(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108079279 B
(45)授权公告日 2022.04.12

(21)申请号 201810021543.X
(22)申请日 2011.09.30
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108079279 A
(43)申请公布日 2018.05.29
(30)优先权数据
PA201070423 2010.10.01 DK
61/390,791 2010.10.07 US
(62)分案原申请数据
201180058044.4 2011.09.30
(73)专利权人 霍巴治疗公司
地址 丹麦哥本哈根
(72)发明人 T.E.约翰森 L.U.瓦尔伯格
J.R.乔根森
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 易方方
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)
A61P 25/06(2006.01)

审查员 陈婧莘

权利要求书1页 说明书36页
序列表17页 附图11页

(54)发明名称

镍纹蛋白用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的用途

(57)摘要

本发明涉及使用镍纹蛋白治疗异常性疼痛(allodynia)、痛觉过敏(hyperagesia)自发性疼痛(spontaneous pain)和幻痛(phantom pain)。在一个优选实施方案中,要治疗的异常是异常性疼痛和痛觉过敏,更优选地异常性疼痛,包括热和触觉异常性疼痛。

CN 108079279 B

1.分离的多肽用于制备药物的用途,其中所述药物用在诊断为患有受压性神经病变或坐骨神经痛的受试者治疗超敏感性的方法中,所述多肽由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列构成。

2.根据权利要求1所述的用途,其中被治疗的受试者不经历体重减轻。

3.根据权利要求1所述的用途,其中被治疗的受试者是人。

4.根据权利要求1所述的用途,其中治疗是通过肠胃外注射。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的用途,其中治疗是以1μg/kg-10,000μg/kg体重的剂量施用的。

镍纹蛋白用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的用途

[0001] 本发明是基于申请日为2011年9月30日，申请号为“201180058044.4”(国际申请号为PCT/DK2011/050369)，发明名称为“镍纹蛋白用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 本文援引并入在专利申请或在本专利申请中所引用的全部专利和非专利参考文献的全部内容。本申请要求获得US 61/390,791的利益，其于2010年10月7日提出申请，本文援引并入其内容。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用镍纹蛋白治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛。在一个优选实施方案中，要治疗的病症是异常性疼痛和痛觉过敏，更优选地为异常性疼痛，包括温度和触觉异常性疼痛。在另一个优选实施方案中，异常是温度痛觉过敏。

[0004] 发明背景

[0005] 已经探索了多种疗法治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛，取得了不同程度的成功，这些疗法包括非甾体抗炎药物(NSAIDs)、阿片类药物、抗惊厥剂、抗心律不齐药、三环类抗抑郁药和外用剂。替代性的手段包括麻醉阻滞、硬膜外施用类固醇和神经外科损伤(neurosurgical lesion)。然而，所有当前的治疗对大多数患者仅具有不太高的效力，仅是缓解性而非治愈性的，并且其副作用导致了显著的限制。

[0006] 因此，对有效治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛，优选地仅具有微小副作用、不会影响患者的一般健康的疗法存在高度的需求，没有得到满足。

发明概要

[0007] 本发明提供了用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的方法。该方法使用镍纹蛋白(Meteorin)，编码镍纹蛋白的核苷酸序列，含有编码镍纹蛋白的核苷酸序列的表达载体，用编码镍纹蛋白的表达载体转化和/或转染的细胞系，或输送分泌型镍纹蛋白的生物相容性胶囊。

[0008] 因此，在第一个方面中，本发明涉及一种用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的方法的分离的多肽，所述多肽包括选自下组的氨基酸序列：

[0009] i.SEQ ID NO:3的氨基酸序列；

[0010] ii.SEQ ID NO:3氨基酸序列的生物活性序列变体，其中该变体与SEQ ID NO:3具有至少70％序列同一性；和

[0011] iii.i)或ii)的至少50个连续氨基酸的生物活性片段，其中该片段与SEQ ID NO:3至少70％同一。

[0012] 本发明人发现，镍纹蛋白能够减轻温度和机械性异常性疼痛和自发性疼痛动物模型(承重不足(Weight bearing deficit))中的异常性疼痛。重要的是，动物在整个实验期间没有经历任何体重减轻或毒性表现，并且没有观察到疼痛副作用。在数种不同的异常性

疼痛和自发性疼痛模型中，同时使用全身性(皮下)和局部(鞘内)给药，均独立观察到阳性效果。

[0013] 在一个进一步的方面中，本发明涉及一种用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的方法的分离的核酸分子，所述核酸分子包括编码多肽的核酸序列，所述多肽包含选自下组的氨基酸序列：

[0014] i.SEQ ID NO:3的氨基酸序列；

[0015] ii.SEQ ID NO:3氨基酸序列的生物活性序列变体，其中该变体与SEQ ID NO:3具有至少70％序列同一性；和

[0016] iii.i)或ii)的至少50个连续氨基酸的生物活性片段，其中该片段与SEQ ID NO:3至少70％同一。

[0017] 在一个进一步的方面中，本发明涉及一种用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法的表达载体，其包含本发明的核酸分子。

[0018] 在更进一步的方面中，本发明涉及一种用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法的分离的宿主细胞，其包含根据本发明的表达载体。特别地，本发明涉及可以用于基于细胞的疗法(基于裸细胞的疗法或者基于包囊细胞的疗法)的宿主细胞，用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法。

[0019] 在一个进一步的方面中，本发明涉及一种可植入生物相容性胶囊，其用于通过向受试者输送分泌型的生物活性镍纹蛋白来治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法，所述胶囊包含：

[0020] i.生物相容性外膜和内核，

[0021] ii.所述内核包含根据本发明的细胞，

[0022] iii.所述细胞包含根据本发明的载体。

[0023] 在一个进一步的方面中，本发明涉及一种组合物，包含：

[0024] i.根据本发明的分离的多肽；或

[0025] ii.根据本发明的分离的核酸；或

[0026] iii.根据本发明的表达载体；或

[0027] iv.根据本发明的细胞系；或

[0028] v.根据本发明的可植入生物相容性胶囊；

[0029] 用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法。

[0030] 在进一步的方面中，本发明涉及：

[0031] i.根据本发明的分离的多肽；

[0032] ii.根据本发明的分离的核酸；

[0033] iii.根据本发明的表达载体；

[0034] iv.根据本发明的细胞系；和

[0035] v.根据本发明的可植入生物相容性胶囊；

[0036] 在制造用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的药物中的用途。

[0037] 在进一步的方面中，本发明涉及用于治疗受试者中的异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法，包括向有需要的所述受试者施用治疗有效量的根据本发明的分离的多肽。

[0038] 附图简述

[0039] 图1.对坐骨神经损伤后弗莱毛(von Frey hairs)机械刺激的同侧后足爪缩回阈值(Ipsilateral hind paw withdrawal threshold)。注意,镍纹蛋白处理剂量依赖地减轻了机械性异常性疼痛。箭头指示处理时间点。数据表达为平均值±SEM,评分是盲评的。*p<0.05。

[0040] 图2.对坐骨神经损伤后冷刺激的同侧后足爪响应打分。0是没有响应,1是相应于正常大鼠中见到的类似惊吓的响应,而2和3指示轻微和严重的疼痛反应。注意,镍纹蛋白处理剂量依赖性地减轻了冷异常性疼痛。箭头指示处理时间点。评分是盲评的,且数据表达为平均值±SEM。*p<0.05。

[0041] 图3.坐骨神经损伤大鼠的体重变化。所有动物在整个研究期间均正常增重。箭头指示处理时间点。评分是盲评的,并且数据表达为平均值±SEM。*p<0.05。

[0042] 图4.CCI(慢性压迫损伤)后大鼠的承重不足。使用双足平衡测痛仪(incapacitance meter)来评估每个后肢施加的下向力(downward force)。手术之前,没有不足,因为所有动物在两个后肢上承载相等的重量。12天后,在处理即将开始之前,与同侧肢相比,对侧肢多承受了～50g。注意,镍纹蛋白处理减轻了承重不足。评分是盲评的,并且数据表达为平均值±SEM。*p<0.05。

[0043] 图5.CCI大鼠的体重变化。所有动物在整个研究期间均正常增重。箭头指示处理时间点。评分是盲评的,并且数据表达为平均值±SEM。*p<0.05。

[0044] 图6.镍纹蛋白的CLUSTAL W(1.82)多序列比对。

[0045] 图6a.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。

[0046] 图6b.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。

[0047] 图6c.成熟镍纹蛋白,从人、小鼠和大鼠序列中完全保守的残基生成的共有序列(SEQ ID NO 11)。X代表由DNA编码的21种天然出现的氨基酸的任一种。

[0048] 图7.镍纹蛋白对CCI大鼠中机械超敏感性的效果。箭头指示处理天数,其中动物全身性注射0.1mg/kg,0.5mg/kg或1.8mg/kg重组镍纹蛋白或者作为阴性对照的溶媒。使用弗莱毛检查大鼠的伤害感受(nociception)改变,数据表达为平均值±SEM。*表示与溶媒处理动物相比差异显著(p<0.05)。

[0049] 图8.镍纹蛋白对CCI大鼠中温度超敏感性的效果。箭头指示处理天数,其中动物全身性注射0.1mg/kg,0.5mg/kg或1.8mg/kg重组镍纹蛋白或者作为阴性对照的溶媒。使用Hargreaves装置评估温度缩回延迟,数据表达为平均值±SEM。*表示1.8mg/kg镍纹蛋白处理的与溶媒处理的动物相比差异显著(p<0.05)。#表示0.5mg/kg镍纹蛋白处理的与溶媒处理的动物相比差异显著(p<0.05)。注意,镍纹蛋白显著并且剂量依赖地减小温度异常性疼痛。

[0050] 图9.镍纹蛋白对CCI大鼠承重差的影响。箭头指示处理天数,其中动物全身性注射0.1mg/kg,0.5mg/kg或1.8mg/kg重组镍纹蛋白或者作为阴性对照的溶媒。受伤与未受伤肢之间的承重差用双足平衡测痛仪加以确定,并表达为%差异。数据显示为平均值±SEM。*表示1.8mg/kg镍纹蛋白处理的与溶媒处理的动物相比差异显著(p<0.05)。#表示0.5mg/kg镍

纹蛋白处理的与溶媒处理的动物相比差异显著(p<0.05)。$表示0.1mg/kg镍纹蛋白处理的与溶媒处理的动物相比差异显著(p<0.05)。注意,镍纹蛋白显著地且剂量依赖地减小承重不足。

[0051] 图10.CCI研究期间动物的体重。箭头指示处理天数,其中动物或者全身性注射0.1mg/kg,0.5mg/kg或1.8mg/kg重组镍纹蛋白或者作为阴性对照的溶媒。镍纹蛋白处理组与溶媒相比,体重没有变化。

[0052] 图11.全身给药后大鼠血清中的镍纹蛋白。动物在第39天(t=0)被全身性注射0.1mg/kg,0.5mg/kg或1.8mg/kg重组镍纹蛋白。在注射后2、6、24小时收集血清样品,并用ELISA确定镍纹蛋白浓度。在幼稚对照大鼠的血清样品中检测不到镍纹蛋白。

[0053] 图12.镍纹蛋白对缺血性坐骨神经损伤后机械刺激的足爪缩回阈值的影响。箭头指示鞘内注射的时间点。数据显示为平均值±SEM。*表示溶媒与6μg镍纹蛋白之间有显著差异(p<0.05),而#表示溶媒与2μg镍纹蛋白之间有显著差异(p<0.05)。

[0054] 图13.镍纹蛋白对缺血性坐骨神经损伤后冷刺激响应的影响。箭头指示鞘内注射的时间点。数据显示为平均值±SEM。*表示溶媒与6μg镍纹蛋白之间有显著差异(p<0.05),而#表示溶媒与2μg镍纹蛋白之间有显著差异(p<0.05)。

[0055] 发明详细说明

[0056] 定义

[0057] 如本申请中使用的,“生物相容性胶囊”的意思是胶囊在植入到宿主哺乳动物时,不会引发足以导致胶囊排斥或使其不可工作的有害宿主响应(例如通过降解)。

[0058] 如本申请中使用的,“编码序列”是被转录并翻译成多肽的多核苷酸序列。

[0059] 如本申请中使用的,“控制序列”是指实现与之连接的编码和非编码序列的表达所必需的多核苷酸序列。控制序列一般包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。此外,“控制序列”指控制编码序列内编码的肽的加工的序列;这些可以包括,但不仅限于,控制肽的分泌、蛋白酶切割和糖基化的序列。术语“控制序列”意图至少包括其存在能够影响表达的组件,并可以包括其他存在时有好处的组件,前导序列和融合配偶序列。

[0060] 启动子的“下调”是指转基因产物的表达被减小到这样的水平,可能导致在体内植入后缺少转基因产物的显著的生物学活性。如本申请中使用的,“启动子不被下调”的意思是,在体内植入到哺乳动物宿主后,启动子驱动或继续驱动转基因以有生物活性的水平表达。

[0061] 如本申请中使用的,术语“表达载体”是指能够指导与其操作连接的基因的表达的载体。一般地,重组DNA技术中有用的表达载体经常是质粒的形式。

[0062] 如本申请中使用的,术语“遗传修饰”和“遗传工程化”是指,通过有意引入外源DNA稳定或瞬时改变细胞的基因型。DNA可以是合成的或者自然来源的,并可以含有基因、基因的部分、或其它有用的DNA序列。术语“遗传修饰”并不意味着包括自然发生的改变,例如通过自然病毒活性、自然遗传重组等出现的改变。

[0063] 如本申请中使用的,“免疫隔离胶囊”的意思是,胶囊在被植入到哺乳动物宿主内时,宿主免疫系统对其核心内的细胞的有害效果最小。

[0064] 如本申请中使用的,“生物活性化合物的长期稳定表达”的意思是,在超过一个月,优选地超过3个月,更优选地超过6个月的时期内,以足以保持其有用生物活性的水平连续

产生生物活性化合物。

[0065] “哺乳动物启动子”是指能够在哺乳动物细胞内发挥功能的启动子。

[0066] 镍纹蛋白，如本申请中使用的，是指具有从任何物种获得的基本上纯化的镍纹蛋白氨基酸序列的多肽，那些物种特别是哺乳动物，包括黑猩猩、牛、绵羊、猪、鼠、马和优选地人，来自任何来源，无论是自然的、合成的、半合成的、还是重组的。术语还指示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，和被翻译后修饰的蛋白。

[0067] 如本申请中使用的，“生长因子特征”限定与经典生长因子相似的序列相关特征，经典生长因子是分泌型蛋白，通过受体作用于靶细胞，在靶细胞中导致一种或多种如下的响应：生长包括增殖、分化、存活、再生、迁移、重新获得功能、提高功能性营养支持，例如神经营养支持。

[0068] 如本申请中使用的，术语“操作连接”的意思是，感兴趣的核苷酸序列与重组表达载体内的调节序列相连，其连接方式允许该核苷酸表达(例如在体外转录/翻译系统中，或者当载体被引入到宿主细胞时，在宿主细胞内)。

[0069] 如本申请中使用的，术语“调节序列”意图包括启动子、增强子和其它表达控制元件(例如多聚腺苷酸化信号)。

[0070] “序列同一性”：高水平的序列同一性表明第一个序列来自于第二个序列。氨基酸序列同一性要求两个比对序列之间的相同的氨基酸序列。因此，与参考序列享有70％氨基酸同一性的候选序列要求，在对准后，候选序列70％的氨基酸与参考序列中相应的氨基酸相同。同一性可以通过计算机分析的辅助加以确定，例如，但没有限制，ClustalW计算比对程序(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)和其中建议的默认参数。ClustalW软件在http://www.ebi.ac.uk/clustalw的欧洲生物信息研究所的ClustalW WWW服务器上可以得到。使用该程序的默认设置，将询问序列的成熟(生物活性)部分与参考多肽对准。计数完全保守的残基数目，并除以参考多肽的长度。

[0071] ClustalW算法可以类似地用于比对核苷酸序列。序列同一性可以按照与说明用于氨基酸序列的相似的方式计算出。

[0072] 术语“受试者”，如本申请中使用的，意味着任何可以施用镍纹蛋白多肽或多核苷酸、治疗细胞或生物相容性胶囊的哺乳动物。本发明方法具体意图治疗的受试者包括人，以及非人灵长动物，绵羊，马，牛，山羊，猪，狗，猫，兔，豚鼠，仓鼠，沙鼠，大鼠和小鼠，以及和从这些宿主来源或发生的器官、肿瘤、和细胞。

[0073] 如本申请中使用的，术语“转化”是指插入外源多核苷酸(即“转基因”)到宿主细胞内。该外源多核苷酸被整合到宿主基因组内。

[0074] “治疗”或“处理”可以用多种不同的方式进行，包括治愈性的、减轻性的和预防性的。治愈性的治疗/处理一般旨在治愈已经存在于受治个体内的临床状况，例如疾病或感染。减轻性的治疗/处理一般意味着处理是为了改善个体内现存的临床状况。预防性的治疗/处理一般旨在预防临床状况或减少罹患该状况的危险，或减少状况的程度。

[0075] 治疗能够改变潜在的疾病进程。通过影响实际的疾病进程，“疾病缓解性”治疗能够延迟、逆转或防止病症的进程，或者能够改变疾病的长期过程。

[0076] 如本申请中使用的，术语“载体”是指能够转运另一个与之连接的核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指其中可以连接额外DNA节段的环形双链DNA环。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最通常使用的载体形式。然而，本发明意图包括其它形式的表达载体，例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)，它们发挥等价的功能。

[0077] 异常性疼痛

[0078] 异常性疼痛(allodynia)，意思是“其它的疼痛(other pain)”，是由于通常不会引发疼痛的刺激导致的疼痛，并且可以是温度或机械/触觉疼痛。它是由通常不会导致疼痛感的刺激产生的疼痛，并可以在损伤某一个部位后出现。异常性疼痛与痛觉过敏和自发性疼痛不同，后两者分别在“痛觉过敏”和“自发性疼痛”部分进行描述。

[0079] 有三种不同类型的异常性疼痛：

[0080] ●机械性异常性疼痛(也称作触觉异常性疼痛)

[0081] 1.静态机械性异常性疼痛-响应于轻触碰/压力的疼痛

[0082] 2.动态机械性异常性疼痛-响应于刷擦的疼痛

[0083] ●温度(热或冷)异常性疼痛-受影响区域内来自通常温和的皮肤温度的疼痛

[0084] 异常性疼痛是许多疼痛状况的一种临床表现，疼痛状况例如神经病变，复杂区域疼痛综合征，疱疹后神经痛，纤维肌痛，和偏头痛。异常性疼痛还可能由一些用于治疗神经损伤包括脊髓损伤的干细胞群体所导致。在本发明的一个优选实施方案中，要治疗的异常性疼痛是冷异常性疼痛。在本发明的另一个优选实施方案中，要治疗的异常性疼痛是热异常性疼痛。

[0085] 参与伤害感受和机械感觉的细胞类型是负责异常性疼痛的细胞。在健康个体中，伤害感受器(nociceptors)感觉关于细胞应激和损伤以及皮肤温度的信息，并将其发送到脊髓。这些神经元的细胞体位于背根神经节，重要结构位于脊髓的两侧。突触随后通过后角与第二级神经元建立连接。第二级神经元跨越到脊髓的另一侧(对侧)，并到达丘脑核。从那里，信息通过一个或多个神经元被传递到大脑的体感觉皮质。机械刺激感受器遵循相同的一般路径。然而，它们不是在脊髓水平跨越，而是在下骨髓(lower medulla)跨越。此外，它们分组成束，与伤害感受束在空间上分开。

[0086] 尽管有这些解剖学上的分离，机械刺激感受器能够通过与相同的中间神经元建立联系而影响伤害感受器的输出，这些中间神经元的激活能够减少或完全消除疼痛的感觉。另一个调节疼痛信息传送的方法是通过来自大脑的下行纤维(descending fiber)。这些纤维通过不同的中间神经元发挥作用来阻断来自伤害感受器的信息传送到第二级神经元。

[0087] 已经提出这两种疼痛调节机制都在疼痛超敏的病理中有牵涉。多个研究提示，伤害脊髓会导致伤害感受器、机械刺激感受器和中间神经元的损失和再组织，导致机械刺激感受器输送疼痛信息。一项不同的研究报道在损伤部位出现了下行纤维。所有这些变化最终影响脊髓内部的回路，并改变了信号的平衡，有可能导致与异常性疼痛相关的强化痛觉感受。

[0088] 不同细胞类型也与异常性疼痛相关联。例如，有报道称，丘脑中的小胶质细胞可能

通过改变第二级伤害感受器的性质促成异常性疼痛。在脊髓中通过招募免疫系统细胞，例如单核细胞/巨噬细胞和T淋巴细胞，实现相同的效果。

[0089] 如已经提到的，存在调节疼痛感觉的下行神经元。这些神经元中的许多来自脑干的核心，并通过中脑的导水管周围灰质(PAG)。

[0090] 身体具有另一种控制疼痛的机制：释放内源阿片样物质，特别是在PAG的水平。有的神经元在PAG释放脑啡肽、内啡肽和强啡肽，并由此调节其调控疼痛感觉的能力。其它神经元也能够在疼痛的来源处释放其内源阿片样物质。如果这种情况发生，则伤害感受器向第二级神经元发送的疼痛信息被阻断，从而不会感受到疼痛。不幸的是，在受到异常性疼痛困扰的人中，这些内在机制经常受损和无功能，所以需要施用药物。

[0091] 许多化合物可以减轻异常性疼痛的痛苦。其中某些是对异常性疼痛的某些类型特异性的，而另外一些则是一般性的。它们包括非甾体抗炎药(NSAIDs)、阿片样物质、和靶定不同离子通道的化合物。

[0092] 本发明涉及镍纹蛋白治疗异常性疼痛的用途。优选地，要治疗的异常性疼痛是温度异常性疼痛。

[0093] 如实施例4证明的，在接受最高剂量镍纹蛋白(1.8mg/kg)的组中的大多数动物实现了完全逆转到正常的感觉功能。因此可以想见，镍纹蛋白能够在至少一部分经治疗的受试者中实现异常性疼痛的基本上完全的逆转。在一个优选的实施方案中，治疗导致至少一部分经治疗的受试者的疾病缓解。

[0094] 痛觉过敏

[0095] 痛觉过敏是对通常会感觉疼痛的刺激的一种极端响应。刺激可以是机械/触觉或热刺激。

[0096] 痛觉过敏与其它类型的与神经损伤有关的疼痛(例如异常性疼痛)相似，因此可能对如“异常性疼痛”部分所述的这种状况的标准治疗有响应。

[0097] 在一个实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗痛觉过敏的用途。优选地，要治疗的痛觉过敏是热痛觉过敏。在本发明的一个实施方案中，要治疗的痛觉过敏是温度痛觉过敏。在本发明的一个实施方案中，要治疗的痛觉过敏是冷痛觉过敏。在本发明的另一个实施方案中，要治疗的痛觉过敏是热痛觉过敏。如上所述，在接受最高剂量镍纹蛋白的动物中实现了基本上完全逆转的正常感觉功能。因此可以想见，镍纹蛋白能够在至少一部分经治疗的受试者中导致痛觉过敏的完全逆转。在一个优选的实施方案中，镍纹蛋白在至少一部分经治疗的受试者中导致疾病缓解。

[0098] 自发性疼痛

[0099] 自发性疼痛的特征是没有任何触发而出现的疼痛。自发性疼痛的临床症状包括针刺感(sensation of pins and needles)、射伤感(shooting)、烧灼感、刺伤感和阵发性(类似电击)疼痛，有时伴随感觉迟钝和/或感觉异常。感觉迟钝的定义为一种不愉快、异常的触觉，它可以认为是一种自发性的疼痛。感觉异常的定义为受试者皮肤的麻刺、刺痛或麻木感，而没有明显的长期物理效应。自发性疼痛似乎可能是由于传入通路中的神经元的自发活性导致的。

[0100] 在一个实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗自发性疼痛的用途。因此可以想见，镍纹蛋白能够导致至少一部分受治疗的受试者的自发性疼痛的完全逆转。在一个优

选实施方案中，治疗导致至少一部分受治疗的受试者中的疾病缓解。

[0101] 幻痛

[0102] 幻痛感的表述为，受试者感觉到不是其身体的物理部分的肢体或器官的感受。幻痛感最经常在手臂或腿截肢之后被记录，但是也可能发生在摘除乳房或内脏之后。幻痛感因人而异。感受到的幻痛可能是与移动、触碰、温度、压力和痒相关的感觉。

[0103] 在一个实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗幻痛的用途。

[0104] 异常性疼痛和痛觉过敏的原因

[0105] 异常性疼痛、痛觉过敏、以及一般的超敏反应可能由于各种疾病引起，其中列举若干如下。

[0106]

类型	原因子类型
外伤性机械损伤	受压性神经病变 神经切断术 脊髓损伤 术后疼痛 幻肢痛 瘢痕形成 坐骨神经痛
代谢或营养	酒精性神经病 糙皮病 脚气 烧足综合征
病毒	带状疱疹后神经痛 HIV/AIDS 疼痛
神经毒	长春新碱 顺铂 泰素(taxol) 铊 砷 放射治疗
疾病(非病毒性)	糖尿病 恶性肿瘤 多发性硬化 三叉神经痛 格林-巴利综合征 法布里病 丹吉尔病 血管炎/血管病 淀粉样蛋白 特发性疾病
缺血	丘脑综合征 卒中后疼痛
神经递质功能	复杂区域疼痛综合征

[0107]

[0108] 因此，在一个实施方案中，本发明涉及对被诊断患有上表所列的病症的受试者中的异常性疼痛、痛觉过敏或超敏反应的治疗。优选地，本发明涉及治疗被诊断患有疼痛性糖尿病神经病变、带状疱疹后神经痛或坐骨神经痛的受试者中的超敏反应。更优选地，本发明涉及治疗被诊断患有疼痛性糖尿病神经病变、带状疱疹后神经痛或坐骨神经痛的受试者中

的异常性疼痛或痛觉过敏。在更加优选的实施方案中，本发明涉及治疗被诊断患有疼痛性糖尿病神经病变、带状疱疹后神经痛或坐骨神经痛的受试者中的异常性疼痛。

[0109] 治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法

[0110] 在一个实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的用途。在更优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗异常性疼痛、痛觉过敏和/或自发性疼痛的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗痛觉过敏和/或异常性疼痛的用途。

[0111] 在一个实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗异常性疼痛的用途。在更优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗机械刺激异常性疼痛的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗温度异常性疼痛的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗冷异常性疼痛的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白用于治疗热异常性疼痛的用途。

[0112] 在另一个优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗自发性疼痛的用途。

[0113] 在另一个优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗痛觉过敏的用途。在更优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗机械刺激痛觉过敏的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗温度痛觉过敏的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗过痛觉过敏的用途。在更加优选的实施方案中，本发明涉及镍纹蛋白治疗热痛觉过敏的用途。

[0114] 随附的实施例(实施例4)证明，镍纹蛋白的效果是长期持续的，特别是考虑到镍纹蛋白相对短的血清半衰期(图11)。这表明，镍纹蛋白不仅可以减轻痛觉过敏、超敏反应、异常性疼痛和自发性疼痛的症状，而且镍纹蛋白还可以实际上能够缓解其背后的疾病或异常。因此，在一个实施方案中，治疗是疾病缓解性治疗。

[0115] 实施例还证明，一些被测试的受试者经历了感觉障碍的完全逆转。因此，在一个实施方案中，治疗导致至少一部分的经治疗的受试者的感觉障碍完全逆转，优选为异常性疼痛的完全逆转，更优选为触觉异常性疼痛的完全逆转。在另一个优选的实施方案中，治疗导致至少部分的经治疗的受试者的痛觉过敏被基本上完全逆转。

[0116] 神经性疼痛的治疗

[0117] 神经性疼痛是一类疼痛，其包括多种形式的慢性疼痛，且缘于神经组织而非体组织的功能障碍。神经性疼痛，其是来源于中枢或外周神经系统功能障碍的疼痛，也可能是外周神经或中枢神经系统区域的损伤所导致的，并可能由于疾病导致，或可以是特发性的。神经性疼痛的症状包括烧灼感、刺痛感、电击感、针刺感、感觉异常、感觉迟钝、僵硬、肢体麻木、身体变形感(feelings of bodily distortion)、异常性疼痛(由通常无害的刺激引发的疼痛)、痛觉过敏(对疼痛的异常敏感)、痛觉过度(疼痛刺激终止后仍长时间持续的过度的疼痛反应)、幻痛和自发性疼痛。

[0118] 当前管理神经性疼痛的疗法对许多患者的效益有限，而且牵涉不良副作用或剂量限制性毒性。此外，当前疗法是对症的，而非疾病缓解性的。仍然需要有改进的疗法，特别是具有缓解疾病的能力的疗法，来管理和治疗神经性疼痛。

[0119] 在一系列动物研究中，本发明人观察到，施用镍纹蛋白剂量可导致触觉和温度疼痛超敏以及自发性疼痛得到长期持续的改善。在多个实例中，在最后一个剂量1周之后仍然

能够在动物体内检测到治疗效果。在其它实例中，在最后一个剂量2周甚至3周后仍然可以检测到治疗效果，并且与对照处理存在显著差异。

[0120] 在所观察的实例中，镍纹蛋白多肽每2或3天皮下或鞘内注射输送一次，达9或11天。在皮下注射24小时后，动物血清中检测不到镍纹蛋白。因此，在所观察的施用方案下，不大可能出现镍纹蛋白的任何蓄积。镍纹蛋白的长期持续效果可能是由于动物体内的表遗传变化或神经损伤修复导致的。修复可能通过重新获得功能、神经形成或神经元前体的分化实现。

[0121] 无论如何，非常令人惊讶的是，在治疗终止后如此长的时间内仍然可以观察到治疗效果。已经得到批准的神经性疼痛药物，例如加巴喷丁、5-羟色胺去甲肾上腺素再摄取抑制剂、三环类抗抑郁药、止痛药、大麻、和阿片类物质治疗剂，均不会在施用最后一个剂量后如此长时间内仍可观察到治疗效果。例如，在阿片类物质的场合，发挥疗效需要血清中存在药物。当药物的血清水平下降到低于某个阈值时，就观察不到治疗效果。

[0122] 因为本发明人已经证明，镍纹蛋白以长剂量间隔给药，可有效治疗不同类型神经性疼痛(包括温度或触觉异常性疼痛和自发性疼痛)的不同症状，本发明人认为，一般的神经性疼痛都可以通过以相对长的剂量间隔施用镍纹蛋白多肽来加以治疗。

[0123] 相对长的剂量间隔是指剂量之间至少间隔2天，例如剂量之间间隔至少3天，例如每周2个剂量。更优选地，长剂量间隔是至少1周，例如至少2周，更优选地至少3周，例如至少4周，或者至少1个月。

[0124] 换一种方式表达，剂量间隔是如此之长，以至于在一次施用镍纹蛋白之后，在施用下一个剂量时，被治疗受试者的血清中已经不再能够检测到该多肽。在另一个实施方案中，血清水平低于10ng/mL，例如低于5ng/mL，更优选地低于1ng/mL，例如低于0.5ng/mL，例如低于0.1ng/mL。

[0125] 在一些实施方案中，长剂量范围之前是更频繁的初始镍纹蛋白给药，例如每天2次，每天1次，每2天一次，每3天1次，或者每4天1次。该初始剂量时间表可以保持例如2、3、4、5、6、7、9、11、14、21天或者更久。该剂量时间表完成后，镍纹蛋白可以以更低的频率施用，例如如上所述。

[0126] 因此在一个方面中，本发明涉及一种在有需要的人受试者中治疗体内神经性疼痛的方法，包括向受试者施用治疗有效量的神经营养性多肽，所述多肽包含与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3次或者频率更低。

[0127] 优选地，施用是每周或者更低频率的施用。甚至更优选地，施用是每两周或者更低频率的施用。

[0128] 在一个实施方案中，所述治疗的治疗效果可以在多肽施用之间的整个时间段内减轻神经性疼痛的至少一种症状。该至少一种症状可以从下组中选出：异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛、幻痛、烧灼感、麻刺感、电击感、针刺感、感觉异常、感觉迟钝、僵硬、肢体麻木、身体变形感、和痛觉过度(疼痛刺激终止后仍长时间持续的一种过度的疼痛反应)。优选地，所述至少一种症状从下组中选出：异常性疼痛、痛觉过敏和自发性疼痛。更优选为异常性疼痛。

[0129] 优选地，所述治疗在多肽施用之间的整个时间段内在所述受试者的血清中不保持可测量水平的所述多肽。优选地，所述多肽在多肽施用之间在所述受试者血清中的水平下

降到低于10ng/mL，例如低于5ng/mL，更优选地低于1ng/mL，例如低于0.5ng/mL，例如低于0.1ng/mL。

[0130] 在另一个相关的方面中，本发明涉及一种治疗有需要的人受试者中的神经性疼痛的方法，包括向受试者施用治疗有效量的神经营养性多肽，所述多肽包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70％的同一性的氨基酸序列，其中所述施用在多肽施用之间的整个间隔内不在所述受试者的血清中保持可测量水平的所述多肽。

[0131] 本发明还涉及使用本发明的多肽在所述治疗神经性疼痛的方法中的用途，或者本发明多肽在制造用于所述神经性疼痛的治疗的药物中的用途。

[0132] 优选地，在多肽施用之间，所述多肽在所述受试者血清中的水平降低到低于10ng/mL，例如低于5ng/mL，更优选地低于1ng/mL，例如低于0.5ng/mL，例如低于0.1ng/mL。

[0133] 关于本发明使用长剂量间隔治疗神经性疼痛的这些方面，神经营养性多肽优选地与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85％的序列同一性，更优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％。

[0134] 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。

[0135] 优选地，神经营养性多肽在相对于SEQ ID NO:3氨基酸序列的第7、28、59、95、148、151、161、219、243和265位具有半胱氨酸残基。

[0136] 镍纹蛋白

[0137] 本发明涉及被鉴定为镍纹蛋白的多肽和编码所述蛋白的多核苷酸在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛中的用途。在一个实施方案中，构想通过使用胶囊向受试者输送分泌型生物活性镍纹蛋白和/或其同源物。镍纹蛋白已经在人类(SEQ ID No.2)、小鼠(SEQ ID No.5)和大鼠(SEQ ID No.8)以及许多其它物种中被鉴定出来。

[0138] 人镍纹蛋白以293个氨基酸的前体存在，前体能够被加工产生至少一个生物活性肽。镍纹蛋白在神经系统和眼中，特别是在大脑的亚区中高表达。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，与人镍纹蛋白(SEQ ID NO:2)的％同一性分别为80.3和80.2(见图6)。

[0139] 人镍纹蛋白含有一条N端23个氨基酸的信号肽序列，其在ARA-GY序列基序处被切割。该信号肽切割位点是用SignalP方法预测的。小鼠镍纹蛋白的N端已经通过N端测序验证(Jørgensen et al.,Characterization of meteorin -An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009Sep;39(1-2):104-116)。

[0140] 表1显示了全长人镍纹蛋白与小鼠和大鼠序列的％序列同一性。见图6a中的比对结果

[0141]

序列	％同一性
人	-
小鼠	80.3
大鼠	80.2

[0142] 表2显示了在除去N端信号肽后，人镍纹蛋白与小鼠和大鼠序列的％序列同一性。见图6b中的比对结果。

[0143]

序列	％同一性

人	-
小鼠	81.9
大鼠	79.6

[0144] 基于完全保守的残基，可以得到成熟镍纹蛋白的共有序列(图6c)，其中X是从DNA编码的21种天然存在的氨基酸中独立选出的任一种。在优选的实施方案中，变体镍纹蛋白包含该共有序列。

[0145] 镍纹蛋白的治疗效果可以通过神经营养作用介导，神经营养作用是一种对靶细胞的生长包括增殖、再生、功能再获得、功能改善、存活、迁移、和/或分化的作用。

[0146] 镍纹蛋白的一个生物学功能是在解离的背根神经节(DRG)培养物中诱导轴突向外生长的能力，如Jørgensen等，Characterization of meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor，J mol Neurosci 2009Sep;39(1-2):104-116，和Nishino等，"Meteorin:a secret3ed protein that regulates glial cell differentitaion and promotes axonal extension"，EMBO J.,23(9):1998-2008(2004)所述。

[0147] 由于半胱氨酸的高保守性，预期这些残基在生物活性蛋白的二级和三级结构中发挥重要作用。一个或多个半胱氨酸可能参与分子内和/或分子间胱氨酸桥的形成。

[0148] 已经证明，镍纹蛋白对由人神经干细胞系(hNS1，原来称作HNSC.100)生成的神经元的百分比有刺激作用，并且镍纹蛋白还对原代培养的大鼠纹状体细胞中神经元的产生有刺激作用(见WO 2005/095450)。

[0149] 施用和制剂

[0150] 镍纹蛋白多肽可以用任何医学可接受的方式施用。这可以包括，通过胃肠外途径，例如静脉内、血管内、动脉内、皮下、肌肉内、肿瘤内、腹膜内、心室内、硬膜内(intraepidural)、鞘内、脑室内、脑半球间，或者其它以及鼻或局部注射。本发明还特别包括缓释施用，通过例如储库注射或易蚀性植入物等手段。

[0151] 根据本发明的镍纹蛋白的施用可以使用任何合适的输送方法实现，包括：

[0152] 注射，皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、鞘内、或对其它合适的部位；

[0153] 泵(见例如Annals of Pharmacotherapy，27:912(1993)；Cancer，41:1270(1993)；Cancer Research，44:1698(1984)，本文引用其内容作为参考)，

[0154] 微胶囊包埋(见例如美国专利4,352,883；4,353,888；和5,084,350，本文援引并入其内容)，

[0155] 缓释聚合物植入物(见例如Sabel，美国专利4,883,666，本文援引并入其内容)，

[0156] 包囊细胞(见“生物相容性胶囊”)，

[0157] 非包囊细胞移植物(见例如美国专利5,082,670和5,618,531，本文援引并入其每一个的内容)；和

[0158] 吸入。

[0159] 施用可以是制备物大药丸的周期性注射，或者可以从体外(例如IV袋)或体内(例如产镍纹蛋白细胞的生物可蚀性植入物、生物人工器官、生物相容性胶囊、或植入的产镍纹蛋白细胞克隆)的贮存库通过静脉内或腹膜内施用来更加连续地实现。见例如US 4,407,957,5,798,113和5,800,828，本文援引并入其每一个的内容。

[0160] 局部输送可以通过如下手段实现，例如通过导管向一条或多条动脉输送。在本发明的一个实施方案中，局部输送包括使用包囊细胞的输送(如“生物相容性胶囊”部分所述)。另一类型的局部输送包括基因治疗载体的局部输送，其通常是注射的。

[0161] 在本发明的一个优选实施方案中，施用是肠胃外注射，优选地皮下注射或鞘内注射。

[0162] 尽管本发明的化合物有可能作为原料化学品施用，但是它们优选地以药物制剂的形式提供。药物制剂可以通过常规技术制备，例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy 2005,Lippincott,Williams&Wilkins所述。

[0163] 术语“药学可接受的载体”的意思是用来与镍纹蛋白多肽组合以便于其应用的一种或多种天然的或合成的有机或无机成分。合适的载体包括无菌盐水，尽管已知是药学可接受的其它水性或非水性等张无菌溶液和无菌悬浮剂是本领域普通技术技术人员已知的。

[0164] 本发明的化合物可以被制备成用于肠胃外施用，并可以置于小瓶、预填充针管、小体积输注的单位剂量形式存在，或置于多剂量容器内，任选地添加防腐剂。组合物可以采取如下形式，例如悬浮液、溶液、或油或水溶媒中的乳状液，例如水性聚乙二醇中的溶液。油或非水载体、稀释剂、溶剂或溶媒的实例包括丙二醇、乙二醇、植物油(例如橄榄油)，和注射用有机酯(例如油酸乙酯)，并可以含有作用剂，例如防腐剂、润湿剂、乳化剂或悬浮剂、稳定化剂和/或分散剂。可选择地，活性成分可以处于粉末形式，通过灭菌固体的无菌分离或者通过从溶液冻干加以获得，在使用前用合适的溶媒，例如无菌无热原水，进行构建。

[0165] “有效量”是指能够减轻或延迟疾病状况、退行性状况或损伤性状况的进程的量。有效量可以根据个体基础，并可以部分地基于待治疗症状和结果要求的考虑，来予以确定。有效量可以由本领域普通技术人员利用这些因素并使用不超过常规的实验加以确定。

[0166] 脂质体系统可以是任何单层囊泡、多层囊泡、或稳定多层囊泡，并可以根据本领域技术人员众所周知的方法加以制备和施用，例如根据美国专利5,169,637,4,762,915,5,000,958或5,185,154的教导。此外，可能期望将本发明的新多肽，以及其它所选多肽表达为脂蛋白，以提高其与脂质体的结合。通过免疫亲和色谱或任何其它方便的方法从CHO细胞纯化重组镍纹蛋白，然后与脂质体混合，并高效地掺入它们中。对脂质体包囊的蛋白质可以在体外加以测试，考察其促进细胞生长的任何效果。

[0167] 当期望在具有适合于治疗任何需要施用镍纹蛋白多肽的疾病或病症的释放特征的制剂中缓释地施用镍纹蛋白多肽时，考虑了镍纹蛋白的微胶囊。用于持续释放的重组蛋白微胶囊化已经成功地在人生长激素(rhGH)、干扰素-(rhIFN-)、白介素-2和MN rgp120中得到了实施。Johnson等,Nat.Med.,2:795-799(1996);Yasuda,Biomed.Ther.,27:1221-1223(1993);Hora等,Bio/Technology,8:755-758(1990);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;WO 97/03692,WO 96/40072,WO 96/07399;和美国专利No.5,654,010。

[0168] 使用聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)聚合物开发了这些蛋白的缓释制剂，因为它们具有生物相容性并具有广泛的生物可降解性质。PLGA的降解产物，乳酸和乙醇酸，能够在人体内被快速清除。而且，该聚合物的可降解性可以根据其分子量和组成从数月到数年的范围

内加以调节。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。

[0169] 在本发明的一个实施方案中,构想了一种包含镍纹蛋白的组合物。该组合物可以包括一种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。

[0170] 剂量

[0171] 构想了用于全身性施用的各种剂量方案。在一个实施方案中,向受试者施用包含镍纹蛋白多肽的制剂的方法包括每剂1μg/kg-10,000μg/kg受试者体重的剂量施用镍纹蛋白。在另一个实施方案中,剂量是每剂1μg/kg-7,500μg/kg受试者体重。在进一步的实施方案中,剂量是每剂1μg/kg-5,000μg/kg受试者体重。在一个不同的实施方案中,剂量是每剂1μg/kg-2,000μg/kg受试者体重。在另外一个实施方案中,剂量是每剂1μg/kg-1,000μg/kg受试者体重。在另一个实施方案中,剂量是每剂1μg/kg-700μg/kg受试者体重。在更优选的实施方案中,剂量是每剂5μg/kg-500μg/kg受试者体重。在最优选的实施方案中,剂量是每剂10μg/kg-100μg/kg受试者体重。在优选的实施方案中,要治疗的受试者是人。

[0172] 在文献中提供了关于特殊剂量和输送方法的指导,见例如WO 02/78730和WO 07/100898。在Reagan-Shaw等,FASEB J,22,659-661(2007)中,提供了根据动物实验中使用的剂量计算人的等价剂量的指导。

[0173] 所给剂量必须根据待治疗个体的年龄、体重和状况,以及施用途径、剂型和施用方案,和期望的结果进行仔细地调节,并且确切的剂量应当由执业者加以确定。

[0174] 在本发明的一个实施方案中,施用每天重复。在另一个实施方案中,施用每周至少重复1-3次,例如每周2-5次,例如每周3-6次,每3天1次,每4天1次,每5天1次,每6天1次,或者每7天1次。

[0175] 在其它实施方案中,镍纹蛋白以相对长的剂量间隔施用。相对长的剂量间隔意图包括剂量之间至少间隔2天,例如剂量之间至少间隔3天,例如每周2个剂量。更优选地,长剂量间隔为至少1周,例如至少2周,更优选地,至少3周,例如至少4周,或者至少1个月。

[0176] 换一种方式表达,剂量间隔是如此之长,以至于在一个剂量的镍纹蛋白之后,当施用下一个剂量时,要治疗受试者的血清中已经不再能够检测到该多肽。在另一个实施方案中,血清水平低于10ng/mL,例如低于5ng/mL,更优选地低于1ng/mL,例如低于0.5ng/mL,例如低于0.1ng/mL。

[0177] 在一些实施方案中,初始镍纹蛋白施用是例如每天2次,每天1次,每2天1次,每3天1次,或者每4天1次。该初始给药时间表可以保持例如2、3、4、5、6、7、9、11、14、21天或者更久。该给药时间表完成后,镍纹蛋白可以以更低的频率施用,例如如上所述。

[0178] 镍纹蛋白多肽

[0179] 除了全长镍纹蛋白、基本上全长的镍纹蛋白和前-镍纹蛋白之外,本发明提供了多肽的生物活性变体。如果镍纹蛋白或片段显示出如本文中所述的天然存在的镍纹蛋白的生物活性,例如神经营养性,则该镍纹蛋白或片段是有生物活性的。应当理解,本发明涉及如本文中所定义的镍纹蛋白。

[0180] 本发明涉及用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法中使用的分离的多肽分子，所述多肽包含选自下组的氨基酸序列：

[0181] a)选自SEQ ID No.3,6和9的氨基酸序列。

[0182] 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，其中该变体与所述SEQ ID No.具有至少70％序列同一性；和

[0183] 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，其中该片段与所述SEQ ID No.至少70％相同。

[0184] 在一个实施方案中，本发明涉及选自下组的分离的多肽：

[0185] i)SEQ ID No 2的AA_{30}-AA_{288}，和在该天然序列的一个或两个末端具有1-5个额外氨基酸的多肽，最多为SEQ ID No 2的AA_{25}-AA_{293}；

[0186] ii)SEQ ID No 8的AA_{28}-AA_{286}，和在该天然序列的一个或两个末端具有1-5个额外氨基酸的多肽，最多为SEQ ID No 8的AA_{23}-AA_{291}；

[0187] iii)SEQ ID No5的AA_{31}-AA_{289}，和在该天然序列的一个或两个末端具有1-5个额外氨基酸的多肽，最多为SEQ ID No5的AA_{26}-AA_{294}；和

[0188] iv)所述多肽的变体，其中所选序列中的任何规定的氨基酸被改变为不同的氨基酸，但序列中被如此改变的氨基酸残基不超过20个。

[0189] 生物活性优选地是神经营养活性。神经营养活性变体可以通过参考如上文在WO 2005/095450所述的一种或多种体外和/或体内神经营养性测定，特别是DRG试验，来加以定义。

[0190] 一种优选的生物活性是引发与在如Jørgensen等，Characterization of meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009 Sep;39(1-2):104-116所述的DRG测定中基本上相同的响应的能力。在该试验中，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。在DRG测定中基本上相同的响应是指，DRG细胞的神经突外生至少是在Jørgensen等，Characterization of meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009Sep;39(1-2):104-116所述DRG试验中所得数目的20％，更优选地至少30％，更优选地至少40％，更优选地至少50％，更优选地至少60％，更优选地至少70％，更优选地至少75％，更优选地至少80％，更优选地至少85％，更优选地至少90％。镍纹蛋白片段或变体的生物活性还可以高于天然存在的镍纹蛋白(SEQ ID NO 3)。

[0191] 变体可以和天然存在的的镍纹蛋白的氨基酸序列不同，或者在不涉及序列的方面不同，或者两种兼有。当天然存在的镍纹蛋白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替代时，则产生了氨基酸序列的变体(“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，其序列与野生型序列相差一个或多个保守和/或半保守的氨基酸取代，其典型地对蛋白或肽的二级和三级结构和疏水性质具有微弱的影响。变体的序列也可以具有不会取消镍纹蛋白的生物活性的一个或多个非保守的氨基酸取代、删除或插入。图6的Clustal W比对可以用于预测哪些氨基酸残基可以被取代而不会显著影响蛋白的生物活性。在一个优选的实施方案中，变体镍纹蛋白序列包括具有SEQ ID NO 11的共有序列。

[0192] 在本发明的意义中，下组中的取代(Clustal W,“强”保守组)被认为是保守取代：-

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。在本发明的意义中，下组中的取代(Clustal W,“弱”保守组)被认为是半保守取代:-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。

[0193] 本发明的其它变体是具有修饰的变体，其可以提高肽的稳定性。这样的变体在肽序列中可以含有例如一个或多个非肽键(其替代肽键)。还包括这样的变体:其含有除天然发生的L-氨基酸之外的残基，例如D-氨基酸或非天然发生或合成的氨基酸，例如β或γ氨基酸和环状变体。多肽中掺入D-氨基酸代替L-氨基酸可以提高其对蛋白酶的抗性。见例如US 5,219,990。剪接变体被特别地包含在本发明之内。

[0194] 当给定取代的结果无法肯定预测时，该衍生物可以根据本文所公开的方法容易地加以测定，以确定是否存在神经营养活性，优选地使用Jørgensen等,Characterization of meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor,J mol Neurosci 2009Sep;39(1-2):104-116描述的DRG测定。

[0195] 在一个实施方案中，多肽是包含SEQ ID No.3,6和9的组中选出的序列的天然发生的等位基因变体。该多肽可以包含如下的氨基酸序列，所述氨基酸序列是如下核酸序列的翻译产物，该核酸序列与从包含SEQ ID No.1,4和7的组中选出的核酸序列相差一个核苷酸。

[0196] 在一个实施方案中，这里所述的变体多肽包括如下的多肽，其中所选序列中规定的任何氨基酸被改变以产生保守取代。

[0197] 在一个实施方案中，本发明范围内的变体包括如下的蛋白和肽，其具有与人、小鼠或大鼠镍纹蛋白(SEQ ID NO:3,6和9)具有至少70％同一性的氨基酸序列。更优选地，序列同一性为至少75％，更优选的至少80％，更优选的至少85％，更优选的至少90％，更优选的至少95％，更优选的至少98％。

[0198] 在一个优选实施方案中，变体镍纹蛋白的序列同一性参考人镍纹蛋白多肽(SEQ ID No 3)加以确定。

[0199] 在一个实施方案中，变体包括这样的蛋白，其包含与SEQ ID NO 3有至少70％序列同一性的氨基酸序列，更优选地至少75％，更优选的至少80％，更优选的至少85％，更优选的至少90％，更优选的至少95％，更优选的至少98％。

[0200] 在一个实施方案中，优选的变体包括这样的蛋白，其包含与SEQ ID NO 6有至少70％序列同一性的氨基酸序列，更优选地至少75％，更优选的至少80％，更优选的至少85％，更优选的至少90％，更优选的至少95％，更优选的至少98％。

[0201] 在一个实施方案中，优选的变体包括这样的蛋白，其包含与SEQ ID NO 9有至少70％序列同一性的氨基酸序列，更优选地至少75％，更优选的至少80％，更优选的至少85％，更优选的至少90％，更优选的至少95％，更优选的至少98％。

[0202] 在一个实施方案中，优选的镍纹蛋白变体包括这样的蛋白，其包含50-270个氨基酸，更优选地75-270个氨基酸，更优选地90-270个氨基酸，更优选地100-270个氨基酸，更优选地125-270个氨基酸，更优选地150-270个氨基酸，更优选地175-270个氨基酸，更优选地200-270个氨基酸，更优选地225-270个氨基酸，更优选地250-270个氨基酸。

[0203] 在一个实施方案中，变体镍纹蛋白在相应位置包含图6中标记为完全保守(*)的残基，更优选地，变体镍纹蛋白还包括在相应位置包含图6中作为强保守(:强保守组包括: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)标记的残基，更优选地，变体镍纹蛋白还包括在相应位置包含图6中作为弱保守(弱保守组包括: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)标记的残基。特别地，构想了保守的半胱氨酸必须存在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的第7,28,59,95,148,151,161,219,243和265位具有半胱氨酸残基。

[0204] 在一个实施方案中，神经营养性多肽包括SEQ ID NO:11的共有序列。共有序列包括在人、小鼠和大鼠镍纹蛋白中保守的氨基酸残基，如图6所示。优选地，神经营养性多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第7,28,59,95,148,151,161,219,243和265位具有半胱氨酸残基。

[0205] 非序列修饰可包括，例如，天然存在的镍纹蛋白一部分的体内或体外化学衍生化，以及酰基化、甲基化、磷酸化、羧基化、PEG化或糖基化。正如有可能取代蛋白残基一样，还有可能以具有相似特征的基团取代与蛋白结合的功能基团。这些修饰不会改变一级序列。这些最初会是保守的，即替换基与原始基团具有近似相同的尺寸、形状、疏水性和电荷。

[0206] 许多氨基酸，包括末端氨基酸，可以在给定多肽中被修饰，这可以是自然过程，例如糖基化和其它翻译后修饰，或者是通过化学修饰技术，其是本领域众所周知的。本发明多肽可以存在的已知修饰包括，仅示意性地举少数实例，乙酰化、酰基化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价附接黄素、共价附接血红素模块、共价附接多核苷酸或多核苷酸衍生物、共价附接脂质或脂质衍生物、共价附接磷脂酰肌醇、交联、环化、形成二硫键、去甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、γ-羧基化、糖基化、糖基化、形成GPI锚、羟基化、碘化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯二基化、外消旋化、硒化、硫酸化、转运RNA介导的对蛋白质的氨基酸添加，例如精氨酸化，和泛素化。

[0207] 这些修饰是技术人员所熟知的，并在科学文献中有更详细的介绍。在大多数基础教科书中，例如I.E.Creighton,Proteins-Structure and Molecular Properties,第二版,W.H.Freeman and Company,New York,1993,介绍了数种特别常见的修饰，糖基化，脂质附接，硫酸化，谷氨酸残基的γ-羧化，羟基化和ADP核糖化。可以获得关于本主题的许多详细的综述，例如在下列文献中提供的:Wold,F.,in Posttranslational Covalent Modification of Proteins,B.C.Johnson,Ed.,Academic Press,New York,pp 1-12,1983;Seifter等,Meth.Enzymol.182:626-646,1990和Rattan等,Protein Synthesis:Posttranslational Modifications and Aging,Ann.N.Y.Acad.Sci.663:48-62,1992。

[0208] 此外，蛋白质可以包括这样的蛋白标签，其允许随后纯化，并且任选地使用内肽酶除去标签。标签可以包括便于随后除去标签的蛋白酶切位点。亲和标签的无限制实例包括多聚组氨酸标签、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、纤维素结合蛋白标签。优选地，为了产生和纯化，标签是多聚组氨酸。优选地，该标签位于蛋白的C端部分。

[0209] 镍纹蛋白的天然信号序列也可以被替换，以提高在其它哺乳动物细胞类型中重组生产蛋白时的分泌。

[0210] 修饰可以发生在多肽的任何位置，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的氨基或羧基或者两者，是天然存在的多肽和合成多肽中常

用的，这些修饰也可以在本发明的多肽中存在。例如，在大肠杆菌中制备的多肽的氨基端残基在蛋白酶解处理之前，几乎总是N-甲酰甲硫氨酸。

[0211] 多肽中发生的修饰因获得它的方式而异。例如，对于通过在宿主中表达克隆基因制成的多肽，修饰的性质和程度大部分是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所决定的。例如，在细菌宿主，例如大肠杆菌中，经常不发生糖基化。因此，当期望糖基化时，多肽应当在糖基化宿主，一般是真核细胞中表达。昆虫细胞经常携带与哺乳动物细胞相同的翻译后糖基化，出于这个原因，开发了昆虫细胞表达系统用于高效表达具有天然糖基化特征的哺乳动物蛋白等。类似的考虑适用于其它的修饰。

[0212] 可以意识到，相同类型的修饰可以在给定多肽的多个位置上以等同或者不同的程度存在。另外，给定多肽可以含有许多类型的修饰。

[0213] 一般地，如本文中所用的，术语多肽包括所有此类修饰，特别是那些通过在宿主细胞中表达多核苷酸而合成的多肽中存在的修饰。

[0214] 镍纹蛋白核苷酸序列

[0215] 本发明提供了编码镍纹蛋白的基因组DNA和cDNA的医学用途，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)。

[0216] 这些序列的变体也包含在本发明的范围内。

[0217] 本发明涉及用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻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，所述多肽包含选自下组的氨基酸序列：

[0218] i.SEQ ID NO:3的氨基酸序列；

[0219] ii.SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体，其中该变体与SEQID NO:3具有至少70％序列同一性；和

[0220] iii.i)或ii)的至少50个连续氨基酸的生物活性片段，其中该片段与SEQID NO:3具有至少70％序列同一性。

[0221] 在一个实施方案中。本发明涉及一种编码多肽的用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法中使用的分离的核酸分子，所述多肽包括选自下组的氨基酸序列：

[0222] i)SEQ ID No 2的AA_{30}-AA_{288}，和在该天然序列的一个或两个末端具有1-5个额外氨基酸的多肽，最多为SEQ ID No 2的AA_{25}-AA_{293}；

[0223] ii)SEQ ID No 8的AA_{28}-AA_{286}，和在该天然序列的一个或两个末端具有1-5个额外氨基酸的多肽，最多为SEQ ID No 8的AA_{23}-AA_{291}；

[0224] iii)SEQ ID No5的AA_{31}-AA_{289}，和在该天然序列的一个或两个末端具有1-5个额外氨基酸的多肽，最多为SEQ ID No 5的AA_{26}-AA_{294}；和

[0225] iv)所述多肽的变体，其中所选序列中规定的任何氨基酸被该变为不同的氨基酸，但序列中被如此改变的氨基酸残基不超过20个。

[0226] 核酸分子可以包括天然存在的的等位核酸变体的核苷酸序列。

[0227] 本发明的核酸分子可以编码变体多肽，其中该变体多肽具有天然存在的的多肽变体的多条序列。

[0228] 在一个实施方案中，核酸分子与从SEQ ID No.1,4,7和10构成的组中选出的核酸序列相差一个核苷酸。

[0229] 优选地，编码的多肽与从包含SEQ ID No.3的组中选出的序列具有至少60％的序列同一性，优选地有至少65％的序列同一性，更优选地有至少70％的序列同一性，更优选地有至少75％的序列同一性，更优选地有至少80％的序列同一性，更优选地有至少85％的序列同一性，更优选地有至少90％的序列同一性，更优选地有至少95％的序列同一性，更优选地有至少98％的序列同一性，更优选地其中该多肽具有从包含所述SEQ ID No.s的组中选出的序列。所述序列构成人镍纹蛋白。

[0230] 在一个优选的实施方案中，编码多肽包含具有SEQ ID NO:11的共有序列。

[0231] 在一个优选实施方案中，编码多肽与SEQ ID No.3具有至少70％的序列同一性，更优选的至少75％，更优选的至少80％，更优选的至少95％，更优选的至少98％，更优选地其中所述多肽具有SEQ ID No.3的序列。

[0232] 在一个方面中，核酸分子包含选自下组的核苷酸序列：

[0233] a)从由SEQ ID No.1,4,7和10构成的组中选出的核苷酸序列；

[0234] b)与从由SEQ ID No.1,4,7和10构成的组中选出的核苷酸序列具有至少70％序列同一性的核苷酸序列；

[0235] c)包含从由SEQ ID No.1,4,7和10构成的组中选出的核苷酸序列的至少150个连续核苷酸的核酸序列。

[0236] 在一个实施方案中，本发明的分离多核苷酸与作为SEQ ID NO:1提供的多核苷酸序列具至少60％，优选地至少65％，更优选地至少70％，更优选地至少75％，更优选地至少80％，更优选地至少85％，更优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％的序列同一性。

[0237] 在一个优选实施方案中，本发明的分离多核苷酸与作为SEQ ID NO:10提供的多核苷酸序列具至少60％，优选地至少65％，更优选地至少70％，更优选地至少75％，更优选地至少80％，更优选地至少85％，更优选地至少90％，更优选地至少95％，更优选地至少98％的序列同一性。

[0238] 在一个实施方案中，本发明的优选分离多核苷酸变体包含150-900个核苷酸，更优选地175-900个核苷酸，更优选地200-900个核苷酸，更优选地225-900个核苷酸，更优选地250-900个核苷酸，更优选地300-900个核苷酸，更优选地350-900个核苷酸，更优选地400-900个核苷酸，更优选地450-900个核苷酸，更优选地500-900个核苷酸，更优选地550-900个核苷酸，更优选地600-900个核苷酸，更优选地650-900个核苷酸，更优选地700-900个核苷酸，更优选地750-900个核苷酸，更优选地800-900个核苷酸，更优选地850-900个核苷酸。

[0239] 一组优选的分离多核苷酸包括SEQ ID No 1和10，它们是人镍纹蛋白cDNA序列。一般地，cDNA序列比基因组序列短得多，更容易地在体内或体外插入到合适的表达载体中，并被转导/转染进入生产细胞或人细胞中。

[0240] 此外，本发明的多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、脂质体和其它载体工具，其包含这些序列的其中一种，或这些序列其中一种的衍生物。本发明还包括从镍纹蛋白cDNA，优选地人镍纹蛋白cDNA，转录和翻译的蛋白质，包括但不仅限于，人镍纹蛋白和衍生物和变体。

[0241] 还构想了用于提高在所选的宿主细胞中的表达的密码子优化的核酸分子，宿主细胞包括但不仅限于，大肠杆菌、酵母、中国仓鼠、幼仓鼠(Baby Hamster)、昆虫、真菌和人。

[0242] 变体核酸能够通过现有技术的诱变方法加以制造。还构想了用小鼠、大鼠或黑猩猩的编码序列重排人的编码序列的方法。

[0243] 通过用小鼠或大鼠镍纹蛋白中相应位置的氨基酸交换人镍纹蛋白中的氨基酸制成的变体核酸，如果该氨基酸与人镍纹内蛋白中的氨基酸不同的话。

[0244] 病毒载体

[0245] 一般地，基因疗法试图将新遗传材料转移到患者的细胞内，从而对患者产生治疗利益。这些利益包括治疗或预防多种多样的疾病、病症和其它状况。

[0246] 体外基因治疗方法涉及修饰分离的细胞(包括但不仅限于，干细胞、神经和胶质前体细胞、和胚胎干细胞)，然后将它们输注、嫁接(grafted)或者以其他方式移植到患者体内。见例如美国专利Nos.4,868,116,5,399,346和5,460,959。体内基因治疗试图直接在体内靶定宿主患者组织。

[0247] 可用作基因转移载体的病毒包括乳多空病毒，腺病毒，牛痘病毒，腺伴随病毒，疱疹病毒，逆转录病毒。合适的逆转录病毒包括由HIV，病毒，FIV，EIAV，MoMLV构成的组。合适逆转录病毒的进一步的组包括由HIV,SIV,FIV,EAIV,CIV构成的组。另一个优选病毒载体组包括由甲病毒，腺病毒，腺伴随病毒，杆状病毒，单纯疱疹病毒，冠状病毒，牛乳头状瘤病毒，Mo-MLV构成的组，优选地腺伴随病毒。

[0248] 用于治疗神经系统病症的优选病毒是慢病毒和腺伴随病毒。这两种类型的病毒能够整合到基因组中而无需细胞分裂，并且这两种类型均已经在临床前动物研究中进行过测试，用于神经系统，特别是中枢神经系统的适应证。

[0249] 现有技术中介绍了AAV的制备方法，例如US 5,677,158.US 6,309,634和US 6,683,058介绍了将AAV输送到中枢神经系统的实例。

[0250] 优选地，慢病毒载体是复制缺陷型慢病毒颗粒。这种慢病毒颗粒能够从包含5’慢病毒LTR、tRNA结合位点、包装信号、与编码所述融合蛋白的多核苷酸信号操作连接的启动子，第二链DNA合成的起点，和3’慢病毒LTR的慢病毒载体产生。用于制备和体内施用慢病毒到神经细胞的方法在US 20020037281中有描述(使用慢病毒载体转导神经细胞的方法)。

[0251] 逆转录病毒载体是人类临床试验中最通常使用的载体，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、稳定地整合到宿主细胞内的能力。见例如WO 95/30761;WO 95/24929。致瘤病毒亚科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体内。逆转录病毒随机整合到患者的基因组中。逆转录病毒能够用于靶定神经系统的干细胞，因为在神经系统(特别是CNS)的其它细胞中很少发生细胞分裂。

[0252] 已经描述了三种类型的逆转录病毒颗粒:同向性的，它们能够高效感染小鼠细胞;和兼向性的，它们能够感染许多物种的细胞。第三类包括异向性逆转录病毒，它们能够感染不同于产生该病毒的物种的另一物种的细胞。它们仅整合到分裂中细胞的基因组内的能力使该逆转录病毒在发育研究中用于标记细胞谱系和向癌症或肿瘤输送治疗或自杀基因的用途引人注意。

[0253] 对于在人类患者中的使用，逆转录病毒载体必须是复制缺陷型的。这防止在靶组织内进一步产生感染性逆转录病毒颗粒——相反，该复制缺陷型载体成为稳定整合到靶细

胞基因组内的“俘虏”转基因。典型地，在复制缺陷型载体中，gag、env和pol基因被删除(连同大部分剩余的病毒基因组)。异源DNA被插入以代替被删除的病毒基因。异源基因可以在内源异种启动子、另一种在靶细胞中有活性的启动子、或逆转录病毒5’LTR(LTR在多种组织中是有活性的)的控制之下。典型地，逆转录病毒载体具有大约7-8kb的转基因容量。

[0254] 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复制和反式组装必需的病毒蛋白。重要的是，包装细胞不释放能够复制的病毒和/或辅助病毒。迄今为止这是通过从缺少ψ信号的RNA表达病毒蛋白，和从不同的转录单元表达gag/pol基因和env基因来实现的。此外，在一些2和3代逆转录病毒中，5’LTR被控制这些基因的表达的非病毒启动子代替，并且3’启动子被最小化到仅含有紧邻的启动子。这些设计使重组导致产生可复制的载体或辅助病毒的可能性最小化。

[0255] 表达载体

[0256] 用于重组表达在本发明中使用的镍纹蛋白多肽的载体的构建可以使用常规的技术加以实现，其对于本领域普通技术人员而言不需要详细的解释。但关于综述普通技术人员可以查询Maniatis等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,(NY 1982)。

[0257] 表达载体可以用于生成用于重组产生供医用的镍纹蛋白多肽的生产细胞，和用于产生用于裸露或包囊治疗的分泌镍纹蛋白多肽的治疗细胞。

[0258] 简而言之，重组表达载体的构建采用标准连接技术。为了分析确认所构建载体中的正确序列，使用例如Messing等(Nucleic Acids Res.,9:309-,1981)的方法，Maxam等(Methods in Enzymology,65:499,1980)的方法，或其它本领域技术人员已知的合适方法进行基因测序。

[0259] 切割片段的大小分离使用常规的凝胶电泳方法来实施，如例如Maniatis等(Molecular Cloning,pp.133-134,1982)所述。

[0260] 为了产生高效表达载体，它们应当含有表达处于正确阅读框内的编码基因所需的调节序列。基因的表达在转录、翻译或翻译后水平被控制。转录起始是基因表达的早期和关键事件。这依赖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，并且在一些情况下，增强子和调节元件所构成(Banerji et al.,Cell 27:299(1981);Corden et al.,Science 209:1406(1980);和Breathnach and Chambon,Ann.Rev.Biochem.50:349(1981))。关于逆转录病毒，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 et al.,eds.,The molecular biology of tumor viruses:RNA tumor viruses,Cold Spring Harbor Laboratory,(NY 1982))。莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)和劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR含有启动子和增强子序列(Jolly et al.,Nucleic Acids Res.11:1855(1983);Capecchi et al.,In:Enhancer and eukaryotic gene expression,Gulzman and Shenk,eds.,pp.101-102,Cold Spring Harbor Laboratories(NY 1991)。其它强启动子包括来自巨细胞病毒(CMV)的启动子和其它野生型病毒启动子。

[0261] 许多非病毒启动子的启动子和增强子区也有介绍(Schmidt et al.,Nature 314:285(1985);Rossi and deCrombrugghe,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:5590-5594(1987))。用于保持和增加转基因在静止期细胞中表达的方法包括使用如下类型的启动子，包括I型

胶原(1和2)(Prockop and Kivirikko,N.Eng.J.Med.311:376(1984);Smith and Niles,Biochem.19:1820(1980);de Wet et al.,J.Biol.Chem.,258:14385(1983))、SV40和LTR启动子。

[0262] 根据本发明的一个实施方案,启动子是选自下组的一种组成型启动子: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1α启动子(EF1-alpha)、RSV、CAG。可诱导/可抑制启动子的实例包括:Tet-On,Tet-Off,雷帕霉素可诱导启动子,Mx1,Mo-MLV-LTR,孕酮,RU486。

[0263] 一组优选的启动子包括CAG、CMV、人UbiC、JeT、SV40、RSV、Tet-可调节启动子、Mo-MLV-LTR、Mx1、Mt1和EF-1alpha。

[0264] 除了使用病毒和非病毒启动子驱动转基因表达之外,可以使用增强子序列提高转基因的表达水平。增强子不仅能够提高其天然基因的转录活性,而且能够提高一些外来基因的转录活性(Armelor,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70:2702(1973))。例如,在本发明中,胶原增强子序列可以和胶原启动子2(I)一起使用,来增加转基因表达。此外,SV40病毒中发现的增强子元件可用于提高转基因表达。该增强子序列由72个碱基对重复构成,如Gruss et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:943(1981);Benoist and Chambon,Nature 290:304(1981),和Fromm and Berg,J.Mol.Appl.Genetics,1:457(1982)所述,其内容全部被本文引用作为参考。当与各种启动子串联存在时,该重复序列能够提高许多不同病毒和细胞基因的转录(Moreau et al.,Nucleic Acids Res.9:6047(1981)。

[0265] 其他表达增强序列包括,但不仅限于,土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件,WPRE,SP163,CMV增强子,和鸡[β]-珠蛋白绝缘子或其它绝缘子(insulator)。

[0266] 细胞系

[0267] 在一个方面中,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。

[0268] 本发明还涉及适合于通过裸露或包囊细胞生物输送镍纹蛋白的细胞,其被遗传修饰从而过表达镍纹蛋白,并能够植入到患者体内以局部输送生物活性镍纹蛋白多肽。这些细胞可以被一般地称作治疗细胞。

[0269] 对于离体基因治疗,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、神经干细胞、人神经胶质干细胞、人前体细胞、干细胞和胚胎细胞。

[0270] 用于包囊的优选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。

[0271] ARPE-19细胞系是基于包囊细胞的输送技术的优越的平台细胞系,也可用于基于非包囊细胞的输送技术。ARPE-19细胞系很强健(即细胞系在严格条件下可以存活,例如植入在中枢神经系统或眼内环境)。ARPE-19细胞能够被遗传修饰,以分泌有治疗意义的物质。ARPE-19细胞具有相对长的寿命。ARPE-19细胞是人来源的。而且,包囊的ARPE-19细胞具有良好的体内器件生命力(device viability)。ARPE-19细胞能够输送有效量的生长因子。ARPE-19细胞引发的宿主免疫反应可以忽略不计。而且,ARPE-19细胞是非致瘤的。用于培养和包装ARPE-19细胞的方法在US 6,361,771中有述。

[0272] 在另一个实施方案中,治疗细胞系从下组中选出:人成纤维细胞系、人星形胶质细胞系、人中脑细胞系、和人内皮细胞系,优选地用TERT、SV40或vmyc永生化。

[0273] 细胞外基质

[0274] 本发明进一步包括在植入到哺乳动物神经系统之前在细胞外基质上体外培养产镍纹蛋白细胞。设计了在植入之前预先将细胞附着于微载体的步骤，以提高植入细胞的长期活性，并提供长期的功能益处。

[0275] 能够构成细胞外基质的材料包括在体外温育后能够被细胞附着的材料，和细胞能够在上面生长的材料，和植入哺乳动物体内后不会产生会破坏植入细胞或者以其他方式干扰其生物或治疗活性毒性反应或炎性反应的材料。这些材料可以是合成的或天然的化学物质，或者具有生物来源的物质。

[0276] 基质材料包括，但不仅限于，玻璃和其它硅氧化物，聚苯乙烯，聚丙烯，聚乙烯，聚偏氟乙烯，聚氨酯，聚海藻酸，聚砜，聚乙烯醇，丙烯腈聚合物，聚丙烯酰胺，聚碳酸酯，聚戊烯(polypentent)，尼龙，淀粉酶，天然和改性明胶与天然和改性胶原，天然和改性的多糖，包括葡聚糖和纤维素(例如，硝酸纤维素)，琼脂，和磁铁矿。无论是可重吸收的还是不可重吸收的材料均可使用。还意图使用本领域众所周知的细胞外基质材料。细胞外基质材料可以商业获得或者如下的加以制备：培养分泌这种基质的细胞、除去分泌细胞，并允许要植入的细胞与基质相互作用并附着在基质上。植入细胞在其上生长或与细胞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，其由被植入的RPE细胞产生和分泌。

[0277] 为了提高细胞附着、生存和功能，可以任选的用本领域已知可提高细胞附着、生长或存活的因子涂布在其外表面。这些因子包括细胞黏附分子、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，蛋白聚糖或生长因子。

[0278] 可选择地，如果植入细胞所附着的固体基质是用多孔材料构建的，则可以在基质材料内掺入促生长或存活的因子，这些因子在体内植入后会缓慢释放。

[0279] 支持物的构型优选地是球形，例如珠子，但是可以是圆柱形、椭圆形、扁平的片状或条状、针或钉形等。支持基质的优选形式是玻璃珠子。另一种优选的珠子是聚苯乙烯珠子。

[0280] 珠子的尺寸范围可以是直径大约10μm-1mm，优选地大约90μm-大约150μm。关于各种微载体珠子的描述，见例如isher Biotech Source 87-88,Fisher Scientific Co.,1987,pp.72-75;Sigma Cell Culture Catalog,Sigma Chemical Co.,St,Louis,1991,pp.162-163;Ventrex Product Catalog,Ventrex Laboratories,1989;本文引用这些文献的内容作为参考。珠子尺寸的上限可以由珠子对不良宿主反应的刺激决定，不良宿主反应可能干扰植入细胞的功能或者导致对周围组织损伤。珠子尺寸的上限还可以由施用方法决定。这些限制可以由本领域的技术人员容易地确定。

[0281] 生物相容性胶囊

[0282] 在一个方面中，本发明涉及含有用根据本发明载体遗传修饰的分离的宿主细胞的生物相容性胶囊。

[0283] 包囊细胞生物输送治疗是基于如下构思：通过在植入宿主体内之前用半透性生物相容材料包围细胞，将与受体宿主的免疫系统隔离。本发明包括一种胶囊，其中细胞被包囊在免疫隔离胶囊内。通过将细胞包装在用微孔膜形成的可植入高分子胶囊内，使细胞与宿主免疫隔离。该方法可防止宿主与被植入组织之间的细胞-细胞接触，消除通过直接呈递引发的抗原识别。

[0284] 细胞胶囊，在下文中称作胶囊，具有膜，其经过裁量以根据其分子量控制分子(例如生长因子、激素、神经递质、肽、抗体和补体)的扩散(Lysaght et al.,56J.Cell Biochem.196(1996),Colton,14 Trends Biotechnol.158(1996))。使用包囊技术，可以在使用或不使用免疫抑制药物的条件下将细胞植入到宿主内，而不会引发免疫排斥。可用的生物相容性高分子胶囊通常含有核心，其包含悬浮在液体介质或固定在固定材料上的细胞，和周围或外围的选择性渗透基质或膜(“外套”)区，其不含有分离的细胞、生物相容的、并以足以保护核内细胞免于有害的免疫攻击。包囊阻碍免疫系统元件进入胶囊，借此保护被包囊的细胞免于免疫破坏。胶囊膜的半渗透性特性还允许目标生物活性分子容易地从胶囊扩散到周围宿主组织，并允许营养成分容易地扩散进入胶囊并支持被包装的细胞。胶囊可以用生物相容性材料制成。“生物相容性材料”是如下的材料，其在植入到宿主后，不会引发足以导致胶囊排斥或导致其不能工作的不良宿主反应(通过例如降解)。生物相容性材料对大分子相对不可渗透，例如宿主免疫系统的组分，但是对小分子可以渗透，例如胰岛素、生长因子和营养成分，同时允许除去代谢废物。多种生物相容性材料均适合于通过本发明的组合物输送生长因子。已知有多种生物相容性材料，它们具有各种外部表面形貌和其它机械和结构特性。优选地，本发明的胶囊将与下列文献所述的相似:WO 92/19195,WO 95/05452或WO 2005/095450，本文引用作为参考;或美国专利Nos.5,639,275;5,653,975;4,892,538;5,156,844;5,283,187;或美国专利No.5,550,050，本文引用作为参考。

[0285] 这些胶囊允许代谢物、营养物和治疗物质通过，同时使宿主免疫系统的有害作用最小化。生物相容性材料的组分可以包括周围的半渗透性膜和内部的支持细胞的支架。优选地，重组细胞被接种到支架上，支架被半渗透性膜包囊。纤维状的细胞支持支架可以用选自下组的任何生物相容性材料制成:丙烯酸树脂，聚酯，聚乙烯，聚丙烯聚乙腈，聚对苯二甲酸乙二醇酯，尼龙，聚酰胺，聚氨酯，聚丁烯酯，丝绸，棉，甲壳素，碳，或生物相容性金属。另外，键合的纤维结构可以用于细胞植入(美国专利No.5,512,600)。生物可降解聚合物包括由聚(乳酸)PLA、聚(乳酸-乙醇酸共聚物)PLGA、和聚(乙醇酸)PGA及其等价物构成的聚合物。泡沫支架已经被用于提供可以附着植入细胞的表面(WO 2005/095450和WO 98/05304)。编织网管已经被用作血管移植物(WO 99/52573)。此外，核心可以用由水凝胶形成的固定基质构成，其可以稳定细胞的位置。水凝胶是交联的亲水聚合物的三维网络，呈凝胶的形式，基本上由水构成。

[0286] 外套优选地具有分子量截止(cutoff)，其定义为由膜(外套)排斥90％溶质时的分子量小于1000kD，更优选地50-700kD，更优选地70-300kD，更优选地70-150kD，例如70-130kD。所选的分子量截止应当确保生物活性分子能够逃离胶囊，同时保护被包囊的细胞免于患者免疫系统破坏。

[0287] 外套的厚度典型地为2-200微米范围，更优选地50-150微米。外套的厚度应当给予胶囊足够的强度，以保持细胞被包囊，在考虑这一点的同时应尽可能地薄，以尽可能少占空间。

[0288] 各种聚合物和共混聚合物均可用于制造周围的半渗透性膜，包括聚丙烯酸酯(包括丙烯酸共聚物)，聚偏乙烯，聚氯乙烯共聚物，聚氨酯，聚苯乙烯，聚酰胺，醋酸纤维素，硝酸纤维素，聚砜(包括聚醚砜)，聚磷腈，聚丙烯腈，聚(丙烯腈/氯乙烯共聚物)，以及其衍生物、共聚物和混合物。优选地，周围半渗透性膜是生物相容性半渗透性中空纤维膜。这些膜

及制造它们的方法在美国专利No.5,284,761和5,158,881中有公开。周围半渗透性膜可以用聚醚砜中空纤维形成，例如美国专利No.4,976,859或美国专利No.4,968,733所述。可选择的周围半渗透性膜材料是聚(丙烯腈/氯乙烯共聚物)(Pan-PVC)。

[0289] 胶囊可以是任何适用于保持生物活性并为产物或功能的输送提供途径的构型，包括例如圆柱形、矩形、盘状、碎片状、卵球形、星形或球形。而且，胶囊可以卷曲或包裹成类似网状或巢状结构。如果胶囊在植入后要取回，则会导致胶囊从植入位点迁移的构型不是优选的，例如足够小以致能够在受体宿主血管内游移的球形胶囊。某些形状，例如矩形、碎片形、盘状、圆柱形和扁平片状可提供更大的结构完整性，在期望取回的情况下是优选的。特别优选的形状是圆柱形，因为这种形状容易用可工业生产的中空纤维制作。

[0290] 本语境中的大胶囊是容积至少为1μL，例如1-10μL的胶囊。

[0291] 当使用大胶囊时，优选地在每个器件中包囊至少10^3个细胞，例如包囊10^3-10^8个细胞，更优选地包囊10^5-10^7个细胞。当然，每个胶囊中的细胞数目取决于胶囊的尺寸。根据经验，在具有泡沫的胶囊中(如下文所述)，本发明人发现，每μL胶囊(以包括泡沫的内部体积计算的体积)装载10,000-100,000个细胞可导致良好的胶囊填充，更优选地25,000-50,000个细胞/μL，更优选地30,000-40,000个细胞/μL。待装载的细胞数目也取决于细胞的尺寸。

[0292] 剂量可以通过改变胶囊的尺寸(长度、直径)和/或通过植入更少或更大数目的胶囊，优选地每个患者1-10个胶囊，来加以控制。

[0293] 支架可以用细胞外基质(ECM)分子包被。合适的细胞外基质分子的实例包括，例如，胶原、层粘连蛋白和纤粘连蛋白。支架的表面还可以通过用等离子体辐射处理加以修饰，以赋予电荷，从而提高细胞的附着。

[0294] 可以使用任何合适的密封胶囊的方法，包括使用聚合物卷边、打结和热封。此外，还可以使用任何合适的“干”封方法，例如美国专利5,653,687所述。

[0295] 经包囊的细胞器件根据已知的技术加以植入。为本发明的器件和方法构想了许多植入位置。这些植入位置包括，但不仅限于，中枢神经系统，包括大脑、脊髓(见US 5,106,627,5,156,844,和5,554,148)，和眼的房水和玻璃体液(见WO 97/34586)。

[0296] 公开的胶囊可以包含整合的系绳(tether)，其从胶囊伸出，长度足以至少从治疗位点到插入位点附近，借此便于将胶囊固定在插入位置，例如头盖骨的外表面。插入位置随后被皮肤覆盖。

[0297] 为了便于从组织除去胶囊，例如当治疗要结束时，或者如果胶囊必须被替换时，胶囊与绳之间的过渡可以是平滑的，没有任何类型的突起，或者尺寸可以从胶囊向系绳方向增加。这显然会在两个部分之间产生一个边缘，但是因为相对小的胶囊形成治疗系统的远端，即朝向机体的一端，因此在除去胶囊的过程中可以防止附加伤害。如果胶囊和系绳是具有剖面为圆形的管状，则胶囊的径向尺寸可以因此优选地小于系绳的径向尺寸，并且胶囊和系绳可以优选地彼此同轴连接。优选地，本发明的胶囊的设计将与WO 2006/122551和WO 2005/095450所述相似。

[0298] 胶囊可以用注射器填充，或可选择地，可以使用如WO2007/048413所述的自动或半自动填充。

[0299] 本发明涉及如下技术方案：

[0300] 1.一种用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法中使用的

分离的多肽，所述多肽包含选自下组的氨基酸序列：

[0301] i.SEQ ID NO:3的氨基酸序列；

[0302] ii.SEQ ID NO:3的氨基酸序列的生物活性序列变体，其中该变体与SEQ ID NO:3有至少70％序列同一性；和

[0303] iii.a)或b)的至少50个连续氨基酸的生物活性片段，其中该片段与SEQ ID NO:3至少70％同一。

[0304] 2.项1的多肽，其中所述多肽与具有SEQ ID NO:3的序列的蛋白质有至少70％序列同一性，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98％。

[0305] 3.根据前述项中任一项的多肽，其中该神经营养性多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。

[0306] 4.根据前述项中任一项的多肽，其中该神经营养性多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第7、28、59、95、148、151、161、219、243和265位置具有半胱氨酸残基。

[0307] 5.根据前述项中任一项的多肽，其是彼处中描述的变体多肽，其中任何氨基酸取代均是保守取代。

[0308] 6.根据前述项中任一项的多肽，其中所述多肽能够形成至少一个分子内半胱氨酸桥。

[0309] 7.根据前述项中任一项的多肽，其中所述治疗导致至少一部分经治疗的受试者的异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛或幻痛基本上完全逆转。

[0310] 8.根据前述项中任一项的多肽，其中所述治疗导致至少一部分经治疗的受试者中的疾病缓解。

[0311] 9.根据前述项中任一项的多肽，其中所述多肽用于在治疗异常性疼痛和/或痛觉过敏的方法中使用。

[0312] 10.根据前述项中任一项的多肽，其中所述异常性疼痛是温度异常性疼痛。

[0313] 11.根据前述项中任一项的多肽，其中所述异常性疼痛是冷异常性疼痛。

[0314] 12.根据前述项中任一项的多肽，其中所述异常性疼痛是热异常性疼痛。

[0315] 13.根据前述项中任一项的多肽，其中所述异常性疼痛是机械性异常性疼痛。

[0316] 14.根据前述项中任一项的多肽，其中所述治疗针对自发性疼痛。

[0317] 15.根据前述项中任一项的多肽，其中所述治疗针对痛觉过敏。

[0318] 16.根据前述项中任一项的多肽，其中所述痛觉过敏是温度痛觉过敏。

[0319] 17.根据前述项中任一项的多肽，其中所述痛觉过敏是冷痛觉过敏。

[0320] 18.根据前述项中任一项的多肽，其中所述痛觉过敏是热痛觉过敏。

[0321] 19.根据前述项中任一项的多肽，其中所述痛觉过敏是机械性痛觉过敏。

[0322] 20.根据前述项中任一项的多肽，其中要治疗的受试者不经历体重减轻。

[0323] 21.根据前述项中任一项的多肽，其中要治疗的受试者是哺乳动物，优选为灵长类动物，更优选为人。

[0324] 22.根据前述项中任一项的多肽，其中多肽是通过全身性给药施用的。

[0325] 23.根据前述项中任一项的多肽，其中治疗是通过肠胃外注射，优选皮下注射或鞘内注射施用的。

[0326] 24.根据前述项中任一项的多肽，其中治疗是以1μg/kg-10,000μg/kg，例如1μg/kg-7,500μg/kg，例如1μg/kg-5,000μg/kg，例如1μg/kg-2,000μg/kg，例如1μg/kg-1,000μg/kg，例如1μg/kg-700μg/kg，例如5μg/kg-500μg/kg，例如10μg/kg-100μg/kg体重的剂量施用的。

[0327] 25.根据前述项中任一项的多肽，其中所述施用每天重复进行。

[0328] 26.根据前述项中任一项的多肽，其中所述施用每周重复进行至少1-3次，例如每周2-5次，例如每周3-6次。

[0329] 27.一种用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻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前述任一项中定义的多肽的核酸序列。

[0330] 28.根据项27的核酸分子，其中所述核酸分子用于在治疗异常性疼痛和/或痛觉过敏的方法中使用。

[0331] 29.一种用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法中使用的载体，所述载体包含编码根据项1-26中任一项的多肽的多核苷酸。

[0332] 30.项29的载体，进一步包含与核酸分子操作连接的启动子。

[0333] 31.前述项29-30中任一项的载体，其中该载体选自下组：甲病毒，腺病毒，腺伴随病毒，杆状病毒，单纯疱疹病毒，冠状病毒，牛乳头状瘤病毒，和Mo-MLV，优选为腺伴随病毒。

[0334] 32.根据前述项29-31中任一项的载体，其中所述载体用于在治疗异常性疼痛和/或痛觉过敏的方法中使用。

[0335] 33.一种用于在治疗异常性疼痛、痛觉过敏和/或自发性疼痛的方法中使用的分离的细胞系，其是经项29-32的载体转化或转导的。

[0336] 34.根据项33的细胞系，其中所述细胞是人细胞。

[0337] 35.项34的细胞系，其中该细胞系选自下组：永生化的视网膜色素上皮细胞，永生化的人成纤维细胞，永生化的人星形胶质细胞，干细胞，包括人神经干细胞或前体细胞，人胶质干细胞或前体细胞，和胚胎干细胞。

[0338] 36.项34的细胞系，其中该细胞系是ARPE-19细胞。

[0339] 37.根据项33-36中任一项的细胞系，其中所述细胞系用于在治疗异常性疼痛和/或痛觉过敏的方法中使用。

[0340] 38.一种用于在通过向受试者输送分泌型生物活性镍纹蛋白来治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法中使用的可植入生物相容性胶囊，所述胶囊包含：

[0341] i.生物相容性外膜和内核，

[0342] ii.所述内核包含根据项33-37中任一项的细胞。

[0343] 39.项38的胶囊，其中所述生物相容性外膜是允许所述化合物通过的半透性外膜。

[0344] 40.项38-39中任一项的胶囊，其中所述内核包含基质。

[0345] 41.项38-40中任一项的胶囊，其中所述胶囊是胶囊容积至少为1μL，例如1-10μL的大胶囊。

[0346] 42.项38-41中任一项的胶囊，其每μL胶囊容积包含10,000-250,000个细胞，更优选地每μL 50,000-200,000个细胞，更优选地每μL 100,000-200,000个细胞，更优选地每μL 15,000-50,000个细胞，更优选地每μL 20,000-30,000个细胞。

[0347] 43.项38-42中任一项的胶囊，其中所述胶囊用于在治疗异常性疼痛和/或痛觉过

敏的方法中使用。

[0348] 44.一种治疗受试者中异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和/或幻痛的方法，包括向所述有需要的受试者施用治疗有效量的项1-26中任一项的分离的多肽。

[0349] 45.根据项44的方法，其中所述治疗针对异常性疼痛和/或痛觉过敏。

[0350] 46.根据项44的方法，其中所述治疗针对自发性疼痛。

[0351] 47.根据项44的方法，其中所述治疗针对痛觉过敏。

[0352] 48.根据项47的方法，其中所述痛觉过敏是温度痛觉过敏。

[0353] 49.根据项47的方法，其中所述痛觉过敏是冷痛觉过敏。

[0354] 50.根据项47的方法，其中所述痛觉过敏是高温痛觉过敏。

[0355] 51.根据项47的方法，其中所述痛觉过敏是机械性痛觉过敏。

[0356] 52.根据项44的方法，其中要治疗的受试者不经历体重减轻。

[0357] 53.根据项44的方法，其中要治疗的受试者是哺乳动物，优选为灵长类动物，更优选为人。

[0358] 54.根据项44的方法，其中所述治疗通过全身性给药来施用。

[0359] 55.根据项44的方法，其中所述治疗通过肠胃外注射，优选皮下注射或鞘内注射来施用。

[0360] 56.根据项44的方法，其中所述治疗以1μg/kg-10,000μg/kg，例如1μg/kg-7,500μg/kg，例如1μg/kg-5,000μg/kg，例如1μg/kg-2,000μg/kg，例如1μg/kg-1,000μg/kg，例如1μg/kg-700μg/kg，例如5μg/kg-500μg/kg，例如10μg/kg-100μg/kg体重的剂量施用。

[0361] 57.根据项44的方法，其中所述施用每天重复进行。

[0362] 58.根据项44的方法，其中所述施用每周重复进行至少1-3次，例如每周2-5次，例如每周3-6次。

[0363] 59.根据项44的方法，其中所述治疗导致至少一部分经治疗的受试者中的异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛或幻痛基本上完全逆转。

[0364] 60.根据项44的方法，其中所述治疗导致至少一部分经治疗的受试者中的疾病缓解。

[0365] 61.一种用于在治疗有需要的人受试者中的神经性疼痛的方法中使用的神经营养性镍纹蛋白多肽，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的神经营养性多肽，其包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70％同一性的氨基酸序列，其中所述施用为每周三次或者频度更低。

[0366] 62.项61的多肽，其中所述施用为每周或者更低频度的施用。

[0367] 63.项61的多肽，其中所述施用为每两周或者更低频度的施用。

[0368] 64.项61的多肽，其中所述治疗的治疗效果在多肽施用之间的整个时间段内减轻神经性疼痛的至少一种症状。

[0369] 65.项64的多肽，其中所述症状选自下组:异常性疼痛，痛觉过敏，自发性疼痛，幻痛，烧灼感，麻刺感，电击感，针刺感，感觉异常，感觉迟钝，僵硬，肢体麻木，身体变形感，和痛觉过敏。

[0370] 66.项61的多肽，其中所述治疗不在多肽施用之间的整个时间段内于所述受试者的血清中保持可测量水平的所述多肽。

[0371] 67.项66的多肽,其中所述多肽在所述受试者血清中的水平在多肽施用之间下降到低于10ng/mL。

[0372] 68.一种用于在治疗有需要人受试者的神经性疼痛的方法中使用的神经营养性镍纹蛋白多肽,包括向受试者施用治疗有效量的神经营养性多肽,其包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,其中所述治疗不在多肽施用之间的整个时间间隔内于所述受试者的血清中保持可测量水平的所述多肽。

[0373] 69.项68的多肽,其中在多肽施用之间所述受试者血清中所述多肽的水平降低到低于10ng/mL。

[0374] 70.项61-69中任一项的多肽,其中所述多肽与具有SEQ ID NO:3的序列的蛋白有至少75%序列同一性,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选90%,更优选95%,更优选98%。

[0375] 71.根据前述项61-70中任一项的多肽,其中所述神经营养性多肽包含SEQ ID NO:11的共有序列。

[0376] 72.根据前述项61-70中任一项的多肽,其中所述神经营养性多肽在相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第7、28、59、95、148、151、161、219、243和265位置处具有半胱氨酸残基。

实施例

[0377] 实施例1

[0378] 蛋白纯化

[0379] 将小鼠镍纹蛋白(Uniprot登录号#Q8C1Q4;SEQ ID NO:5)(aa22-291(SEQ ID NO:6),具有来自hCD33的信号肽)克隆到表达载体内。通过电穿孔将载体转染到NS0小鼠骨髓瘤细胞系。分离稳定克隆,并通过Western分析,使用Gt x mMETRN多克隆抗体(AF3475)筛选小鼠镍纹蛋白的表达。从含有小鼠镍纹蛋白的培养物浓缩条件培养基,补加20mM MOPS,pH调至6.5,并通过0.2um滤膜过滤。将样品施加到用20mM MOPS,0.1M NaCl,pH 6.5平衡的阴离子交换色谱树脂。对含有小鼠镍纹蛋白的级分补加2M NaCl,将pH调至7.0,然后施加到苯基Sepharose树脂。用渐低梯度的NaCl洗脱结合的蛋白。汇集富含小鼠镍纹蛋白的级分,浓缩,并加载到Superdex凝胶过滤柱上,然后用PBS平衡。小鼠镍纹蛋白作为大约30kDa分子量的蛋白洗脱。汇集感兴趣的级分,浓缩,对PBS透析,并保存在-80C。

[0380] 实施例2

[0381] 光化学诱导的坐骨神经损伤

[0382] 在光化学诱导的坐骨神经损伤大鼠中研究全身性(sc)施用镍纹蛋白的效果,已知该大鼠在损伤1周内产生对机械性和冷刺激的异常性疼痛(Kupers,R.,Yu,W.,Persson,J.K.,Xu,X.J.,and Wiesenfeld-Hallin,Z.(1998);Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical,heat and cold allodynia,and signs of spontaneous pain.Pain 76,45-59)。简而言之,在单侧光诱导坐骨神经损伤后,将动物随机分成4组(每组n=8),并注射作为阴性对照的盐水或不同浓度的镍纹蛋白(0.05,0.2和0.8mg/kg)。从形成稳定的异常性疼痛后7天开始,每只大鼠在2周的时间内接受6次注射。在处理期间每次注射之前及额外2周

时间内，实施行为评估。

[0383] 从图1可以显见，盐水和低剂量镍纹蛋白(0.05mg/kg)未影响身体同侧后肢对机械刺激的响应。0.2mg/kg镍纹蛋白适度地减少机械刺激异常性疼痛，但是该组与盐水对照组没有统计学差异。与之相对的，重复注射0.8mg/kg镍纹蛋白导致机械刺激异常性疼痛显著而明确地减轻。在第21天终止治疗后，该组在至少一周内仍然保持与对照组显著差异。随着时间推移，机械刺激异常性疼痛逐渐恢复。

[0384] 对寒冷的响应通过在后足爪平面上短暂喷射氯乙烷，并相应地给动物行为打分来进行评估。图2显示，用0.8mg/kg镍纹蛋白处理强烈减轻了冷异常性疼痛刺激，并且0.2mg/kg也有显著的阳性效果。处理终止后，用0.8mg/kg镍纹蛋白处理的组与对照组保持显著差异达至少1周，甚至在2周后仍然有改进的趋势。随着时间推移，冷刺激异常性疼痛逐渐恢复，但在实验结束时仍未完全恢复。0.05mg/kg镍纹蛋白没有效果，在整个研究期间与对照组相似。

[0385] 重要的是，所有动物在整个研究期间体重正常增加，没有观察到副作用(图3)。

[0386] 结论，镍纹蛋白剂量依赖地减少了机械性和冷刺激异常性疼痛，并且效果在处理终止后持续至少1周。处理终止2周后，超敏感性似乎逐渐恢复。没有观察到副作用。

[0387] 实施例3

[0388] 慢性缩窄性损伤(CCI)

[0389] 进一步确立的慢性缩窄性损伤(CCI)模型(Bennett,G.J.,and Xie,Y.K.(1988);A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.Pain 33,87-107)中研究镍纹蛋白的效果。简而言之，注射12天后，当建立了稳定的机械刺激异常性疼痛时，动物在随后2周内接受分散的6次皮下镍纹蛋白(0.1,0.5,2.0mg/kg)或溶媒注射(每组n＝7-8)。在整个研究期间直至末次注射后3周止，监视动物的行为。

[0390] 在即将处理前和刚处理后立即评估承重，作为自发性疼痛的替代标志。在治疗之前(第12天)，所有组均有大约50g的一侧对另一侧不足，镍纹蛋白处理组减少到10-15g。处理终止后，效果逐渐减少，三周后，各组间没有显著差异。

[0391] 也在CCI动物中评价了机械刺激异常性疼痛。针对用经测径的弗莱毛进行的机械刺激的平均基线足爪缩回阈值为15g，其逐渐减少到第12天(此时处理开始)的2g。在整个研究期间，溶媒组保持超敏(～2g)，而镍纹蛋白在所有测试剂量下均有效减轻了机械性异常性疼痛(8-11g)。处理终止后，镍纹蛋白处理组的动物在大约1周内仍然与对照组有显著差异，但是异常性疼痛逐渐恢复，3周后各组间没有差异。为了评估效果的程度，对照组的动物给予高剂量的加巴喷丁(200mg/kg)用于比较。加巴喷丁处理1小时后，对机械刺激的阈值为9.7±1.9g，而处理之前为1.9±0.7g。显然，镍纹蛋白和加巴喷丁的有效性相似，但是重要的是，尽管加巴喷丁是一种镇痛剂，但是镍纹蛋白具有长效性，并且具有潜在的疾病缓解作用。

[0392] 镍纹蛋白注射未在对照与处理动物之间导致体重减少或者一般行为差异。

[0393] 实施例4

[0394] 慢性缩窄性损伤(CCI)

[0395] 目的

[0396] 本研究被设计用于研究在通过慢性缩窄性损伤(CCI)产生的大鼠中(Bennett and Xie,"A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like thos seen in man",1988,Pain 33;p.87-107)皮下(s.c)给予重组镍纹蛋白对减轻异常性疼痛和自发性疼痛的效力。

[0397] 方法

[0398] 重组镍纹蛋白:重组小鼠镍纹蛋白(Uniprot登录号#Q8C1Q4)的生产如本申请其它部分所述。

[0399] 手术:对30只体重250-280g的雄性Sprague-Dawley大鼠进行手术,使用4个4-0铬制肠线制成的宽松结扎(loose ligature)对左侧坐骨神经产生慢性缩窄(CCI模型)(Bennett and Xie,"A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like thos seen in man",1988,Pain 33;p.87-107)。大鼠通过吸入异氟醚气体进行麻醉。在紧邻左后肢中股水平处相对于股二头肌靠尾端的部位,对大鼠进行皮肤切口。然后在下层肌肉层中造成一个小切口,并用止血钳轻柔地分离,小心不干扰坐骨神经。然后识别坐骨神经,将其与附着组织游离,用45°角钳子轻轻抬高。在神经下面放入4片4-0铬制肠线材料(预先用无菌盐水冲洗过),然后将每一片宽松地围绕神经系成一个方结。结间隔1mm。这些宽松结扎可以对神经造成慢性压迫,而不阻断血液供应。肌肉层用4-0Vicryl缝线缝合,皮肤用缝合夹封闭。

[0400] 分组和行为分析:在实验第0天,所有大鼠用弗莱毛测试机械刺激异常性疼痛,用Hargreaves的方法测试温度异常性疼痛,并用双足平衡测痛仪(incapacitance meter)测量后肢的承重。选择24只大鼠继续进行研究,随后分成4个处理组(n=6)。在手术后10、12、14、17和19天,动物用溶媒、0.1、0.5或1.8mg/kg镍纹蛋白皮下注射5次。在手术后10、12、14、17、19、21、26、32和39天,进一步测试动物的机械性和温度异常性疼痛以及不平衡(incapacitance)。重要的是,在注射镍纹蛋白之前进行行为分析,以排除立即镇痛效果,而聚焦于长期持续的潜在的疾病缓解作用。在整个研究期间对动物进行观察并监视体重。实验人不知道处理条件,在研究中没有移出动物。

[0401] 血清中镍纹蛋白测定:在手术后第39天进行行为测试之后,对动物给药0.1、0.5和2mg/kg镍纹蛋白,并在施用2、6、24小时后收集大鼠血清样品。还从未处理的对照大鼠收集血清。每个时间点两只大鼠。所有大鼠血清样品通过小鼠镍纹蛋白ELISA(R&D Systems,DY3475)进行测定。

[0402] 结果

[0403] 通过CCI(Bennett and Xie,1988)诱导大鼠实验异常性疼痛和自发性疼痛,并使用弗莱毛评估触觉异常性疼痛(图7)。大鼠的基线缩回阈值为大约15g,在CCI 10天后降低到1.5g。显然,用镍纹蛋白处理快速减轻了异常性疼痛,在17、19、21、26和32天,1.8mg/kg镍纹蛋白处理大鼠忍受的力与溶媒处理大鼠相比是显著的。如此,该显著差异在治疗终止后保持至少13天,在20天后亦观察到减轻异常性疼痛的趋势。用1.8mg/kg镍纹蛋白处理组中的大多数动物恢复到15g,但有一只动物没有响应,这解释了这一组中增大的标准误差。

[0404] 对于温度敏感性(图8),大鼠的基线缩回延迟为16.5秒,在CCI 10天后减小到大约7秒,表明出现温度异常性疼痛。溶媒处理的动物在整个研究期间保持超敏感性,而用1.8mg/kg镍纹蛋白处理从第14天快速导致缩回延迟显著降低,其在实验的剩余时间中一直

保持，包括处理终止后至少3周。有趣的是，该镍纹蛋白组的缩回延迟没有返回到溶媒组的异常性疼痛水平，而是平稳在10.5秒。0.5mg/kg剂量的镍纹蛋白也导致缩回延迟减少，在第19天和21天变得显著。0.1mg/kg镍纹蛋白也具有异常性疼痛降低的趋势，尽管这没有达到统计学显著水平。总之，镍纹蛋白剂量依赖性地减少了温度异常性疼痛，在整个治疗时期及之后具有显著作用。

[0405] 在手术后基线筛选时，大鼠在其两个后足上分布相等的重量(图9)。然后，CCI损伤后，施加到身体同侧后肢的重量少了大约60％，这被作为自发性疼痛的替代标志。溶媒组在整个研究期间保持60％的承重不足。相反，0.5和1.8mg/kg镍纹蛋白快速减少了承重不足，在两个情况下，在治疗终止后至少3周内都仍然保持显著改善的阳性效果。在第19天，低剂量镍纹蛋白也见到统计学显著的效果。总的来说，从第26天到实验结束，所有镍纹蛋白处理组中承重不足均保持于低于溶媒组的稳定水平。溶媒对照组保持超过60％，而0.1、0.5和1.8mg/kg镍纹蛋白处理组的平均承重不足分别保持为大约55％、48％和40％。

[0406] 没有观察到直接的副作用，在整个研究期间所有动物的体重正常增加(图10)。

[0407] 第39天最后一次行为测试后，给予动物0.1、0.5和1.8mg/kg镍纹蛋白，并在2、6和24小时后收集血清样品用于药动学评估(图11)。镍纹蛋白在注射0.1mg/kg后在血清中几乎检测不到，但是在两个更高剂量之间可以观察到剂量与血清浓度的良好的相关性。从图11更清晰可见，镍纹蛋白在注射24小时后不再能在血清中检测到。与此相关的，有趣的是，观察到的有益作用在最后一次注射后仍持续数周，而此时血清中已不存在镍纹蛋白(图7、8和9)。同样，镍纹蛋白处理没有返回到超敏感的基线水平，而是导致一个新的超敏感性更低的水平。综合来看，镍纹蛋白很可能具有疾病缓解性质。因此，长期持续的效果可以反映神经元功能的正常化或恢复。

[0408] 结论

[0409] 从温度和触觉异常性疼痛均减小和承重差异的正常化推断，对手术制备成显示类似异常性疼痛和自发性疼痛样综合征的动物施用镍纹蛋白，导致了异常性疼痛和自发性疼痛的深度降低。甚至在注射24小时后，当血清中不存在镍纹蛋白时，阳性作用仍可持续数周，由此显示了疾病缓解作用。

[0410] 实施例5:光化学诱导的坐骨神经损伤，鞘内施用

[0411] 方法

[0412] 手术:给体重380-450g的雄性Sprague-Dawley大鼠(Harlan,The Netherlands)安装长期鞘内导管(chronic intrathecal catheter)，其尖端位于腰部膨大(Storkson,R.V.,Kjorsvik,A.,Tjolsen,A.,and Hole,K.(1996).Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat.J.Neurosci.Methods65,167-172)。导管植入后3-5天，使用光化学方法产生缺血性坐骨神经损伤(Kupers,R.,Yu,W.,Persson,J.K.,Xu,X.J.,and Wiesenfeld-Hallin,Z.(1998);Pain 76,45-59)。简而言之，在全身麻醉(水合氯醛300mg/kg)下，在中股水平暴露左侧坐骨神经，并用514nm平均功率0.17W运作的氩激光器辐射1.5min。在即将辐射前通过尾静脉静脉内注射藻红B(32,5mg/kg，溶解于0.9％盐水)。该操作可在7天内产生高度可重复的超敏感性。

[0413] 异常性疼痛评估 为了评估机械性异常性疼痛，用逐渐增强的力量向爪的光滑皮肤施加一系列经过测径的尼龙单丝(弗莱毛,Stoelting,IL)，直至动物缩腿。每个单丝施加

5次，确定这样的力作为缩回阈值：在该力下，5次连续刺激中至少有3次动物缩回。对寒冷的响应用氯乙烷测试，将其短暂(<1s)喷洒到后足爪的平坦表面。响应如下计分：0＝无响应，1＝惊吓样响应，无后足爪缩回(正常)，2＝受刺激的后足爪短暂回缩(轻度疼痛)，3＝受刺激的后足爪持续或重复回缩，短暂舔舐或摇晃(严重疼痛)。所有测试由对实验条件全不知情的实验人实施。

[0414] 实验设计 基线响应在导管植入后进行评估，并在坐骨神经辐射之前再次评估。将在神经损伤7天后对机械性和冷刺激产生异常性疼痛的大鼠随机分成4组(N＝8)，鞘内给予作为阴性对照的溶媒和三个剂量的重组镍纹蛋白(0.5,2和6ug)，体积为10μl。每只大鼠在两周时间内接受6次注射(从神经损伤开始计时的第7、9、11、14、16和18日)。在各个处理日鞘内注射之前、以及处理终止后的第21、25、28和35日进行行为测试。

[0415] 结果

[0416] 如图12所示，对机械刺激的基线足爪缩回阈值为大约50g。光化学诱导坐骨神经损伤后7天，大鼠出现显著的机械性异常性疼痛事件，缩回阈值降低到大约8g。然后把大鼠随机分成4组，随后在2周的时间跨度内通过6次鞘内注射施用溶媒或镍纹蛋白。对于镍纹蛋白，大鼠接受了0.5μg、2μg或6μg。显然，鞘内注射镍纹蛋白显著地并且剂量依赖地减轻了机械性异常性疼痛(图12)。机械性异常性疼痛在处理终止后1周内逐渐恢复。鞘内注射溶媒在整个实验期间未影响机械超敏感性。

[0417] 如图13所示，基线冷刺激响应是1，相应于正常的惊吓样响应。光化学诱导坐骨神经损伤后7天，大鼠产生明显的冷异常性疼痛事件，呈现中等的疼痛反应。用2μg和6μg镍纹蛋白处理快速逆转了冷异常性疼痛，并且在治疗期间，动物对寒冷的响应接近正常。在6μg镍纹蛋白处理终止后3天，也观察到了显著的阳性效果。然而，冷异常性疼痛在处理结束1周后完全恢复。溶媒对冷异常性疼痛没有效果。

[0418] 结论

[0419] 在缺血性坐骨神经损伤后的大鼠中，重复鞘内注射镍纹蛋白显著减少机械性和冷异常性疼痛。

[0420] 实施例6:序列列表

[0421] SEQ ID NO 1:人镍纹蛋白cDNA

[0422] SEQ ID NO 2:人镍纹蛋白全长氨基酸序列

[0423] SEQ ID NO 3:没有信号肽的人镍纹蛋白氨基酸序列

[0424] SEQ ID NO 4:小鼠镍纹蛋白cDNA

[0425] SEQ ID NO 5:小鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列

[0426] SEQ ID NO 6:没有信号肽的小鼠镍纹蛋白氨基酸序列

[0427] SEQ ID NO 7:大鼠镍纹蛋白cDNA

[0428] SEQ ID NO 8:大鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列

[0429] SEQ ID NO 9:没有信号肽的大鼠镍纹蛋白氨基酸序列

[0430] SEQ ID NO 10:人密码子优化的DNA序列

[0431] SEQ ID NO 11:成熟镍纹蛋白，共有序列

[0432] 人镍纹蛋白cDNA(1109 bp;CDS＝118-999)(SEQ ID NO 1)

[0433] >gi|34147349|ref|NM_024042.2|人假想蛋白MGC2601(MGC2601),mRNA

[0434] GCTTCGCCGGGGCCGGGCGGCCGGCGCCCCCGGCTGCTCCCGCCGCCGCCCGGACCCGCGCCCCGCCGG GGCAGCGGTGGTGAGAGCCCCGACTCCCCGGACGCCGCCCGCCGTGCCATGGGGTTCCCGGCCGCGGCGCTGCTCTG CGCGCTGTGCTGCGGCCTCCTGGCCCCGGCTGCCCGCGCCGGCTACTCCGAGGAGCGCTGCAGCTGGAGGGGCAGCG GCCTCACCCAGGAGCCCGGCAGCGTGGGGCAGCTGGCCCTGGCCTGTGCGGAGGGCGCGGTTGAGTGGCTGTACCCG GCTGGGGCGCTGCGCCTGACCCTGGGCGGCCCCGATCCCAGAGCGCGGCCCGGCATCGCCTGTCTGCGGCCGGTGCG GCCCTTCGCGGGCGCCCAGGTCTTCGCGGAGCGCGCAGGGGGCGCCCTGGAGCTGCTGCTGGCCGAGGGCCCGGGCC CGGCAGGGGGCCGCTGCGTGCGCTGGGGTCCCCGCGAGCGCCGGGCCCTCTTCCTGCAGGCCACGCCGCACCAGGAC ATCAGCCGCCGCGTGGCCGCCTTCCGCTTTGAGCTGCGCGAGGACGGGCGCCCCGAGCTGCCCCCGCAGGCCCACGG TCTCGGCGTAGACGGTGCCTGCAGGCCCTGCAGCGACGCTGAGCTGCTCCTGGCCGCATGCACCAGCGACTTCGTAA TTCACGGGATCATCCATGGGGTCACCCATGACGTGGAGCTGCAGGAGTCTGTCATCACTGTGGTGGCCGCCCGTGTC CTCCGCCAGACACCGCCGCTGTTCCAGGCGGGGCGATCCGGGGACCAGGGGCTGACCTCCATTCGTACCCCACTGCG CTGTGGCGTCCACCCGGGCCCAGGCACCTTCCTCTTCATGGGCTGGAGCCGCTTTGGGGAGGCCCGGCTGGGCTGTG CCCCACGATTCCAGGAGTTCCGCCGTGCCTACGAGGCTGCCCGTGCTGCCCACCTCCACCCCTGCGAGGTGGCGCTG CACTGAGGGGCTGGGTGCTGGGGAGGGGCTGGTAGGAGGGAGGGTGGGCCCACTGCTTTGGAGGTGATGGGACTATC AATAAGAACTCTGTTCACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0435] 人镍纹蛋白全长氨基酸序列(SEQ ID NO2)

[0436] >IPI00031531.1REFSEQ_NP:NP_076947TREMBL:Q9UJH9

[0437] ENSEMBL:ENSP00000219542Tax_Id＝9606C380A1.2.1(新蛋白)

[0438] MGFPAAALLC ALCCGLLAPA ARAGYSEERC SWRGSGLTQE PGSVGQLALA CAEGAVEWLYPAGALRLTLG GPDPRARPGI ACLRPVRPFA GAQVFAERAG GALELLLAEG PGPAGGRCVRWGPRERRALF LQATPHQDIS RRVAAFRFEL REDGRPELPP QAHGLGVDGA CRPCSDAELLLAACTSDFVI HGIIHGVTHD VELQESVITV VAARVLRQTP PLFQAGRSGD QGLTSIRTPLRCGVHPGPGT FLFMGWSRFG EARLGCAPRF QEFRRAYEAA RAAHLHPCEV ALH

[0439] 没有信号肽的人镍纹蛋白(SEQ ID NO 3)

[0440] GYSEERCSWR GSGLTQEPGS VGQLALACAE GAVEWLYPAG ALRLTLGGPD PRARPGIACLRPVRPFAGAQ VFAERAGGAL ELLLAEGPGP AGGRCVRWGP RERRALFLQA TPHQDISRRVAAFRFELRED GRPELPPQAH GLGVDGACRP CSDAELLLAA CTSDFVIHGI IHGVTHDVELQESVITVVAA RVLRQTPPLF QAGRSGDQGL TSIRTPLRCG VHPGPGTFLF MGWSRFGEARLGCAPRFQEF RRAYEAARAA HLHPCEVALH

[0441] 小鼠镍纹蛋白cDNA,1363 bp,CDS 84..959(SEQ ID NO 4)

[0442] NM_133719.小家鼠镍纹蛋白.[gi:56550040]

[0443] gggcagccgc gccgcgggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtccgaggccccggc gcgtccccta accatgctgg tagccacgct tctttgcgcg ctctgttgcggcctcctggc cgcgtccgct cacgctggct actcggaaga ccgctgcagc tggaggggcagcggtttgac ccaggagcct ggcagcgtgg ggcagctgac cctggactgt actgagggcgctatcgagtg gctgtaccca gctggggcgc tgcgcctgac cctgggcggc cccgatccgggcacacggcc cagcatcgtc tgtctgcgcc cagagcggcc cttcgctggt gcccaggtcttcgctgaacg tatgaccggc aatctagagt tgctactggc cgagggcccg gacctggctgggggccgctg catgcgctgg ggtccccgcg agcgccgagc ccttttcctg

caggccacaccacaccgcga catcagccgc agagttgctg ccttccgttt tgaactgcac gaggaccaacgtgcagaaat gtctccccag gctcaaggtc ttggtgtgga tggtgcctgc aggccctgcagtgatgccga gctcctcctg gctgcatgca ccagtgattt tgtgatccac gggaccatccatggggtcgc ccatgacaca gagctgcaag aatcagtcat cactgtggtg gttgctcgtgtcatccgcca gacactgcca ctgttcaagg aagggagctc ggagggccaa ggccgggcctccattcgtac cttgctgcgc tgtggtgtgc gtcctggccc aggctccttc ctcttcatgggctggagccg atttggcgaa gcttggctgg gctgtgctcc ccgcttccaa gagttcagccgtgtctattc agctgctctc acgacccatc tcaacccatg tgagatggca ctggactgagagacctggga gcaagccctg gatggacctt cttctggaga tggggtgttg gggagggtgatgggagggtg ggtgagaagg gtgtggctcg gatggcatcc tggtacccac agtgagctggtagaatacta agtaatctgg accataccag ccactgtagt catggtcttc tgtggcaggcagcataccca gctctgtgcc tgcctcactt tgtctactct ccagtctgct gcccttctaacccttcttag cctgctgacc agtgagctca tgttttcctc gaattccagg gtgctgctggggttcagagc aaccgtgccg tagtttggaa gacttgagct aattgttttt ttttgtttgttttttttgtt tgtttaaagg tggcctgggg ggggcggcaa aca

[0444] 小鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列(SEQ ID NO 5)

[0445] ref|NP_598480.1|镍纹蛋白[小家鼠]

[0446] MLVATLLCAL CCGLLAASAH AGYSEDRCSW RGSGLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIEWLYPAGALRLTLGGP DPGTRPSIVC LRPERPFAGA QVFAERMTGN LELLLAEGPD LAGGRCMRWGPRERRALFLQ ATPHRDISRR VAAFRFELHE DQRAEMSPQA QGLGVDGACR PCSDAELLLAACTSDFVIHG TIHGVAHDTE LQESVITVVV ARVIRQTLPL FKEGSSEGQG RASIRTLLRCGVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGCAPRFQE FSRVYSAALT THLNPCEMAL D

[0447] 没有信号肽的小鼠镍纹蛋白(SEQ ID NO 6)

[0448] GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGPD PGTRPSIVCL RPERPFAGAQVFAERMTGNL ELLLAEGPDL AGGRCMRWGP RERRALFLQA TPHRDISRRV AAFRFELHED QRAEMSPQAQGLGVDGACRP CSDAELLLAA CTSDFVIHGT IHGVAHDTEL QESVITVVVA RVIRQTLPLF KEGSSEGQGRASIRTLLRCG VRPGPGSFLF MGWSRFGEAW LGCAPRFQEF SRVYSAALTT HLNPCEMALD

[0449] 大鼠镍纹蛋白cDNA(1026 bp;CDS＝1-876)(SEQ ID NO 7)

[0450] >gi|34870570|ref|XM_213261.2|褐家鼠,与1810034B16Rik(LOC287151)蛋白相似,mRNAATGCTGGTAGCGGCGCTTCTCTGCGCGCTGTGCTGCGGCCTCTTGGCTGCGTCCGCTCGAGCTGGCTAC TCCGAGGACCGCTGCAGCTGGAGGGGCAGCGGTTTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTGGGGCAGCTGACCCTGGATTG TACTGAGGGTGCTATCGAGTGGCTGTATCCAGCTGGGGCGCTGCGCCTGACTCTAGGCGGCTCTGATCCGGGCACGC GGCCCAGCATCGTCTGTCTGCGCCCAACACGGCCCTTCGCTGGTGCCCAGGTCTTCGCTGAACGGATGGCCGGCAAC CTAGAGTTGCTACTGGCCGAGGGCCAAGGCCTGGCTGGGGGCCGCTGCATGCGCTGGGGTCCTCGCGAGCGCCGAGC CCTTTTCCTGCAGGCCACGCCACACCGGGACATCAGCCGCAGAGTTGCTGCCTTCCAATTTGAACTGCACGAGGACC AACGTGCAGAAATGTCTCCCCAGGCCCAAGGTTTTGGTGTGGATGGTGCCTGCAGGCCCTGCAGTGATGCCGAGCTC CTTCTGACTGCATGCACCAGTGACTTTGTGATCCATGGGACCATCCATGGGGTCGTCCATGACATGGAGCTGCAAGA ATCAGTCATCACTGTGGTGGCCACTCGTGTCATCCGCCAGACACTGCCACTGTTCCAGGAAGGGAGCTCGGAGGGCC GGGGCCAGGCCTCCGTTCGTACCTTGTTGCGCTGTGGTGTGCGTCCTGGCCCAGGCTCCTTCCTCTTCATGGGCTGG

AGCCGATTTGGCGAAGCTTGGCTGGGCTGCGCTCCCCGCTTCCAAGAGTTCAGCCGTGTCTATTCAGCTGCTCTCGC GGCCCACCTCAACCCATGTGAGGTGGCACTGGACTGAGAGACCTGGGAGCAAGCCCTGGATGGATCTTCCTCTGGGG ATGGGGTGTTGGGGAGGGGTGATAGGAGGGTGGGTGGGAAGGGTGTGGCTCAGATGGCATCCTGGTACCCACAGTGA GGTGGTAGAATACTAAATAACCTGGATCACACC

[0451] 大鼠镍纹蛋白全长氨基酸序列(SEQ ID NO 8)

[0452] >IPI00369281.1|REFSEQ_XP:XP_213261|ENSEMBL: ENSRNOP00000026676MLVAALLCAL CCGLLAASAR AGYSEDRCSW RGSGLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIEWLYPAGALRLTLGGS DPGTRPSIVC LRPTRPFAGA QVFAERMAGN LELLLAEGQG LAGGRCMRWGPRERRALFLQ ATPHRDISRR VAAFQFELHE DQRAEMSPQA QGFGVDGACR PCSDAELLLTACTSDFVIHG TIHGVVHDME LQESVITVVA TRVIRQTLPL FQEGSSEGRG QASVRTLLRCGVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGCAPRFQE FSRVYSAALA AHLNPCEVAL D

[0453] 没有信号肽的大鼠镍纹蛋白(SEQ ID No 9)

[0454] GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGSD PGTRPSIVCLRPTRPFAGAQ VFAERMAGNL ELLLAEGQGL AGGRCMRWGP RERRALFLQA TPHRDISRRVAAFQFELHED QRAEMSPQAQ GFGVDGACRP CSDAELLLTA CTSDFVIHGT IHGVVHDMELQESVITVVAT RVIRQTLPLF QEGSSEGRGQ ASVRTLLRCG VRPGPGSFLF MGWSRFGEAWLGCAPRFQEF SRVYSAALAA HLNPCEVALD

[0455] 存在于构建体pCAn.Meteorin和pT2.CAn.Meteorin中的密码子优化的镍纹蛋白核苷酸序列(SEQ ID NO 10)

[0456] ATGGGCTTTCCCGCTGCCGCCCTGCTGTGCGCTCTGTGCTGCGGACTGCTGGCTCCTGCAGCCAGAGCC GGCTACAGCGAGGAACGGTGCAGCTGGCGGGGCAGCGGCCTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTCGGCCAGCTCGCACT GGCCTGTGCAGAAGGCGCCGTGGAGTGGCTGTACCCCGCAGGCGCCCTGAGACTGACCCTGGGCGGACCCGACCCCA GAGCCAGACCCGGCATTGCCTGTCTGAGGCCCGTGCGGCCTTTCGCTGGCGCCCAGGTGTTCGCCGAGAGAGCCGGC GGAGCCCTGGAACTCCTGCTCGCCGAAGGCCCTGGTCCAGCCGGCGGAAGATGCGTGAGATGGGGCCCAAGAGAGCG GAGAGCCCTGTTCCTGCAAGCCACCCCCCACCAGGACATCAGCAGACGGGTGGCCGCCTTCAGATTCGAGCTGCGGG AGGACGGTAGACCCGAGCTGCCACCTCAGGCCCACGGACTGGGAGTGGACGGCGCCTGCAGACCCTGTAGCGACGCC GAGCTGCTGCTCGCCGCCTGCACCAGCGACTTCGTGATCCACGGCATCATCCACGGCGTGACCCACGACGTGGAGCT GCAGGAAAGCGTCATCACCGTCGTCGCCGCCAGAGTGCTGAGACAGACCCCCCCTCTGTTCCAGGCCGGCAGAAGCG GCGACCAGGGCCTGACCAGCATCCGGACCCCCCTGAGATGCGGCGTGCATCCCGGACCCGGCACCTTCCTGTTCATG GGCTGGTCCAGATTCGGCGAGGCCCGGCTGGGCTGCGCTCCCCGGTTCCAGGAATTCAGACGGGCCTACGAGGCCGC CAGGGCCGCTCATCTGCACCCCTGCGAGGTGGCCCTGCATTGA

[0457] 共有序列,成熟镍纹蛋白(SEQ ID No 11)

[0458] GYSEXRCSWR GSGLTQEPGS VGQLXLXCXE GAXEWLYPAG ALRLTLGGXD PXXRPXIXCL 60

[0459] RPXRPFAGAQ VFAERXXGXL ELLLAEGXXX AGGRCXRWGP RERRALFLQA TPHXDISRRV 120AAFXFELXED XRXEXXPQAX GXGVDGACRP CSDAELLLXA CTSDFVIHGX IHGVXHDXEL 180QESVITVVXX RVXRQTXPLF XXGXSXXXGX XSXRTXLRCG VXPGPGXFLF MGWSRFGEAX 240LGCAPRFQEF XRXYXAAXXX HLXPCEXALX 270

[0460] X是能够由DNA编码的21种氨基酸中的任何一种。

[0001] 序列表

[0002] <110> 霍巴治疗公司

[0003] <120> 镍纹蛋白用于治疗异常性疼痛、痛觉过敏、自发性疼痛和幻痛的用途

[0004] <130> P2413PC00

[0005] <150> DK PA 2010 70423

[0006] <151> 2010-01-01

[0007] <150> US 61/390,791

[0008] <151> 2010-01-07

[0009] <160> 11

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 1109

[0013] <212> DNA

[0014] <213> 人

[0015] <220>

[0016] <221> CDS

[0017] <222> (118)..(999)

[0018] <400> 1

[0019] gcttcgccgg ggccgggcgg ccggcgcccc cggctgctcc cgccgccgcc cggacccgcg 60

[0020] ccccgccggg gcagcggtgg tgagagcccc gactccccgg acgccgcccg ccgtgcc 117

[0021] atg ggg ttc ccg gcc gcg gcg ctg ctc tgc gcg ctg tgc tgc ggc ctc 165

[0022] Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu

[0023] 1 5 10 15

[0024] ctg gcc ccg gct gcc cgc gcc ggc tac tcc gag gag cgc tgc agc tgg 213

[0025] Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp

[0026] 20 25 30

[0027] agg ggc agc ggc ctc acc cag gag ccc ggc agc gtg ggg cag ctg gcc 261

[0028] Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala

[0029] 35 40 45

[0030] ctg gcc tgt gcg gag ggc gcg gtt gag tgg ctg tac ccg gct ggg gcg 309

[0031] Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala

[0032] 50 55 60

[0033] ctg cgc ctg acc ctg ggc ggc ccc gat ccc aga gcg cgg ccc ggc atc 357

[0034] Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile

[0035] 65 70 75 80

[0036] gcc tgt ctg cgg ccg gtg cgg ccc ttc gcg ggc gcc cag gtc ttc gcg 405

[0037] Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala

[0038] 85 90 95

[0039] gag cgc gca ggg ggc gcc ctg gag ctg ctg ctg gcc gag ggc ccg ggc 453

[0040] Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly

[0041] 100 105 110

[0042] ccg gca ggg ggc cgc tgc gtg cgc tgg ggt ccc cgc gag cgc cgg gcc 501
[0043] Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala
[0044] 115 120 125
[0045] ctc ttc ctg cag gcc acg ccg cac cag gac atc agc cgc cgc gtg gcc 549
[0046] Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala
[0047] 130 135 140
[0048] gcc ttc cgc ttt gag ctg cgc gag gac ggg cgc ccc gag ctg ccc ccg 597
[0049] Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro
[0050] 145 150 155 160
[0051] cag gcc cac ggt ctc ggc gta gac ggt gcc tgc agg ccc tgc agc gac 645
[0052] Gln Ala His Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp
[0053] 165 170 175
[0054] gct gag ctg ctc ctg gcc gca tgc acc agc gac ttc gta att cac ggg 693
[0055] Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly
[0056] 180 185 190
[0057] atc atc cat ggg gtc acc cat gac gtg gag ctg cag gag tct gtc atc 741
[0058] Ile Ile His Gly Val Thr His Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile
[0059] 195 200 205
[0060] act gtg gtg gcc gcc cgt gtc ctc cgc cag aca ccg ccg ctg ttc cag 789
[0061] Thr Val Val Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln
[0062] 210 215 220
[0063] gcg ggg cga tcc ggg gac cag ggg ctg acc tcc att cgt acc cca ctg 837
[0064] Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu
[0065] 225 230 235 240
[0066] cgc tgt ggc gtc cac ccg ggc cca ggc acc ttc ctc ttc atg ggc tgg 885
[0067] Arg Cys Gly Val His Pro Gly Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp
[0068] 245 250 255
[0069] agc cgc ttt ggg gag gcc cgg ctg ggc tgt gcc cca cga ttc cag gag 933
[0070] Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu
[0071] 260 265 270
[0072] ttc cgc cgt gcc tac gag gct gcc cgt gct gcc cac ctc cac ccc tgc 981
[0073] Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys
[0074] 275 280 285
[0075] gag gtg gcg ctg cac tga ggggctgggt gctggggagg ggctggtagg 1029
[0076] Glu Val Ala Leu His
[0077] 290
[0078] agggagggtg ggcccactgc tttggaggtg atgggactat caataagaac tctgttcacg 1089
[0079] caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1109
[0080] <210> 2
[0081] <211> 293
[0082] <212> PRT
[0083] <213> 人

[0084] <400> 2

[0085] Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu

[0086] 1 5 10 15

[0087] Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp

[0088] 20 25 30

[0089] Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala

[0090] 35 40 45

[0091] Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala

[0092] 50 55 60

[0093] Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile

[0094] 65 70 75 80

[0095] Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala

[0096] 85 90 95

[0097] Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly

[0098] 100 105 110

[0099] Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala

[0100] 115 120 125

[0101] Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala

[0102] 130 135 140

[0103] Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro

[0104] 145 150 155 160

[0105] Gln Ala His Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp

[0106] 165 170 175

[0107] Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly

[0108] 180 185 190

[0109] Ile Ile His Gly Val Thr His Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile

[0110] 195 200 205

[0111] Thr Val Val Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln

[0112] 210 215 220

[0113] Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu

[0114] 225 230 235 240

[0115] Arg Cys Gly Val His Pro Gly Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp

[0116] 245 250 255

[0117] Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu

[0118] 260 265 270

[0119] Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys

[0120] 275 280 285

[0121] Glu Val Ala Leu His

[0122] 290

[0123] <210> 3

[0124] <211> 270

[0125] <212> PRT

[0126] <213> 人

[0127] <400> 3

[0128] Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln

[0129] 1 5 10 15

[0130] Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala

[0131] 20 25 30

[0132] Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly

[0133] 35 40 45

[0134] Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg

[0135] 50 55 60

[0136] Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu

[0137] 65 70 75 80

[0138] Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val

[0139] 85 90 95

[0140] Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro

[0141] 100 105 110

[0142] His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg

[0143] 115 120 125

[0144] Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro Gln Ala His Gly Leu Gly Val

[0145] 130 135 140

[0146] Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala

[0147] 145 150 155 160

[0148] Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Ile Ile His Gly Val Thr His

[0149] 165 170 175

[0150] Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Ala Ala Arg Val

[0151] 180 185 190

[0152] Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln

[0153] 195 200 205

[0154] Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu Arg Cys Gly Val His Pro Gly

[0155] 210 215 220

[0156] Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg

[0157] 225 230 235 240

[0158] Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala

[0159] 245 250 255

[0160] Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys Glu Val Ala Leu His

[0161] 260 265 270

[0162] <210> 4

[0163] <211> 1363

[0164] <212> DNA

[0165] <213> 小家鼠

[0166] <220>

[0167] <221> CDS

[0168] <222> (84)..(959)

[0169] <400> 4

[0170] gggcagccgc gccgcgggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtccg 60

[0171] aggccccggc gcgtccccta acc atg ctg gta gcc acg ctt ctt tgc gcg ctc 113

[0172] Met Leu Val Ala Thr Leu Leu Cys Ala Leu

[0173] 1 5 10

[0174] tgt tgc ggc ctc ctg gcc gcg tcc gct cac gct ggc tac tcg gaa gac 161

[0175] Cys Cys Gly Leu Leu Ala Ala Ser Ala His Ala Gly Tyr Ser Glu Asp

[0176] 15 20 25

[0177] cgc tgc agc tgg agg ggc agc ggt ttg acc cag gag cct ggc agc gtg 209

[0178] Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val

[0179] 30 35 40

[0180] ggg cag ctg acc ctg gac tgt act gag ggc gct atc gag tgg ctg tac 257

[0181] Gly Gln Leu Thr Leu Asp Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr

[0182] 45 50 55

[0183] cca gct ggg gcg ctg cgc ctg acc ctg ggc ggc ccc gat ccg ggc aca 305

[0184] Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Gly Thr

[0185] 60 65 70

[0186] cgg ccc agc atc gtc tgt ctg cgc cca gag cgg ccc ttc gct ggt gcc 353

[0187] Arg Pro Ser Ile Val Cys Leu Arg Pro Glu Arg Pro Phe Ala Gly Ala

[0188] 75 80 85 90

[0189] cag gtc ttc gct gaa cgt atg acc ggc aat cta gag ttg cta ctg gcc 401

[0190] Gln Val Phe Ala Glu Arg Met Thr Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala

[0191] 95 100 105

[0192] gag ggc ccg gac ctg gct ggg ggc cgc tgc atg cgc tgg ggt ccc cgc 449

[0193] Glu Gly Pro Asp Leu Ala Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg

[0194] 110 115 120

[0195] gag cgc cga gcc ctt ttc ctg cag gcc aca cca cac cgc gac atc agc 497

[0196] Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser

[0197] 125 130 135

[0198] cgc aga gtt gct gcc ttc cgt ttt gaa ctg cac gag gac caa cgt gca 545

[0199] Arg Arg Val Ala Ala Phe Arg Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala

[0200] 140 145 150

[0201] gaa atg tct ccc cag gct caa ggt ctt ggt gtg gat ggt gcc tgc agg 593

[0202] Glu Met Ser Pro Gln Ala Gln Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg

[0203] 155 160 165 170

[0204] ccc tgc agt gat gcc gag ctc ctc ctg gct gca tgc acc agt gat ttt 641

[0205] Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe

[0206] 175 180 185

[0207] gtg atc cac ggg acc atc cat ggg gtc gcc cat gac aca gag ctg caa 689

[0208] Val Ile His Gly Thr Ile His Gly Val Ala His Asp Thr Glu Leu Gln

[0209] 190 195 200

[0210] gaa tca gtc atc act gtg gtg gtt gct cgt gtc atc cgc cag aca ctg 737
[0211] Glu Ser Val Ile Thr Val Val Val Ala Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu
[0212] 205 210 215
[0213] cca ctg ttc aag gaa ggg agc tcg gag ggc caa ggc cgg gcc tcc att 785
[0214] Pro Leu Phe Lys Glu Gly Ser Ser Glu Gly Gln Gly Arg Ala Ser Ile
[0215] 220 225 230
[0216] cgt acc ttg ctg cgc tgt ggt gtg cgt cct ggc cca ggc tcc ttc ctc 833
[0217] Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu
[0218] 235 240 245 250
[0219] ttc atg ggc tgg agc cga ttt ggc gaa gct tgg ctg ggc tgt gct ccc 881
[0220] Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro
[0221] 255 260 265
[0222] cgc ttc caa gag ttc agc cgt gtc tat tca gct gct ctc acg acc cat 929
[0223] Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Thr His
[0224] 270 275 280
[0225] ctc aac cca tgt gag atg gca ctg gac tga gagacctggg agcaagccct 979
[0226] Leu Asn Pro Cys Glu Met Ala Leu Asp
[0227] 285 290
[0228] ggatggacct tcttctggag atggggtgtt ggggagggtg atgggagggt gggtgagaag 1039
[0229] ggtgtggctc ggatggcatc ctggtaccca cagtgagctg gtagaatact aagtaatctg 1099
[0230] gaccatacca gccactgtag tcatggtctt ctgtggcagg cagcataccc agctctgtgc 1159
[0231] ctgcctcact ttgtctactc tccagtctgc tgcccttcta acccttctta gcctgctgac 1219
[0232] cagtgagctc atgttttcct cgaattccag ggtgctgctg gggttcagag caaccgtgcc 1279
[0233] gtagtttgga agacttgagc taattgtttt ttttttgttt gttttttttgt ttgtttaaag 1339
[0234] gtggcctggg gggggcggca aaca 1363
[0235] <210> 5
[0236] <211> 291
[0237] <212> PRT
[0238] <213> 小家鼠
[0239] <400> 5
[0240] Met Leu Val Ala Thr Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala
[0241] 1 5 10 15
[0242] Ala Ser Ala His Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly
[0243] 20 25 30
[0244] Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp
[0245] 35 40 45
[0246] Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg
[0247] 50 55 60
[0248] Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys
[0249] 65 70 75 80
[0250] Leu Arg Pro Glu Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg
[0251] 85 90 95

[0252] Met Thr Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Asp Leu Ala
[0253] 100 105 110
[0254] Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe
[0255] 115 120 125
[0256] Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe
[0257] 130 135 140
[0258] Arg Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala
[0259] 145 150 155 160
[0260] Gln Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu
[0261] 165 170 175
[0262] Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile
[0263] 180 185 190
[0264] His Gly Val Ala His Asp Thr Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val
[0265] 195 200 205
[0266] Val Val Ala Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Lys Glu Gly
[0267] 210 215 220
[0268] Ser Ser Glu Gly Gln Gly Arg Ala Ser Ile Arg Thr Leu Leu Arg Cys
[0269] 225 230 235 240
[0270] Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg
[0271] 245 250 255
[0272] Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser
[0273] 260 265 270
[0274] Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Thr His Leu Asn Pro Cys Glu Met
[0275] 275 280 285
[0276] Ala Leu Asp
[0277] 290
[0278] <210> 6
[0279] <211> 270
[0280] <212> PRT
[0281] <213> 小家鼠
[0282] <400> 6
[0283] Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln
[0284] 1 5 10 15
[0285] Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp Cys Thr Glu Gly Ala
[0286] 20 25 30
[0287] Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly
[0288] 35 40 45
[0289] Pro Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys Leu Arg Pro Glu Arg
[0290] 50 55 60
[0291] Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg Met Thr Gly Asn Leu
[0292] 65 70 75 80
[0293] Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Asp Leu Ala Gly Gly Arg Cys Met

[0294] 85 90 95

[0295] Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro

[0296] 100 105 110

[0297] His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe Arg Phe Glu Leu His

[0298] 115 120 125

[0299] Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala Gln Gly Leu Gly Val

[0300] 130 135 140

[0301] Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala

[0302] 145 150 155 160

[0303] Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile His Gly Val Ala His

[0304] 165 170 175

[0305] Asp Thr Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Val Ala Arg Val

[0306] 180 185 190

[0307] Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Lys Glu Gly Ser Ser Glu Gly Gln

[0308] 195 200 205

[0309] Gly Arg Ala Ser Ile Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly

[0310] 210 215 220

[0311] Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp

[0312] 225 230 235 240

[0313] Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala

[0314] 245 250 255

[0315] Ala Leu Thr Thr His Leu Asn Pro Cys Glu Met Ala Leu Asp

[0316] 260 265 270

[0317] <210> 7

[0318] <211> 1026

[0319] <212> DNA

[0320] <213> 褐家鼠

[0321] <220>

[0322] <221> CDS

[0323] <222> (1)..(876)

[0324] <400> 7

[0325] atg ctg gta gcg gcg ctt ctc tgc gcg ctg tgc tgc ggc ctc ttg gct 48

[0326] Met Leu Val Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala

[0327] 1 5 10 15

[0328] gcg tcc gct cga gct ggc tac tcc gag gac cgc tgc agc tgg agg ggc 96

[0329] Ala Ser Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly

[0330] 20 25 30

[0331] agc ggt ttg acc cag gaa cct ggc agc gtg ggg cag ctg acc ctg gat 144

[0332] Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp

[0333] 35 40 45

[0334] tgt act gag ggt gct atc gag tgg ctg tat cca gct ggg gcg ctg cgc 192

[0335] Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg

[0336] 50 55 60

[0337] ctg act cta ggc ggc tct gat ccg ggc acg cgg ccc agc atc gtc tgt 240

[0338] Leu Thr Leu Gly Gly Ser Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys

[0339] 65 70 75 80

[0340] ctg cgc cca aca cgg ccc ttc gct ggt gcc cag gtc ttc gct gaa cgg 288

[0341] Leu Arg Pro Thr Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg

[0342] 85 90 95

[0343] atg gcc ggc aac cta gag ttg cta ctg gcc gag ggc caa ggc ctg gct 336

[0344] Met Ala Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Gln Gly Leu Ala

[0345] 100 105 110

[0346] ggg ggc cgc tgc atg cgc tgg ggt cct cgc gag cgc cga gcc ctt ttc 384

[0347] Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe

[0348] 115 120 125

[0349] ctg cag gcc acg cca cac cgg gac atc agc cgc aga gtt gct gcc ttc 432

[0350] Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe

[0351] 130 135 140

[0352] caa ttt gaa ctg cac gag gac caa cgt gca gaa atg tct ccc cag gcc 480

[0353] Gln Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala

[0354] 145 150 155 160

[0355] caa ggt ttt ggt gtg gat ggt gcc tgc agg ccc tgc agt gat gcc gag 528

[0356] Gln Gly Phe Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu

[0357] 165 170 175

[0358] ctc ctt ctg act gca tgc acc agt gac ttt gtg atc cat ggg acc atc 576

[0359] Leu Leu Leu Thr Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile

[0360] 180 185 190

[0361] cat ggg gtc gtc cat gac atg gag ctg caa gaa tca gtc atc act gtg 624

[0362] His Gly Val Val His Asp Met Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val

[0363] 195 200 205

[0364] gtg gcc act cgt gtc atc cgc cag aca ctg cca ctg ttc cag gaa ggg 672

[0365] Val Ala Thr Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly

[0366] 210 215 220

[0367] agc tcg gag ggc cgg ggc cag gcc tcc gtt cgt acc ttg ttg cgc tgt 720

[0368] Ser Ser Glu Gly Arg Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys

[0369] 225 230 235 240

[0370] ggt gtg cgt cct ggc cca ggc tcc ttc ctc ttc atg ggc tgg agc cga 768

[0371] Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg

[0372] 245 250 255

[0373] ttt ggc gaa gct tgg ctg ggc tgc gct ccc cgc ttc caa gag ttc agc 816

[0374] Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser

[0375] 260 265 270

[0376] cgt gtc tat tca gct gct ctc gcg gcc cac ctc aac cca tgt gag gtg 864

[0377] Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val

[0378] 275 280 285

[0379] gca ctg gac tga gagacctggg agcaagccct ggatggatct tcctctgggg 916

[0380] Ala Leu Asp

[0381] 290

[0382] atggggtgtt ggggaggggt gataggaggg tgggtgggaa gggtgtggct cagatggcat 976

[0383] cctggtaccc acagtgaggt ggtagaatac taaataacct ggatcacacc 1026

[0384] <210> 8

[0385] <211> 291

[0386] <212> PRT

[0387] <213> 褐家鼠

[0388] <400> 8

[0389] Met Leu Val Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala

[0390] 1 5 10 15

[0391] Ala Ser Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly

[0392] 20 25 30

[0393] Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp

[0394] 35 40 45

[0395] Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg

[0396] 50 55 60

[0397] Leu Thr Leu Gly Gly Ser Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys

[0398] 65 70 75 80

[0399] Leu Arg Pro Thr Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg

[0400] 85 90 95

[0401] Met Ala Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Gln Gly Leu Ala

[0402] 100 105 110

[0403] Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe

[0404] 115 120 125

[0405] Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe

[0406] 130 135 140

[0407] Gln Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala

[0408] 145 150 155 160

[0409] Gln Gly Phe Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu

[0410] 165 170 175

[0411] Leu Leu Leu Thr Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile

[0412] 180 185 190

[0413] His Gly Val Val His Asp Met Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val

[0414] 195 200 205

[0415] Val Ala Thr Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly

[0416] 210 215 220

[0417] Ser Ser Glu Gly Arg Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys

[0418] 225 230 235 240

[0419] Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg

[0420] 245 250 255

[0421] Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser

[0422] 260 265 270

[0423] Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val

[0424] 275 280 285

[0425] Ala Leu Asp

[0426] 290

[0427] <210> 9

[0428] <211> 270

[0429] <212> PRT

[0430] <213> 褐家鼠

[0431] <400> 9

[0432] Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln

[0433] 1 5 10 15

[0434] Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp Cys Thr Glu Gly Ala

[0435] 20 25 30

[0436] Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly

[0437] 35 40 45

[0438] Ser Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys Leu Arg Pro Thr Arg

[0439] 50 55 60

[0440] Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg Met Ala Gly Asn Leu

[0441] 65 70 75 80

[0442] Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Gln Gly Leu Ala Gly Gly Arg Cys Met

[0443] 85 90 95

[0444] Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro

[0445] 100 105 110

[0446] His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe Gln Phe Glu Leu His

[0447] 115 120 125

[0448] Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala Gln Gly Phe Gly Val

[0449] 130 135 140

[0450] Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Thr Ala

[0451] 145 150 155 160

[0452] Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile His Gly Val Val His

[0453] 165 170 175

[0454] Asp Met Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Ala Thr Arg Val

[0455] 180 185 190

[0456] Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly Ser Ser Glu Gly Arg

[0457] 195 200 205

[0458] Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly

[0459] 210 215 220

[0460] Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp

[0461] 225 230 235 240

[0462] Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala

[0463] 245 250 255

[0464] Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val Ala Leu Asp

[0465] 260 265 270

[0466] <210> 10

[0467] <211> 882

[0468] <212> DNA

[0469] <213> 人工序列

[0470] <220>

[0471] <223> 密码子优化的

[0472] <400> 10

[0473] atgggctttc ccgctgccgc cctgctgtgc gctctgtgct gcggactgct ggctcctgca 60

[0474] gccagagccg gctacagcga ggaacggtgc agctggcggg gcagcggcct gacccaggaa 120

[0475] cctggcagcg tcggccagct cgcactggcc tgtgcagaag gcgccgtgga gtggctgtac 180

[0476] cccgcaggcg ccctgagact gaccctgggc ggacccgacc ccagagccag acccggcatt 240

[0477] gcctgtctga ggcccgtgcg gcctttcgct ggcgcccagg tgttcgccga gagagccggc 300

[0478] ggagccctgg aactcctgct cgccgaaggc cctggtccag ccggcggaag atgcgtgaga 360

[0479] tggggcccaa gagagcggag agccctgttc ctgcaagcca ccccccacca ggacatcagc 420

[0480] agacgggtgg ccgccttcag attcgagctg cgggaggacg gtagacccga gctgccacct 480

[0481] caggcccacg gactgggagt ggacggcgcc tgcagaccct gtagcgacgc cgagctgctg 540

[0482] ctcgccgcct gcaccagcga cttcgtgatc cacggcatca tccacggcgt gacccacgac 600

[0483] gtggagctgc aggaaagcgt catcaccgtc gtcgccgcca gagtgctgag acagaccccc 660

[0484] cctctgttcc aggccggcag aagcggcgac cagggcctga ccagcatccg gacccccctg 720

[0485] agatgcggcg tgcatcccgg acccggcacc ttcctgttca tgggctggtc cagattcggc 780

[0486] gaggcccggc tgggctgcgc tccccggttc caggaattca gacgggccta cgaggccgcc 840

[0487] agggccgctc atctgcaccc ctgcgaggtg gccctgcatt ga 882

[0488] <210> 11

[0489] <211> 270

[0490] <212> PRT

[0491] <213> 人工序列

[0492] <220>

[0493] <223> 共有序列

[0494] <220>

[0495] <221> misc_feature

[0496] <222> (5)..(5)

[0497] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0498] <220>

[0499] <221> misc_feature

[0500] <222> (25)..(25)

[0501] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0502] <220>

[0503] <221> misc_feature

[0504] <222> (27)..(27)

[0505] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0506] <220>

[0507] <221> misc_feature

[0508] <222> (29)..(29)

[0509] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0510] <220>

[0511] <221> misc_feature

[0512] <222> (33)..(33)

[0513] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0514] <220>

[0515] <221> misc_feature

[0516] <222> (49)..(49)

[0517] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0518] <220>

[0519] <221> misc_feature

[0520] <222> (52)..(53)

[0521] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0522] <220>

[0523] <221> misc_feature

[0524] <222> (56)..(56)

[0525] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0526] <220>

[0527] <221> misc_feature

[0528] <222> (58)..(58)

[0529] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0530] <220>

[0531] <221> misc_feature

[0532] <222> (63)..(63)

[0533] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0534] <220>

[0535] <221> misc_feature

[0536] <222> (76)..(77)

[0537] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0538] <220>

[0539] <221> misc_feature

[0540] <222> (79)..(79)

[0541] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0542] <220>

[0543] <221> misc_feature

[0544] <222> (88)..(90)

[0545] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0546] <220>
[0547] <221> misc_feature
[0548] <222> (96)..(96)
[0549] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0550] <220>
[0551] <221> misc_feature
[0552] <222> (114)..(114)
[0553] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0554] <220>
[0555] <221> misc_feature
[0556] <222> (124)..(124)
[0557] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0558] <220>
[0559] <221> misc_feature
[0560] <222> (128)..(128)
[0561] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0562] <220>
[0563] <221> misc_feature
[0564] <222> (131)..(131)
[0565] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0566] <220>
[0567] <221> misc_feature
[0568] <222> (133)..(133)
[0569] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0570] <220>
[0571] <221> misc_feature
[0572] <222> (135)..(136)
[0573] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0574] <220>
[0575] <221> misc_feature
[0576] <222> (140)..(140)
[0577] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0578] <220>
[0579] <221> misc_feature
[0580] <222> (142)..(142)
[0581] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0582] <220>
[0583] <221> misc_feature
[0584] <222> (159)..(159)
[0585] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0586] <220>
[0587] <221> misc_feature

[0588] <222> (170)..(170)

[0589] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0590] <220>

[0591] <221> misc_feature

[0592] <222> (175)..(175)

[0593] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0594] <220>

[0595] <221> misc_feature

[0596] <222> (178)..(178)

[0597] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0598] <220>

[0599] <221> misc_feature

[0600] <222> (189)..(190)

[0601] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0602] <220>

[0603] <221> misc_feature

[0604] <222> (193)..(193)

[0605] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0606] <220>

[0607] <221> misc_feature

[0608] <222> (197)..(197)

[0609] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0610] <220>

[0611] <221> misc_feature

[0612] <222> (201)..(202)

[0613] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0614] <220>

[0615] <221> misc_feature

[0616] <222> (204)..(204)

[0617] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0618] <220>

[0619] <221> misc_feature

[0620] <222> (206)..(208)

[0621] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0622] <220>

[0623] <221> misc_feature

[0624] <222> (210)..(211)

[0625] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0626] <220>

[0627] <221> misc_feature

[0628] <222> (213)..(213)

[0629] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0630] <220>
[0631] <221> misc_feature
[0632] <222> (216)..(216)
[0633] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0634] <220>
[0635] <221> misc_feature
[0636] <222> (222)..(222)
[0637] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0638] <220>
[0639] <221> misc_feature
[0640] <222> (227)..(227)
[0641] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0642] <220>
[0643] <221> misc_feature
[0644] <222> (240)..(240)
[0645] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0646] <220>
[0647] <221> misc_feature
[0648] <222> (251)..(251)
[0649] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0650] <220>
[0651] <221> misc_feature
[0652] <222> (253)..(253)
[0653] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0654] <220>
[0655] <221> misc_feature
[0656] <222> (255)..(255)
[0657] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0658] <220>
[0659] <221> misc_feature
[0660] <222> (258)..(260)
[0661] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0662] <220>
[0663] <221> misc_feature
[0664] <222> (263)..(263)
[0665] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0666] <220>
[0667] <221> misc_feature
[0668] <222> (267)..(267)
[0669] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0670] <220>
[0671] <221> misc_feature

[0672] <222> (270)..(270)

[0673] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0674] <400> 11

[0675] Gly Tyr Ser Glu Xaa Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln

[0676] 1 5 10 15

[0677] Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Glu Gly Ala

[0678] 20 25 30

[0679] Xaa Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly

[0680] 35 40 45

[0681] Xaa Asp Pro Xaa Xaa Arg Pro Xaa Ile Xaa Cys Leu Arg Pro Xaa Arg

[0682] 50 55 60

[0683] Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg Xaa Xaa Gly Xaa Leu

[0684] 65 70 75 80

[0685] Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Xaa Xaa Xaa Ala Gly Gly Arg Cys Xaa

[0686] 85 90 95

[0687] Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro

[0688] 100 105 110

[0689] His Xaa Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe Xaa Phe Glu Leu Xaa

[0690] 115 120 125

[0691] Glu Asp Xaa Arg Xaa Glu Xaa Xaa Pro Gln Ala Xaa Gly Xaa Gly Val

[0692] 130 135 140

[0693] Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Xaa Ala

[0694] 145 150 155 160

[0695] Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Xaa Ile His Gly Val Xaa His

[0696] 165 170 175

[0697] Asp Xaa Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Xaa Xaa Arg Val

[0698] 180 185 190

[0699] Xaa Arg Gln Thr Xaa Pro Leu Phe Xaa Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa

[0700] 195 200 205

[0701] Gly Xaa Xaa Ser Xaa Arg Thr Xaa Leu Arg Cys Gly Val Xaa Pro Gly

[0702] 210 215 220

[0703] Pro Gly Xaa Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Xaa

[0704] 225 230 235 240

[0705] Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Xaa Arg Xaa Tyr Xaa Ala

[0706] 245 250 255

[0707] Ala Xaa Xaa Xaa His Leu Xaa Pro Cys Glu Xaa Ala Leu Xaa

[0708] 260 265 270

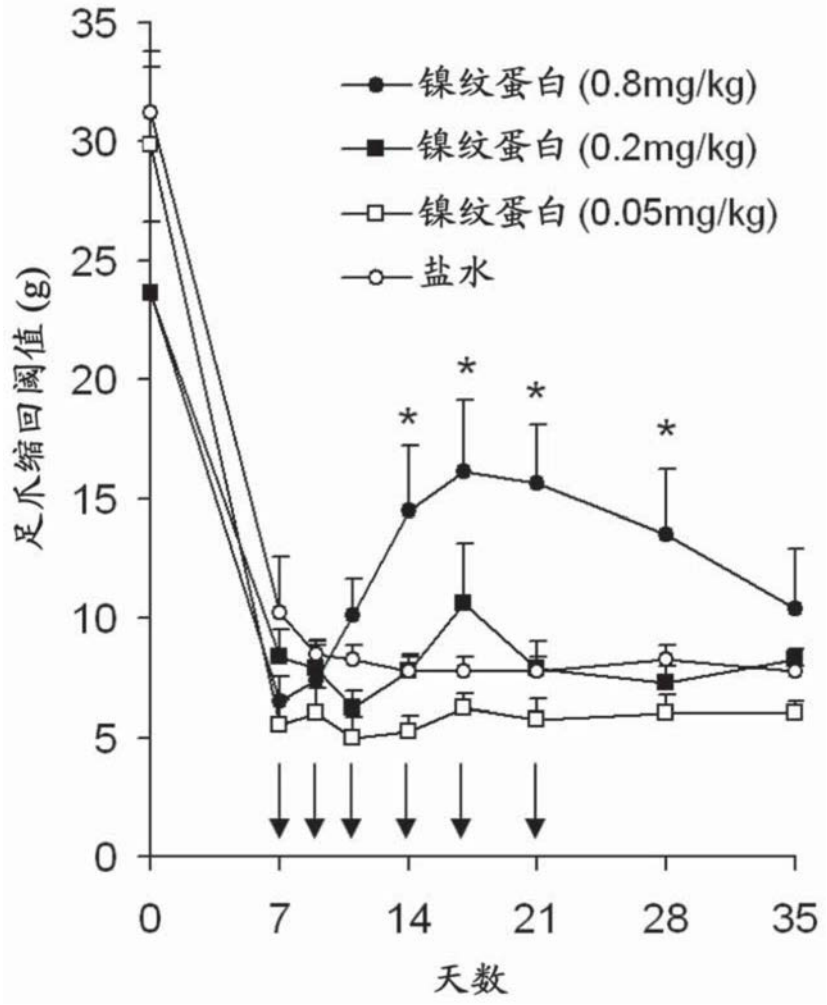

镍纹蛋白 (0.8mg/kg)
镍纹蛋白 (0.2mg/kg)
镍纹蛋白 (0.05mg/kg)
盐水
足爪缩回阈值 (g)
天数
0
5
10
15
20
25
30
35
0
7
14
21
28
35
*
*
*
*

图1

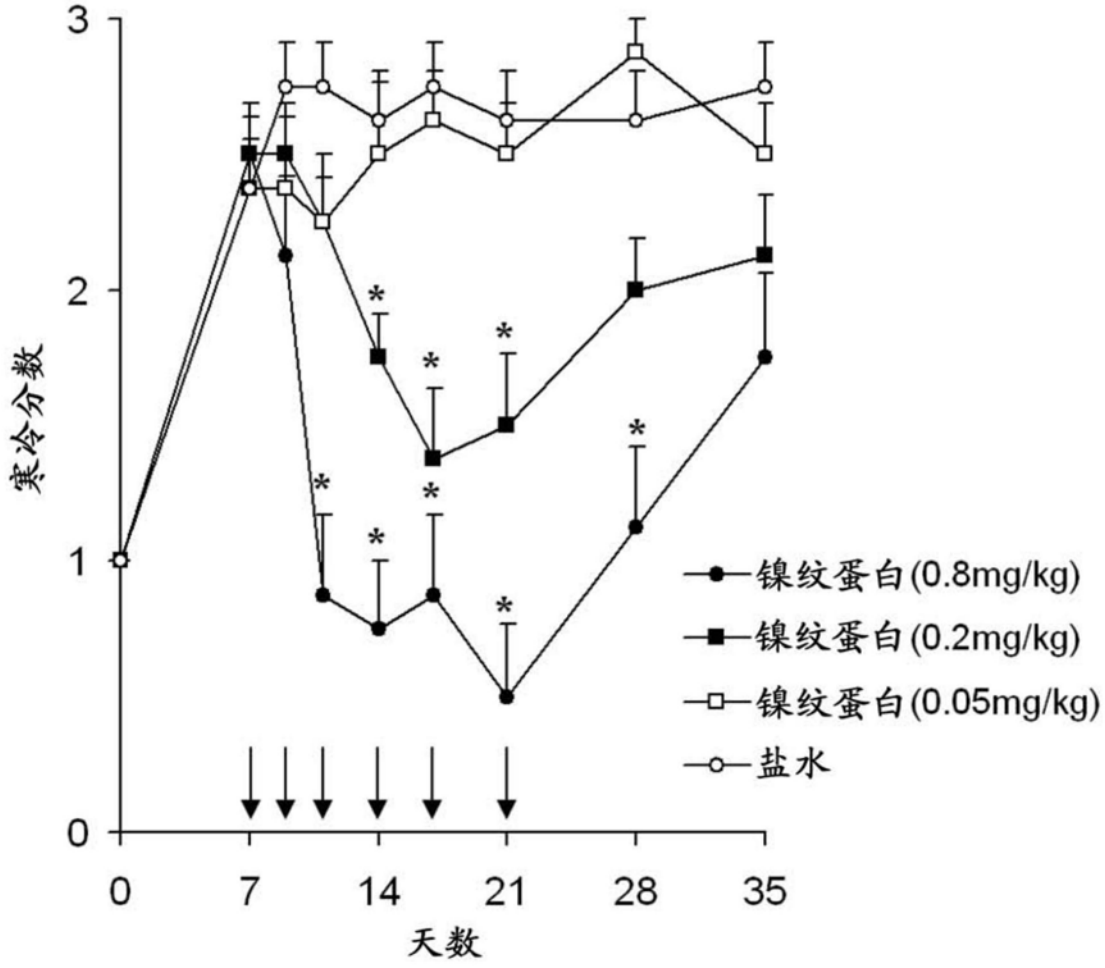

寒冷分数
天数
0
1
2
3
0
7
14
21
28
35
镍纹蛋白(0.8mg/kg)
镍纹蛋白(0.2mg/kg)
镍纹蛋白(0.05mg/kg)
盐水

图2

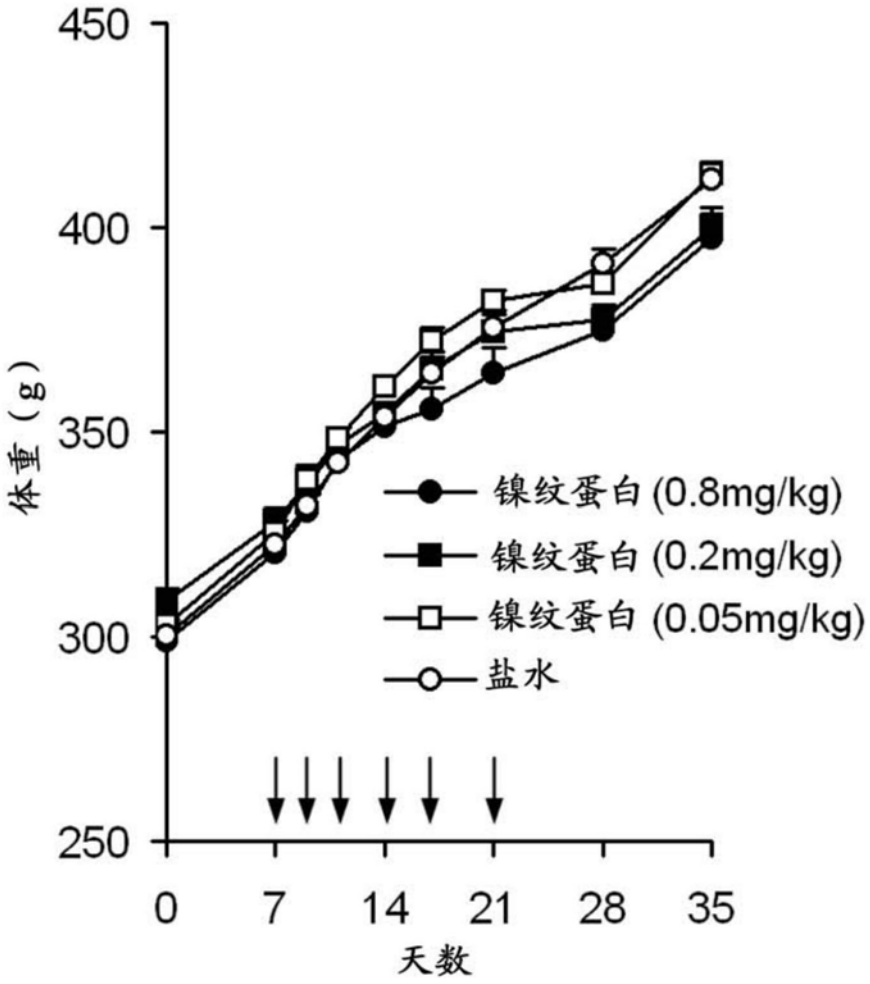

450
400
350
300
250
体重（g）
0
7
14
21
28
35
天数
镍纹蛋白 (0.8mg/kg)
镍纹蛋白 (0.2mg/kg)
镍纹蛋白 (0.05mg/kg)
盐水

图3

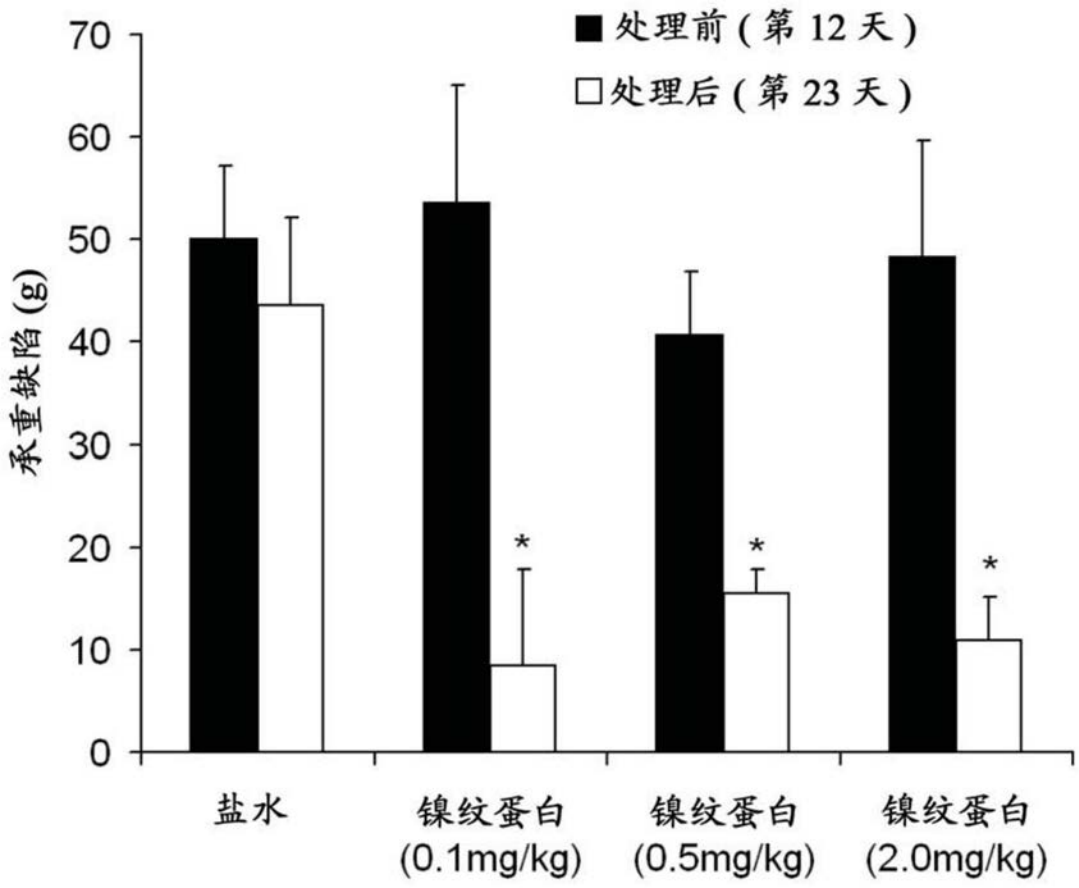

处理前(第12天)
处理后(第23天)
承重缺陷(g)
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
盐水
镍纹蛋白
(0.1mg/kg)
镍纹蛋白
(0.5mg/kg)
镍纹蛋白
(2.0mg/kg)

图4

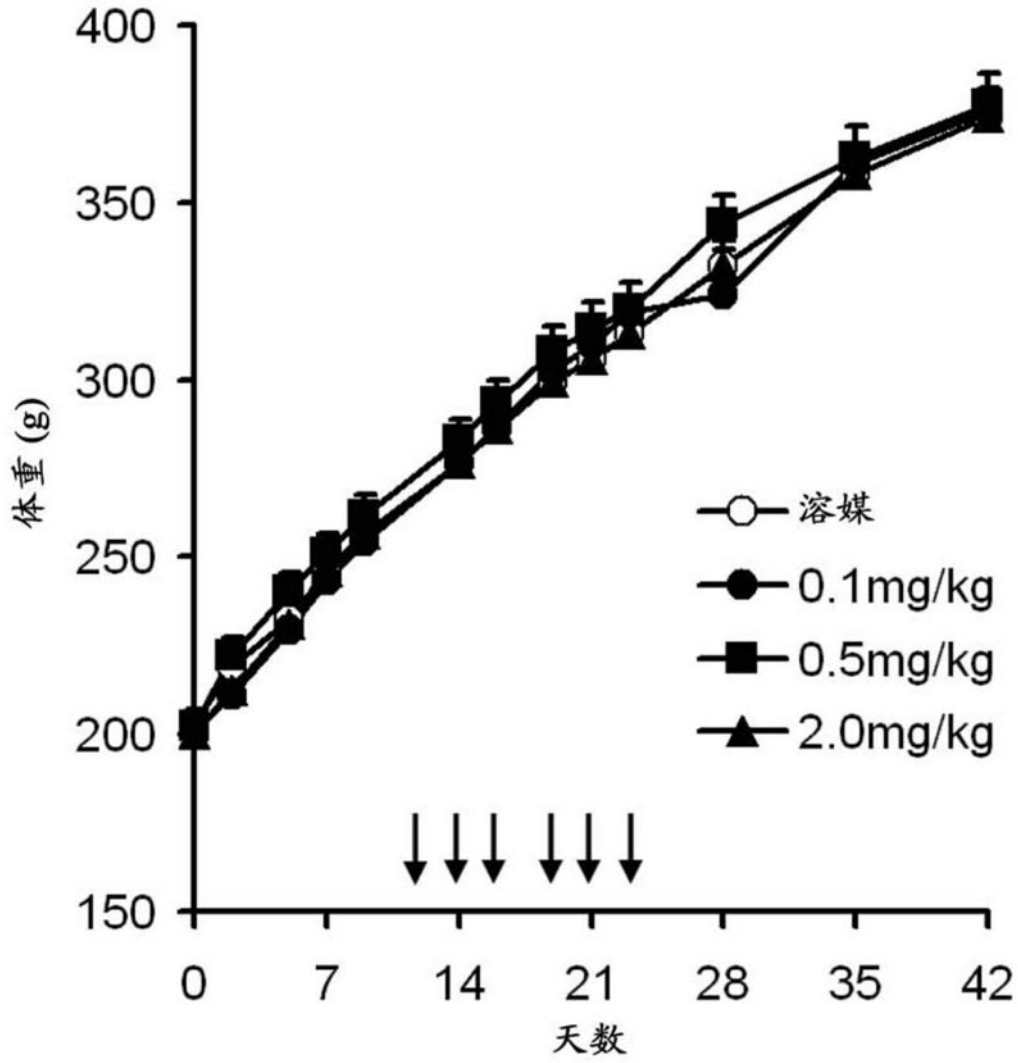

400
350
300
250
200
150
体重(g)
0
7
14
21
28
35
42
天数
溶媒
0.1mg/kg
0.5mg/kg
2.0mg/kg

图5

```
小鼠    --MLVATLLCALCCGLLAASAHAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQLTLDCTEGAIEWLY 58
大鼠    --MLVAALLCALCCGLLAASARAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQLTLDCTEGAIEWLY 58
人      MGFPAAALLCALCCGLLAPAARAGYSEERCSWRGSGLTQEPGSVGQLALACAEGAVEWLY 60
          : .*:***********.:*:*****:*******************:* *:***:****

小鼠    PAGALRLTLGGPDPGTRPSIVCLRPERPFAGAQVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRCMR 118
大鼠    PAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCLRPTRPFAGAQVFAERMAGNLELLLAEGQGLAGGRCMR 118
人      PAGALRLTLGGPDPRARPGIACLRPVRPFAGAQVFAERAGGALELLLAEGPGPAGGRCVR 120
        ***********.** :**.*.**** ************  * ******** . *****:*

小鼠    WGPRERRALFLQATPHRDISRRVAAFRFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELL 178
大鼠    WGPRERRALFLQATPHRDISRRVAAFQFELHEDQRAEMSPQAQGFGVDGACRPCSDAELL 178
人      WGPRERRALFLQATPHQDISRRVAAFRFELREDGRPELPPQAHGLGVDGACRPCSDAELL 180
        ***************:*********:***:** *.*:.***:*:***************

小鼠    LAACTSDFVIHGTIHGVAHDTELQESVITVVVARVIRQTLPLFKEGSSEGQGRASIRTLL 238
大鼠    LTACTSDFVIHGTIHGVVHDMELQESVITVVATRVIRQTLPLFQEGSSEGRGQASVRTLL 238
人      LAACTSDFVIHGIIHGVTHDVELQESVITVVAARVLRQTPPLFQAGRSGDQGLTSIRTPL 240
        *:********** ****.** **********.:**:*** ***: * * .:* :*:** *

小鼠    RCGVRPGPGSFLFMGWSRFGEAWLGCAPRFQEFSRVYSAALTTHLNPCEMALD 291
大鼠    RCGVRPGPGSFLFMGWSRFGEAWLGCAPRFQEFSRVYSAALAAHLNPCEVALD 291
人      RCGVHPGPGTFLFMGWSRFGEARLGCAPRFQEFRRAYEAARAAHLHPCEVALH 293
        ****:****:************ ********** *.*.** ::**:***:**.
```

图6a

```
小鼠    GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQLTLDCTEGAIEWLYPAGALRLTLGGPDPGTRPSIVCL 60
大鼠    GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSVGQLTLDCTEGAIEWLYPAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCL 60
人      GYSEERCSWRGSGLTQEPGSVGQLALACAEGAVEWLYPAGALRLTLGGPDPRARPGIACL 60
        ****:*******************:* *:***:***************.** :**.*.**

小鼠    RPERPFAGAQVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRCMRWGPRERRALFLQATPHRDISRRV 120
大鼠    RPTRPFAGAQVFAERMAGNLELLLAEGQGLAGGRCMRWGPRERRALFLQATPHRDISRRV 120
人      RPVRPFAGAQVFAERAGGALELLLAEGPGPAGGRCVRWGPRERRALFLQATPHQDISRRV 120
        ** ************  * ******** . *****:*****************:******

小鼠    AAFRFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELLLAACTSDFVIHGTIHGVAHDTEL 180
大鼠    AAFQFELHEDQRAEMSPQAQGFGVDGACRPCSDAELLLTACTSDFVIHGTIHGVVHDMEL 180
人      AAFRFELREDGRPELPPQAHGLGVDGACRPCSDAELLLAACTSDFVIHGIIHGVTHDVEL 180
        ***:***:** *.*:.***:*:****************:********** ****.** **

小鼠    QESVITVVVARVIRQTLPLFKEGSSEGQGRASIRTLLRCGVRPGPGSFLFMGWSRFGEAW 240
大鼠    QESVITVVATRVIRQTLPLFQEGSSEGRGQASVRTLLRCGVRPGPGSFLFMGWSRFGEAW 240
人      QESVITVVAARVLRQTPPLFQAGRSGDQGLTSIRTPLRCGVHPGPGTFLFMGWSRFGEAR 240
        ********.:**:*** ***: * * .:* :*:** *****:****:************

小鼠    LGCAPRFQEFSRVYSAALTTHLNPCEMALD 270
大鼠    LGCAPRFQEFSRVYSAALAAHLNPCEVALD 270
人      LGCAPRFQEFRRAYEAARAAHLHPCEVALH 270
        ********** *.*.** ::**:***:**.
```

图6b

```
共有        GYSEXRCSWRGSGLTQEPGSVGQLXLXCXEGAXEWLYPAGALRLTLGGXDPXXRPXIXCL 60
共有        RPXRPFAGAQVFAERXXGXLELLLAEGXXXAGGRCXRWGPRERRALFLQATPHXDISRRV 120
共有        AAFXFELXEDXRXEXXPQAXGXGVDGACRPCSDAELLLXACTSDFVIHGXIHGVXHDXEL 180
共有        QESVITVVXXRVXRQTXPLFXXGXSXXXGXXSXRTXLRCGVXPGPGXFLFMGWSRFGEAX 240
共有        LGCAPRFQEFXRXYXAAXXXHLXPCEXALX 270
```

图6c

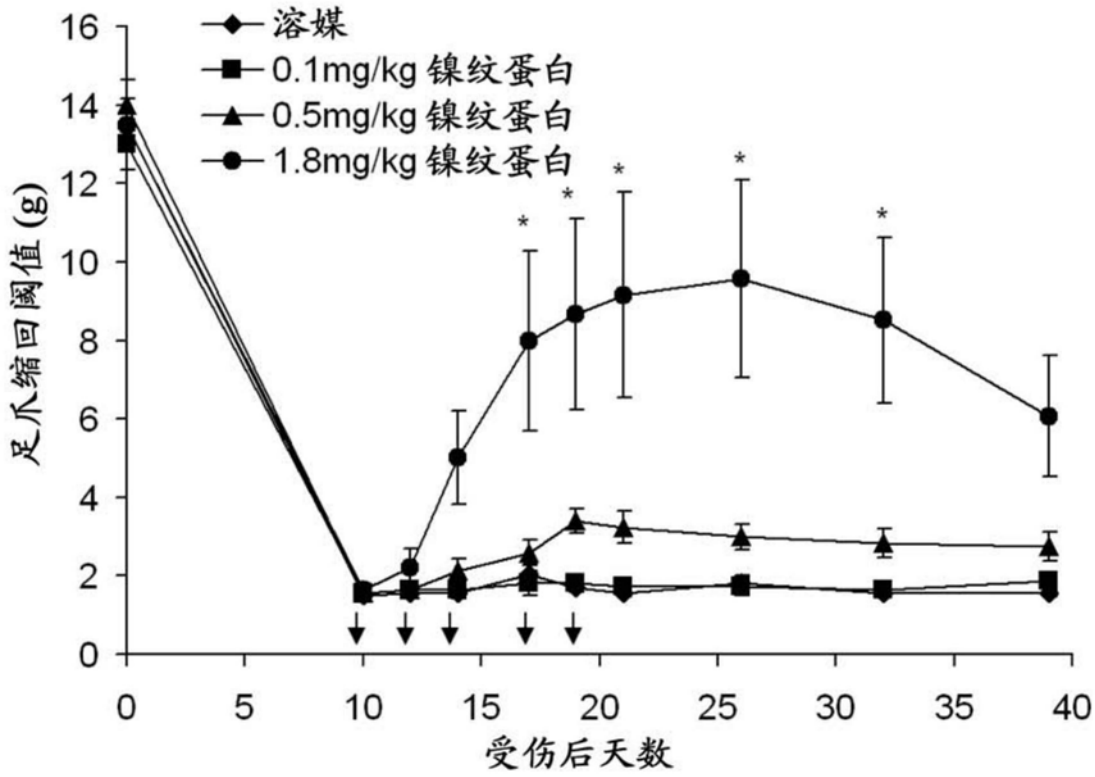


图7

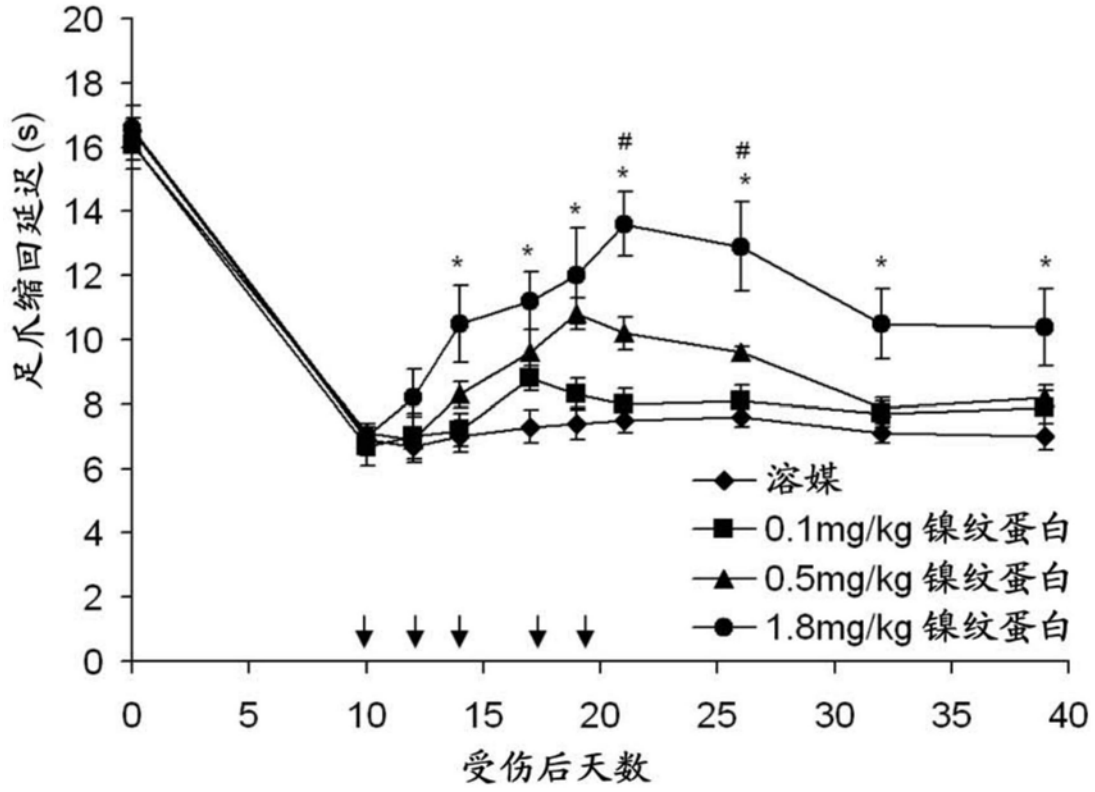

足爪缩回延迟(s)
受伤后天数
溶媒
0.1mg/kg 镍纹蛋白
0.5mg/kg 镍纹蛋白
1.8mg/kg 镍纹蛋白

图8

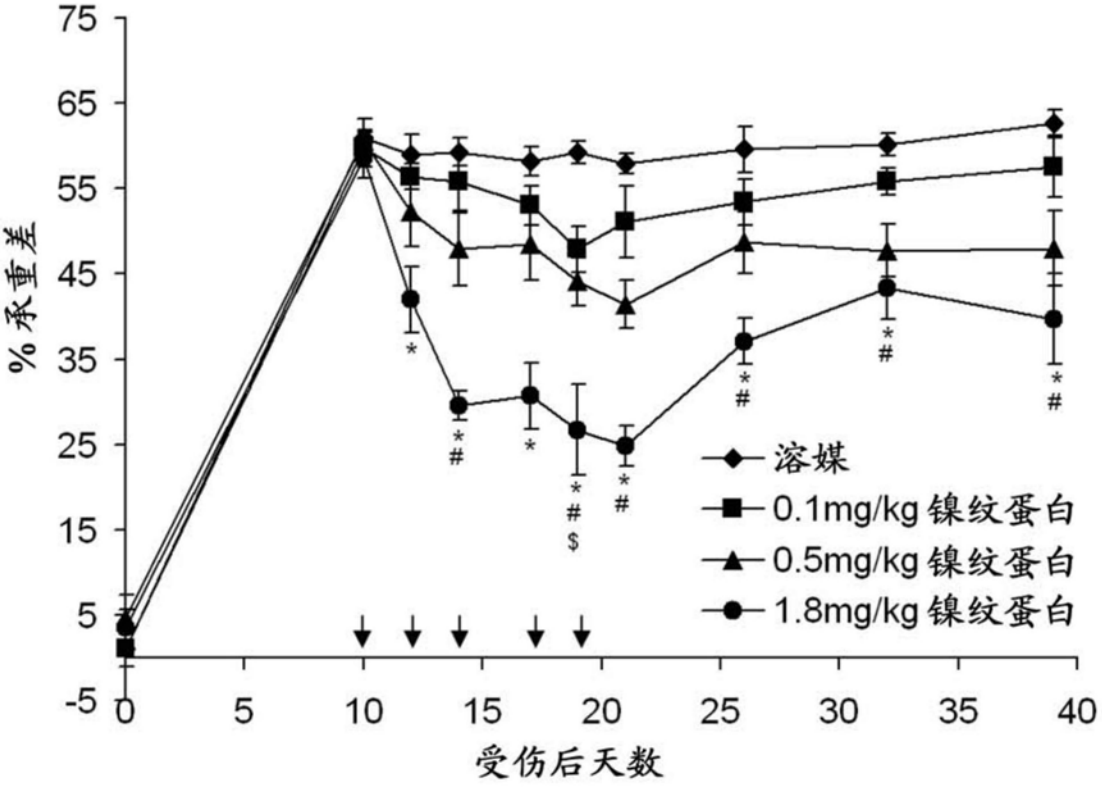

% 承重差
受伤后天数
溶媒
0.1mg/kg 镍纹蛋白
0.5mg/kg 镍纹蛋白
1.8mg/kg 镍纹蛋白

图9

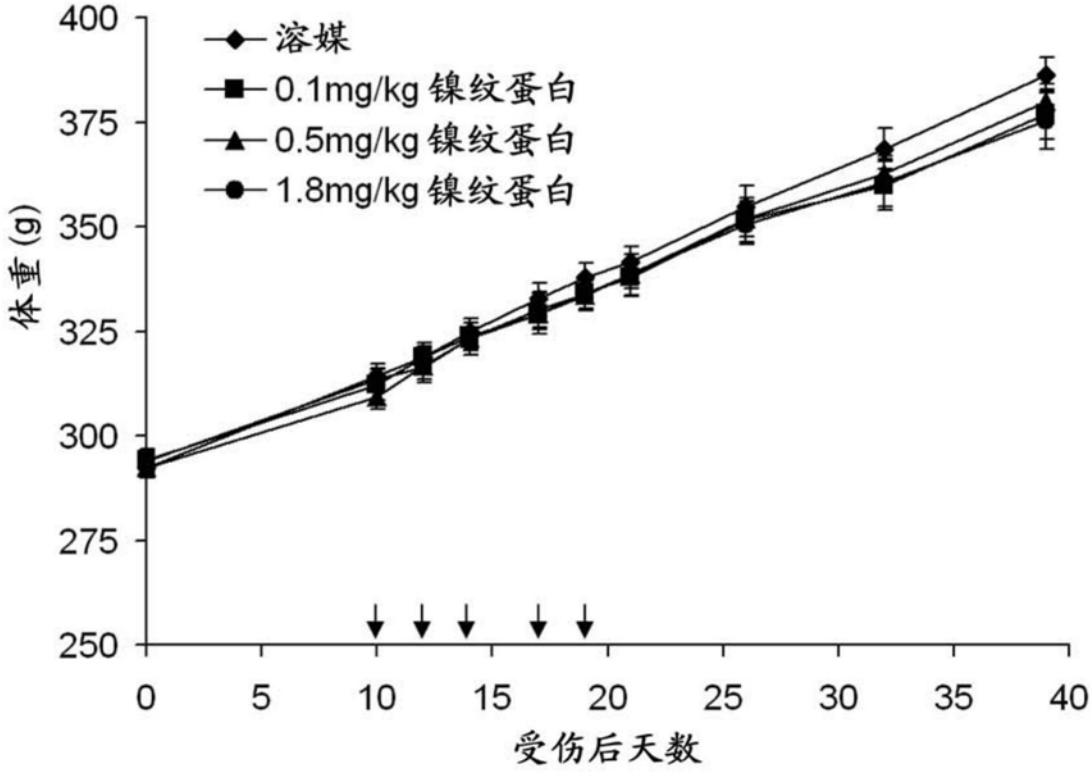

溶媒
0.1mg/kg 镍纹蛋白
0.5mg/kg 镍纹蛋白
1.8mg/kg 镍纹蛋白
体重(g)
受伤后天数
400
375
350
325
300
275
250
0
5
10
15
20
25
30
35
40

图10

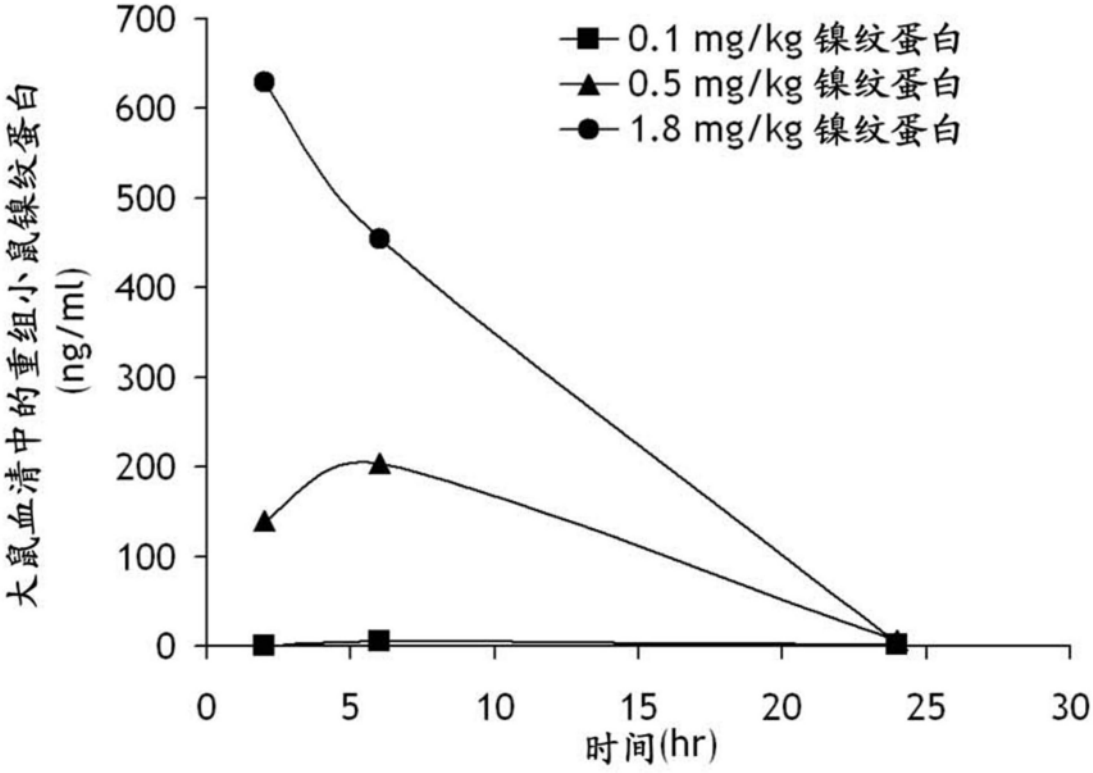

0.1 mg/kg 镍纹蛋白
0.5 mg/kg 镍纹蛋白
1.8 mg/kg 镍纹蛋白
大鼠血清中的重组小鼠镍纹蛋白 (ng/ml)
时间(hr)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30

图11

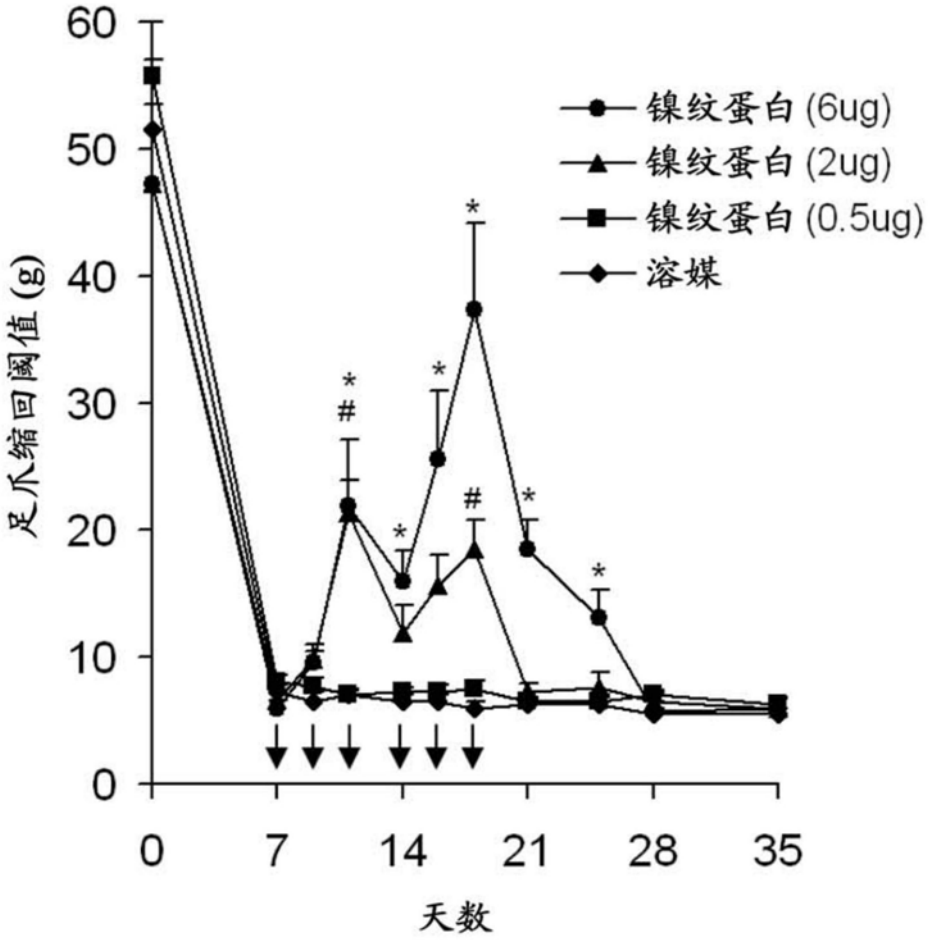

镍纹蛋白 (6ug)
镍纹蛋白 (2ug)
镍纹蛋白 (0.5ug)
溶媒
足爪缩回阈值 (g)
天数
0
10
20
30
40
50
60
0
7
14
21
28
35
*
#

图12

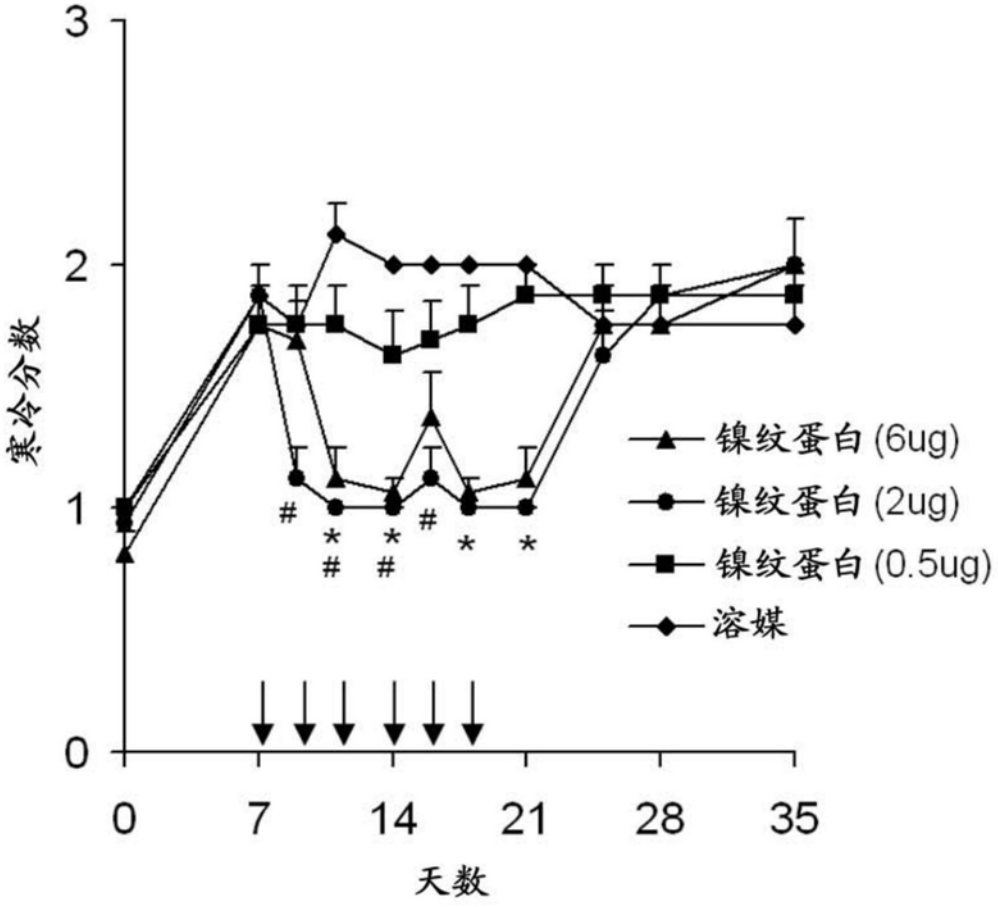


图13