(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 3 月 2 日 (02.03.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/025193 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61K 38/18* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/114516

(22) 国际申请日: 2022 年 8 月 24 日 (24.08.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110981721.5 2021年8月25日 (25.08.2021) CN

(71) 申请人: 上海交通大学医学院(SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) [CN/CN]; 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。 上海蓝鹊生物医药有限公司(SHANGHAI RNACURE BIOPHARMA CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市宝山区长江南路99弄2号103室-287, Shanghai 201906 (CN)。

(72) 发明人: 徐颖洁(XU, Yingjie); 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。 于翔(YU, Xiang); 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。 徐玮(XU, Wei); 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。 杨文(YANG, Wen); 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。 杨峥(YANG, Zheng); 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。 张宇(ZHANG, Yu); 中国上海市黄浦区重庆南路280号西区七号楼401, Shanghai 200025 (CN)。

(74) 代理人: 上海巅石知识产权代理事务所（普通合伙）(SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号103室/游琦;张琤, Shanghai 201210 (CN)。

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

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

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

WO 2023/025193 A1

(54) **Title:** RECOMBINANT PROTEIN OF NERVE GROWTH FACTOR MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 神经生长因子突变体重组蛋白及其应用

(57) **Abstract:** Provided is a recombinant protein, which contains a nerve growth factor (NGF) protein variant and a heterologous signal peptide linked to the NGF protein variant. Further provided are a combination containing an mRNA encoding the recombinant protein and a delivery vector, and the use thereof in the treatment of toxic/hereditary/metabolic peripheral neuropathy, nerve regeneration repair, and/or central nervous system degenerative diseases.

(57) 摘要: 提供一种重组蛋白，其包含神经生长因子(NGF)蛋白变体以及与所述NGF蛋白变体连接的异源信号肽。还提供了包含编码所述重组蛋白的mRNA和递送载体的组合，以及该组合在治疗中毒性/遗传性/代谢性周围神经病变、神经再生修复和/或中枢神经系统退行性疾病中的应用。

神经生长因子突变体重组蛋白及其应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种神经生长因子突变体重组蛋白，包含编码该重组蛋白的 mRNA，以及它们在治疗神经系统疾病中的应用。

背景技术

神经生长因子（Nerve growth factor，NGF）是具有神经元营养功能的生长调节因子，在维持中枢基底前脑胆碱能神经元（basal forebrain cholinergic neurons，BFCNs）和外周伤害性感觉神经元的发育和功能分化中起重要作用，对成熟的中枢和周围神经元正常功能的维持、神经损伤的自我保护与修复也至关重要。NGF 作为一种强有力的神经营养因子，在过去的 20-30 年成为多种中枢和周围神经系统疾病药物治疗的热点。

在临床研究过程中，NGF 的应用却导致了剂量依赖型的疼痛副作用。阿尔茨海默症（Alzheimer's disease，AD）是一种以认知功能障碍和记忆力减退为主要临床表现的进行性和致命性的中枢神经系统退行性疾病。临床实验中大剂量 NGF 对 AD 患者进行治疗时发现，虽然 AD 患者的认知能力以及大脑皮质代谢均得到明显改善，但是痛楚与体重减少等不良反应的出现则抵消了其治疗效果，最终宣告临床试验失败。在使用 NGF 治疗糖尿病神经病和 HIV 周围神经病时也发现相同的现象。这是由于 NGF 是导致疼痛和痛觉过敏的重要中间介质之一。TrkA 和 p75NTR 信号通路均介导了 NGF 的致痛功能，许多研究表明 TrkA 和 p75NTR 信号通路存在相互影响。因此，丢失任一信号通路（TrkA 或 p75NTR）或打破 TrkA 和 p75NTR 信号通路之间的平衡都将会对 NGF 的致痛作用产生影响。

“无痛性”神经生长因子的发现为 NGF 的临床应用带来了极大的希望。继发于 NGF^{R100W} 的遗传性感觉和自主神经病 V 型（hereditary sensory and autonomous neuropathy type V, HSAN V），是在一北部瑞典家庭中发现的成熟 NGF 蛋白第 100 位精氨酸替换为色氨酸，患者痛觉和温度觉丧失，但智力正常，提示 NGF^{R100W} 可能选择性的丢失介导痛觉的功能，而保留神经营养的功能。NGF^{R100W} 的发现为研究 NGF 神经营养和介导痛觉的功能提供了重要的依据，其生物学特性和相关作用机制的研究可能为解决 NGF 用于中毒性/遗传性/代谢性周围神经病变、神经再生修复和/或中枢神经系统退行性疾病等的治疗寻求新的突破点。

但是，HSAN V 的敲入小鼠模型证明表达 NGF^{R100W} 突变体的小鼠通常在大约 2 个月大时完全丧失了痛觉，并且经常无法存活到成年。并且全长的 NGF^{R100W} 突变体蛋白会影响其成熟体的切割，从而使成熟 NGF^{R100W} 无法正常外泌到胞外行使其神经滋养功能。因此，目前仍未

有获得 NGF^{R100W} 突变体蛋白的简便高效的方法，极大地限制了应用于 NGF^{R100W} 突变体蛋白在治疗神经疾病的中的应用。

发明内容

本申请提供了一种重组蛋白，所述重组蛋白包含神经生长因子（NGF）蛋白变体以及与所述 NGF 蛋白变体连接的异源信号肽，所述重组蛋白具有以下至少一种特点：（1）与野生型 NGF 蛋白相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少；（2）且表达量和/或分泌量增加至少 50%；（3）具有可观的表达量和/或分泌量，例如，可以达到野生型 NGF 蛋白的至少 50%以上；（4）降低痛觉；（5）延长的半衰期，以及（6）促进损伤神经细胞的修复及再生。本申请还提供了包含编码所述 NGF 蛋白或 NGF 蛋白变体的 mRNA 和递送载体的组合物。本申请的重组蛋白和组合物能够用于治疗周围神经病变及神经变性病等神经系统病变，促进神经修复及再生。例如，本申请的重组蛋白和组合物能够用于治疗中毒性/遗传性/代谢性周围神经病变、神经再生修复和/或中枢神经系统退行性疾病（例如，糖尿病周围神经病变、药物相关性周围神经病变、遗传性运动感觉神经病、周围神经外伤后修复、外伤性视神经炎和/或阿尔茨海默症）。

一方面，本申请提供了一种重组蛋白，所述重组蛋白包含神经生长因子（NGF）蛋白变体以及与所述 NGF 蛋白变体连接的异源信号肽，其中，与野生型 NGF 蛋白相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少至少约 50%，

与 SEQ ID NO: 29 所示的信号肽相比，所述异源信号肽使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量增加至少约 50%。

在某些实施方式中，所述野生型 NGF 蛋白包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自脑源性神经营养因子（BDNF），神经营养因子-3（NT-3）和/或神经营养因子-4（NT-4）。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自 Gp67、Gp64、蜂毒素（HBM）、白蛋白、IL-2、天青素前蛋白、小鼠 IgK、免疫球蛋白重链和/或胱抑素-S 前体。

在某些实施方式中，所述重组蛋白还包括前导肽。

在某些实施方式中，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白依次包括所述异源信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。

在某些实施方式中，所述重组蛋白还包括免疫球蛋白的 Fc 区。

在某些实施方式中，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白依次包括所述异源信号肽、所述前导

肽、所述 NGF 蛋白变体和所述 Fc 区。

另一方面，本申请提供了一种分离的核酸分子，所述分离的核酸分子编码所述的重组蛋白。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子包括 DNA 和/或 RNA。在某些实施方式中，所述分离的核酸分子为 DNA。在某些实施方式中，所述分离的核酸分子为 RNA。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子在选自下组的一个或多个位置处包含修饰：5’帽、5’非翻译区、开放阅读框、3’非翻译区和 poly A 尾。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子包含至少一种经修饰的核苷酸。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子包含的经修饰的核苷酸包含一种或多种选自下组的核苷酸：N1-甲基假尿苷三磷酸（N1-Methylpseudo-UTP）、假尿苷三磷酸（pseudo-UTP）、5-甲氧基尿苷三磷酸（5-Methoxy-UDP）和 5-甲基胞苷三磷酸（5-Methyl-CTP）。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子是密码子优化的。

另一方面，本申请提供一种组合物，所述组合物包含(a) mRNA，所述 mRNA 包含编码神经生长因子（NGF）蛋白或其变体的多核苷酸，和(b)递送载体。

在某些实施方式中，所述 NGF 蛋白包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，与 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少至少约 50%。

在某些实施方式中，所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 mRNA 包含编码异源信号肽的多核苷酸，与 SEQ ID NO: 29 所示的信号肽相比，所述异源信号肽使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量增加至少约 50%。

在某些实施方式中，所述异源信号肽能够使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量达到野生型 NGF 蛋白的 50%以上。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自脑源性神经营养因子（BDNF），神经营养因子-3（NT-3）和/或神经营养因子-4（NT-4）。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自 Gp67、Gp64、蜂毒素（HBM）、白蛋白、IL-2、天青素前蛋白、小鼠 IgK、免疫球蛋白重链和/或胱抑素-S 前体。

在某些实施方式中，所述 mRNA 还包括编码前导肽的多核苷酸。

在某些实施方式中，自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括所述编码异源信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和所述编码 NGF 蛋白或其变体的多核苷酸。

在某些实施方式中，自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 IgK 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸。

在某些实施方式中，自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 BDNF 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述其中所述 mRNA 还包含编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

在某些实施方式中，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括所述编码异源信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸、所述编码 NGF 蛋白变体的多核苷酸和所述编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

在某些实施方式中，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 IgK 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸、编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸和所述编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述 mRNA 编码包含 SEQ ID NO: 54-55 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 mRNA 在选自下组的一个或多个位置处包含修饰：5’帽、5’非翻译区、开放阅读框、3’非翻译区和 poly A 尾。

在某些实施方式中，所述 mRNA 包含至少一种经修饰的核苷酸。

在某些实施方式中，所述 mRNA 包含的经修饰的核苷酸包含一种或多种选自下组的核苷酸：N1-甲基假尿苷三磷酸（N1-Methylpseudo-UTP）、假尿苷三磷酸（pseudo-UTP）、5-甲氧基尿苷三磷酸（5-Methoxy-UDP）和 5-甲基胞苷三磷酸（5-Methyl-CTP）。

在某些实施方式中，所述 mRNA 是密码子优化的。

在某些实施方式中，所述 mRNA 包含如 SEQ ID NO: 22-28 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列。在某些实施方式中，所述 mRNA 包含如 SEQ ID NO: 23 和 27 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述递送载体包括脂质体。

在某些实施方式中，所述递送载体包括脂质纳米颗粒（LNP）。

在某些实施方式中，所述递送载体包括阳离子脂质。

在某些实施方式中，所述阳离子脂质的摩尔比为约 45%至约 55%。

在某些实施方式中，所述阳离子脂质 SM102 和 DLin-MC3-DMA。

在某些实施方式中，所述递送载体包括非阳离子脂质。

在某些实施方式中，所述非阳离子脂质包括磷脂和/或脂质缀合物。

在某些实施方式中，所述磷脂的摩尔比为约 35%至约 40%。

在某些实施方式中，所述磷脂包括二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）。

在某些实施方式中，所述脂质缀合物包括聚乙二醇修饰的脂分子。

在某些实施方式中，在所述递送载体中，其中所述脂质缀合物的摩尔比为约 1%至约 2%。

在某些实施方式中，所述聚乙二醇修饰的脂分子包括 PEG2000-DMG。

在某些实施方式中，所述递送载体包括胆固醇。

在某些实施方式中，在所述递送载体中，其中所述胆固醇的摩尔比为约 8%至约 12%。

在某些实施方式中，所述递送载体包含阳离子脂质、胆固醇、磷脂和脂质缀合物，且所述阳离子脂质、胆固醇、磷脂和脂质缀合物的质量比为 50:10:38.5:1.5。

在某些实施方式中，所述递送载体包含 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 和 PEG2000-DMPE，且所述 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 和 PEG2000-DMPE 的质量比为 50:10:38.5:1.5。

在某些实施方式中，所述递送载体的直径为约 60nm 至约 500nm。

在某些实施方式中，所述递送载体的直径为约 80nm 至约 200nm。

在某些实施方式中，所述 mRNA 包载在所述递送载体中。

另一方面，本申请提供了一种载体，所述载体包含所述的核酸分子。

另一方面，本申请提供了一种细胞，所述细胞包含本申请所述的核酸分子，和/或所述的载体，或其表达本申请所述的重组蛋白。

另一方面，本申请提供了一种制备所述的重组蛋白的方法，所述方法包括在使得所述的重组蛋白表达的条件下，培养所述的细胞。

另一方面，本申请提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体和/或所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

另一方面，本申请提供了一种试剂盒或给药装置，所述试剂盒或给药装置包含所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物。

另一方面，本申请提供了一种所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于缓解、预防和/或治疗中枢和/或周围神经系统疾病。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉

及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下：

图 1A 显示的是 NGF^{R100W} 重组蛋白的多种组成。

图 1B 显示的是不同 NGF^{R100W} 重组蛋白在 293T 细胞中的表达情况。

图 1C 显示的是包含不同核苷酸修饰的 IGK19-NGFmut mRNA 的表达情况。

图 1D 显示的是 NGF 和 NGF^{R100W} 重组蛋白 mRNA 在 PC12 细胞中表达，并促进 PC12 细胞分化的荧光显微镜观察结果。

图 1E 显示的是 NGF 和 NGF^{R100W} 重组蛋白 mRNA 促进 PC12 细胞分化的电子显微镜观察结果。

图 1F 至图 1G 显示的是成熟 NGF 蛋白和成熟 NGF^{R100W} 蛋白在细胞裂解液和细胞上清液中的含量检测结果。

图 1H 至图 1I 显示的是成熟 NGF 蛋白和成熟 NGF^{R100W} 蛋白在细胞上清液中的含量检测结果。

图 1J 显示的是 NGF^{R100W} 重组蛋白的多种组成。

图 2 显示的是 mRNA-LNP 的组装和体内递送。

图 3A 显示的是 NGF 和 NGF^{R100W} 重组蛋白 mRNA 纳米粒径分布。

图 3B 显示的是 NGF 和 NGF^{R100W} 重组蛋白 mRNA 在 293T 细胞的表达情况。

图 3C 显示的是 IGK19-NGFmut mRNA LNP 小鼠体内表达定位。

图 4A 显示的是表达 NGF 与 IGK19-NGFmut 对小鼠热痛痛阈的影响。

图 4B 显示的是表达 NGF 与 IGK19-NGFmut 对小鼠机械痛痛阈的影响。

图 5A 显示的是表达 IGK19-NGFmut 对小鼠周围神经损伤修复的实验流程。

图 5B 显示的是注射 paclitaxel 对小鼠热痛以及机械痛痛阈的影响。

图 5C 显示的是表达 IGK19-NGFmut 对小鼠受损外周神经的修复情况。

图 5D 显示的是表达 IGK19-NGFmut 对外周神经受损小鼠热痛以及机械痛痛阈的影响。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“神经生长因子（NGF）”，通常是指在多种神经元的生长和存活中起作用的分泌蛋白。如本文所用的，术语 NGF 不限于人 NGF，并且包含人 NGF 的所有物种直向同源物。术语“NGF”涵盖 NGF 的前体形式（pro-form）、NGF 前体（proNGF）、全长 NGF、以及由细胞内过程产生的任何形式的 NGF。该术语还涵盖天然存在的 NGF 的变体，例如剪接变体、等位基因变体和同种型。

NGF 存在于一个由 3 个蛋白 α-NGF、β-NGF 和 γ-NGF 组成的约为 130-kDa 的复合体中，这种 NGF 也被称为 proNGF（NGF 前体）。proNGF 也而被称为未成熟的 NGF。该复合物的 γ 亚基起丝氨酸蛋白酶的作用，能裂解 β 亚基的 n 端，从而激活该蛋白，生成具有功能的 NGF，即 β-NGF。NGF 能结合两个受体：p75 神经营养蛋白受体（p75NTR）和 TrkA，其是一种跨膜酪氨酸激酶。NGF 是经过充分验证的针对疼痛的靶标，已知其介导伤害性感受器的致敏作用。人的全长 NGF 的氨基酸序列可参见 Genbank 登录号 NP_002497.2 或 UniProtKB 登录号 P01138。人的全长 NGF 通常包含 241 个氨基酸，其中第 1-18 位为 NGF 信号肽部分（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示），第 19-121 位为前导肽部分（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示），第 122-241 位为成熟 NGF（mature NGF，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示）。全长 NGF 可通过剪切过程成为成熟 NGF。

在本申请中，术语“变体”通常是指，与参比序列相比，有一个或多个氨基酸改变（例如，一个或多个氨基酸的取代、变化、修饰、替代、缺失或添加）的氨基酸序列，或者，有一个或多个核苷酸改变（例如，一个或多个核苷酸的取代、变化、修饰、替代、缺失或添加）的核酸序列。对于多肽，变体包括由于一个或多个氨基酸替代、删除、或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以天然存在或者是非天然存在的。变体可以保留参比序列的一种或多种活性，但是于参比序列相比，变体的该一种或多种活性可以增强、减弱或保持不变。

在本申请中，术语“NGF 变体”通常是指，与全长 NGF 氨基酸序列相比（例如，Genbank 登录号 NP_002497.2 或 UniProtKB 登录号 P01138，或如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列），有一个或多个氨基酸改变（例如，一个或多个氨基酸的取代、变化、修饰、替

代、缺失或添加）的氨基酸序列。例如，氨基酸改变可以在成熟 NGF 部分。与野生型 NGF 蛋白相比，所述氨基酸改变（例如，突变）使得 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少。例如，对于氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的全长 NGF 序列来说，氨基酸突变可以是第 221 位的精氨酸（R）突变为色氨酸（W），突变后的全长 NGF 蛋白可以称为 NGF^{R221W}（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示）。例如，对于氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示的成熟 NGF 序列来说，氨基酸突变可以是第 100 位的精氨酸（R）突变为色氨酸（W），突变后的成熟 NGF 蛋白可以称为 NGF^{R100W}（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示）。

在本申请中，术语“连接”，可以和“融合（fused）”或“融合（fusion）”互换使用，通常是指通过包括化学轭合或重组手段的任何手段将两个更多个元件或组分连接在一起。在多肽情况下氨基酸残基的两个聚合物直接彼此偶联，或在多核苷酸情况下核苷酸的两个聚合物直接彼此偶联，或在相同的多肽或多核苷酸内但通过插入氨基酸残基或核苷酸而分离。

在本申请中，术语“异源”通常是指多肽或核酸包含两种或更多种序列或子序列，这些序列或子序列在自然界中未以彼此相同的关系发现。例如，通常重组产生表达盒，其具有来自不相关基因的两个或更多个序列，以排列成新的功能性核酸。术语“异源信号肽”通常是指，在天然情况下，该信号肽与信号肽连接的氨基酸序列不属于一个相同的起源，可以是源自不同物种，不同个体，可以源自同一物种但不同的个体，可以是源自同一个体但源自不同的蛋白，可以是源自同一物种但源自不同的蛋白。例如，异源信号肽和与该异源信号肽连接的氨基酸序列由天然情况下来自不相关基因编码，以排列成新的多肽。例如，对于一个信号肽和与该信号肽连接的 NGF 蛋白或 NGF 蛋白变体连接时，当该信号肽与该 NGF 蛋白或 NGF 蛋白变体由天然情况下来自不相关基因编码，即编码该信号肽的基因与编码该 NGF 蛋白或 NGF 蛋白变体的基因不相关时，或者，天然情况下，与该信号肽连接的蛋白不是 NGF 蛋白或 NGF 蛋白变体时，可以说该信号肽时异源的。

在本申请中，术语“信号肽”通常是指引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链。信号肽的一般长度为 5~30 个氨基酸。信号肽可以位于蛋白前体形式的 N 端或 C 端，但是大多数情况下以 N-端肽存在于蛋白前体形式上。信号肽的功能可以是促进连接至内质网的表达多肽的易位。信号肽通常在该过程中被切除。蛋白前体被切除信号肽对于用于产生多肽的生物体可以是异源的或同源的。例如，本申请的信号肽可以包含野生型信号肽的功能活性片段、截短体和/或突变体。例如，本申请的信号肽可以具有引导包含信号肽的物质结合于细胞膜的功能。

在本申请中，术语“野生型”通常是指在某一物种或群体（例如人、小鼠、大鼠、细胞等）内天然存在的氨基酸或核酸的序列。

在本申请中，术语“神经营养因子受体 p75”通常是指一种低亲和力神经生长因子受体（LNGFR），可以与神经营养因子结合，是肿瘤坏死因子受体超家族的一员，也可称为 p75NTR。示例性的人 p75NTR 的氨基酸序列及其他信息可参见 UniProtKB 数据库登录号 P08138 下。如本文所用的，p75NTR 不限于人 p75NTR，并且包含人 p75NTR 的所有物种直向同源物。术语“p75NTR”涵盖 p75NTR 的前体形式、p75NTR 前体、全长 p75NTR、以及由细胞内过程产生的任何形式的 p75NTR。该术语还涵盖天然存在的 p75NTR 的变体，例如剪接变体、等位基因变体和同种型。

在本申请中，术语“神经营养因子”通常是指一种为神经元的生存、发展以及实现正常功能提供支持的蛋白质。它是生长因子的一种。示例性的神经营养因子可包括神经生长因子（NGF）、脑源性神经营养因子（BDNF）、神经营养因子-3（NT-3）、神经营养因子-4（NT-4）、神经营养因子-6 （NT-6）、神经营养因子-7（NT-7）、脱氢表雄酮（DHEA）、DHEA 硫酸盐（DHEA-S）、GDNF 配体家族和睫状神经营养因子（CNTF）以及其他生物分子。

在本申请中，术语“脑源性神经营养因子（BDNF）”通常是指神经营养因子中的一种，也可称为“abrineurin”。BDNF 是神经营养因子生长因子家族的成员，与经典神经生长因子有关。BDNF 通常存在于大脑和外周。如本文所用的，BDNF 不限于人 BDNF，并且包含人 BDNF 的所有物种直向同源物。术语“BDNF”涵盖 BDNF 的前体形式、BDNF 前体、全长 BDNF、以及由细胞内过程产生的任何形式的 BDNF。该术语还涵盖天然存在的 BDNF 的变体，例如剪接变体、等位基因变体、和同种型。人 BDNF 蛋白的氨基酸序列可参见 UniProtKB 数据库的登录号 P23560 下。全长人 BDNF 蛋白通常具有 247 个氨基酸，可包含信号肽、前体部分、前导肽和成熟 BDNF。BDNF 信号肽可以为全长人 BDNF 蛋白的第 1-18 位氨基酸，例如，BDNF 信号肽可包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在本申请中，术语“神经营养因子-3（NT-3）”通常是指神经营养因子 NGF（神经生长因子）家族中的一种神经营养因子。NT-3 是一种蛋白质生长因子，对周围和中枢神经系统的某些神经元有活性。示例性的人 NT-3 的氨基酸序列可参见 UniProtKB 数据库登录号 P20783 下。

在本申请中，术语“神经营养因子-4（NT-4）”通常是指神经营养因子 NGF（神经生长因子）家族中的一种神经营养因子。NT-4 主要通过 TrkB 受体酪氨酸激酶发出信号。NT4 也可称为 NT-5。示例性的人 NT-4 的氨基酸序列可参见 UniProtKB 数据库登录号 P34130 下。

在本申请中，术语“前导肽”通常是指在蛋白质成熟或激活过程中被切割的一部分。一旦被切割，前导肽通常没有独立的生物学功能。前导肽可以协助蛋白质的折叠和正确的表达。有些情况下，前导肽可包含信号肽或信号肽的一部分。有些情况下，前导肽不包含信号肽。

在本申请中，术语“递送载体”通常是指能够将试剂（例如，mRNA）递送至靶细胞的转移媒介物。递送载体可以将试剂（例如，mRNA）递送到特定的细胞亚类。例如，借助递送载体的固有特征或者通过与载体相偶联的部分、包含在其内的部分（或者与载体结合的部分，从而使得该部分和该递送载体维持在一起，进而使得该部分足以靶向递送载体）使递送载体靶向某些类型的细胞。递送载体还可提高要递送的试剂（例如，mRNA）的体内半衰期和/或要递送的试剂的生物利用度。递送载体可包括病毒载体、病毒样颗粒、聚阳离子载体、肽载体、脂质体和/或杂交载体。例如，如果靶细胞是肝细胞，所述递送载体的性质（例如，尺寸、电荷和/或 pH）可以有效地将所述递送载体和/或其中包载的分子（例如，mRNA）递送至靶细胞、降低免疫清除和/或促进在该靶细胞中停留。

在本申请中，术语“脂质纳米颗粒（LNP）”通常是指包含通过分子间力彼此物理结合（例如，共价或非共价）的多个（即多于一个）脂质分子的颗粒。脂质纳米颗粒可以是例如微球（包括单层和多层囊泡，例如脂质体）、乳液中的分散相、胶团或悬浮液中的内相。脂质纳米颗粒可以包含一种或多种脂质（例如，阳离子脂质、非阳离子脂质和 PEG-修饰的脂质）。

在本申请中，术语“脂质体”通常是指通过一个或多个双层的膜与外部介质隔离的具有内部空间的囊泡。例如，所述双层的膜可以通过两性分子形成，如包含空间隔离的亲水性和疏水性结构域的合成或天然来源的脂质；又例如，所述双层的膜可以通过两亲性聚合物和表面活性剂形成。

在本申请中，术语“修饰”用于核酸（例如 RNA 或 DNA）时通常是指，与相应的野生型相比，所述核酸具有不同的核苷酸分子，不同的核苷酸序列，由不同的键组成和/或在其结构中掺入非天然部分。例如，所述修饰可包括核苷酸的修饰，例如，所述核苷酸可包含经修饰的碱基、糖或磷酸基团。例如，所述修饰可包括不同的核苷酸序列但是编码相同氨基酸序列的多肽或蛋白质，或相同功能的多肽或蛋白质。所述修饰可以是化学修饰和/或生物修饰。“化学修饰”可包括引入不同于野生型或天然存在的核酸中所见到的那些化学物质的修饰，例如，共价修饰，例如，引入经修饰的核苷酸（例如，核苷酸类似物，或者引入在这些核酸分子中

未天然发现的侧基)。术语“经修饰的核苷酸”通常是指核酸聚合物中的单元，其含有经修饰的碱基、糖或磷酸基团，或在其结构中掺入非天然部分。

在本申请中，术语“密码子优化”用于核酸时，通常表示通过用在细胞中具有不同的相对使用频率的编码相同氨基酸残基的密码子，替换亲代多肽编码核酸中的一个、至少一个、或一个以上密码子，已经改良而在细胞中具有改善的表达的编码多肽的核酸，例如哺乳动物细胞或细菌细胞。

在本申请中，术语“多核苷酸”通常包括 DNA 分子（例如 cDNA 或基因组 DNA）、RNA 分子（例如 mRNA）、使用核苷酸类似物（例如肽核酸和非天然存在的核苷酸类似物）产生的 DNA 或 RNA 的类似物，及其杂合体。核酸分子可以是单链或双链的。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常是指从 5’至 3’末端阅读的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物或其类似物，其已与至少约 50％的当从来源细胞分离总核酸时与核酸分子一起被天然发现的多肽、肽、脂质、糖类、多核苷酸或其它材料分离。例如，分离的核酸分子大体上不含任何其它污染性核酸分子或在核酸的天然环境中发现的可干扰其的用途或其治疗性、诊断性、预防性或研究用途的其它分子。

在本申请中，术语“mRNA”通常是指经过处理去除了内含子，且能够被翻译成多肽的 RNA 转录本。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。

在本申请中，术语“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段的个体细胞、细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的、意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞，也可以是真核细胞。

在本申请中，术语“药学上可接受的载体”通常包括药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常，生理学可接

受的载体是 pH 缓冲水溶液。生理学可接受载体的例子可包括缓冲剂，抗氧化剂，低分子量（少于约 10 个残基）多肽，蛋白质，亲水性聚合物，氨基酸，单糖，二糖和其它碳水化合物，螯合剂，糖醇，成盐反荷离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂。

在本申请中，术语“药物组合物”通常是指以允许活性成分（例如，本申请的 S 蛋白变体、核酸分子）的生物学活性有效的形式的制剂，并且其不含有对所述制剂待施用的受试者有不可接受的毒性的另外成分。这些制剂可为无菌的。

在本申请中，术语“试剂盒”通常是指包含用于给予本申请的抗原结合蛋白治疗 PD-1 介导的相关病症的组分的包装产品。试剂盒的组分可包含在分开的小瓶中（即具有分开部分的试剂盒），或在单个小瓶内提供。试剂盒可包含试剂，诸如缓冲剂、蛋白稳定试剂、信号产生体系（例如，荧光信号生成体系）、抗体、对照蛋白、以及测试容器。试剂盒还可以包含实施所述方法的说明书。

在本申请中，术语“给药装置” 包括：（i）输注模块，所述输注模块用于对受试者施用包括具有一活性成分的药物组合物；（ii）用于输注的药物组合物，所述药物组合物中含有一活性成分，所述活性成分选自下组：重组蛋白、核酸分子、mRNA、载体、细胞、组合物、药物组合物或其组合；以及（iii）任选的药效监控模块。

在本申请中，术语“中枢和/或周围神经系统疾病”通常是指中枢神经系统（脑或脊髓）和周围神经系统（脑或脊髓外的神经）病变相关的疾病。例如：中枢和/或周围神经系统疾病可以表现由以下一种或多种引起：神经细胞退化、少突胶质细胞发炎或丢失、脑部血液供应梗塞、损伤或肿瘤和细菌或病毒感染。中枢和/或周围神经系统疾病可以包括阿尔茨海默症、亨廷顿氏舞蹈症、帕金森病、多发性硬化、脑炎或脑膜炎、脑或脊髓结构损伤和/或中风。

在本申请中，术语“神经退行性疾病”通常是指神经元功能和结构的逐渐丧失以导致认知障碍。神经退行性疾病可包括阿尔茨海默症、帕金森病、亨廷顿氏舞蹈症、早发性阿尔茨海默症或早发性帕金森病，和/或肌萎缩性侧索硬化症。

在本申请中，术语“周围神经病变”通常是指周围神经系统异常引起的疾病或病症。周围神经系统包括除中枢神经系统（脑和脊髓）以外的所有神经，例如：连接头部、面部、眼睛、鼻子、肌肉和耳朵与脑的神经（脑神经），连接脊髓与身体其它部位的神经，和分布于全身各个部位的神经细胞。

在本申请中，术语“受试者”通常是指需要诊断、预后、改善、预防和/或治疗疾病的人或非人动物（包括哺乳动物），诸如人、非人灵长类动物(猿、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、

猕猴)、家畜(狗和猫)、农场动物(家禽如鸡和鸭、马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。人受试者包括胎儿、新生儿、婴儿、青少年和成人受试者。受试者可以包括动物疾病模型。

在本申请中，术语“包括”、“包含”、“具有”、“可以”、“含有”及其变体通常旨在是开放式过渡性短语、术语或词语，其不排除额外行为或结构的可能性。术语“由……组成”通常表示不能存在别的组分(或同样地，特征、整数、步骤、等)。除非上下文另有明确规定，单数形式如英文的“a”，“an”，“the”，中文的“一个”、“一种”和“所述/该”一般包括所指代事物的复数形式。

在本申请中，术语“约”通常意指大约(approximately)、在.....的附近(intheregionof)、粗略地(roughly)、或左右(around)。当术语“约”当用于指涉数值范围时，截值或特定数值用于指示所载明的数值可与该列举数值有多达 10%的差异。因此，术语“约”可用于涵盖自特定值±10%或更少的变异、±5%或更少的变异、±1%或更少的变异、±0.5%或更少的变异、或±0.1%或更少的变异。

发明详述

重组蛋白

一方面，本申请提供了一种重组蛋白，所述重组蛋白包含神经生长因子（NGF）蛋白变体，其中，与野生型 NGF 蛋白相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少至少约 50%（例如，减少至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%或更多），例如，所述野生型 NGF 蛋白可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在本申请中，与 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列相比，所述 NGF 蛋白变体可包含一个或多个氨基酸突变。例如，与 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列相比，所述 NGF 蛋白变体可在 R100 处（即，第 100 位精氨酸处）包含氨基酸突变。例如，与 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列相比，所述 NGF 蛋白变体第 100 位的精氨酸突变为色氨酸（即 R100W）。例如，所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

本领域已知，当成熟 NGF 蛋白发生 R100W 突变时，其被分泌到细胞外的能力降低。本身请提供了一种，与天然存在的 NGF^{R100W} 变体蛋白相比，表达量和/或分泌量增加的 NGF^{R100W} 变体的重组蛋白。本申请的重组蛋白能够增加成熟 NGF^{R100W} 变体蛋白分泌到细胞外的量。例如，本申请的重组蛋白可包含异源信号肽，所述异源信号肽可以位于所述 NGF 蛋白变体的 N 端。例如，与 SEO ID NO: 29 所示的信号肽相比，所述异源信号肽使得所述 NGF 蛋白变体的

表达量和/或分泌量增加至少约 50%（例如，增加至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%或更多）。

本申请所述的异源信号肽的长度可以为 5~30 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 5-25 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 5-20 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 10-25 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 10-30 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 15-30 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 10-20 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 15-20 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 18 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 19 个氨基酸。例如，本申请所述的异源信号肽的长度可以为 20 个氨基酸。

本申请所述的异源信号肽可以来自原核生物，如细菌（大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌）。本申请所述的异源信号肽可以来自真核生物，例如，酵母或哺乳动物细胞（人类、小鼠、猴等）。

本申请所述的异源信号肽可以源自分泌型蛋白、周质蛋白和/或膜结合蛋白，例如，酶。例如，信号肽可以源自大肠杆菌外膜蛋白 A OmpA、OmpF、λ 噬菌体受体 LamB、热稳定肠毒素 ST、碱性磷酸酶 PhoA、麦芽糖结合蛋白 MBP、DsbA，金黄色葡萄球菌蛋白 A，枯草芽孢杆菌蛋白酶、中性蛋白酶，崖边杆菌 RNA 酶、果聚糖酶。例如，信号肽还可以源自酵母表达系统中的外源蛋白的天然信号肽、α-因子信号肽、蔗糖酶基因 SUC 信号肽序列、酸性磷酸酶基因 PHO1 和/或间质金属蛋白酶，或者源自人血清蛋白和牛凝乳酶。

本申请所述的异源信号肽可以源自 Gaussia、Homo sapiens、Oikopleura dioica 或 Mus musculus。本申请所述的异源信号肽可以包含源自 Gaussia 荧光素酶、人胰蛋白酶原-2、Oikosin 1 突变体、天青素前蛋白和/或 Igκ 的信号肽。在某些实施方式中，所述异源信号肽源自 Gp67、Gp64、蜂毒素（HBM）、白蛋白、IL-2、天青素前蛋白、小鼠 IgK、免疫球蛋白重链和/或胱抑素-S 前体。

本申请所述的异源信号肽可以包含源自神经营养因子的信号肽。例如，所述异源信号肽可以为脑源性神经营养因子（BDNF）、神经营养因子-3（NT-3）和/或神经营养因子-4（NT-4）的信号肽。例如，所述异源信号肽可以包含 SEQ ID NO: 30、31 和 35-43 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述异源信号肽为 IgK 信号肽和/或 BDNF 信号肽。例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30-31 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 IgK 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 BDNF 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 hIL-2 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 APP 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 HC 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 Cystatin 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 Gp67 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 HBM 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 Gp64 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 Alb 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。

例如，所述异源信号肽为 SP 信号肽，又例如，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述重组蛋白还包括前导肽。所述前导肽可以是 NGF 蛋白的前导肽，也可以是源自非 NGF 蛋白的异源的前导肽。例如，所述前导肽可以包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述重组蛋白还包括前导肽。在本申请中，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。

在本申请中，所述重组蛋白还包括前导肽。在本申请中，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体，且所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30-31 和 35-43 中任一项所示的氨基酸序列，所述前导肽包含 SEQ ID NO: 34 所

示的氨基酸序列，且所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 BDNF 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 BDNF 信号肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 SP 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 58 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 hIL-2 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 Cystatin 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 APP 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 HC 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 Gp67 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 HBM 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 64 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 Gp64 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 Alb 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述重组蛋白还包括标签肽。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽，所述前导肽，所述 NGF 蛋白变体和所述标签肽。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽，所述 NGF 蛋白变体和所述标签肽。

例如，所述标签肽可以包含(YPYDVPDYA)n 所示的氨基酸序列，其中 n 为 1 至 5 的任意整数。又例如，所述标签肽可以包含 YPYDVPDYA（SEQ ID NO: 68）或 YPYDVPDYAYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 69)所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽，所述 NGF 蛋白变体和所述标签肽。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 70 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述重组蛋白还包括穿膜锚定区。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽，所述前导肽，所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽，所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。

例如，所述穿膜锚定区可以是血小板衍生生长因子受体的 C 端跨膜锚定域（C-terminal transmembrane anchoring domain of platelet-derived growth factor receptor, PDGFR）。又例如，所述穿膜锚定区可以包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽，所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。例如，所述重组蛋白包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述重组蛋白还包括延长半衰期的结构域。

例如，所述重组蛋白还包括免疫球蛋白的 Fc 区。所述 Fc 区可以延长所述重组蛋白的半衰期。所述 Fc 区可以位于所述重组蛋白的 C 端。例如，与不包含 Fc 区的重组蛋白相比，所述包含 Fc 区的重组蛋白的半衰期可延长至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高。

例如，所述 Fc 区可以源自人免疫球蛋白和/或小鼠免疫球蛋白。

例如，所述 Fc 区可以为人 IgG1 的 Fc 区。

例如，所述 Fc 区可以为小鼠 IgG 的 Fc 区

例如，所述 Fc 区可以包含 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽、所述前导肽、所述

NGF 蛋白变体和所述 Fc 区。

又例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽、所述 NGF 蛋白变体和所述 Fc 区。

例如，所述重组蛋白可以包含 SEQ ID NO: 54-55 中任一项所示的氨基酸序列。

核酸分子

另一方面，本申请提供了一种分离的核酸分子，所述分离的核酸分子编码所述的重组蛋白。例如，所述分离的核酸分子可以编码包含 SEQ ID NO: 15-20、54-55 和 58-66 中任一项所示的氨基酸序列的重组蛋白。

例如，所述分离的核酸分子可以编码包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的重组蛋白。例如，所述分离的核酸分子可以编码包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列的重组蛋白。

例如，所述分离的核酸分子可以包括 DNA 和/或 RNA。例如，所述分离的核酸分子可以为 DNA，且可以编码包含 SEQ ID NO: 15 或 19 所示的氨基酸序列的重组蛋白。例如，所述分离的核酸分子可以为 RNA，且可以编码包含 SEQ ID NO: 15 或 19 所示的氨基酸序列的重组蛋白。

例如，所述分离的核酸分子可以在选自下组的一个或多个位置处包含修饰：5’帽、5’非翻译区、开放阅读框、3’非翻译区和 poly A 尾。

例如，所述分离的核酸分子可以包含至少一种经修饰的核苷酸。

在本申请中，所述核酸分子可包含如 SEQ ID NO: 2-8，10-11，23-28，46-47 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列。在本申请中，所述核酸分子可包含与 SEQ ID NO: 2-8，10-11，23-28，46-47 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述核酸分子可包含如 SEQ ID NO:11-12 中任一项所示的核苷酸序列。在本申请中，所述核酸分子可包含与 SEQ ID NO: 11-12 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述核酸分子可包含如 SEQ ID NO: 3、11 和 23 中任一项所示的核苷酸序列。在本申请中，所述核酸分子可包含与 SEQ ID NO: 3、11 和 23 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述核酸分子可包含如 SEQ ID NO: 7、12 和 27 中任一项所示的核苷酸序列。在本申请中，所述 mRNA 可包含与 SEQ ID NO: 7、12 和 27 中任一项所示的核苷酸序列

具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

一方面，本申请提供一种分离的 RNA，特别是一种 mRNA，所述 mRNA 包含能够编码神经生长因子（NGF）蛋白或其变体的核酸分子，或者，所述 mRNA 的至少一部分能够编码所述 NGF 蛋白变体。

在某些实施方式中，所述 NGF 蛋白包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，与 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少至少 50%（例如，减少至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或更多）。

在某些实施方式中，所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 mRNA 包含编码异源信号肽的多核苷酸，与 SEQ ID NO: 29 所示的信号肽相比，所述异源信号肽使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量增加至少 50%（例如，增加至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或更多）。

在某些实施方式中，所述异源信号肽能够使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量达到野生型 NGF 蛋白的 50%以上（例如，达到至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或更多）。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自神经营养因子。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自脑源性神经营养因子（BDNF），神经营养因子-3（NT-3）和/或神经营养因子-4（NT-4）。

在某些实施方式中，所述异源信号肽源自 Gp67、Gp64、蜂毒素（HBM）、白蛋白、IL-2、天青素前蛋白、小鼠 IgK、免疫球蛋白重链和/或胱抑素-S 前体。

在某些实施方式中，所述异源信号肽为 IgK 信号肽和/或 BDNF 信号肽。

在某些实施方式中，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30-31 和 35-43 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30-31 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 mRNA 还包括编码前导肽的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述前导肽包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括所述编码异源信号肽的多核苷

酸、所述编码前导肽的多核苷酸和所述编码 NGF 蛋白或其变体的多核苷酸。

在某些实施方式中，自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 IgK 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸。

在某些实施方式中，自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 BDNF 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述 mRNA 编码包含如 SEQ ID NO: 15-20 中任一项所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 mRNA 编码包含如 SEQ ID NO: 15 和 19 任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述重组蛋白还包括穿膜锚定区。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽，所述前导肽，所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述异源信号肽，所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。

例如，所述穿膜锚定区可以是 PDGFR 穿膜锚定区。又例如，所述穿膜锚定区可以包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列。

例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽，所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。例如，自 N 端至 C 端，所述重组蛋白可以依次包括所述 IgK 信号肽、所述 NGF 蛋白变体和所述穿膜锚定区。

在某些实施方式中，所述 mRNA 编码包含 SEQ ID NO: 17-18 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述其中所述 mRNA 还包含编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述 Fc 区源自人免疫球蛋白和/或小鼠免疫球蛋白。

在某些实施方式中，所述 Fc 区为人 IgG1 的 Fc 区。

在某些实施方式中，所述 Fc 区为小鼠 IgG 的 Fc 区

在某些实施方式中，所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括所述编码异源信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸、所述编码 NGF 蛋白变体的多核苷酸和所述编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

在某些实施方式中，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 IgK 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸、编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸和所述编码免疫球

蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述 mRNA 编码包含 SEQ ID NO: 54-55 中任一项所示的氨基酸序列。

一方面，本申请提供一种分离的 RNA，特别是一种 mRNA，所述 mRNA 包含能够编码所述重组蛋白的核酸分子，或者，所述 mRNA 的至少一部分能够编码所述重组蛋白，例如，所述重组蛋白可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 RNA 可以是天然或非天然存在的 RNA，例如 mRNA。所述 mRNA 可以包括一个或多个核碱基、核苷或核苷酸。在本申请中，术语“核苷”通常是指包含糖分子（例如戊糖或核糖）或其衍生物和有机碱（例如嘌呤或嘧啶）或其衍生物（本文也称为“核碱基”）的组合的化合物。在本申请中，“核苷酸”通常是指包括磷酸基团的核苷。

在本申请中，所述 mRNA 可以包括 5’非翻译区（5’UTR）、3’非翻译区（3’UTR）和/或编码区（例如开放阅读框）。

在本申请中，所述 mRNA 可以是修饰的。所述修饰可以是化学修饰或生物修饰。在本申请中，所述 mRNA 可以包含一个或多个修饰的核碱基、核苷或核苷酸，此时，它可以被称为“化学修饰的 mRNA”，在本文中也可被称为“修饰的 mRNA”。与未经修饰的参考序列（例如，天然存在的或野生型的 mRNA）相比，修饰的 mRNA 可具有有用的性质，例如，包括增强的稳定性、提高的细胞内保留、增强的翻译效果和/或降低的免疫原性。因此，使用修饰的 mRNA 可以提高蛋白质生产的效率、提高核酸在细胞内的保留以及降低免疫原性。

在某些实施方式中，所述 mRNA 在选自下组的一个或多个位置处包含修饰：5’帽、5’非翻译区、开放阅读框、3’非翻译区和 poly A 尾。

在本申请中，所述 mRNA 可以包括修饰的核碱基，所述修饰的核碱基可以是修饰的尿嘧啶。在本申请中，所述 mRNA 可以包括修饰的核碱基，所述修饰的核碱基可以是修饰的胞嘧啶。在本申请中，所述 mRNA 可以包括修饰的核碱基，所述修饰的核碱基可以是修饰的腺嘌呤。在本申请中，所述 mRNA 可以包括修饰的核碱基，所述修饰的核碱基可以是修饰的鸟嘌呤。在本申请中，所述 mRNA 可以包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合（例如，前述修饰的核碱基的 2、3 或 4 种的组合）。

例如，所述分离的核酸分子可以选自下组的一种或多种核苷酸：N1-甲基假尿苷三磷酸（N1-Methylpseudo-UTP）、假尿苷三磷酸（pseudo-UTP）、5-甲氧基尿苷三磷酸（5-Methoxy-UDP）和 5-甲基胞苷三磷酸（5-Methyl-CTP）。在某些实施方案中，本申请的修饰的 RNA 包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合（例如，前述修饰的核碱基的 2、3 或 4 的组合）。

在本申请中，所述 mRNA 可以被密码子优化，改变密码子的一种或多种核苷酸，仍使得密码子编码相同氨基酸。

在本申请中，所述 mRNA 可包含如 SEQ ID NO: 23-28 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列。在本申请中，所述 mRNA 可包含与 SEQ ID NO: 23-28 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 mRNA 可包含如 SEQ ID NO: 23 所示的核苷酸序列。在本申请中，所述 mRNA 可包含与 SEQ ID NO: 23 所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 mRNA 可包含如 SEQ ID NO: 23 所示的核苷酸序列。在本申请中，所述 mRNA 可包含与 SEQ ID NO: 23 所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 mRNA 可包含如 SEQ ID NO: 27 所示的核苷酸序列。在本申请中，所述 mRNA 可包含与 SEQ ID NO: 27 所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，82%、85%、88%、90%、95%、98%、99%或以上）的序列同一性的核苷酸序列。

本申请的 mRNA 可以通过本领域任何可行的方法产生，包括但不限于体外转录（IVT）和合成方法。可以利用酶促、固相、液相、组合合成方法、小区域合成和连接方法制备 mRNA。在一个实施方案中，使用 IVT 酶促合成方法制备 mRNA。因此，本申请还涉及还可用于体外转录本申请的 mRNA 的多核苷酸，例如 DNA、构建体和载体。

组合物

在本申请中，所述的组合物还可包含递送载体。本申请的 mRNA 可以配制在纳米颗粒或其他递送载体中，例如，以避免它们在递送至受试者时被降解。在本申请中，所述 mRNA 可以被包封在纳米颗粒内。在特定的实施方案中，纳米颗粒是具有至少一个尺寸（例如直径）小于或等于约 1000nM、小于或等于约 500nM、小于或等于约 400nM、小于或等于约 300nM、小于或等于约 200nM 或小于或等于约 100nM 的颗粒。在特定的实施方案中，纳米颗粒可包括脂质。脂质纳米颗粒可以包括但不限于脂质体和胶束。在本申请中，所述脂质纳米颗粒可以包括阳离子和/或可电离的脂质、阴离子脂质、非阳离子脂质、中性脂质、两亲性脂质、聚乙二醇化的脂质和/或结构性脂质，或上述的组合在某些实施方案中，脂质纳米颗粒包含一种或多种本申请所述的 RNA，例如 mRNA，又例如，编码目的多肽（例如，所述重组蛋白或所述 NGF 蛋白变体）的 mRNA。例如，脂质纳米颗粒中包含一种或多种本申请所述的编码所述

重组蛋白或所述 NGF 蛋白变体的 mRNA。

本申请所述组合物中的递送载体可以是脂质纳米颗粒。所述脂质纳米颗粒可包含一种或多种（例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8）阳离子和/或可离子化的脂质。“阳离子脂质”通常指在一定 pH（例如，生理 pH）下携带任意数目的净正电荷的脂质。所述阳离子脂质可包括但不限于 3-（双十二烷基氨基）-N1,N1,4-三十二烷基-1-哌嗪乙胺（KL10）、N1-[2-（二十二烷基氨基）乙基]-N1,N4,N4-三十二烷基-1,4-哌嗪二乙胺（KL22）、14,25-二十三烷基-15,18,21,24-四氮杂八孔并烷（KL25）、DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、Octyl-CLinDMA、辛基- CLinDMA（2S）、DODAC、DOTMA、DDAB、DOTAP、DOTAP.C1、DC-Choi、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA 和 DMRIE。另外，可以使用许多商业化的阳离子和/或可离子化脂质，例如，LIPOFECTIN®（包括 DOTMA 和 DOPE）和 LIPOFECTAMINE®（包括 DOSPA 和 DOPE）。例如，阳离子脂质可以是 DLin-MC3-DMA 或 DLin-KC2-DMA。

在某些实施方式中，所述阳离子脂质在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 40-70%，例如，约 40-65%、约 40-60%、约 45-55%或约 48-53%。在某些实施方式中，所述阳离子脂质（例如，DLin-MC3-DMA）在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 50%。

在本申请中，所述脂质纳米颗粒可包含一种或多种（例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8）非阳离子脂质。所述非阳离子脂质可以包括阴离子脂质。适用于本申请的脂质纳米颗粒的阴离子脂质可包括磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰磷酸乙醇基，以及其他连接了阴离子基团的中性脂质。

所述非阳离子脂质可以包括中性脂质。适用于本申请的脂质纳米颗粒的中性脂质可包括磷脂，例如二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）、二油酰基磷脂酰胆碱（DOPC）、二棕榈酰基磷脂酰胆碱（DPPC）、二油酰基磷脂酰甘油（DOPG）、二棕榈酰基磷脂酰甘油（DPPG）、二油酰基磷脂酰乙醇胺（DOPE）、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱（POPC）、棕榈酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺（POPE）、二油酰基-磷脂酰乙醇胺 4-（N-马来酰亚胺基甲基）-环己烷-1-羧酸酯（DOPE-mal）、二棕榈酰基磷脂酰基乙醇胺（DPPE）、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺（DMPE）、二硬脂酰基-磷脂酰基-乙醇胺（DSPE）、16-O-单甲基 PE、16-O-二甲基 PE、18-1-反式 PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺（SOPE），或其混合物。另外，可以使用具有饱和和不饱和脂肪酸链的混合物的脂质。例如，本申请所述的中性脂质可以选自 DOPE、DSPC、DPPC、POPC 或任何相关的磷脂酰胆碱。

在某些实施方式中，所述磷脂在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 30-45%，例如，约 33-

42%、约 35-40%或约 38-39%。在某些实施方式中，所述磷脂（例如，DSPC）在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 38.5%。

在本申请中，所述脂质纳米颗粒可包含脂质缀合物，例如，聚乙二醇（PEG）修饰的脂质和衍生的脂质。PEG 修饰的脂质可包括但不限于与具有 C6-C20 长度的烷基链的脂质共价连接的长度至多为 5kDa 的聚乙二醇链。这些组分的加入可防止脂质聚集，也可增加循环持续时间，易于脂质-核酸组合物递送至靶细胞，或快速释放出核酸。例如，所述聚乙二醇（PEG）修饰的脂分子可以是具有较短的酰基链（例如，C14 或 C18）的 PEG-神经酰胺。例如，所述脂质纳米颗粒可包含 PEG2000-DMG。

在某些实施方式中，所述聚乙二醇（PEG）修饰的脂分子在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 0.5-2%，例如，约 1-2%、约 1.2-1.8%或约 1.4-1.6%。在某些实施方式中，所述聚乙二醇（PEG）修饰的脂分子（例如，PEG2000-DMG）在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 1.5%。

在本申请中，所述脂质纳米颗粒还可包含胆固醇。在某些实施方式中，所述胆固醇在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 5-15%，例如，约 6-14%、约 7-13%、约 8-12%或约 9-11%。在某些实施方式中，所述胆固醇在脂质纳米颗粒中的摩尔比例为约 10%。

在本申请中，所述脂质纳米颗粒可包括阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子。在某些实施方式中，所述阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子的摩尔比可以为 45~55：5~15：35~45：0.5~2。在某些实施方式中，所述阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子的摩尔比可以为 50:10:38.5:1.5。

例如，所述组合物可包含所述 mRNA 和所述脂质纳米颗粒，其中，所述 mRNA 可以编码 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，所述脂质纳米颗粒可包括阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子，且所述阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子的摩尔比可以为 50:10:38.5:1.5。

例如，所述组合物可包含所述 mRNA 和所述脂质纳米颗粒，其中，所述 mRNA 可以编码 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，所述脂质纳米颗粒可包含 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 以及 PEG2000-DMG 的摩尔，且所述 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 以及 PEG2000-DMG 的摩尔比可以为 50:10:38.5:1.5。

例如，所述组合物可包含所述 mRNA 和所述脂质纳米颗粒，其中，所述 mRNA 可以包含 SEQ ID NO: 23 所示的核苷酸序列，所述脂质纳米颗粒可包含阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子，且所述阳离子脂质、胆固醇、磷脂以及聚乙二醇修饰的脂分子的摩尔比可以为 50:10:38.5:1.5。

例如，所述组合物可包含所述 mRNA 和所述脂质纳米颗粒，其中，所述 mRNA 可以包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，所述脂质纳米颗粒可包含 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 以及 PEG2000-DMG 的摩尔，且所述 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 以及 PEG2000-DMG 的摩尔比可以为 50:10:38.5:1.5。

制备方法

本申请提供了制备所述组合物中的递送载体的方法。例如，通过现有技术可制备多层囊泡（MLV），例如，通过沉积选择的脂质在合适容器或器皿的内壁上；通过溶解脂质在合适溶剂中，以及然后蒸发溶剂以在器皿的内侧保留薄膜或者通过喷雾干燥。可将水相加入旋转运动着的器皿，其导致形成 MLV。然后通过均质化、超声处理或挤压多层囊泡能够形成单层囊泡（ULV）。此外，通过洗涤剂去除技术能够形成单层囊泡。

在申请中，所述组合物包含递送载体（例如，脂质纳米颗粒），其中 mRNA 可以与脂质的递送载体的表面缔合，并包封在其中。例如，在制备本申请的组合物时，所述阳离子脂质的递送载体可与 mRNA 通过静电作用缔合。

在某些实施方案中，所述组合物包含体内外可检测的诊断放射性核素、荧光物质或其他物质。

在本申请中，考虑靶细胞或者组织的尺寸以及待制备的脂质体应用程度选择所述脂质递送载体（例如，脂质纳米颗粒）的合适尺寸。在某些实施方案中，可以将 mRNA 递送至特定的细胞或者组织。例如，为了靶向肝细胞，可确定脂质递送载体（例如，脂质纳米颗粒）的尺寸，使得它的尺寸比在肝中内皮层衬里肝窦状隙的开窗缝要小，使得脂质递送载体（例如，脂质纳米颗粒）能够容易地渗透这些内皮开窗缝以到达靶肝细胞。脂质递送载体（例如，脂质纳米颗粒）可以具有足够大的直径以限制或者明显避免分布至某些细胞或组织内。在本申请中，所述脂质递送载体（例如，脂质纳米颗粒）的尺寸（例如，直径）可以在约 25 至 250nm 范围内，例如小于约 250nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、50nm、25nm 或 10nm。例如，所述脂质递送载体（例如，脂质纳米颗粒）的尺寸（例如，直径）可以在约 25 至 250nm 范围内，例如，约 50 至 200nm、约 75 至 175nm、约 75 至 150nm 或约 75 至 125nm 内。

载体、细胞和药物组合物

另一方面，本申请提供了载体，所述载体包含所述核酸分子。例如，所述载体可以为病毒载体，例如，腺病毒载体、腺相关病毒载体和/或慢病毒载体。

另一方面，本申请提供了细胞，所述细胞包含所述核酸分子，和/或所述载体。在本申请中，所述细胞可以是原核细胞，例如，大肠杆菌。在本申请中，所述细胞可以是真核细胞例

如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞。在本申请中，所述细胞可以为哺乳动物的细胞，例如小鼠细胞、人细胞等。在本申请中，所述细胞可以为 293T 细胞或 P12 细胞。

另一方面，本申请提供了一种制备所述的重组蛋白的方法，所述方法包括在使得所述的重组蛋白表达的条件下，培养所述的细胞。

另一方面，本申请提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体和/或所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

另一方面，本申请提供了一种试剂盒或给药装置，所述试剂盒或给药装置包含所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物。其可在单一常用容器中包括本申请所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物，也可任选地与一种或多种治疗剂组合，任选地一起配制于试剂盒中。

治疗方法

另一方面，本申请提供了一种缓解、预防和/或治疗中枢和/或周围神经系统疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物。例如，所述中枢和/或周围神经系统疾病可以包括神经退行性疾病。例如，所述中枢和/或周围神经系统疾病可以包括周围神经病变。例如，所述周围神经病变包括中毒性周围神经病变、遗传性周围神经病变和/或代谢性周围神经病变。例如，所述中枢和/或周围神经系统疾病可以包括在某些实施方式中，所述周围神经病变包括中毒性周围神经病变、遗传性周围神经病变和/或代谢性周围神经病变。

在某些实施方式中，所述中枢和/或周围神经系统疾病包括糖尿病周围神经病变、药物相关性周围神经病变、遗传性运动感觉神经病、周围神经外伤后修复、外伤性视神经炎和/或阿尔茨海默症。

另一方面，本申请提供了一种所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物可以用于缓解、预防和/或治疗中枢和/或周围神经系统疾病。例如，所述中枢和/或周围神经系统疾病可以包括神经退行性疾病。例如，所述中枢和/或周围神经系统疾病可以包括周围神经病变。例如，所述周围神经病变包括中毒性周围神经病变、遗传性周围神经病变和/或代谢性周围神经病变。例如，所述中枢和/或周围神经系统疾病可以包括在某些实施方式中，所述周围神经病变包括中毒性周围神经病变、遗传性周围神经病变和/或代谢性周围神经病变。

另一方面，本申请提供了一种促进神经生长因子（NGF）蛋白分泌和/或表达的方法，其

包括使用所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物。例如，所述方法可以为非治疗目的的方法。例如，所述方法可以为体外的和/或离体的方法。

另一方面，本申请提供了一种促进神经细胞增殖和/或分化的方法，其包括使用所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物。例如，所述方法可以为非治疗目的的方法。例如，所述方法可以为体外的和/或离体的方法。

另一方面，本申请提供了一种修复损伤的神经细胞的方法，其包括使用所述的重组蛋白、所述的核酸分子、所述的组合物、所述的载体、所述的细胞，和/或所述的药物组合物。例如，所述方法可以为非治疗目的的方法。例如，所述方法可以为体外的和/或离体的方法。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请发明的各个技术方案，而不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 NGF^{R100W} mRNA 的设计优化及合成

通过将 NGF 内源信号肽替换位外源信号肽、截短前导肽、增加穿膜锚定区等方式构建包含 NGF 突变体的重组蛋白，如图 1A 或图 1J 所示。其中，NGFwt：全长的野生型 NGF 蛋白，自 N 端至 C 端，依次为 NGF 信号肽+前导肽+成熟 NGF 蛋白；NGFmut：全长的 NGF^{R221W} 突变体蛋白，自 N 端至 C 端，依次为 NGF 信号肽+前导肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白；IGK19-NGFmut：自 N 端至 C 端，依次为 IGK 信号肽+前导肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白；IGK122-NGFmut：自 N 端至 C 端，依次为 IGK 信号肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白；IGK19-NGF-PDGFRmut：自 N 端至 C 端，依次为 IGK 信号肽+前导肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白+PDGFR 穿膜锚定区；IGK122-NGF-PDGFRmut：自 N 端至 C 端，依次为 IGK 信号肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白+PDGFR 穿膜锚定区；BDNF19NGFmut：自 N 端至 C 端，依次为 BDNF 信号肽+前导肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白；BDNF122-NGFmut：自 N 端至 C 端，依次为 BDNF 信号肽+成熟 NGF^{R100W} 突变体蛋白；氨基酸序列和核苷酸序列如下表 1 所示。

表 1 NGF 或其变体重组蛋白的序列

重组蛋白	氨基酸序列（SEQ ID NO.）	编码区序列（SEQ ID NO.）	密码子优化后的编码区序列（SEQ	mRNA 序列（SEQ ID NO.）

			ID NO.）	
NGFwt	13	9	1	21
NGFmut	14	10	2	22
IGK19-NGFmut	15	11	3	23
IGK122-NGFmut	16	-	4	24
IGK19-NGF-PDGFRmut	17	-	5	25
IGK122-NGF-PDGFRmut	18	-	6	26
BDNF19-NGFmut	19	12	7	27
BDNF122-NGFmut	20	-	8	28
IGK19-NGFmut-Fc1	54	-	46	50
IGK19-NGFmut-Fc2	55	-	47	51
SP-19-NGFmut	58	-	-	-
hIL-2-19-NGFmut	59	-	-	-
Cystatin 19-NGFmut	60	-	-	-
APP-19-NGFmut	61	-	-	-
HC-19-NGFmut	62	-	-	-
Gp67-19-NGFmut	63	-	-	-
HBM-19-NGFmut	64	-	-	-
Gp64-19-NGFmut	65	-	-	-
Alb-19-NGFmut	66	-	-	-

使用 T7 聚合酶进行体外转录得到上述编码区的 DNA 序列，在 3’端添加 HA tag 并克隆到 pSG5L 载体上 T7 启动子的下游，利用载体上获取体外转录线性 DNA 模板的通用引物，PCR 获取体外转录的 DNA 模板。使用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录，使用 DNA 酶消化模板后，使用大肠杆菌 poly(A)聚合酶 EPAP(E. coli Poly(A) Polymerase)进行 poly(A)加尾，最后纯化回收获取 mRNA。

将 mRNA 在 293T 工具细胞系中进行表达，使用 western blot 检测表达量，结果如图 1B 所示，IGK19-NGFmut 和 BDNF19-NGFmut 均检测到上清中有蛋白表达。且图 1F 显示，与野生型 NGF 蛋白（WT）相比，不包含异源信号肽的 NGF^{R100W} 蛋白（Mut）分泌至上清液的含量较低，大部分以 proNGF 的形式存在于细胞中。此外，采用其他几种常用的信号肽（图 1J），APP（Azurocidin preproprotein）、HC(Immunoglobulin heavy chain)、SP(Signal peptide)、Cystatin

（Cystatin-S precursor）HBM、Gp64、Alb（Albumin）等，如图 1G 至 1I，结果显示均能一定程度促进 NGFmut 的外泌。

实施例 2 mRNA 修饰后的蛋白表达量检测

本实施例对 IGK19-NGFmut mRNA 进行修饰，即在转录时分别加入携带不同化学修饰的核苷酸，得到携带化学修饰的 mRNA，化学修饰核苷酸的引入均为 100%的替换。使用的化学修饰分别为 N1-甲基假尿苷三磷酸（N1-Methylpseudo-UTP，即 N1-UTP）、假尿苷三磷酸（pseudo-UTP）、5-甲氧基尿苷三磷酸（5-Methoxy-UDP，即 5mO-UTP）和 5-甲基胞苷三磷酸（5-Methyl-CTP，5mCTP）。结果如图 1C 所示，包含不同修饰的 IGK19-NGFmut mRNA 翻译得到的蛋白表达量相当，且包含 N1-UTP 修饰的蛋白表达量最高。后续的生化及功能研究的 mRNA 均为 N1-UTP 修饰。

实施例 3 NGF^{R100W} 促进神经细胞分化的功能检测

PC12 细胞株来源于一种可移植的鼠嗜铬细胞瘤，该细胞对 NGF 有可逆的神经元显形反应。当 PC12 细胞暴露在有 NGF 蛋白的环境中，细胞会在一周之内作出反应，主要是停止细胞分裂并延伸神经突。将 PC12 细胞培养在含 5%胎牛血清和 5%马血清的 RPMI1640 培养基中，当细胞到达对数生长期时，用 NGFwt 或 IGK19-NGFmut mRNA 进行转染，24 小时后对细胞进行 DAPI 和 HA 染色，荧光显微镜和电子显微镜下观察细胞的形态。结果如图 1D 和 1E 显示，IGK19NGFmut 和 NGFwt 一样，mRNA 能够翻译表达为 NGF^{R100W} 突变蛋白，并促进 PC12 细胞的分化。

实施例 4 使用脂质包裹 NGF mRNA 获得脂质纳米颗粒

运用 NGF mRNA 与脂类混合物包裹成脂质纳米颗粒（LNP）体系来递送 mRNA，流程如图 2 所示。使用的脂质分子包括四种：阳离子脂质（DLin-MC3-DMA）、胆固醇、二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）以及聚乙二醇修饰的脂分子（PEG2000-DMG）。四种脂质以 50:10:38.5:1.5 的摩尔比溶于乙醇，将溶于乙醇的脂质与体外转录的 mRNA 通过 T 管快速混匀，自包装得到直径约为 100 nm 的脂质纳米颗粒。将体外转录的 NGFwt 及 IGK19-NGFmut 与脂质按照 mRNA：阳离子脂质=1：3（摩尔比）的比例混合包装成纳米颗粒 LNP，使用 Malvern Zetasizer 纳米粒径电位分析仪对 LNP 进行粒径检测，结果显示 NGFwt 及 IGK19-NGFmut 大小大约为 100 nm，如图 3A。

取 NGF LNP 2ug 直接滴加到 293T 细胞中进行细胞转染，可以在细胞和上清中检测到外泌到上清中的成熟 NGF 蛋白表达，如图 3B。我们利用荧光素酶(luciferase)氧化荧光素(D-luciferin)发出荧光的荧光报告系统，结合生物活体荧光成像技术，确定纳米颗粒在小鼠体内表达的定位及表达动力学。小鼠在给予尾静脉注射包载荧光素酶 mRNA 的纳米颗粒后，在不同时间点腹腔注射荧光素底物，利用小动物活体成像检测荧光素酶氧化底物产生的生物光的强度和定位。结果显示，通过循环途径给药时，纳米颗粒的表达效率较高，且主要集中在肝脏，如图 3C。

实施例 5 在小鼠中验证 IGK19-NGFmut LNP 的低致痛效应

8 周周龄的 C57BL/6 雄性小鼠 8 只，分为两组，每组 4 只，使用足底注射，每只小鼠分别将 2 μg IGK19-NGFmut LNP 以及 2 μg NGFwt LNP 注射进小鼠后爪足底足垫区。在注射后 8 h 进行小鼠行为学实验，对小鼠足底的热痛痛阈进行检测。在足底注射 8 小时后将小鼠放置于透明架上，给予两组小鼠相同强度的红外热源刺激，记录小鼠抬爪的潜伏时间。

另将 8 周周龄的 C57BL/6 雄性小鼠 10 只分为两组，每组 5 只，以同样的方式分别注射 2 μg IGK19-NGFmut LNP 以及 2 μg NGFwt LNP。在足底注射 8 小时，将小鼠置于网格架上，使用 von frey 细丝给予小鼠足底不同大小的机械应力，并记录能使小鼠发生抬爪动作的应力数值。

结果显示注射 IGK19-NGFmut LNP 的小鼠相较于注射了 NGFwt LNP 的对照组小鼠对于热痛的感应阈值明显升高，如图 4A；同时图 4B 也显示 IGK19-NGFmut mRNA 的表达使得小鼠对机械痛觉的响应相比表达 NGFwt 更不敏感，说明 IGK19-NGFmut LNP 比 NGFwt LNP 在小鼠足底的表达，对小鼠有更低的致痛效应。

实施例 6 在外周神经损伤小鼠中验证 IGK19-NGFmut LNP 的神经修复作用

8 周周龄的 C57BL/6 雄性小鼠 15 只，使用腹腔隔天注射 paclitaxel 的方法对小鼠外周神经损伤进行造模。造模完成的一周后分为三组，其中注射 IGK19-NGFmut LNP 以及 NGFwt LNP 的组每组 6 只，仅造模组 3 只。使用足底注射，每只小鼠分别将 2 μg IGK19-NGFmut LNP 以及 2 μg NGFwt LNP 注射进小鼠后爪足底足垫区，每隔两天注射一次。在注射 5 次后，对小鼠足底的热痛痛阈以及机械痛痛阈进行检测。将小鼠置于网格架上，使用 von frey 细丝给予小鼠足底不同大小的机械应力，并记录能使小鼠发生抬爪动作的应力数值。机械痛阈测试完毕后给予 2 h 缓冲期，随后将两组小鼠放置于 55 ℃的热盘上，记录小鼠抬爪的潜伏时间。实验流程如图 5A 所示。

图 5B 中热痛和机械痛的结果显示，12 mg/kg 的 paclitaxel 注射剂量所造成的小鼠周围神

经损伤均能引起小鼠足底痛阈升高。随着注射次数的增加，注射 IGK19-NGFmut LNP 的小鼠相较于注射了 NGFwt LNP 的对照组的小鼠，能够明显增加周围神经的连续性以及密度，如图 5C；同时图 5D 也显示 IGK19-NGFmut mRNA 的表达使得小鼠对机械痛觉以及热痛的响应相比表达 NGFwt 更敏感，说明 IGK19-NGFmut LNP 在小鼠足底的表达能够修复由 paclitaxel 引起的外周神经损伤。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方式的范围内。

权 利 要 求 书

1.重组蛋白，其包含神经生长因子（NGF）蛋白变体以及与所述 NGF 蛋白变体连接的异源信号肽，其中，

与野生型 NGF 蛋白相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少至少 50%，

与 SEQ ID NO: 29 所示的信号肽相比，所述异源信号肽使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量增加至少 50%。

2.根据权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述野生型 NGF 蛋白包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

3.根据权利要求 1-2 中任一项所述的重组蛋白，其中所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

4.根据权利要求 1-3 中任一项所述的重组蛋白，其中所述异源信号肽能够使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量达到野生型 NGF 蛋白的 50%以上。

5.根据权利要求 1-4 中任一项所述的重组蛋白，其中所述异源信号肽源自神经营养因子。

6.根据权利要求 1-5 中任一项所述的重组蛋白，其中所述异源信号肽源自脑源性神经营养因子（BDNF），神经营养因子-3（NT-3）和/或神经营养因子-4（NT-4）。

7.根据权利要求 1-6 中任一项所述的重组蛋白，其中所述异源信号肽源自 Gp67、Gp64、蜂毒素（HBM）、白蛋白（Albumin, Alb）、IL-2、天青素前蛋白（Azurocidin preproprotein, APP）、小鼠 IgK、免疫球蛋白重链（Immunoglobulin heavy chain, HC）和/或胱抑素-S 前体（Cystatin-S precursor, Cystatin）。

8.根据权利要求 1-7 中任一项所述的重组蛋白，其中所述异源信号肽为 IgK 信号肽和/或 BDNF 信号肽。

9.根据权利要求 1-8 中任一项所述的重组蛋白，其中所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30-31 中任一项所示的氨基酸序列。

10.根据权利要求 1-9 中任一项所述的重组蛋白，其还包括前导肽。

11.根据权利要求 10 所述的重组蛋白，其中所述前导肽包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

12.根据权利要求 10-11 中任一项所述的重组蛋白，其中自 N 端至 C 端，所述重组蛋白依次包括所述异源信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。

13.根据权利要求 10-12 中任一项所述的重组蛋白，其中自 N 端至 C 端，所述重组蛋白依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽和所述 NGF 蛋白变体。

14.根据权利要求 1-13 中任一项所述的重组蛋白，其包含 SEQ ID NO: 15-20 中任一项所示的氨基酸序列。

15.根据权利要求 1-13 中任一项所述的重组蛋白，其包含 SEQ ID NO: 15 和 19 中任一项所示的氨基酸序列。

16.根据权利要求 1-15 中任一项所述的重组蛋白，其还包括免疫球蛋白的 Fc 区。

17.根据权利要求 16 所述的重组蛋白，其中所述 Fc 区源自人免疫球蛋白和/或小鼠免疫球蛋白。

18.根据权利要求 16-17 中任一项中所述的重组蛋白，其中所述 Fc 区为人 IgG1 的 Fc 区。

19.根据权利要求 16-18 中任一项所述的重组蛋白，其中所述 Fc 区为小鼠 IgG 的 Fc 区。

20.根据权利要求 16-19 中任一项所述的重组蛋白，其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列。

21.根据权利要求 16-20 中任一项所述的重组蛋白，其中自 N 端至 C 端，所述重组蛋白依次包括所述异源信号肽、所述前导肽、所述 NGF 蛋白变体和所述 Fc 区。

22.根据权利要求 16-21 中任一项所述的重组蛋白，其中自 N 端至 C 端，所述重组蛋白依次包括所述 IgK 信号肽、所述前导肽、所述 NGF 蛋白变体和所述 Fc 区。

23.根据权利要求 1-22 中任一项所述的重组蛋白，其包含 SEQ ID NO: 54-55 中任一项所示的氨基酸序列。

24.分离的核酸分子，其编码权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白。

25.根据权利要求 24 所述的核酸分子，其包括 DNA 和/或 RNA。

26.根据权利要求 24-25 中任一项所述的核酸分子，其在选自下组的一个或多个位置处包含修饰：5’帽、5’非翻译区、开放阅读框、3’非翻译区和 poly A 尾。

27.根据权利要求 24-26 中任一项所述的核酸分子，其包含至少一种经修饰的核苷酸。

28.根据权利要求 24-27 中任一项所述的核酸分子，其包含的经修饰的核苷酸包含一种或多种选自下组的核苷酸：N1-甲基假尿苷三磷酸（N1-Methylpseudo-UTP）、假尿苷三磷酸（pseudo-UTP）、5-甲氧基尿苷三磷酸（5-Methoxy-UDP）和 5-甲基胞苷三磷酸（5-Methyl-CTP）。

29.根据权利要求 24-28 中任一项所述的核酸分子，其是密码子优化的。

30.根据权利要求 24-29 中任一项所述的核酸分子，其包含 SEQ ID NO:3-8 和 46-47 中任一项所示的核苷酸序列。

31.根据权利要求 24-30 中任一项所述的核酸分子，其包含 SEQ ID NO:3 和 7 中任一项所示的核苷酸序列。

32.根据权利要求 24-31 中任一项所述的核酸分子，其包含 SEQ ID NO:11-12 中任一项所示的核苷酸序列。

33.根据权利要求 24-32 中任一项所述的核酸分子，其包含 SEQ ID NO:23-28 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列。

34.根据权利要求 16-21 中任一项所述的核酸分子，其包含 SEQ ID NO: 23 和 27 中任一项所示的核苷酸序列。

35.组合物，其包含(a) mRNA，所述 mRNA 包含编码神经生长因子（NGF）蛋白或其变体的多核苷酸，和(b)递送载体。

36.根据权利要求 35 所述的组合物，其中所述 NGF 蛋白包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

37.根据权利要求 35-36 中任一项所述的组合物，其中与 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列相比，所述 NGF 蛋白变体与神经营养因子受体 p75（p75NTR）的结合减少至少 50%。

38.根据权利要求 35-37 中任一项所述的组合物，其中所述 NGF 蛋白变体包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

39.根据权利要求 35-38 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 包含编码异源信号肽的多核苷酸，与 SEQ ID NO: 29 所示的信号肽相比，所述异源信号肽使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量增加至少 50%。

40.根据权利要求 39 所述的组合物，其中所述异源信号肽能够使得所述 NGF 蛋白变体的表达量和/或分泌量达到野生型 NGF 蛋白的 50%以上。

41.根据权利要求 39-40 中任一项所述的组合物，其中所述异源信号肽源自神经营养因子。

42.根据权利要求 39-41 中任一项所述的组合物，其中所述异源信号肽源自脑源性神经营养因子（BDNF），神经营养因子-3（NT-3）和/或神经营养因子-4（NT-4）。

43.根据权利要求 39-42 中任一项所述的组合物，其中所述异源信号肽源自 Gp67、Gp64、蜂毒素（HBM）、白蛋白、IL-2、天青素前蛋白、小鼠 IgK、免疫球蛋白重链和/或胱抑素-S 前体。

44.根据权利要求 39-43 中任一项所述的组合物，其中所述异源信号肽为 IgK 信号肽和/或 BDNF 信号肽。

45.根据权利要求 39-44 中任一项所述的组合物，其中所述异源信号肽包含 SEQ ID NO: 30-31 中任一项所示的氨基酸序列。

46.根据权利要求 35-45 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 还包括编码前导肽的多核

苷酸。

47.根据权利要求 46 所述的组合物，其中所述前导肽包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

48.根据权利要求 46-47 中任一项所述的组合物，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括所述编码异源信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和所述编码 NGF 蛋白或其变体的多核苷酸。

49.根据权利要求 46-48 中任一项所述的组合物，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 IgK 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸。

50.根据权利要求 46-48 中任一项所述的组合物，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 BDNF 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸和编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸。

51.根据权利要求 35-50 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 编码包含如 SEQ ID NO: 14-20 中任一项所示的氨基酸序列。

52.根据权利要求 35-50 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 编码包含如 SEQ ID NO: 15 和 19 中任一项所示的氨基酸序列。

53.根据权利要求 35-52 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 还包含编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

54.根据权利要求 53 所述的组合物，其中所述 Fc 区源自人免疫球蛋白和/或小鼠免疫球蛋白。

55.根据权利要求 53-54 中任一项中所述的组合物，其中所述 Fc 区为人 IgG1 的 Fc 区。

56.根据权利要求 53-55 中任一项所述的组合物，其中所述 Fc 区为小鼠 IgG 的 Fc 区。

57.根据权利要求 53-56 中任一项所述的组合物，其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列。

58.根据权利要求 53-57 中任一项所述的组合物，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括所述编码异源信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸、所述编码 NGF 蛋白变体的多核苷酸和所述编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

59.根据权利要求 53-58 中任一项所述的组合物，其中自 5’端至 3’端，所述 mRNA 依次包括编码所述 IgK 信号肽的多核苷酸、所述编码前导肽的多核苷酸、编码所述 NGF 蛋白变体的多核苷酸和所述编码免疫球蛋白的 Fc 区的多核苷酸。

60.根据权利要求 35-59 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 编码包含 SEQ ID NO: 54-55 中任一项所示的氨基酸序列。

61.根据权利要求 35-60 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 在选自下组的一个或多个位置处包含修饰：5'帽、5'非翻译区、开放阅读框、3'非翻译区和 poly A 尾。

62.根据权利要求 35-61 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 包含至少一种经修饰的核苷酸。

63.根据权利要求 35-62 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 包含的经修饰的核苷酸包含一种或多种选自下组的核苷酸：N1-甲基假尿苷三磷酸（N1-Methylpseudo-UTP）、假尿苷三磷酸（pseudo-UTP）、5-甲氧基尿苷三磷酸（5-Methoxy-UDP）和 5-甲基胞苷三磷酸（5-Methyl-CTP）。

64.根据权利要求 35-63 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 是密码子优化的。

65.根据权利要求 35-64 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 包含如 SEQ ID NO: 22-28 和 50-51 中任一项所示的核苷酸序列。

66.根据权利要求 35-65 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 包含如 SEQ ID NO: 23 和 27 中任一项所示的核苷酸序列。

67.根据权利要求 35-66 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包括脂质体。

68.根据权利要求 35-67 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包括脂质纳米颗粒（LNP）。

69.根据权利要求 35-68 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包括阳离子脂质。

70.根据权利要求 69 所述的组合物，在所述递送载体中，其中所述阳离子脂质的摩尔比为约 45%至约 55%。

71.根据权利要求 69-70 中任一项所述的组合物，其中所述阳离子脂质为 SM102 和 DLin-MC3-DMA。

72.根据权利要求 35-71 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包括非阳离子脂质。

73.根据权利要求 72 所述的组合物，其中所述非阳离子脂质包括磷脂和/或脂质缀合物。

74.根据权利要求 73 所述的组合物，在所述递送载体中，其中所述磷脂的摩尔比为约 35%至约 40%。

75.根据权利要求 73-74 中任一项所述的组合物，其中所述磷脂包括二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）。

76.根据权利要求 73-75 中任一项所述的组合物，其中所述脂质缀合物包括聚乙二醇修饰的脂

分子。

77.根据权利要求 73-76 中任一项所述的组合物，在所述递送载体中，其中所述脂质缀合物的摩尔比为约 1%至约 2%。

78.根据权利要求 76-77 中任一项所述的组合物，其中所述聚乙二醇修饰的脂分子包括 PEG2000-DMG。

79.根据权利要求 35-78 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包括胆固醇。

80.根据权利要求 79 所述的组合物，在所述递送载体中，其中所述胆固醇的摩尔比为约 8%至约 12%。

81.根据权利要求 35-80 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包含阳离子脂质、胆固醇、磷脂和脂质缀合物，且所述阳离子脂质、胆固醇、磷脂和脂质缀合物的质量比为 50:10:38.5:1.5。

82.根据权利要求 35-81 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体包含 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 和 PEG2000-DMPE，且所述 DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC 和 PEG2000-DMPE 的质量比为 50:10:38.5:1.5。

83.根据权利要求 35-82 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体的直径为约 60nm 至约 500nm。

84.根据权利要求 35-83 中任一项所述的组合物，其中所述递送载体的直径为约 80nm 至约 200nm。

85.根据权利要求 35-84 中任一项所述的组合物，其中所述 mRNA 包载在所述递送载体中。

86.载体，其包含权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子。

87.细胞，其包含权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子，和/或权利要求 86 所述的载体，或其表达权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白。

88.制备权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白的方法，所述方法包括在使得权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白表达的条件下，培养根据权利要求 87 所述的细胞。

89.药物组合物，其包含权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体和/或权利要求 87 所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

90.试剂盒或给药装置，其包含权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体、权利要求 87 所述的细胞，和/或权利要求 89 所述的药物组合物。

91.缓解、预防和/或治疗中枢和/或周围神经系统疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体、权利要求 87 所述的细胞，和/或权利要求 89 所述的药物组合物。

92.根据权利要求 91 所述的方法，其中所述中枢和/或周围神经系统疾病包括神经退行性疾病。

93.根据权利要求 91 所述的方法，其中所述中枢和/或周围神经系统疾病包括周围神经病变。

94.根据权利要求 93 所述的方法，其中所述周围神经病变包括中毒性周围神经病变、遗传性周围神经病变和/或代谢性周围神经病变。

95.根据权利要求 91 所述的方法，其中所述中枢和/或周围神经系统疾病包括糖尿病周围神经病变、药物相关性周围神经病变、遗传性运动感觉神经病、周围神经外伤后修复、外伤性视神经炎和/或阿尔茨海默症。

96.权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体、权利要求 87 所述的细胞，和/或权利要求 89 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于缓解、预防和/或治疗中枢和/或周围神经系统疾病。

97.根据权利要求 96 所述的用途，其中所述中枢和/或周围神经系统疾病包括神经退行性疾病。

98.根据权利要求 96 所述的用途，其中所述中枢和/或周围神经系统疾病包括周围神经病变。

99.根据权利要求 98 所述的用途，其中所述周围神经病变包括中毒性周围神经病变、遗传性周围神经病变和/或代谢性周围神经病变。

100.根据权利要求 96 所述的用途，其中所述中枢和/或周围神经系统疾病包括糖尿病周围神经病变、药物相关性周围神经病变、遗传性运动感觉神经病、周围神经外伤后修复、外伤性视神经炎和/或阿尔茨海默症。

101.促进神经生长因子（NGF）蛋白分泌和/或表达的方法，其包括使用权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体、权利要求 87 所述的细胞，和/或权利要求 89 所述的药物组合物。

102.根据权利要求 101 所述的方法，其为非治疗目的的方法。

103.根据权利要求 101 所述的方法，其为体外的和/或离体的方法。

104.促进神经细胞增殖和/或分化的方法，其包括使用权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体、权利要求 87 所述的细胞，和/或权利要求 89 所述的药物组合物。

105.根据权利要求 104 所述的方法，其为非治疗目的的方法。

106.根据权利要求 104 所述的方法，其为体外的和/或离体的方法。

107.修复损伤的神经细胞的方法，其包括使用权利要求 1-23 中任一项所述的重组蛋白、权利要求 24-34 中任一项所述的核酸分子、权利要求 35-85 中任一项所述的组合物、权利要求 86 所述的载体、权利要求 87 所述的细胞，和/或权利要求 89 所述的药物组合物。

108.根据权利要求 107 所述的方法，其为非治疗目的的方法。

109.根据权利要求 107 所述的方法，其为体外的和/或离体的方法。

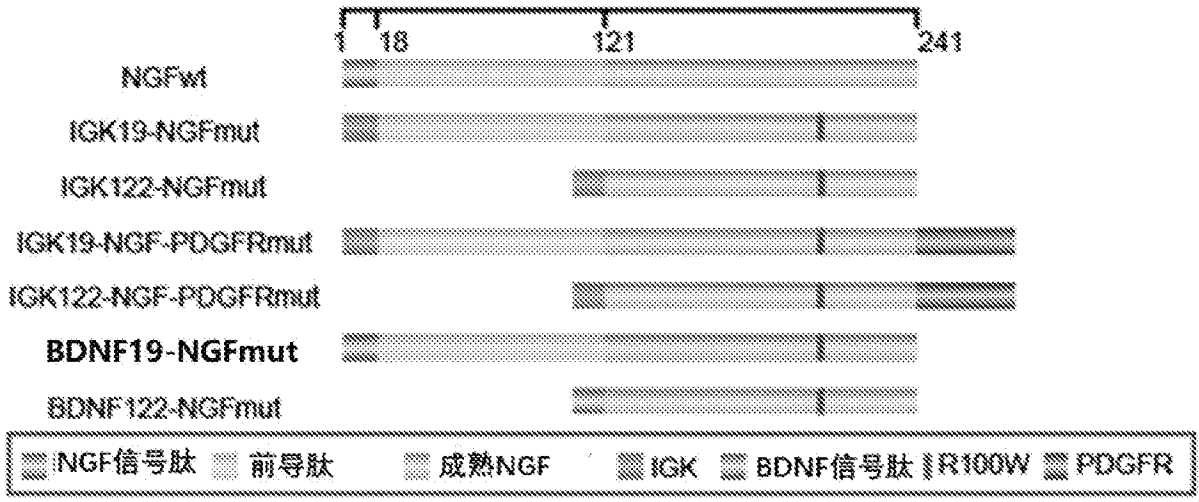
1
18
121
241
NGFwt
IGK19-NGFmut
IGK122-NGFmut
IGK19-NGF-PDGFRmut
IGK122-NGF-PDGFRmut
BDNF19-NGFmut
BDNF122-NGFmut
NGF信号肽
前导肽
成熟NGF
IGK
BDNF信号肽
R100W
PDGFR

图 1A

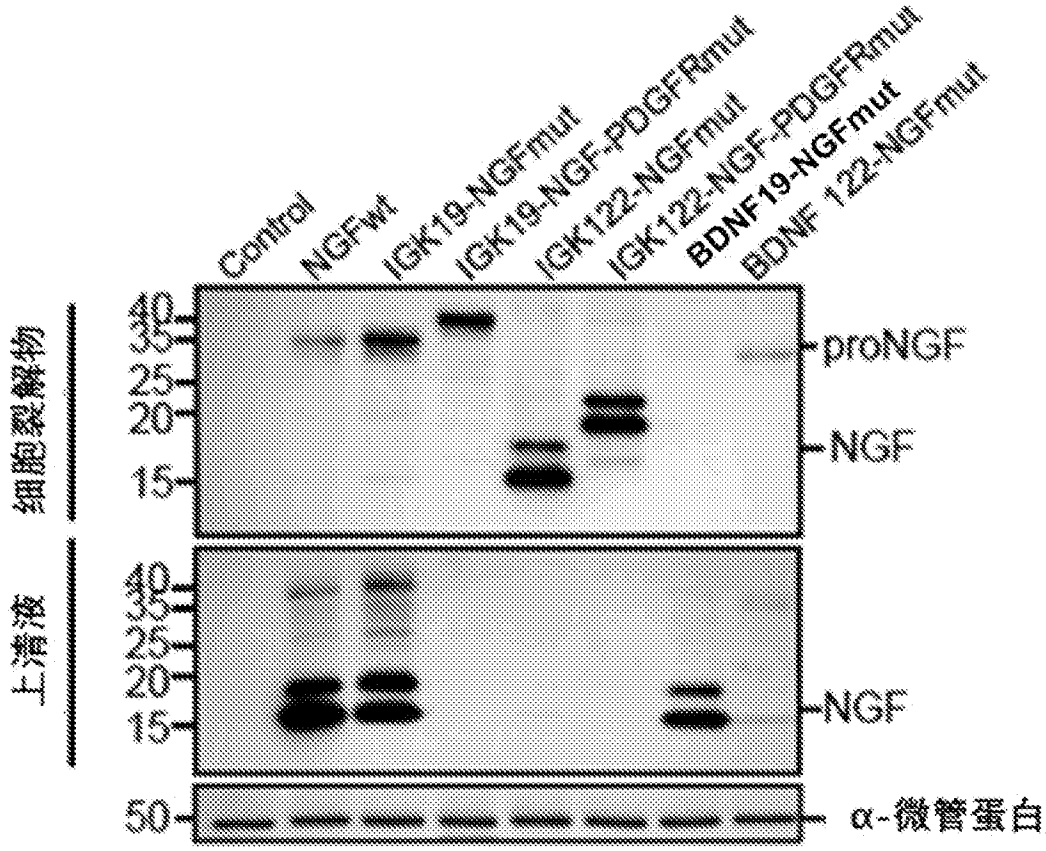
Control
NGFwt
IGK19-NGFmut
IGK19-NGF-PDGFRmut
IGK122-NGFmut
IGK122-NGF-PDGFRmut
BDNF19-NGFmut
BDNF122-NGFmut
细胞裂解物
上清液
40
35
25
20
15
50
proNGF
NGF
NGF
α-微管蛋白

图 1B

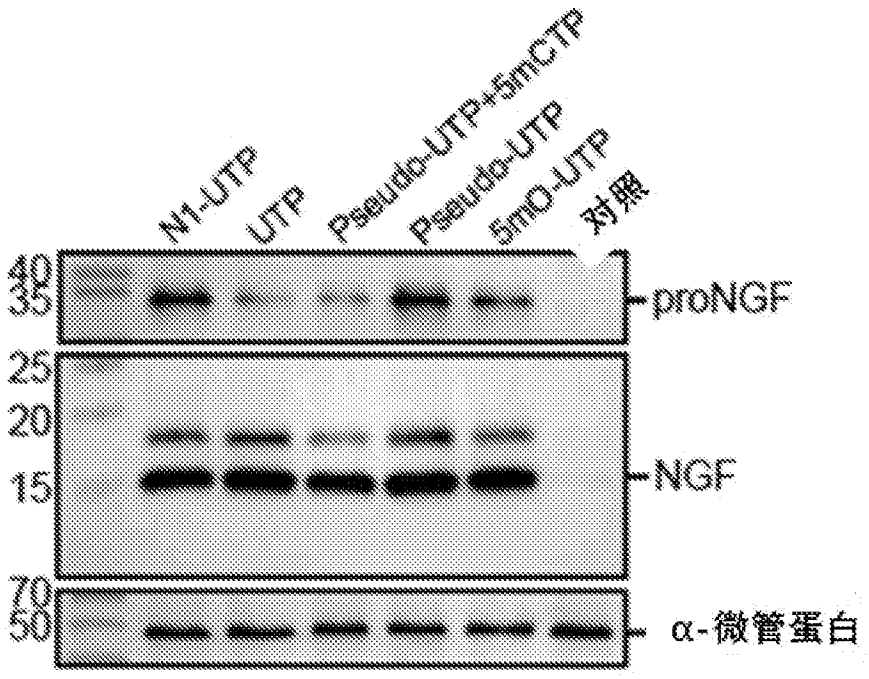
N1-UTP
UTP
Pseudo-UTP+5mCTP
Pseudo-UTP
5mO-UTP
对照
40
35
25
20
15
70
50
proNGF
NGF
α-微管蛋白

图 1C

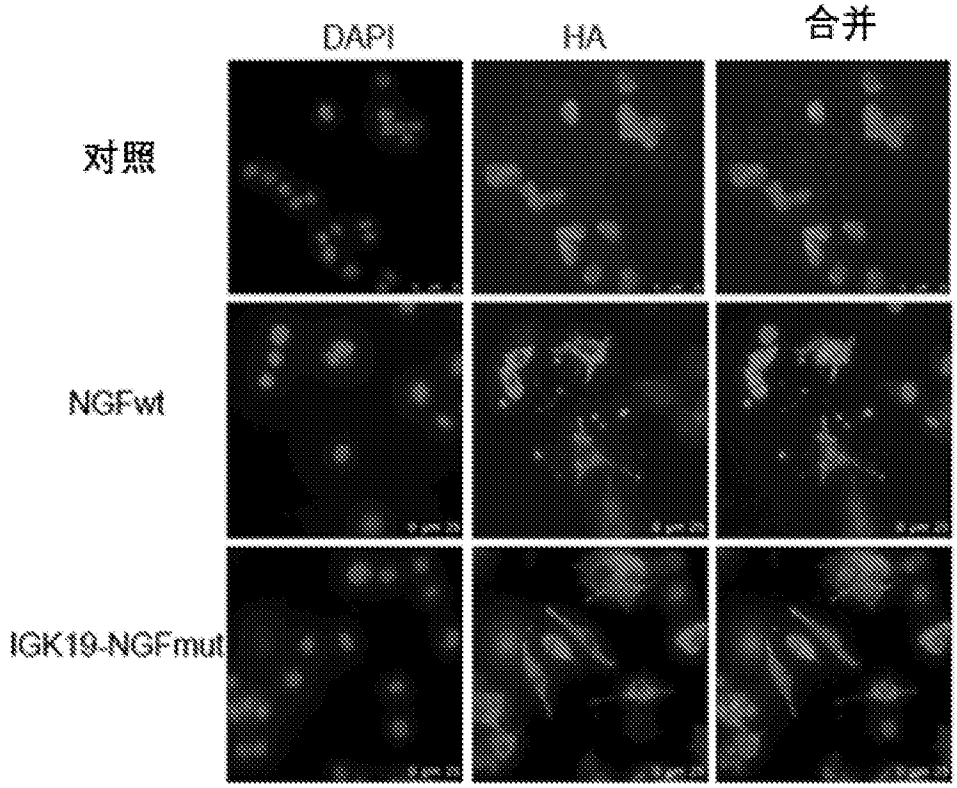
DAPI
HA
合并
对照
NGFwt
IGK19-NGFmut

图 1D

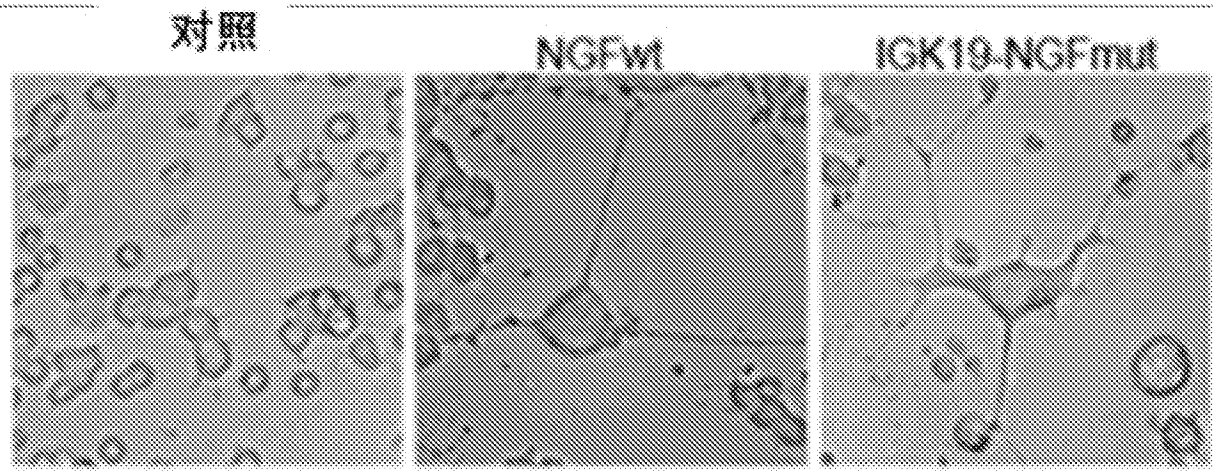
对照
NGFwt
IGK19-NGFmut

图 1E

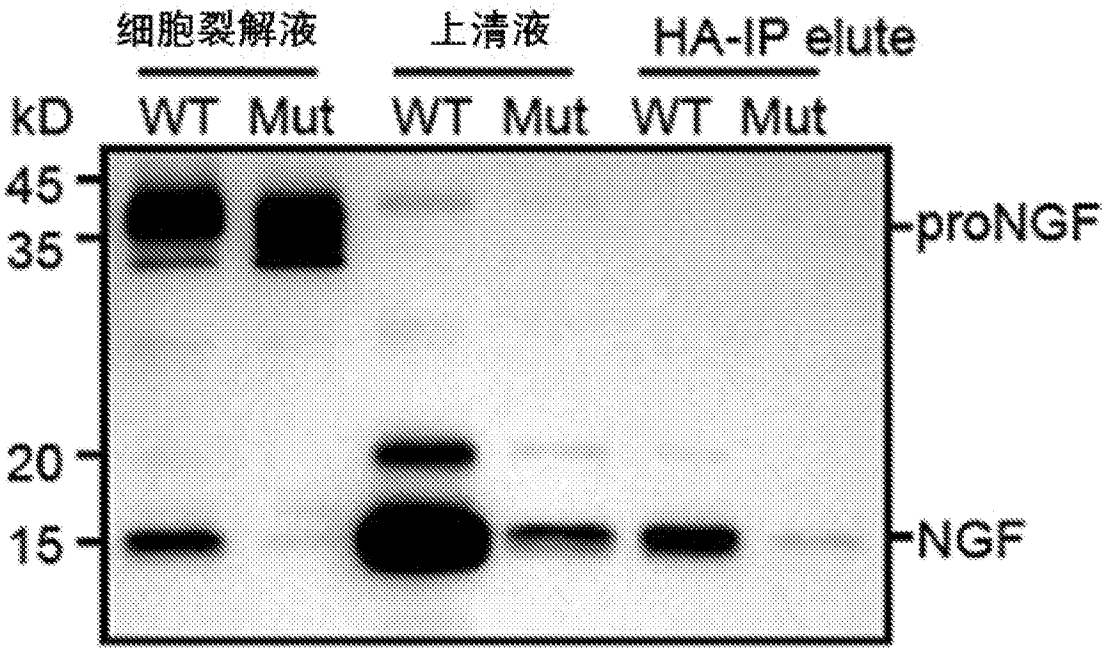
细胞裂解液
上清液
HA-IP elute
kD
WT
Mut
WT
Mut
WT
Mut
45
35
20
15
proNGF
NGF

图 1F

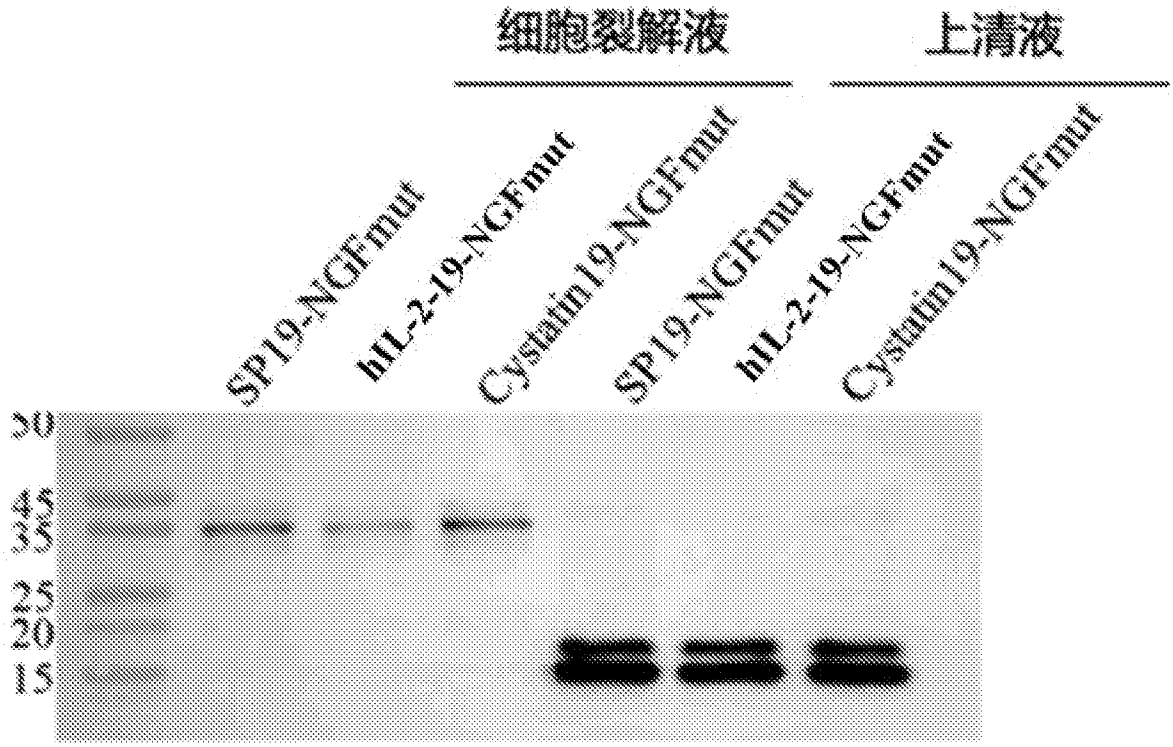
细胞裂解液
上清液
SP19-NGFmut
hIL-2-19-NGFmut
Cystatin19-NGFmut
SP19-NGFmut
hIL-2-19-NGFmut
Cystatin19-NGFmut
30
45
35
25
20
15

图 1G

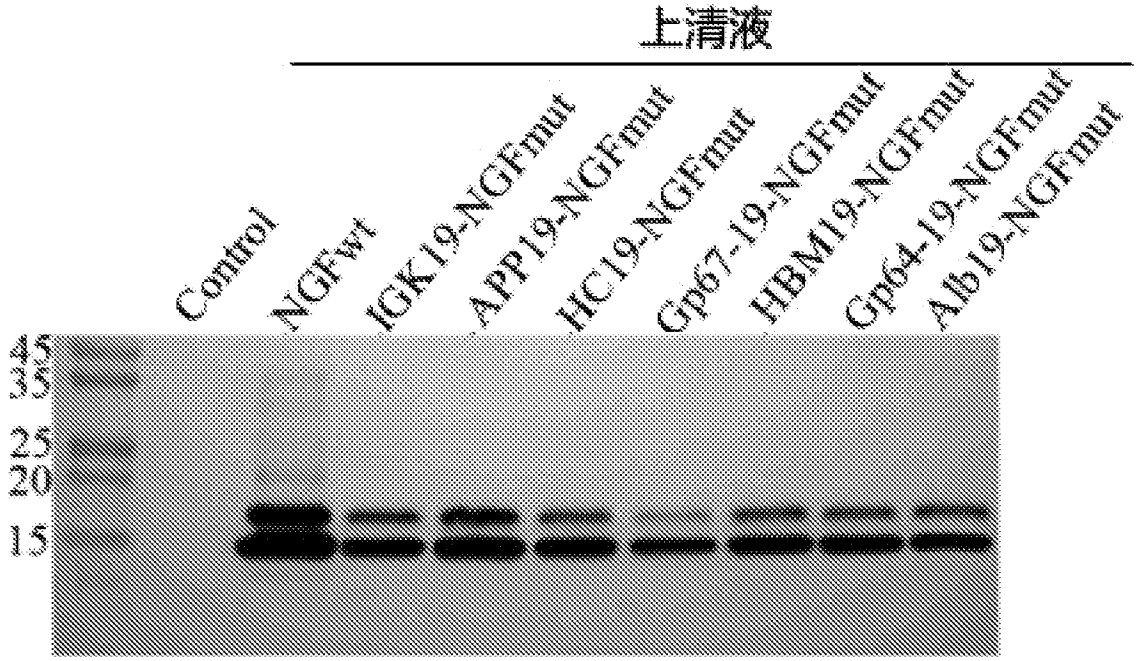
上清液
Control
NGFwt
IGK19-NGFmut
APP19-NGFmut
HC19-NGFmut
Gp67-19-NGFmut
HBM19-NGFmut
Gp64-19-NGFmut
Alb19-NGFmut
45
35
25
20
15

图 1H

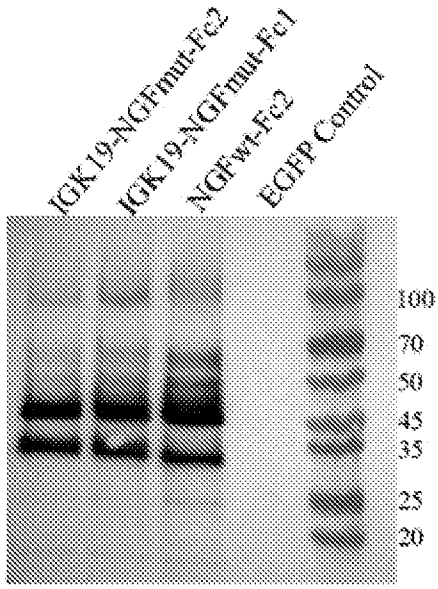
IGK19-NGFmut-Fc2
IGK19-NGFmut-Fc1
NGFwt-Fc2
EGFP Control
100
70
50
45
35
25
20

图 1I

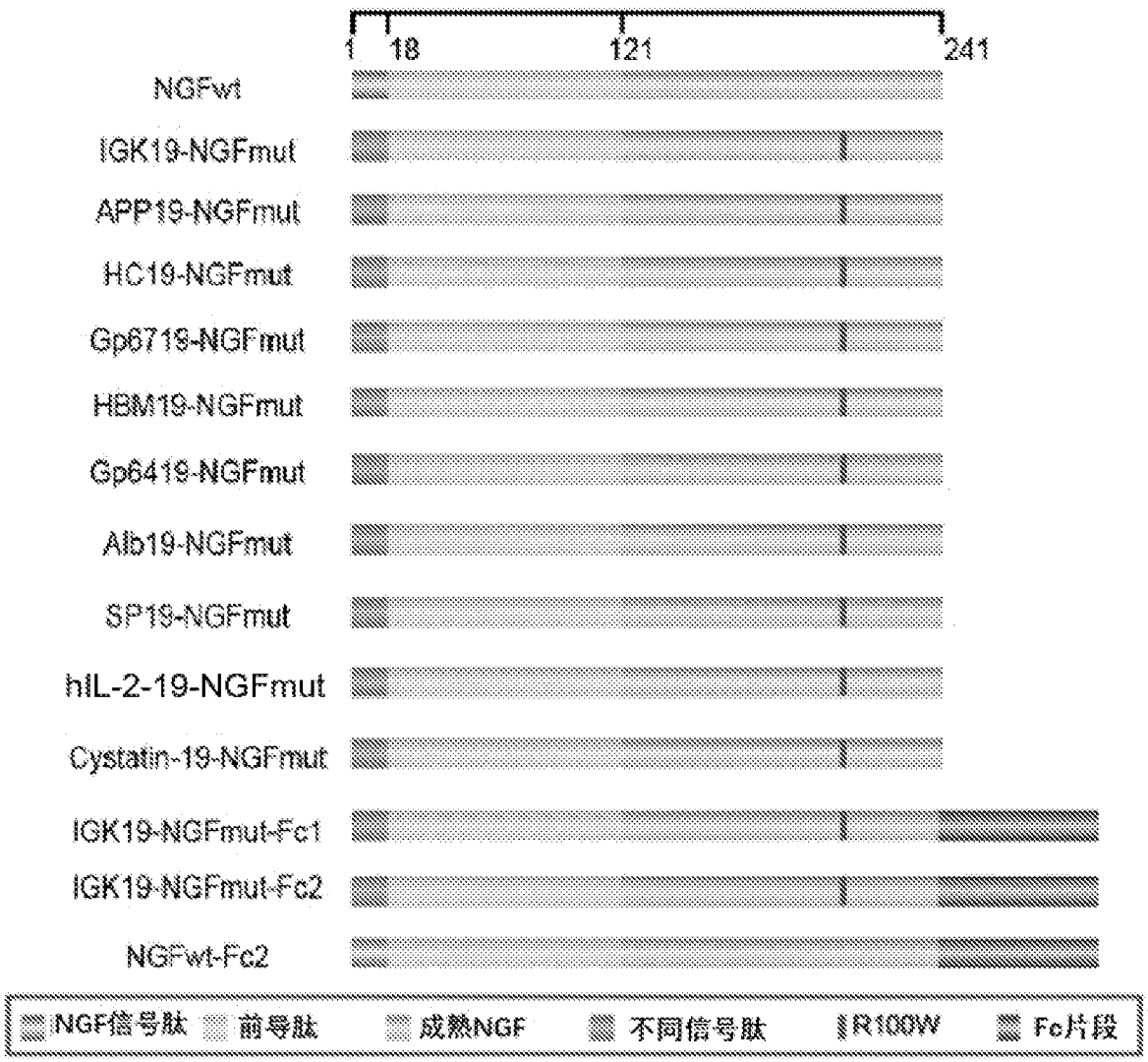
1
18
121
241
NGFwt
IGK19-NGFmut
APP19-NGFmut
HC19-NGFmut
Gp6719-NGFmut
HBM19-NGFmut
Gp6419-NGFmut
Alb19-NGFmut
SP19-NGFmut
hIL-2-19-NGFmut
Cystatin-19-NGFmut
IGK19-NGFmut-Fc1
IGK19-NGFmut-Fc2
NGFwt-Fc2
NGF信号肽
前导肽
成熟NGF
不同信号肽
R100W
Fc片段

图 1J

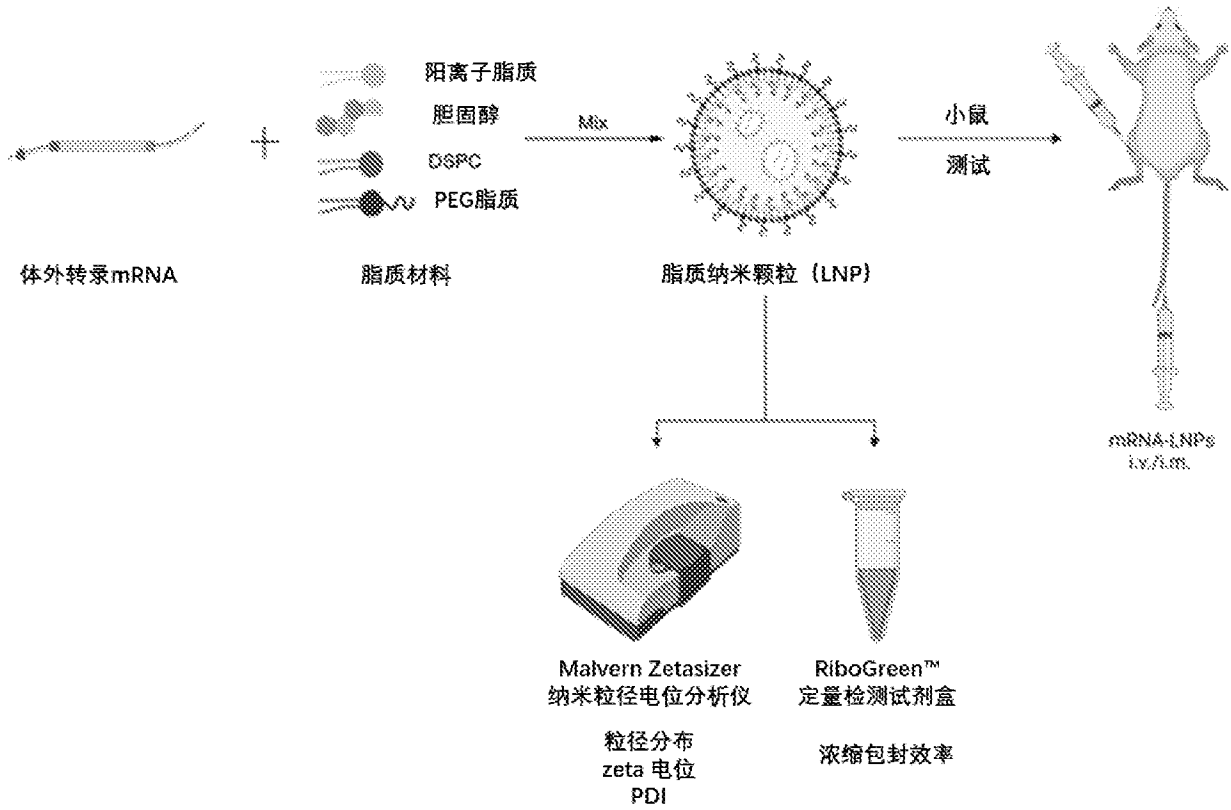
阳离子脂质
胆固醇
DSPC
PEG脂质
Mix
小鼠
测试
体外转录mRNA
脂质材料
脂质纳米颗粒（LNP）
mRNA-LNPs
i.v./i.m.
Malvern Zetasizer
纳米粒径电位分析仪
粒径分布
zeta 电位
PDI
RiboGreen™
定量检测试剂盒
浓缩包封效率

图 2

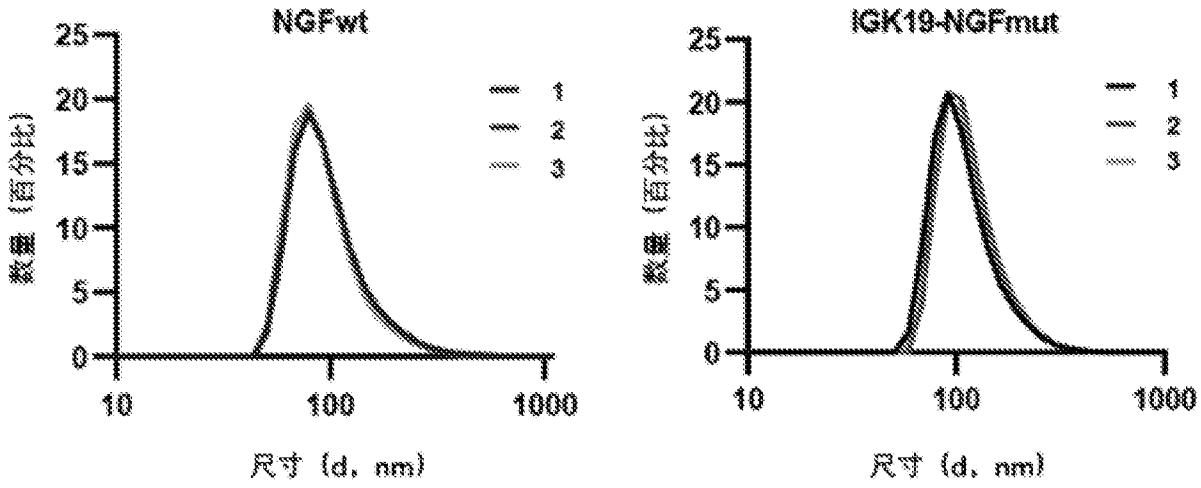
NGFwt
IGK19-NGFmut
数量（百分比）
25
20
15
10
5
0
10
100
1000
尺寸（d，nm）
1
2
3

图 3A

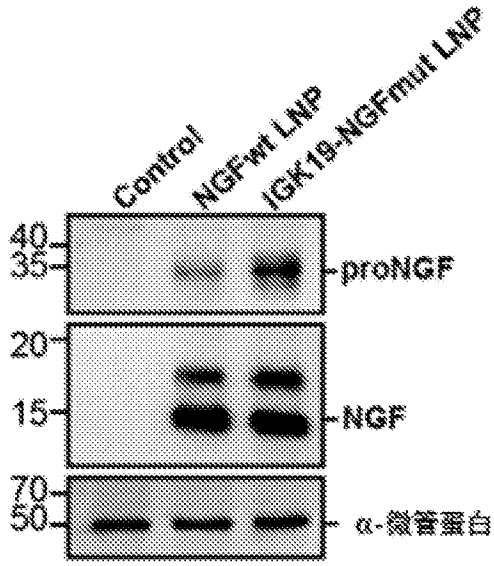
Control
NGFwt LNP
IGK19-NGFmut LNP
40
35
proNGF
20
15
NGF
70
50
α-微管蛋白

图 3B

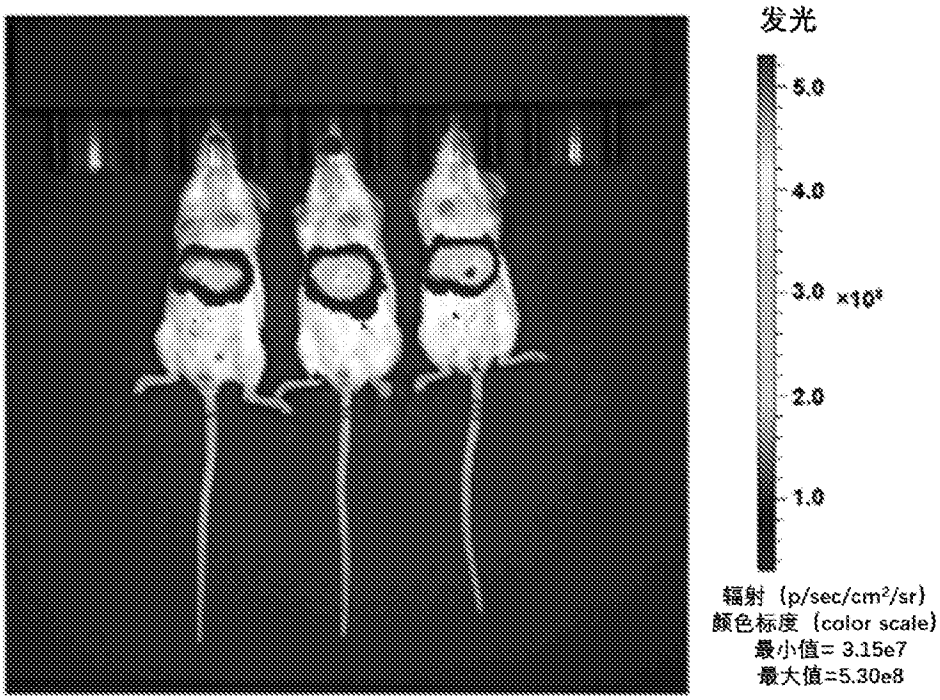
发光
5.0
4.0
3.0 ×10⁸
2.0
1.0
辐射 (p/sec/cm²/sr)
颜色标度 (color scale)
最小值= 3.15e7
最大值=5.30e8

图 3C

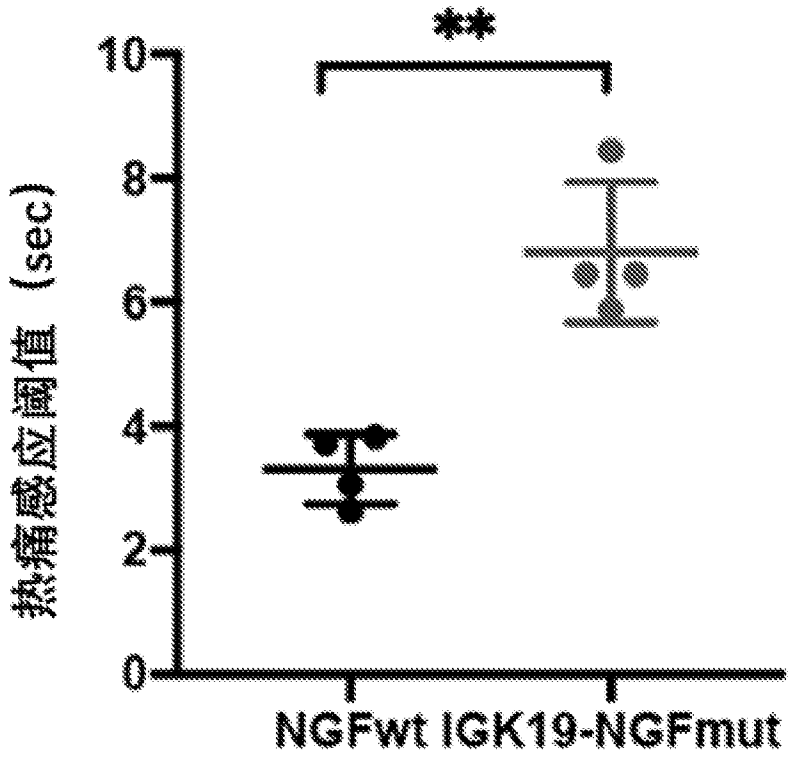
**
10
8
6
4
2
0
热痛感应阈值（sec）
NGFwt IGK19-NGFmut

图 4A

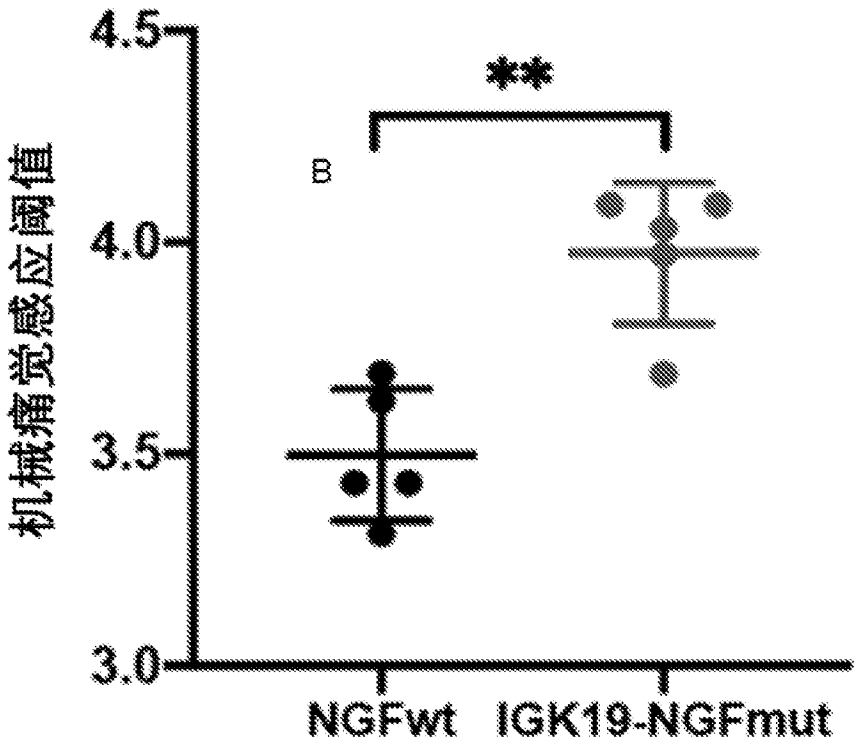
**
B
4.5
4.0
3.5
3.0
机械痛觉感应阈值
NGFwt IGK19-NGFmut

图 4B

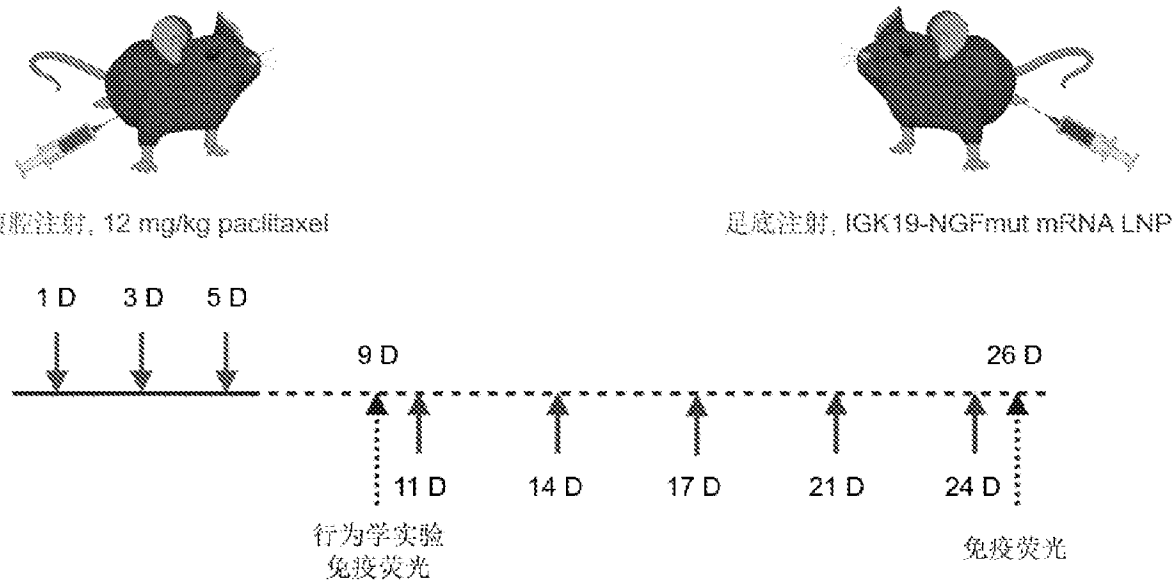
腹腔注射, 12 mg/kg paclitaxel
足底注射, IGK19-NGFmut mRNA LNP
1 D
3 D
5 D
9 D
26 D
11 D
14 D
17 D
21 D
24 D
行为学实验
免疫荧光
免疫荧光

图 5A

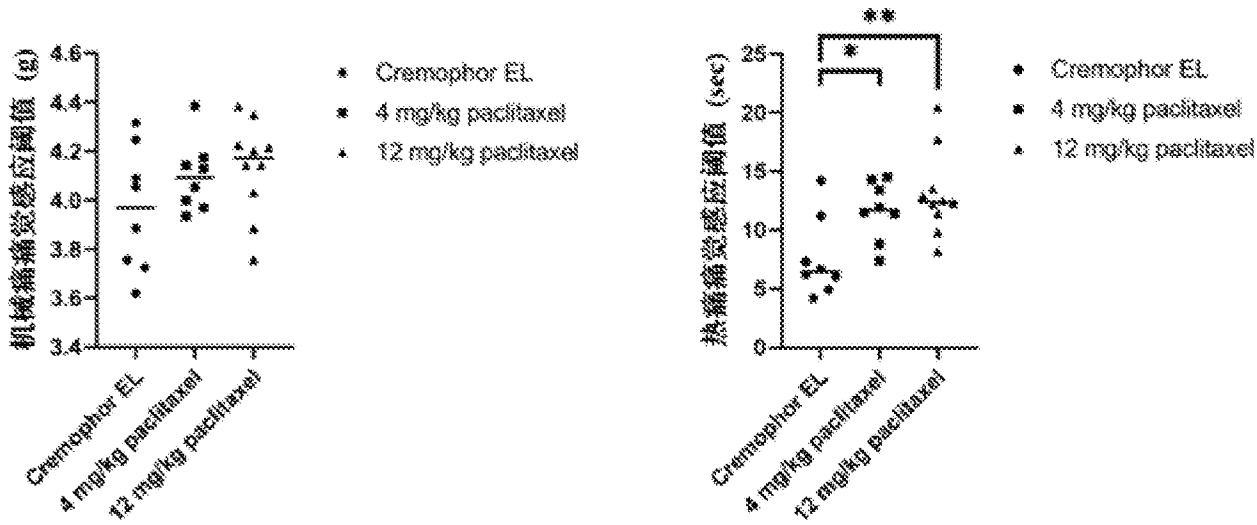
机械痛痛觉感应阈值 (g)
4.6
4.4
4.2
4.0
3.8
3.6
3.4
Cremophor EL
4 mg/kg paclitaxel
12 mg/kg paclitaxel
Cremophor EL
4 mg/kg paclitaxel
12 mg/kg paclitaxel
热痛痛觉感应阈值 (sec)
25
20
15
10
5
0
**
*
Cremophor EL
4 mg/kg paclitaxel
12 mg/kg paclitaxel

图 5B

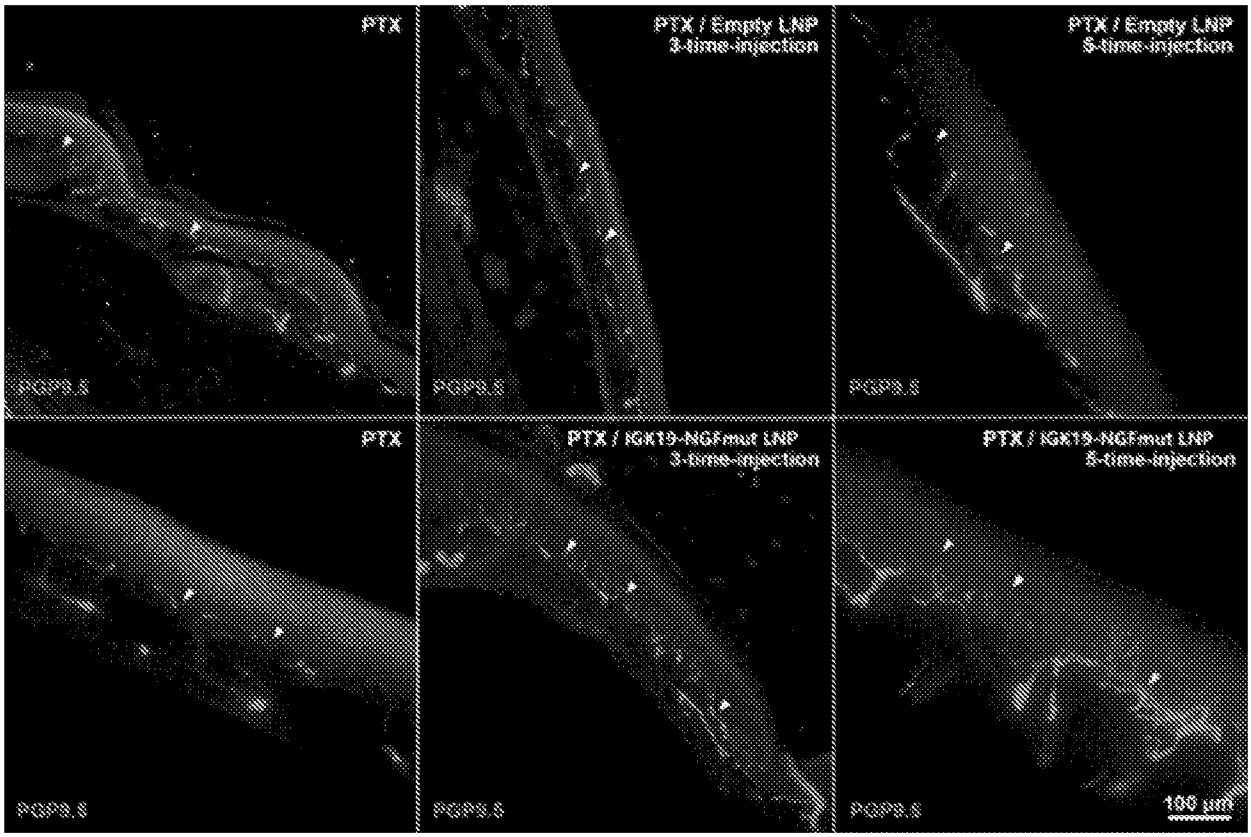
PTX
PTX / Empty LNP
3-time-injection
PTX / Empty LNP
5-time-injection
PTX
PTX / IGK19-NGFmut LNP
3-time-injection
PTX / IGK19-NGFmut LNP
5-time-injection
PGP9.5
100 μm

图 5C

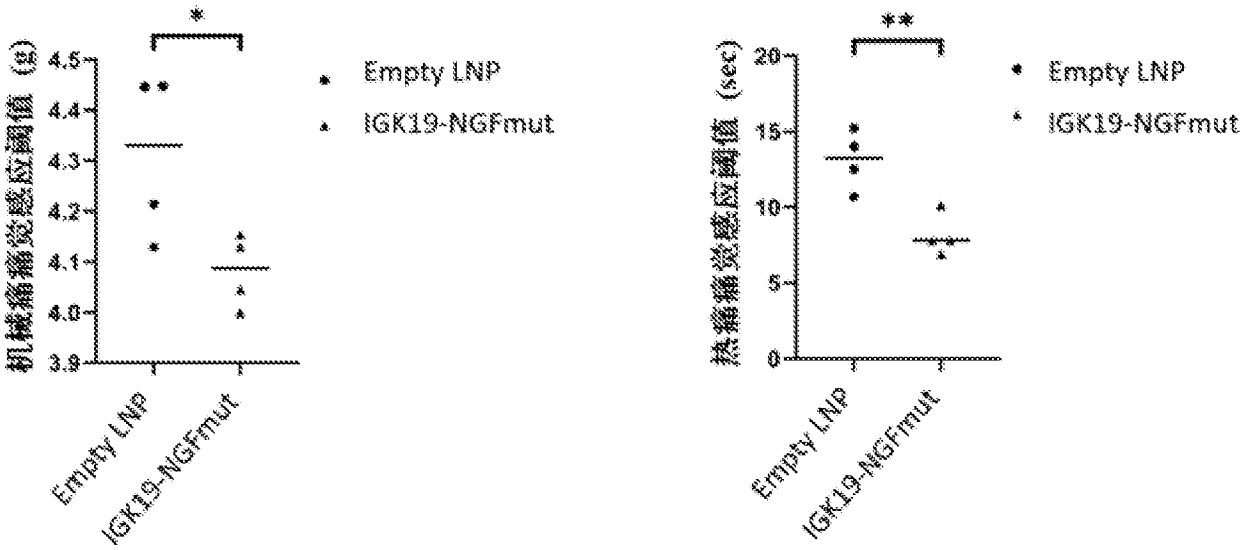
机械痛痛觉感应阈值 (g)
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
*
Empty LNP
IGK19-NGFmut
热痛痛觉感应阈值 (sec)
20
15
10
5
0
**
Empty LNP
IGK19-NGFmut

图 5D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/114516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; C07K

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

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

CNTXT, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀, DUXIU: SEQ ID Nos: 1-70, 神经生长因子, NGF, 融合, 蛋白, 变体, 异源信号肽, 前导肽, FC, R100W, 神经, 疾病, 阿尔茨海默, fusion, protein, variant, heterologous signal peptide, precursor peptide, nerve, disease, Alzheimer.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114933657 A (SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE et al.) 23 August 2022 (2022-08-23) claims 1-10, and description, paragraphs 6-404	1-109
X	US 2008286323 A1 (NSGENE A/S) 20 November 2008 (2008-11-20) claims 1-77 and 82-104, and description, paragraphs 248-303	35-36, 91-109
Y	US 2008286323 A1 (NSGENE A/S) 20 November 2008 (2008-11-20) claims 1-77 and 82-104, and description, paragraphs 248-303	1-34, 37-109
Y	WO 2012170452 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13 December 2012 (2012-12-13) claims 1-17, and description, paragraphs 56-71	1-34, 37-109
Y	CN 110809476 A (QUETHERA LTD.) 18 February 2020 (2020-02-18) claims 1-34, and description, paragraphs 141-143	1-34, 37-109
Y	CN 106008722 A (SINOBIOWAY BIOMEDICINE CO., LTD.) 12 October 2016 (2016-10-12) claims 1-34, and description, paragraphs 21-108	1-34, 37-109

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 November 2022	**23 November 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王倩 等 (WANG, Qian et al.). "GM1和NGF对神经干细胞体外增殖的影响 (Effects of Ganglioside 1 and Nerve Growth Factor on the Proliferation of Neural Stem Cells In Vitro)" *中国当代儿科杂志 (Chinese Journal of Contemporary Pediatrics),* Vol. 11, No. 10, 11 December 2009 (2009-12-11), abstract	1-109
A	YANG, Wanlin et al. "Targeted Mutation (R100W) of the Gene Encoding NGF Leads to Deficits in the Peripheral Sensory Nervous System" *Frontiers in Aging Neuroscience,* Vol. 10, 13 November 2018 (2018-11-13), Article 373:1-9	1-109
A	CN 110869386 A (VIVIBABA INC.) 06 March 2020 (2020-03-06) entire document	1-109

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/114516

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

   [1] The actually submitted sequence table is an XML file in Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/114516

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **91-95**、**101**(部分)、**104**(部分)、**107**(部分)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter set forth in claims 91-95, 101 (when relating to in vivo), 104 (when relating to in vivo), and 107 (when relating to in vivo) relates to a method for treating a human or animal body. Therefore, no international search is performed according to PCT Rule 39.1(iv). A search was made on the basis of a pharmaceutical use of the recombinant protein, nucleic acid molecule, composition, vector, cell, and pharmaceutical composition according to any one of claims 1-89.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/114516

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114933657	A	23 August 2022	None			
US	2008286323	A1	20 November 2008	DK	1709161	T3	26 January 2009
				WO	2005068498	A2	28 July 2005
				EP	1709161	A2	11 October 2006
				ES	2315842	T3	01 April 2009
				DE	602005010047	D1	13 November 2008
				AT	409741	T	15 October 2008
WO	2012170452	A2	13 December 2012	None			
CN	110809476	A	18 February 2020	PL	3606546	T3	08 November 2021
				GB	201705484	D0	17 May 2017
				WO	2018185468	A1	11 October 2018
				EP	3606546	A1	12 February 2020
				ES	2881176	T3	29 November 2021
				KR	20200005549	A	15 January 2020
				US	2020046850	A1	13 February 2020
				MX	2019012000	A	27 January 2020
				AU	2018248651	A1	17 October 2019
				RU	2019131098	A	05 May 2021
				JP	2020516244	A	11 June 2020
				PT	3606546	T	12 July 2021
				CA	3058549	A1	11 October 2018
CN	106008722	A	12 October 2016	None			
CN	110869386	A	06 March 2020	US	2018236031	A1	23 August 2018
				WO	2018148507	A1	16 August 2018
				JP	2020507350	A	12 March 2020
				CA	3053267	A1	16 August 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/114516

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNTXT, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀:SEQ ID Nos:1-70, 神经生长因子, NGF, 融合, 蛋白, 变体, 异源信号肽, 前导肽, FC, R100W, 神经, 疾病, 阿尔茨海默, fusion, protein, variant, heterologous signal peptide, precursor peptide, nerve, disease, Alzheimer.

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114933657 A (上海交通大学医学院等) 2022年8月23日 (2022-08-23) 权利要求1-10，说明书第6-404段	1-109
X	US 2008286323 A1 (NSGENE A/S) 2008年11月20日 (2008-11-20) 权利要求1-77、82-104、说明书第248-303段	35-36、91-109
Y	US 2008286323 A1 (NSGENE A/S) 2008年11月20日 (2008-11-20) 权利要求1-77、82-104、说明书第248-303段	1-34、37-109
Y	WO 2012170452 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2012年12月13日 (2012-12-13) 权利要求1-17，说明书第56-71段	1-34、37-109
Y	CN 110809476 A (奎西拉有限公司) 2020年2月18日 (2020-02-18) 权利要求1-34，说明书第141-143段	1-34、37-109
Y	CN 106008722 A (未名生物医药有限公司) 2016年10月12日 (2016-10-12) 权利要求1-34，说明书第21-108段	1-34、37-109

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年11月8日	2022年11月23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 沈晶晶 电话号码 86-(10)-53961944

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	王倩 等. "GM1和NGF对神经干细胞体外增殖的影响" 中国当代儿科杂志, 第11卷, 第10期, 2009年12月11日 (2009-12-11), 摘要	1-109
A	YANG, W. 等. "Targeted Mutation (R100W) of the Gene Encoding NGF Leads to Deficits in the Peripheral Sensory Nervous System" Frontiers in Aging Neuroscience, 第10卷, 2018年11月13日 (2018-11-13), Article 373:1-9	1-109
A	CN 110869386 A (维维巴巴公司) 2020年3月6日 (2020-03-06) 全文	1-109

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/114516

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

[1] 实际提交的序列表是ST.26标准的XML文件。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/114516

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 91-95、101(部分)、104(部分)、107(部分)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求91-95、101(涉及体内时)、104(涉及体内时)、107(涉及体内时)的保护主题涉及对人体或者动物体进行治疗的方法,因此依据PCT实施细则39.1(iv)不进行国际检索。检索是基于权利要求1-89中任一项所述的重组蛋白、核酸分子、组合物、载体、细胞、药物组合物的制药用途作出。

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

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/114516

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114933657	A	2022年8月23日	无			
US	2008286323	A1	2008年11月20日	DK	1709161	T3	2009年1月26日
				WO	2005068498	A2	2005年7月28日
				EP	1709161	A2	2006年10月11日
				ES	2315842	T3	2009年4月1日
				DE	602005010047	D1	2008年11月13日
				AT	409741	T	2008年10月15日
WO	2012170452	A2	2012年12月13日	无			
CN	110809476	A	2020年2月18日	PL	3606546	T3	2021年11月8日
				GB	201705484	D0	2017年5月17日
				WO	2018185468	A1	2018年10月11日
				EP	3606546	A1	2020年2月12日
				ES	2881176	T3	2021年11月29日
				KR	20200005549	A	2020年1月15日
				US	2020046850	A1	2020年2月13日
				MX	2019012000	A	2020年1月27日
				AU	2018248651	A1	2019年10月17日
				RU	2019131098	A	2021年5月5日
				JP	2020516244	A	2020年6月11日
				PT	3606546	T	2021年7月12日
				CA	3058549	A1	2018年10月11日
CN	106008722	A	2016年10月12日	无			
CN	110869386	A	2020年3月6日	US	2018236031	A1	2018年8月23日
				WO	2018148507	A1	2018年8月16日
				JP	2020507350	A	2020年3月12日
				CA	3053267	A1	2018年8月16日