



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118488846 A

(43) 申请公布日 2024.08.13

(21) 申请号 202280081515.1

(22) 申请日 2022.12.08

(30) 优先权数据

21213798.8 2021.12.10 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/084971 2022.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/104960 EN 2023.06.15

(71) 申请人 霍巴治疗公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 K·彼得森 G·门罗

T·梅尔德加德 马德森

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 23/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书30页

序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

伤害性疼痛的治疗

(57) 摘要

本公开文本涉及镍纹蛋白及其在预防和/或治疗伤害性疼痛中的用途。可以通过向患者施用镍纹蛋白来治疗由例如身体损伤或炎症引起的急性和慢性伤害性疼痛。

1. 一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的多肽,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

2. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述伤害性疼痛是躯体疼痛或内脏疼痛。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述伤害性疼痛是炎性疼痛、下背部疼痛、肩部疼痛、肌肉骨骼疼痛、关节炎疼痛、关节疼痛、术后疼痛、创伤后疼痛或癌症疼痛。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述伤害性疼痛选自炎性疼痛和术后疼痛。

5. 根据权利要求3所述的用于所述用途的多肽,其中所述伤害性疼痛是炎性疼痛,如炎性痛觉过敏。

6. 根据权利要求1所述的用于所述用途的多肽,其中所述受试者患有关节炎。

7. 根据权利要求6所述的用于所述用途的多肽,其中所述关节炎选自骨关节炎、类风湿性关节炎、或狼疮。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述多肽与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性,更优选与SEQ ID NO:3具有至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选90%、更优选95%、更优选98%序列同一性。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中将所述多肽通过全身施用来施用。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中将所述多肽通过肠胃外注射,优选皮下注射或鞘内注射来施用。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中将所述多肽以 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $10,000\mu\text{g}/\text{kg}$ ,如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $7,500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $5,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $2,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $1,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $700\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ - $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 身体的剂量来施用。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中每周施用所述多肽至少1-3次,如每周2-5次,如每周3-6次。

14. 一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的核酸分子,所述核酸分子包含编码多肽的核酸序列,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

a. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

b. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

15. 一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的载体,所述载体包含编码根据权利要求1至13中任一项所述的多肽的多核苷酸。

## 伤害性疼痛的治疗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及镍纹蛋白及其在治疗和/或预防伤害性疼痛中的用途。

### 背景技术

[0002] 急性疼痛是一种不愉快的、动态的心理生理过程,其通常响应于组织创伤和相关的炎症过程而发生,并且在伤口愈合中发挥重要作用。然而,持续超过3个月的愈合期的疼痛(根据国际疾病分类,第11版标准)没有明显的生物学目的,并且被认为是天然慢性的。国际疼痛研究协会(The International Association for the Study of Pain)将疼痛定义为“与实际或潜在的组织损伤相关或类似的不愉快的感觉和情感体验”,将慢性疼痛分类为三个主要类别:伤害性、神经性和伤害可塑性疼痛。伤害性疼痛是慢性疼痛的最常见形式,包括关节炎和大多数形式的脊柱疼痛。然而,人们越来越认识到,许多疼痛病症(尤其是涉及癌症和脊柱疼痛的那些)具有混合疼痛表型。为了本申请的目的,将这三种慢性疼痛类别进行简要比较,以帮助提供精确的定义。

[0003] 伤害性疼痛与神经性疼痛和伤害可塑性疼痛

[0004] 伤害性疼痛由组织损伤或潜在的组织损伤引起。典型的例子包括通过正常磨损发生的退行性变化(退行性椎间盘疾病、关节突关节病、原发性骨关节炎)、创伤(例如烧伤、肌肉撕裂、创伤性关节炎)、肌肉痉挛、内脏病理(例如溃疡、肾结石、胰腺炎)。它通常被描述为具有悸动或疼痛的性质,并且与神经性疼痛相反,很少与感觉缺陷(例如麻木、麻刺感、刺痛)相关。伤害性超敏性通常限于损伤的紧接区域,其再次与神经性疼痛形成对比,神经性疼痛通常与非疼痛刺激(痛觉超敏)相关并且在神经或神经根中向远侧辐射。可以使用阿片类镇痛药(由于安全性和耐受性问题,越来越多地避免使用)、非甾体抗炎药(外用和全身)、肌肉松弛药(对急性和亚急性脊柱疼痛更有效)、和疾病改善抗风湿药(炎性关节炎)成功治疗伤害性疼痛。

[0005] 神经性疼痛还具有作为影响神经系统的疾病或损伤的结果而发生的可识别的基础。与伤害性疼痛相比,神经病理性疼痛通常与感觉异常(如麻木和痛觉超敏)、更突出的疼痛突发、以及神经学表现(取决于受影响的一个或多个神经)相关。神经性疼痛通常被描述为具有刺状痛和/或抽痛特征。与许多形式的伤害性疼痛和急性神经损伤相反,慢性神经性疼痛总是适应不良的。

[0006] 伤害性疼痛与神经性疼痛之间的差异也反映在官方治疗指南中,因为推荐和用于治疗神经性疼痛的药物与推荐和用于治疗伤害性疼痛的药物之间几乎没有重叠,详情如下。

[0007] 对于神经性疼痛的药理学治疗,国际疼痛研究协会(Finnerup等人2015)、欧洲神经学会联合会(the European Federation of Neurological Societies)(EFNS)(Attal等人2010)、英国的国家健康和护理卓越研究所(the National Institute for Health and Care Excellence)(NICE)(NICE 2013)和加拿大疼痛协会(the Canadian Pain Society)(CPS)(Moulin等人2014)已经发布了临床实践指南。在所有指南中,三种药物类别已收到用

于一线治疗的建议：

[0008] 1. 三环类抗抑郁药,特别是阿米替林;

[0009] 2. 血清素-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI),如度洛西汀;和

[0010] 3.  $\text{Ca}^{2+}$ 通道 $\alpha$ -2- $\delta$ 配体加巴喷丁和普瑞巴林。

[0011] 曲马多,作为一种混合的阿片类物质/SNRI,被推荐用于神经性疼痛的二线治疗。被推荐用于三线 and 四线治疗的药物通常包括强效阿片类物质和除加巴喷丁以外的抗癫痫药(例如拉莫三嗪)和大麻素。

[0012] 对于伤害性疼痛的药物治疗,WHO建议使用三阶梯方法:

[0013] i) 对于阶梯1,推荐使用非阿片类镇痛药(例如扑热息痛)和NSAID(例如阿司匹林、双氯芬酸、布洛芬)。

[0014] ii) 对于阶梯2,可以将弱阿片类物质(例如可待因、曲马多)与阶梯1的镇痛药组合引入。

[0015] iii) 对于阶梯3,可以将强阿片类物质(主要是吗啡)与阶梯1的镇痛药组合使用。

[0016] 此外,伤害性疼痛与神经性疼痛之间的差异也反映在可从EMA(EMA/CHMP/970057/2011)和FDA(FDA 34355740dft.docx 02/07/22,草案版本)获得的针对疼痛治疗的官方临床开发指南中。

[0017] 在整个指南中,监管机构清楚地区分了伤害性疼痛与神经性疼痛。需要强调的是,旨在用于伤害性疼痛的疼痛化合物应靶向潜在的病因和疾病机制,并且研究群体应是同质的,并按诊断、强度、和持续时间(急性与慢性)进行选择。成功的开发将仅在所研究的伤害性疼痛适应证和病因学方面获得批准。这同样适用于神经性疼痛,即,如果开发用于糖尿病神经性疼痛的神经性疼痛药物,则标签中将仅包含该适应证。

[0018] 在混合性疼痛(伤害可塑性疼痛(修订的IASP术语))的情况下,应研究潜在的候选物,并在至少两个不同的临床计划中确认其有效性:一个在伤害性疼痛中,另一个在神经性疼痛中。

[0019] 总之,根据监管机构,在一种疼痛适应证中的候选药物的批准不会被自动批准或甚至被考虑用于其他疼痛类型。这说明人们无法预测为神经性疼痛开发的药物是否能够或将有效治疗伤害性疼痛,反之亦然。

[0020] 第三种类型的慢性疼痛称为伤害可塑性疼痛,其是由疼痛信号的异常处理引起的一种疼痛,没有任何明确的组织损伤或累及躯体感觉系统的离散病理的证据。以前称为功能性疼痛综合征,这些病症包括疼痛状态,如纤维肌痛、肠易激综合征、和可能的非特异性背痛。导致这些障碍的病理生理机制主要涉及整个伤害性感受轴的感觉处理增强和中枢神经系统内抑制途径的功能发挥减弱。

[0021] 目前使用的疼痛疗法在大多数患者中仅具有适度的功效,并且它们的副作用对它们的使用代表显著的限制。因此,非常需要用于预防和治疗伤害性疼痛的安全且有效的疗法,其不产生镇痛耐受性并且不具有或仅具有影响患者的一般健康状况和幸福的轻微副作用。

[0022] 镍纹蛋白是一种内源性蛋白,其先前已经被证明可促进培养的神经元的生长(WO 2005/095450)。此外,先前已经显示出镍纹蛋白在逆转由周围神经损伤引起的神经性疼痛中是有效的(WO 2012/041328)。

## 发明内容

[0023] 本发明提供了用于改善患有急性和慢性伤害性疼痛的患者的生活质量的手段。本公开文本的发明人已经发现施用镍纹蛋白是管理伤害性疼痛的有效治疗策略。镍纹蛋白已显示具有稳健的和长期的镇痛作用,同时是良好耐受的。镍纹蛋白在患有炎性痛觉过敏的受试者中完全逆转机械性痛觉过敏,并且重复施用不会发生镇痛耐受性。

[0024] 在一个方面,本发明涉及一种分离的多肽,其用于

[0025] 治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛,所述

[0026] 多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0027] a. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0028] b. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0029] 在第二方面,本发明涉及一种用于在治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的核酸分子,所述核酸分子包含编码多肽的核酸序列,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0030] a. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0031] b. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0032] 在另外的方面,本发明涉及一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的载体,所述载体包含编码用于在治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛中使用的多肽的多核苷酸。

## 附图说明

[0033] 图1:使用CFA炎性疼痛模型的一般研究设计。使用冯弗雷细丝(von Frey filament)(VF;实线箭头),在基线(BL)处、然后在后爪注射完全弗氏佐剂(CFA;虚线圆圈)后第3-5天评估机械阈值。一旦痛觉过敏完全建立,在第一个实验(实施例1)中的第5、7、9、11和13天,并且在第二个实验(实施例2)中的第3天(1次注射)、第3和5天(2次注射)以及第3、5和7天(3次注射),将1.8mg/kg重组小鼠镍纹蛋白(rmMeteorin)或媒介物皮下施用至小鼠。缩写:皮下(s.c.)。

[0034] 图2.用重组小鼠镍纹蛋白重复治疗完全逆转了患有CFA炎性痛觉过敏的小鼠的机械性疼痛。a)在基线(BL)处在进行后爪CFA(20 $\mu$ l,皮下)注射(虚线箭头)之前,在雌性C57BL/6JRj小鼠中评估对冯弗雷细丝刺激的后爪缩回阈值(g),并且然后常规地评估直到CFA注射后第15天。(b,c)在CFA注射(虚线箭头)之前和常规地在CFA注射之后测量爪宽度(mm)和体重(g),分别作为炎症负荷和一般健康(general welfare)的替代标记物。

[0035] 在第5-13天(实线箭头)进行重组小鼠镍纹蛋白的重复全身注射(1.8mg/kg,皮下),并产生机械性疼痛的稳健逆转。相比之下,没有观察到对爪宽度或体重的影响。为了在研究结束时获得用于暴露分析的躯干血液样品的目的,初始小鼠包括在内。\*P<0.05,\*\*P<0.01,双向RM方差分析和图基检验。数据为平均值 $\pm$ S.E.M.

[0036] 图3.采用重组小鼠镍纹蛋白的急性治疗逆转机械性疼痛,类似于重复治疗患有CFA炎性痛觉过敏的小鼠。a)在基线(BL)处在进行后爪CFA(20 $\mu$ l,皮下)注射(虚线箭头)之

前,在雌性C57BL/6JRj小鼠中评估对冯弗雷细丝刺激的后爪缩回阈值(g),并且然后常规地评估直到CFA注射后第14天。在第3天(第1组(镍纹蛋白1):1次注射),第3天和第5天(第2组(镍纹蛋白2):2次注射),以及第3、5和7天(第3组(镍纹蛋白3):3次注射),对3个独立组的小鼠进行全身注射重组小鼠镍纹蛋白(1.8mg/kg,皮下),如实线箭头所指示。单次注射重组小鼠镍纹蛋白产生相似幅度和持续时间的机械性痛觉过敏逆转。b)在第14-15天实验结束时,将部分 $\mu$ -阿片受体激动剂丁丙诺啡(0.1mg/kg,皮下)或媒介物施用于先前用媒介物重复注射处理的小鼠,并评估对机械缩回阈值的影响。每组中小鼠的数量在括号中指示。

[0037] 相比于相应的媒介物,<sup>^#</sup>\*P<0.05,<sup>##</sup>\*\*P<0.01,<sup>^^</sup>P<0.001,<sup>^^^^</sup>P<0.0001,双向RM方差分析和图基检验。(b)相比于媒介物,\*\*\*\*P<0.0001,学生t检验。数据是平均值 $\pm$ S.E.M.

[0038] 图4:镍纹蛋白的CLUSTAL W(1.82)多序列比对。

[0039] A)来自人(SEQ ID NO:2)、大鼠(SEQ ID NO:9)、和小鼠(SEQ ID NO:5)的镍纹蛋白前体的比对。B)来自人(SEQ ID NO:3)、大鼠(SEQ ID NO:10)、和小鼠(SEQ ID NO:6)的成熟镍纹蛋白的比对。C)从人、小鼠和大鼠序列中完全保守的残基产生的成熟镍纹蛋白共有序列(SEQ ID NO:11)。X表示由DNA编码的21种天然存在的氨基酸中的任何一种。

## 具体实施方式

[0040] 定义

[0041] 如本文所用,“生物相容性胶囊”意指在植入宿主哺乳动物后,胶囊不引发足以导致胶囊排斥或使其不可起作用(例如,通过降解)的有害宿主反应。

[0042] 如本文所用,“编码序列”是被转录并翻译成多肽的多核苷酸序列。

[0043] 如本文所用,术语“表达载体”是指能够指导与其可操作地连接的基因的表达的载体。一般来说,使用重组DNA技术的有用的表达载体通常呈质粒的形式。

[0044] 如本文所用,“镍纹蛋白”是指来自任何来源(无论是天然的、合成的、半合成的还是重组的)的具有从任何物种获得的基本上纯化的镍纹蛋白的氨基酸序列的多肽,这些物种特别是哺乳动物,包括黑猩猩、牛、绵羊、猪、鼠、马,优选人。该术语还指代从任何这些物种获得的镍纹蛋白的生物活性片段,以及这些的生物活性序列变体和经受翻译后修饰的蛋白质。

[0045] 如本文所用,术语“可操作地连接”旨在意指目的核苷酸序列与重组表达载体内的一个或多个调节序列以允许核苷酸序列表达(例如,在体外转录/翻译系统中或当将载体引入宿主细胞中时在宿主细胞中)的方式连接。

[0046] 如本文所用,术语“调节序列”旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。

[0047] “序列同一性”:高水平的序列同一性指示第一序列可能衍生自第二序列。氨基酸序列同一性需要两个比对序列之间的相同氨基酸序列。因此,与参考序列具有70%氨基酸同一性的候选序列要求在比对后,候选序列中的70%氨基酸与参考序列中的相应氨基酸相同。同一性可以通过计算机分析来确定,例如而限于ClustalW计算机比对程序(Higgins D.,Thompson J.,Gibson T.,Thompson J.D.,Higgins D.G.,Gibson T.J.,1994.CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment

through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680) 以及其中建议的默认参数。ClustalW软件可作为在欧洲生物信息学研究所的ClustalW WWW服务 (ClustalW WWW Service) 从<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>获得。使用此程序及其默认设置, 将询问序列的成熟(生物活性)部分与参考多肽进行比对。对完全保守的残基的数量计数, 并且将其除以参考多肽的长度。

[0048] ClustalW算法可以类似地用于比对核苷酸序列。序列同一性可以以与针对氨基酸序列所指示的类似的方式来计算。

[0049] 本文所用的术语“受试者”意指可以向其施用镍纹蛋白多肽或多核苷酸、治疗性细胞或生物相容性胶囊的任何哺乳动物。特别旨在用本发明的方法进行治疗的受试者包括人以及非人灵长类动物、绵羊、马、牛、山羊、猪、狗、猫、兔、豚鼠、仓鼠、沙鼠、大鼠和小鼠。

[0050] “治疗”可以以不同的方式进行, 包括治愈性的和/或改善性的。治愈性治疗通常旨在治愈已经存在于被治疗个体中的临床病症。改善性治疗通常意指为了改善个体的现有的临床病症而进行的治疗。

[0051] 如本文所用的术语“预防”是指预防临床病症或降低患上病症的风险或降低病症的程度。预防在本文中也可以被称为预防性治疗或先驱性治疗。

[0052] 如本文所用, 术语“载体”是指能够转运已经与其连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”, 其是指可以将另外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。在本说明书中, “质粒”和“载体”可以可互换地使用, 因为质粒是最常用的载体形式。然而, 本发明旨在包括发挥等效功能的此类其他形式的表达载体, 如病毒载体(例如, 复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0053] 伤害性疼痛

[0054] 存在两种主要类型的疼痛: 神经系统完整的伤害性疼痛和由于神经系统损伤引起的神经性疼痛。

[0055] 如本文所用, 术语“神经性疼痛”是指由躯体感觉神经系统(周围神经系统和中枢神经系统两者)的感觉神经损伤(病变或疾病)引起的疼痛, 如还由国际疼痛研究协会IASP: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/#neuropathic-pain>所描述的。神经性疼痛通常是定位明确的、持续的, 并且通常具有疼痛或悸动的性质。

[0056] 如本文所用, 术语“伤害性疼痛”是指根据IASP使用的定义: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/#nociceptive-pain>, 由非神经组织的实际损伤或威胁损伤, 以及由于伤害性感受器的激活引起的疼痛。

[0057] 伤害性疼痛响应于对身体和身体的非神经组织的特定刺激而发生, 并告知受试者即将发生的组织损伤。伤害性疼痛包括组织损伤诱导的疼痛和炎性疼痛。

[0058] IASP最近修订了与伤害性疼痛和神经性疼痛有关的定义和术语, 以避免任何误解。IASP在伤害性疼痛的定义下添加了以下内容: “此术语旨在与神经性疼痛形成对比”。修订后的定义强调, 术语伤害性疼痛旨在与术语神经性疼痛形成对比。

[0059] 从上面可以看出, 神经性疼痛和伤害性疼痛是具有不同潜在原因的不同现象。伤害性疼痛描述了在躯体感觉神经系统正常发挥功能的情况下发生的疼痛, 与神经性疼痛中所见的异常神经功能相反。

[0060] 伤害性疼痛的常见例子包括下背部疼痛、肩部疼痛、肌肉骨骼疼痛、关节炎疼痛、

关节疼痛、术后疼痛、创伤后疼痛和癌症疼痛。

[0061] 伤害性疼痛可以分为内脏的或躯体的。

[0062] “内脏疼痛”是指起源于内脏器官如胃肠道或胰腺的疼痛。

[0063] “躯体疼痛”是指起源于肌肉骨骼系统如皮肤、皮下组织、肌肉、和关节的疼痛。

[0064] 另外，伤害性疼痛可以是急性和慢性的两者。

[0065] 如本文所用，“急性疼痛”是指持续有限时间段的由特定原因(如损伤、感染、炎症)引起的突然的重度疼痛。

[0066] 如本文所用，“慢性疼痛”是指疼痛的持续状态，其中疼痛的原因不能被容易地除去。慢性疼痛可以是持续性的或间歇性的。可以将慢性疼痛定义为持续超过给定时间段(通常约三个月)的疼痛。慢性疼痛通常与长期无法治愈或难以治愈的医学病症或疾病有关。

[0067] 慢性疼痛的常见原因包括但不限于关节炎、癌症、重复性应激损伤、头痛、下背部疼痛、颈部和肩部疼痛、创伤后疼痛、手术后疼痛、中度至重度骨关节炎和重度偏头痛。

[0068] 如本文所用，术语“炎性疼痛”是指与炎症相关的疼痛，其特征在于发红、肿胀、发热和疼痛。炎症是生物体对感染、刺激和/或损伤的非特异性免疫应答，并且涉及促炎分子(例如肽、细胞因子、前列腺素类激素、生长因子)的释放。这些分子使参与刺激(如触摸、热、冷和化学信息)的转导和传递的周围感觉神经元的传入末端敏化。炎性疼痛通常导致炎性痛觉过敏。

[0069] 痛觉过敏

[0070] 痛觉过敏是对通常被感知是疼痛的刺激的极端反应。刺激在来源上可以是机械的/可触知的、热学的或化学的。痛觉过敏通常与神经损伤(神经性疼痛)相关，然而，如本文所用的痛觉过敏是指由组织损伤或炎症引起的增加的敏感性。

[0071] 如本文所用，“炎性痛觉过敏”是指在受损组织中直接发生的增加的疼痛敏感性和在周围未受损组织中发生的疼痛敏感性。

[0072] 在一个实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白在治疗痛觉过敏中的用途。在本发明的一个实施方案中，待治疗的痛觉过敏是炎性痛觉过敏。

[0073] 在本发明的一个实施方案中，待治疗的痛觉过敏是机械性痛觉过敏。在另一个实施方案中，待治疗的痛觉过敏是热学痛觉过敏。

[0074] 在本发明的一个实施方案中，热学痛觉过敏是冷痛觉过敏。在另一个实施方案中，热学痛觉过敏是热痛觉过敏。

[0075] 环境刺激物如邻苯二甲酸盐和重金属(包括铅、铝和汞)可以破坏免疫功能，从而触发增加的炎症产生，导致化学痛觉过敏。

[0076] 在本发明的一个实施方案中，痛觉过敏是化学痛觉过敏。在一个实施方案中，化学痛觉过敏由邻苯二甲酸盐、铅、铝、汞和/或其他环境刺激物触发。

[0077] 如上所述，在接受镍纹蛋白的动物中实现了正常感觉功能的基本完全逆转。因此，可以想到，镍纹蛋白可以在至少一部分经治疗的受试者中介导痛觉过敏的完全逆转。

[0078] 伤害性疼痛可以由不同的刺激(包括损伤和炎症)诱导。镍纹蛋白可用于预防或治疗伤害性疼痛，如急性伤害性疼痛、慢性伤害性疼痛、内脏伤害性疼痛、躯体伤害性疼痛。

[0079] 在一个实施方案中，伤害性疼痛是炎性疼痛、下背部疼痛、肩部疼痛、肌肉骨骼疼痛、关节炎疼痛、关节疼痛、术后疼痛、创伤后疼痛、癌症疼痛和其他伤害性疼痛中的一种或

多种。

[0080] 在一个实施方案中,伤害性疼痛响应于对身体的特定刺激而发生。特定刺激包括对身体的损伤和组织损伤,这些损伤与以下相关但不限于以下:炎症、手术、物理创伤、关节炎、癌症、重复性应激损伤、头痛、中度至重度骨关节炎、和偏头痛。

[0081] 在一个实施方案中,伤害性疼痛与炎症相关,使参与刺激如触摸、热、冷和化学信息的转导和传递的周围感觉神经元的传入末端敏化。

[0082] 在一个实施方案中,伤害性疼痛与关节炎相关。

[0083] 在一个实施方案中,将镍纹蛋白通过间歇施用来施用。

[0084] 在一个实施方案中,镍纹蛋白在施用数天内逆转炎性痛觉过敏。

[0085] 治疗和/或预防伤害性疼痛

[0086] 在实施例1中,证明了在开始给药后数天内,持续间歇施用镍纹蛋白完全逆转CFA诱导的炎性痛觉过敏(图2)。进一步证明,炎性水肿的大小完全不受重组小鼠镍纹蛋白治疗的影响。重组小鼠镍纹蛋白对炎症负荷没有影响,这表明它本身不具有直接的抗炎机制。

[0087] 在实施例2中,证明了在患有CFA炎性痛觉过敏的小鼠中,用重组小鼠镍纹蛋白的急性治疗(单次注射)与重复治疗(多次注射)类似地逆转机械性疼痛。单次注射重组小鼠镍纹蛋白产生的痛觉过敏逆转的幅度和持续时间与三次注射情况下所观察到的类似(图3)。

[0088] 需要开发安全且有效的疗法来预防或治疗伤害性疼痛,因为通常有效对抗慢性疼痛病症的药物(如阿片类药物)与许多副作用相关。

[0089] 本发明提供了通过向疼痛中的受试者施用镍纹蛋白来治疗、改善和/或预防伤害性疼痛。因此,在一个实施方案中,本发明涉及用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的镍纹蛋白。在一个实施方案中,本发明涉及用于在治疗伤害性疼痛中使用的镍纹蛋白。

[0090] 镍纹蛋白可以用于预防和/或治疗急性伤害性疼痛。在一个实施方案中,镍纹蛋白用于治疗急性伤害性疼痛。此外,镍纹蛋白可以用于治疗和预防慢性伤害性疼痛。在一个实施方案中,镍纹蛋白用于治疗慢性伤害性疼痛。

[0091] 在一个实施方案中,本公开文本提供了用于在治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的多肽,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0092] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0093] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0094] 在一个实施方案中,本发明涉及用于治疗和/或预防伤害性疼痛的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的分离的多肽,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0095] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0096] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0097] 在一个实施方案中,本公开文本提供了分离的多肽用于制造用于治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛的药剂的用途,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0098] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0099] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:

3具有至少70%序列同一性。

[0100] 在一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白在治疗伤害性痛觉过敏的方法中的用途。在另一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗机械性伤害性痛觉过敏的用途。在一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗热学伤害性痛觉过敏的用途。在另一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗冷伤害性痛觉过敏的用途。在另一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗热伤害性痛觉过敏的用途。在又一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗化学痛觉过敏的用途。

[0101] 在一个实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗伤害性疼痛的用途。在一个更优选的实施方案中,本发明涉及镍纹蛋白用于治疗与炎症或身体损伤相关的疼痛的用途。在一个实施方案中,镍纹蛋白用于逆转患有炎性痛觉过敏的受试者的机械性疼痛的方法中。

[0102] 如本公开文本的实施例1和2中所证明的,施用镍纹蛋白完全减少了患有炎性痛觉过敏的受试者中感觉功能的获得。因为使用镍纹蛋白不会发生镇痛耐受性,所以可以维持炎性痛觉过敏的逆转。

[0103] 因此,在优选的实施方案中,本发明涉及用于在预防和/或治疗伤害性疼痛中使用的镍纹蛋白。

[0104] 在一个实施方案中,本公开文本提供了用于在预防和/或治疗受试者的伤害性疼痛中使用的分离的多肽,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0105] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0106] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0107] 在一个方面,本公开文本涉及用于在预防和/或治疗受试者的伤害性疼痛中使用的分离的多肽。

[0108] 在一个实施方案中,本公开文本涉及用于在预防和/或治疗受试者的伤害性疼痛中使用的分离的多肽。在一个实施方案中,伤害性疼痛是躯体疼痛或内脏疼痛。在另一个实施方案中,伤害性疼痛是炎性疼痛、下背部疼痛、肩部疼痛、肌肉骨骼疼痛、关节炎疼痛、关节疼痛、术后疼痛、创伤后疼痛或癌症疼痛。

[0109] 在另一个实施方案中,其中所述伤害性疼痛选自炎性疼痛和术后疼痛。

[0110] 在本公开文本的一个实施方案中,所述分离的多肽用于在预防和/或治疗伤害性疼痛中使用,其中所述伤害性疼痛是伤害性痛觉过敏或炎性疼痛,如炎性痛觉过敏。在本公开文本的另一个实施方案中,所述分离的多肽用于在预防和/或治疗化学痛觉过敏中使用。

[0111] 在本公开文本的一个实施方案中,所述分离的多肽用于在预防和/或治疗伤害性疼痛中使用,其中所述伤害性疼痛是术后疼痛。

[0112] 在本公开文本的一个实施方案中,所述分离的多肽用于在预防和/或治疗伤害性疼痛中使用,其中受试者患有选自关节炎、炎性疼痛、和术后疼痛的疾病或障碍。

[0113] 在一个实施方案中,关节炎选自骨关节炎、类风湿性关节炎、或狼疮。

[0114] 在另一个实施方案中,炎性疼痛选自炎性痛觉过敏、术后疼痛、和关节炎。

[0115] 在一个实施方案中,本发明涉及用于治疗伤害性疼痛的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的分离的多肽,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0116] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0117] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0118] 在一个实施方案中,本公开文本提供了分离的多肽用于制造用于在预防和/或治疗受试者的伤害性疼痛中使用的药剂的用途,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0119] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和

[0120] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0121] 施用和配制品

[0122] 镍纹蛋白多肽可以以医学上可接受的任何方式来施用。这可以包括通过肠胃外途径(如静脉内、血管内、动脉内、皮下、肌内、肿瘤内、腹膜内、心室内、硬膜内外(intraepidural)、鞘内、脑室内、脑间等)以及鼻或外用。本发明还特别包括缓释施用,通过诸如贮库型注射或易蚀性植入物的手段。

[0123] 根据本发明的镍纹蛋白的施用可以使用任何合适的递送手段来实现,所述递送手段包括:皮下、静脉内、动脉内、肌内、鞘内注射或注射至其他合适的部位;泵(参见例如, *Annals of Pharmacotherapy*, 27:912(1993); *Cancer*, 41:1270(1993); *Cancer Research*, 44:1698(1984), 通过引用并入本文);微囊化(参见例如,美国专利4,352,883;4,353,888;和5,084,350,通过引用并入本文);缓释聚合物植入物(参见例如, Sabel, 美国专利4,883,666,通过引用并入本文);包封细胞(参见,“生物相容性胶囊”);未包封细胞移植物(参见例如,美国专利5,082,670和5,618,531,各自通过引用并入本文);和吸入。

[0124] 施用可以通过制剂团注的周期性注射进行,或者可以从外部(例如,静脉输液袋)或内部(例如,镍纹蛋白生产细胞的生物可蚀性植入物、生物人工器官、生物相容性胶囊、或植入的镍纹蛋白生产细胞的集落)的储器通过静脉内或腹膜内施用来更加连续地进行。参见例如,US 4,407,957、5,798,113和5,800,828,各自通过引用并入本文。

[0125] 局部递送可以通过诸如经由导管递送至一个或多个动脉的手段进行。在本发明的一个实施方案中,局部递送包括使用包封细胞(如“生物相容性胶囊”部分中所述)进行递送。又一类型的局部递送包括基因疗法载体的局部递送,其通常是注射的。

[0126] 在本发明的优选的实施方案中,施用是肠胃外注射,优选皮下注射、或鞘内注射。

[0127] 尽管本发明的化合物可以作为化学原料施用,但优选以药物配制品的形式呈递它们。所述药物配制品可以通过常规技术制备,例如在Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 2005, Lippincott, Williams&Wilkins中所述。

[0128] 术语“药学上可接受的载体”意指一种或多种天然的或合成的有机或无机成分,镍纹蛋白多肽与其组合以促进镍纹蛋白多肽的应用。合适的载体包括无菌盐水,尽管已知为药学上可接受的其他水性和非水性等渗无菌溶液和无菌悬浮液是本领域普通技术人员已知的。

[0129] 本发明的化合物可以被配制用于肠胃外施用,并且可以以单位剂量形式存在于安瓿、载药注射器、小体积输注或多剂量容器中,任选地添加防腐剂。组合物可以采取诸如以下的形式:在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液,例如在水性聚乙二醇中的溶液。油性或非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的例子包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如,橄

榄油)和可注射的有机酯(例如,油酸乙酯),并且可以包括诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂或助悬剂、稳定剂和/或分散剂的试剂。可替代地,活性成分可以呈粉末形式(通过无菌分离无菌固体或通过从溶液中冻干获得),用于在使用前用合适的媒介物(例如,无菌无热原水)构成。

[0130] “有效量”是指能够改善或延迟患病、退行性或受损状况的进展的量。有效量可以在个体基础上确定,并且将部分地基于待治疗的症状和所寻求的结果的考虑。有效量可以由本领域普通技术人员采用此类因素并且仅使用常规实验来确定。

[0131] 脂质体系统可以是任何种类的单层囊泡、多层(multilamellar)囊泡或稳定的多层(plurilamellar)囊泡,并且可以根据本领域技术人员熟知的方法(例如,根据美国专利5,169,637、4,762,915、5,000,958或5,185,154的教导)来制备和施用。此外,可能期望将本发明的新型多肽以及其他所选多肽表达为脂蛋白,以便增强它们与脂质体的结合。例如,通过免疫亲和色谱法或任何其他方便的方法从CHO细胞中纯化重组镍纹蛋白,然后将其与脂质体混合并且高效地掺入它们中。可以在体外测试脂质体包封的蛋白质对刺激细胞生长的任何作用。

[0132] 在需要以具有适合于治疗需要施用镍纹蛋白多肽的任何疾病或障碍的释放特征的配制品缓释施用镍纹蛋白多肽的情况下,设想了镍纹蛋白多肽的微囊化。已经成功用人生长激素(rhGH)、干扰素(rhIFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2和MN rgp120进行了重组蛋白的微囊化以持续释放。Johnson等人,Nat.Med.,2:795-799(1996);Yasuda,Biomed.Ther.,27:1221-1223(1993);Hora等人,Bio/Technology,8:755-758(1990);Cleland,“Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems,”Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach,Powell和Newman编辑,(Plenum Press:New York,1995),第439-462页;WO 97/03692、WO 96/40072、WO 96/07399;以及美国专利号5,654,010。

[0133] 由于这些蛋白质的生物相容性和广泛的可生物降解特性,使用聚-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)聚合物开发了它们的缓释配制品。PLGA、乳酸和乙醇酸的降解产物可以在人体内快速清除。此外,这种聚合物的降解性可以根据其分子量和组成从数月 to 数年进行调整。Lewis,“Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer,”在M.Chasin和R.Langer(编辑),Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems(Marcel Dekker:New York,1990),第1-41页中。

[0134] 在本发明的一个实施方案中,设想了包含镍纹蛋白的组合物。组合物可以包含如本文所述的分离的多肽、如本文所述的分离的核酸、如本文所述的编码镍纹蛋白的表达载体、如本文所述的表达镍纹蛋白的细胞系或如本文所述的分泌镍纹蛋白的生物相容性胶囊。

[0135] 剂量

[0136] 设想了用于全身性施用的各种给药方案。在一个实施方案中,向受试者施用包含镍纹蛋白多肽的配制品的方法包括以每剂 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 与 $10,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重之间的剂量施用镍纹蛋白。在另一个实施方案中,剂量在每剂 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 与 $7,500\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重之间。在另外的实施方案中,剂量在每剂 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 与 $5,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重之间。在不同的实施方案中,剂量在每剂 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 与 $2,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者体重之间。在又一个实施方案中,剂量在每剂 $1\mu$

g/kg与1,000 $\mu$ g/kg受试者体重之间。在又一个实施方案中,剂量在每剂1 $\mu$ g/kg与700 $\mu$ g/kg受试者体重之间。在更优选的实施方案中,剂量在每剂5 $\mu$ g/kg与500 $\mu$ g/kg受试者体重之间。在最优选的实施方案中,剂量在每剂10 $\mu$ g/kg与100 $\mu$ g/kg受试者体重之间。在优选的实施方案中,待治疗的受试者是人。

[0137] 在文献中提供了关于具体的剂量和递送方法的指导;参见例如,WO 02/78730和WO 07/100898。在Reagan-Shaw等人,FASEB J,22,659-661 (2007)中提供了基于动物实验中使用的剂量计算人等效剂量的指导。

[0138] 必须根据所治疗个体的年龄、体重和病症以及施用途径、剂型和方案以及所期望的结果小心地调整所施用的剂量,并且确切的剂量应当由从业者确定。

[0139] 在本发明的一个实施方案中,将镍纹蛋白通过全身施用来施用。

[0140] 在一个实施方案中,将镍纹蛋白通过肠胃外注射、优选皮下注射或鞘内注射来施用。

[0141] 在一个实施方案中,将镍纹蛋白以1 $\mu$ g/kg-10,000 $\mu$ g/kg,如1 $\mu$ g/kg-7,500 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-5,000 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-2,000 $\mu$ g/kg、例如1 $\mu$ g/kg-1,000 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-700 $\mu$ g/kg、如5 $\mu$ g/kg-500 $\mu$ g/kg、如10 $\mu$ g/kg至100 $\mu$ g/kg身体的剂量来施用。

[0142] 在本发明的一个实施方案中,每天重复施用。在另一个实施方案中,每周重复施用至少1-3次,如每周2-5次,如每周3-6次。

[0143] 在一个实施方案中,每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每7天一次重复施用。在一个优选的实施方案中,每两天重复施用一次。

[0144] 在一个实施方案中,本发明提供了伤害性疼痛的治疗。因此,在一个实施方案中,在伤害性疼痛的症状发作后开始施用。

[0145] 在一个实施方案中,本发明提供了伤害性疼痛的预防。因此,在一个实施方案中,在伤害性疼痛的症状发作之前施用镍纹蛋白多肽。

[0146] 在其他实施方案中,以相对较长的剂量间隔施用镍纹蛋白。相对较长的剂量间隔旨在包括剂量之间有至少2天,如剂量之间有至少3天,例如每周2次剂量。更优选地,长剂量间隔为至少一周,如至少2周,更优选至少3周,如至少4周或至少一个月。

[0147] 相对较长的剂量间隔是指剂量之间有至少2天,如剂量之间有至少3天,例如每周2次剂量。更优选地,长剂量间隔为至少一周,如至少2周,更优选至少3周,如至少4周或至少一个月。

[0148] 以不同的方式表达,剂量间隔是如此长,以至于在一次剂量的镍纹蛋白多肽后,当施用下一次剂量时,在待治疗的受试者的血清中不再可检测到多肽。在另一个实施方案中,血清水平低于10ng/mL,如低于5ng/mL,更优选低于1ng/mL,如低于0.5ng/mL,例如低于0.1ng/mL。

[0149] 在一些实施方案中,在长剂量范围之前更频繁地初始施用镍纹蛋白,例如每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次或每四天一次。此初始给药方案可以维持例如2、3、4、5、6、7、9、11、14、21天或更久。在完成此给药方案后,可以较不频繁地施用镍纹蛋白,例如如上所述。

[0150] 因此,在一个方面,本发明涉及治疗有需要的人受试者的神经性疼痛的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的神经营养性多肽,所述神经营养性多肽包含与

SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,其中所述施用是每周三次或更不频繁。

[0151] 优选地,施用是每周一次或更不频繁的施用。甚至更优选地,施用是每两周一次或更不频繁的施用。

[0152] 以不同的方式表达,剂量间隔是如此长,以至于在一次剂量的镍纹蛋白多肽后,当施用下一次剂量时,在待治疗的受试者的血清中不再可检测到多肽。在另一个实施方案中,血清水平低于10ng/mL,如低于5ng/mL,更优选低于1ng/mL,如低于0.5ng/mL,例如低于0.1ng/mL。

[0153] 在一些实施方案中,镍纹蛋白的初始施用是例如每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次或每四天一次。此给药方案可以维持例如2、3、4、5、6、7、9、11、14、21天或更久。在完成此给药方案后,可以较不频繁地施用镍纹蛋白,例如如上所述。

[0154] 镍纹蛋白

[0155] 本发明涉及被鉴定为镍纹蛋白的多肽和编码所述蛋白质的多核苷酸在治疗伤害性疼痛中的用途。在一个实施方案中,递送被设想为通过使用胶囊将分泌的生物活性镍纹蛋白和/或其同源物递送至受试者。已经在人(SEQ ID NO:2)、小鼠(SEQ ID NO:5)、和大鼠(SEQ ID NO:8)和各种其他物种中鉴定了镍纹蛋白。

[0156] 人镍纹蛋白作为293个氨基酸的前体存在,其可以经加工,以产生至少一种生物活性肽。镍纹蛋白在神经系统和眼睛、特别是脑的特定亚区中以高水平表达。小鼠(SEQ ID NO:5)和大鼠(SEQ ID NO:8)镍纹蛋白前体由291个氨基酸组成,并且与人镍纹蛋白(SEQ ID NO:2)的序列同一性%分别是80.3和80.2(见图4)。

[0157] 人镍纹蛋白含有23个氨基酸的N末端信号肽序列,其在序列基序ARA-GY处被切割。此信号肽切割位点是通过SignalP方法预测到的。小鼠镍纹蛋白的N末端已通过N末端测序验证(Jørgensen等人,Characterization of Meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009年9月;39(1-2):104-116)。

[0158] 表1示出了全长人镍纹蛋白与小鼠和大鼠序列之间的序列同一性%。参见在图4a中的比对。

序列	序列同一性%
人	-
小鼠	80.3
大鼠	80.2

[0160] 表2示出了在去除N末端信号肽后,人镍纹蛋白与小鼠和大鼠序列之间的序列同一性%。参见在图4b中的比对。

序列	序列同一性%
人	-
小鼠	81.9
大鼠	79.6

[0162] 基于完全保守的残基,可以衍生出成熟镍纹蛋白的共有序列(SEQ ID NO:11,图4c),其中X独立地选自自由DNA编码的21种天然存在的氨基酸中的任何一种。在优选的实施方案

案中,变体镍纹蛋白包含共有序列。

[0163] 镍纹蛋白的一个生物功能是在解离的背根神经节 (DRG) 培养物中诱导神经突生长的能力,如以下所描述的: Jørgensen 等人, Characterization of Meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009年9月;39(1-2):104-116以及Nishino等人, "Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension", EMBO J., 23(9):1998-2008(2004)。

[0164] 由于半胱氨酸的高度保守,预期这些残基在生物活性蛋白的二级和三级结构中起重要作用。一个或多个半胱氨酸可以参与分子内和/或分子间二硫桥的形成。

[0165] 镍纹蛋白多肽

[0166] 除了全长镍纹蛋白、基本上全长镍纹蛋白和前镍纹蛋白之外,本发明还提供了多肽的生物活性变体。如果镍纹蛋白多肽或片段展现出如本文所述的天然存在的镍纹蛋白的生物活性(如是神经营养性的),则它是有生物活性的。应理解,本发明涉及如本文所定义的镍纹蛋白。

[0167] 本发明涉及用于在治疗伤害性疼痛的方法中使用的分离的多肽分子,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0168] a) 选自SEQ ID NO:3、6和9的氨基酸序列;

[0169] b) 选自SEQ ID NO:3、6和9的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与所述SEQ ID NO具有至少70%序列同一性;以及

[0170] c) a) 或 b) 中任一个的至少50个连续氨基酸的生物活性片段,其中所述片段与所述SEQ ID NO至少70%相同。

[0171] 在一个实施方案中,本发明涉及选自以下的分离的多肽:

[0172] i) SEQ ID NO:2的AA<sub>30</sub>-AA<sub>288</sub>,和在一端或两端具有来自天然序列的一至五个额外氨基酸的多肽,至多为SEQ ID NO:2的AA<sub>25</sub>-AA<sub>293</sub>;

[0173] ii) SEQ ID NO:8的AA<sub>28</sub>-AA<sub>286</sub>,和在一端或两端具有来自天然序列的一至五个额外氨基酸的多肽,至多为SEQ ID NO:8的AA<sub>23</sub>-AA<sub>291</sub>;

[0174] iii) SEQ ID NO:5的AA<sub>31</sub>-AA<sub>289</sub>,和在一端或两端具有来自天然序列的一至五个额外氨基酸的多肽,至多为SEQ ID NO:5的AA<sub>26</sub>-AA<sub>294</sub>;以及

[0175] iv) 所述多肽的变体,其中所选序列中指定的任何氨基酸被改变为不同的氨基酸,条件是序列中不超过20个氨基酸残基被如此改变。

[0176] 优选的生物活性是能够引发与DRG测定中对于小鼠镍纹蛋白获得的反应(描述于 Jørgensen 等人, Characterization of Meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009年9月;39(1-2):104-116中)基本相同的反应。在此测定中,使DRG细胞在全长人镍纹蛋白编码序列(SEQ ID NO:3)的存在下生长。与在DRG测定中基本上相同的反应,旨在表示DRG细胞的神经突生长是在 Jørgensen 等人, Characterization of Meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci 2009年9月;39(1-2):104-116中描述的DRG测定中获得的数量的至少20%、更优选至少30%、更优选至少40%、更优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%。镍纹蛋白的片段或变体的生物活性也可以高于天然存在的镍纹蛋白(SEQ ID NO:3)的生物活性。

[0177] 变体可以在氨基酸序列上或在不涉及序列的方面上或在两个方面上不同于天然存在的镍纹蛋白。当天然存在的镍纹蛋白中的一个或多个氨基酸被不同的天然氨基酸、氨基酸衍生物或非天然氨基酸取代时,产生氨基酸序列的变体(“序列变体”)。特别优选的变体包括天然存在的镍纹蛋白或天然存在的镍纹蛋白的生物活性片段,后者的序列与野生型序列相差一个或多个保守和/或半保守氨基酸取代,其通常对蛋白质或肽的二级和三级结构以及疏水性质具有最小的影响。变体还可以具有因一个或多个不消除镍纹蛋白生物活性的非保守氨基酸取代、缺失或插入而不同的序列。图4中的Clustal W比对可以用于预测哪些氨基酸残基可以被取代而基本上不影响蛋白质的生物活性。在优选的实施方案中,变体镍纹蛋白序列包含具有SEQ ID NO:11的共有序列。

[0178] 下组(Clustal W,“强”保守组)内的取代在本发明的含义内被视为保守取代:

[0179] -S、T、A;N、E、Q、K;N、H、Q、K;N、D、E、Q;Q、H、R、K;M、I、L、V;M、I、L、F;H、Y;F、Y、W。

[0180] 下组(Clustal W,“弱”保守组)内的取代在本发明的含义内被视为半保守取代:

[0181] -C、S、A;A、T、V;S、A、G;S、T、N、K;S、T、P、A;S、G、N、D;S、N、D、E、Q、K;N、D、E、Q、H、K;N、E、Q、H、R、K;V、L、I、M;H、F、Y。

[0182] 本发明内的其他变体是具有增加肽稳定性的修饰的变体。此类变体可以在肽序列中含有例如一个或多个非肽键(其替代肽键)。还包括:包括除天然存在的L-氨基酸之外的残基(如D-氨基酸或非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 或 $\gamma$ 氨基酸))的变体和环状变体。将D-氨基酸而不是L-氨基酸掺入多肽中可以增加其对蛋白酶的抗性。参见例如,US 5,219,990。本发明特别包括剪接变体。

[0183] 当不能确定地预测给定取代的结果时,可以根据本文公开的方法容易地测定衍生物以确定神经营养活性的存在或不存在,优选地使用如Jørgensen等人,Characterization of meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009年9月;39(1-2):104-116所描述的DRG测定。

[0184] 在一个实施方案中,多肽是选自SEQ ID NO:3、6和9的序列的天然存在的等位基因变体。此多肽可以包含与选自SEQ ID NO:1、4和7的核酸序列相差单个核苷酸的核酸序列翻译的氨基酸序列。

[0185] 在一个实施方案中,如本文所述的变体多肽包括这样的多肽,其中改变所选序列中指定的任何氨基酸以提供保守取代。

[0186] 在一个实施方案中,在本发明的范围内的变体包括具有与人、鼠或大鼠镍纹蛋白(SEQ ID NO:3、6和9)具有至少70%同一性的氨基酸序列的蛋白质和肽。更优选地,序列同一性为至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,更优选至少95%,更优选至少98%。

[0187] 在优选的实施方案中,参考人镍纹蛋白多肽(SEQ ID NO:3)确定变体镍纹蛋白的序列同一性。

[0188] 在一个实施方案中,变体包括包含与SEQ ID NO:3具有至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少98%序列同一性的氨基酸序列的蛋白质。

[0189] 在一个实施方案中,优选变体包括包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少

98%序列同一性的氨基酸序列的蛋白质。

[0190] 在一个实施方案中,优选变体包括包含与SEQ ID NO:9具有至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少98%序列同一性的氨基酸序列的蛋白质。

[0191] 神经营养性多肽优选与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少98%序列同一性。

[0192] 在一个实施方案中,神经营养性多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。

[0193] 优选地,神经营养性多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的位置7、28、59、95、148、151、161、219、243和265处具有半胱氨酸残基。

[0194] 在一个实施方案中,镍纹蛋白的优选变体包括包含50-270个氨基酸、更优选75-270个氨基酸、更优选90-270个氨基酸、更优选100-270个氨基酸、更优选125-270个氨基酸、更优选150-270个氨基酸、更优选175-270个氨基酸、更优选200-270个氨基酸、更优选225-270个氨基酸、更优选250-270个氨基酸的蛋白质。

[0195] 在一个实施方案中,在相应位置处的变体镍纹蛋白包含在图4中标记为完全保守的残基(\*),更优选地,变体镍纹蛋白还在相应位置处包含在图4中标记为强保守的残基(:强保守的组包括:S、T、A;N、E、Q、K;N、H、Q、K;N、D、E、Q;Q、H、R、K;M、I、L、V;M、I、L、F;H、Y;F、Y、W),更优选变体镍纹蛋白还在相应位置处包含在图4中标记为不太保守的残基(不太保守的组包括:C、S、A;A、T、V;S、A、G;S、T、N、K;S、T、P、A;S、G、N、D;S、N、D、E、Q、K;N、D、E、Q、H、K;N、E、Q、H、R、K;V、L、I、M;H、F、Y)。特别地,设想了保守的半胱氨酸必须位于变体镍纹蛋白中的相应位置处。因此,在一个实施方案中,变体镍纹蛋白序列在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的位置7、28、59、95、148、151、161、219、243和265处具有半胱氨酸残基。

[0196] 在一个实施方案中,用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。

[0197] 在一个实施方案中,用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的位置7、28、59、95、148、151、161、219、243和265处具有半胱氨酸残基。

[0198] 在一个实施方案中,用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽是变体多肽,其中任何氨基酸取代是保守取代。

[0199] 在一个实施方案中,用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽能够形成至少一个分子内二硫桥。

[0200] 在一个实施方案中,所述多肽用于在治疗和/或预防受试者(如哺乳动物,优选灵长类动物,更优选人)的伤害性疼痛中使用。

[0201] 在一个实施方案中,将用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽通过全身施用(如通过肠胃外注射,优选皮下注射或鞘内注射)来施用。

[0202] 在一个实施方案中,将用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽以1 $\mu$ g/kg-10,000 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-7,500 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-5,000 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-2,000 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-1,000 $\mu$ g/kg、如1 $\mu$ g/kg-700 $\mu$ g/kg、如5 $\mu$ g/kg-500 $\mu$ g/kg、如10 $\mu$ g/kg至100 $\mu$ g/kg身体的剂量来施用。

[0203] 在一个实施方案中,将用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的多肽每周施用

至少1-3次,如每周2-5次,如每周3-6次。在另一个实施方案中,每天施用多肽。在另一个实施方案中,每日施用多肽。

[0204] 在一个实施方案中,所述多肽用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用,在伤害性疼痛的症状发作后开始所述多肽的施用。

[0205] 在一个实施方案中,编码的多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。所述共有序列包含如图4c所示出的在人、小鼠和大鼠中保守的氨基酸残基。优选地,神经营养性多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的位置7、28、59、95、148、151、161、219、243和265处具有半胱氨酸残基。

[0206] 非序列修饰可以包括例如天然存在的镍纹蛋白的部分的体内或体外化学衍生化,以及乙酰化、甲基化、磷酸化、羧化、PEG化或糖基化。正如可以替代蛋白质的取代基一样,也可以用特征在于特征类似的基团取代与蛋白质结合的官能团。此类修饰不改变一级序列。这些最初将是保守的,即替代基团将具有与原始基团大致相同的大小、形状、疏水性和电荷。

[0207] 给定多肽中的许多氨基酸(包括末端氨基酸)可以通过天然过程(如糖基化和其他翻译后修饰)或通过本领域熟知的化学修饰技术进行修饰。举几个例子,可以存在于本发明的多肽中的已知修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附接、血红素部分的共价附接、多核苷酸或多核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 $\gamma$ -羧化、糖化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化(selenoylation)、硫酸化、转移RNA介导的向蛋白质添加氨基酸(如精氨酸化)和泛素化。

[0208] 此类修饰是技术人员熟知的,并且已经在科学文献中详细描述。几种特别常见的修饰(例如,糖基化、脂质附接、硫酸化、谷氨酸残基的 $\gamma$ -羧化、羟基化和ADP-核糖基化)在大多数基础文本(例如I.E.Creighton,Proteins-Structure and Molecular Properties,第2版,W.H.Freeman and Company,New York,1993)中有描述。有许多关于此主题的详细综述,例如由以下提供的那些:Wold,F.,Posttranslational Covalent Modification of Proteins,B.C.Johnson编辑,Academic Press,New York,第1-12页,1983;Seifter等人,Meth.Enzymol.182:626-646,1990和Rattan等人,Protein Synthesis:Posttranslational Modifications and Aging,Ann.N.Y.Acad.Sci.663:48-62,1992。

[0209] 此外,蛋白质可以包含蛋白质标签以允许随后纯化,并且任选地使用内肽酶去除标签。标签还可以包含蛋白酶切割位点以促进随后的标签去除。亲和标签的非限制性例子包括多组氨酸标签、GST标签、HA标签、Flag标签、C-myc标签、HSV标签、V5标签、麦芽糖结合蛋白标签、纤维素结合结构域标签。优选地,对于产生和纯化,标签是多组氨酸标签。优选地,标签在蛋白质的C末端部分。

[0210] 也可以替代镍纹蛋白的天然信号序列,以便在其他哺乳动物细胞类型中的重组产生中增加蛋白质的分泌。

[0211] 修饰可以发生在多肽的任何地方,包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。实际上,通过共价修饰封闭多肽中的氨基或羧基或两者在天然存在的和合成的多肽中是常见的,并且此类修饰也可以存在于本发明的多肽中。

[0212] 在多肽中发生的修饰通常将随其制备方式变化。例如,对于通过在宿主中表达克隆基因制备的多肽,修饰的性质和程度在很大程度上将由宿主细胞的翻译后修饰能力和多肽氨基酸序列中存在的修饰信号决定。例如,在细菌宿主(如大肠杆菌(E.coli))中通常不发生糖基化。因此,当需要糖基化时,多肽应当在糖基化宿主(通常是真核细胞)中表达。昆虫细胞通常进行与哺乳动物细胞相同的翻译后糖基化,并且由于这个原因,已经开发了昆虫细胞表达系统以有效地表达尤其具有天然糖基化模式的哺乳动物蛋白。类似的考虑适用于其他修饰。

[0213] 将理解,相同类型的修饰可以以相同或不同的程度存在于给定多肽中的几个位点处。此外,给定多肽可以含有许多类型的修饰。

[0214] 通常,如本文所用,术语多肽包含所有此类修饰,特别是存在于通过在宿主细胞中表达多核苷酸而合成的多肽中的修饰。

[0215] 镍纹蛋白核苷酸序列

[0216] 本发明提供了编码镍纹蛋白的基因组DNA和cDNA(包括例如人cDNA核苷酸序列(SEQ ID NO:1和10)、小鼠cDNA序列(SEQ ID NO:4)和大鼠cDNA序列(SEQ ID NO:7))的医学用途。

[0217] 这些序列的变体也被包括在本发明的范围内。

[0218] 本发明涉及用于在治疗和/或预防伤害性疼痛的方法中使用的分离的核酸分子,所述核酸分子包含编码多肽的核酸序列,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0219] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0220] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性;以及

[0221] iii. i) 或 ii) 的至少50个连续氨基酸的生物活性片段,其中所述片段与SEQ ID NO:3至少70%相同。

[0222] 在一个方面,本发明涉及用于在治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的核酸分子。

[0223] 在一个实施方案中,分离的核酸分子包含编码包含选自以下的氨基酸序列的多肽的核酸序列:

[0224] a. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0225] b. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0226] 在一个实施方案中,本发明涉及用于在治疗和/或预防伤害性疼痛的方法中使用的编码多肽的分离的核酸分子,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0227] i) SEQ ID NO:2的AA<sub>30</sub>-AA<sub>288</sub>,和在一端或两端具有来自天然序列的一至五个额外氨基酸的多肽,至多为SEQ ID NO:2的AA<sub>25</sub>-AA<sub>293</sub>;

[0228] ii) SEQ ID NO:8的AA<sub>28</sub>-AA<sub>286</sub>,和在一端或两端具有来自天然序列的一至五个额外氨基酸的多肽,至多为SEQ ID NO:8的AA<sub>23</sub>-AA<sub>291</sub>;

[0229] iii) SEQ ID NO:5的AA<sub>31</sub>-AA<sub>289</sub>,和在一端或两端具有来自天然序列的一至五个额外氨基酸的多肽,至多为SEQ ID NO:5的AA<sub>26</sub>-AA<sub>294</sub>;以及

[0230] iv) 所述多肽的变体,其中所选序列中指定的任何氨基酸被改变为不同的氨基酸,

条件是序列中不超过20个氨基酸残基被如此改变。

[0231] 核酸分子可以包含天然存在的等位基因核酸变体的核苷酸序列。

[0232] 本发明的核酸分子可以编码变体多肽,其中变体多肽具有天然存在的多肽变体的多肽序列。

[0233] 在一个实施方案中,核酸分子与选自SEQ ID NO:1、4、7和10的核酸序列相差单个核苷酸。

[0234] 优选地,所编码的多肽与选自SEQ ID NO:3的序列具有至少60%序列同一性,优选至少65%序列同一性,更优选至少70%序列同一性,更优选75%序列同一性,更优选至少80%序列同一性,更优选至少85%序列同一性,更优选至少90%序列同一性,更优选至少95%序列同一性,更优选至少98%序列同一性,更优选地,其中多肽具有选自所述SEQ ID NO的序列。所述序列构成人镍纹蛋白。

[0235] 在优选的实施方案中,所编码的多肽包含具有SEQ ID NO:11的共有序列。

[0236] 在优选的实施方案中,所编码的多肽与SEQ ID NO:3具有至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、更优选至少95%、更优选98%序列同一性,更优选地其中所述多肽具有SEQ ID NO:3的序列。

[0237] 在一个方面,核酸分子包含选自以下的核苷酸序列:

[0238] a) 选自SEQ ID NO:1、4、7和10的核苷酸序列;

[0239] b) 与选自SEQ ID NO:1、4、7和10的核苷酸序列具有至少70%序列同一性的核苷酸序列;以及

[0240] c) 选自SEQ ID NO:1、4、7和10的序列的至少150个连续核苷酸的核酸序列。

[0241] 在一个实施方案中,本发明的分离的多核苷酸与作为SEQ ID NO:1呈现的多核苷酸序列具有至少60%、更优选至少65%、更优选至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少98%序列同一性。

[0242] 在一个优选的实施方案中,本发明的分离的多核苷酸与作为SEQ ID NO:10呈现的多核苷酸序列具有至少50%、优选至少60%、更优选至少70%、更优选至少75%、更优选至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少98%序列同一性。

[0243] 在一个实施方案中,本发明的优选的分离的多核苷酸变体包含150-900个核酸,更优选175-900个核酸,更优选200-900个核酸,更优选225-900个核酸,更优选250-900个核酸,更优选300-900个核酸,更优选350-900个核酸,更优选400-900个核酸,更优选450-900个核酸,更优选500-900个核酸,更优选550-900个核酸,更优选600-900个核酸,更优选650-900个核酸,更优选700-900个核酸,更优选750-900个核酸,更优选800-900个核酸,更优选850-900个核酸。

[0244] 一组优选的分离的多核苷酸包括SEQ ID NO:1和10,它们是人镍纹蛋白cDNA序列。通常,cDNA序列比基因组序列短得多,更容易插入适当的表达载体中,并且在体内或离体转导/转染到生产细胞或人细胞中。

[0245] 此外,本发明的核苷酸序列包括作为这些序列的衍生物的序列。本发明还包括载体、脂质体和其他载体媒介物,其包含这些序列之一或这些序列之一的衍生物。本发明还包括从镍纹蛋白cDNA、优选人镍纹蛋白cDNA转录和翻译的蛋白质,包括但不限于人镍纹蛋白以及衍生物和变体。

[0246] 还设想了用于在所选宿主细胞中增强表达的密码子优化的核酸分子,所述宿主细胞包括但不限于大肠杆菌、酵母物种、中国仓鼠、幼仓鼠、昆虫、真菌和人。

[0247] 可以通过现有技术的诱变方法制备变体核酸。还设想了用于将来自人的编码序列与小鼠、大鼠或黑猩猩的编码序列进行改组的方法。

[0248] 通过将存在于人镍纹蛋白中的氨基酸与存在于小鼠或大鼠镍纹蛋白中的氨基酸在相应位置处交换制备变体核酸,如果此氨基酸与存在于人镍纹蛋白中的氨基酸不同的话。

[0249] 病毒载体

[0250] 宽泛地讲,基因疗法寻求将新的遗传材料转移到患者的细胞中,从而对患者产生治疗益处。此类益处包括治疗或预防广泛范围的疾病、障碍和其他病症。

[0251] 离体基因疗法方法涉及修饰分离的细胞(包括但不限于干细胞、神经和胶质前体细胞以及胎儿干细胞),然后将其输注、移植(grafted)或以其他方式移植(transplanted)到患者中。参见,例如,美国专利号4,868,116、5,399,346和5,460,959。体内基因疗法寻求在体内直接靶向宿主患者组织。

[0252] 可用作基因转移载体的病毒包括乳多空病毒、腺病毒、痘苗病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和逆转录病毒。合适的逆转录病毒包括HIV、SIV、FIV、EIAV、MoMLV。又一组合适的逆转录病毒包括HIV、SIV、FIV、EAIIV、CIV。另一组优选的病毒载体包括甲病毒、腺病毒、腺相关病毒、杆状病毒、HSV、冠状病毒、牛乳头瘤病毒、Mo-MLV,优选腺相关病毒。

[0253] 用于治疗神经系统障碍的优选病毒是慢病毒和腺相关病毒。这两种类型的病毒都可以在不进行细胞分裂的情况下整合到基因组中,并且这两种类型都已经在神经系统、特别是中枢神经系统的适应证的临床前动物研究中进行了测试。

[0254] 本领域(例如,US 5,677,158)描述了用于制备AAV的方法。US 6,309,634和US 6,683,058描述了将AAV递送至中枢神经系统的例子。

[0255] 优选地,慢病毒载体是复制缺陷型慢病毒颗粒。这种慢病毒颗粒可以由慢病毒载体产生,所述慢病毒载体包含5'慢病毒LTR、tRNA结合位点、包装信号、可操作地连接至编码所述融合蛋白的多核苷酸信号的启动子、第二链DNA合成的起点和3'慢病毒LTR。用于制备慢病毒并将其体内施用至神经细胞的方法描述于US20020037281(用于使用慢病毒载体转导神经细胞的方法(Methods for transducing neural cells using lentiviral vectors))中。

[0256] 逆转录病毒载体是人临床试验中最常用的载体,因为它们携带7-8kb,并且因为它们具有感染细胞和使其遗传材料高效地、稳定地整合到宿主细胞中的能力。参见例如,WO 95/30761;WO 95/24929。肿瘤病毒亚科(Oncovirinae)需要至少一轮靶细胞增殖,用于将外源核酸序列转移和整合到患者中。逆转录病毒载体随机整合到患者的基因组中。逆转录病毒可以用于靶向神经系统的干细胞,因为在神经系统(特别是CNS)的其他细胞中很少发生细胞分裂。

[0257] 已经描述了三种类别的逆转录病毒颗粒;同向性的,其可以有效地感染鼠细胞;和兼向性的,其可以感染许多物种的细胞。第三类别包括异向性逆转录病毒,其可以感染与产生病毒的物种不同的另一种物种的细胞。它们仅整合到分裂细胞的基因组中的能力已经使得逆转录病毒在发育研究中标记细胞谱系以及将治疗性或自杀基因递送至癌症或肿瘤方

面具有吸引力。

[0258] 为了在人患者中使用,逆转录病毒载体必须是复制缺陷型的。这防止在靶组织中进一步产生感染性逆转录病毒颗粒—相反,复制缺陷型载体变为稳定掺入靶细胞基因组中的“俘虏(captive)”转基因。通常,在复制缺陷型载体中,gag、env和pol基因已经被缺失(连同大部分剩余的病毒基因组)。插入异源DNA代替缺失的病毒基因。异源基因可以在内源异源启动子、在靶细胞中有活性的另一种异源启动子或逆转录病毒5'LTR(病毒LTR在多种组织中有活性)的控制下。通常,逆转录病毒载体具有约7-8kb的转基因能力。

[0259] 复制缺陷型逆转录病毒载体需要从例如工程化包装细胞系提供反式复制和组装所必需的病毒蛋白。重要的是,包装细胞不释放有复制能力的病毒和/或辅助病毒。这已经通过从缺乏 $\psi$ 信号的RNA表达病毒蛋白并且从单独的转录单元表达gag/pol基因和env基因来实现。此外,在一些2代和3代逆转录病毒中,5'LTR已经被控制这些基因的表达的非病毒启动子替代,并且3'启动子已经被最小化以仅含有近端启动子。这些设计使导致产生有复制能力的载体或辅助病毒的重组的可能性最小化。

[0260] 表达载体

[0261] 用以重组表达用于在本发明中使用的镍纹蛋白多肽的载体的构建可以使用不需要对本领域普通技术人员进行详细解释的常规技术来完成。然而,对于综述,普通技术人员可不妨查阅Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,(NY 1982)。表达载体可以用于产生用以重组产生用于医学用途的镍纹蛋白多肽的生产细胞,以及用于产生分泌用于裸或包封疗法的镍纹蛋白多肽的治疗性细胞。

[0262] 简而言之,重组表达载体的构建采用标准连接技术。为了进行分析以确认构建的载体中的正确序列,使用例如Messing等人的方法(Nucleic Acids Res.,9:309-,1981)、Maxam等人的方法(Methods in Enzymology,65:499,1980)、或本领域技术人员已知的其他合适方法对基因进行测序。

[0263] 使用常规凝胶电泳进行切割片段的大小分离,如例如由Maniatis等人(Molecular Cloning,第133-134页,1982)所描述的。

[0264] 为了产生有效的表达载体,这些应当含有以正确的阅读框表达编码基因所必需的调节序列。在转录、翻译或翻译后水平上控制基因的表达。转录起始是基因表达的早期且关键的事件。这取决于启动子和增强子序列,并且受到与这些序列相互作用的特定细胞因子的影响。许多基因的转录单元由启动子以及(在一些情况下)增强子或调节子元件组成(Banerji等人,Cell 27:299(1981);Corden等人,Science 209:1406(1980);以及Breathnach和Chambon,Ann.Rev.Biochem.50:349(1981))。对于逆转录病毒,参与逆转录病毒基因组复制的控制元件位于长末端重复序列(LTR)中(Weiss等人编辑,The molecular biology of tumor viruses:RNA tumor viruses,Cold Spring Harbor Laboratory,(NY 1982))。莫洛尼鼠白血病毒(MLV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR含有启动子和增强子序列(Jolly等人,Nucleic Acids Res.11:1855(1983);Capecchi等人,Enhancer and eukaryotic gene expression,Gulzman和Shenk编辑,第101-102页,Cold Spring Harbor Laboratories(NY 1991)。其他强效启动子包括衍生自巨细胞病毒(CMV)的启动子和其他野生型病毒启动子。

[0265] 还已经描述了许多非病毒启动子的启动子和增强子区域(Schmidt等人,Nature 314:285(1985);Rossi和deCrombrugge,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:5590-5594(1987))。用于维持和增加转基因在静止期细胞中的表达的方法包括使用包括以下在内的启动子:I型胶原(1和2)(Prockop和Kivirikko,N.Eng.J.Med.311:376(1984);Smith和Niles,Biochem.19:1820(1980);de Wet等人,J.Biol.Chem.,258:14385(1983))、SV40和LTR启动子。

[0266] 根据本发明的一个实施方案,启动子是选自以下的组成型启动子:泛素启动子、CMV启动子、JeT启动子(US 6,555,674)、SV40启动子、延伸因子1 $\alpha$ 启动子(EF1- $\alpha$ )、RSV、CAG。诱导型/阻遏型启动子的例子包括:Tet-On、Tet-Off、雷帕霉素诱导型启动子、Mx1、Mo-MLV-LTR、孕酮、RU486。

[0267] 一组优选的启动子包括CAG、CMV、人UbiC、JeT、SV40、RSV、Tet调控型启动子、Mo-MLV-LTR、Mx1、Mt1和EF-1 $\alpha$ 。

[0268] 除了使用病毒和非病毒启动子驱动转基因表达之外,增强子序列也可以用于增加转基因表达的水平。增强子不仅可以增加其天然基因的转录活性,而且可以增加一些外来基因的转录活性(Armelior,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70:2702(1973))。例如,在本发明中,胶原增强子序列可以与胶原启动子2(I)一起使用以增加转基因表达。此外,在SV40病毒中发现的增强子元件可以用于增加转基因表达。此增强子序列由如由Gruss等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:943(1981)、Benoist和Chambon,Nature 290:304(1981)以及Fromm和Berg,J.Mol.Appl.Genetics,1:457(1982)所描述的72个碱基对重复组成,将这些文献全部通过引用并入本文。当此重复序列与各种启动子串联存在时,它可以增加许多不同病毒和细胞基因的转录(Moreau等人,Nucleic Acids Res.9:6047(1981))。

[0269] 其他表达增强序列包括但不限于土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件、WPRE、SP163、CMV增强子和鸡 $\beta$ -珠蛋白绝缘子或其他绝缘子。

[0270] 在一个方面,本发明涉及用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的载体。

[0271] 在一个实施方案中,用于在治疗和/或预防受试者的伤害性疼痛中使用的载体包含编码如本文定义的多肽的多核苷酸。

[0272] 在另一个实施方案中,载体还包含可操作地连接至核酸分子的启动子。

[0273] 在一个实施方案中,用于在治疗和/或预防伤害性疼痛中使用的载体选自甲病毒、腺病毒、腺相关病毒、杆状病毒、HSV、冠状病毒、牛乳头瘤病毒和Mo-MLV,优选腺相关病毒。

[0274] 细胞系

[0275] 在一个方面,本发明涉及用根据本发明的载体遗传修饰的分离的宿主细胞。

[0276] 本发明还涉及适合于经由裸细胞或包封细胞生物递送镍纹蛋白的细胞,其被遗传修饰以过表达镍纹蛋白,并且可以移植至患者,以局部递送生物活性镍纹蛋白多肽。此类细胞可以被宽泛地称为治疗性细胞。

[0277] 对于离体基因疗法,优选组的细胞包括神经元细胞、神经元前体细胞、神经元祖细胞、神经元干细胞、人胶质干细胞、人前体细胞、干细胞和胎儿细胞。

[0278] 对于包封,优选的细胞包括视网膜色素上皮细胞,包括ARPE-19细胞;人永生化成纤维细胞;和人永生化星形胶质细胞。

[0279] ARPE-19细胞系是用于基于包封细胞的递送技术的优异的平台细胞系,并且还可

用于基于未包封细胞的递送技术。ARPE-19细胞系是稳健的(即,细胞系在严格条件(如植入中枢神经系统或眼内环境中)下可以存活)。ARPE-19细胞可以被遗传修饰以分泌有治疗意义的物质。ARPE-19细胞具有相对较长的寿命。ARPE-19细胞是人起源的。此外,包封的ARPE-19细胞具有良好的体内装置活力。ARPE-19细胞可以递送有效量的生长因子。ARPE-19细胞引发可忽略的宿主免疫反应。此外,ARPE-19细胞是非致瘤性的。用于培养和包封ARPE-19细胞的方法描述于US 6,361,771中。

[0280] 在另一个实施方案中,治疗性细胞系选自:人成纤维细胞细胞系、人星形胶质细胞细胞系、人中脑细胞系和人内皮细胞系,优选地用TERT、SV40T或vmyc永生化。

[0281] 细胞外基质

[0282] 本发明进一步包括在植入哺乳动物神经系统前,在细胞外基质上体外培养产生镍纹蛋白的细胞。在植入前细胞对微载体的预粘附旨在增强移植细胞的长期活力,并且提供长期功能益处。

[0283] 可以构成细胞外基质的材料包括在体外孵育后细胞粘附至其上的那些材料和细胞可以在其上生长的那些材料,以及可以植入哺乳动物体内而不产生会破坏植入细胞或以其他方式干扰它们的生物或治疗活性的毒性反应或炎症反应的那些材料。此类材料可以是合成的或天然的化学物质,或者具有生物起源的物质。

[0284] 基质材料包括但不限于玻璃和其他硅氧化物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚偏氟乙烯、聚氨酯、聚海藻酸酯、聚砒、聚乙烯醇、丙烯腈聚合物、聚丙烯酰胺、聚碳酸酯、聚戊烯、尼龙、淀粉酶、天然和改性明胶以及天然和改性胶原、天然和改性多糖(包括右旋糖酐和纤维素(例如,硝酸纤维素))、琼脂以及磁铁矿。可以使用可再吸收的或不可再吸收的材料。还预期的是本领域熟知的细胞外基质材料。细胞外基质材料可以商购获得,或者通过以下方式来制备:使分泌这种基质的细胞生长,去除分泌细胞,并且允许待移植的细胞与基质相互作用并粘附至基质。待植入的细胞在其上生长或细胞与其混合的基质材料可以是RPE细胞的固有产物。因此,例如,基质材料可以是细胞外基质或基底膜材料,其由待植入的RPE细胞产生和分泌。

[0285] 为了改善细胞粘附、存活和功能,固体基质可以任选地在其外表面上涂覆有本领域已知的促进细胞粘附、生长或存活的因子。此类因子包括细胞粘附分子、细胞外基质(例如纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、糖胺聚糖或蛋白聚糖)或生长因子。

[0286] 可替代地,如果植入细胞附接至其上的固体基质是由多孔材料构建的,则可以将一种或多种生长或存活促进因子掺入基质材料中,在体内植入后它们将从其中缓慢释放。

[0287] 支持物的构造优选地是球形的(如呈珠状),但是可以是圆柱形的、椭圆形的、扁平的片状或条状、针或销形等。支持基质的优选形式是玻璃珠。另一种优选的珠是聚苯乙烯珠。

[0288] 珠大小的直径的范围可以为约10 $\mu\text{m}$ 至1mm,优选约90 $\mu\text{m}$ 至约150 $\mu\text{m}$ 。关于各种微载体珠的描述,参见例如isher Biotech Source 87-88,Fisher Scientific Co.,1987,第72-75页;Sigma Cell Culture Catalog,Sigma Chemical Co.,St,Louis,1991,第162-163页;Ventrex Product Catalog,Ventrex Laboratories,1989;将这些参考文献通过引用特此并入。珠大小的上限可以由珠对不期望的宿主反应的刺激来决定,不期望的宿主反应可能干扰移植细胞的功能或对周围组织造成损伤。珠大小的上限也可以由施用方法决定。此

类限制是本领域技术人员容易确定的。

[0289] 实施例

[0290] 实施例1:用重组小鼠镍纹蛋白重复治疗完全逆转了患有CFA炎性痛觉过敏的小鼠的机械性疼痛

[0291] 材料与方法:

[0292] 将成年雌性C57BL/6JRj小鼠分为三组; (i) 完全弗氏佐剂 (CFA)+媒介物 (杜尔贝科 PBS (Dulbecco's PBS)), (ii) CFA+重组小鼠镍纹蛋白 (1.8mg/kg), (iii) 用于暴露分析的无处理附属者 (satellite)。如图1所示,使用胰岛素注射器 (30G) 每隔一天 (D1、D3、D5、D7和D9) 皮下 (s.c) 注射施用媒介物或重组小鼠镍纹蛋白 (实线箭头)。在异氟烷麻醉 (4%, 4ml/min O<sub>2</sub>用于诱导;然后2%, 2ml/min O<sub>2</sub>用于维持) 下皮下注射CFA (20 $\mu$ l;虚线箭头)。所有小鼠快速恢复,并且通常在去除麻醉后5-10分钟内活跃。没有提供术后镇痛来帮助促进CFA诱导的敏化作用的全面发生。对于行为测试,在开始实验之前,使CFA小鼠熟悉15-30min透明的丙烯酸行为室。使用校准的冯弗雷细丝在基线处测试缩爪阈值 (PWT),然后常规地进行测试,直至第14-15天,作为机械性伤害性痛觉过敏的替代标记物。在注射CFA之前使用数字测微器从爪最厚部分的腹面到背面测量爪厚度,然后常规地测量,作为炎性水肿/负荷的指标。在整个研究持续时间中常规地测量体重,作为一般健康的替代标记物。所有测试都是在实验者对治疗不知情的情况下进行的。使用混合效应方差分析进行组间统计学分析。所有数据均表示为平均值 $\pm$ SEM,  $P < 0.05$ 被认为是显著的。

[0293] 结果:

[0294] 在第5天,所有注射CFA的小鼠都产生了稳健的后爪机械性伤害性痛觉过敏,如图2a所示。第一次注射1.8mg/kg重组小鼠镍纹蛋白 (实线,黑色圆圈) 后四天,在第9天观察到PWT增加 ( $P < 0.01$ )。随着持续间歇施用重组小鼠镍纹蛋白,PWT分别第11、13和15天维持增加。图2b清楚地显示,CFA注射导致爪宽度的几乎2倍增加,表明存在完全不受重组小鼠镍纹蛋白治疗影响的大量炎性水肿。最后,用重组小鼠镍纹蛋白治疗的CFA小鼠的体重与用媒介物处理的CFA小鼠几乎相同 (图2c),表明小鼠的一般健康不受治疗的影响。

[0295] 结论:

[0296] 在开始给药后数天内,通过重复皮下注射重组小鼠镍纹蛋白的治疗完全逆转了CFA诱导的炎性痛觉过敏。在整个实验持续时间中保持了这种逆转,表明使用重组小鼠镍纹蛋白不会发生镇痛耐受性。重组小鼠镍纹蛋白对炎症负荷没有影响,表明它本身不具有直接的抗炎机制,而对体重没有影响表明重组小鼠镍纹蛋白小鼠的一般健康得到了维持。

[0297] 实施例2:采用重组小鼠镍纹蛋白的急性治疗逆转机械性疼痛,类似于重复治疗患有CFA炎性痛觉过敏的小鼠

[0298] 材料与方法:

[0299] 将成年雌性C57BL/6JRj小鼠分为四组; (i) CFA+媒介物 (ii) CFA+1次注射镍纹蛋白 (iii) CFA+2次注射重组小鼠镍纹蛋白 (iv) CFA+3次注射重组小鼠镍纹蛋白。使用胰岛素注射器 (30G) 每隔一天 (D3、D5和D9;实线箭头) 皮下 (s.c) 注射施用媒介物或重组小鼠镍纹蛋白。在异氟烷麻醉 (4%, 4ml/min O<sub>2</sub>用于诱导;然后2%, 2ml/min O<sub>2</sub>用于维持) 下皮下注射CFA (20 $\mu$ l)。所有小鼠快速恢复,并且通常在去除麻醉后5-10分钟内活跃。没有提供术后镇痛来帮助促进CFA诱导的敏化作用的全面发生。对于行为测试,在开始实验之前,使CFA小鼠

熟悉15-30min透明的丙烯酸行为室。使用校准的冯弗雷细丝在基线处测试缩爪阈值(PWT),然后常规地进行测试,直至第14-15天,作为机械性伤害性痛觉过敏的替代标记物。所有测试都是在实验者对治疗不知情的情况下进行的。使用混合效应方差分析进行组间统计学分析。所有数据均表示为平均值 $\pm$ SEM, $P<0.05$ 被认为是显著的。

[0300] 结果:

[0301] 如图3a所示,在第3天,所有小鼠都发生了由CFA注射处理诱导的稳健的后爪机械性伤害性痛觉过敏。第一次注射1.8mg/kg重组小鼠镍纹蛋白(实线黑色圆圈)后四天,在第7天观察到PWT增加( $P<0.01$ )。在已接受2或3次重组小鼠镍纹蛋白注射的CFA小鼠中还观察到在第9天PWT的类似增加。随着持续间歇施用,PWT分别在第11、13和14天维持增加。在第14-15天实验结束时,将部分 $\mu$ -阿片受体激动剂丁丙诺啡(0.1mg/kg,皮下)或媒介物施用于先前用媒介物重复注射处理的小鼠,以证实所用测定条件的敏感性。如预期的,丁丙诺啡导致PWT的完全逆转( $P<0.0001$ )。

[0302] 结论:

[0303] 全身注射重组小鼠镍纹蛋白完全逆转了患有CFA诱导的炎性痛觉过敏的雌性小鼠的后爪机械性疼痛。单次注射重组小鼠镍纹蛋白导致的伤害性痛觉过敏逆转的幅度和持续时间与三次注射情况下所观察到的类似。

[0304] 序列概述

[0305] SEQ ID NO:1:人镍纹蛋白cDNA

[0306] SEQ ID NO:2:人镍纹蛋白全长氨基酸序列

[0307] SEQ ID NO:3:没有信号肽的人镍纹蛋白氨基酸序列

[0308] SEQ ID NO:4:小鼠镍纹蛋白cDNA

[0309] SEQ ID NO:5:小鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列

[0310] SEQ ID NO:6:没有信号肽的小鼠镍纹蛋白氨基酸序列

[0311] SEQ ID NO:7:大鼠镍纹蛋白cDNA

[0312] SEQ ID NO:8:大鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列

[0313] SEQ ID NO:9:没有信号肽的大鼠镍纹蛋白氨基酸序列

[0314] SEQ ID NO:10:人密码子优化的DNA序列

[0315] SEQ ID NO:11:成熟镍纹蛋白共有序列

[0316] 人镍纹蛋白cDNA(1109bp;CDS=118-999)(SEQ ID NO:1)

[0317] >gi|34147349|ref|NM\_024042.2|智人(Homo sapiens)假定蛋白MGC2601(MGC2601),mRNA

[0318] GCTTCGCCGGGGCCGGGCGGCCGCCCGGCTGCTCCCGCCGCCCGCCGACCCGCGCCCCGCCGGGCGAGCGGTGAGAGCCCCGACTCCCCGACGCCGCCCGCCGTGCCATGGGGTTCCCGCCGCGGCGCTGCTCTGCGCGCTGTGCTGCGGCTCCTGGCCCCGGCTGCCCGCGCCGGCTACTCCGAGGAGCGCTGCAGCTGGAGGGGCGAGCGCCTCAGGAGCCCCGGCAGCGTGCGGAGGGCGCGGTTGAGTGGCTGTACCCGGCTGGGGCGCTGCGCCTGACCCTGGGCGGCCCGATCCCAGAGCGCGGCCCGGCATCGCCTGTCTGCGGCCGGTGGCGCCCTTCGCGGGCGCCAGGTCTTCGCGGAGCGCGCAGGGGGCGCCCTGGAGCTGCTGCTGGCCGAGGGCCCCGGGCCGCGCAGGGGGCCGCTGCGTGCGCTGGGGTCCCCGCGAGCGCCGGGCCCTTCTCCTGCAGGCCACGCCGACCAGGACATCAGCCGCCGCTGGCCGCTTCCGCTTTGAGCTGCGCGAGGACGGGCGCCCCGAGCTGCCCCGCGAGGCCACGG

TCTCGGCGTAGACGGTGCCTGCAGGCCCTGCAGCGACGCTGAGCTGCTCCTGGCCGCATGCACCAGCGACTTCGTAA  
 TTCACGGGATCATCCATGGGGTACCCATGACGTGGAGCTGCAGGAGTCTGTCATCACTGTGGTGGCCGCCCGTGC  
 CTCCGCCAGACACCGCCGCTGTTCCAGGCGGGGCGATCCGGGGACCAGGGGCTGACCTCCATTTCGTACCCCACTGCG  
 CTGTGGCGTCCACCCGGGCCAGGCACCTTCCTCTTCATGGGCTGGAGCCGCTTTGGGGAGGCCCGGCTGGGCTGTG  
 CCCCACGATTCCAGGAGTCCGCCGTGCTACGAGGCTGCCCGTGTGCCACCTCCACCCCTGCGAGGTGGCGCTG  
 CACTGAGGGGCTGGGTGCTGGGGAGGGGCTGGTAGGAGGGAGGGTGGGCCCACTGCTTTGGAGGTGATGGGACTATC  
 AATAAGAACTCTGTTACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0319] 人镍纹蛋白全长氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)

[0320] >IPI00031531.1REFSEQ\_NP:NP\_076947TREMBL:Q9UJH9

[0321] ENSEMBL:ENSP00000219542 Tax\_Id=9606C380A1.2.1 (新型蛋白)

**MGFPAAALLC ALCCGLLAPA ARAGYSEERC** SWRGSGLTQE PGSVGQLALA CAEGAVEWLY  
 PAGALRLTLG GPDPRARPGI ACLRPVRPFA GAQVFAERAG GALELLLAEG PGPAGGRCVR  
 [0322] WGPERRRALF LQATPHQDIS RRVAEFRFEL REDGRPELPP QAHGLGVDGA CRPCSDAELL  
 LAACTSDFVI HGLIHGVTHD VELQESVITV VAARVLRQTP PLFQAGRSGD QGLTSIRTPPL  
 RCGVHPGPGT FLFMGWSRFG EARLGCAPRF QEFRRAYEAA RAAHLHPCEV ALH

[0323] 人镍纹蛋白,没有信号肽的蛋白质 (SEQ ID NO:3)

GYSEERCSWR GSGLTQEPGS VGQLALACAE GAVEWLYPAG ALRLTLGGPD PRARPGIACL  
 RPVRPFAGA QVFAERAGGAL ELLLAEGPGP AGGRCVRWGP RERRALFLQA TPHQDISRRV  
 [0324] AAFRFELRED GRPELPPQAH GLGVDGACRP CSDAELLAA CTSDFVIHGI IHGVTHDVEL  
 QESVITVVA RVLRQTPPLF QAGRSGDQGL TSIRTPPLRCG VHPGPGTFLF MGWSRFGEAR  
 LGCAPRFQEF RRAYEAAAAA HLHPCEVALH

[0325] 小鼠镍纹蛋白cDNA,1363 bp,CDS84..959 (SEQ ID NO: 4)

[0326] NM\_133719.小家鼠 (Mus musculus) 镍纹蛋白. [gi:56550040]

gggcagccgc gccgcgggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtcgg  
 aggcccccgc gcgcccccta accatgctgg tagccacgct tctttgcgcg ctctgttgcg  
 gcctcctggc cgcgtccgct cacgctggct actcgggaaga ccgctgcagc tggaggggca  
 gcggtttgac ccaggagcct ggcagcgtgg ggcagctgac cctggactgt actgagggcg  
 ctatcgagtg gctgtacca gctggggcgc tgcgcctgac cctgggcggc cccgatccgg  
 gcacacggcc cagcatcgtc tgtctgcgcc cagagcggcc ctctcgtggt gccaggtct  
 [0327] tcgctgaacg tatgaccggc aatctagagt tgctactggc cgagggcccc gagctggctg  
 gggcccgcgt catgcgctgg ggtccccgcg agcgcgcgagc ccttttcctg caggccacac  
 cacaccgcga catcagccgc agagtgtctg ccttccgttt tgaactgcac gaggaccac  
 gtgcagaaat gctcctccag gctcaaggct ttggtgtgga tgggtgcctgc aggcctgca  
 gtgatgccga gctcctcctg gctgcatgca ccagtgattt tgtgatccac gggaccatcc  
 atggggctgc ccatgacaca gagctgcaag aatcagtcac cactgtgggtg gttgctcgtg  
 tcatccgcca gacactgcca ctgttcaagg aagggagctc ggagggccaa ggccgggctc  
 ccattcgtac cttgctgcgc tgtggtgtgc gtccctggccc aggetccttc ctcttcatgg  
 gctggagccg atttggcgaa gcttggctgg gctgtgctcc ccgcttccaa gattcagcc  
 gtgtctattc agctgctctc acgaccatc tcaaccatg tgagatggca ctggactgag  
 agacctggga gcaagccctg gatggacctt cttctggaga tggggtgttg gggaggggta  
 tgggaggggt ggtgagaagg gtgtggctcg gatggcatcc tggtaaccac agtgagctgg  
 [0328] tagaatacta agtaactctg accataccag ccaactgtagt catggtcttc tgggagggc  
 agcataccca gctctgtgcc tgccctcaact tgtctactct ccagtctgct gcccttctaa  
 cccttcttag cctgctgacc agtgagctca tgttttcttc gaattccagg gtgctgctgg  
 ggttcagagc aaccgtgccc tagtttgga gacttgagct aattgttttt tttttgtttg  
 tttttttgtt tgttttaaagg tggcctgggg ggggcggcaa aca

[0329] 小鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)

[0330] ref|NP\_598480.1|镍纹蛋白[小家鼠]

- [0331] MLVATLLCAL CCGLLAASAH AGYSEDRCSW RGSGLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIEWLYPA  
GALRLTLGGP DPGTRPSIVC LRPERPFAGA QVFAERMTGN LELLAEGPD LAGGRCMRWG  
PRRRALFLQ ATPHRDISRR VAAFRFELHE DQRAEMSPQA QGLGVDGACR PCSDAELLA  
ACTSDFVIHG TIHGVAHDTE LQESVITVVV ARVIRQTLPL FKEGSSEGQG RASIRTLRLC  
GVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGAPRFQE FSRVYSAALT THLNPCEMAL D
- [0332] 小鼠镍纹蛋白,没有信号肽的蛋白质 (SEQ ID NO:6)
- [0333] GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGPD PGTRPSIVCL RPERPFAGA  
VFAERMTGNL ELLLAEGPDL AGGRCMRWGP RRRALFLQA TPHRDISRRV AAFRFELHED QRAEMSPQA  
GLGVDGACRP CSDAELLAA CTSDFVIHGT IHGVAHDTEL QESVITVVVA RVIRQTLPLF KEGSSEGQGR  
ASIRTLRLRC VRRPGPGSFLF MGWSRFGEAW LGAPRFQEF SRVYSAALT HLNPCEMALD
- [0334] 大鼠镍纹蛋白cDNA (1026bp; CDS=1-876) (SEQ ID NO: 7)
- [0335] >gi|34870570|ref|XM\_213261.2|褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 类似于  
1810034B16Rik蛋白 (LOC287151), mRNA
- [0336] ATGCTGGTAGCGGCGCTTCTCTGCGCGCTGTGCTGCGGCCTCTGGCTGCGTCCGCTCGAGCTGGCTAC  
T
- [0337] CCGAGGACCGCTGCAGCTGGAGGGGCAGCGGTTTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTGGGGCAGCTGACCC  
T
- [0338] GGATTGTACTGAGGGTGCTATCGAGTGGCTGTATCCAGCTGGGGCGCTGCGCCTGACTCTAGGCGGCTC  
T
- [0339] GATCCGGGCACGCGGCCACGATCGTCTGTCTGCGCCCAACACGGCCCTTCGCTGGTGCCAGGTCTTC  
G
- [0340] CTGAACGGATGGCCGCAACCTAGAGTTGCTACTGGCCGAGGGCCAAGGCCTGGCTGGGGCCGCTGCA  
T
- [0341] GCGCTGGGGTCCTCGCGAGCGCCGAGCCCTTTTCCTGCAGGCCACGCCACACCGGGACATCAGCCGCAG  
A
- [0342] GTTGCTGCCTTCCAATTTGAACTGCACGAGGACCAACGTGCAGAAATGTCTCCCCAGGCCCAAGGTTTT  
G
- [0343] GTGTGGATGGTGCCTGCAGGCCCTGCAGTGATGCCGAGCTCCTTCTGACTGCATGCACCAGTGACTTTG  
T
- [0344] GATCCATGGGACCATCCATGGGGTCGTCCATGACATGGAGCTGCAAGAATCAGTCATCACTGTGGTGGC  
C
- [0345] ACTCGTGTATCCGCCAGACACTGCCACTGTCCAGGAAGGGAGCTCGAGGGCCGGGGCCAGGCCTCC  
G
- [0346] TTCGTACCTTGTTGCGCTGTGGTGTGCGTCCCTGGCCAGGCTCCTTCTTCTCATGGGCTGGAGCCGAT  
T
- [0347] TGGCGAAGCTTGGCTGGGCTGCGCTCCCCGCTCCAAGAGTTCAGCCGTGTCTATTCAGCTGCTCTCGC  
G
- [0348] GCCCACCTCAACCCATGTGAGGTGGCACTGGACTGAGAGACCTGGGAGCAAGCCCTGGATGGATCTTCC  
T
- [0349] CTGGGGATGGGGTGTGGGGAGGGGTGATAGGAGGGTGGGTGGGAAGGGTGTGGCTCAGATGGCATCCT  
G
- [0350] GTACCCACAGTGAGGTGGTAGAATACTAAATAACCTGGATCACACC

- [0351] 大鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)
- [0352] >IPI00369281.1|REFSEQ\_XP:XP\_213261|ENSEMBL:ENSRNOP00000026676  
**MLVAALLCAL CCGLLAASAR** AGYSEDRCSW RGSGLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIEWLYPA  
 GALRLTLGGS DPGTRPSIVC LRPTRPFAGA QVFAERMAGN LELLAEGQG LAGGRCMRWG  
 [0353] PRRRALFLQ ATPHRDISRR VAAFQFELHE DQRAEMSPQA QGFGVDGACR PCSDAELLT  
 ACTSDFVIHG TIHGVVHME LQESVITVVA TRVIRQTLPL FQEGSSEGRG QASVRTLLRC  
 GVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGAPRFQE FSRVYSAALA AHLNPCEVAL D
- [0354] 大鼠镍纹蛋白,没有信号肽的蛋白质 (SEQ ID NO:9)  
 GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIIEWLYPAG ALRLTLGGSD PGTRPSIVCL  
 RPTRPFAGA QVFAERMAGN LELLAEGQGL AGGRCMRWGP RRRALFLQA TPHRDISRRV  
 [0355] AAFQFELHED QRAEMSPQAQ GFGVDGACRP CSDAELLTA CTSDFVIHGT IHGVVHDMEL  
 QESVITVVAT RVIRQTLPLF QEGSSEGRGQ ASVRTLLRCG VRPGPGSFLF MGWSRFGEAW  
 LGCAPRFQEF SRVYSAALAA HLNPCVALD
- [0356] 存在于构建体pCAn.镍纹蛋白和pT2.CAn.镍纹蛋白中的密码子优化的镍纹蛋白核  
 苷酸序列 (SEQ ID NO: 10)
- [0357] ATGGGCTTTCCCGCTGCCGCCCTGCTGTGCGCTCTGTGCTGCGGACTGCTGGCTCCTGCAGCCAGAGCC  
 GGCTACAGCGAGGAACGGTGCAGCTGGCGGGCAGCGGCCTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTCGGCCAGCTCGCACT  
 GGCCTGTGCAGAAGGCGCCGTGGAGTGGCTGTACCCCGCAGGCGCCCTGAGACTGACCCTGGGCGGACCCGACCCCA  
 GAGCCAGACCCGGCATTGCCTGTCTGAGGCCGTGCGGCCTTTCGCTGGCGCCAGGTGTTCCCGAGAGAGCCGGC  
 GGAGCCCTGGAACCTCCTGCTCGCCGAAGGCCCTGGTCCAGCCGGCGAAGATGCGTGAGATGGGGCCCAAGAGAGCG  
 GAGAGCCCTGTTCTGCAAGCCACCCCCACCAGGACATCAGCAGACGGGTGGCCGCTTCAGATTCGAGCTGCGGG  
 AGGACGGTAGACCCGAGCTGCCACCTCAGGCCACGGACTGGGAGTGGACGGCGCTGCAGACCCTGTAGCGACGCC  
 GAGCTGCTGCTCGCCGCTGCACCAGCGACTTCGTGATCCACGGCATCATCCACGGCGTGACCCACGACGTGGAGCT  
 GCAGGAAAGCGTCATCACCGTCGTCGCCGCCAGAGTGGTGCAGACAGACCCCCCTCTGTTCCAGGCCGGCAGAAGCG  
 GCGACCAGGGCCTGACCAGCATCCGGACCCCTGAGATGCGGCGTGCATCCCGACCCGGCACCTTCCTGTTTCATG  
 GGCTGGTCCAGATTCGGCGAGGCCCGGCTGGGCTGCGCTCCCCGTTCCAGGAATTCAGACGGGCCTACGAGGCCGC  
 CAGGGCCGCTCATCTGCACCCCTGCGAGGTGGCCCTGCATTGA
- [0358] 共有序列,成熟镍纹蛋白 (SEQ ID NO:11)
- GYSEXRCRCSWR GSGLTQEPGS VGQLXLXCXE GAXEWLYPAG ALRLTLGGXD PXXRPXIXCL 60  
 RPXRPFAGA QVFAERXXGXL ELLLAEGXXX AGGRCXRWGP RRRALFLQA TPHXDISRRV 120  
 [0359] AAFXFELXED XRREXXPQAX GXGVDGACRP CSDAELLXA CTSDFVIHGX IHGVXHDXEL 180  
 QESVITVVXX RVXRQTXPLF XXGXSXXXGX XSRXTXLRG VXPXPGXFLF MGWSRFGEAX 240  
 LGCAPRFQEF XRXYYAAXXX HLPXCEXALX 270
- [0360] X是可以由DNA编码的21种氨基酸中的任一种。
- [0361] 参考文献
- [0362] Armelot, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:2702(1973) .
- [0363] Attal et al.2010, "EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain:2010revision", Eur J Neurol.2010Sep;17 (9) :1113-e88.doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02999.x.Epub 2010Apr 9.
- [0364] Fisher Biotech Source 87-88,Fisher Scientific Co.,1987,pp.72-75.
- [0365] Banerji et al.,Cell 27:299(1981) .
- [0366] Benoist and Chambon,Nature 290:304(1981) .
- [0367] Breathnach and Chambon,Ann.Rev.Biochem.50:349(1981)) .
- [0368] Capecchi et al.,In:Enhancer and eukaryotic gene expression,Gulzman

and Shenk,eds.,pp.101-102,Cold Spring Harbor Laboratories(NY 1991) .

[0369] Cleland,"Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems,"in Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach,Powell and Newman,eds, (Plenum Press:New York,1995) , pp.439-462

[0370] Corden et al.,Science 209:1406(1980) .

[0371] EMA/CHMP/970057/2011,"Guideline on the clinical development of medicinal products intended for the treatment of pain(EMA/CHMP/970057/2011)" from EMA.

[0372] FDA 34355740dft.docx 02/07/22,"Draft Development of Non-Opioid Analgesics for Acute Pain Guidance for Industry"from FDA.

[0373] Finnerup et al.2015,"Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review,meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations",Lancet Neurol.2015Feb;14(2):162-173.

[0374] Fromm and Berg,J.Mol.Appl.Genetics,1:457(1982) .

[0375] Gruss et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:943(1981) .

[0376] Hora et al.,Bio/Technology,8:755-758(1990) .

[0377] I.E.Creighton,Proteins-Structure and Molecular Properties,2nd Ed., W.H.Freeman and Company,New York,1993.

[0378] Johnson et al.,Nat.Med.,2:795-799(1996) .

[0379] Jolly et al.,Nucleic Acids Res.11:1855(1983) .

[0380] **Jørgensen** et al.,Characterization of Meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009Sep;39(1-2):104-116.

[0381] Lysaght et al.,56J.Cell Biochem.196(1996) .

[0382] Maniatis et al.,in Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982) .

[0383] Maxam,et al., (Methods in Enzymology,65:499,1980) .Messing,et al., (Nucleic Acids Res.,9:309-,1981) .

[0384] Moulin et al.2014,"Pharmacological management of chronic neuropathic pain:Revised consensus statement from the Canadian Pain Society",Pain Res Manag.2014Nov-Dec;19(6):328-335.

[0385] Moreau et al.,Nucleic Acids Res.9:6047(1981) .

[0386] NICE 2013,"Neuropathic pain in adults:pharmacological management in non-specialist settings",Clinical guideline[CG173],20November 2013.

[0387] Nishino et al., "Meteorin:a secret3ed protein that regulates glial cell differentitaion and promotes axonal extension",EMBO J.,23(9):1998-2008 (2004) .

[0388] Prockop and Kivirikko,N.Eng.J.Med.311:376(1984) .

[0389] Rattan et al.,Protein Synthesis:Posttranslational Modifications and

Aging, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62, 1992.

[0390] Reagan-Shaw et al., FASEB J, 22, 659-661 (2007).

[0391] Rossi and deCrombrughe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5590-5594 (1987).

[0392] Schmidt et al., Nature 314:285 (1985).

[0393] Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646, 1990.

[0394] Sigma Cell Culture Catalog, Sigma Chemical Co., St. Louis, 1991, pp. 162-163

[0395] Smith and Niles, Biochem. 19:1820 (1980).

[0396] Ventrex Product Catalog, Ventrex Laboratories, 1989.

[0397] Weiss et al., eds., The molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982).

[0398] de Wet et al., J. Biol. Chem., 258:14385 (1983).

[0399] Wold, F., in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp 1-12, 1983.

[0400] Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993).

[0401] 项目

[0402] 1. 一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的多肽, 所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0403] i. SEQ ID NO:3的氨基酸序列; 和

[0404] ii. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体, 其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0405] 2. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽, 其中所述伤害性疼痛是躯体疼痛或内脏疼痛。

[0406] 3. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽, 其中所述伤害性疼痛是炎性疼痛、下背部疼痛、肩部疼痛、肌肉骨骼疼痛、关节炎疼痛、关节疼痛、术后疼痛、创伤后疼痛或癌症疼痛。

[0407] 4. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽, 其中所述伤害性疼痛选自炎性疼痛和术后疼痛。

[0408] 5. 根据项3所述的用于所述用途的多肽, 其中所述伤害性疼痛是炎性疼痛, 如炎性痛觉过敏。

[0409] 6. 根据项3所述的用于所述用途的多肽, 其中所述伤害性疼痛是术后疼痛。

[0410] 7. 根据项1所述的用于所述用途的多肽, 其中所述受试者患有选自关节炎、炎性疼痛、和术后疼痛的疾病或障碍。

[0411] 8. 根据项6所述的用于所述用途的多肽, 其中所述关节炎选自骨关节炎、类风湿性关节炎、或狼疮。

[0412] 9. 根据项6所述的用于所述用途的多肽, 其中所述炎性疼痛选自炎性痛觉过敏、术后疼痛和关节炎。

[0413] 10. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽, 其中所述多肽与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性, 更优选与SEQ ID NO:3具有至少75%、更优选至少80%、更

优选至少85%、更优选90%、更优选95%、更优选98%序列同一性。

[0414] 11. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。

[0415] 12. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的位置7、28、59、95、148、151、161、219、243和265处具有半胱氨酸残基。

[0416] 13. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述多肽是变体多肽,其中任何氨基酸取代是保守取代。

[0417] 14. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中所述多肽能够形成至少一个分子内二硫桥。

[0418] 15. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中待治疗的所述受试者是哺乳动物,优选灵长类动物,更优选人。

[0419] 16. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中将所述多肽通过全身施用来施用。

[0420] 17. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中将所述多肽通过肠胃外注射,优选皮下注射或鞘内注射来施用。

[0421] 18. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中将所述多肽以 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $10,000\mu\text{g}/\text{kg}$ ,如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $7,500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $5,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $2,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $1,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $700\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ - $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 、如 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 身体的剂量来施用。

[0422] 19. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中每周施用所述多肽至少1-3次,如每周2-5次,如每周3-6次。

[0423] 20. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中每隔一天施用所述多肽。

[0424] 21. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中每日施用所述多肽。

[0425] 22. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的多肽,其中在伤害性疼痛的症状发作后开始所述多肽的施用。

[0426] 23. 一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的分离的核酸分子,所述核酸分子包含编码多肽的核酸序列,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

[0427] a. SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0428] b. SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体,其中所述变体与SEQ ID NO:3具有至少70%序列同一性。

[0429] 24. 一种用于在治疗或预防受试者的伤害性疼痛中使用的载体,所述载体包含编码根据项1至22中任一项所述的多肽的多核苷酸。

[0430] 25. 根据项24所述的用于所述用途的载体,所述载体还包含可操作地连接至所述核酸分子的启动子。

[0431] 26. 根据前述项24或25中任一项所述的用于所述用途的载体,其中所述载体选自甲病毒、腺病毒、腺相关病毒、杆状病毒、HSV、冠状病毒、牛乳头瘤病毒和Mo-MLV,优选腺相关病毒。

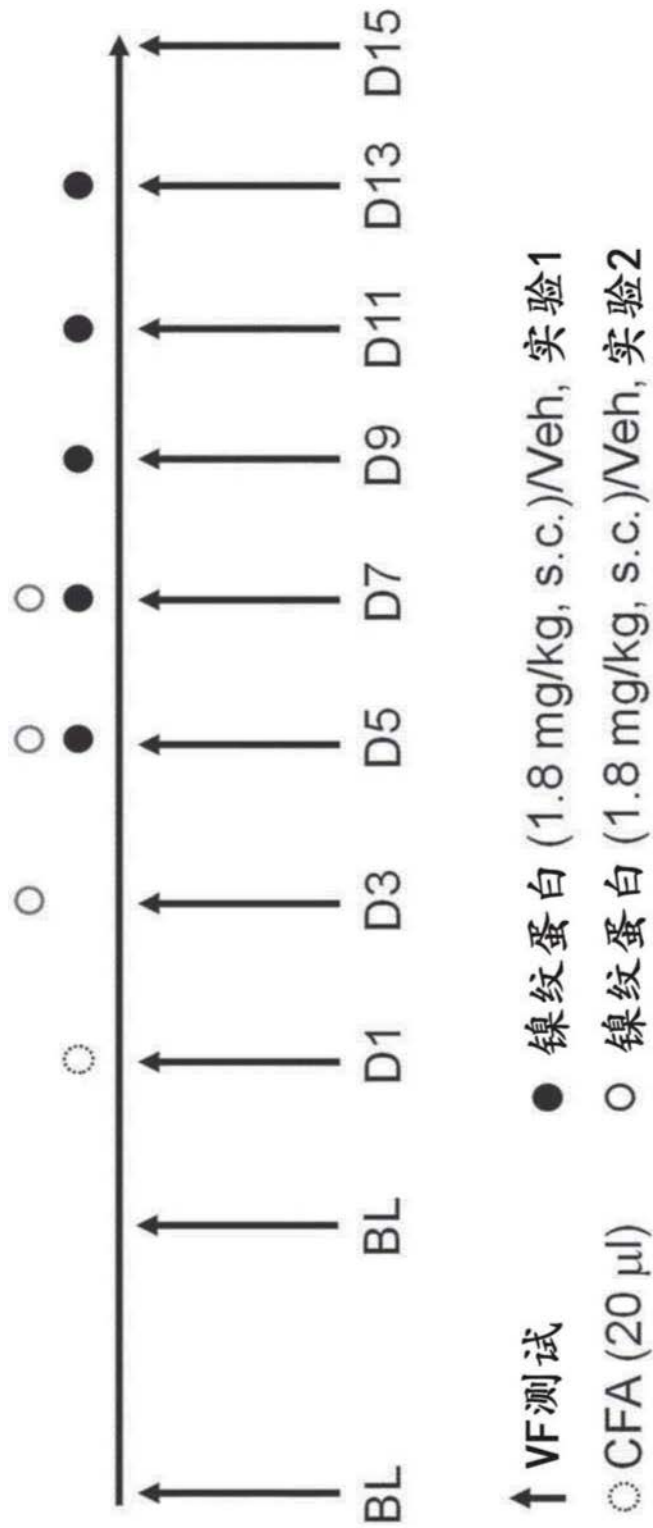


图1

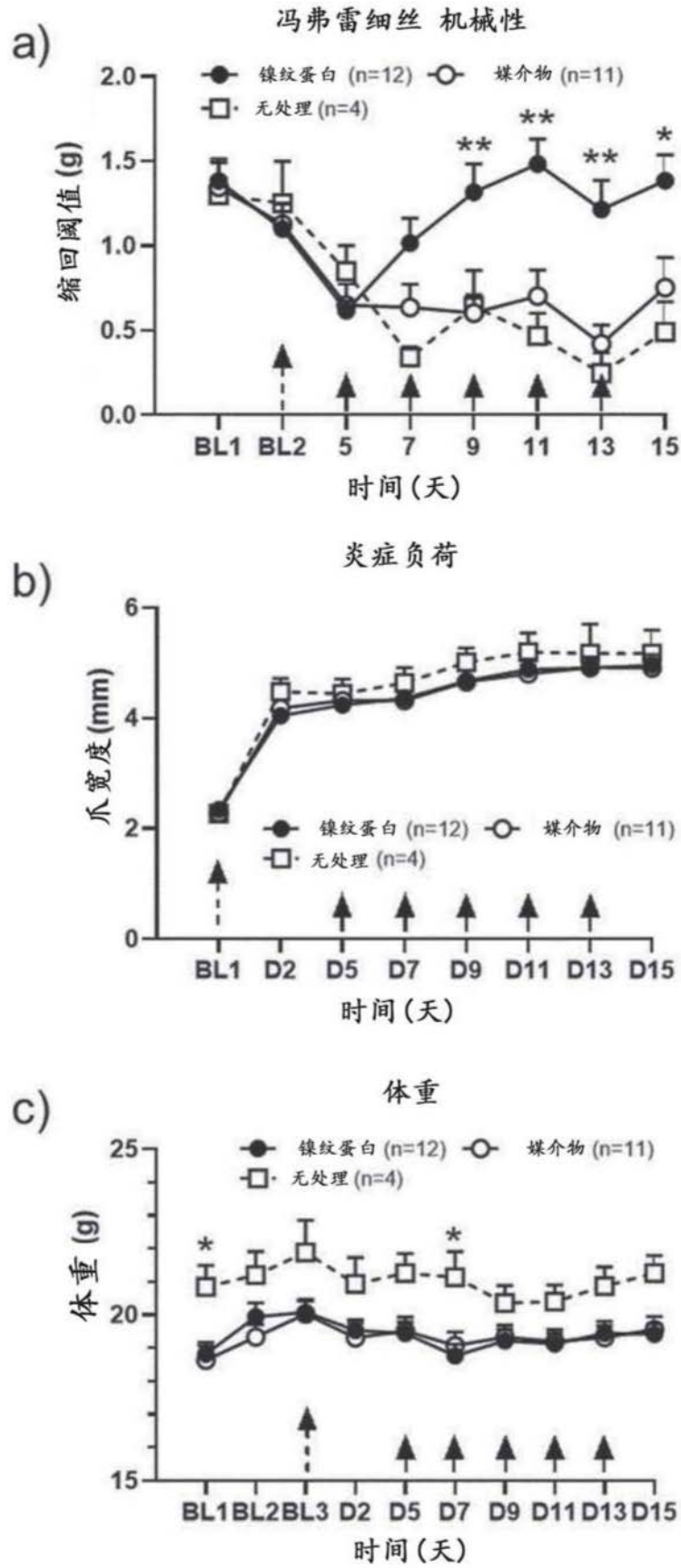


图2

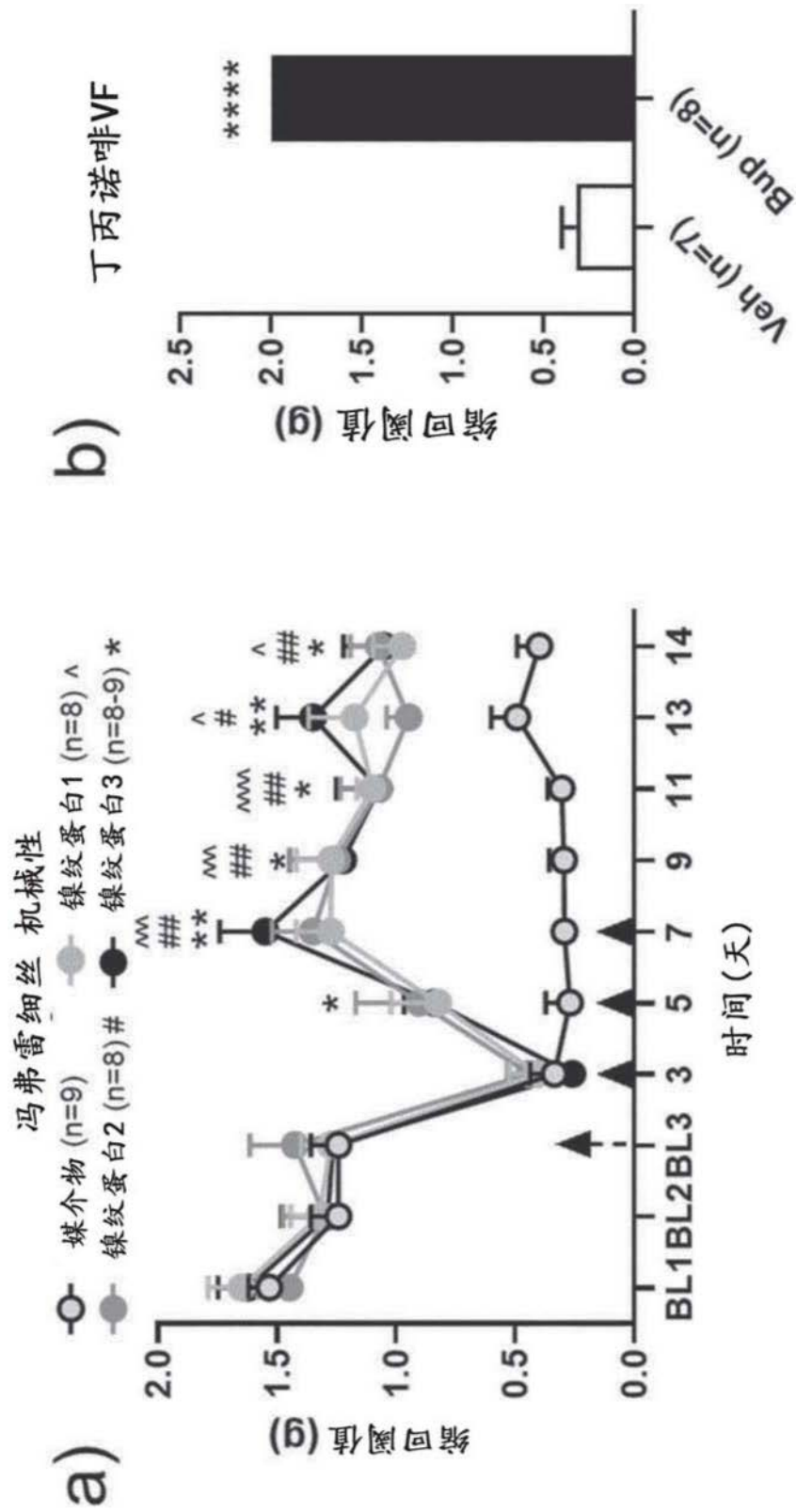


图3

**A)**

```

小鼠      --MLVATLLCALCCGLLAASAHAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQTLTLDCTEGAI EWLY 58
大鼠      --MLVAALLCALCCGLLAASARAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQTLTLDCTEGAI EWLY 58
人        MGFPAAALLCALCCGLLAPAARAGYSEERC SWRGSGLTQEPGSVGQLALACAEGAVEWLY 60
          : .*:*****. :*:*****:*****:*****:* *:***:***

小鼠      PAGALRLTLGGPDPGTRPSIVCLRPERPFAGA QVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRCMR 118
大鼠      PAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCLRPRPFAGA QVFAERMAGNLELLLAEGQGLAGGRCMR 118
人        PAGALRLTLGGPDPRARPGIACLRPVRFAGA QVFAERAGGALELLLAEGPGPAGGRCVR 120
          *****.*:*.*.***** ***** * ***** . *****:

小鼠      WGP RRALFLQATPHRDISRRVA AFRFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELL 178
大鼠      WGP RRALFLQATPHRDISRRVA AFRFELHEDQRAEMSPQAQGFVVDGACRPCSDAELL 178
人        WGP RRALFLQATPHQDISRRVA AFRFELREDGRPELPPQA HGLGVDGACRPCSDAELL 180
          *****:*****:***:* *.*. :***:*. :*****

小鼠      LAACTSDFVIHGTIHGVAHDTELQESVITV VVARVIRQTLPLFKESSEGGQGRASIRTL 238
大鼠      LTACTSDFVIHGTIHGVVHDMELQESVITV VVTRVIRQTLPLFQEGSSEGRGQASVRTLL 238
人        LAACTSDFVIHGI IHGVTHDVELQESVITV VVAARVLRQTPPLFQAGRSGDQGLTSIRTP 240
          *:***** *****.* *****. :***:*** ***: * * .*: :***:

小鼠      RCGVRPGPGSFLFMGWSRFG EAWLGCAPRFQEF SRVYSAALTHLNPCEMALD 291
大鼠      RCGVRPGPGSFLFMGWSRFG EAWLGCAPRFQEF SRVYSAALAAHLNPEVALD 291
人        RCGVHPGPGTFLFMGWSRFG EARLGCAPRFQEF RRAYEAARA AHLHPCEVALH 293
          ****:****:***** ***** *.*.* :***:***:*.

```

**B)**

```

小鼠      GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQTLTLDCTEGAI EWLYPAGALRLTLGGPDPGTRPSIVCL 60
大鼠      GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQTLTLDCTEGAI EWLYPAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCL 60
人        GYSEERC SWRGSGLTQEPGSVGQLALACAEGAVEWLYPAGALRLTLGGPDPRARPGIACL 60
          ****:*****:*****:* *:***:*****:*****.* *:*.***

小鼠      RPERPFAGA QVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRCMRWGP RRALFLQATPHRDISRRV 120
大鼠      RPRPFAGA QVFAERMAGNLELLLAEGQGLAGGRCMRWGP RRALFLQATPHRDISRRV 120
人        RPVRPFAGA QVFAERAGGALELLLAEGPGPAGGRCVRWGP RRALFLQATPHQDISRRV 120
          ** ***** * ***** . *****:*****:*****

小鼠      AAFRFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELL LAACTSDFVIHGTIHGVAHDTEL 180
大鼠      AAFQFELHEDQRAEMSPQAQGFVVDGACRPCSDAELL LTA CTSDFVIHGTIHGVVHDMEL 180
人        AAFRFELREDGRPELPPQA HGLGVDGACRPCSDAELL LAACTSDFVIHGI IHGVTHDVEL 180
          ***:***:*. *.*. :***:*. :*****:*****:***** *****.* **

小鼠      QESVITV VVARVIRQTLPLFKESSEGGQGRASIRTL LRCGVRPGPGSFLFMGWSRFG EAW 240
大鼠      QESVITV VVTRVIRQTLPLFQEGSSEGRGQASVRTLL RCGVRPGPGSFLFMGWSRFG EAW 240
人        QESVITV VVAARVLRQTPPLFQAGRSGDQGLTSIRTP LRCGVHPGPGTFLFMGWSRFG EAR 240
          *****.:***:*** ***: * * .*: :***:*** *****:*****:*****

小鼠      LGCAPRFQEF SRVYSAALTHLNPCEMALD 270
大鼠      LGCAPRFQEF SRVYSAALAAHLNPEVALD 270
人        LGCAPRFQEF RRAYEAARA AHLHPCEVALH 270
          ***** *.*.* :***:***:*.

```

图4

C)

共有	GYSEXRCSWRGSGLTQEPGQVLXLCXEGAXEWLYPAGALRLTLGGXDPXXRPXIXCL 60
共有	RPXRPFAGAQVFAERXXGXLELELLAEGXXXAGGRCXRWGPRERRALFLQATPHXDISRRV 120
共有	AAFXFELXEDXRXEXXPQAXGXGVDGACRPCSDAELLXACTSDFVIHGXIHGVMHDXEL 180
共有	QESVITVXXRVXRQTXPLFXXGXSSXXGXSSXRTXLRGCVXPGPGXFLFMGWSRFGEAX 240
共有	LGCAPRFQEFXRXYAAXXXHLXPCEXALX 270

图4(续)