

(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
2016 年 6 月 30 日 (30.06.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/101277 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C07K 1/04* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C07K 1/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/095198

(22) 国际申请日: 2014 年 12 月 26 日 (26.12.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN)
[CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 刘杰 (LIU, Jie); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。林志龙 (LIN, Zhilong); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。闻博 (WEN, Bo); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。童婷 (TONG, Ting); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。莫芬 (MO, Fen); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。彭超 (PENG, Chao); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。石琼 (SHI, Qiong); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路 39 号西金大厦 6 层, Beijing 100036 (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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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: CONOTOXIN PEPTIDE K-CPTX-BTL04, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04、其制备方法及应用

(57) Abstract: Provided are a conotoxin peptide κ -CPTx-btl04 and a derivative polypeptide. The amino acid sequence of the conotoxin peptide is indicated by SEQ ID NO:1. Also provided are a conotoxin peptide preparation method and uses of the conotoxin peptide in the treatment of diseases related to a calcium ion channel.

(57) 摘要: 提供了一种芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 及其衍生多肽, 所述芋螺毒素肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。还提供了所述芋螺毒素肽的制备方法及其在治疗钙离子通道相关疾病中的应用。



WO 2016/101277 A1

说明书

芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04、其制备方法及应用

技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体地，涉及一种新的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，编码该肽的多核苷酸，含有该多核苷酸的构建体、表达载体和宿主细胞，该肽的天然提取及人工合成方法，以及该肽的医药用途。

背景技术

钙离子通道是广泛分布于兴奋细胞的跨膜蛋白，调节细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞质，参与一系列 Ca^{2+} 依赖的生理活动，如激素及神经递质释放、肌肉收缩和细胞信号传导等。根据对电压的敏感性不同分为低电压激活钙离子通道（LVA）或 T-型钙通道（Cav3.x）和高电压激活钙离子通道（HVA），HVA 钙通道包括 L-型（Cav1.x）、P/Q-型（Cav2.1）、N-型（Cav2.2）和 R-型（Cav2.3）钙通道。Cav1.x 通道参与肌肉收缩和细胞分泌，Cav2.x 参与神经递质释放和神经元兴奋调节。钙通道由起主要功能的 α 亚基和辅助功能的 β 、 γ 及 δ 亚基组成。

钙通道阻滞剂广泛存在于动物毒液中，如蜈蚣、蜘蛛等，目前已开发出很多如二氢吡啶类小分子钙通道阻滞剂药物，典型药物有选择性钙离子阻滞剂硝苯地平，该类药物在临床上主要应用于治疗高血压、冠心病、心律失常、心绞痛、脑血管病等，属当前应用最广泛和频率较高的一类靶点药物。

然而，目前已开发的多肽类钙通道阻滞剂药物则相对较少，如齐考诺肽是一类 N-型钙通道阻滞剂，用于治疗难治性慢性疼痛。多肽类钙通道阻滞剂因其众多优势，如高选择性、高亲脂性和高安全性，将成为未来钙通道阻滞剂药物开发的热点。

高血压是当今世界最常见的心血管疾病之一，也是心脑血管疾病的主要危险因素。中国疾控中心慢病防控中心公布的研究结果显示，我国高血压患者人数已突破 3.3 亿

人，平均每 3 个成人中就有 1 人是高血压患者。一线抗高血压药物有 5 类，分别是钙通道阻滞剂（CCB）、血管紧张素转换酶抑制剂（ACE I）、血管紧张素受体阻滞剂（ARB）、利尿剂和 β 受体阻滞剂。其中，钙通道阻滞剂是目前降压药零售市场的主力军，其主要通过阻断心肌和血管平滑肌细胞膜上的钙离子通道，抑制细胞外的钙离子内流，使细胞内钙离子水平降低而引起心血管等组织平滑肌收缩率降低，血管舒张，从而降低血压。

芋螺是一类广泛分布于热带海洋的有毒动物，其毒液中含有大量的多肽类离子通道活性物质，例如 ω -Conotoxin，能专一阻断电压敏感型钙离子通道，是开发多肽类钙通道阻滞剂类降压药的重要天然资源。

发明内容

本发明的目的在于提供一种新的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，编码该肽的多核苷酸，含有该多核苷酸的构建体、表达载体和转化的宿主细胞，该肽的天然提取及人工合成方法，以及该肽的医药用途。

本发明通过以下技术方案实现上述目的：

第一方面，本发明提供了一种芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，其为：

（a）如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的多肽；

（b）如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、添加或缺失而形成的，具有（a）多肽功能的由（a）衍生的多肽；所述被取代、添加或缺失的氨基酸中不包括半胱氨酸；所述功能为抑制钙离子通道的活性；

所述（a）和（b）多肽的氨基酸序列内含两对二硫键，其为所述多肽发挥钙离子通道抑制活性的必要条件，因此，如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的半胱氨酸是不能被取代、添加或缺失的。

上述芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 中，作为优选，所述一个或多个氨基酸的取代选自

由以下组成的组：

- (i) 第 1 位的丝氨酸被苏氨酸取代；
- (ii) 第 2 位的亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸取代；
- (iii) 第 9 位的色氨酸被酪氨酸或苯丙氨酸取代。

本发明的发明人首次从海南产桶形芋螺 (*Conus betulinus*) 毒管中提取并鉴定了本发明的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，其氨基酸序列为：SLCCPEDRWCC (即 SEQ ID NO:1)，其分子量为 1313.47 Da。

发明人还发现，通过对 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的一个或多个特定氨基酸残基进行特定的取代，还可以保留其原有的功能，即为所述 (b) 多肽。

第二方面，本发明提供了编码如第一方面所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的多核苷酸。

在具体实施方案中，当芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 具有如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列时，编码其的多核苷酸具有如 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列，即其核苷酸序列为：TCCTTGCTGCTGCCCAGAAGATAGGTGGTGCTGT。

第三方面，本发明提供了一种核酸构建体，其包含如第二方面所述的多核苷酸，以及与之可操作连接、可指导多肽在表达宿主中生产的一个或多个控制序列。

第四方面，本发明提供了一种表达载体，其包含如第三方面所述的核酸构建体。

第五方面，本发明提供了一种转化的细胞，其中转化了如第三方面所述的核酸构建体或如第四方面所述的表达载体。

第六方面，本发明提供了如第一方面所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 在制备抑制钙离子通道的药物中的应用；优选地，所述钙离子通道为高电压激活钙离子通道。

发明人研究了本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的生物学活性。具体地，采用全细胞膜片钳方法检测本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 对背根神经节细胞 (DRG 细胞) 离

子通道的作用。实验中,给予两个去极化刺激,第一个从-90mV 到-30mV,刺激 250 ms,第二个从-60mV 到 0mV,刺激 250 ms,两个刺激的间隔是 500ms,同时记录 LVA 钙通道和 HVA 钙通道。通过与阳性对照物硝苯地平(Nifedipine,第一代钙通道阻滞剂,为抗高血压、防治心绞痛药物,是 20 世纪 80 年代中期世界畅销的药物之一)的活性比较分析,确定其钙离子通道抑制效果及其后续的应用方向。

发明人通过上述实验发现,本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 能够有效抑制高电压激活钙离子通道(HVA)电流,抑制效果比阳性对照硝苯地平更高。

第七方面,本发明提供了如第一方面所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 在制备治疗心血管系统疾病药物中的应用;优选地,所述心血管系统疾病为高血压、心绞痛或冠心病。

根据第六方面所述,由于本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 能够有效抑制高电压激活钙离子通道(HVA)电流,因而可应用于治疗高血压、心绞痛、冠心病等疾病。

第八方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含如第一方面所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 及药学上可接受的载体。

第九方面,本发明提供了如第一方面所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的制备方法,其包括:

(1) 采用固相化学合成法、优选苄甲氧羰基固相化学合成法,按其氨基酸序列合成芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的线性肽;

(2) 用谷胱甘肽法对步骤(1)所得线性肽进行氧化复性。

此外,当芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 为如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的多肽时,还可以通过从天然生物体中提取获得。具体地,发明人从海南桶形芋螺(*Conus betulinus*)的毒管中从海南桶形芋螺(*Conus betulinus*)的毒管中提取毒素多肽,然后进行分离、鉴定的步骤即可获得;优选地,采用强阳离子交换高效液相色谱进行分

离；优选地，采用质谱法进行多肽鉴定。

在具体实施方案中，采用下述步骤提取并鉴定具有如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04：

收集海南产桶形芋螺 (*Conus betulinus*)，取毒管，提取其毒素多肽。经二硫苏糖醇 (DTT) 和碘乙酰胺 (IAM) 还原烷基化处理后，用强阳离子交换高效液相色谱 (SCX-HPLC) 分组分后采用纳升高效液相色谱-质谱联用仪 (nanoLC-MS/MS) 进行多肽质谱检测。产生的质谱数据经过数据解析和生物信息分析后得到芋螺毒素多肽完整的氨基酸序列。

有益效果

本发明的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 来源于天然活性动物资源，属于钙通道阻滞剂，与传统小分子药物相比，具有高选择性、高亲脂性和高安全性等优点；又因其结构简单、易于人工合成，能有效抑制钙通道电流且其活性比硝苯地平更高，因此可广泛用于钙离子通道相关疾病的治疗，例如，在临床上对于治疗高血压、冠心病、心绞痛等疾病具有巨大潜力。

附图说明

图 1 显示本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的质谱序列鉴定结果；

图 2 显示 10 μ M 芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 对高电压激活钙通道的抑制作用；

图 3 显示 10 μ M 硝苯地平对高电压激活钙通道的抑制作用。

具体实施方式

为便于理解本发明，本发明列举实施例如下。本领域技术人员应该明了，所述实施例仅仅是帮助理解本发明，不应视为对本发明的具体限制。

实施例 1 本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的提取和鉴定

1、芋螺毒液提取及还原烷基化

将 4 只海南产桶形芋螺 (*Conus betulinus*) 砸壳后解剖剪取毒管, 收集芋螺毒液。使用 Bradford 法测定毒液中蛋白浓度为 6.48 mg/ml。取总蛋白量为 0.5 mg, 加入终浓度为 1 mM 的 DTT, 于 56°C 反应 1 h, 还原冷却至室温后加入终浓度为 55 mM 的 IAM 于室温暗室反应 45 min。

2、毒素多肽富集

将经上述处理的芋螺毒素多肽, 用 Strata-X C18 柱多芋螺毒液中多肽进行富集。Strata-X C18 富集操作按标准规程操作: 1) 加 1ml 甲醇活化柱子; 2) 加 1 ml 0.1% FA 平衡柱子; 3) 毒液样品上样 1 ml, buffer (5%ACN+0.1%FA) wash, 重复 wash 3 次; 4) 100%ACN 洗脱, 收集洗脱液。富集多肽用 MALDI-TOF-MS 检测其分子量大小。

3、芋螺毒素多肽序列鉴定

将 240 μ g 混合肽经 SCX-HPLC (Shimadzu) 系统进行组分分离: buffer A: 10mM KH_2PO_4 in 25% ACN, pH 3.5; buffer B 是在 buffer A 的基础上加入 500 mM 氯化钾; 流速 1 ml/min, 0-40%的线性二元梯度的 buffer B 洗脱 10 分钟, 40-90%的 buffer B 洗脱 2 分钟, 90%的 buffer B 洗脱 3 分钟, 214nm 进行吸光度检测, 通过梯度洗脱共收集 10 个馏分。收集馏分经 C18 固相萃取柱除盐 (Strata-X, Phenomenex) 后用 30 μ l 的 0.1%的甲酸复溶, 进行 nanoLC-MS/MS 分析。

4、nanoLC-MS/MS 分析

液质联用仪采用的是岛津的 nano HPLC 色谱仪系统和 AB Sciex 的 Triple TOF 5600 质谱仪系统。每个预分离好的多肽组分分别经过自制的 12 cm 长, 75 μ m 内径, 填充了粒径 3 μ m 孔径 120A 的 Welch Materials 品牌 XB-C18 柱料的 Ultimate 毛细管分析柱分离, 流速为 300 nl/min。检测进样体积为 25 μ l, 洗脱梯度为 B 液浓度从 5%均匀上升到 45%经过 40min。质谱采集的电喷雾电压为 2.5kV, 辅气气压为 30PSI, 鞘气气压为 15PSI, 源温度为 150°C。一级质谱的采集使用大于或等于 30000 的高分辨率模式。

二级质谱的采集，选择母离子价态在 2 电荷到 5 电荷的范围，扫描一次一级质谱后可接着连续做 30 个二级质谱碎裂，这样在 250ms 内完成对 30 个二级谱子离子的扫描，每秒可产生超过 120 张二级谱，总的一个循环时间为 3.3 秒。

在得到的原始质谱数据中，相应于本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的质谱序列搜索比对结果如图 1 所示。

5、数据分析

将 nanoLC-MS/MS 检测得到的原始质谱数据进行格式转换成 MGF 后，再用 Mascot 搜索软件进行数据搜索鉴定。得到的多肽序列中，通过序列特征分析选取全长氨基酸序列为 SLCCPEDRWCC 的 κ -CPTx-btl04 多肽。

实施例 2 本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的化学合成

应用苄氧羰基 (Fmoc) 固相化学合成的方法合成如 SEQ ID NO:1 所示序列的芋螺毒素线性肽（由上海吉尔生化合成公司完成）。

化学合成的多肽使用谷胱甘肽氧化复性法进行复性，即：

取多肽按质量体积比 1：10 溶解于 0.1M Tris-HCl，0.1M NaCl，5mM GSH，0.5mM GSSG，PH 7.4 溶液中，25℃反应 24~48 h。用 MALDI-TOF-MS 检测复性效果。

实施例 3 本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 对钙离子通道的抑制活性

采用膜片钳技术，检测本发明芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 对钙离子通道的抑制活性。具体地，称取实施例 2 中制备的、复性后的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，通过全细胞膜片钳方法检测芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 对大鼠背根神经节 (DRG) 细胞离子通道的作用。以硝苯地平为阳性对照。

膜片钳中细胞内、外液配置：

细胞外液：140 mM NaCl，4 mM KCl，1 mM MgCl₂，2 mM CaCl₂，5 mM D-葡萄糖一水物 (D-Glucose monohydrate)，10 mM HEPES (pH=7.4)；细胞内液：20 mM KCl，

110 mM 天冬氨酸钾(KAspartic), 1 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES(pH=7.2)。

取出恒温培养箱中的 DRG 细胞(从 SD 大鼠中急性分离培养的背根神经节细胞), 用室温下平衡好的细胞外液更换培养皿内的培养液, 以防止溶液温度的剧烈变化。加细胞外液是用枪沿着皿壁轻轻加入, 以防止细胞从培养皿底部脱落。将换好液的细胞放置倒置显微镜下观察, 选择细胞膜较为光滑、细胞质均匀的细胞, 在室温 20-25 °C 条件下进行膜片钳实验。

选用 100 μ l 硼硅酸盐玻璃毛坯为玻璃微电极材料。经拉制仪两步拉制使电极尖端口径为 1.5-3.0 μ m, 玻璃微电极入液后初始电阻为 2-4 M Ω 。电极充灌安装并移入液面后即给持续正压以保证电极尖端清洁, 即进行液接电位补偿。在倒置显微镜下将微电极移至所选细胞上方并接近细胞, 去除正压并开始稍施负压吸引, 待电极与细胞膜之间形成高阻抗的吉欧(G Ω)封接后, 即进行电极快电容(fast capacitance)补偿。然后将细胞钳制在 -60 mV, 给予一短而有力的负压, 将钳制在微电极中的细胞膜迅速打破, 再进行细胞慢电容(Slow capacitance)补偿。形成全细胞记录模式后将细胞钳制为 -90 mV, 细胞稳定 4-6 min 后, 给予细胞两个去极化刺激, 第一个从 -90mV 到 -30mV, 刺激 250 ms, 第二个从 -60mV 到 0mV, 刺激 250 ms, 两个刺激的间隔是 500ms, 同时记录 LVA 钙通道和 HVA 钙通道。向细胞外液中加入多肽样品使其有效浓度达 10 μ M 同时观察记录钙通道电流的变化(实验重复三次, 结果为三次重复的平均值)。串联电阻(R_s)在实验过程中在 <10 M Ω 的范围之内始终保持不变, 系统串联电阻(R_{series} compensation)补偿在 30~70%之间。

芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的检测结果显示如图 2 所示, 硝苯地平的检测结果如图 3 所示, 10 μ M 的 κ -CPTx-btl04 对 DRG 神经元细胞 HVA 钙通道电流的抑制率为 81.18%(如表 1)。上述结果显示: 相同浓度的 κ -CPTx-btl04 与硝苯地平比较, 对 HVA 钙通道电流的抑制率更高, 提示其可以作为降压药的候选药物。

表 1、芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 对钙离子通道抑制率的膜片钳检测结果

测试药物	细胞编号	加样前电流 (pA)	加样后电流 (pA)	抑制率 (%)
κ -CPTx-btl04	140903009	-438.34	-82.49	81.18
硝苯地平	140904007	-1471.35	-734.31	50.09

申请人声明，本发明通过上述实施例来说明本发明的产品、详细制备工艺及其用途，但本发明并不局限于上述详细制备工艺和用途，即不意味着本发明必须依赖上述详细制备工艺和用途才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本发明的任何改进，对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，其为：

(a) 如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的多肽；或者，

(b) 如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列经过一个或多个氨基酸的取代、添加或缺失而形成的，具有 (a) 多肽功能的由 (a) 衍生的多肽；所述被取代、添加或缺失的氨基酸中不包括半胱氨酸；

所述 (a) 和 (b) 多肽的氨基酸序列内含两对二硫键。

2、如权利要求 1 所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04，其特征在于，所述一个或多个氨基酸的取代选自以下组成的组：

(i) 第 1 位的丝氨酸被苏氨酸取代；

(ii) 第 2 位的亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸取代；

(iii) 第 9 位的色氨酸被酪氨酸或苯丙氨酸取代。

3、编码如权利要求 1 或 2 所述芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的多核苷酸。

4、一种核酸构建体，其包含权利要求 3 所述的多核苷酸，以及与之可操作连接、可指导多肽在表达宿主中生产的一个或多个控制序列。

5、一种表达载体，其包含权利要求 4 所述的核酸构建体。

6、一种转化的细胞，其中转化了权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 5 所述的表达载体。

7、如权利要求 1 或 2 所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 在制备抑制钙离子通道的药物中的应用；优选地，所述钙离子通道为高电压激活钙离子通道。

8、如权利要求 1 或 2 所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 在制备治疗心血管系统疾病药物中的应用；优选地，所述心血管系统疾病为高血压、心绞痛或冠心病。

9、一种药物组合物，其包含权利要求 1 或 2 所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 及药学上可接受的载体。

10、如权利要求 1 或 2 所述的芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的制备方法，其包括：

(1) 采用固相化学合成法、优选苄甲氧羰基固相化学合成法，按其氨基酸序列合成芋螺毒素肽 κ -CPTx-btl04 的线性肽；

(2) 用谷胱甘肽法对步骤 (1) 所得线性肽进行氧化复性。

说明书附图

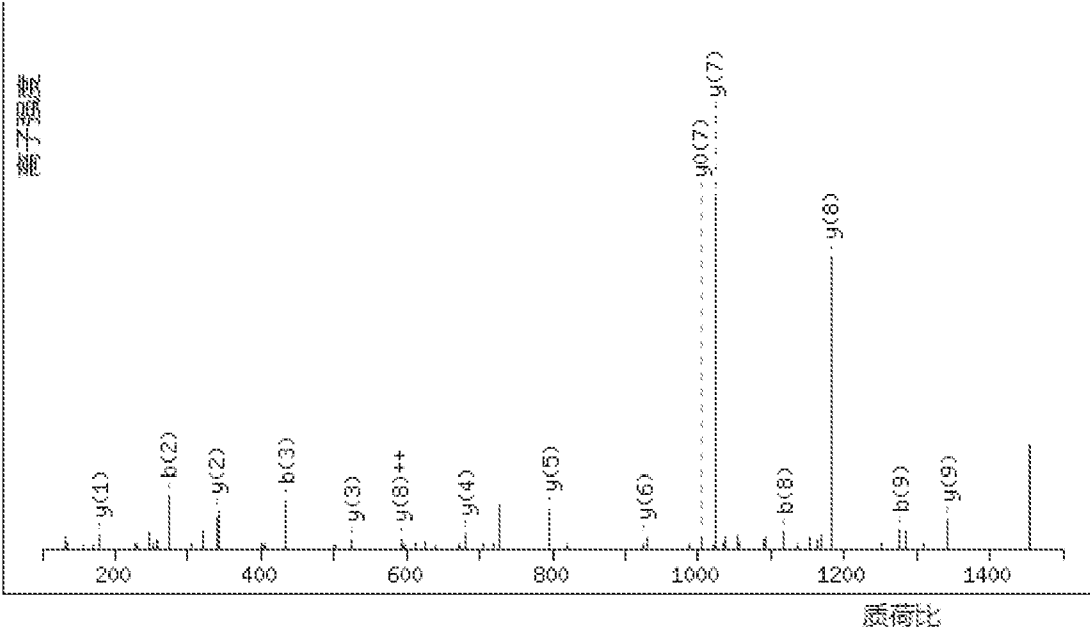


图 1

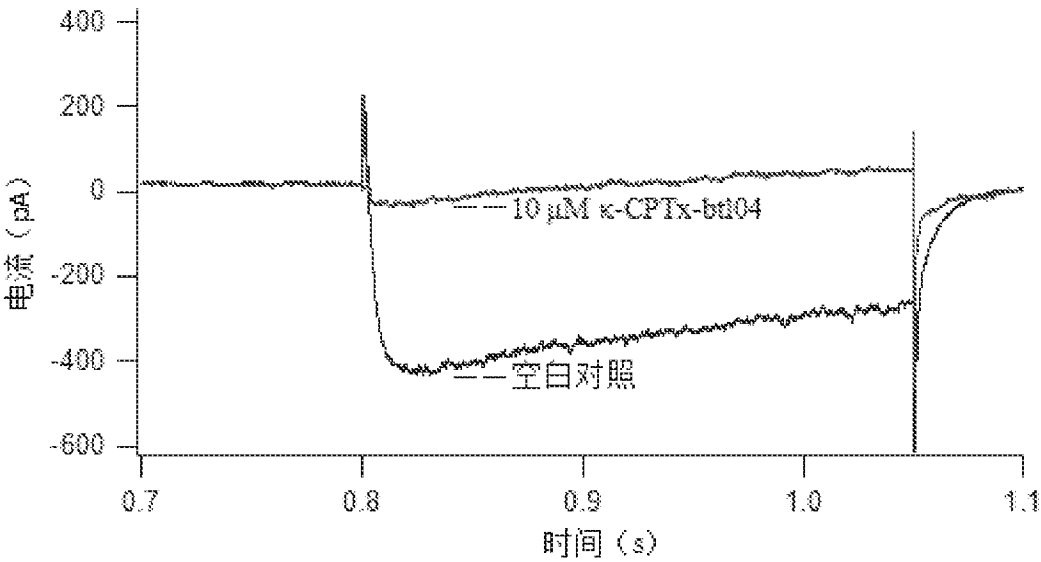


图 2

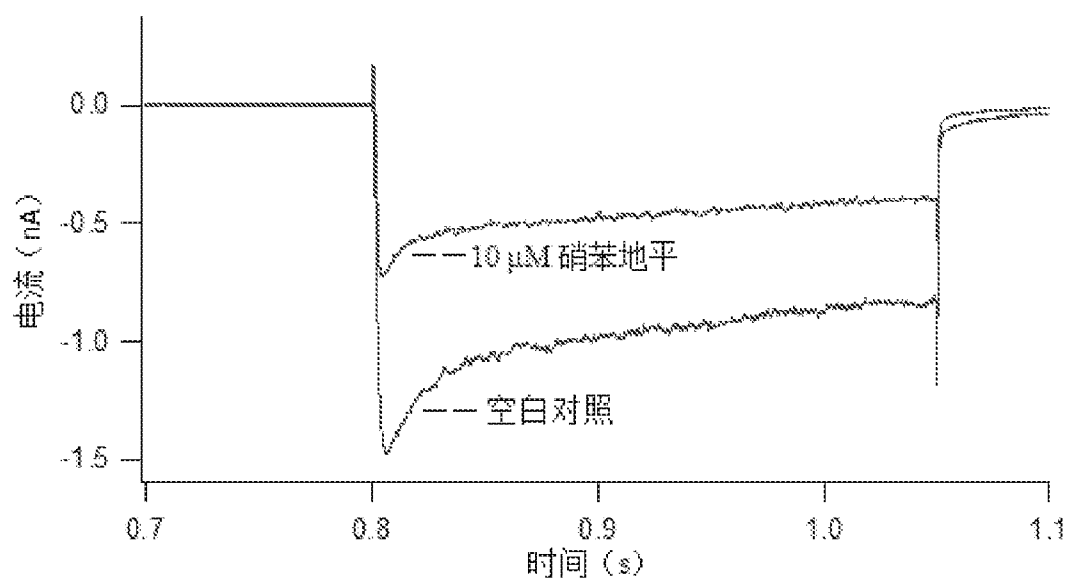


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/095198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06 (2006.01) i; C12N 15/12 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 38/08 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; C07K 1/04 (2006.01) i; C07K 1/06 (2006.01) i

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)

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)

CPRSABS; CNKI; CNTXT and search terms: conotoxin, calcium channel etc.

DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA and search terms: conotoxin, CTX, BtX, conus, betulinus, conopeptide, kappa, calcium channel etc.

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL; STN and search sequences: SEQ ID NOs: 1 and 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1237584 A (INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES, CHINA), 08 December 1999 (08.12.1999), see the whole document	1-10 (parts)
A	WO 9734925 A1 (UNIV UTAH RES FOUND), 25 September 1997 (25.09.1997), see the whole document	1-10 (parts)
A	Fan, C.X. et al., "A Novel Conotoxin from Conus betulinus, κ -BtX, Unique in Cysteine Pattern and in Function as a Specific BK Channel Modulator", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 15, 11 April 2003 (11.04.2003), see pages 12624-12633	1-10 (parts)

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 September 2015 (06.09.2015)	Date of mailing of the international search report 08 October 2015 (08.10.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 HE, Rui Telephone No.: (86-10) 62411106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/095198

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-10 (parts)
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:
[1] "multiple" is used in one of the technical solutions of claim 1, but has no definite meanings, and therefore the technical solution of claim 1 is not clear, and does not comply with the requirements of PCT Article 6. Claims 2-10 (parts) based on the technical solution are also not clear, and do not comply with the requirements of PCT Article 6.

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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/095198

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1237584 A	08 December 1999	CN 1169830 C	06 October 2004
WO 9734925 A1	25 September 1997	AU 2069097 A	10 October 1997
		US 5672682 A	30 September 1997
		EP 0922055 B1	06 October 2004
		JP 2001500474 A	16 January 2001
		DE 69731097 T2	17 February 2005
		ES 2232861 T3	01 June 2005
		CA 2248710 C	12 June 2007
		EP 0922055 A1	16 June 1999
		CA 2248710 A1	25 September 1997
		AT 278708 T	15 October 2004
		DE 69731097 D1	11 November 2004
		JP 3953110 B2	08 August 2007
		EP 0922055 A4	23 January 2002
		AU 724408 B2	21 September 2000

A. 主题的分类		
C07K 7/06(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/08(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; C07K 1/04(2006.01)i; C07K 1/06(2006.01)i		
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)		
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))		
CPRSABS; CNKI; CNTXT和检索词: 芋螺毒素, 钙离子通道等 DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA和检索词: conotoxin, CTX, BtX, conus, betulinus, conopeptide, kappa, calcium channel等 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs:1和2		
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
A	CN 1237584 A (放军军事医学科学院生物工程研究所) 1999年 12月 8日 (1999 - 12 - 08) 参见全文	1-10 (部分)
A	WO 9734925 A1 (UNIV UTAH RES FOUND) 1997年 9月 25日 (1997 - 09 - 25) 参见全文	1-10 (部分)
A	Fan, CX等. "A Novel Conotoxin from Conus betulinus, κ -BtX, Unique in Cysteine Pattern and in Function as a Specific BK Channel Modulator" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第278卷, 第15期, 2003年 4月 11日 (2003 - 04 - 11), 参见第12624-12633页	1-10 (部分)
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “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) “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 “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 “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 “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 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2015年 9月 6日		2015年 10月 8日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国		何睿
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62411106

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：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 1-10（部分）
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：
[1] 权利要求1中的技术方案之一中使用了“多个”，“多个”没有确定的含义，因此，权利要求1的该技术方案不清楚，不符合PCT条约第6条的规定。基于该技术方案的权利要求2-10（部分）也不清楚，不符合PCT条约第6条的规定。
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。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/095198

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1237584	A	1999年 12月 8日	CN	1169830	C	2004年 10月 6日
WO	9734925	A1	1997年 9月 25日	AU	2069097	A	1997年 10月 10日
				US	5672682	A	1997年 9月 30日
				EP	0922055	B1	2004年 10月 6日
				JP	2001500474	A	2001年 1月 16日
				DE	69731097	T2	2005年 2月 17日
				ES	2232861	T3	2005年 6月 1日
				CA	2248710	C	2007年 6月 12日
				EP	0922055	A1	1999年 6月 16日
				CA	2248710	A1	1997年 9月 25日
				AT	278708	T	2004年 10月 15日
				DE	69731097	D1	2004年 11月 11日
				JP	3953110	B2	2007年 8月 8日
				EP	0922055	A4	2002年 1月 23日
				AU	724408	B2	2000年 9月 21日