroscience*, 2008,28 (47), 12318-27). $\alpha 6^*$ nAChRs 也表达在儿茶酚胺能神经元与视网膜上 (Le Novere, N.; Zoli, M.; Changeux, J. P., Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *The European*

journal of neuroscience 1996,8 (11), 2428-39. Vailati, S.; Hanke, W.; Bejan, A.; Barabino, B.; Longhi, R.; Balestra, B.; Moretti, M.; Clementi, F.; Gotti, C., Functional $\alpha 6$ -containing nicotinic receptors are present in chick retina. Molecular pharmacology 1999,56 (1), 11-9). $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs 表现出具有调控多巴胺释放的功能, 在灵长类的 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine 动物模型与人类帕金森症疾病模型上, $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs 的数量明显降低(Champiaux, N.; Han, Z. Y.; Bessis, A.; Rossi, F. M.; Zoli, M.; Marubio, L.; McIntosh, J. M.; Changeux, J. P., Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. The Journal of neuroscience, 2002,22 (4), 1208-17. Quik, M.; Polonskaya, Y.; Kulak, J. M.; McIntosh, J. M., Vulnerability of 125I-alpha-conotoxin MII binding sites to nigrostriatal damage in monkey. The Journal of neuroscience, 2001,21 (15), 5494-500. Quik, M.; Bordia, T.; Forno, L.; McIntosh, J. M., Loss of alpha-conotoxin MII- and A85380-sensitive nicotinic receptors in Parkinson's disease striatum. Journal of neurochemistry 2004,88 (3), 668-79). 因而, $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChRs 的特异阻断剂是研究解释不同组织中存在的 $\alpha 6^*$ nAChRs 生理功能的有价值的工具, 以及与之有关的如成瘾、帕金森症等疾病的治疗药物或药物筛选的工具药。

新近研究表明, 阻断含有 $\alpha 3\beta 4$ 的 nAChRs 可有效防止烟瘾、吗啡和可卡因毒瘾的发作, 显著抑制吸烟和吸毒的欲望 (Brunzell DH, Boschen KE, Hendrick ES, Beardsley PM, McIntosh JM. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens shell regulate progressive ratio responding maintained by nicotine, *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(3):665-73)。

据调查, 疼痛影响 1/6 左右的人群, 包括关节炎、神经痛、肿痛。

其中神经痛影响 4-8% 的人群，包括酒精中毒、坐骨神经痛、癌症与癌症化疗、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤等都会引起神经痛。含有 $\alpha 3$ -亚基的 nAChRs，包括 $\alpha 3\beta 2$ 与 $\alpha 3\beta 4$ 亚型主要表达在外周神经系统，中枢神经系统也有分布，是神经痛药物作用的靶点。阻断 $\alpha 3\beta 2$ 或 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 的 α -芋螺毒素在临床前多种顽固性疼痛 (chronic pain) 模型上显示出很好的镇痛活性，且不成瘾。顽固性疼痛是一个世界性的健康难题，急需新的治疗药物面世 (Napier, I. A.; Klimis, H.; Rycroft, B. K.; Jin, A. H.; Alewood, P. F.; Motin, L.; Adams, D. J.; Christie, M. J., Intrathecal α -conotoxins Vc1.1, AuIB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2012,62 (7), 2202-2207. Blyth, F. M.; March, L. M.; Brnabic, A. J.; Jorm, L. R.; Williamson, M.; Cousins, M. J., Chronic pain in Australia: a prevalence study. *PAIN* 2001,89 (2-3), 127-34. Cousins, M. J.; Brennan, F.; Carr, D. B., Pain relief: a universal human right. *PAIN* 2004,112 (1-2), 1-4. Eisenberg, E.; McNicol, E. D.; Carr, D. B., Efficacy and safety of opioid agonists in the treatment of neuropathic pain of nonmalignant origin: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005,293 (24), 3043-52.) 。

$\alpha 3\beta 4$ nAChRs 是感觉的以及自律的神经中枢中主要的乙酰胆碱受体亚型。 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 也是中枢神经系统 (CNS) 神经元的分支，譬如向中枢延伸的松果体缰、背部骨髓，涉及到烟碱及其它滥用药物的成瘾 (Millar, N. S.; Gotti, C., Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 2009,56 (1), 237-46; Tapper, A. R.; McKinney, S. L.; Nashmi, R.; Schwarz, J.; Deshpande, P.; Labarca, C.; Whiteaker, P.; Marks, M. J.; Collins, A. C.; Lester, H. A., Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* 2004,306 (5698), 1029-32.) 。

$\alpha 3\beta 4$ nAChR 涉及到

中枢边缘多巴胺途径，对于滥用某种物质（如毒品）产生的奖赏效应起着非常重要的作用。并且在 $\beta 4$ 亚基敲除的老鼠中，烟碱引起的运动和奖赏效应显著减少，这意味着 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 在 CNS 中烟碱成瘾的重要作用（Salas, R., Sturm, R., Boulter, J., and De Biasi, M. (2009) Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J. Neurosci.* 29, 3014-3018）。 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 在恐惧反应中也起着很重要的作用，对于调节谷氨酸和去甲肾上腺素的释放至关重要（Zhu, P. J.; Stewart, R. R.; McIntosh, J. M.; Weight, F. F., Activation of nicotinic acetylcholine receptors increases the frequency of spontaneous GABAergic IPSCs in rat basolateral amygdala neurons. *Journal of neurophysiology* 2005,94 (5), 3081-91. Alkondon, M.; Albuquerque, E. X., A non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons. *Journal of neurophysiology* 2002,87 (3), 1651-4. Luo, S.; Kulak, J. M.; Cartier, G. E.; Jacobsen, R. B.; Yoshikami, D.; Olivera, B. M.; McIntosh, J. M., α -conotoxin AuIB selectively blocks $\alpha 3$ $\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998,18 (21), 8571-9. Kulak, J. M.; McIntosh, J. M.; Yoshikami, D.; Olivera, B. M., Nicotine-evoked transmitter release from synaptosomes: functional association of specific presynaptic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels. *Journal of neurochemistry* 2001,77 (6), 1581-9.)。

对 nAChRs 特定亚型具有非凡选择性的 α -CTxs 是研究各种亚型分布和功能的绝对必需的工具和相关疾病的治疗药物（Kasheverov, I. E., Utkin, Y. N., and Tsetlin, V. I. (2009) Naturally Occurring and Synthetic Peptides Acting on Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Pharmaceutical Design* 15, 2430-2452; Nicke, A., Wonnacott, S., and

Lewis, R. J. (2004) alpha-Conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur. J. Biochem.* 271, 2305-2319)。特异阻断 $\alpha 3\beta 2$ 亚型, 而对其极其相似的 $\alpha 6\beta 2^*$ 亚型阻断活性很小或没有的 α -CTx具有非常珍贵的价值, 也就是说能将 $\alpha 3\beta 2$ 与 $\alpha 6\beta 2^*$ 两种亚型区分开的配体具有极其重要的科学与应用价值。因为, 在多巴胺能区域, 以 $\alpha 6\beta 2^*$ 亚型占主导地位。我们对这个重要生理功能区域的受体群的组成、特征、和生理作用的了解仅仅来自 α -CTx MII的应用, 但是 α -CTx MII对 $\alpha 3\beta 2$ 与 $\alpha 6\beta 2^*$ 两种亚型的选择性很差, 无法区分它们。或者是用选择性的 $\alpha 6\beta 2^*$ 亚型的阻断剂来研究 (Dowell, C., Olivera, B. M., Garrett, J. E., Staheli, S. T., Watkins, M., Kuryatov, A., Yoshikami, D., Lindstrom, J. M., and McIntosh, J. M. (2003) α -Conotoxin PIA Is Selective for $\alpha 6$ Subunit-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Neuroscience* 23, 8445-8452; McIntosh, J. M., Azam, L., Staheli, S., Dowell, C., Lindstrom, J. M., Kuryatov, A., Garrett, J. E., Marks, M. J., and Whiteaker, P. (2004) Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology* 65, 944-952; Quik, M., Perez, X. A., and Grady, S. R. (2011) Role of alpha 6 nicotinic receptors in CNS dopaminergic function: relevance to addiction and neurological disorders. *Biochemical pharmacology* 82, 873-882; Letchworth, S. R., and Whiteaker, P. (2011) Progress and challenges in the study of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology* 82, 862-872; Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Lena, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novere, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M., and Changeux, J. P. (2003) Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *Journal of Neuroscience* 23, 7820-7829)。然而, $\alpha 3\beta 2^*$

nAChRs的表达往往会与 $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs的表达相互重叠，有时 $\alpha 3\beta 2^*$ nAChRs还占主导（Whiteaker, P., McIntosh, J. M., Luo, S. Q., Collins, A. C., and Marks, M. J. (2000) I-125-alpha-conotoxin MII identifies a novel nicotinic acetylcholine receptor population in mouse brain. *Molecular pharmacology* 57, 913-925; Whiteaker, P., Peterson, C. G., Xu, W., McIntosh, J. M., Paylor, R., Beaudet, A. L., Collins, A. C., and Marks, M. J. (2002) Involvement of the alpha 3 subunit in central nicotinic binding populations. *Journal of Neuroscience* 22, 2522-2529; McClure-Begley, T. D., Wageman, C. R., Grady, S. R., Marks, M. J., McIntosh, J. M., Collins, A. C., and Whiteaker, P. (2012) A novel alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptor modulates H-3 -GABA release in the superficial layers of the mouse superior colliculus. *J Neurochem* 122, 48-57)。此外，脊柱中的 $\alpha 3\beta 2^*$ nAChRs在疼痛刺激的传递中起重要作用，是镇痛药物作用的靶点（Young, T., Wittenauer, S., McIntosh, J. M., and Vincler, M. (2008) Spinal $\alpha 3\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors tonically inhibit the transmission of nociceptive mechanical stimuli. *Brain research* 1229, 118-124）一个真正的 $\alpha 3\beta 2^*$ vs. $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs选择性阻断剂的发现，对于综合研究理解该亚型在正常和疾病状态下的功能和意义具有非常重要的价值。

可见， α -芋螺毒素在疼痛，戒烟，戒毒，治疗帕金森病、痴呆、抑郁和精神分裂等新药的研发、以及相关疾病机理的研究等领域具有巨大的潜力，市场亦急需能区分特定 nAChRs 亚型的分子探针工具药、以及治疗神经痛、以及成瘾等的创新药物上市，以缓解疼痛、吸烟吸毒等带来的疾病损失和严重的社会问题。目前，亟需发现新的高特异性的 nAChRs 阻断剂。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，发现了新的 α -芋螺毒素肽，其能够特异性地阻断乙酰胆碱受体，特别是对神经痛药物靶点 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs、 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 或 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChRs，以及成瘾药物靶点 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChRs 或 $\alpha 3\beta 4$ nAChRs 具有强阻断活性，并且在动物模型上显示出极强的镇痛活性，在制备镇痛、戒烟戒毒药物，防治抑郁、痴呆、精神分裂症、帕金森症等疾病或作为神经科学工具药等方面具有的良好应用前景。由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种多肽，其具有如下的式 I 所示的氨基酸序列：



其中，

X_1 表示 D 或 H，

X_2 表示 P、A 或 V，

X_3 表示 R、N 或 S，

X_4 表示 N、V 或 A，

X_5 表示 K、D、M 或 A，

X_6 表示 H 或 S，

X_7 表示 D、E 或者 X_7 缺失，

X_8 表示 L 或 I，

X_9 表示 G 或者 X_9 缺失；

可选地，式 I 多肽的 C-末端酰胺化。

上述氨基酸 D、H、P、A、V、R、N、S、K、M、H、E、L、I、G 等是氨基酸的缩写，其具有本领域人员公知的含义。

式 I 多肽的 C-末端酰胺化也可以用 # 表示，即：
GCCSX₁PX₂CX₃X₄X₅X₆PX₇X₈CX₉#。

本发明还涉及一种多肽，其为或者包含选自如下 (1) 至 (3) 中任一项所述的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11-15、SEQ ID NO: 26-28 或 SEQ ID NO: 30 中的任一序列所示的氨基酸序列;

(2) 与上述(1)所述氨基酸序列至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、尤其优选至少 95%、最优选至少 97% 相同的氨基酸序列; 或

(3) 被 1-5 个、优选 1-3 个、更优选 1-2 个、最优选 1 个氨基酸残基的取代、缺失、插入和/或添加而与上述(1)或(2)所示序列有所不同的氨基酸序列。

为了本发明的一个目的, 两个或更多个氨基酸序列之间的相同程度是通过 BLAST2.0 蛋白质数据库查询程序 (Aaltschul 等, 1997, 核酸研究 25: 3389-3402) 并采用下列参数确定的: blastall -p blastp -a4 -e10 -E0 -v500 -b250 -I[查询文档] -d prot_all, 其中 -p 指程序名称, -a 指将要用到的服务器数, -e 指期望值, -E 指延伸缺口的代价, -v 指单线描述 (one-line description) 数, -b 指将要显示的比对数, -I 指查询文档, -d 指用于查询的数据库。

同源多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11-15、SEQ ID NO: 26-28 或 SEQ ID NO: 30 中任一氨基酸序列不同之处可能在于取代、插入、添加和/或缺失了 1 或多个、优选 1-5 个、更优选 1-3 个、尤其优选 1-2 个、最优选 1 个氨基酸残基。优选地, 氨基酸改变是性质改变较小的变化, 即是不会显著影响蛋白质的折叠和/或活性的保守性氨基酸取代; 小片段缺失, 通常是 1 到大约 5 个、优选 1-3 个、更优选 1 个氨基酸的缺失; 小的氨基或羧基末端延伸, 如氨基端添加的甲硫氨酸残基; 有多达大约 20-25 个残基的小连接肽; 或可通过改变净电荷或者其它功能而有助于纯化的小延伸如多聚组氨酸片段、抗原表位或结合区。

保守性取代的例子是在碱性氨基酸 (精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、

酸性氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸）、极性氨基酸（谷氨酰胺和天冬酰胺）、疏水氨基酸（亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸）、芳香族氨基酸（苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸）和小氨基酸（甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸）内进行的取代。通常不会改变特异活性的氨基酸取代是本领域已知的，并且由例如 H.Neurath 和 R.L.Hill, 1979, 在《蛋白质》一书, Academic Press, New York 中描述过。最常见的替换是 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 和 Asp/Gly 以及反向进行的替换。

本发明还包括在本发明 α -芋螺毒素肽的 N-末端和/或 C-末端融合了其它肽/多肽的融合多肽或可裂解的融合多肽。产生融合多肽的技术为本领域内已知，包括连接编码本发明肽的编码序列与编码所述其它肽/多肽的编码序列，使它们在同一读框中，并且融合多肽的表达受控于相同的启动子和终止子。

根据本发明任一项所述的多肽，其具有 SEQ ID NO: 4 (α -LvIA/LvD21)、或 SEQ ID NO: 3 (该多肽实际上是 α -LvIA/LvD21 的前肽) 所示的氨基酸序列。

根据本发明任一项所述的多肽，其中，所述多肽的 C 末端是酰胺化的。所述酰胺化可以通过人工化学合成实现，也可以在细胞内或细胞外，通过酰胺化酶实现。

根据本发明任一项所述的多肽，其中，所述多肽的 N 末端的第一个半胱氨酸与第三个半胱氨酸形成二硫键，并且第二个半胱氨酸与第四个半胱氨酸形成二硫键；或所述多肽的 N 末端的第一个半胱氨酸与第四个半胱氨酸形成二硫键，并且第二个半胱氨酸与第三个半胱氨酸形成二硫键；所述多肽的 N 末端的第一个半胱氨酸与第二个半胱氨酸形成二硫键，并且第三个半胱氨酸与第四个半胱氨酸形成二硫键。

本发明的上述多肽即为芋螺毒素肽；具体地，是 α -芋螺毒素肽。上述芋螺毒素肽可以从我国海南产的疣编芋螺 (Conus lividus)

或织锦芋螺(*Conus textile*)中提取。也可以化学合成氨基酸序列(例如参考实施例 2-(1)至 2-(3)中的方法);或者通过基因重组的手段表达其核苷酸(核苷酸序列的制备参考实施例 1-(1)至 1-(3)或者直接按照实施例 2-(1)至 2-(3)中的方法进行多肽的人工合成),得到多肽。也可以参考下面的方法:

本发明的另一方面涉及本发明任一项所述的多肽的制备方法,包括下述步骤:

1)在ABI Prism 433a 多肽合成仪上或者手工方法合成线性多肽, Fmoc 氨基酸的侧链保护基为:Pmc (Arg)、Trt或Acm(Cys)、But (Thr、Ser、Tyr)、OBut (Asp)以及Boc (Lys);

2)将步骤1)中合成的线性多肽从树脂上切割下来;

3)用冰乙醚沉淀和洗涤步骤2)中得到的线性多肽,回收得到线性多肽粗品;

4)用制备型反向HPLC C18 柱(Vydac)纯化步骤3)中得到的线性多肽粗品;

5)将步骤4)中得到的产物进行两步或一步氧化折叠。

本发明的再一方面涉及一种多核苷酸,其编码本发明任一项所述多肽的氨基酸序列。

根据本发明任一项所述的多核苷酸,其为或者包含选自如下的(1)至(3)中任一项所述的核苷酸序列:

(1) SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16-21、SEQ ID NO: 22-25、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 31 中的任一序列所示的核苷酸序列;

(2)上面(1)中所述核苷酸序列的互补序列;

(3)在严谨条件下能够与上述(1)中所述的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

关于多核苷酸之间的杂交,在现有技术中有众多的文献可供参考,包括例如 Sambrook 等,分子克隆实验室手册,第二版,冷泉港实验室,冷泉港,1989。杂交中可以应用各种程度的严谨条件,例如中度、中度-高度,或者高度严谨条件。越严谨的条件,形成双螺旋要求的互补程度越高。可以通过温度、探针浓度、探针长度、离子强度、时间等等控制严谨程度。对于双链 DNA 基因探针,杂交于低于 DNA 杂合体熔解温度[melting temperature, T_m]) $20 - 25^\circ\text{C}$ 下在 6X SSPE、5X Denhardt 氏溶液、0.1% SDS、0.1mg/ml 变性 DNA 中进行过夜。清洗通常如下进行:于 $T_m - 20^\circ\text{C}$ 在 0.2X SSPE、0.1% SDS 中一次 15 分钟(中度严谨条件清洗)。

本发明的再一方面涉及一种核酸构建体,其包含本发明任一项所述的多核苷酸。

本发明的再一方面涉及一种表达载体,其包含本发明任一项所述的核酸构建体。

本发明的再一方面涉及一种转化的细胞,其包含本发明任一项所述的表达载体。

本发明的再一方面涉及一种融合蛋白,其包含本发明任一项所述的多肽。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物,其包含本发明任一项所述的多肽,或者包含本发明的融合蛋白;可选地,其还包含药学上可接受的载体或辅料。

本发明的再一方面涉及一种阻断乙酰胆碱受体的方法,包括使用有效量的本发明任一项所述的多肽或本发明的融合蛋白的步骤;具体地,所述乙酰胆碱受体是 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆

碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

本发明的再一方面涉及一种筛选乙酰胆碱受体抑制剂或者确定乙酰胆碱受体亚型的方法，该方法包括：通过在存在或不存在候选化合物存在的情况下将乙酰胆碱受体与本发明任一项所述的多肽或本发明的融合蛋白进行接触的步骤；具体地，所述乙酰胆碱受体为 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。当多肽或融合蛋白（例如 α -芋螺毒素LvIA/LvD21）能够特异阻断 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、（例如 α -芋螺毒素TxIB/Txd4）能够特异阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或（例如 α -芋螺毒素TxIC/Txd1）能够特异阻断 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体时，则推断该乙酰胆碱受体分别是 $\alpha 3\beta 2$ 亚型、 $\alpha 6\beta 2^*$ 亚型（ $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体）或 $\alpha 3\beta 4$ 亚型的乙酰胆碱受体。

本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的多肽或本发明的融合蛋白用于阻断乙酰胆碱受体的用途；具体地，所述乙酰胆碱受体是 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的多肽或本发明的融合蛋白在制备阻断乙酰胆碱受体的药物或试剂中的用途；具体地，所述乙酰胆碱受体是 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的多肽或本发明的融合蛋白在制备治疗和/或预防和/或辅助治疗神经系统疾病例如成瘾、神经痛、帕金森症、或痴呆等的药物，或者用于制备杀灭害虫、镇痛、戒烟、或戒毒的药物的用途；具体地，所述神经痛由如下原因导致：癌症与癌症化疗、酒精中毒、坐骨神经痛、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤、艾滋病、头部神经瘫痪、药物中毒、工业污染中毒、淋巴神经痛、骨髓瘤、多点运动神经痛、慢性先天性感觉神经病、急性剧烈自发性神经痛、挤压神经痛、脉管炎、血

管炎、局部缺血、尿毒症、儿童胆汁肝脏疾病、慢性呼吸障碍、复合神经痛、多器官衰竭、脓毒病/脓血症、肝炎、卟啉症、维生素缺乏、慢性肝脏病、原生胆汁硬化、高血脂症、麻疯病、莱姆关节炎、感觉神经束膜炎、过敏症等。

本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防和/或辅助治疗神经系统疾病例如疼痛、烟酒和毒品成瘾、智障、痴呆、精神分裂症、中枢神经紊乱、癫痫症、帕金森病、精神病、神经肌肉阻滞、重症肌无力、抑郁症、高血压、心率不齐、哮喘、肌肉松弛、中风、乳腺癌和肺癌等的方法，或者一种杀灭害虫、镇痛、戒烟、或戒毒的方法，包括给予有效量的本发明的多肽（芋螺毒素肽或其前肽）或者本发明的药物组合物或者本发明的融合蛋白的步骤；具体地，所述成瘾由烟碱、吗啡、可卡因、酒精等能引起上瘾的物质；所述神经痛由如下原因导致：癌症与癌症化疗、酒精中毒、坐骨神经痛、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤、艾滋病、头部神经瘫痪、药物中毒、工业污染中毒、淋巴神经痛、骨髓瘤、多点运动神经痛、慢性先天性感觉神经病、急性剧烈自发性神经痛、挤压神经痛、脉管炎、血管炎、局部缺血、尿毒症、儿童胆汁肝脏疾病、慢性呼吸障碍、复合神经痛、多器官衰竭、脓毒病/脓血症、肝炎、卟啉症、维生素缺乏、慢性肝脏病、原生胆汁硬化、高血脂症、麻疯病、莱姆关节炎、感觉神经束膜炎、过敏症等。

本发明的芋螺毒素肽可通过结合 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体(nAChR)、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体发挥作用，具有戒除成瘾与镇痛的活性。可应用于研究、诊断和治疗成瘾、神经痛、帕金森病、痴呆、精神分裂症、抑郁等神经系统疾病、以及作为有用的分子探针用于研究等方面。不同的 α -CTx 对脊椎动物受体的亲和性不同，有时相差几个数量级。这种种系间的差异使得 α -CTx 可作为有用的探针用于研究脊椎动物 nAChR 的种系发生，可作为分子探针来确

定 nAChRs 的不同亚型。它们是新药开发的候选药物、先导药物和治疗药物。

下面给出了本发明涉及的术语的解释。

神经痛

本发明所述多肽涉及到治疗各种神经痛的用途。神经痛是周围或中枢神经系统原发或继发性损害或功能障碍或短暂紊乱引起的疼痛，表现为自发性疼痛、痛觉超敏、痛觉过敏等。很多疾病都会引起神经痛，包括癌症与癌症化疗、酒精中毒、坐骨神经痛、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤、艾滋病、头部神经瘫痪、药物中毒、工业污染中毒、淋巴神经痛、骨髓瘤、多点运动神经痛、慢性先天性感觉神经病、急性剧烈自发性神经痛、挤压神经痛、脉管炎（血管炎）/局部缺血、尿毒症、儿童胆汁肝脏疾病、慢性呼吸障碍、复合神经痛、多器官衰竭、脓毒病/脓血症、肝炎、卟啉症、维生素缺乏、慢性肝脏病、原生胆汁硬化、高血脂症、麻疯病、莱姆关节炎、感觉神经束膜炎、过敏症等。

成瘾（addiction）

本发明所述多肽涉及到能治疗各种有依赖性物质引起的成瘾。成瘾是指反复使用精神活性物质者处于周期性或慢性中毒状态。精神活性物质指尼古丁、鸦片、海洛因、甲基苯丙胺（冰毒）、吗啡、大麻、可卡因以及国家规定管制的其它能够使人形成瘾癖的麻醉药品和精神药品等。成瘾与大脑中大量产生的多巴胺（Dopamine）有关。表现为不可遏制地应用偏爱的物质和难以自制或难以矫正使用行为，为获取精神活性物质达到感觉良好或避免戒断痛苦之目的，可以不择手段。典型情况是耐受性增高，并在物质使用中断后常出现戒断症状。成瘾者的生活可能完全由物质使用主宰，因而受到严重影响，甚至抛弃了

其它重要活动和一切责任。因此，物质使用既给个人，也给社会带来损害。当用于酒精使用时，与慢性酒精中毒的概念等同。成瘾一词还涵盖躯体及心理两方面的内容。心理成瘾强调对饮酒、服药的自控力受损体验，而躯体成瘾指耐受和戒断症状。

核酸构建体

本发明还涉及包含本发明所述核酸序列及与之可操作连接的 1 或多个调控序列的核酸构建体，所述调控序列在其相容条件下能指导编码序列在合适的宿主细胞中进行表达。表达应理解为包括多肽生产中所涉及的任何步骤，包括，但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

“核酸构建体”在文中定义为单链或双链核酸分子，它们分离自天然基因，或者经修饰而含有以非天然方式组合和并列的核酸片段。当核酸构建体包含表达本发明所述编码序列必需的所有调控序列时，术语核酸构建体与表达盒同义。术语“编码序列”在文中定义为核酸序列中直接确定其蛋白产物的氨基酸序列的部分。编码序列的边界通常是由紧邻 mRNA 5'端开放读码框上游的核糖体结合位点(对于原核细胞)和紧邻 mRNA 3'端开放读码框下游的转录终止序列确定。编码序列可以包括，但不限于 DNA、cDNA 和重组核酸序列。

可以以多种方式操作编码本发明所述肽的分离的核酸序列，使其表达所述肽。可能期望或必须在插入载体之前对核酸序列进行加工，这取决于表达载体。应用重组 DNA 方法修饰核酸序列的技术为本领域所熟知。

本文中术语“调控序列”定义为包括表达本发明肽所必需或有利的所有组分。每个调控序列对于编码多肽的核酸序列可以是天然含有的或外来的。这些调控序列包括，但不限于，前导序列、多聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号序列和转录终止子。最低限度，调控序列要包括启动子以及转录和翻译的终止信号。为了导入特定的限制

位点以便将调控序列与编码多肽的核酸序列的编码区进行连接，可以提供带接头的调控序列。术语“可操作连接”在文中定义为这样一种构象，其中调控序列位于相对 DNA 序列之编码序列的适当位置，以使调控序列指导多肽的表达。

调控序列可以是合适的启动子序列，即可被表达核酸序列的宿主细胞识别的核酸序列。启动子序列含有介导多肽表达的转录调控序列。启动子可以是在所选宿主细胞中有转录活性的任何核酸序列，包括突变的、截短的和杂合的启动子，可以得自编码与宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因。

调控序列还可以是合适的转录终止序列，即能被宿主细胞识别从而终止转录的一段序列。终止序列可操作连接在编码多肽的核酸序列的 3' 末端。在所选宿主细胞中可发挥功能的任何终止子都可以用于本发明。

调控序列还可以是合适的前导序列，即对宿主细胞的翻译十分重要的 mRNA 非翻译区。前导序列可操作连接于编码多肽的核酸序列的 5' 末端。在所选宿主细胞中可发挥功能的任何前导序列均可用于本发明。

调控序列还可以是信号肽编码区，该区编码一段连在多肽氨基端的氨基酸序列，能引导编码多肽进入细胞分泌途径。核酸序列编码区的 5' 端可能天然含有翻译读框一致地与分泌多肽的编码区片段自然连接的信号肽编码区。或者，编码区的 5' 端可含有对编码序列是外来的信号肽编码区。当编码序列在正常情况下不含有信号肽编码区时，可能需要添加外来信号肽编码区。或者，可以用外来的信号肽编码区简单地替换天然的信号肽编码区以增强多肽分泌。但是，任何能引导表达后的多肽进入所用宿主细胞的分泌途径的信号肽编码区都可以用于本发明。

调控序列还可以是肽原编码区，该区编码位于多肽氨基末端的一段氨基酸序列。所得多肽被称为酶原或多肽原。多肽原通常没有活性，

可以通过催化或自我催化而从多肽原切割肽原而转化为成熟的活性多肽。

在多肽的氨基末端即有信号肽又有肽原区时，肽原区紧邻多肽的氨基末端，而信号肽区则紧邻肽原区的氨基末端。

添加能根据宿主细胞的生长情况来调节多肽表达的调控序列可能也是需要的。调控系统的例子是那些能对化学或物理刺激物（包括在有调控化合物的情况下）作出反应，从而开放或关闭基因表达的系统。调控序列的其它例子是那些能使基因扩增的调控序列。在这些例子中，应将编码多肽的核酸序列与调控序列可操作连接在一起。

表达载体

本发明还涉及包含本发明核酸序列、启动子和转录及翻译终止信号的重组表达载体。可以将上述各种核酸和调控序列连接在一起来制备重组表达载体，该载体可以包括 1 或多个方便的限制位点，以便在这些位点插入或取代编码多肽的核酸序列。或者，可以通过将核酸序列或包含该序列的核酸构建体插入适当表达载体而表达本发明所述核酸序列。制备表达载体时，可使编码序列位于载体中以便与适当的表达调控序列可操作连接。

重组表达载体可以是任何便于进行重组 DNA 操作并表达核酸序列的载体（例如质粒或病毒）。载体的选择通常取决于载体与它将要导入的宿主细胞的相容性。载体可以是线性或闭环质粒。

载体可以是自主复制型载体（即存在于染色体外的完整结构，可独立于染色体进行复制），例如质粒、染色体外元件、微小染色体或人工染色体。载体可包含保证自我复制的任何机制。或者，载体是一个当导入宿主细胞时，将整合到基因组中并与所整合到的染色体一起复制的载体。此外，可应用单个载体或质粒，或总体包含将导入宿主细胞基因组的全部 DNA 的两个或多个载体或质粒，或转座子。

优选本发明所述载体含有 1 或多个便于选择转化细胞的选择标

记。选择标记是这样—个基因，其产物赋予对杀生物剂或病毒的抗性、对重金属的抗性，或赋予营养缺陷体原养型等。细菌选择标记的例子如枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因，或者抗生素如氨基青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素的抗性标记。

优选本发明所述载体包含能使载体稳定整合到宿主细胞基因组中，或保证载体在细胞中独立于细胞基因组而进行自主复制的元件。

就进行自主复制的情况而言，载体还可以包含复制起点，使载体能在目标宿主细胞中自主地复制。复制起点可以带有使其在宿主细胞中成为温度敏感型的突变（参见例如，fEhrlich,1978，美国国家科学院学报 75: 1433）。

可以向宿主细胞插入 1 个以上拷贝的本发明核酸序列以提高该基因产物的产量。该核酸序列的拷贝数增加可以通过将该序列的至少 1 个附加拷贝插入宿主细胞基因组中，或者与该核酸序列一起插入一个可扩增的选择标记，通过在有合适选择试剂存在下培养细胞，挑选出含有扩增拷贝的选择性标记基因、从而含有附加拷贝核酸序列的细胞。

用于连接上述各元件来构建本发明所述重组表达载体的操作是本领域技术人员所熟知的（参见例如 Sambrook 等，分子克隆实验手册，第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约，1989）。

宿主细胞

本发明还涉及包含可用来重组生产多肽的本发明所述核酸序列的重组宿主细胞。可将包含本发明之核酸序列的载体导入宿主细胞，从而使该载体以上述染色体整合体或自我复制的染色体外载体形式得以维持。术语“宿主细胞”涵盖任何由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不同的后代。宿主细胞的选择很大程度上取决于多肽编码基因及其来源。

宿主细胞可以是原核细胞或者真核细胞，例如细菌或酵母细胞。可以通过本领域技术人员熟知的技术将载体导入宿主细胞。

制备方法

本发明还涉及重组制备本发明肽的方法，该方法包括：(a) 在适于产生所述肽的条件下，培养含有核酸构建体的宿主细胞，该核酸构建体包含编码所述肽的核酸序列；和 (b) 回收该肽。

在本发明所述制备方法中，用本领域已知方法在合适多肽产生的营养培养基中培养细胞。例如，可以在合适的培养基中，在允许多肽表达和/或分离的条件下，通过摇瓶培养、实验室或工业发酵罐中小规模或大规模发酵（包括连续、分批、分批加料或固态发酵）来培养细胞。在包含碳和氮源以及无机盐的合适的培养基中，采用本领域已知的步骤进行培养。合适的培养基可由供应商提供或者可以参照公开的组成（例如，美国典型培养物保藏中心的目录中所述）来制备。如果多肽被分泌到培养基中，则可以直接从培养基中回收多肽。如果多肽不分泌，可以从细胞裂解物中回收。

可以用本领域已知方法回收所产生的多肽。例如，可以通过常规操作（包括，但不限于离心、过滤、抽提、喷雾干燥、蒸发或沉淀）从培养基中回收多肽。

可以通过各种本领域已知的操作来纯化本发明所述多肽，这些操作包括，但不限于层析（例如，离子交换层析、亲和层析、疏水作用层析、层析聚焦、和大小排阻层析）、HPLC、电泳（例如，制备性等电点聚焦）、差示溶解度（例如硫酸铵沉淀）、SDS-PAGE 或抽提（参见例如，蛋白质纯化，J.C.Janson 和 Lars Ryden 编，VCH Publishers, New York, 1989）。

转基因动物和植物

本发明还涉及转化了本发明的核酸序列的动物或植物细胞，优选小麦、玉米等植物细胞，赋予被转化宿主新的性状（如抗虫性）。这可以通过本领域技术人员熟知的技术，用此处公开的构建体转化动物

或植物细胞而实现。

用于控制害虫的方法和制剂

可以通过本领域技术人员知道的多种方法，使用本发明的芋螺毒素肽或多核苷酸来实现控制害虫。这些方法包括例如将重组微生物应用于害虫（或它们的所在地）、和用编码本发明的芋螺毒素肽的基因转化植物。转化可以由本领域技术人员使用常规技术进行。此处公开了用于这些转化的必要物质，或者熟练的技术人员可以通过其它方法容易的获得。

可以将配制的含有芋螺毒素肽、或包含本发明所述多核苷酸的重组微生物的制剂应用于土壤。还可以将配制的产品作为种子覆料或根部处理或作物生长周期晚期的完整植株处理应用。制剂可以包括扩散-增稠佐剂、稳定剂、其它杀虫添加剂、或表面活性剂。液体制剂可以是基于水的或非水的，并以泡沫、凝胶、悬浮液、可乳化浓缩物等等形式使用。成分可以包括流变剂、表面活性剂、乳化剂、分散剂、或聚合物。

本领域技术人员可以理解，杀虫剂浓度将由于特殊制剂的本性广泛变化，特别是可作为浓缩物或直接使用。杀虫剂将以至少 1%（重量计）存在，而且可能是 100%（重量计）。干燥制剂通常有大约 1-95%（重量计）的杀虫剂，而液体制剂将通常是液相中固体重量大约 1-60%。含有细胞的制剂将通常含有大约 10^2 - 大约 10^4 个细胞/mg。这些制剂将以每公顷大约 50mg（液体的或干的）- 1kg 或更多的量使用。通过喷、撒、洒等等，可以将制剂应用于害虫环境，例如土壤和植物。

药物组合物

本发明还涉及含有本发明肽和药学可接受载体和/或赋形剂的药物组合物。所述药物组合物可用于研究、诊断、缓解或治疗与成瘾、

神经痛、智障、疼痛、帕金森症、精神病、抑郁、重症肌无力、癌症等有关的疾病或病症。在一个实施方案中，含有治疗有效量的本发明肽的药物组合物以利于药用的方式配制和给药，并需考虑到个体病人的临床状况、运送位点、给药方法、给药日程安排和医生已知的其它因素。因此用于本文目的的“有效量”由这些方面的考虑决定。

含治疗有效量的本发明多肽的药物组合物非肠道给药、口服、脑池内给药、鞘内给药等。“药学可接受载体”指无毒的固体、半固体或液体填充物、稀释液、胶囊材料或任何类型的配方辅助物。本文所用术语“非肠道的”表示的给药方式包括静脉内、肌肉内、腹膜内、胸骨内、皮下、鞘内和关节内注射和输注。本发明多肽还可通过缓释系统恰当地给药。

本发明还涉及特异阻断 nAChRs 的药物组合物。

可应用本发明的芋螺毒素肽作为有用的探针来用于研究动物 nAChRs 的种系发生；作为分子探针来确定 nAChRs 的不同亚型；作为分子模型,设计新药；作为研究、诊断神经性疾病如成瘾、帕金森氏病、行动障碍、精神分裂症等的工具药和治疗药物；治疗乳腺癌、肺癌、小细胞肺癌等的候选药物。作为多肽杀虫剂，开发为新型生物农药等。

发明的有益效果

本发明的 α -芋螺毒素肽能够特异地阻断乙酰胆碱受体 (nAChRs)，并且具有强镇痛与戒除成瘾活性，以及治疗帕金森症、痴呆、精神分裂症、抑郁等疾病的功效。

附图说明

图 1: α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 (LvIA) 前肽基因序列及其编码产生的前肽与翻译后修饰产生的成熟肽。箭头所指为翻译后修饰的加工位点。推断的蛋白酶水解加工位点 1 (processing 1) 在碱性氨基酸

精氨酸 (R) 的后面; C-末端酰胺化加工位点在箭头所指的甘氨酸的位置, 用字符底纹表示, 即 processing 2. 成熟肽 C-末端紧挨半胱氨酸 (Cys) 的第一甘氨酸残基往往是酰胺化翻译后修饰的加工位点, 从 processing site 2 进行酰胺化产生的成熟肽命名为 LvIA/LvD21 (或 LvIA), 序列为: GCCSH**PAC**NVDH**PEIC**# (# 表示 C-末端酰胺化)。前肽区用斜体字表示, 成熟肽用下划线表示, 其中的半胱氨酸 (C) 用黑体字显示, 终止密码子用 * 表示。

图 2: 合成的线性肽与成熟肽 α -LvIA/LvD21 (SEQ ID NO: 4) 序列及其二硫键连接方式 I-III, II-IV, 及其相应的 HPLC 色谱图。图 2A 显示的是合成的线性肽序列, 及其 Cys1 和 Cys3 的自由-SH 与 Cys2 和 Cys4 上的保护基 S-Acm (S-acetamidomethyl); 图 2B 显示的是氧化折叠后的成熟肽 α -LvIA/LvD21 序列, 及其含有的 I-III, II-IV 二硫键连接方式; 图 2C 显示的是图 2A 中合成的线性肽的 HPLC 色谱图, 其保留时间为 27.713min; 图 2D 显示的是图 2B 中氧化肽的 HPLC 色谱图, 其保留时间为 27.947min。

图 3: 图 3A 显示的是 100 nM α -LvIA/LvD21 对 α 3 β 2 nAChR 的电流影响情况, 钳制电压为 70 mV, 图 3A 中的“C”是指的对照电流, 箭头所指的是 100 nM α -LvIA/LvD21 温育 5 分钟后, 第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹 (~0 nA), 每两个电流轨迹之间的时间间隔为 1 min。图 3B、3C、3D 分别是 α -LvIA/LvD21 对各种 nAChRs 亚型 (大鼠 11 个, 人类 2 个) 的浓度剂量反应曲线, 图中横坐标为所用 α -LvIA/LvD21 的摩尔浓度 (M) 的对数值 (Log[LvIA/LvD21]M); 纵坐标为剂量反应百分数 (% Response), 是相应浓度的毒素作用下乙酰胆碱受体电流与对照电流的比值百分数。图 3B 显示, α -LvIA/LvD21 高选择性阻断大鼠 α 3 β 2 vs. α 6/ α 3 β 2 β 3 nAChRs 的浓度剂量反应曲线; 图 3C 显示, α -LvIA/LvD21 对其他大鼠神经型亚型和小鼠肌肉型 nAChRs 的浓度剂量反应曲线; 图 3D 显示, α -LvIA/LvD21 高选择性阻断人类 α 3 β 2 vs. α 6/ α 3 β 2 β 3 nAChRs 的浓度剂量反应曲线。图 3 中各个数值是取自 3

- 9 个非洲爪蟾卵母细胞的电流平均值。

图 4: 不同剂量的 α -LvIA/LvD21 各种 nAChRs 的电流影响情况。图 4A, 100 nM α -LvIA/LvD21 对大鼠 $\alpha3\beta2$ nAChRs 的电流影响情况; 图 4B, 10 μ M α -LvIA/LvD21 对 $\alpha2\beta2$ nAChRs 的电流影响情况; 图 4C, 10 μ M α -LvIA/LvD21 对小鼠肌肉型 ($M\alpha1\beta\delta\epsilon$) nAChRs 的电流影响情况。图 4 中“C”指的是对照电流, 紧接“C”后面的是 α -LvIA/LvD21 的毒素浓度。箭头所指的是温育 5 分钟后, LvIA/LvD21 阻断相应受体亚型的第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹。图 4 显示, 100 nM α -LvIA/LvD21 特异阻断 $\alpha3\beta2$ nAChR, 而 10 μ M 完全不阻断 $\alpha2\beta2$ (B)与 $M\alpha1\beta\delta\epsilon$ (C) nAChRs 亚型。

图 5: α -LvIA/LvD21 对 $\alpha3\beta2$ nAChRs 及其 7 个 $\beta2$ 突变型的浓度剂量反应曲线。图 5A 中的突变型是 $\alpha3\beta2$ [F119Q]、 $\alpha3\beta2$ [V111I]; 图 5B 中的突变型是 $\alpha3\beta2$ [F119Q]、 $\alpha3\beta2$ [T59K]、 $\alpha3\beta2$ [T59L]; 图 5C 中的突变型是 $\alpha3\beta2$ [T59I]、 $\alpha3\beta2$ [K79A]、 $\alpha3\beta2$ [Q34A]。

图 6: 显示的是 10 nM α -LvIA/LvD21 对大鼠 $\alpha3\beta2$ nAChRs 野生型 (A), 以及突变型 $\alpha3\beta2$ [F119Q] (B), $\alpha3\beta2$ [T59K] (C)与 $\alpha3\beta2$ [V111I] (D)的电流影响情况, 以及阻断后不同的洗脱速率。图 6A, 10 nM α -LvIA/LvD21 阻断 $\alpha3\beta2$ nAChRs 野生型大约 50% 的电流, 洗脱速度快, 2 min 内电流完全恢复; 图 6B, 10 nM α -LvIA/LvD21 阻断突变型 $\alpha3\beta2$ [F119Q] 的全部电流, 洗脱速度慢, 洗脱 12 min 后电流才恢复; 图 6C, 10 nM α -LvIA/LvD21 阻断突变型 $\alpha3\beta2$ [T59K] 的全部电流, 洗脱速度非常慢, 洗脱 20 min 后的电流才恢复至对照电流的 27%。图 6D, 10 nM α -LvIA/LvD21 完全不阻断突变型 $\alpha3\beta2$ [V111I] 的电流。图中“C”是指的对照电流, 箭头所指的是 10 nM α -LvIA/LvD21 温育 5 分钟后, 第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹 (~ 0 nA), “washout”是指洗脱, 每两个电流轨迹之间的时间间隔为 1 min。

图 7: α -LvIA/LvD21 腹腔给药 (IP) 后 1-24h 在 CCI 模型上的镇痛作用。图中阴性对照 Saline 为生理盐水 (Saline), 阳性对照为吗啡

(Morphine)，其给药剂量为 1mg/kg 大鼠体重； α -LvIA/LvD21 的给药剂量为 1 nmol/kg 大鼠体重。图中横坐标 Time(hours)为给药后的小时数；纵坐标 Mechanical Threshold 为观测痛阈值与基础痛阈值 (100) 的比值百分数 (% of basal)，图中各个点的纵坐标是平均值和标准误 (Mean \pm SD)。显著性差异比较概率为 #p<0.05，每组大鼠数量为 8 只 (n=8)。

图 8: α -LvIA/LvD21 腹腔给药 (IP) 后 7-14 天在 CCI 模型上的镇痛作用。图中阴性对照 Saline 为生理盐水(Saline)，阳性对照为吗啡 (Morphine)，其给药剂量为 1mg/kg 大鼠体重； α -LvIA/LvD21 的给药剂量为 1 nmol/kg 大鼠体重。图中横坐标 Time(days)为给药后的天数；纵坐标 Mechanical Threshold 为观测痛阈值与基础痛阈值(100) 的比值百分数 (% of basal)，图中各个点的纵坐标是平均值和标准误 (Mean \pm SD)。显著性差异比较概率为 #p<0.05，每组大鼠数量为 8 只 (n=8)。

图 9: α -LvIA/LvD21 脑室给药 (ICV) 后 120 min 内在小鼠热板试验模型上的镇痛作用。图中阴性对照 Saline 为生理盐水(Saline)，阳性对照为吗啡 (Morphine)，其给药剂量为 100 μ g/kg 小鼠体重； α -LvIA/LvD21 的给药剂量为 0.1 nmol/kg 小鼠体重。图中横坐标 Time(min)为给药后的分钟数；纵坐标 Threshold (sec) 为观测痛阈值，单位为秒。图中各个点的纵坐标是平均值和标准误 (Mean \pm SD)。显著性差异比较概率为 p<0.05，每组小鼠数量为 10 只 (n=10)。

图 10: α -芋螺毒素 TxIB/Txd4 (TxIB) 前肽基因序列及其编码产生的前肽与翻译后修饰产生的成熟肽。箭头所指为翻译后修饰的加工位点。推断的蛋白酶水解加工位点 1 (processing site 1) 在碱性氨基酸精氨酸 (R) 的后面；C-末端酰胺化加工位点可能在箭头所指的两个甘氨酸的位置，用字符底纹表示，即 processing site 2 或 processing site 3。成熟肽 C-末端紧挨半胱氨酸 (Cys) 的第一或第二个甘氨酸残基往往是酰胺化翻译后修饰的加工位点，从 processing site

2 进行酰胺化产生的成熟肽命名为 TxIB/Txd4 (或 TxIB), 序列为: GCCSDPPCRNKHPDLC# (# 表示 C-末端酰胺化); 从 processing site 3 进行酰胺化产生的成熟肽命名为 TxIB/Txd4 (G) (或 TxIB(G)), 序列为: GCCSDPPCRNKHPDLCG# (# 表示 C-末端酰胺化)。TxIB(G) 的 C-末端只比 TxIB 多一个甘氨酸 (G), 是 TxIB 的类似物。前肽区用斜体字表示, 成熟肽用下划线表示, 其中的半胱氨酸 (C) 用黑体字显示, 终止密码子用 * 表示。

图 11: 显示的是 α -TxIB/Txd4 (图 11A) 以及 TxIB (G) (图 11B) 的成熟肽序列及其二硫键连接方式 I-III, II-IV。

图 12: α -TxIB 与 TxIB(G) 是 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR 的高选择性特异阻断剂。图 12A 显示的是 $1\mu\text{M}$ α -TxIB 对 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR 的电流影响情况。图 12A 中“C”是指的对照电流, 箭头所指的是 $1\mu\text{M}$ α -TxIB 温育 5 分钟后, 第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹 (~ 0 nA)。图 12B 显示的是 α -TxIB 与 TxIB (G) 对 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR 的浓度剂量反应曲线, 图中横坐标为所用 α -TxIB 与 TxIB(G) 的摩尔浓度 (M) 的对数值 ($\text{Log}[\text{TxIB and TxIB(G)]M}$); 纵坐标为剂量反应百分数 (% Response), 是相应浓度的毒素作用下乙酰胆碱受体电流与对照电流的比值百分数。图 12C 显示的是 α -TxIB 对各种 nAChRs 亚型的浓度剂量反应曲线, α -TxIB 特异阻断 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR, 其半阻断剂量 (IC_{50}) 为 28 nM, 在 $10\mu\text{M}$ 毒素浓度下, TxIB 对其它亚型没有阻断作用, 其 $\text{IC}_{50} > 10\mu\text{M}$ 。图中各个数值是取自 3-5 个非洲爪蟾卵母细胞的电流平均值。

图 13: 显示的是 $1\mu\text{M}$ α -TxIB 对 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR (图 13A), 以及 $10\mu\text{M}$ α -TxIB 对其非常接近的 $\alpha_3\beta_2$ (图 13B), $\alpha_6/\alpha_3\beta_4$ (图 13C), $\alpha_3\beta_4$ (图 13D) nAChRs 的电流影响情况。图中“C”是指的对照电流, 紧接“C”后面的是 α -TxIB 的毒素浓度。箭头所指的是温育 5 分钟后, TxIB 阻断相应受体亚型的第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹。 $1\mu\text{M}$ α -TxIB 特异阻断 $\alpha_6/\alpha_3\beta_2\beta_3$ nAChR (图 13A), 而 $10\mu\text{M}$ 完全

不阻断 $\alpha 3 \beta 2$ (图 13B), $\alpha 6 / \alpha 3 \beta 4$ (图 13C) 与 $\alpha 3 \beta 4$ (图 13D) nAChRs 亚型。

图 14: α -芋螺毒素 TxIC/Txd1 (TxIC) 前肽基因序列及其编码产生的前肽与翻译后修饰产生的成熟肽。箭头所指为翻译后修饰的加工位点。推断的蛋白酶水解加工位点 1 (processing site 1) 在碱性氨基酸精氨酸 (R) 的后面; C 末端酰胺化加工位点在箭头所指的甘氨酸的位置, 用字符底纹表示, 即 processing site 2. 成熟肽 C 末端紧挨半胱氨酸 (Cys) 的第一个甘氨酸残基往往是酰胺化翻译后修饰的加工位点, 从 processing site 2 进行酰胺化产生的成熟肽命名为 TxIC/Txd1 (或 TxIC), 序列为: GCCSHPVCSAMSPIC # (# 表示 C 末端酰胺化)。前肽区用斜体字表示, 成熟肽用下划线表示, 其中的半胱氨酸 (C) 用黑体字显示, 终止密码子用 * 表示。

图 15: A 显示的是成熟肽 α -TxIC/Txd1 (SEQ ID NO: 28) 序列及其二硫键连接方式 I-III, II-IV。B 显示的是含有 I-III, II-IV 二硫键连接方式的 α -TxIC/Txd1 的 HPLC 色谱图, 该毒素肽的色谱分析条件为: 用 Vydac C18 HPLC 反相分析柱, 在 40 分钟内进行线性梯度洗脱, B 液从 15% 到 50%, A 液从 85% 到 50%, A 液是 0.65% 的三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA), B 是 0.5% TFA 与 90% 乙腈 (acetonitrile) 的水溶液。紫外分析波长为 214nm, TxIC 的出峰时间, 即保留时间是 23.366 分钟。

图 16: α -TxIC 是 $\alpha 3 \beta 4$ nAChR 的选择性强阻断剂。A 显示的是 $1 \mu\text{M}$ α -TxIC 对 $\alpha 3 \beta 4$ nAChR 的电流影响情况。图 A 中“C”是指的对照电流, 箭头所指的是 $1 \mu\text{M}$ α -TxIC 温育 5 分钟后, 第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹 ($\sim 0 \text{ nA}$)。B 显示的是 α -TxIC 对其它 10 个 nAChRs 各种亚型的浓度剂量反应曲线, 图中横坐标为所用 α -TxIC 的摩尔浓度 (M) 的对数值 ($\text{Log}[\text{TxIC}]/\text{M}$); 纵坐标为剂量反应百分数 (% Response), 是相应浓度的毒素作用下乙酰胆碱受体电流与对照电流的比值百分数。 α -TxIC 特异阻断 $\alpha 3 \beta 4$ nAChR, 其半阻断剂量 (IC_{50})

仅为 12.5 nM; α -TxIC 对 $\alpha6/\alpha3\beta4$ nAChR 也有一定的阻断作用, 其半阻断剂量 (IC_{50}) 为 94 nM; α -TxIC 对 $\alpha2\beta4$ nAChR 有很微弱的阻断作用, 其半阻断剂量高达 4550 nM。在 10 μ M 毒素浓度下, TxIC 对其它亚型没有阻断作用, 其 $IC_{50} > 10 \mu$ M。图中各个数值是取自 3-8 个非洲爪蟾卵母细胞的电流平均值。

图 17: 显示的是 1 μ M α -TxIC 对 $\alpha3\beta4$ nAChR (A), 以及 10 μ M α -TxIC 对其很接近的 $\alpha4\beta4$ (B), $\alpha7$ (C) nAChRs 的电流影响情况。图中“C”是指的对照电流, 紧接“C”后面的是 α -TxIC 的毒素浓度。箭头所指的是温育 5 分钟后, TxIC 阻断相应受体亚型的第一个 Ach 脉冲形成的电流轨迹。1 μ M α -TxIC 特异阻断 $\alpha3\beta4$ nAChR, 而 10 μ M 完全不阻断 $\alpha4\beta4$ (B)与 $\alpha7$ (C) nAChRs 亚型。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解, 下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件 (例如参考 J.萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译的《分子克隆实验指南》, 第三版, 科学出版社)、相应的参考文献、或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1-(1): α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 基因的克隆和序列分析

1. 疣螭芋螺基因组 DNA 的提取

分别以从海南岛、西沙群岛等沿海采集的疣螭芋螺 (*C. textile* Linnaeus) 活体为材料, 储存在 -80°C 备用。先将芋螺毒腺解剖出来, 并称重。然后用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒 (购自中国北京天根生化科技有限公司), 提取毒腺的基因组 DNA, 具体操作参见试剂盒说明书; 也可以参考文献, 郑晓冬、高炳淼、李宝珠、彭超、吴爱

银、朱晓鹏、陈心、长孙东亭、罗素兰，新型 α -芋螺毒素基因克隆的引物筛选，生物技术，2011，21（4）：40-44。

将提取的毒腺基因组总 DNA 溶于 100 μ L TE 中，取 5 μ L 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，以 λ -EcoT14 I digest DNA Marker 为标准，检测所得 DNA 的完整性和大小。用核酸蛋白质分析仪测定 DNA 溶液的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值以及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值，并计算 DNA 的浓度(μ g·ml⁻¹)、纯度和 DNA 产率(μ g·g⁻¹)。

所提取的 DNA 作为进行芋螺毒素基因克隆的模板，用于下面的 PCR 扩增。

2. PCR 反应及其产物的克隆、测序、和序列分析

根据 α -CTx 前体基因内含子序列及其 3'端非翻译区 (3'-UTR) 序列，设计 α -CTx 特异引物。

上游内含子引物序列：

5'-GTGGTTCTGGGTCCAGCA-3' (SEQ ID NO: 9)；

下游 3'-UTR 引物序列：

5'-GTCGTGGTTCAGAGGGTC-3' (SEQ ID NO: 10)。

每条引物均为 18 个碱基的寡核苷酸片段。

将所提取的基因组 DNA 原液稀释后作为 PCR 扩增的模板。采用如下的 PCR 扩增体系和反应条件：

(1) PCR 反应体系：

PCR 反应体系	反应体积 (25 μ l)
模板 DNA	4 μ l
P1 正向引物(5 μ mol/ μ l)	1 μ l
P1 反向引物(5 μ mol/ μ l)	1 μ l
2 \times Taq PCR MasterMix	12.5 μ l
无菌 ddH ₂ O	6.5 μ l

(2) PCR 反应条件：

预变性 94 °C 5min 94 °C 7min

变性	94°C 30s	} 35 个循环
退火	50°C 1min	
延伸	72°C 2min	
再延伸	72°C 10min	
保存	4°C	

回收 PCR 特异扩增产物，与 T-easy 载体(Promega)连接后转化大肠杆菌 XL1 菌株（也可以使用其它商业化的感受态大肠杆菌），利用蓝白菌落和氨苄青霉素抗性挑选重组子，抽提纯化重组子质粒用于测序分析。得到测序结果，如下：

GTGGTTCTGGGTCCAGCATTTCGTGGCAGGGACGCCGCAGC
CAAAGCGTCTGGCCTGGTTGGTCTGACTGACAGGAGAGGATG
CTGTTCTCATCCTGCCTGTAACGTAGATCATCCAGAAATTTGT
GGCTGA (SEQ ID NO: 1)。

上面的序列中，斜体字母是内含子，对应引物。

所获 PCR 特异扩增产物序列经 DNASTar 软件分析，获知其编码蛋白序列、3'-非翻译区 (UTR) 序列。经序列分析比较，获得了本发明的 1 种新型 α 4/7-CTx LvIA/LvD21 的前体基因，即 SEQ ID NO: 1 中带下划线的部分，其为编码 LvIA/LvD21 芋螺毒素前肽的核苷酸序列，如下 (114aa)：

TTTCGTGGCAGGGACGCCGCAGCCAAAGCGTCTGGCCTG
GTTGGTCTGACTGACAGGAGAGGATGCTGTTCTCATCCTGCCT
GTAACGTAGATCATCCAGAAATTTGTGGCTGA (SEQ ID NO: 2)。

根据前体基因及芋螺毒素特点，推测出 LvIA/LvD21 芋螺毒素前肽，它具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列 (37aa)，下文中也称为 α -conotoxin LvIA/LvD21 precursor 或 α -LvIA/LvD21 precursor 或 LvIA/LvD21 precursor 或 LvIA 或 LvD21 precursor，如下：

FRGRDAAAKASGLVGLTDRRGCCSH PACNV DHPEICG (SEQ ID

NO: 3)。

芋螺毒素前体蛋白的信号肽、前肽以及成熟肽的预测，采用在线 ProP 1.0 Server 进行分析(Duckert, P.; Brunak, S.; Blom, N., Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 2004, 17 (1), 107-12.)。推断的方法和原理请参考 Luo S, Zhangsun D, Zhang B, Quan Y, Wu Y. Novel alpha-conotoxins identified by gene sequencing from cone snails native to Hainan, and their sequence diversity. *J Pept Sci.* 2006,12(11):693-704。推导过程和结果亦参见图 1。

根据前肽序列再推测出成熟肽 LvIA/LvD21, 它具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列(16aa; 下文中也称为 α -conotoxin LvIA/LvD21 或 α -LvIA/LvD21 或 LvIA/LvD21 或 LvIA 或 LvD21)：

GCCSHPACNVDHPEIC# (SEQ ID NO: 4; # 表示 C-末端酰胺化)。

LvIA/LvD21 含有 α -CTx 所特有的 CC-C-C 半胱氨酸模式，二硫键连接方式 I-III, II-IV (图 2A-B)，即在第一和第三个半胱氨酸之间，以及第二和第四个半胱氨酸之间分别形成两对二硫键。LvIA/LvD21 为 4/7 型 α -CTx (图 1 和图 2A-B)。

实际上，本发明的成熟肽 LvIA/LvD21 也可由前肽 (SEQ ID NO: 3 或 6) 在体内或体外经过相应的加工 (例如图 1 所示) 得到，可选地，在体内或体外通过酰胺化酶对其 C 末端进行酰胺化。

编码 LvIA/LvD21 成熟肽的核苷酸序列如下 (48 bp)：

GGATGCTGTTCTCATCCTGCCTGTAACGTAGATCATCCA
GAAATTTGT (SEQ ID NO: 5)。

本发明还涉及成熟肽在未经第二个加工位点 (processing 2) 的序列 (17aa)：

GCCSHPACNVDHPEIC G (SEQ ID NO: 6)；

其对应的核苷酸序列如下 (54bp)：

GGATGCTGTTCTCATCCTGCCTGTAACGTAGATCATCCA
GAAATTTGTGGCTGA (SEQ ID NO: 7); 或 51bp 的

GGATGCTGTTCTCATCCTGCCTGTAACGTAGATCATCCA
GAAATTTGTGGC (SEQ ID NO: 8)。

实施例 1-(2): α -芋螺毒素 TxIB/Txd4 基因的克隆和序列分析

1. 织锦芋螺基因组 DNA 的提取

分别以从海南岛、西沙群岛等沿海采集的织锦芋螺(*C. textile* Linnaeus)活体为材料, 储存在 -80°C 备用。先将芋螺毒腺解剖出来, 并称量。然后用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(购自中国北京天根生化科技有限公司), 提取毒腺的基因组 DNA, 具体操作参见试剂盒说明书。将提取的芋螺基因组总 DNA 溶于 $100\mu\text{L}$ TE 中, 取 $5\mu\text{L}$ 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 以 λ -EcoT14 I digest DNA Marker 为标准, 检测所得 DNA 的完整性和大小。用核酸蛋白质分析仪测定 DNA 溶液的 OD260、OD280 值以及 OD260/OD280 比值, 并计算 DNA 的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、纯度和 DNA 产率 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。所提取的完整 DNA 用于下一步 PCR 扩增进行芋螺毒素基因克隆的模板。

2. PCR 反应及其产物的克隆、测序、和序列分析

PCR 反应的方法、体系、条件、所用引物等参考实施例 1-(1), 除了模板为本实施例 1. 中所提取的基因组 DNA 原液稀释。

回收 PCR 特异扩增产物, 与 T-easy 载体(Promega)连接后转化大肠杆菌 XL1 菌株(也可以使用其它的商业化的感受态大肠杆菌细胞), 利用蓝白菌落和氨苄青霉素抗性挑选重组子, 抽提纯化重组子质粒用于测序分析, 得到 PCR 特异扩增产物的序列。

所获 PCR 特异扩增产物序列经 DNASTar 软件分析, 获知其编码蛋白序列、3' -非翻译区(UTR)序列。经序列分析, 获得了本发明的 1 种新型 α -CTx TxIB/Txd4 的前体基因(SEQ ID NO: 21)(图 10)。

芋螺毒素前体蛋白的信号肽、前肽以及成熟肽的预测, 采用在线

ProP 1.0 Server 进行分析(Duckert, P.; Brunak, S.; Blom, N., Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 2004, 17 (1), 107-12.)。

根据前体基因及芋螺毒素特点,推导出 TxIB/Txd4 芋螺毒素前肽,它具有 SEQ ID NO: 15 所示的含有 41 氨基酸的蛋白序列。

根据前肽序列再推导出成熟肽 TxIB/Txd4 或 TxIB/Txd4(G),它们分别具有 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列,推导的方法和原理请参考 Luo S, Zhangsun D, Zhang B, Quan Y, Wu Y. Novel alpha-conotoxins identified by gene sequencing from cone snails native to Hainan, and their sequence diversity. *J Pept Sci.* 2006,12(11):693-704, 以及在线软件 ProP 1.0 Server。

推导结果详见图 10。

成熟肽都具有 CC-C-C 的半胱氨酸模式。TxIB(G)的 C-末端只比 TxIB 多一个甘氨酸(G),是 TxIB 的类似物。TxIB/Txd4 或 TxIB/Txd4(G)含有 α -CTx 所特有的 CC-C-C 半胱氨酸模式,二硫键连接方式可以为 I-III, II-IV (图 11, A-B), 即在第一和第三个半胱氨酸之间, 以及第二和第四个半胱氨酸之间分别形成两对二硫键。TxIB/Txd4 和 TxIB/Txd4(G)为 4/7 型 α -CTx (图 10 和图 11)。

(1) SEQ ID NO: 11 (本文中也称为 α -conotoxin TxIB/Txd4 或 α -TxIB/Txd4 或 TxIB/Txd4 或 TxIB) 所示的氨基酸序列(成熟肽):

GCCSDPPCRNKHPDLC (SEQ ID NO: 11) (16aa)。

优选地, C-末端的半胱氨酸(C)是酰胺化的,即表示为 GCCSDPPCRNKHPDLC #, 其中#表示 C-末端酰胺化。

(2) SEQ ID NO: 12 (本文中也称为 α -conotoxin TxIB/Txd4(G) 或 α -TxIB/Txd4(G)或 TxIB/Txd4(G)或 TxIB(G)) 所示的氨基酸序列(成熟肽):

GCCSDPPCRNKHPDLC G (SEQ ID NO: 12) (17aa)。

优选地, C-末端的甘氨酸(G)是酰胺化的,即表示为

GCCSDPPCRNKHPDLC G #, 其中# 表示 C-末端酰胺化。

不拘于理论的限制, 没有酰胺化的 SEQ ID NO: 12 的 C-末端的甘氨酸(第 17 位)可以是酰胺化酶(在细胞内或细胞外)的识别位点, 从而导致与该甘氨酸紧邻的半胱氨酸(C, 第 16 位)的酰胺化, 这种情况下将得到酰胺化的 SEQ ID NO: 11(GCCSDPPCRNKHPDLC #)。

(3) SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列:

GCCSDPPCRNKHPDLC GG (SEQ ID NO: 13) (18aa)。

不拘于理论的限制, SEQ ID NO: 13 的第 18 位的甘氨酸可以是酰胺化酶(在细胞内或细胞外)的识别位点, 从而导致与该甘氨酸紧邻的 17 位的甘氨酸(G)的酰胺化, 这种情况下将得到酰胺化的 SEQ ID NO: 12(GCCSDPPCRNKHPDLC G #)。

或者,

SEQ ID NO: 13 的第 17 位的甘氨酸可以是酰胺化酶(在细胞内或细胞外)的识别位点, 从而导致与该甘氨酸紧邻的 16 位的半胱氨酸(C)的酰胺化, 这种情况下将得到酰胺化的 SEQ ID NO: 11(GCCSDPPCRNKHPDLC #)。

(4) SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列:

GCCSDPPCRNKHPDLC GGRR (SEQ ID NO: 14) (20aa)。

不拘于理论的限制, SEQ ID NO: 14 的第 18 位的甘氨酸可以是酰胺化酶(在细胞内或细胞外)的识别位点, 从而导致与该甘氨酸紧邻的 17 位的甘氨酸(G)的酰胺化, 这种情况下将得到酰胺化的 SEQ ID NO: 12(GCCSDPPCRNKHPDLC G #)。

或者,

SEQ ID NO: 14 的第 17 位的甘氨酸可以是酰胺化酶(在细胞内或细胞外)的识别位点, 从而导致与该甘氨酸紧邻的 16 位的半胱氨酸(C)的酰胺化, 这种情况下将得到酰胺化的 SEQ ID NO: 11(GCCSDPPCRNKHPDLC #)。

(5) SEQ ID NO: 15 (本文中也称为 α -conotoxin TxIB/Txd4

precursor 或 α -TxIB/Txd4 precursor 或 TxIB/Txd4 precursor 或 TxIB precursor) 所示的氨基酸序列 (前体肽):

FDGRNTSANNKATDLMALPVR GCCSDPPCRNKHPDLC GRR
(SEQ ID NO: 15) (41 aa).

(6) SEQ ID NO: 16 所示的核苷酸序列 (编码 TxIB/Txd4 成熟肽):

***GGATGCTGTTCCGATCCTCCCTGTAGAAACAAGCACCCA
GATCTTTGT*** (SEQ ID NO: 16) (48 bp)。

(7) SEQ ID NO: 17 所示的核苷酸序列 (编码 TxIB/Txd4 成熟肽或编码 TxIB (G) 成熟肽):

***GGATGCTGTTCCGATCCTCCCTGTAGAAACAAGCACCCA
GATCTTTGTGGC*** (SEQ ID NO: 17) (51 bp)。

(8) SEQ ID NO: 18 所示的核苷酸序列 (编码 TxIB/Txd4 成熟肽或编码 TxIB (G) 成熟肽):

***GGATGCTGTTCCGATCCTCCCTGTAGAAACAAGCACCCA
GATCTTTGTGGCGGA*** (SEQ ID NO: 18) (54 bp)。

(9) SEQ ID NO: 19 所示的核苷酸序列 (编码 TxIB/Txd4 成熟肽前体或编码 TxIB (G) 成熟肽前体):

***GGATGCTGTTCCGATCCTCCCTGTAGAAACAAGCACCCA
GATCTTTGTGGCGGAAGACGCTGA*** (SEQ ID NO: 19) (63 bp)。

(10) SEQ ID NO: 20 所示的核苷酸序列 (编码 TxIB/Txd4 或 TxIB (G) 前体蛋白序列):

***TTTGATGGCAGGAATACCTCAGCCAACAACAAAGCGACTG
ACCTGATGGCTCTGCCTGTCAGGGGATGCTGTTCCGATCCTCC
CTGTAGAAACAAGCACCCAGATCTTTGTGGCGGAAGACGCTG
A*** (SEQ ID NO: 20) (123 bp)。

(11) SEQ ID NO: 21 所示的核苷酸序列:

GTGGTTCTGGGTCCAGCATTGATGGCAGGAATACCTCAGC

CAACAACAAAGCGACTGACCTGATGGCTCTGCCTGTCAGGGG
ATGCTGTTCCGATCCTCCCTGTAGAAACAAGCACCCA
GATCTTTGTGGCGGAAGACGCTGATGCTCCAGGACCCTCTGA
ACCACGAC(斜体字母是内含子,对应引物)(SEQ ID NO: 21)(170
bp)。

实施例 1-(3): α -芋螺毒素 TxIC/Txd1 的基因克隆和序列分析

1. 织锦芋螺毒腺基因组 DNA 的提取

分别以从海南岛、西沙群岛等沿海采集的织锦芋螺(*C. textile* Linnaeus)活体为材料,储存在 -80°C 备用。先将芋螺毒腺解剖出来,并称重。然后用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(购自中国北京天根生化科技有限公司),提取毒腺的基因组 DNA,具体操作按照试剂盒说明书进行。得到毒腺的基因组 DNA。

将提取的毒腺基因组 DNA 溶于 $100\mu\text{L}$ TE 中,取 $5\mu\text{L}$ 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,以 λ -EcoT14 I digest DNA Marker 为标准,检测所得 DNA 的完整性和大小。用核酸蛋白质分析仪测定 DNA 溶液的 OD_{260} 、 OD_{280} 值以及 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值,并计算 DNA 的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、纯度和 DNA 产率($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

所提取的 DNA 作为进行芋螺毒素基因克隆的模板,用于下面的 PCR 扩增。

2. PCR 反应及其产物的克隆、测序、和序列分析

PCR 反应的方法、体系、条件、所用引物等参考实施例 1-(1),除了模板为本实施例 1.中所提取的基因组 DNA 原液稀释至终浓度为 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

取 $8\mu\text{L}$ 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 90V,电泳 20min,以 DL2000 DNA Marker 为标准,检测扩增产物的大小。

回收 PCR 扩增产物,与 T-easy 载体(Promega)连接后转化大肠杆菌 XL1 菌株(也可以使用其它商业化的感受态大肠杆菌),利用蓝白

菌落和氨苄青霉素抗性挑选重组子，抽提纯化重组子质粒用于测序分析。得到两个测序结果，即 SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23（图 14，168 bp），分别如下：

GTGGTTCTGGGTCCAGCATTGATGGCAGGAATGCTGCA
GGCAACGACAAAATGTCCGCCCTGATGGCTCTGACCACCAGG
GGATGCTGTTCCCATCCTGTCTGTAGCGCGATGAGTCCAATCT
GTGGCTGAAGACGCTGATGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGA
 CA（SEQ ID NO: 22）或，

GTGGTTCTGGGTCCAGCATTGATGGCAGGAATGCTGCA
GGCAACGACAAAATGTCCGCCCTGATGGCTCTGACCATCAGG
GGATGCTGTTCCCATCCTGTCTGTAGCGCGATGAGTCCAATCT
GTGGCTGAAGACGCTGATGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGA
 CA（SEQ ID NO: 23）。

上面的两个序列只有第 77 位的碱基不同，用加框标出。

所获的 PCR 扩增产物的测序结果经 DNASTar 软件分析，获知其编码蛋白序列、3'-非翻译区（UTR）序列。经序列分析比较，获得了本发明的新型 α 4/6-CTx TxIC/Txd1 的前体基因。即 SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 中带下划线的部分，其为编码 TxIC/Txd1 芋螺毒素前肽的核苷酸序列，如下（114aa）：

TTTGATGGCAGGAATGCTGCAGGCAACGACAAAATGTCC
GCCCTGATGGCTCTGACCACCAGGGGATGCTGTTCCCATCCT
GTCTGTAGCGCGATGAGTCCAATCTGTGGCTGA（SEQ ID NO:
 24）；

TTTGATGGCAGGAATGCTGCAGGCAACGACAAAATGTCC
GCCCTGATGGCTCTGACCATCAGGGGATGCTGTTCCCATCCT
GTCTGTAGCGCGATGAGTCCAATCTGTGGCTGA（SEQ ID NO:
 25）。

根据前体基因及芋螺毒素特点，推测出 TxIC/Txd1 芋螺毒素前肽，

它具有 SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列(37 aa), 下文中也称为 α -conotoxin TxIC/Txd1 precursor 或 α -TxIC/Txd1 precursor 或 TxIC/Txd1 precursor 或 TxIC precursor) :

FDGRNAAGNDKMSALMALTTR↓GCCSHPVCSAMSPIC G
(SEQ ID NO: 26) ;

FDGRNAAGNDKMSALMALTIR↓GCCSHPVCSAMSPIC G
(SEQ ID NO: 27) 。

芋螺毒素前体蛋白的信号肽、前肽以及成熟肽的预测, 采用在线 ProP 1.0 Server 进行分析(Duckert, P.; Brunak, S.; Blom, N., Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 2004, 17 (1), 107-12.) 。推断的方法和原理请参考 Luo S, Zhangsun D, Zhang B, Quan Y, Wu Y. Novel alpha-conotoxins identified by gene sequencing from cone snails native to Hainan, and their sequence diversity. *J Pept Sci.* 2006,12(11):693-704。推导过程和结果亦参见图 14。

根据前肽序列推测出成熟肽 TxIC/Txd1, 它具有 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列 (下文中也称为 α -conotoxin TxIC/Txd1 或 α -TxIC/Txd1 或 TxIC/Txd1 或 TxIC) :

GCCSHPVCSAMSPIC # (SEQ ID NO: 28, #表示 C 末端酰胺化, 15aa)

TxIC/Txd1 含有 α -CTx 所特有的 CC-C-C 半胱氨酸模式, 二硫键连接方式 I-III, II-IV (图 15A), 即在第一和第三个半胱氨酸之间, 以及第二和第四个半胱氨酸之间分别形成两对二硫键。TxIC/Txd1 为 4/6 型 α -CTx (图 14 和图 15A)。TxIC/Txd1 是新的 α -芋螺毒素, 与其它 α -CTx 的序列和活性比较见表 6。

实际上, 本发明的成熟肽 TxIC/Txd1 也可由前肽 (SEQ ID NO: 26 或 27 或 30) 在体内或体外经过相应的加工 (例如图 14 所示) 得到, 可选地, 在体内或体外通过酰胺化酶对其 C 末端进行酰胺化。

编码 TxIC/Txd1 成熟肽的核苷酸序列如下 (45 bp) :

GGATGCTGTTCCCATCCTGTCTGTAGCGCGATGAGTCCA
ATCTGT (SEQ ID NO: 29)。

本发明还涉及成熟肽在未经第二个加工位点 (processing 2) 的序列 (16aa) :

GCCSHPVCSAMSPIC G (SEQ ID NO: 30) ,

其对应的核苷酸序列如下 (51bp) :

GGATGCTGTTCCCATCCTGTCTGTAGCGCGATGAGTCCA
ATCTGTGGCTGA (SEQ ID NO: 31)。

实施例 2-(1): α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 的人工合成

根据 α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 成熟肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4, C 末端酰胺化), 采用 Fmoc 方法人工合成 LvIA/LvD21 线性肽 (图 2B)。具体方法如下:

树脂肽采用 Fmoc 化学方法进行人工合成, 可用多肽合成仪或手工合成法合成树脂肽。除了半胱氨酸外, 其余氨基酸用标准的侧链保护基团。LvIA/LvD21 的第 1 和第 3 个半胱氨酸 (Cys) 的 -SH 用 Trt (S-trityl) 保护, 第 2 和第 4 个半胱氨酸的 -SH 用 AcM (S-acetamidomethyl) 成对保护。其合成步骤为: 采用固相合成法中的 Fmoc 与 FastMoc 方法, 在 ABI Prism 433a 多肽合成仪上合成了 3 个异构体线性肽。Fmoc 氨基酸的侧链保护基为: Pmc (Arg)、Trt (Cys)、But (Thr、Ser、Tyr)、OBut (Asp)、Boc (Lys)。采用 Fmoc HOBT DCC 方法, Rink 酰胺化树脂及 Fmoc 氨基酸, 合成步骤参考仪器合成手册进行。为反应完全, 在哌啶脱保护及偶合时间上分别适当延长, 对难接氨基酸采用双偶合, 获得树脂肽。用 reagent K (trifluoroacetic acid / water / ethanedithiol / phenol / thioanisole; 90 : 5 : 2.5 : 7.5 : 5, v / v / v / v / v) 将线性肽从树脂上切割下来, 并用冰乙醚沉淀和洗涤回收线性肽粗品, 用制备型反向 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化, 洗脱线性梯

度为在 0 - 40min 内 0 - 40 % B90, 第 40 - 45 min 40 - 100 % B90. 溶剂 B90 是 90 % ACN (acetonitrile), 10 % H₂O, 0.05 % TFA (trifluoroacetic acid); 溶剂 A 是 0.075 % TFA 的水溶液。紫外吸收值分析在 214nm 波长下进行。纯化后的线性肽用分析型的 HPLC C18 柱 (Vydac) 进行纯度检测 (图 2C), HPLC 色谱分析条件与制备纯化所用条件相同, 流速为 0.75ml/min, α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 线性肽的出峰时间为 27.713min。

参照文献 (Dowell, C.; Olivera, B. M.; Garrett, J. E.; Staheli, S. T.; Watkins, M.; Kuryatov, A.; Yoshikami, D.; Lindstrom, J. M.; McIntosh, J. M., Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of neuroscience* 2003, 23 (24), 8445-52.) 对 LvIA/LvD21 的线性肽进行两步氧化折叠反应, 过程简述如下:

首先通过铁氰化钾氧化法 (20 mM potassium ferricyanide, 0.1 M Tris, pH 7.5, 30 min) 在 Trt 保护基团的两个半胱氨酸之间形成第一对二硫键。单环肽经反相 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化后, 进行碘氧化 (10 mM iodine in H₂O:trifluoroacetic acid:acetonitrile (78:2:20 by volume, 10 min), 移去另外 2 个半胱氨酸上的 Acm, 同时在这 2 个半胱氨酸之间形成第二对二硫键(图 2B)。二环肽再经反相 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化, 即获得按照从 N 端至 C 端的顺序在相应的半胱氨酸之间定向形成二硫键的 α -芋螺毒素, LvIA/LvD21 的出峰时间为 27.947 min (图 2D), 并通过质谱(MS)鉴定为正确。HPLC 色谱分析条件为: 用 Vydac C18 HPLC 反相分析柱, 在 40 分钟内进行线性梯度洗脱, B 液从 0-40 %, A 液从 100 % 到 60 %, A 液是 0.075 % 的三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA), B 是 0.05 % TFA 与 90 % 乙腈 (acetonitrile) 的水溶液, 流速为 0.75ml/min。紫外分析波长为 214nm。

氧化折叠后的 LvIA/LvD21 的理论分子量(monoisotopic mass)与测

定分子量一致: LvIA/LvD21 的理论分子量为 1678.91 Da, LvIA/LvD21 的测定分子量为 1678.7977 Da, 比它的线性肽分子量 1682.91 Da 减少 4 Da。多肽浓度用 280nm 波长下比色测定, 根据 Beer-Lambert 方程 (equation) 计算多肽浓度和质量。这些定量过的折叠好的毒素肽用于下面实施例中的活性实验。

实施例 2-(2): α -芋螺毒素 TxIB 与 TxIB (G) 的人工合成

根据 α -芋螺毒素 TxIB 与 TxIB (G) 成熟肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 11 和 12, C-末端均酰胺化), 采用 Fmoc 方法人工合成 TxIB 与 TxIB (G) 线性肽 (图 11)。具体方法如下:

树脂肽采用 Fmoc 化学方法进行人工合成, 可用多肽合成仪或手工合成法合成树脂肽。除了半胱氨酸外, 其余氨基酸用标准的侧链保护基团。TxIB 与 TxIB (G) 的第 1 和第 3 个半胱氨酸 (Cys) 的-SH 用 Trt (S-trityl) 保护, 第 2 和第 4 个半胱氨酸的-SH 用 AcM (S-acetamidomethyl) 成对保护。其合成步骤为: 采用固相合成法中的 Fmoc 与 FastMoc 方法, 在 ABI Prism 433a 多肽合成仪上合成了 3 个异构体线性肽。Fmoc 氨基酸的侧链保护基为: Pmc (Arg)、Trt(Cys)、But (Thr、Ser、Tyr)、OBut (Asp)、Boc (Lys)。采用 Fmoc HOBT DCC 方法, Rink 酰胺化树脂及 Fmoc 氨基酸, 合成步骤参考仪器合成手册进行。为反应完全, 在哌啶脱保护及偶合时间上分别适当延长, 对难接氨基酸采用双偶合, 获得树脂肽。用 reagent K (trifluoroacetic acid / water / ethanedithiol / phenol / thioanisole; 90 : 5 : 2.5 : 7.5 : 5, v / v / v / v / v) 将线性肽从树脂上切割下来, 并用冰乙醚沉淀和洗涤回收线性肽粗品, 用制备型反向 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化, 洗脱线性梯度为在 0-40min 内 2-42% B60, 42-47 min 42-100% B60。溶剂 B60 是 60% ACN (acetonitrile), 40% H₂O, 0.05% TFA (trifluoroacetic acid); 溶剂 A 是 0.05% TFA 的水溶液。

纯化后的线性肽用分析型的 HPLC C18 柱 (Vydac) 进行纯度检

测，洗脱梯度为 0 - 40 min 2 - 42% B60, 42-47 min 42 - 100% B60, 流速为 1 mL/min。其纯度达 95 %以上，用于氧化折叠。

参照文献 (Dowell, C.; Olivera, B. M.; Garrett, J. E.; Staheli, S. T.; Watkins, M.; Kuryatov, A.; Yoshikami, D.; Lindstrom, J. M.; McIntosh, J. M., Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of neuroscience* 2003, 23 (24), 8445-52.) 对 TxIB 与 TxIB (G) 的线性肽进行两步氧化折叠反应，过程简述如下：

首先通过铁氰化钾氧化法 (20 mM potassium ferricyanide, 0.1 M Tris, pH 7.5, 30 min) 在 Trt 保护基团的两个半胱氨酸之间形成第一对二硫键。单环肽经反相 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化后，进行碘氧化 (10 mM iodine in H₂O:trifluoroacetic acid:acetonitrile (78:2:20 by volume, 10 min)，移去另外 2 个半胱氨酸上的 AcM，同时在这 2 个半胱氨酸之间形成第二对二硫键。二环肽再经反相 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化，即获得按照从 N 端至 C 端的顺序在相应的半胱氨酸之间定向形成二硫键的 α -芋螺毒素，并通过质谱 (MS) 鉴定为正确。

氧化折叠后的 TxIB 与 TxIB (G) 的理论分子量 (monoisotopic mass) 与测定分子量一致：TxIB 的理论分子量为 1738.7 Da, TxIB 的测定分子量为 1738.6 Da; TxIB (G) 的理论分子量为 1795.7 Da; TxIB (G) 的测定分子量为 1795.6 Da。多肽浓度用 280nm 波长下比色测定，根据 Beer-Lambert 方程 (equation) 计算多肽浓度和质量。这些定量过的折叠好的毒素肽用于后续的活性实验。

实施例 2-(3): α -芋螺毒素 TxIC 的人工合成

根据 α -芋螺毒素 TxIC 成熟肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 28, C 末端酰胺化)，采用 Fmoc 方法人工合成 TxIC 线性肽 (图 15A)。具体方法如下：

树脂肽采用 Fmoc 化学方法进行人工合成，可用多肽合成仪或手

工合成法合成树脂肽。除了半胱氨酸外，其余氨基酸用标准的侧链保护基团。TxIC 的第 1 和第 3 个半胱氨酸 (Cys) 的-SH 用 Trt (S-trityl) 保护，第 2 和第 4 个半胱氨酸的-SH 用 AcM (S-acetamidomethyl) 成对保护。其合成步骤为：采用固相合成法中的 Fmoc 与 FastMoc 方法，在 ABI Prism 433a 多肽合成仪上合成了 3 个异构体线性肽。Fmoc 氨基酸的侧链保护基为：Pmc (Arg)、Trt(Cys)、But (Thr、Ser、Tyr)、OBut (Asp)、Boc (Lys)。采用 Fmoc HOBT DCC 方法，Rink 酰胺化树脂及 Fmoc 氨基酸，合成步骤参考仪器合成手册进行。为反应完全，在哌啶脱保护及偶合时间上分别适当延长，对难接氨基酸采用双偶合，获得树脂肽。用 reagent K (trifluoroacetic acid / water / ethanedithiol / phenol / thioanisole; 90 : 5 : 2.5 : 7.5 : 5, v / v / v / v / v) 将线性肽从树脂上切割下来，并用冰乙醚沉淀和洗涤回收线性肽粗品，用制备型反向 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化，洗脱线性梯度为在 0 - 40min 内 15 - 50% B90，第 40 - 45 min 50 - 100% B90。溶剂 B90 是 90% ACN (acetonitrile)，10 % H₂O，0.5% TFA (trifluoroacetic acid)；溶剂 A 是 0.65% TFA 的水溶液。

紫外吸收值分析在 214nm 波长下进行。纯化后的线性肽用分析型的 HPLC C18 柱 (Vydac) 进行纯度检测，洗脱梯度为 0-40 min 2-42% B60，42 - 47 min 42-100% B60，流速为 1 mL/min。其纯度达 95 % 以上，用于氧化折叠。

参照文献 (Dowell, C.; Olivera, B. M.; Garrett, J. E.; Staheli, S. T.; Watkins, M.; Kuryatov, A.; Yoshikami, D.; Lindstrom, J. M.; McIntosh, J. M., Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of neuroscience* 2003, 23 (24), 8445-52.) 对 TxIC 的线性肽进行两步氧化折叠反应，过程简述如下：

首先通过铁氰化钾氧化法 (20 mM potassium ferricyanide, 0.1 M Tris, pH 7.5, 30 min) 在 Trt 保护基团的两个半胱氨酸之间形成第

一对二硫键。单环肽经反相 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化后, 进行碘氧化 (10 mM iodine in H₂O:trifluoroacetic acid:acetonitrile (78:2:20 by volume, 10 min), 移去另外 2 个半胱氨酸上的 AcM, 同时在这 2 个半胱氨酸之间形成第二对二硫键。二环肽再经反相 HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化, 洗脱线性梯度仍为在 0 - 40min 内 15-50% B90, 第 40 - 45 min 50 - 100% B90. 溶剂 B90 是 90% ACN (acetonitrile), 10 % H₂O, 0.5% TFA (trifluoroacetic acid); 溶剂 A 是 0.65% TFA 的水溶液。紫外吸收值分析在 214nm 波长下进行。即获得按照从 N 端至 C 端的顺序在相应的半胱氨酸之间定向形成二硫键的 α -芋螺毒素, TxIC 的出峰时间为 23.366min (图 15B), 并通过质谱(MS)鉴定为正确。

氧化折叠后的 TxIC 的理论分子量(monoisotopic mass)与测定分子量一致: TxIC 的理论分子量为 1488.81 Da, TxIC 的测定分子量为 1488.4266 Da, 比它的线性肽分子量 1492.815 Da 减少 4 Da。多肽浓度用 280nm 波长下比色测定, 根据 Beer-Lambert 方程 (equation) 计算多肽浓度和质量。这些定量过的折叠好的毒素肽用于下面实施例中的活性实验。

实施例 3-(1): α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 阻断各种 nAChRs 的实验
参照文献 (Azam L, Yoshikami D, McIntosh JM. Amino acid residues that confer high selectivity of the α 6 nicotinic acetylcholine receptor subunit to α -conotoxin MII[S4A,E11A,L15A]. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11625-32.) 中的方法, 以及体外转录试剂盒 (mMessage mMachine in vitro transcription kit (Ambion, Austin, TX)) 说明书, 制备各种大鼠神经型 nAChRs 亚型 (α 3 β 2, α 6/ α 3 β 2 β 3, α 6/ α 3 β 4, α 9 α 10, α 4 β 2, α 4 β 4, α 3 β 4, α 2 β 2, α 2 β 4, α 7)、人类 α 3 β 2, α 6/ α 3 β 2 β 3, α 3 β 4、以及小鼠肌肉型 nAChRs (α 1 β 1 δ ϵ) 的 cRNA, 其浓度用 UV 260 nm 下的 OD 值进行测算。解

剖收集非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞 (蛙卵), 将 cRNA 注射入蛙卵中, 每个亚基的注射量为 5ng cRNA。肌肉 nAChR 每个亚基注射 0.5 - 2.5 ng DNA。蛙卵在 ND-96 中培养。蛙卵收集后的 1 - 2 天内注射 cRNA, 注射后 1 - 4 天内用于 nAChRs 的电压钳记录。

将 1 个注射过 cRNA 的蛙卵置于 30 μ L 的 Sylgard 记录槽中 (直径 4mm \times 深度 2mm), 重力灌注含有 0.1 mg/ml BSA (bovine serum albumin) 的 ND96 灌流液 (96.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.1 - 7.5) 或含有 1 mM atropine 的 ND96 (ND96A), 流速为 1ml/min。所有的芋螺毒素溶液也含有 0.1 mg/ml BSA 以减少毒素的非特异性吸附, 用转换阀 (SmartValve, Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, CA) 可以在灌注毒素或乙酰胆碱 (ACh) 之间进行自由切换, 以及一系列三通螺线阀 (solenoid valves, model 161TO31, Neptune Research, Northboro, MA) 使灌注 ND96 与 ACh 等之间进行自由切换。ACh 门控的电流由双电极电压箱放大器 (model OC-725B, Warner Instrument Corp., Hamden, CT) 设置在“慢”箱, 以及 clamp gain 在最大值 ($\times 2000$) 位置时进行在线记录。用 1mm 外径 \times 0.75 内径 mm 的玻璃毛细管 (fiber-filled borosilicate capillaries, WPI Inc., Sarasota, FL) 拉制玻璃电极, 并充满 3 M KCl 作为电压和电流电极。膜电压箝制在 -70mV。整个系统均由电脑控制和记录数据。ACh 脉冲为每隔 5min 自动灌注 1s 的 ACh。ACh 的浓度分别为, 表达肌肉型的 nAChRs 和神经型 $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs 卵为 10 μ M; 表达神经型的 nAChRs 之 $\alpha 7$ 为 200 μ M, 其它的亚型都为 100 μ M。至少记录 4 个卵表达某个亚型对不同毒素浓度的电流反应情况, 以及电流轨迹。

测试的电流数据用 GraphPad Prism 软件 (San Diego, CA) 进行统计分析, 绘制剂量反应曲线, 计算芋螺毒素的半阻滞浓度 IC₅₀ 等多种有关毒素阻断 nAChRs 的各种参数。

结果表明, LvIA/LvD21 (实施例 2-(1) 制备) 对大鼠 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs

等有阻断作用，且洗脱较快（图 3）。LvIA/LvD21 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的阻断活性最强，其半阻断剂量 IC_{50} 仅为 8.69 nM，误差范围为 6.9 - 11.0 n（表 1）。100 nM α -LvIA/LvD21 完全阻断了由 Ach 门控的大鼠 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 开放产生的电流，2 min 内可洗脱完全，其阻断是可逆的（图 3A）。LvIA/LvD21 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChRs 的阻断活性次之，其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围为 120.9 (86.1-169.8) nM；再次为 $\alpha 3\beta 4$ ，其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围为 148.4 (103.2-213.2) nM。LvIA/LvD21 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChRs 的阻断活性很微弱，其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围为 852(590-1230) nM；对 $\alpha 7$ 、 $\alpha 2\beta 4$ 有极其微弱的阻断活性，其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围分别高达为 3000 (1797-4997) nM 与 15520 (11600-20770) nM。对其它亚型没有阻断活性，包括 $\alpha 9\alpha 10$ 、 $\alpha 2\beta 2$ 、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 4\beta 4$ 与 $M\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ，其 $IC_{50} > 10\mu M$ （表 1）。LvIA/LvD21 对各种 nAChRs 亚型的剂量反应曲线分别如图 3B、3C、3D 所示。

相比之下， α -LvIA/LvD21 阻断 $\alpha 3\beta 2$ 比阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 的活性 > 100 倍，在大鼠上高达 ~ 100 倍，在人类上更是高达 ~ 305 倍（图 3B，3D，表 1）。 α -LvIA/LvD21 是至今发现的第一个对 $\alpha 3\beta 2$ vs. $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 的选择性和区分度最好的配体。以前发现的所有阻断 $\alpha 3\beta 2$ 的芋螺毒素几乎都同时阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChRs。因而， α -LvIA/LvD21 是我们发现的一个真正的 $\alpha 3\beta 2^*$ vs. $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs 高选择性新阻断剂，对于综合研究理解该亚型在正常和疾病状态下的功能和意义具有非常重要的价值。

α -LvIA/LvD21 选择性阻断对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的阻断选择性高。

从 100 nM α -LvIA/LvD21 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs（图 4A），以及 10 μM α -LvIA/LvD21 对其接近的 $\alpha 2\beta 2$ （图 4B）和 $M\alpha 1\beta 1\delta\epsilon\alpha 7$ （图 4C）nAChRs 的电流影响情况可以看出（图 4），100 nM α -LvIA/LvD21 完全阻断 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs（图 4A），而比之高 100 倍浓度的毒素对 $\alpha 2\beta 2$ ，与 $M\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ nAChRs 亚型没有阻断活性（图 4B-C）。

因此， α -LvIA/LvD21 是本发明人发现的，对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 活性很强的新型 α -芋螺毒素，是第一个对 $\alpha 3\beta 2$ vs. $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 的选择性和区分度最好的配体。

表 1: α -LvIA/LvD21 对各种 nAChRs 亚型的 IC_{50} 和剂量反应曲线斜率

Subtypes 受体 亚型	IC_{50} (nM) ^a 半阻断剂 量 ^a	Ratio ^b 比 例 ^b	Hill slope ^a 剂量反应曲线斜 率 ^a
$\alpha 3\beta 2$	8.69 (6.9-11.0)	1	1.17 (0.88-1.46)
$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$	120.9 (86.1-169.8)	14	0.94 (0.66-1.22)
$\alpha 3\beta 4$	148.4 (103.2-213.2)	17	1.14 (0.72-1.55)
$\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$	852(590-1230)	98	0.60(0.48-0.72)
$\alpha 7$	3000 (1797-4997)	345	0.65 (0.43-0.87)
$\alpha 2\beta 4$	15520 (11600-20770)	1786	1.13 (0.78-1.48)
$\alpha 9\alpha 10$	>10000	-	-
$\alpha 2\beta 2$	>10000	-	-
$\alpha 4\beta 2$	>10000	-	-
$\alpha 4\beta 4$	>10000	-	-
M $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$	>10000	-	-
H $\alpha 3\beta 2$	17.5 (16.6-21.6)	1 ^c	0.81 (0.44 – 1.18)
H $\alpha 6/3\beta 2\beta 3$	5342 (1763 – 8921)	305 ^c	0.85 (0.55-1.15)

a Numbers in parentheses are 95% confidence intervals; 表中a是置信度为95%的区间。

b nAChR subtype IC_{50} / $\alpha 3\beta 2$ IC_{50} ; b 是其它亚型与 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 半阻断剂量 (IC_{50}) 的比值。

c nAChR subtype IC_{50} / Human $\alpha 3\beta 2$ IC_{50} ; c 是人类 $\alpha 6/3\beta 2\beta 3$ 亚型与人类 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 半阻断剂量

(IC50) 的比值。

“M” denotes mouse subunits used, “H” denotes human subunits used. “M” 代表小鼠, “H” 代表人类。

已有研究表明, $\alpha 3\beta 2$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 与 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 是治疗神经精神疾病, 如神经痛、成瘾、帕金森病、痴呆、精神分裂症、抑郁、恐惧等的药物作用靶点 (参见背景技术中的相关文献)。因此, 本发明的新的 α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 在上述疾病的机理研究、诊断、治疗方面具有极高的应用潜力。

实施例 3-(2): α -芋螺毒素 TxIB 与 TxIB (G) 特异阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChRs 实验

参照文献 (Azam L, Yoshikami D, McIntosh JM. Amino acid residues that confer high selectivity of the $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunit to α -conotoxin MII[S4A,E11A,L15A]. J Biol Chem. 2008;283(17):11625-32.) 中的方法, 以及体外转录试剂盒 (mMessage mMachin in vitro transcription kit (Ambion, Austin, TX)) 说明书, 制备各种大鼠神经型 nAChRs 亚型, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ (即 $\alpha 6\beta 2^*$ -nAChRs), $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$, $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 7$)、人类 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 、以及小鼠肌肉型 nAChRs ($\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$) 的 cRNA, 其浓度用 UV 260 nm 下的 OD 值进行测算。解剖收集非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞 (蛙卵), 将 cRNA 注射入蛙卵中, 每个亚基的注射量为 5 ng cRNA。肌肉 nAChR 每个亚基注射 0.5-2.5 ng DNA。蛙卵在 ND-96 中培养。蛙卵收集后的 1-2 天内注射 cRNA, 注射后 1-4 天内用于 nAChRs 的电压钳记录。

将 1 个注射过 cRNA 的蛙卵置于 30 μ L 的 Sylgard 记录槽中 (直径 4mm \times 深度 2mm), 重力灌注含有 0.1 mg/ml BSA (bovine serum

albumin)的 ND96 灌流液 (96.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.1-7.5) 或含有 1 mM atropine 的 ND96 (ND96A), 流速为 1ml/min。所有的芋螺毒素溶液也含有 0.1 mg/ml BSA 以减少毒素的非特异性吸附, 用转换阀 (SmartValve, Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, CA)可以在灌注毒素或乙酰胆碱(ACh)之间进行自由切换, 以及一系列三通螺线阀 (solenoid valves, model 161TO31, Neptune Research, Northboro, MA) 使灌注 ND96 与 ACh 等之间进行自由切换。ACh 门控的电流由双电极电压箱放大器 (model OC-725B, Warner Instrument Corp., Hamden, CT) 设置在“慢”箱, 以及 clamp gain 在最大值 ($\times 2000$) 位置时进行在线记录。用 1mm 外径 \times 0.75 内径 mm 的玻璃毛细管 (fiber-filled borosilicate capillaries, WPI Inc., Sarasota, FL) 拉制玻璃电极, 并充满 3 M KCl 作为电压和电流电极。膜电压箱制在 -70mV。整个系统均由电脑控制和记录数据。ACh 脉冲为每隔 5min 自动灌注 1s 的 ACh。ACh 的浓度分别为, 表达肌肉型的 nAChRs 和神经型 $\alpha 9 \alpha 10$ nAChRs 卵为 10 μ M; 表达神经型的 nAChRs 之 $\alpha 7$ 为 200 μ M, 其它的亚型都为 100 μ M。至少记录 4 个卵表达某个亚型对不同毒素浓度的电流反应情况, 以及电流轨迹。

测试的电流数据用 GraphPad Prism 软件 (San Diego, CA) 进行统计分析, 绘制剂量反应曲线, 计算芋螺毒素的半阻滞浓度 IC₅₀ 等多种有关毒素阻断 nAChRs 的各种参数。

结果表明, α -TxIB 和 TxIB (G) (实施例 2-(2)制备) 对大鼠 $\alpha 6 / \alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChR 均有特异阻断作用, 洗脱都很快 (图 12)。1 μ M α -TxIB/Txd4 几乎完全阻断了由 ACh 门控的大鼠 $\alpha 6 / \alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChR 开放产生的电流, 洗脱很快, 阻断是可逆的 (图 12A)。相比之下, α -TxIB 比 TxIB (G) 的活性要强 8.7 倍 (图 12B), 它们对 $\alpha 6 / \alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChRs 的半阻断剂量 IC₅₀ 和误差范围分别为 α -TxIB, 28.4 (18.6-43.4) nM; α -TxIB (G), 247.4 (186.2-328.8) nM。它们的剂

量反应曲线的斜率 (Hillslope) 和误差范围分别为 α -TxIB, 0.51 (0.41-0.60) 和 α -TxIB (G), 0.78 (0.63-0.93). 因此, α -TxIB 和 TxIB (G) 对其它 nAChRs 亚型没有阻断活性, 其 $IC_{50} > 10 \mu M$ (图 12C, 表 2)。

表 2: α -TxIB 与 TxIB(G)对各种 nAChRs 亚型的半阻断剂量 IC_{50} 和剂量反应曲线的斜率

多肽	亚型	IC_{50} (nM) ^a	比值 ^b	斜率 ^a
TxIB	$\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$	28.41 (18.6-43.4)	1	0.51 (0.41-0.60)
TxIB(G)	$\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$	247.4 (186.2-328.8)	8.7	0.78 (0.63-0.93)
TxIB TxIB(G)	$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$	>10000 ^c	--	--
	$\alpha 7$	>10000	--	--
	$\alpha 9\alpha 10$	>10000	--	--
	$M\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$	>10000	--	--
	$\alpha 2\beta 2$	>10000	--	--
	$\alpha 2\beta 4$	>10000	--	--
	$\alpha 3\beta 2$	>10000	--	--
	$\alpha 3\beta 4$	>10000	--	--
	$\alpha 4\beta 2$	>10000	--	--
	$\alpha 4\beta 4$	>10000	--	--

表 2 中 a 是置信度为 95%的区间。b 是 TxIB(G)与 TxIB 半阻断剂量 (IC_{50}) 的比值。c 是在 $10 \mu M$ 下没有阻断活性。

α -TxIB/Txd4 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR 的阻断选择性特高。从 $1 \mu M$ α -TxIB/Txd4 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR, 以及 $10 \mu M$ α -TxIB/Txd4 对其非常接近的 $\alpha 3\beta 2$ (B), $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (C), $\alpha 3\beta 4$ (D) nAChRs 的电流影响情况可以看出 (图 13), $1 \mu M$ α -TxIB/Txd4 特异阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nAChR (图 13A), 而比之高 10 倍浓度的毒素

对 $\alpha 3 \beta 2$ (图 13B), $\alpha 6/\alpha 3 \beta 4$ (图 13C), 与 $\alpha 3 \beta 4$ (图 13D) nAChRs 亚型没有任何阻断活性。对人类 $\alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChR, α -TxIB 和 TxIB (G) 具有与大鼠 $\alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChR 相似的阻断活性。因此, α -TxIB 是目前发现的, 对 $\alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChR 选择性最好的 α -芋螺毒素, 其活性比较见下面的表 3。

已有的研究表明, $\alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3$ nAChR 是治疗神经精神疾病, 如烟碱、吗啡与可卡因等的成瘾、帕金森病、痴呆、精神分裂症、抑郁等的药物作用靶点 (参见背景技术中的文献)。因此, 本发明的新 α -芋螺毒素 TxIB/Txd4 和 TxIB (G) 在上述疾病的机理研究、诊断、治疗方面具有极高的应用价值。

TxIB/Txd4 和 TxIB/Txd4(G)与其它 α -CTx 的序列和活性比较见表 3。

表 3: α -TxIB 与其它 α -芋螺毒素前体蛋白序列及其活性比较

多肽 (超家族)	物种	前体肽(肽原)序列		nAChRs 选择性
		信号肽, N-末端前肽区 (pro-regions) ↓	成熟肽 (* , C-末端酰胺化)	
TxIB ($\alpha 4/7$)	<i>C. textile</i>	FDGRNTSANNKATDLMALPVR↓	GCCSDPPCRNKHPDLC RR	$\alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3$ ($\alpha 6 \beta 2^*$ -nAChRs)
TxIA($\alpha 4/7$)	<i>C. textile</i>	MFTVFLVVLATAVVS FTSDRASDDGKAAASDLITLIK↓	GCCSRPPCIANNPDLC *G	$\alpha 3 \beta 2 > \alpha 7$
MII ($\alpha 4/7$)	<i>C. magus</i>	MGMRMMFTVFLVVLATTVVSF PSDRASDGRNAAANDKASDVITL ALK↓	GCCSNPVCHLEHSNL C*GRRR	$\alpha 3 \beta 2 > \alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3 > \alpha 7$
LtIA ($\alpha 4/7$)	<i>C. litteratus</i>	MGMRMMFIMFMLVVLATTVVV FTSDRALDAMNAAASNKASRLIA LAVR↓	GCCARAACAGIHQEL C*GGGR	$\alpha 3 \beta 2 > \alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3$
PIA ($\alpha 4/7$)	<i>C. purpurascens</i>	MFTVFLVVLATTVGSFTLDRAS DGRDAAANDKATDLIALTAR↓	RDPCCSNPVCTVHNP QIC*G	$\alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3 > \alpha 6/\alpha 3 \beta 4 > \alpha 3 \beta 2 > \alpha 3 \beta 4$
GIC ($\alpha 4/7$)	<i>C. geographus</i>	SDGRNDAAKAFDLISSTVKK ↓	GCCSHPACAGNNOHI C*GRRR	$\alpha 3 \beta 2 > \alpha 4 \beta 2 > \alpha 3 \beta 4$
PnIB ($\alpha 4/7$)	<i>C. pennaceus</i>	MGMRMMFTVFLVVLATTVVSF TSDRASDDGNAAASDLIALTIK↓	GCCSLPPCALSNPDY C*G	$\alpha 7 > \alpha 3 \beta 2$
SrIA/SrIB ($\alpha 4/7$)	<i>C. spurius</i>	MGMRMMFTVFLVVLATTVVSF TSDSAFDSRNVAANDKVSDMIAL TAR↓	RTCCSRPTCRMEYPE LCG*GRR	Muscle nAChR / $\alpha 4 \beta 2$
Vel.1 ($\alpha 4/7$)	<i>C. victoriae</i>	MGMRMMFTVFLVVLATTVVS TSGR REFRGRNAAAKASDLVSLTDKKR ↓	GCCSDPRCNYDHPEI C*G	$\alpha 9 \alpha 10 >> \alpha 6/\alpha 3 \beta 2 \beta 3 > \alpha 6/\alpha 3 \beta 4 > \alpha 3 \beta 4 \sim \alpha 3 \beta 2$
AuIB ($\alpha 4/6$)	<i>C. aulicus</i>	MFTVFLVVLATTVVSFTSDRA	GCCSYPPCFATNPD-C	$\alpha 3 \beta 4 > \alpha 3 \beta 2$

		SDGRKDAASGLIALTMK↓	*GRRR	
Bu1A (α4/4)	<i>C. bullatus</i>	MFTVFLLVLTITTVVSFPSDRAS DGRNAAANDKASDVVTLVVK↓	GCCSTPPCAVLY---C* GRRR	α6/α3β2β3>α6/α3β4> α3β2> α3β4
Rg1A (α4/3)	<i>C. regius</i>	SNKRKNAAMLDMIAQHAIR↓	GCCSDPRCRYR---CR	α9α10
Ac1.1a (α3/5)	<i>C. achatinus</i>	MGMRRMFTLFLLVLTITTVVSY PSDSASDGRDDEAKDERSDMYEL KR	NGRCC-HPACGKHFN ---C*GR	Muscle nAChR

表中星号 (*) 表示 C 末端酰胺化。短线 (-) 表示缺口。

实施例 3-(3): α-芋螺毒素 TxIC 特异阻断 α3β4 和 α6/α3β4 nAChRs 实验

参照文献 (Azam L, Yoshikami D, McIntosh JM. Amino acid residues that confer high selectivity of the alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunit to alpha-conotoxin MII[S4A,E11A,L15A]. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11625-32.) 中的方法, 以及体外转录试剂盒 (mMessage mMachine in vitro transcription kit (Ambion, Austin, TX)) 说明书, 制备各种大鼠神经型 nAChRs 亚型 (α3β4, α6/α3β4, α9α10, α4β2, α4β4, α3β4, α2β2, α2β4, α7)、人类 α3β4、以及小鼠肌肉型 nAChRs (α1β1δε) 的 cRNA, 其浓度用 UV 260 nm 下的 OD 值进行测算。解剖收集非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞 (蛙卵), 将 cRNA 注射入蛙卵中, 每个亚基的注射量为 5ng cRNA。肌肉 nAChR 每个亚基注射 0.5 - 2.5 ng DNA。蛙卵在 ND-96 中培养。蛙卵收集后的 1 - 2 天内注射 cRNA, 注射后 1 - 4 天内用于 nAChRs 的电压钳记录。

将 1 个注射过 cRNA 的蛙卵置于 30uL 的 Sylgard 记录槽中 (直径 4mm×深度 2mm), 重力灌注含有 0.1 mg/ml BSA (bovine serum albumin) 的 ND96 灌流液 (96.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.1 - 7.5) 或含有 1 mM atropine 的 ND96 (ND96A), 流速为 1ml/min。所有的芋螺毒素溶液也含有 0.1 mg/ml BSA 以减少毒素的非特异性吸附, 用转换阀 (SmartValve, Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, CA) 可以在灌注毒素或乙酰

胆碱(ACh)之间进行自由切换,以及一系列三通螺线阀(solenoid valves, model 161TO31, Neptune Research, Northboro, MA)使灌注 ND96 与 ACh 等之间进行自由切换。ACh 门控的电流由双电极电压箝放大器(model OC-725B, Warner Instrument Corp., Hamden, CT)设置在“慢”箝,以及 clamp gain 在最大值($\times 2000$)位置时进行在线记录。用 1mm 外径 \times 0.75 内径 mm 的玻璃毛细管(fiber-filled borosilicate capillaries, WPI Inc., Sarasota, FL)拉制玻璃电极,并充满 3 M KCl 作为电压和电流电极。膜电压箝制在-70mV.整个系统均由电脑控制和记录数据。ACh 脉冲为每隔 5min 自动灌注 1s 的 ACh。ACh 的浓度分别为,表达肌肉型的 nAChRs 和神经型 $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs 卵为 $10\mu\text{M}$; 表达神经型的 nAChRs 之 $\alpha 7$ 为 $200\mu\text{M}$,其它的亚型都为 $100\mu\text{M}$ 。至少记录 4 个卵表达某个亚型对不同毒素浓度的电流反应情况,以及电流轨迹。

测试的电流数据用 GraphPad Prism 软件(San Diego, CA)进行统计分析,绘制剂量反应曲线,计算芋螺毒素的半阻滞浓度 IC_{50} 等多种有关毒素阻断 nAChRs 的各种参数。

结果表明, TxIC (实施例 2-(3)制备)对大鼠 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 均有特异阻断作用,洗脱较快(图 16)。TxIC 是迄今为止发现的 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的活性最强的阻断剂,其半阻断剂量 IC_{50} 仅为 12.5 nM,与其它已知的芋螺毒素的活性比较见下面的表 4。

1 μM α -TxIC/Txd1 完全阻断了由 ACh 门控的大鼠 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 开放产生的电流,洗脱较快,阻断是可逆的(图 16A)。TxIC 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的阻断活性最强,其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围为 12.5 nM (9.4 - 16.5 nM); TxIC 对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 的阻断活性次之,其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围为 94.1 nM (73 - 121 nM); TxIC 对 $\alpha 2\beta 4$ nAChR 的阻断活性很微弱,其半阻断剂量 IC_{50} 和误差范围为 4550 nM (3950-5230 nM)。TxIC 对它们的剂量反应曲线的斜率(Hillslope)和误差范围分别为: $\alpha 3\beta 4$ nAChR, 0.19 (0.66 - 1.44); $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR,

0.26 (0.73 - 1.87); $\alpha 2\beta 4$ nAChR, 0.20 (1.48 - 2.42)。 α -TxIC 对其它 nAChRs 亚型没有阻断活性, 包括 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 、 $\alpha 2\beta 2$ 、 $\alpha 9\alpha 10$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$, 其 $IC_{50} > 10\mu M$ (图 16B, 表 5), 相比之下, α -TxIC 阻断 $\alpha 3\beta 4$ 比阻断 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 的活性要强 7.5 倍, 比阻断 $\alpha 2\beta 4$ 的活性要强 524 倍 (图 16B, 表 5)。

α -TxIC/Txd1 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 的阻断选择性高。从 1 μM α -TxIC/Txd1 对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR, 以及 10 μM α -TxIC/Txd1 对其非常接近的 $\alpha 4\beta 4$ (B), $\alpha 7$ (C) nAChRs 的电流影响情况可以看出 (图 17), 1 μM α -TxIC/Txd1 特异阻断 $\alpha 3\beta 4$ nAChR (图 17A), 而比之高 10 倍浓度的毒素对 $\alpha 4\beta 4$ (图 17B), 与 $\alpha 7$ (图 17C) nAChRs 亚型没有阻断活性。对人类 $\alpha 3\beta 4$ nAChR, α -TxIC 具有与大鼠 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 相似的阻断活性。

因此, α -TxIC 是目前发现的对 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 活性最强的 α -芋螺毒素, 同时对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChR 也有较强的阻断活性, 其活性比较见下面的表 4。

表 4: α -TxIC 与其它 α -芋螺毒素序列及其活性比较

亚类	多肽	物种	序列	作用乙酰胆碱受体的靶点活性 (半阻断剂量 IC_{50} [nM])
$\alpha 4/6$	TxIC	<i>C. textile</i>	GCCSHPVCSAMSP-I C*	$\alpha 3\beta 4$ (12.5 nM) > $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (94 nM) > $\alpha 2\beta 4$ (4550 nM)
	AuIB	<i>C. aulicus</i>	GCCSYPPCFATNP-D C*	$\alpha 3\beta 4$ (750 nM) > $\alpha 7$
$\alpha 4/4$	BuIA	<i>C. bullatus</i>	GCCSTPPCAVLY---C *	$\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ (0.26-0.46 nM) > $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (1.54-2.1 nM) > $\alpha 3\beta 2$ (5.72 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (27.7 nM) > $\alpha 4\beta 4$ (69.9 nM) > $\alpha 2\beta 4$ (121 nM) > $\alpha 7$ (272 nM)
$\alpha 4/3$	ImI	<i>C. imperialis</i>	GCCSDPRCAWR---C *	$\alpha 3\beta 2$ (41 nM) > $\alpha 7/5HT3$ chimera (217 nM) > $\alpha 7$ (595 nM) $\alpha 9\alpha 10$ (2000 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (3390 nM)
$\alpha 4/7$	RegIIA	<i>C. regius</i>	GCCSHPACNVNNPH IC*	$\alpha 3\beta 2$ (33 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (97 nM) > $\alpha 7$ (103 nM) > $\alpha 9\alpha 10$
	PeIA	<i>C. pergrandis</i>	GCCSHPACSVNHPE LC*	$\alpha 9\alpha 10$ (6.9-54.9 nM) > $\alpha 3\beta 2$ (23-97.5 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (480nM) > $\alpha 7$ (1800 nM)

	PIA	<i>C.purpurascens</i>	RDPCCSNPVCTVHN PQIC*	$\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ (1-1.7 nM) > $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (12.6-30.5 nM) > $\alpha 3\beta 2$ (74.2 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (518 nM)
	Vc1.1	<i>C. victoriae</i>	GCCSDPRCNYDHPEI C*	$\alpha 9\alpha 10$ (19 nM) > $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ (140 nM) > $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (980 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (4200 nM) > $\alpha 3\beta 2$ (7300 nM)
	GIC	<i>C.geographus</i>	GCCSH PACAGNNQH IC*	$\alpha 3\beta 2$ (1.1 nM) > $\alpha 4\beta 2$ (309 nM) > $\alpha 3\beta 4$ (755 nM)

表中星号 (*) 表示 C 末端酰胺化。短线 (-) 表示缺口。

表 5: α -TxIC 对各种 nAChRs 亚型的半阻断剂量 IC_{50} 和剂量反应曲线的斜率

亚型	IC_{50} (nM) ^a	比率 ^b	斜率 ^a	亚型	IC_{50} (nM) ^c
$\alpha 3\beta 4$	12.5 (9.4-16.5)	1	0.19 (0.66-1.44)	$\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$	>10000
$\alpha 6/\alpha 3\beta 4$	94.1 (73-121)	7.5	0.26 (0.73-1.87)	$\alpha 2\beta 2$	>10000
$\alpha 2\beta 4$	4550 (3950-5230)	524	0.20 (1.48-2.42)	$\alpha 9\alpha 10$	>10000
$\alpha 4\beta 4$	>10000	--	--	$\alpha 7$	>10000
$\alpha 4\beta 2$	>10000	--	--	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$	>10000

表中^a是置信度为 95% 的区间；^b是其它亚型与 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 半阻断剂量 (IC_{50}) 的比值；^c是在 10 μ M 下没有阻断活性。

现有技术的研究表明， $\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ nAChRs 是治疗神经精神疾病，如烟碱、吗啡与可卡因等的成瘾、神经痛、帕金森病、痴呆、精神分裂症、抑郁、恐惧等的药物作用靶点 (参见背景技术中的相关文献)。因此，本发明的新的 α -芋螺毒素 TxIC/Txd1 在上述疾病的机理研究、诊断、治疗方面具有极高的应用价值。

实施例 4: α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 阻断 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 突变型的实验

α -CTx LvIA/LvD21 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的 7 个 $\beta 2$ 突变型： $\alpha 3\beta 2$ [T59K]， $\alpha 3\beta 2$ [T59L]， $\alpha 3\beta 2$ [T59I]， $\alpha 3\beta 2$ [V111I]， $\alpha 3\beta 2$ [F119Q]， $\alpha 3\beta 2$ [Q34A]， $\alpha 3\beta 2$ [K79A] 的阻断作用有较大差异 (表 6-7; 图 5-6)，这 7 种突变型是将 nAChR 的 $\beta 2$ 亚基中与配体结合部位的关键氨基酸

残基突变为 $\beta 4$ 亚基中相应的氨基酸残基(包括 α -CTx MII 在内)。突变型的具体制备方法参照文献 Shiembob DL, Roberts RL, Luetje CW, McIntosh JM. Determinants of alpha-conotoxin BuIA selectivity on the nicotinic acetylcholine receptor beta subunit. *Biochemistry*. 2006 Sep 19;45(37):11200-7 进行。

关于前 5 个 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 突变型的详细情况可参考文献 Shiembob DL, Roberts RL, Luetje CW, McIntosh JM. Determinants of alpha-conotoxin BuIA selectivity on the nicotinic acetylcholine receptor beta subunit. *Biochemistry*. 2006 Sep 19;45(37):11200-7; 和 Dutertre S, Nicke A, Lewis RJ. $\beta 2$ subunit contribution to 4/7 α -conotoxin binding to the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 2005;280:30460-8.

其中后两个 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 突变型 $\alpha 3\beta 2$ Q34A, $\alpha 3\beta 2$ K79A 是 α -CTx LtIA 与 $\alpha 3\beta 2$ 受体结合的关键氨基酸 (Luo, S., Akondi, K. B., Zhangsun, D., Wu, Y., Zhu, X., Hu, Y., Christensen, S., Dowell, C., Daly, N. L., Craik, D. J., Wang, C. I., Lewis, R. J., Alewood, P. F., and Michael McIntosh, J. (2010) Atypical alpha-conotoxin LtIA from *Conus litteratus* targets a novel microsite of the alpha3beta2 nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 12355-12366)。

具体实验方法可以参考实施例 3-(1), 结果如表 6-7 和图 5-6 所示。

从表 2 和图 5 可以看出, α -CTx LvIA/LvD21 对突变型 $\alpha 3\beta 2$ [V111I] 的阻断活性最小, 其 IC_{50} 为 126 nM, 其活性比对野生型 $\alpha 3\beta 2$ nAChR (IC_{50} 为 14.5 nM) 的阻断能力下降了 8.7 倍。对突变型 $\alpha 3\beta 2$ [F119Q]、 $\alpha 3\beta 2$ [T59K]、 $\alpha 3\beta 2$ [T59L] 的阻断活性很强, 其 IC_{50} 分别仅为 0.58、0.96 和 2.03 nM, 其活性比对野生型 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的阻断能力分别增强了 25 倍、15 倍和 7 倍。 α -CTx LvIA/LvD21 对突变型 $\alpha 3\beta 2$ [Q34A]、[K79A] 与 [T59I] 的 IC_{50} 分别为 8.64、10.8 和 15.2 nM, 其阻断活性是对野生型 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的阻断能力 0.6 - 1.05 倍, 与对野生型的 $\alpha 3\beta 2$

nAChR 的阻断活性差异不大。 α -CTx LvIA/LvD21 对突变型 $\alpha 3\beta 2$ [F119Q]的阻断活性是对 $\alpha 3\beta 2$ [V111I]的 217 倍。这意味着 $\beta 2$ 亚基上的第 111 位的缬氨酸、第 119 位的苯丙氨酸、第 59 位的苏氨酸对于 LvIA 与 $\alpha 3\beta 2$ 的结合起关键作用, 其活性变化趋势有减弱和增强 2 种情况, 这与 MII、LtIA 和其它以前发现的 α -CTxs 结合 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的部位有所不同。

表 6: α -LvIA/LvD21 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 野生型及其突变型的 IC_{50} 和剂量反应曲线斜率

受体亚型	半阻断剂量 ^a	比例 ^b	比例 ^c	剂量反应曲线斜率 ^a
$\alpha 3\beta 2$	14.5(11.1-18.8)	1	25	1.17(0.79-1.54)
$\alpha 3\beta 2$ [F119Q]	0.58(0.44-0.76)	0.04	1	1.12(0.79-1.44)
$\alpha 3\beta 2$ [T59K]	0.96(0.56-1.65)	0.07	1.7	0.80(0.47-1.13)
$\alpha 3\beta 2$ [T59L]	2.03(1.52-2.69)	0.14	3.5	1.07(0.77-1.37)
$\alpha 3\beta 2$ [Q34A]	8.64(4.80-15.5)	0.60	15	0.90(0.22-1.58)
$\alpha 3\beta 2$ [K79A]	10.8(6.44-18.0)	0.74	19	0.86(0.43-1.30)
$\alpha 3\beta 2$ [T59I]	15.2(9.71-23.9)	1.05	26	1.15(0.43-1.86)
$\alpha 3\beta 2$ [V111I]	126(97.2-163)	8.70	217	1.31(0.66-1.96)

上表中,

a 是置信度为 95% 的区间; b 是 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 突变型与野生型半阻断剂量 (IC_{50}) 的比值; c $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 其它突变型、野生型与突变型 $\alpha 3\beta 2$ [F119Q]半阻断剂量 (IC_{50}) 的比值。

α -CTx LvIA/LvD21 不但对有些 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 突变型的阻断活性 (IC_{50}) 有很大的影响, 对它们的洗脱速率的影响也很显著 (图 6 与表 7)。研究结果显示, 10 nM α -LvIA/LvD21 阻断 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 野生型大约 50% 的电流, 洗脱速度快, 2 min 内电流完全恢复 (图 6A); 10 nM α -LvIA/LvD21 却阻断了突变型 $\alpha 3\beta 2$ [F119Q]的全部电流, 其洗脱速度慢, 洗脱 12 min 后电流才恢复 (图 6B); 更加不同的是, 10 nM α -LvIA/LvD21 阻断了突变型 $\alpha 3\beta 2$ [T59K]的全部电流, 洗脱速度非常慢, 洗脱 20 min 后的电流才恢复至对照电流的 27% (图 6C); 然而,

10 nM α -LvIA/LvD21 完全不阻断突变型 $\alpha 3\beta 2$ [V111I] 的电流(图 6D)。 α -LvIA/LvD21 对各种突变型受体的洗脱速率的影响总结于表 7。 $\alpha 3\beta 2$ [K79A], $\alpha 3\beta 2$ [V111I], $\alpha 3\beta 2$ [Q34A], 以及 $\alpha 3\beta 2$ [T59I] 4 种突变型对 α -LvIA/LvD21 阻断后的洗脱速度影响较小, 在 10 - 10000nM 很宽的浓度范围类, 它们的洗脱速度都较快, 在 1 - 3 min 内, 电流均可恢复到对照水平, 即 100%。对于突变型 $\alpha 3\beta 2$ [T59L], 其洗脱速度相对较慢, 需要 5 - 8 min 的洗脱, 其电流方可恢复到对照水平。对于突变型 $\alpha 3\beta 2$ [F119Q] 来说, 其洗脱速度更慢, 需要 10 - 12 min 的洗脱, 其电流才能恢复到对照水平。对于突变型 $\alpha 3\beta 2$ [T59K], 其洗脱速度是最慢的, 10 nM LvIA/LvD21 完全阻断了它的电流, 20 min 的洗脱只能恢复到对照电流的 $28\pm 3.5\%$, 100 nM LvIA/LvD21 阻断后, 20 min 的洗脱仅恢复到对照电流的 $13\pm 2\%$, 可见突变型 $\alpha 3\beta 2$ [T59K] 对 LvIA/LvD21 的结合方式是影响最大的。因此, α -CTx LvIA/LvD21 的结构与功能为研究洞察 α -CTxs 与 nAChRs 之间相互作用的机制奠定了重要的基础, 提供了很好的工具与模型。

表 7: α -CTx LvIA/LvD21 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 野生型及其突变型洗脱速率的影响

受体亚型	浓度 ^a (nM)	洗脱 时间 ^b (min)	电流恢 复百分 数 (%) ^c	受体亚型	浓度 ^a (nM)	洗脱 时间 ^b (min)	电流恢 复百分 数 (%) ^c
$\alpha 3\beta 2$	10-10000	2	100	$\alpha 3\beta 2$ [T59I]	10-10000	2	100
$\alpha 3\beta 2$ [K79A]	10-10000	1	100	$\alpha 3\beta 2$ [T59L]	10-10000	5-8	100
$\alpha 3\beta 2$ [V111I]	100-10000	1	100	$\alpha 3\beta 2$ [F119Q]	10-10000	10-12	100
$\alpha 3\beta 2$ [Q34A]	10-10000	2-3	100	$\alpha 3\beta 2$ [T59K]	10	20	28 ± 3.5^d
					100	20	13 ± 2^d

上表中,

a 毒素肽 α -CTx LvIA/LvD21 的浓度; b 阻断后的洗脱时间, 单位为分钟(min); c 阻断后在洗脱时间内的电流恢复百分数(%); d 95% 置信区间的平均值与误差 (Mean \pm 标准误)。

实施例 5: α -LvIA/LvD21 的镇痛活性实验

1. 利用大鼠 CCI 模型测定 LvIA/LvD21 的镇痛活性

(1) 实验动物和实验材料

利用 SD (Sprague Dawley) 大鼠, 制作坐骨神经慢性挤压伤模型 (Chronic Constriction Injury model, CCI 模型), 用压力痛觉测试仪(大鼠 800G, 型号为美国 IITC 2391) 测定所试芋螺毒素对神经痛的镇痛活性。SD (Sprague Dawley) 大鼠, 购自广东省医学实验动物中心。CCI 模型的制作参照 Bennett 等(Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87)的方法。

(2) 实验方法

经腹腔注射戊巴比妥钠 80mg/kg 麻醉后, 无菌条件下切开右下肢, 暴露坐骨神经主干, 用 4-0 铬制羊肠线松扎四道, 间距为 1mm, 结扎线的松紧以不影响神经外膜的血运为度, 逐层缝合。左下肢切开暴露坐骨神经主干但不结扎, 为假手术侧。各侧伤口缝合前均在局部涂以青霉素粉剂。术后腹腔注射青霉素 1 次/天, 8 万单位/次, 连续 3 天。大鼠置管前每笼 5 只, 置管后单笼饲养。将初选合格的大鼠按随机数字表分成五组, 即生理盐水阴性对照组、吗啡阳性对照组、和毒素肽 α -LvIA/LvD21 实验组, 其中毒素肽 α -LvIA/LvD21 实验组重复 2 次(即毒素肽 α -LvIA/LvD21 实验组供进行 3 次)。分别在手术之前、手术后三天、一周、两周测大鼠患足和假手术侧足的机械痛觉刺激值。经检测合格的坐骨神经慢性挤压伤模型 (CCI) 模型, 用作测试 LvIA/LvD21 对神经痛疗效的整体动物模型。

用腹腔注射给药方式测定 LvIA/LvD21 在 CCI 模型上的镇痛作用。用生理盐水(Saline)为空白对照, 也就是阴性对照; 用吗啡 (Morphine) 作阳性对照, 给药剂量为 1mg/kg 大鼠体重。实验组为毒素肽 α -LvIA/LvD21, 给药剂量为 1 nmol/kg ($\sim 1.7 \mu\text{g}/\text{kg}$) 大鼠体

重，每组大鼠数量为 8 只 ($n=8$)。镇痛活性用 Mechanical Threshold 表示，为观测痛阈值与基础痛阈值(100)的比值百分数(% of basal)，这个值越大，镇痛效果越好。

(3) 实验结果

如图 7-8 所示。

图 7 显示了 α -LvIA/LvD21 腹腔给药 (IP) 后 1-24 小时在 CCI 模型上的镇痛作用。LvIA/LvD21 给药后 1 小时就显示出对神经痛的强镇痛作用，而阳性对照吗啡在给药后 1 小时却没有镇痛活性；LvIA/LvD21 给药后 3 小时，对神经痛的镇痛作用达到最高，平均镇痛值为 160%，有的高达 200%，而阳性对照吗啡在给药后 3 小时的平均镇痛值为 120%；到后 24 小时时，LvIA/LvD21 的镇痛值仍远高于吗啡 (图 7)。

连续给药 7 天后，测定停药后一周内 (第 7-14 天) 的镇痛值，结果如图 8 所示。LvIA/LvD21 在 7-14 天的机械痛觉刺激痛阈值显著分别高于吗啡组，在第 12 天时的镇痛效果达到最好，平均镇痛值达到 200%，吗啡组与并且与生理盐水对照组具有显著性差异的镇痛值几乎没有差异。这说明吗啡停止给药后的镇痛效果就消失了，而 LvIA/LvD21 停止给药后的镇痛效果还得以持续 (图 8)，表明 LvIA/LvD21 不但能对神经痛起到镇痛作用，还具有治愈效果。

以上研究结果表明，LvIA/LvD21 具有比吗啡更强的镇痛作用，若按相同重量剂量计算，在 CCI 模型上，LvIA/LvD21 的镇痛效应比吗啡强 823-1176 倍。腹腔注射 LvIA/LvD21 在大鼠 CCI 模型上的镇痛作用强大且具有很好的持续性，芋螺毒素自身不会引起成瘾。

2. 利用小鼠热板试验测定 LvIA/LvD21 的镇痛活性

(1) 实验动物

实验前将反应潜伏期小于 5s 或大于 30s 的小鼠剔除，选择体重 $18\pm 2\text{g}$ 的雌性昆明小鼠 50 只。给药前，将小鼠放在 $55\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的热板测痛仪 (型号为美国 HTC 39) 金属板上，以小鼠舔后足反应或跳跃反

应的时间计算潜伏期 (S)。

(2) 实验方法

依照随机分组数字表分成阴性对照生理盐水 (Saline)、阳性对照吗啡(Morphine)、 α -芋螺毒素 LvIA/LvD21 共 3 组, 每组 10 只。每组均为侧脑室给药方式, 注射体积为 10 μ L/只小鼠。阳性对照吗啡的给药剂量为 100 μ g/kg 小鼠体重; α -LvIA/LvD21 的给药剂量为 0.1 nmol/kg (\sim 0.17 μ g/kg) 小鼠体重。按同等重量剂量计算, 阳性对照吗啡的给药量为 LvIA/LvD21 的 588 倍。给药前, 将小鼠放在 $55\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的热板测痛仪 (型号为美国 IITC 39) 金属板上, 以小鼠舔后足反应或跳跃反应的潜伏期作为痛阈指标, 单位为秒 (s)。每只小鼠测定 2 次取平均值作为基础痛阈, 2 次测定时间间隔 5min。为防足部烫伤, 设 60s 为截止时间, 超过 60s 者, 痛阈计为 60s。给药后分别在 15、30、45、60、90、120 min 时取值作为给药后痛阈, 结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

(3) 实验结果

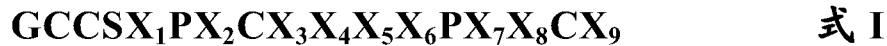
如图 9 所示。

α -CTx LvIA/LvD21 在热板试验模型上显示出很强的镇痛活性(图 9)。在给药前 3 组小鼠的基础痛阈均在 14-17s 左右。给药后, 在所有时间点, 阴性对照生理盐水 (Saline) 的痛阈仍然维持在 14-17s 左右, 在给药后的第 15min, LvIA/LvD21 的痛阈迅速增加到 30 s, 吗啡的痛阈也迅速增加到 32 s (图 9), 此时, LvIA/LvD21 显示了强大的镇痛活性, 说明 LvIA/LvD21LvIA 的镇痛活性起效非常快。在给药后的第 15 第 30-90min 内, LvIA/LvD21 的痛阈略微下降持续上升, 而吗啡的痛阈持续下降, LvIA/LvD21 的痛阈与吗啡相比, 痛阈提高了 1.3-1.5 倍。在给药后的第 120 min, LvIA/LvD21 的痛阈略有下降, 但仍比吗啡给药后此时的痛阈高出 1.3 倍。若按相同重量剂量计算, 在热板模型上, LvIA/LvD21 的镇痛效应比吗啡强 764-882 倍。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求

1. 一种多肽，其具有如下的式 I 所示的氨基酸序列：



其中，

X_1 表示 D 或 H，

X_2 表示 P、A 或 V，

X_3 表示 R、N 或 S，

X_4 表示 N、V 或 A，

X_5 表示 K、D、M 或 A，

X_6 表示 H 或 S，

X_7 表示 D、E 或者 X_7 缺失，

X_8 表示 L 或 I，

X_9 表示 G 或者 X_9 缺失。

2. 一种多肽，其为或者包含选自如下 (1) 至 (3) 中任一项所述的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11-15、SEQ ID NO: 26-28 或 SEQ ID NO: 30 中的任一序列所示的氨基酸序列；

(2) 与上述 (1) 所述氨基酸序列至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、尤其优选至少 95%、最优选至少 97% 相同的氨基酸序列；或

(3) 被 1-5 个、优选 1-3 个、更优选 1-2 个、最优选 1 个氨基酸残基的取代、缺失、插入和/或添加而与上述 (1) 或 (2) 所示序列有所不同的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的多肽，其中，所述多肽的 N 末端的第一个半胱氨酸与第三个半胱氨酸形成二硫键，并且第二个半胱氨酸

与第四个半胱氨酸形成二硫键；或所述多肽的 N 末端的第一个半胱氨酸与第四个半胱氨酸形成二硫键，并且第二个半胱氨酸与第三个半胱氨酸形成二硫键；或所述多肽的 N 末端的第一个半胱氨酸与第二个半胱氨酸形成二硫键，并且第三个半胱氨酸与第四个半胱氨酸形成二硫键；具体地，所述多肽的羧基末端是酰胺化的。

4. 一种多核苷酸，其编码权利要求 1 至 3 中任一项所述多肽的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 4 所述的多核苷酸，其为或者包含选自如下的(1)至(3)中任一项所述的核苷酸序列：

(1) SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16-21、SEQ ID NO: 22-25、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 31 中的任一序列所示的核苷酸序列；

(2) 上面(1)中所述核苷酸序列的互补序列；

(3) 在严谨条件下能够与上述(1)中所述的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

6. 一种核酸构建体，其包含权利要求 4 或 5 所述的多核苷酸。

7. 一种表达载体，其包含权利要求 6 所述的核酸构建体。

8. 一种转化的细胞，其包含权利要求 7 所述的表达载体。

9. 一种融合蛋白，其包含权利要求 1 至 3 中任一项所述的多肽。

10. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 3 中任一项所述的多肽，或者包含权利要求 9 所述的融合蛋白；可选地，其还包含药学上可接受

的载体或辅料。

11. 一种在体内或体外阻断乙酰胆碱受体或者调节乙酰胆碱水平的方法，包括使用有效量的权利要求1至3中任一项所述的多肽或权利要求9所述的融合蛋白的步骤；具体地，所述乙酰胆碱受体是 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

12. 一种筛选乙酰胆碱受体抑制剂或者确定乙酰胆碱受体亚型的方法，该方法包括：通过在存在或不存在候选化合物存在的情况下将乙酰胆碱受体与权利要求1至3中任一项所述的多肽或权利要求9所述的融合蛋白进行接触的步骤；具体地，所述乙酰胆碱受体为 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

13. 权利要求1至3中任一项所述的多肽或权利要求9所述的融合蛋白用于阻断乙酰胆碱受体的用途；具体地，所述乙酰胆碱受体是 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

14. 权利要求1至3中任一项所述的多肽或权利要求9所述的融合蛋白在制备阻断乙酰胆碱受体的药物或试剂中的用途；具体地，所述乙酰胆碱受体是 $\alpha 3\beta 2$ 乙酰胆碱受体、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 乙酰胆碱受体或 $\alpha 3\beta 4$ 乙酰胆碱受体。

15. 权利要求1至3中任一项所述的多肽或权利要求9所述的融合蛋白在制备治疗和/或预防和/或辅助治疗神经系统疾病例如神经痛与成瘾、帕金森症、痴呆、精神分裂症、抑郁、或癌症的药物的用途，或者用于制备杀灭害虫、镇痛、戒烟、戒毒的药物的用途；具体地，所述成瘾由如下原因导致：各种精神活性物质，包括尼古丁、鸦片、海洛因、甲基苯丙胺（冰毒）、吗啡、大麻、可卡因以及国家规定管

制的其它能够使人形成瘾癖的麻醉药品和精神药品等。具体地，所述神经痛由如下原因导致：癌症与癌症化疗、酒精中毒、坐骨神经痛、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤、艾滋病、头部神经瘫痪、药物中毒、工业污染中毒、淋巴神经痛、骨髓瘤、多点运动神经痛、慢性先天性感觉神经病、急性剧烈自发性神经痛、挤压神经痛、脉管炎、血管炎、局部缺血、尿毒症、儿童胆汁肝脏疾病、慢性呼吸障碍、复合神经痛、多器官衰竭、脓毒病/脓血症、肝炎、卟啉症、维生素缺乏、慢性肝脏病、原生胆汁硬化、高血脂症、麻疯病、莱姆关节炎、感觉神经束膜炎、或过敏症。

16. 一种治疗和/或预防和/或辅助治疗神经系统疾病例如疼痛、烟酒和毒品成瘾、智障、痴呆、精神分裂症、中枢神经紊乱、癫痫症、帕金森病、精神病、神经肌肉阻滞、重症肌无力、抑郁症、高血压、心率不齐、哮喘、肌肉松弛、中风、乳腺癌和肺癌等的方法，或者一种杀灭害虫、镇痛、戒烟、或戒毒的方法，包括给予有效量的权利要求1至3中任一项所述的多肽或权利要求9所述的融合蛋白的步骤；具体地，所述成瘾由烟碱、吗啡、可卡因、酒精等能引起上瘾的物质；所述神经痛由如下原因导致：癌症与癌症化疗、酒精中毒、坐骨神经痛、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤、艾滋病、头部神经瘫痪、药物中毒、工业污染中毒、淋巴神经痛、骨髓瘤、多点运动神经痛、慢性先天性感觉神经病、急性剧烈自发性神经痛、挤压神经痛、脉管炎、血管炎、局部缺血、尿毒症、儿童胆汁肝脏疾病、慢性呼吸障碍、复合神经痛、多器官衰竭、脓毒病/脓血症、肝炎、卟啉症、维生素缺乏、慢性肝脏病、原生胆汁硬化、高血脂症、麻疯病、莱姆关节炎、感觉神经束膜炎、过敏症。

17. 权利要求1至3中任一项所述的多肽的制备方法，包括下述步骤：

- 1) 在ABI Prism 433a 多肽合成仪上或者手工方法合成线性多肽, Fmoc 氨基酸的侧链保护基为:Pmc (Arg)、Trt或Acm(Cys)、But (Thr、Ser、Tyr)、OBut (Asp)以及Boc (Lys);
- 2) 将步骤1) 中合成的线性多肽从树脂上切割下来;
- 3) 用冰乙醚沉淀和洗涤步骤2) 中得到的线性多肽, 回收得到线性多肽粗品;
- 4) 用制备型反向HPLC C18 柱 (Vydac) 纯化步骤3) 中得到的线性多肽粗品;
- 5) 将步骤4) 中得到的产物进行两步或一步氧化折叠。

GTGGTTCCTGGGTCAGCATTTTCGTGGCAGGGACGCCGAGCCAAAGCGTCT 51
 V V L G P A F R G R D A A A K A S

GGCCTGGTTGGTCTGACTGACAGGAGAGGATGCTGTTCTCATCCTGCCTGT 102
 G L V G L T D R R G C C S H P A C
 processing 1 Mature Toxin

AACGTAGATCATCCAGAAATTTGTGGCTGAAGACGCTGATGCTCCAGG 150
 N V D H P E I C # * R R * C S R
 processing 2 (#, C-terminal carboxamide)

ACCCTCTGAACCACGACA 168
 T L * T T T

图 1

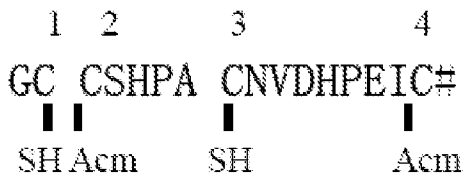


图 2 (A)

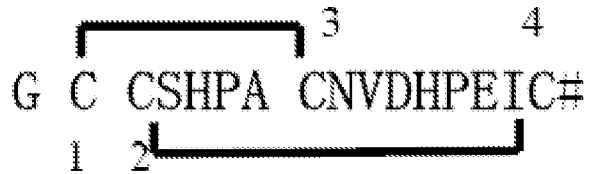


图 2 (B)

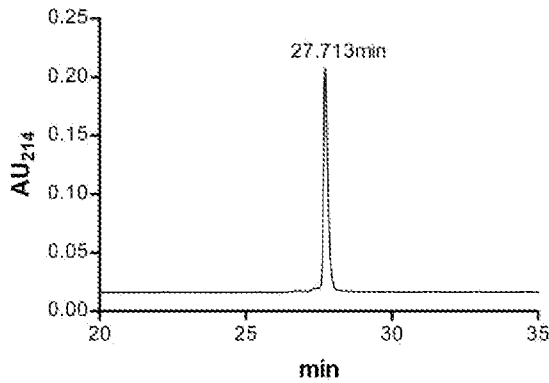


图 2 (C)

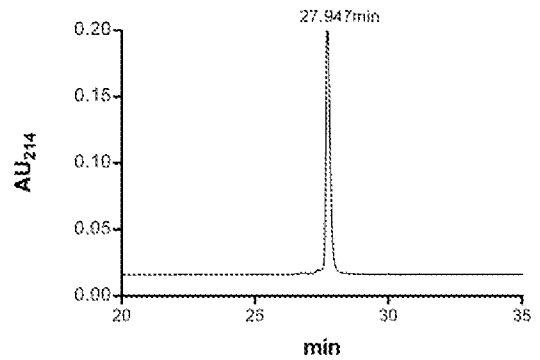


图 2 (D)

C C 100 nM LvIA ↓

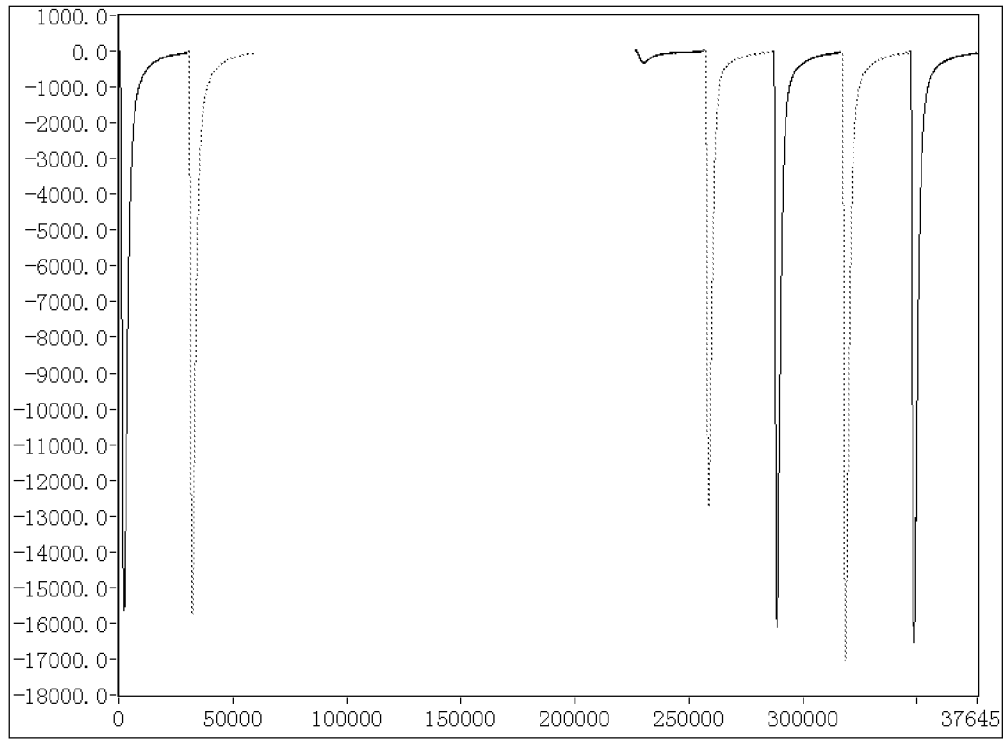


图 3 (A)

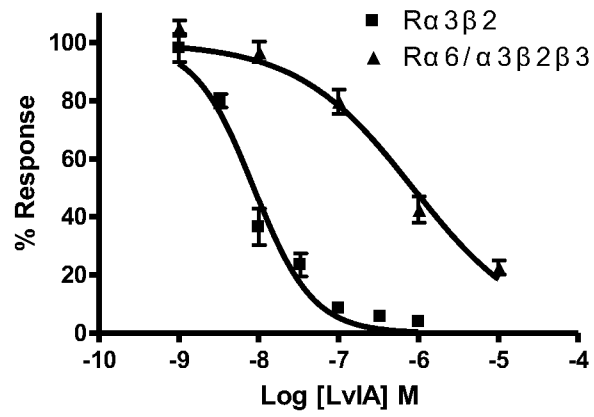


图 3 (B)

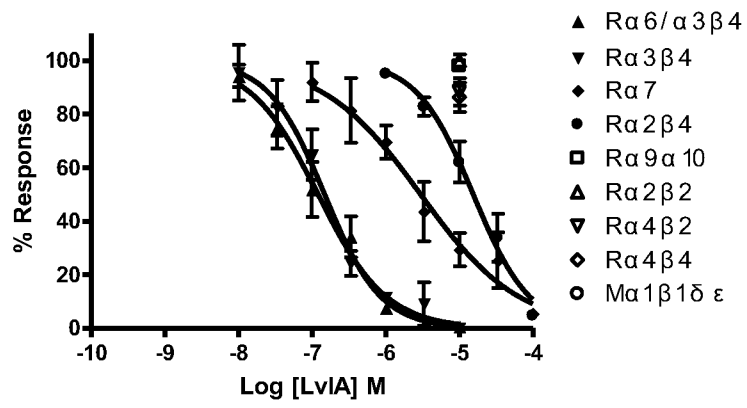


图 3 (C)

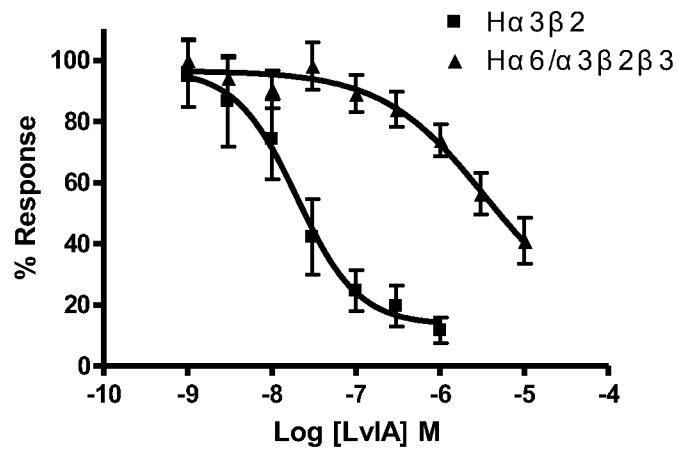


图 3 (D)

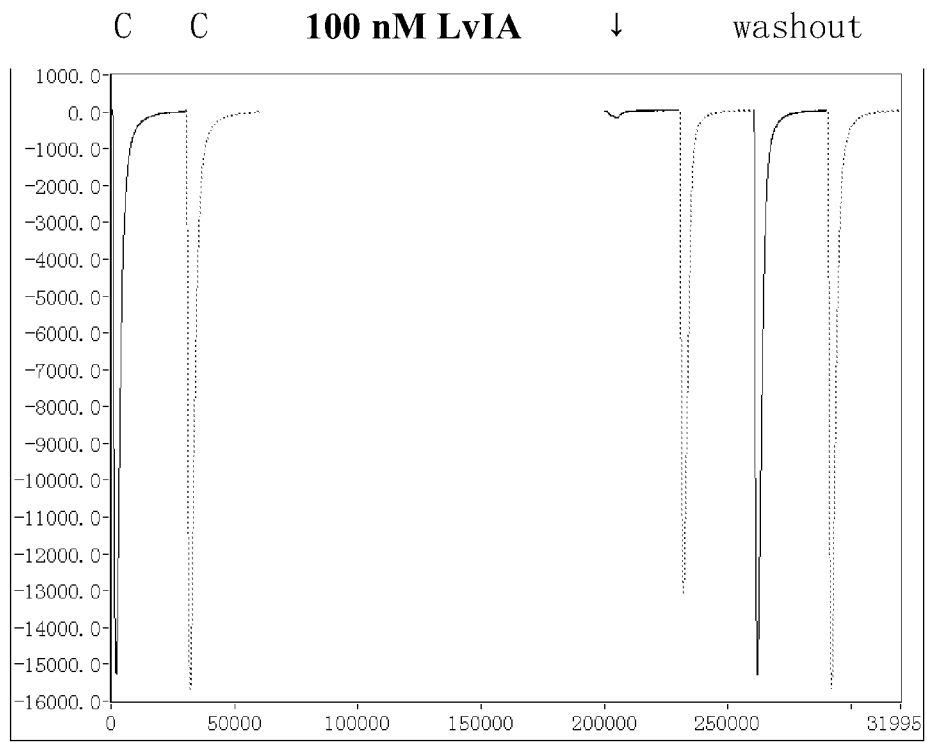


图 4 (A)

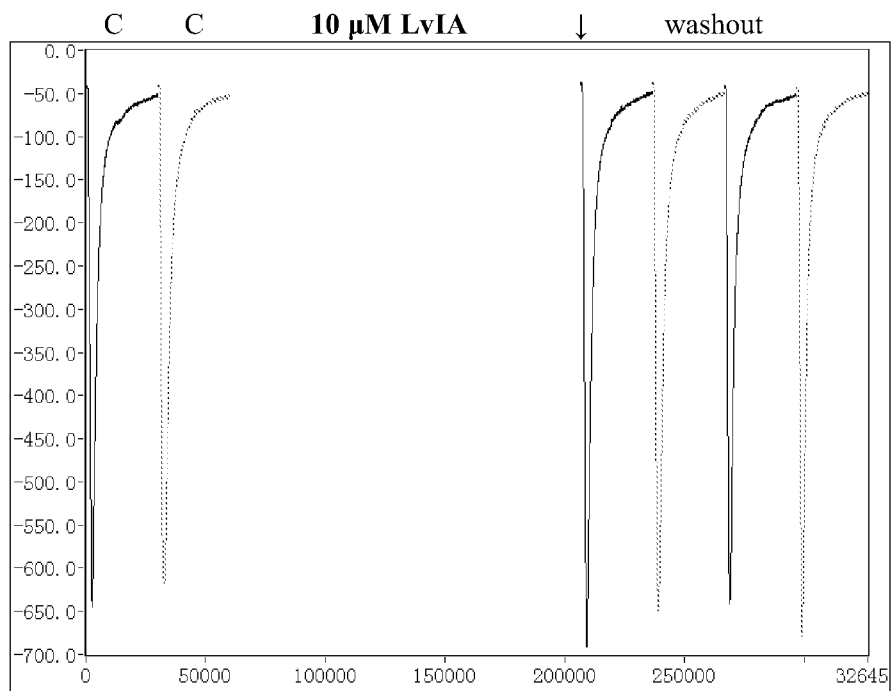


图 4 (B)

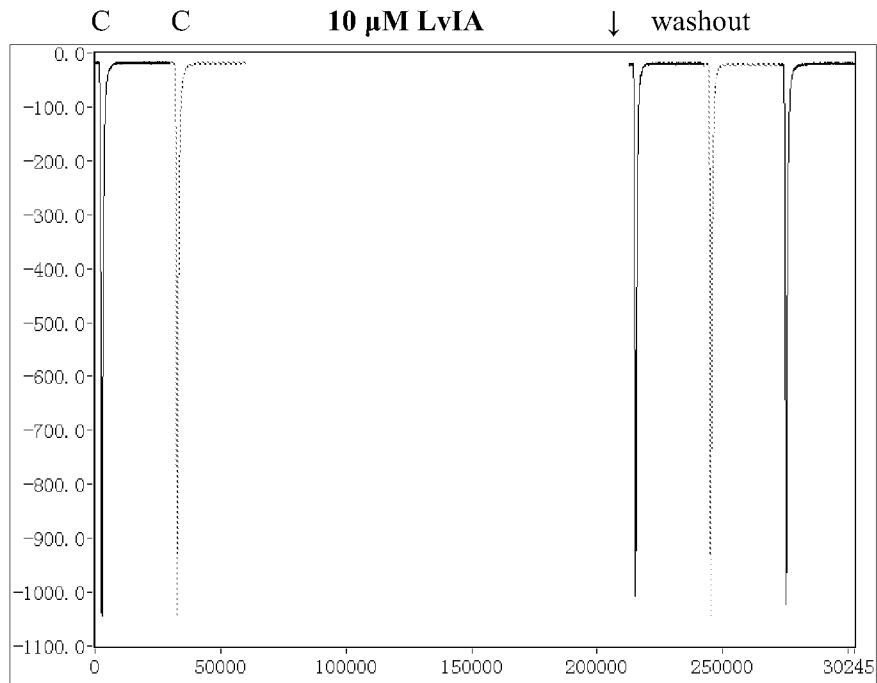


图 4 (C)

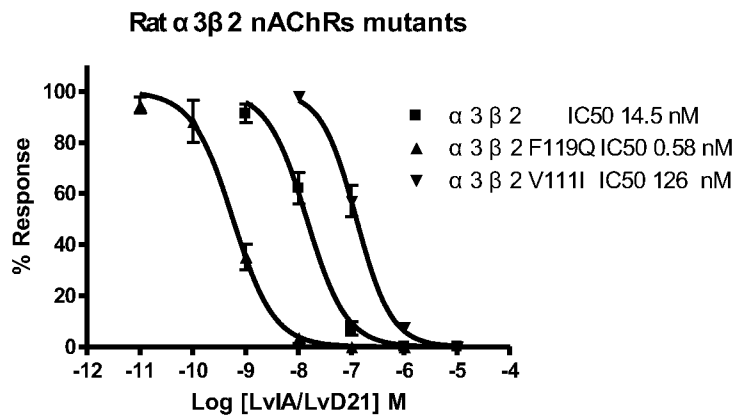


图 5 (A)

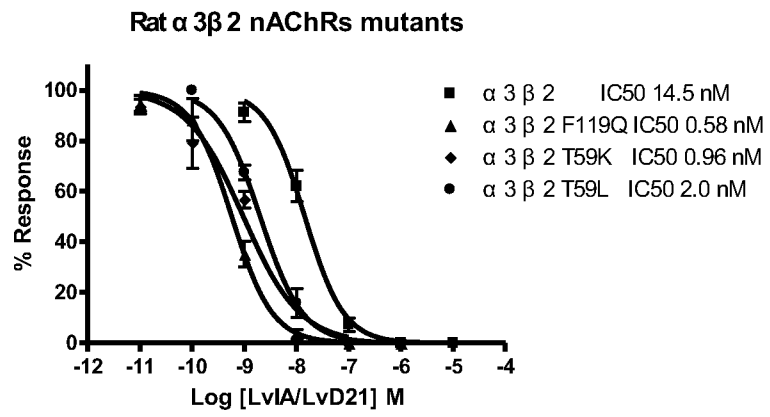


图5 (B)

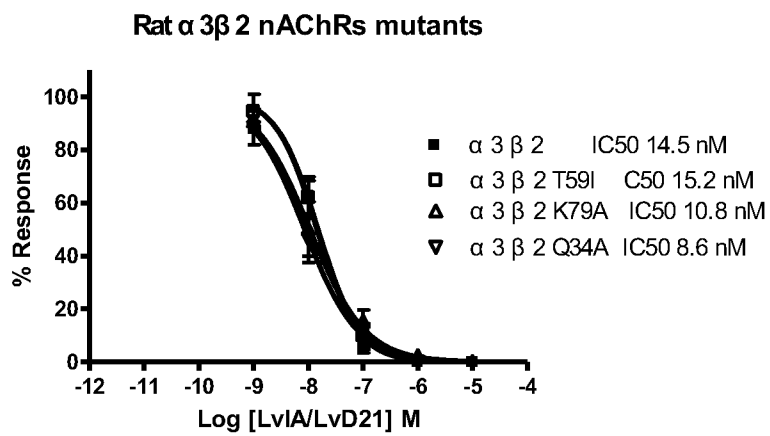


图5 (C)

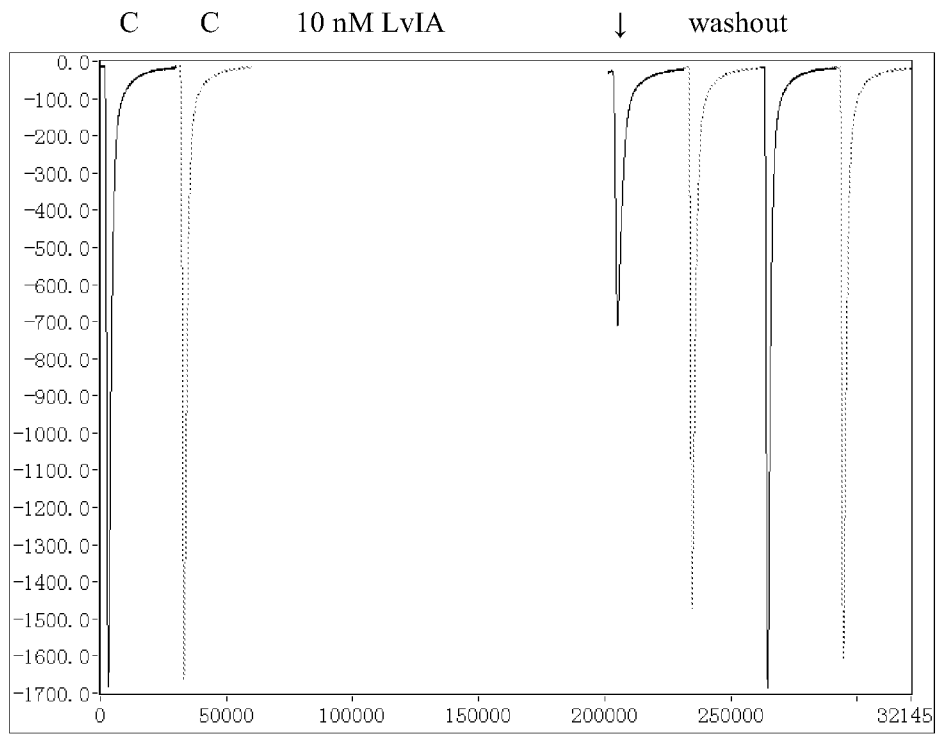


图 6 (A)

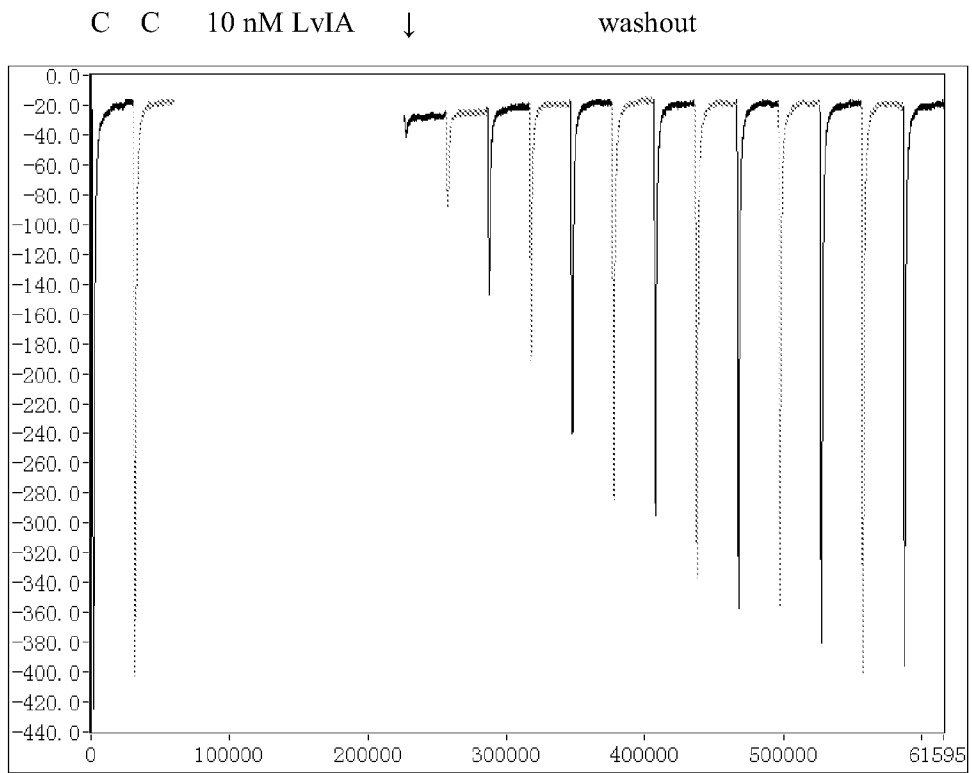


图 6 (B)

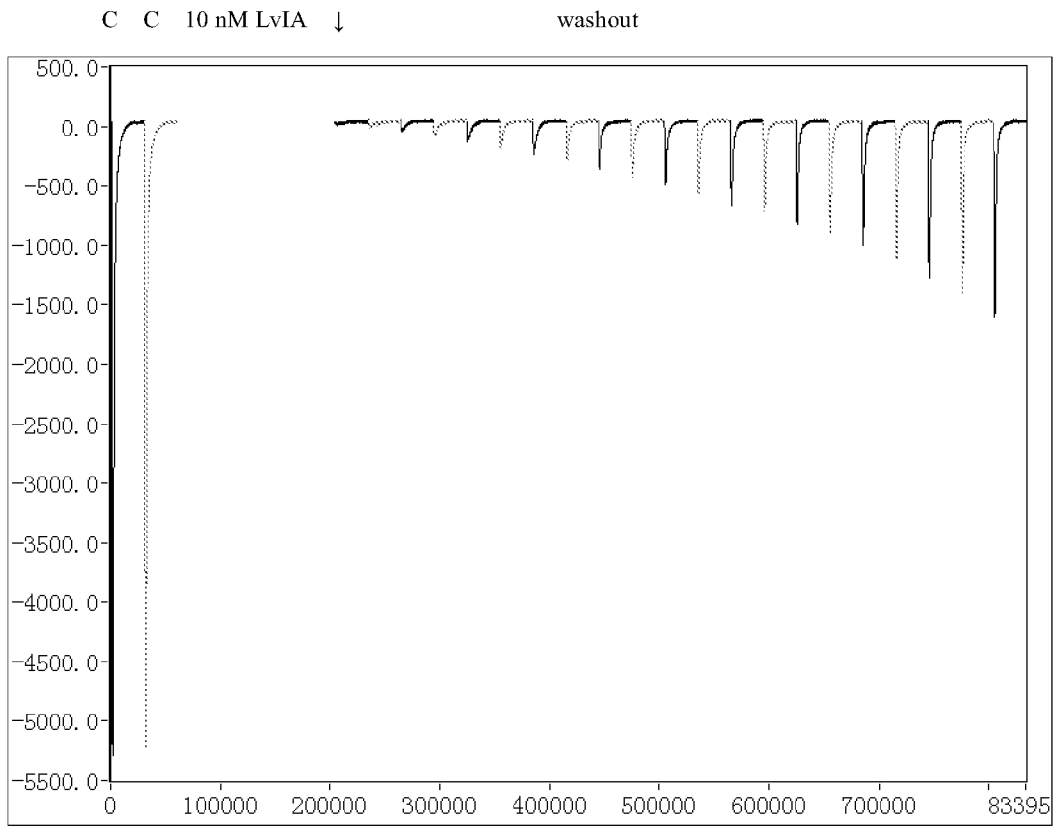


图 6 (C)

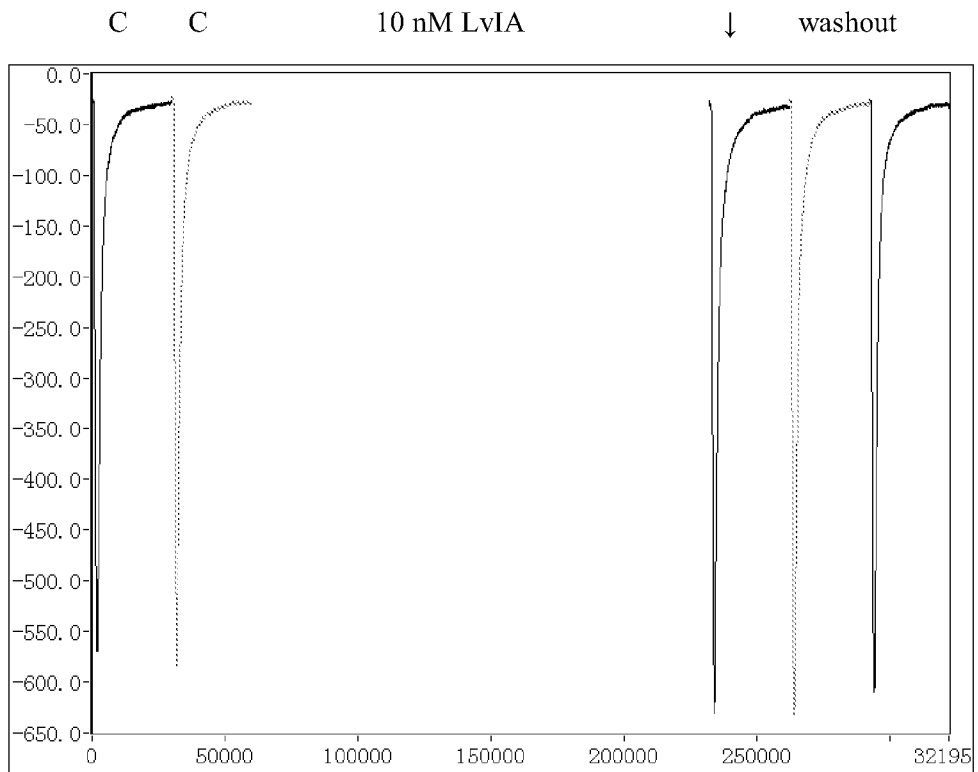


图 6 (D)

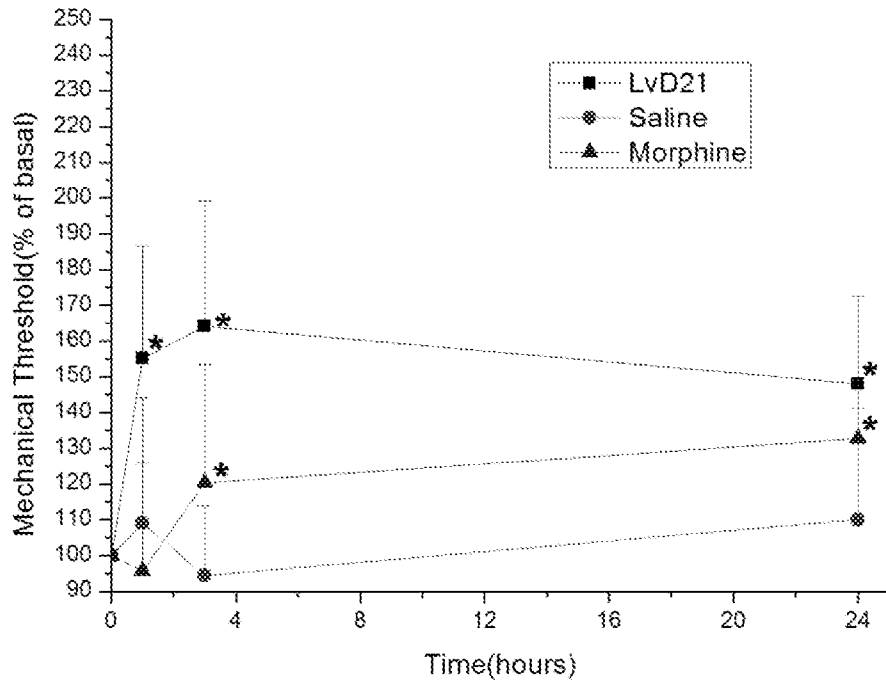


图 7

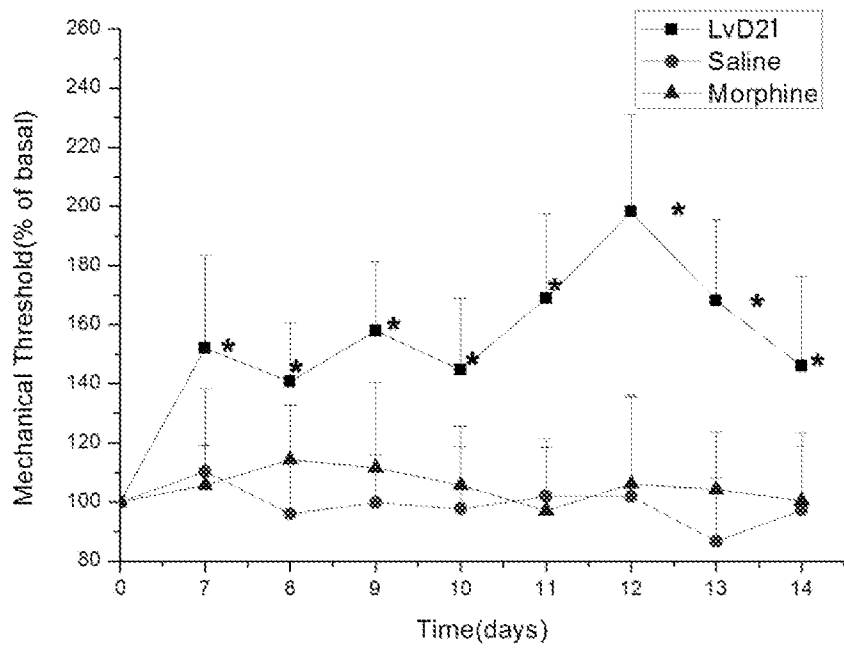


图 8

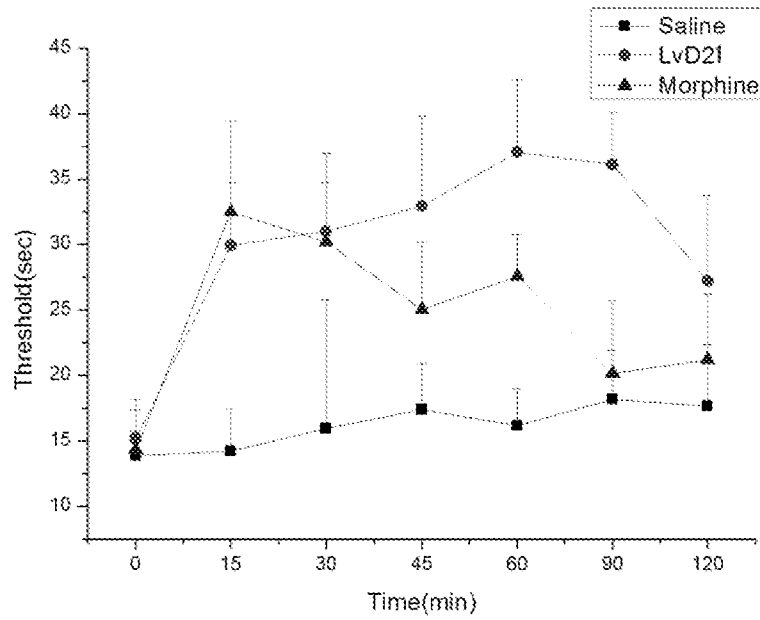


图 9

```

GTGGTTCTGGGTCCAGCATTGATGGCAGGAATACCTCAGCCAACAACAA 50
V V L G P A F D G R N T S A N N K

AGCGACTGACCTGATGGCTCTGCCTGTCAGGGGATGCTGTTCCGATCCTC 100
A T D L M A L P V R G C C S D P P
                    processing 1      Mature Toxin

CCTGTAGAAAACAAGCACCCAGATCTTTGTGGCGGAAGACGCTGA      144
C R N K H P D L C G G R R *
                    TxIB = processing 2      processing 3 = TxIB(G)

TGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGAC      170
C S R T L * T T
    
```

图 10

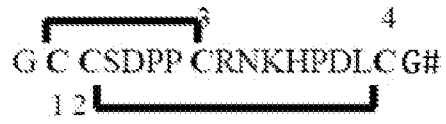


图 11 (A)



图 11 (B)

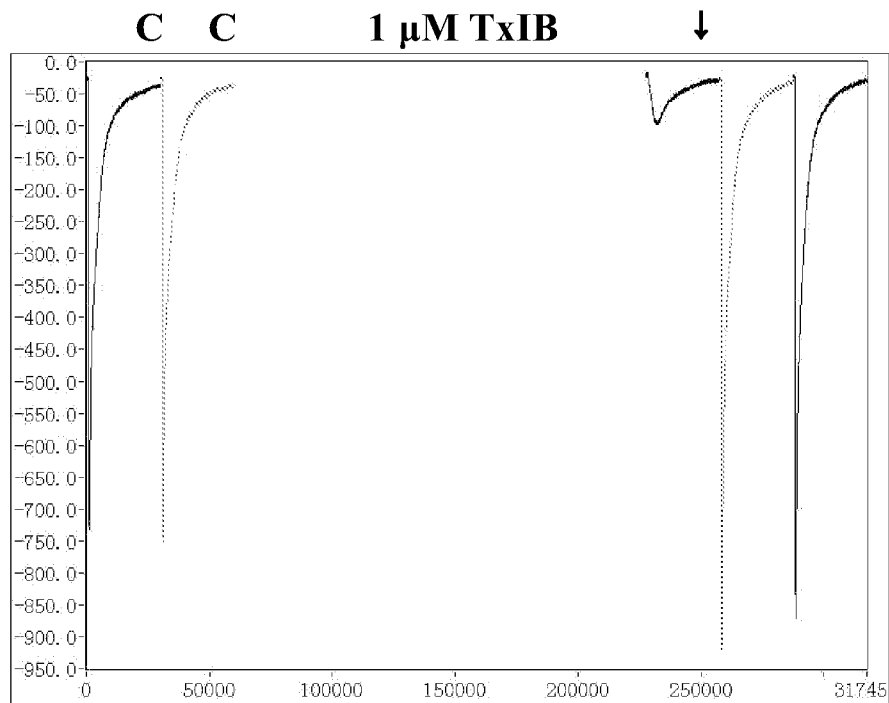


图 12 (A)

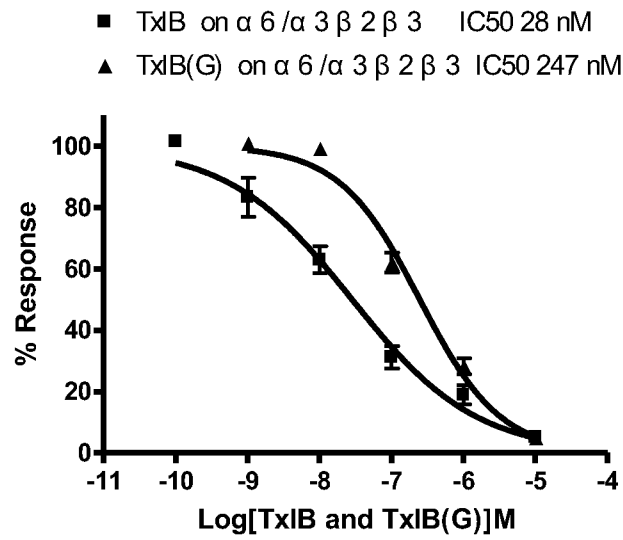


图 12 (B)

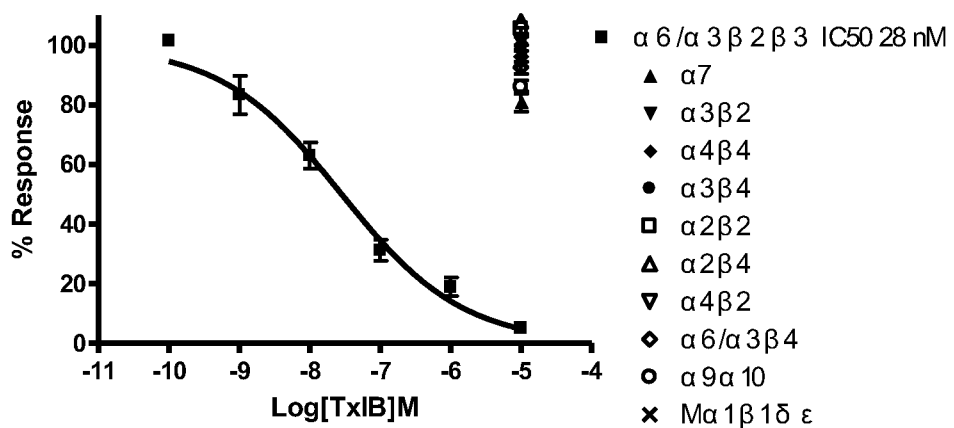


图 12 (C)

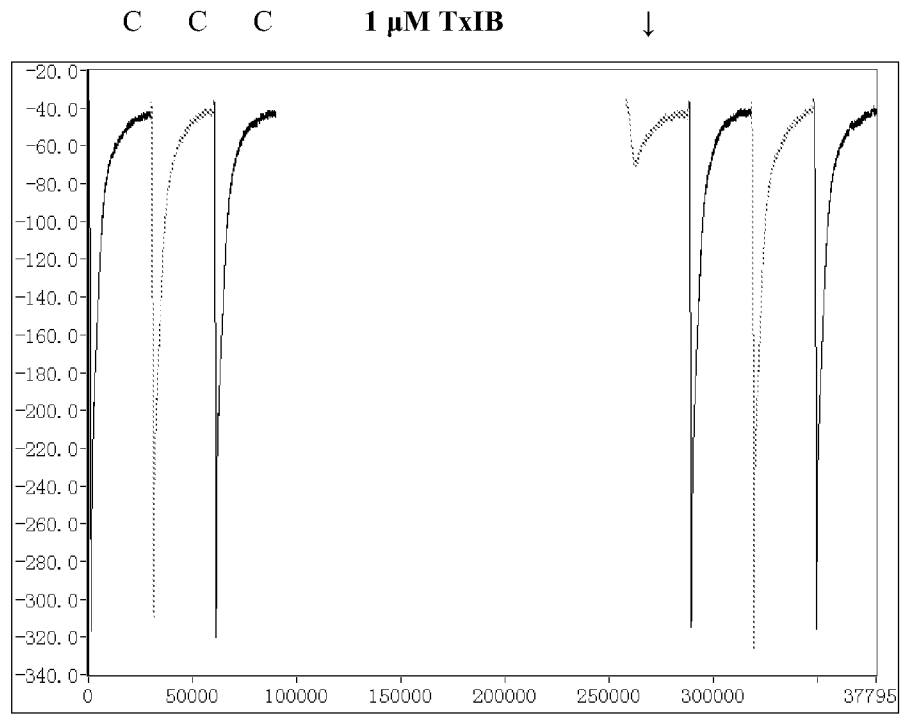


图 13 (A)

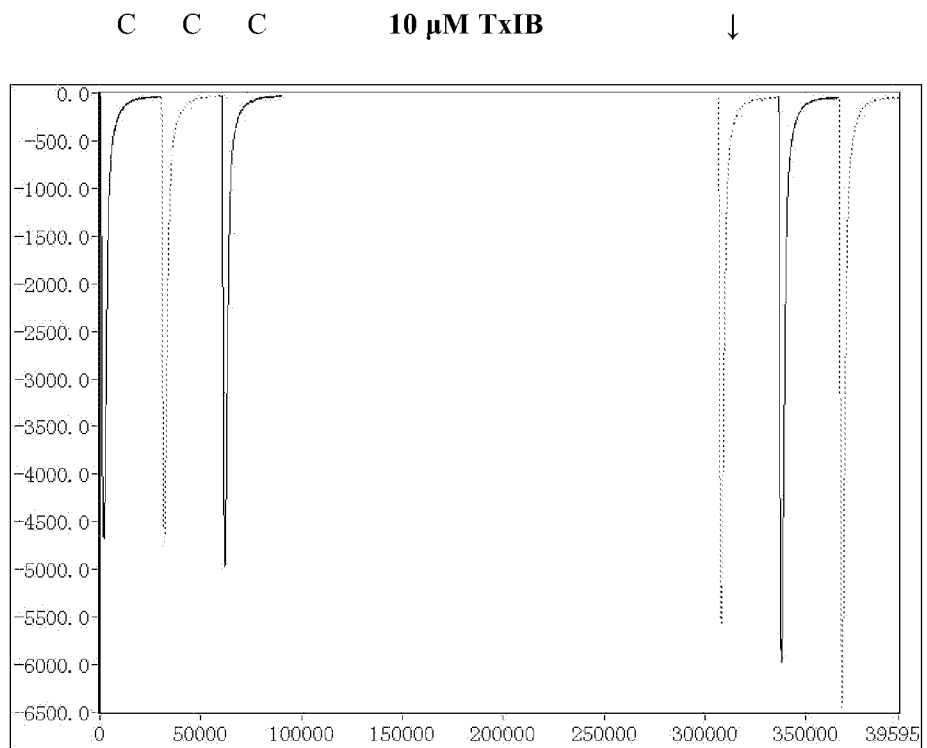


图 13 (B)

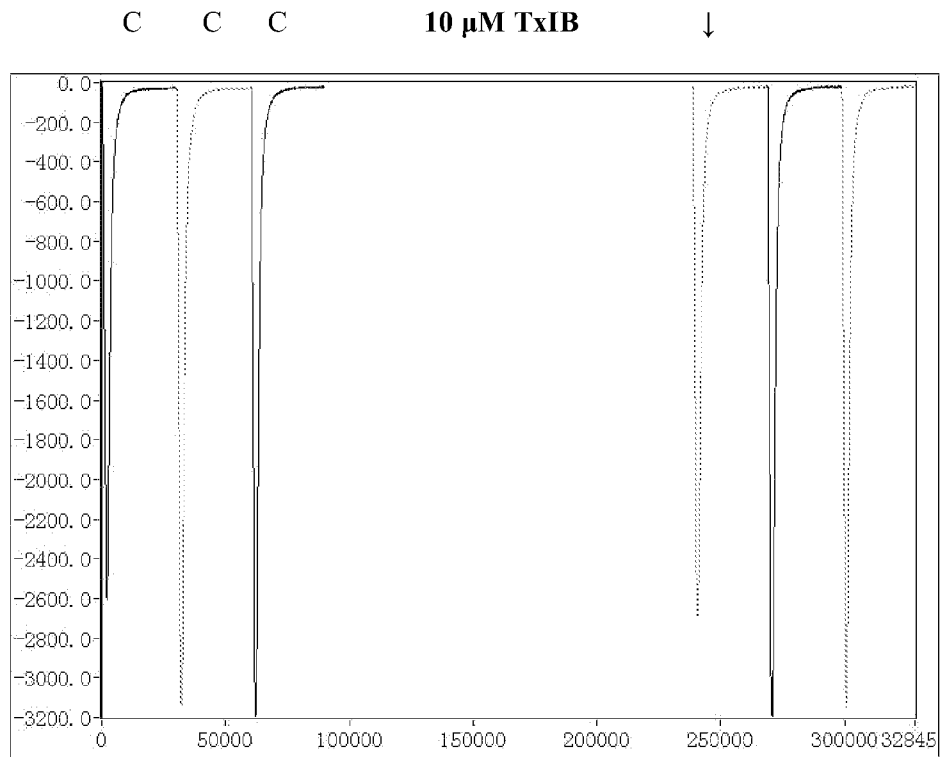


图 13 (C)

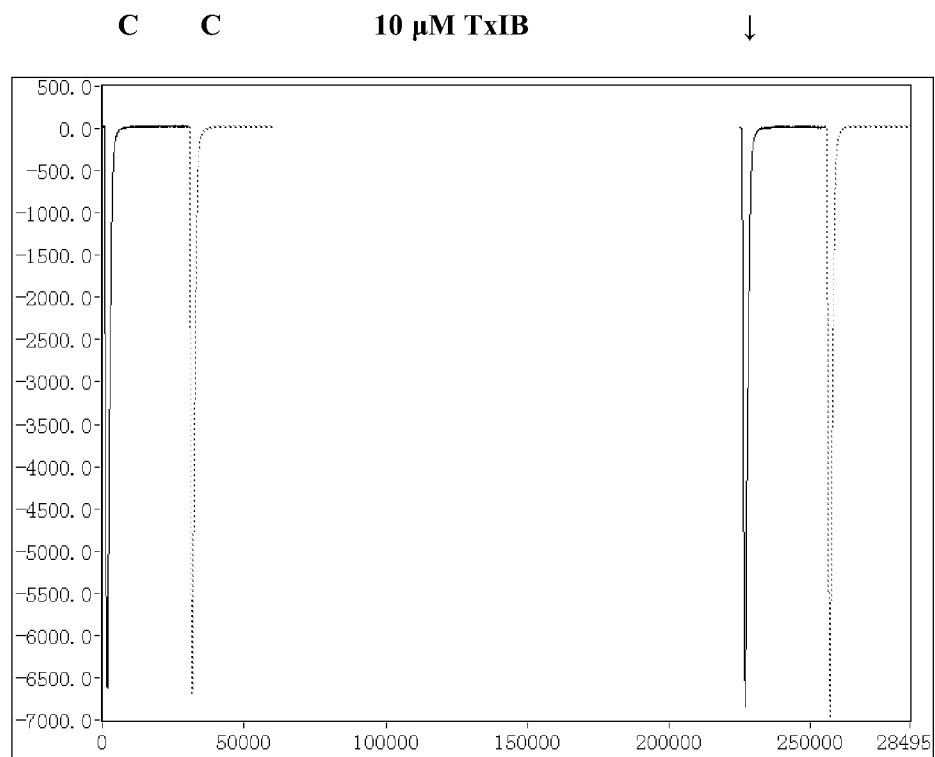


图 13 (D)

GTGGTTCIGGGTCCAGCATTGATGGCAGGAATGCTGCAGGCAACGACAAA 51
 V V L G P A F D G R N A A G N D K

ATGTCCGCCCTGATGGCTCTGACCA (C/T) CAGGGGATGCTGTTCATCCTGTC 102
 M S A L M A L T (T/D) R G C C S H P V
 processing 1 Mature Toxin

TGTAGCGCGATGAGTCCAATCTGTGGCTGAAGACGCTGATGCTCCAGGACC 153
 C S A M S P I C # * R R * C S R T
 processing 2 (#, C-terminal carboxamide)

CTCTGAACCACGACA 168
 L * T T T

图 14

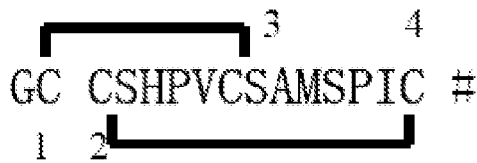


图 15 (A)

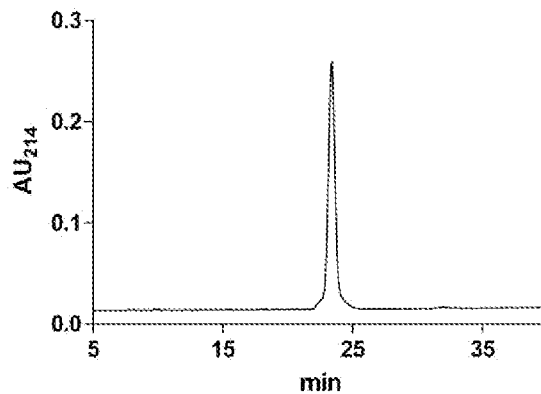


图 15 (B)

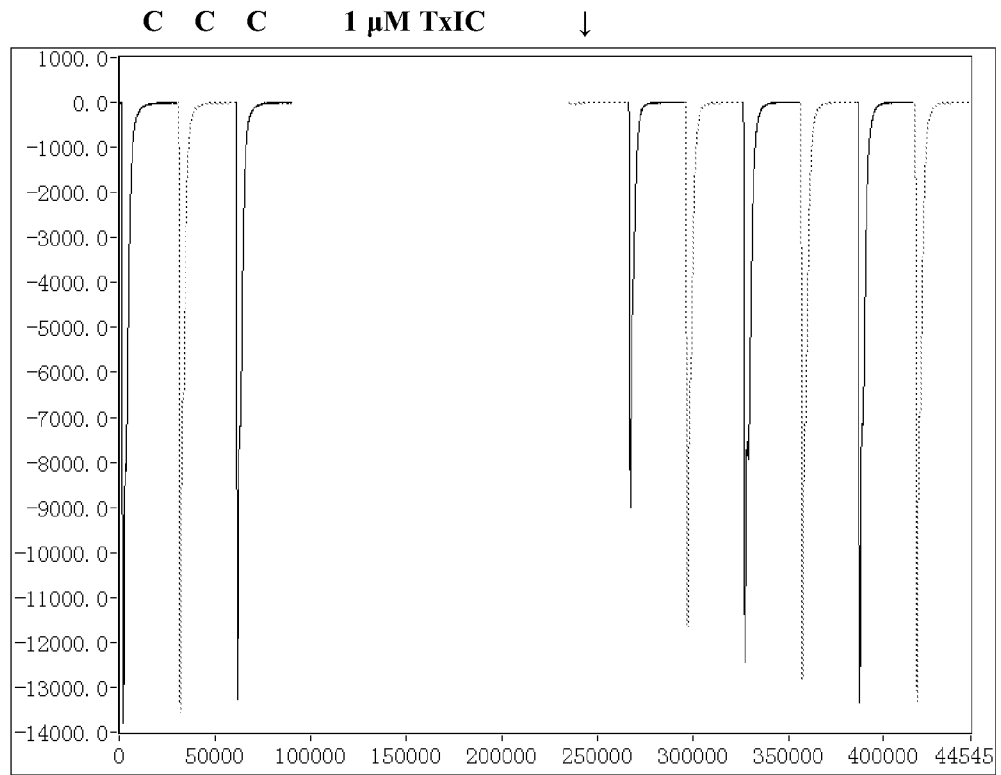


图 16 (A)

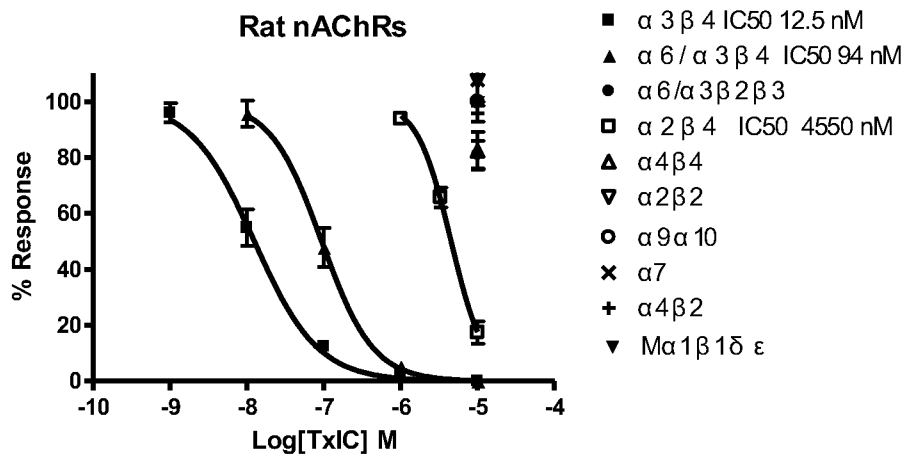


图 16 (B)

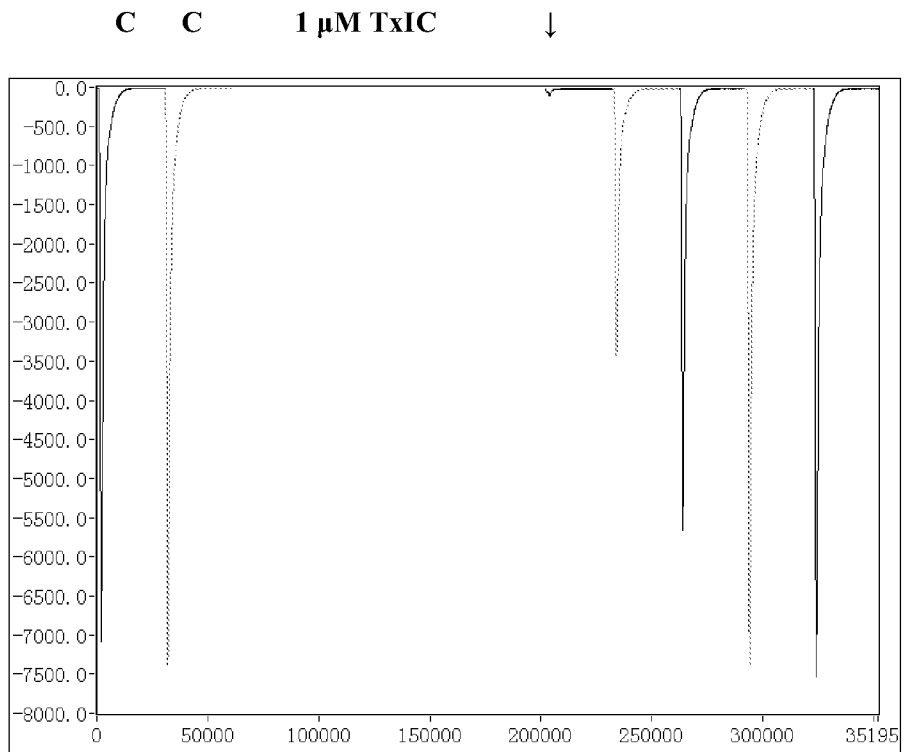


图 17 (A)

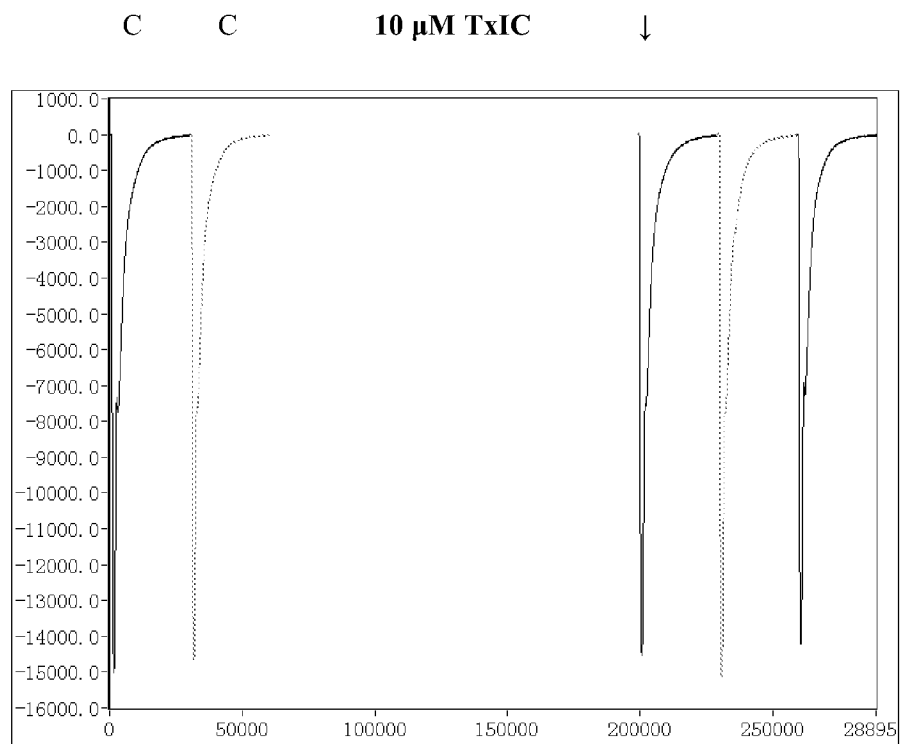


图 17 (B)

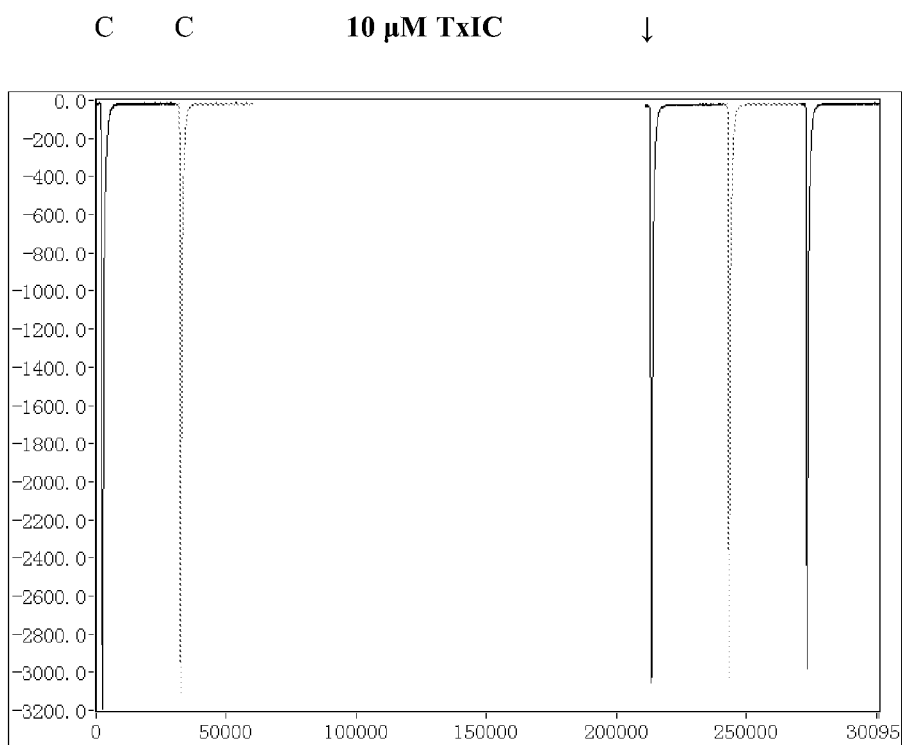


图 17 (C)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE: luo sulan, conus, conotoxin, conopeptide, nicotinic acetylcholine receptor, acetylcholine receptor, nachr etc.
Genbank, EMBL, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent: searching for SEQ ID NOs: 1-8, SEQ ID NOs: 11-31

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101448516 A (UNIV QUEENSLAND) 03 June 2009 (03.06.2009) see description, page 2, lines 1 and 2, lines 25-30, page 3, lines 21 and 22, page 4, line 25, page 6, lines 7-18, pages 6 and 7, table 1 and claims 11-22	1-9, 13-15
Y	ditto	12
X	US 6797808 B1 (UNIV UTAH RES FOUND et al.) 28 September 2004 (28.09.2004) see the abstract, description, column 1, line 53 to column 2, line 11, column 22, lines 35-45, column 43, table 37, column 57, table 67 and column 81, table 114	1-9, 15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
09 September 2013 (09.09.2013)

Date of mailing of the international search report
03 October 2013 (03.10.2013)

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer

WANG, Xiangyu
Telephone No. (86-10) 62411992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077363

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101381403 A (BIOENGINEERING RES INST ACAD MEDICAL SCI) 11 March 2009 (11.03.2009) see description, pages 2 and 3 and page 4, table 1	1-10, 15
Y	see description, pages 4-6	17
X	CHANG, D. et al., Genbank, AFD18554.1, GI: 379771989, 30 July 2012 (30.07.2012)	2
	CN 101745097 A (UNIV HAINAN) 23 June 2010 (23.06.2010)	
Y	see the abstract, description, paragraphs [0025], [0027] and claims 1, 2 and 8	12
Y	see description, paragraphs [0064] to [0069]	17
	CN 102875653 A (UNIV HAINAN) 16 January 2013 (16.01.2013)	
P, X	see claims 1-15	1-10, 12-15, 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077363

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11 and 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claims 11 and 16 relates to methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy (PCT Rule 39. 1(iv)).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/077363

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101448516 A	03.06.2009	WO 2007118270 A1	25.10.2007
		CA 2566832 A1	13.10.2007
		AU 2006236006 A1	01.11.2007
		EP 2015766 A1	21.01.2009
		INDELNP 200808574 E	01.05.2009
		JP 2009533355 A	17.09.2009
		US 2010120670 A1	13.05.2010
		AU 2006236006 B2	06.09.2012
		US 8354372 B2	15.01.2013
		US 2005143560 A1	30.06.2005
		US 7368432 B2	06.05.2008
US 6797808 B1	28.09.2004	US 6767896 B1	27.07.2004
		WO 0044776 A1	03.08.2000
		AU 2973500 A	18.08.2000
		EP 1147130 A1	24.10.2001
		JP 2002534996 A	22.10.2002
		US 2005032705 A1	10.02.2005
		US 7279549 B2	09.10.2007
		US 2008081901 A1	03.04.2008
		US 7666840 B2	23.02.2010
		CA 2361534 C	30.08.2011
		US 2012149869 A1	14.06.2012
		WO 0044769 A1	03.08.2000
		AU 3473800 A	18.08.2000
		US 2002004391 A1	10.01.2002
		AU 770076 B2	12.02.2004
		EP 1852440 A1	07.11.2007
		US 7373085 B2	13.05.2008
		US 2010145011 A1	10.06.2010
		US 7902153 B2	08.03.2011
		US 2011166322 A1	07.07.2011
CA 2743116 A1	03.08.2000		
US 8110549 B2	07.02.2012		
CN 101381403 A	11.03.2009	CN 101381403 B	16.03.2011
CN 101745097 A	23.06.2010	None	
CN 102875653 A	16.01.2013	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077363

Continuation of : CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08 (2006.01) i
C07K 14/435 (2006.01) i
C12N 15/12 (2006.01) i
C12N 15/63 (2006.01) i
C12N 1/21 (2006.01) i
C12N 1/19 (2006.01) i
C07K 19/00 (2006.01) i
A61K 38/10 (2006.01) i
A61K 38/17 (2006.01) i
A61P 25/04 (2006.01) i
A61P 25/16 (2006.01) i
A61P 25/28 (2006.01) i
A61P 25/34 (2006.01) i
A61P 25/36 (2006.01) i
A61P 29/00 (2006.01) i
C07K 1/04 (2006.01) i
C07K 1/06 (2006.01) i
C07K 1/16 (2006.01) i

A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC:C07K, C12N, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, CNTXT, CNKI 和检索词: 罗素兰, 芋螺毒素, 芋螺肽等		
DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI web of knowledge 和检索词: luo, sulan, conus, conotoxin, conopeptide, nicotinic acetylcholine receptor, acetylcholine receptor, nachr 等		
中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL 和检索的序列: SEQ ID NOs:1-8 和 SEQ ID NOs:11-31		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101448516 A (昆士兰大学) 03.6 月 2009 (03.06.2009) 权利要求 11-22, 说明书第 2 页第 1-2 行和 25-30 行, 第 3 页 21-22 行, 第 4 页第 25 行, 第 6 页第 7-18 行, 说明书第 6-7 页表 1	1-9 和 13-15
Y	同上	12
X	US 6797808 B1 (UNIV UTAH RES FOUND 等) 28.9 月 2004 (28.09.2004) 摘要, 说明书第 1 栏第 53 行-第 2 栏第 11 行, 第 22 栏第 35-45 行, 第 43 栏表 37, 第 57 栏表 67, 第 81 栏表 114	1-9 和 15
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“&” 同族专利的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 09.9 月 2013 (09.09.2013)	国际检索报告邮寄日期 03.10 月 2013 (03.10.2013)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 王翔宇 电话号码: (86-10) 62411992	

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101381403 A (中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所) 11.3 月 2009 (11.03.2009) 说明书第 2-3 页, 第 4 页表 1	1-10 和 15
Y	说明书第 4-6 页	17
X	CHANG, D.等, Genbank, AFD18554.1, GI: 379771989, 30.7 月 2012 (30.07.2012)	2
Y	CN 101745097 A (海南大学) 23.6 月 2010 (23.06.2010) 摘要, 权利要求 1-2 和 8, 说明书第[0025]和[0027]段	12
Y	说明书第[0064]-[0069]段	17
P, X	CN 102875653 A (海南大学) 16.1 月 2013 (16.01.2013) 权利要求 1-15	1-10, 12-15 和 17

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：11 和 16

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

PCT 实施细则 39.1 (iv) — 治疗人体或者动物体的外科手术或者治疗方法。

2. 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/077363

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101448516 A	03.06.2009	WO 2007118270 A1	25.10.2007
		CA 2566832 A1	13.10.2007
		AU 2006236006 A1	01.11.2007
		EP 2015766 A1	21.01.2009
		INDELNP 200808574 E	01.05.2009
		JP 2009533355 A	17.09.2009
		US 2010120670 A1	13.05.2010
		AU 2006236006 B2	06.09.2012
		US 8354372 B2	15.01.2013
		US 6797808 B1	28.09.2004
US 7368432 B2	06.05.2008		
US 6767896 B1	27.07.2004		
WO 0044776 A1	03.08.2000		
AU 2973500 A	18.08.2000		
EP 1147130 A1	24.10.2001		
JP 2002534996 A	22.10.2002		
US 2005032705 A1	10.02.2005		
US 7279549 B2	09.10.2007		
US 2008081901 A1	03.04.2008		
US 7666840 B2	23.02.2010		
CA 2361534 C	30.08.2011		
US 2012149869 A1	14.06.2012		
WO 0044769 A1	03.08.2000		
AU 3473800 A	18.08.2000		
US 2002004391 A1	10.01.2002		
AU 770076 B2	12.02.2004		
EP 1852440 A1	07.11.2007		
US 7373085 B2	13.05.2008		
US 2010145011 A1	10.06.2010		
US 7902153 B2	08.03.2011		
US 2011166322 A1	07.07.2011		
CA 2743116 A1	03.08.2000		
US 8110549 B2	07.02.2012		
CN 101381403 A	11.03.2009	CN 101381403 B	16.03.2011
CN 101745097 A	23.06.2010	无	
CN 102875653 A	16.01.2013	无	

续：A.主题的分类

C07K 7/08 (2006.01) i
C07K 14/435 (2006.01) i
C12N 15/12 (2006.01) i
C12N 15/63 (2006.01) i
C12N 1/21 (2006.01) i
C12N 1/19 (2006.01) i
C07K 19/00 (2006.01) i
A61K 38/10 (2006.01) i
A61K 38/17 (2006.01) i
A61P 25/04 (2006.01) i
A61P 25/16 (2006.01) i
A61P 25/28 (2006.01) i
A61P 25/34 (2006.01) i
A61P 25/36 (2006.01) i
A61P 29/00 (2006.01) i
C07K 1/04 (2006.01) i
C07K 1/06 (2006.01) i
C07K 1/16 (2006.01) i