



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118525098 A

(43) 申请公布日 2024.08.20

(21) 申请号 202280075021.2

(22) 申请日 2022.11.29

(66) 本国优先权数据

202111434384.4 2021.11.29 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/134993 2022.11.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/093905 ZH 2023.06.01

(71) 申请人 上海瑞宏迪医药有限公司

地址 201206 上海市浦东新区自由贸易试
验区新金桥路27号13号楼2楼

(72) 发明人 姜军 吴明月 宁威 廖成

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(54) 发明名称

AADC、GDNF多核苷酸及其用于治疗帕金森病

(57) 摘要

提供AADC、GDNF多核苷酸及其用于治疗帕金森病的用途。具体地,提供了以AAV作为载体的基因递送系统,将芳族L-氨基酸脱羧酶(AADC)和神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)递送到脑部特定区域,用于治疗神经退行性疾病(如帕金森病)的方法和用途。

(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6月1日 (01.06.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/093905 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/864 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/134993

(22) 国际申请日: 2022年11月29日 (29.11.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111434384.4 2021年11月29日 (29.11.2021) CN

(71) 申请人: 上海瑞宏迪医药有限公司 (SHANGHAI REGENEALD THERAPIES CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区自由贸易试验区新金桥路27号13号楼2楼, Shanghai 201206 (CN)。

(72) 发明人: 姜军 (JIANG, Jun); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区新金桥路27号13号楼2楼, Shanghai 201206 (CN)。 吴明月 (WU, Mingyue); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区新金桥路27号13号楼2楼, Shanghai 201206 (CN)。 宁威 (NING, Wei); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区新金桥路27号13号楼2楼, Shanghai 201206 (CN)。 廖成 (LIAO, Cheng); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区新金桥路27号13号楼2楼, Shanghai 201206 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层程伟, Beijing 100738 (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, 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, CV, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(54) Title: AADC/GDNF POLYNUCLEOTIDE, AND USE THEREOF IN TREATING PARKINSON'S DISEASE

(54) 发明名称: AADC、GDNF多核苷酸及其用于治疗帕金森病

(57) Abstract: Provided are an aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)/glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) polynucleotide, and a use thereof in treating Parkinson's disease. Specifically, provided are a method for and a use in treating neurodegenerative diseases (such as Parkinson's disease) by delivering AADC and a GDNF to specific areas of the brain by a gene delivery system using AAV as a vector.

(57) 摘要: 提供AADC、GDNF多核苷酸及其用于治疗帕金森病的用途。具体地, 提供了以AAV作为载体的基因递送系统, 将芳族L-氨基酸脱羧酶(AADC)和神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)递送到脑部特定区域, 用于治疗神经退行性疾病(如帕金森病)的方法和用途。



WO 2023/093905 A1

AADC、GDNF 多核苷酸及其用于治疗帕金森病

5 本公开要求 2021 年 11 月 29 日提交的中国专利申请(申请号 CN202111434384.4)的
优先权。

技术领域

本公开涉及基因治疗领域,特别涉及用于治疗帕金森病的基因治疗药物组合物
和治疗方法。具体而言,本公开涉及以 AAV 作为载体的基因递送系统,将芳族 L-
10 氨基酸脱羧酶(AADC)和神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)递送到脑部特定
区域,用于治疗帕金森病。

背景技术

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中枢神经系统(CNS)的进行性神经变性性
15 疾病,主要影响黑质(SN)中的多巴胺能(DA)神经元。PD 在临床上以静止性震颤、
运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍为主要特征,发病 10 到 15 年内可导致患者明
显残障,严重影响患者生存质量。有关 PD 的病因迄今尚不明了,既往研究表明可
能与诸多因素有关,包括年龄老化、遗传因素、环境毒物、感染、氧化应激及自
由基形成等。PD 主要的运动症状导因于中脑黑质细胞死亡,使患者相关脑区的多
20 多巴胺不足。

芳族 L-氨基酸脱羧酶(Amino Acid Decarboxylase, AADC)是一种同源二聚体的
磷酸吡哆醛依赖性的酶,其负责多巴胺和血清素的合成,能催化 L-3, 4-二羟基苯
丙氨酸(L-DOPA 或左旋多巴)脱羧为多巴胺。AADC 缺陷会导致血清素和儿茶酚胺
缺乏,神经递质 DOPA 减少,从而引起严重的运动功能障碍和自主功能障碍(Nutt et
25 al. 2020; Pons et al. 2004)。

胶质细胞源性神经营养因子(Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor,
GDNF)在中枢神经系统的不同脑区均有表达,较为肯定的细胞来源有 I 型星状胶
质细胞、黑质-纹状体系统和基底前脑的神经元等。在 DA 神经元投射区如基底节、
嗅结节,与某些运动有关的神经结构如无名质、小脑蒲肯野细胞和三叉神经运动
30 核,与某些感觉有关的结构如丘脑、三叉神经感觉核、脊髓后角和背根节以及蓝
斑核等,均有相当的 GDNF mRNA 表达(Golden et al. 1998)。GDNF 属于神经营养
因子(NTFs),对 DA 神经元有高度的亲和力,是 DA 神经元的一个高度特异性神
经营养因子。GDNF 的作用方式主要是靶源性的,另外可能还有旁分泌和自分泌
的作用方式,作用力强且神经营养作用更为广谱(Lin et al. 1993)。研究显示,
35 GDNF 对体外培养的胚胎中脑 DA 能神经元有明显的营养,促存活与分化作用,使神
经元胞体增大、轴突延长(Lin et al. 1993);在体内,对黑质、纹状体 DA 能系统亦有
保护和修复作用(Wang et al. 2002)。用 MPTP 处理小鼠,或用 6-羟基多巴(6-OHDA)

处理大鼠,处理之前或之后注射 GDNF 于黑质或纹状体,能降低 MPTP 或 6-OHDA 对 DA 能神经元的损伤,阻止 DA 能神经元的退变,诱导残存的 DA 能神经元长出新的突起,恢复其 DA 水平和 DA 能神经纤维的密度,动物的运动行为亦有明显改善(Kearns et al. 1997; D. Kirik et al. 2001; D. Kirik, Rosenblad, and Bjorklund 2000; 5 Deniz Kirik, Georgievska, and Björklund 2004; Wang et al. 2002)。

重组腺相关病毒 (rAAV) 源于非致病的野生型腺相关病毒,具有安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低,在体内表达外源基因时间长的特点,被视为最有前途的基因递送载体之一,在世界范围内的基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用(Snyder 1999; Xiao, Lentz, and Samulski 2012)。

10 目前治疗 PD 最成功的上市药物是多巴胺类药左旋多巴胺(L-DOPA)。但是,随着治疗时间的持续,由于多巴胺能神经元的进行性死亡和 AADC 活性的丢失,多巴胺疗法的益处逐步丢失,进而导致长期服用药物的剂量依赖性增加。而高剂量多巴胺的全身给药伴随着较强的副作用,如近期副作用(胃肠反应、心血管副作用、睡眠障碍和精神症状差等),远期副作用(异动症、运动波动、晨僵、起效延迟 15 等)。因此,提供高安全性、长期有效的治疗药物是亟待解决的问题。本公开提供了改进的多核苷酸构建体,通过基因治疗手段,利用 AAV 及其衍生载体,将 AADC、GDNF 等基因包裹在 AAV 外壳内,递送到脑部的特定区域(例如纹状体),用于治疗 PD。

20 发明内容

本公开提供了一种表达 AADC 蛋白和/或 GDNF 蛋白的多核苷酸、重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,相关表达盒、质粒、载体、宿主细胞、药物组合物,及其用于治疗、缓解或预防神经退行性疾病(例如帕金森病)的方法和相关制药用途。

AADC 和/或 GDNF 多核苷酸序列

25 本公开提供一种核酸分子,其包含编码 AADC 蛋白(所述 AADC 蛋白的编码氨基酸序列例如 SEQ ID NO:1 所示)的多核苷酸,所述多核苷酸与 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 90%、至少 95%同一性(例如具有至少 80.83%、至少 81.21%、至少 79.18%、至少 79.63%或以上同一性),或与 SEQ ID NO:4-7 任一具有至少 95%同一性。一些实施方案中,所述 AADC 蛋白的 30 编码多核苷酸包含如 SEQ ID NO: 3-7 任一所示的多核苷酸序列。

本公开提供一种核酸分子,其包含编码 GDNF 蛋白(所述 AADC 蛋白的编码氨基酸序列例如 SEQ ID NO:2 所示)的多核苷酸,所述多核苷酸与 SEQ ID NO:8 具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%同一性(例如具有至少 75.13%、至少 73.99%、至少 77.52%、至少 77.83%或以上同一性),或与 SEQ ID NO:9-12 35 任一具有至少 95%同一性。一些实施方案中,所述 GDNF 蛋白的编码多核苷酸包含如 SEQ ID NO:8-12 任一所示的多核苷酸序列。

本公开的一些实施方案中，AADC 蛋白、GDNF 蛋白涵盖其类似物。

本公开提供一种核酸分子，其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸，其中，所述第一多核苷酸包含编码 AADC 蛋白(所述 AADC 蛋白的编码氨基酸序列例如 SEQ ID NO:1 所示)的多核苷酸，第二多核苷酸包含编码 GDNF 蛋白(所述 AADC 蛋白的编码氨基酸序列例如 SEQ ID NO:2 所示)的多核苷酸。在一些实施方案中，所述第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作地连接，第一多核苷酸和第二多核苷酸可以位于同一条多核苷酸或同一质粒、同一表达盒中。在另外一些实施方案中，或所述第一多核苷酸和第二多核苷酸相互独立地存在于两条相互独立存在的多核苷酸、或两个相互独立存在的不同的质粒、两个不同的表达盒中。

一些实施方案中，所述 AADC 蛋白的氨基酸序列包含或如 SEQ ID NO:1 所示，所述 GDNF 蛋白的氨基酸序列包含或如 SEQ ID NO:2 所示。

一些实施方案中，所述编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸序列和/或编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸序列是经密码子优化的。例如，所述编码 AADC 蛋白的经密码子优化的多核苷酸序列与 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 同一性；所述编码 GDNF 蛋白的经密码子优化的多核苷酸序列与 SEQ ID NO:8 具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 同一性。

一些实施方案中，所述编码 AADC 蛋白的多核苷酸序列包含与 SEQ ID NO:4-7 任一具有至少 95% 同一性的序列，和/或所述编码 GDNF 蛋白的多核苷酸序列包含与 SEQ ID NO:9-12 任一具有至少 95% 同一性的序列。一些具体实施方案中，所述编码 AADC 的多核苷酸序列包含或如 SEQ ID NO:3-7 任一所示的多核苷酸序列；所述编码 GDNF 的多核苷酸序列包含或如 SEQ ID NO: 8-12 任一所示的多核苷酸序列。

本公开中，“至少 95% 同一性”意为涵盖至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或以上同一性。

所述表达 AADC 蛋白的经密码子优化的多核苷酸(例如 SEQ ID NO:4-7 任一)较之野生型或非密码子优化的多核苷酸(例如 SEQ ID NO:3)，使得 AADC 蛋白的表达量增加。所述表达 GDNF 蛋白的经密码子优化的多核苷酸(例如 SEQ ID NO:9-12 任一)较之野生型或非密码子优化的多核苷酸(例如 SEQ ID NO:8)，使得 GDNF 蛋白的表达量增加。所述增加是较之野生型或非密码子优化的多核苷酸具有至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 50%、至少 75%、至少 100%、至少数倍(包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或以上)的蛋白表达量的增加。

一些实施方案中，本公开提供的核酸分子进一步包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作地连接在同一表达控制序列，或者分别与所述第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作地连接的两个相同或不同的表达控制序列。其中，所述表达控制序列包含(c) 启动子和/或(d) 增强子。

一些实施方案中，本公开提供的核酸分子进一步包含如下的任意一种或任意组合：

- (a) 5'反向末端重复(5' ITR)；
- (b) 3'反向末端重复(3' ITR)；
- 5 (e) 内含子(intron)；
- (f) 转录后调控元件；
- (g) 多聚腺苷酸化信号(polyA)；
- (h) 多克隆位点(MCS)。

一些具体实施方案中，(a)-(h)的任意组合能够满足使得目的基因(AADC 和/或 GDNF)表达的功能(例如在受试者大脑中(例如黑质、纹状体)表达)的功能。

一些具体实施方案中，所述(a)-(h)的任一项的多核苷酸或任意组合与所述 AADC 蛋白的编码多核苷酸和/或所述 GDNF 蛋白的编码多核苷酸可操作地连接。

一些具体实施方案中，所述 5' ITR 和/或 3' ITR 源自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、15 AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ 或 AAV-DJ8；例如，源自 AAV2、AAV9。

一些具体实施方案中，所述启动子选自 CMV、CAG、CBh、EFS、EF1(例如 EF-1 α)、PGK、SV40、Ubi、RSV 或其任意组合。

一些具体实施方案中，所述增强子选自 Ubi、CMV、RSV 增强子或其任意组合。

一些具体实施方案中，所述内含子选自 MVM、SV40、 β Globin、EF1(例如 EF-1 α)、杂合内含子，或其任意组合。

一些具体实施方案中，所述 polyA 选自 PA75 polyA、SV40 polyA、hGH polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或其任意组合。

一些具体实施方案中，所述转录后调控元件选自 WPRE、HPRE 或其组合。

一些实施方案中，所述核酸分子包含编码 AADC 蛋白的多核苷酸、CMV 增强子(例如，CMV 增强子 1)和 CBA 启动子，可选地，所述第一多核苷酸还包含杂合内含子、polyA，所述 polyA 选自 SV40 polyA、hGH polyA；和/或所述核酸分子包含编码 GDNF 蛋白的多核苷酸、CMV 增强子(例如，CMV 增强子 2)和 CMV 启动子，可选地，所述第二多核苷酸还包含 β 球蛋白内含子、polyA，所述 polyA 选自 PA75 polyA、SV40 polyA；其中，所述 CMV 增强子 1、CMV 增强子 2 均为 CMV 增强子，两者可以相同或者不同。

一些实施方案中，所述多核苷酸中的 AADC 和 GDNF 可以单独用不同表达框架或者通过连接子(例如 P2A 序列)连接共用一个表达框架。

第一多核苷酸与第二多核苷酸可操作地连接，使 AADC 蛋白和 GDNF 蛋白在受试者的同一目标施用位置表达，可避免由于两者施用位置不一致导致影响两者

联用的治疗效果，并能降低某一蛋白向其他位置渗漏造成的副作用。参见本公开实施例，第一多核苷酸与第二多核苷酸可操作地连接后施用于患病模型小鼠，结果发现可发挥显著的治疗效果。

5 一些实施方案中，第一多核苷酸和第二多核苷酸通过第三多核苷酸连接，例如，所述第三多核苷酸编码具有连接子功能的氨基酸序列。连接顺序可以是 5' 端到 3' 端为第一多核苷酸-第三多核苷酸-第二多核苷酸，或从 5' 端到 3' 端为第二多核苷酸-第三多核苷酸-第一多核苷酸。一些具体实施方案中，所述第三多核苷酸编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43-46 任一所示，例如，所述第三多核苷酸的序列如 SEQ ID NO: 47-50 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%、至少 95%、
10 至少 98% 同一性。

一些实施方案中，所述编码 AADC 蛋白的多核苷酸和编码 GDNF 蛋白的多核苷酸为同一个调控元件调控表达，或分别为两个不同的调控元件调控表达。所述调控元件包括但不限于 5'ITR、3'ITR、启动子、增强子、内含子、polyA、转录后调控元件等。

15 一些实施方案中，所述核酸分子从 5' 端至 3' 端包含：

a) CMV 增强子、CBA 启动子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA；

在一些可选的实施方案中，在 CBA 启动子和编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸之间还包含杂合内含子；

20 在一些可选的实施方案中，在编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列。

在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、WPRE 序列和 polyA。

25 b) CMV 增强子、CBA 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA；

在一些可选的实施方案中，在 CBA 启动子和编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸之间还包含杂合内含子；

30 在一些可选的实施方案中，在编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列。

在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、WPRE 序列和 polyA。

35 c) CMV 增强子、CBA 启动子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、polyA、CMV 增强子、CMV 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA；

在一些可选的实施方案中，在 CBA 启动子和编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸

之间还包含杂合内含子；

在一些可选的实施方案中，在 CMV 启动子和编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸之间还包含 β 球蛋白内含子；

5 在一些可选的实施方案中，在编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列。

在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：

CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、polyA、CMV 增强子 2、CMV 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA；或者，

10 CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、polyA、CMV 增强子 2、CMV 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、WPRE 序列和 polyA；或者，

CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、polyA、CMV 增强子 2、CMV 启动子、 β 球蛋白内含子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA。

d) CMV 增强子、CMV 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、polyA、CMV 增强子、CBA 启动子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA；

在一些可选的实施方案中，在 CMV 启动子和编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸之间还包含 β 球蛋白内含子或 MVM 内含子；

20 在一些可选的实施方案中，在 CBA 启动子和编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸之间还包含杂合内含子；

在一些可选的实施方案中，在编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：

25 CMV 增强子 2、CMV 启动子、 β 球蛋白内含子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA；

CMV 增强子 2、CMV 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、WPRE 序列和 polyA；或者，

30 CMV 增强子 2、CMV 启动子、MVM 内含子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、WPRE 序列和 polyA。

e) CMV 增强子、CBA 启动子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、第三多核苷酸、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA；

在一些可选的实施方案中，在 CBA 启动子和编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸

之间还包含杂合内含子；

在一些可选的实施方案中，在编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

5 在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、第三多核苷酸、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、WPRE 序列和 polyA。

f) CMV 增强子、CBA 启动子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、第三多核苷酸、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA；

10 在一些可选的实施方案中，在 CBA 启动子和编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸之间还包含杂合内含子；

在一些可选的实施方案中，在编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

15 在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、编码 GDNF 蛋白的第二多核苷酸、第三多核苷酸、编码 AADC 蛋白的第一多核苷酸、WPRE 序列和 polyA。

g) CMV 增强子、CBA 启动子、第一多核苷酸或第二多核苷酸，和 polyA；

在一些可选地实施方案中，在 CBA 启动子和第一多核苷酸之间还包含杂合内含子，或所述 CBA 和所述第二多核苷酸之间还包含杂合内含子；

20 在一些可选地实施方案中，在第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列，或者，在第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

在一些具体的实施方案中，核酸分子包含：CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、第一多核苷酸和 polyA；

CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、第二多核苷酸和 polyA；

25 或者，
CMV 增强子、CBA 启动子、杂合内含子、第二多核苷酸、WPRE 序列和 polyA。

在一些实施方案中，所述 polyA 选自 hGH polyA、PA75 polyA 或 SV40 polyA。

一些实施方案中，提供多核苷酸，所述核酸分子从 5' 端至 3' 端包含：

30 (1) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-第三多核苷酸-编码 GDNF 的第二多核苷酸-WPRE-SV40 polyA；

(2) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-第三多核苷酸-编码 AADC 的第一多核苷酸-WPRE-SV40 polyA；

(3) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-SV40 polyA-CMV 增强子-CMV 启动子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 polyA；

35 (4) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-SV40 polyA-CMV 增强子-CMV 启动子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-WPRE-PA75 polyA；

(5) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-SV40 polyA-CMV 增强子-CMV 启动子-β 球蛋白内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 polyA;

5 (6) CMV 增强子-CMV 启动子-β 球蛋白内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 poly A-CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-SV40 polyA;

(7) CMV 增强子-CMV 启动子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 poly A-CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-WPRE-SV40 polyA; 或

10 (8) CMV 增强子-CMV 启动子-MVM 内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 poly A-CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 AADC 的第一多核苷酸-WPRE-SV40 polyA。

一些实施方案中, 提供多核苷酸, 其从 5'到 3'方向包含如下的 1)-13)或其任意组合:

15 1) 5'ITR、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸或 GDNF 编码多核苷酸、hGH polyA、3'ITR;

2) 5'ITR、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸或 GDNF 编码多核苷酸、SV40 polyA、3'ITR;

20 3) 5'ITR、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸或 GDNF 编码多核苷酸、WPRE、SV40 polyA、3'ITR;

4) 5'ITR、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、P2A、GDNF 编码多核苷酸、WPRE、SV40 polyA、3'ITR;

5) 5'ITR、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、GDNF 编码多核苷酸、P2A、AADC 编码多核苷酸、WPRE、SV40 polyA、3'ITR;

25 6) 5'ITR、MCS、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、SV40 polyA、CMV 增强子 2、CMV 启动子、GDNF 编码多核苷酸、PA75 polyA、3'ITR;

30 7) 5'ITR、MCS、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、SV40 polyA、CMV 增强子 2、CMV 启动子、GDNF 编码多核苷酸、WPRE、PA75 polyA、3'ITR;

8) 5'ITR、MCS、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、SV40 polyA、CMV 增强子 2、CMV 启动子、β 球蛋白内含子、GDNF 编码多核苷酸、PA75 polyA、3'ITR;

35 9) 5'ITR、CMV 增强子 2、CMV 启动子、β 球蛋白内含子、GDNF 编码多核苷酸、PA75 polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、SV40 polyA、3'ITR;

10) 5'ITR、CMV 增强子 2、CMV 启动子、GDNF 编码多核苷酸、PA75 polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、WPRE、SV40 polyA、3'ITR;

5 11) 5'ITR、CMV 增强子 2、CMV 启动子、MVM 内含子、GDNF 编码多核苷酸、PA75 polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、WPRE、SV40 polyA、3'ITR;

12) 5'ITR、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、P2A、GDNF 编码多核苷酸、WPRE、SV40 polyA、3'ITR;

10 13) 5'ITR、CMV 增强子 2、CMV 启动子、 β 球蛋白内含子、GDNF 编码多核苷酸、PA75 polyA、CMV 增强子 1、CBA 启动子、杂合内含子、AADC 编码多核苷酸、SV40 polyA、3'ITR。

一些具体实施方案中，

所述 CMV 增强子 1 包含或如 SEQ ID NO:27 所示序列；

所述 CMV 增强子 2 包含或如 SEQ ID NO:37 所示序列；

15 所述 CBA 启动子包含或如 SEQ ID NO:28 所示序列；

所述 CMV 启动子包含或如 SEQ ID NO:35 所示序列；

所述 β 球蛋白内含子包含或如 SEQ ID NO:38 所示序列；

所述杂合内含子包含或如 SEQ ID NO:29 所示序列；

所述 MVM 内含子包含或如 SEQ ID NO:39 所示序列；

20 所述 PA75 polyA 包含或如 SEQ ID NO:36 所示序列；

所述 SV40 polyA 包含或如 SEQ ID NO:32 所示序列；

所述 hGH polyA 包含或如 SEQ ID NO:30 所示序列；

所述 HPRE 包含或如 SEQ ID NO:33 所示序列；

所述 WPRE 包含或如 SEQ ID NO:34 所示序列；

25 所述 5'ITR 包含或或如 SEQ ID NO:26 所示序列；

所述 3'ITR 包含或如 SEQ ID NO:31 所示序列；

所述 MCS 包含或如 SEQ ID NO:40 所示序列；和/或

所述 P2A 包含或如 SEQ ID NO:33 所示序列。

30 一些实施方案中，提供核酸分子，其包含多核苷酸，所述多核苷酸与 SEQ ID NO:13-25 任一所示序列具有至少 95%同一性。一些实施方案中，所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:13-25 任一所示的序列。

35 一些实施方案中，所述 AADC 蛋白(例如为 SEQ ID NO:1 所示的 AADC 蛋白)包含其变体(所述变体例如与 SEQ ID NO:1、NP_000781.2、NP_001076440.2、NP_001229815.2、NP_001229816.2、NP_001229817.2、NP_001229818.2、NP_001229819.2 具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%或以上同一性)或片段，所述变体或片段具有与 AADC 蛋白相同或相似的生物学活性或功

能；所述 GDNF 蛋白(例如为 SEQ ID NO:2 所示的 GDNF 蛋白)包含其变体(所述变体例如与 SEQ ID NO:2、NP_001177397.1、NP_001177398.1、NP_001265027.1、NP_954701.1 具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%或以上同一性)或片段，所述变体或片段具有与 GDNF 蛋白相同或相似的生物学活性或功能。

一些实施方案中，所述多核苷酸包括在细胞内部加工的前体分子。可以在质粒、载体、基因组或其他多核苷酸表达载体中编码 AADC 和/或 GDNF 多核苷酸或其加工形式以递送至细胞。

一些实施方案中，所述载体包含完整的复制子，使得在例如经转染、感染或转化细胞后，能在所述细胞中复制。一些实施方案中，所述载体为或者衍生自逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒、杆状病毒、乳头病毒或经修饰或改造的以上病毒。一些实施方案中，递送所述载体的方法包括但不限于直接递送裸 DNA 或经阳离子或阴离子脂质体、经与阳离子聚合物络合、经与蛋白质或多肽形成复合物递送。

一些实施方案中，所述多核苷酸被设计为 AAV 载体基因组(或病毒基因组)的组分，并包装在 rAAV 颗粒中，所述 rAAV 颗粒在细胞内加工以产生 AADC 和/或 GDNF 蛋白，所述 AADC 和/或 GDNF 蛋白可以为野生型蛋白或其变体。

一些实施方案中，所述多核苷酸可以是 rAAV 颗粒的有效负载。

AAV 衣壳和 AAV 颗粒

本公开前述任一项的多核苷酸均可以使用如下 AAV 衣壳进行包裹，以形成 AAV 颗粒。

所述 AAV 衣壳包含或源自任何天然或重组 AAV 血清型，包括但不限于：PHP.B、PHP.A、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、

AAV161.10/hu.60 、 AAV161.6/hu.61 、 AAV33.12/hu.17 、 AAV33.4/hu.15 、
 AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAVA3.4、
 AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、
 AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、
 5 AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、
 AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、
 AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、
 AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、
 AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、
 10 AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、
 AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、
 AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、
 AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、
 AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、
 15 AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、
 AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、
 AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、
 AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.68、AAVhu.14/9、AAVhu.t19、AAVrh.2、AAVrh.2R、
 AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、
 20 AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、
 AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、
 AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、
 AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、
 AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、
 25 AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R
 A586R 突变体、AAVrh8R R533A 突变体、AAAV、BAAV、山羊 AAV、牛 AAV、
 绵羊 AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、
 AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、
 AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、
 30 AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、
 AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、
 AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、
 AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、
 AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV
 35 SM 10-2、AAVShuffle 100-1、AAV Shuffle 100-3、AAV Shuffle 100-7、AAV Shuffle
 10-2、AAVShuffle 10-6、AAV Shuffle 10-8、AAV Shuffle 100-2、AAV SM 10-1、

AAV SM 10-8、AAVSM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、

5 真型(true type)AAV(ttAAV)、UPENNAAV 10、日本 AAV 10 血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAVCBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAVCBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAVCBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、

10 AAVCHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAVCKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、

15 AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV Clv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV Clv1-7、AAV Clv1-8、AAV Clv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、

20 AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、

25 AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAVCSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、

30 AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8、AAVF9/HSC9、PHP.B(AAV-PHP.B)、PHP.A(AAV.PHP.A)、G2B-26、G2B-13、TH1.1-32、TH1.1-35、AAVPHP.B2、AAVPHP.B3、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、

35 AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、

AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、
AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、
AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、
AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、
5 AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5、AAVDJ8 以及其变体。

一些实施方案中,所述 AAV 衣壳可以是经修饰或突变的,例如含有 Y252F、
Y272F、Y444F、Y500F、Y700F、Y704F、Y730F、Y275F、Y281F、Y508F、Y576F、
Y612G、Y673F 和 Y720F 中的一个或多个突变;例如含有 F129L、D418E、K531E、
L584F、V598A 和 H642N 中的一个或多个突变;例如在 AAV2 的 252、272、444、
10 500、700、704 和 730 位 Tyr 残基中的至少一个被例如 Phe 残基取代;例如在 AAV2
衣壳中含有 N587A、E548A 或 N708A 突变;例如在 AAV9 衣壳中含有 T446F 突变;
例如在 AAV 衣壳中含有 V708K 突变;例如所述 AAV 衣壳是经由 390-627 位氨基
酸(VP1 编号)中具有突变的 AAV9 衣壳文库产生的。

本公开全文引入 WO2018232055(例如其表 1)、WO2005033321、WO2015168666、
15 WO2015121501、WO2015038958、WO2016065001、WO2016130589、WO2016049230、
WO2016134375、WO2017100671、WO2017083722、WO2017015102、WO2017058892、
WO2017066764、US9546112、US7198951、US9233131、US6156303、US9624274、
US9475845、US8734809、US20130224836、US20140359799、US20150315612、
US20150376240、US20150159173、US20150376607、US20150238550、
20 US20160369298、US20160361439、US20170145405, 以及 NPulicherla 等
(MolecularTherapy19(6):1070-1078(2011))中的 AAV 衣壳。一些具体实施方案中,
本公开所使用的 AAV 衣壳是上述现有技术中的 AAV2 和 AAV9 衣壳。

一些实施方案中,所述 AAV 衣壳是经工程化改造的,例如是来自两种或更多
种亲本血清型的杂合 AAV 衣壳。例如,所述 AAV 衣壳可以是 AAV2G9,其包含
25 来自 AAV2 和 AAV9 的序列。此处全文引入 US20160017005 中 AAV2G9 的序列。

一些实施方案中,所述 AAV 衣壳是 AAV2 或 AAV9 衣壳,例如包含 SEQ ID NO:
41 或 42 所示的氨基酸序列。

一些实施方案中,除编码的异源有效负载外,AAV 颗粒可以包含任何天然存
在的和/或重组的 AAV 衣壳的核苷酸序列或变体的全部或部分载体基因组。

30 一些实施方案中,AAV 颗粒可以是复制缺陷的(例如其在载体基因组中缺乏编
码功能性 Rep 和 Cap 蛋白的序列)。一些具体实施方案中,所述复制缺陷性 AAV
颗粒可以缺乏大多数或全部亲本编码序列,并且基本上仅携带一个或两个 AAV
ITR 序列以及用于递送至细胞、组织、器官或生物体的感兴趣的多核苷酸。

一些实施方案中,AAV 颗粒可以是重组 AAV(rAAV)颗粒。

35 一些实施方案中,AAV 颗粒可以选自单链 AAV 颗粒(例如 ssAAV)、自身互补
AAV 颗粒(例如 scAAV)。通过跳过第二链合成,scAAV 在细胞中实现快速表达。

一些实施方案中, AAV 颗粒包裹有多核苷酸, 所述多核苷酸与 SEQ ID NO:13-25 任一所示序列具有至少 95%同一性。

一些实施方案中, AAV 颗粒包裹有多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:13-25 任一所示的序列。

5 调控元件

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)包含至少一种调控元件, 使得有效负载中的目的基因(例如 AADC、GDNF)能够复制、转录和翻译。

一些实施方案中, 所述调控元件包括但不限于用于转录起始和/或终止的序列、启动子和/或增强子序列、有效的 RNA 处理信号(例如剪接和聚腺苷酸化信号)、稳定细胞质 mRNA 的序列、增强翻译效率的序列(例如, Kozak 共有序列)、增强蛋白质稳定性的序列和/或增强蛋白质加工和/或分泌的序列。示例性调控元件包括但不限于启动子、增强子、内含子、内源性 miRNA、转录后调控元件(PRE)、聚腺苷酸化(PolyA)信号序列、上游增强子(USE)。

15 一些实施方案中, 下述调控元件(例如启动子)驱动有效负载在靶组织(例如受试者的大脑(例如纹状体、黑质))中表达一段时间。例如, 1、2、3、4、5、6、7 天, 1、2、3、4 周, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个月, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60 年或以上。又例如, 1-2 周、1-3 周、1-4 周、1-2 个月、1-4 个月、1-6 个月、2-6 个月、3-6 个月、3-9 个月、4-8 个月、6-12 20 个月、1-2 年、1-5 年、2-5 年、3-6 年、3-8 年、4-8 年、5-10 年、10-20 年、10-30 年、20-40 年、20-50 年, 或受试者终生。

反向末端重复(ITR)

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)包含至少一个 ITR, 例如具有两个 ITR, 分别位于 5' 和 3' 端的有效负载的侧翼。

25 一些实施方案中, ITR 具有复制起点功能。

一些实施方案中, ITR 包含可以互补和对称排列的序列区。

一些实施方案中, ITR 可以由天然存在的多核苷酸序列或重组衍生的多核苷酸序列组成。

一些实施方案中, ITR 可以源自与衣壳相同或不同的血清型。一些实施方案中, 30 5'ITR 和 3' ITR 可以源自相同的血清型, 也可以源自不同的血清型。例如, 5'ITR 和 3' ITR 均来自 AAV2, 或均来自 AAV9。又例如, 5'ITR 包含如 SEQ ID NO: 26 所示的序列, 和/或 3'ITR 包含如 SEQ ID NO: 31 所示的核苷酸序列。

一些实施方案中, 每个 ITR 的长度可以是约 100 至约 150 个核苷酸, 例如, 是 100-105 个核苷酸、106-110 个核苷酸、111-115 个核苷酸、116-120 个核苷酸、35 121-125 个核苷酸、126-130 个核苷酸、131-135 个核苷酸、136-140 个核苷酸、141-145 个核苷酸或 146-150 个核苷酸。在一个实施方案中, ITR 的长度是 140-142 个核苷

酸,例如是 141 个核苷酸。ITR 长度的非限制性实例是长度为 102、140、141、142、145 个核苷酸,以及与它们具有至少 95%同一性的核苷酸。

启动子

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)包含至少一个启动子,包括但不限于物种特异性、诱导型、组织特异性或细胞周期特异性的启动子。

一些实施方案中,启动子驱动在 AAV 颗粒的载体基因组的有效负载中编码的蛋白或多肽(例如 AADC 和/或 GDNF)的表达。

一些实施方案中,启动子是靶组织特异性的或向性的,例如是能在神经组织中表达有效负载的启动子。

一些实施方案中,启动子可以是病毒启动子、植物启动子、哺乳动物启动子、人启动子。

一些实施方案中,启动子包括但不限于 CMV、CBA(包括衍生物 CAG、CBh 等)、EF-1 α 、PGK、UBC、RSV、EFS、EF1、GUSB(hGBp)、UCOE(HNRPA2B1-CBX3 的启动子)、NSE、Synapsin、MeCP2、MeP418、MeP426、VMD2、MRHO、TRE、Ac5、Polyhedrin、CaMKIIa、Gall、TEF1、GDS、ADH1、Ubi、GFAP 或 PKG 启动子,以及可选自神经丝轻(NFL)启动子、神经丝重(NFH)启动子、SCN8A 启动子、共济蛋白(FXN)启动子(或称 FRDA 启动子)、H1 启动子、RNA pol III 启动子(例如 U6 或 H1)、小核 RNA(ULB 或 ULA)启动子。一些实施方案中,启动子为肝脏或骨骼肌启动子,肝启动子例如为人 α -1-抗胰蛋白酶(hAAT)和甲状腺素结合球蛋白(TBG),骨骼肌启动子例如为结蛋白、MCK 或合成的 C5-12。

一些实施方案中,本公开的 AAV 载体基因组包含两个启动子,例如是 CMV 和 CBA 启动子,其序列分别为 SEQ ID NO:35 和 28 所示;又例如是 EF1 α 启动子和 CMV 启动子,或前述启动子的任意两两组合。

一些实施方案中,启动子为组织特异性表达元件,可将表达限制于某些细胞类型,包括但不限于肌肉特异性启动子、B 细胞启动子、单核细胞启动子、白细胞启动子、巨噬细胞启动子、胰腺腺泡细胞启动子、内皮细胞启动子、肺组织启动子、星形胶质细胞启动子或神经系统启动子,其可用于将表达限于神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞。

一些实施方案中,启动子为神经元组织特异性表达元件,包括但不限于神经元特异性烯醇化酶(NSE)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、血小板衍生的生长因子 B 链(PDGF- β)、突触蛋白(Syn)、甲基 CpG 结合蛋白 2(MeCP2)、Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(CaMKII)、促代谢性谷氨酸受体 2(mGluR2)、神经丝轻(NFL)或重(NFH)、 β -珠蛋白小基因 $\eta\beta$ 2、前脑啡肽原(PPE)、脑啡肽(Enk)和兴奋性氨基酸转运蛋白 2(EAAT2)启动子。星形胶质细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和 EAAT2 启动子。少突胶质细胞的组织特异性表

达元件子的非限制性实例包括髓磷脂碱性蛋白(MBP)启动子。

一些实施方案中,启动子是前述启动子的截短体或变体,长度小于 1kb,例如为 200-300、200-400、300-400、200-500、200-600 或以上长度。

5 一些实施方案中,启动子可以是相同或不同的起始或亲本启动子的两种或更多种组合,例如 CMV 和 CBA。

增强子

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)包含至少一个增强子,包括但不限于物种特异性、诱导型、组织特异性或细胞周期特异性的增强子。

10 一些实施方案中,增强子是靶组织特异性的或向性的,例如是能在神经组织中调控有效负载表达的增强子。

一些实施方案中,增强子可以是或源自病毒增强子、植物增强子、哺乳动物增强子、人增强子。

15 一些实施方案中,所述增强子可位于启动子的上游或下游,与启动子可操作的连接。当所述增强子存在时,较之所述增强子不存在时,对目的基因(例如 AADC 和/或 GDNF)的表达增强至少 20%、至少 50%、至少 80%、至少 100%、至少数倍(包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍或以上)。

20 一些实施方案中,所述增强子包括但不限于 EF-1 α 、Ubc、human β -actin、CAG、TRE、Ac5、Polyhedrin、CaMKII α 、Gall、TEF1、GDS、ADH1、Ubi 和 α -1-antitrypsin(hAAT),或以上增强子的变体或片段。一些实施方案中,所述增强子选自 IRBP、RSV 或 CMV 增强子,或其变体或片段。

一些实施方案中,所述增强子包含或为 SEQ ID NO:27 或 37 所示的增强子或其变体或片段。

内含子

25 本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)中可以包含内含子或其部分,

30 一些实施方案中,所述内含子包括但不限于 MVM(67-97bp)、F.IX 截短的内含子 1(约 300bp)、 β -球蛋白 SD/免疫球蛋白重链剪接受体(约 250bp)、腺病毒剪接受体/免疫球蛋白剪接受体(约 500bp)、SV40 晚期剪接受体/剪接受体(19S/16S)(180bp)和杂合腺病毒剪接受体/IgG 剪接受体(约 230bp)、hemoglobin 内含子、杂合内含子、 β -球蛋白(β -globin)内含子,或以上内含子的变体或片段。

一些实施方案中,所述内含子的长度为 100-800 个核苷酸,例如约 100、约 200、约 300、约 400、约 500、约 600 个核苷酸,又例如为 200-250、200-300、100-200、300-500、500-600、400-600、100-200 个核苷酸。

35 一些实施方案中,本公开技术方案中的内含子选自 hybrid intron、 β -球蛋白 intron,其序列分别如 SEQ ID NO: 29 和 38 所示。

非翻译区(UTR)

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)中可以包含非翻译区(UTR)，所述 UTR 选自 5'UTR 和/或 3'UTR，以调节(例如，增减或降低)多核苷酸稳定性和蛋白质产生。通常情况下，5'UTR 在转录起始位点开始并在起始密码子处终止，3'UTR 在终止密码子后立即开始从到转录终止信号为止。所述 UTR 可以是野生型、其变体或人工 UTR。

一些实施方案中，5'UTR 包括 Kozak 序列。另一些实施方案中，5'UTR 不包括 Kozak 序列。

一些实施方案中，3'UTR 富含 AU。一些实施方案中，3'UTR 选自：I 类 ARE，例如但不限于 c-Myc 和 MyoD，在富含 U 的区域内包含数个 AUUUA 基序的分散拷贝；II 类 ARE，例如但不限于 GM-CSF 和 TNF-a，拥有两个或多个重叠的 UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚体；III 类 ARES，例如但不限于 c-Jun 和肌形成蛋白

一些实施方案中，3' UTR 可以包括寡聚(dT)序列，用于模板化添加聚腺苷酸化序列(PolyA)。

聚腺苷酸化序列(PolyA)

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)中可以包含编码 PolyA 的序列，所述 PolyA 可以是野生型、其变体或经修饰的 PolyA，以进行蛋白质翻译。

一些实施方案中，所述编码 PolyA 的序列位于有效负载编码序列的 3'端与 3'ITR 的 5' 端之间。

一些实施方案中，所述编码 PolyA 的序列长度为 0-500 个核苷酸，例如约 75、约 100、约 110、约 120、约 150、约 160、约 200、约 300 个核苷酸，又例如 50-100、50-150、50-160、50-200、60-100、60-150、60-160、60-200、70-100、70-150、70-160、70-200、80-100、80-150、80-160、80-200、90-100、90-150、90-160、90-200。

一些实施方案中，所述编码 PolyA 可以编码连续的 PolyA 或不连续的 PolyA。当编码不连续的 PolyA 时，所述编码序列可被其他核苷酸中断或分离开。例如，所述 polyA 具有至少两个 60 个腺苷酸的片段，所述至少两个 60 个腺苷酸片段被包含 10-90 个核苷酸的序列分离开。

一些实施方案中，本公开技术方案中的编码 PolyA 的序列或 polyA 选自 β -球蛋白 polyA、SV40 polyA、bGH polyA、PA75 polyA、MeCP2 polyA、RDH1 polyA、BGH polyA、SPA49 polyA、sNRP-TK65 polyA、sNRP polyA、TK65 polyA，或以上 PolyA 的变体或片段。

一些实施方案中，本公开技术方案中的 SEQ ID NO: 32 和 36 所示的 polyA 或其变体或片段。

此处全文引入 WO2016005324、WO2016005004、WO2016091391、WO2019036513、WO2020074642 中的 polyA 或其编码序列，其均可用于本公开技

术方案中。

填充序列

本公开前述任一项的多核苷酸或 AAV 颗粒的载体基因组(或病毒基因组)中可以包含填充序列,使得载体基因组的长度为包装的最佳大小,例如使得载体基因组

5 的长度为约 2.3kb、约 4.6kb、约 4.7kb 或约 5.1kb。

一些实施方案中,所述载体基因组为单链或双链基因组,包装后的 AAV 颗粒为 ssAAV 或 scAAV。

一些实施方案中,一个载体基因组中可以含有一个或多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)填充序列。

10 一些实施方案中,填充序列可以位于多个调控元件之间或之内,例如两个内含子之间、5'ITR 序列的 3'处、5'ITR 序列的 5'处、3'ITR 序列的 5'处、3'ITR 序列的 3'处,以及启动子、内含子、增强子、polyA、多克隆位点(MCS)区、外显子等区域之前或之后。

rAAV 颗粒的生产或制备方法

15 本公开提供生产、制备和/或修饰 rAAV 颗粒的方法。此处全文引入 WO200028004、WO200123001、WO2004112727、WO 2005005610、WO2005072364、WO2013123503、WO2015191508 和 US20130195801 中的 rAAV 颗粒生产、制备和/或修饰方法。所述 rAAV 颗粒可以具有增强递送效率的特性,能进行有效包装,能以高频率和最小的毒性成功地感染靶细胞(例如哺乳动物或人细胞)。

20 一些实施方案中,提供了 rAAV 颗粒的生产方法,包括将本公开任意多核苷酸或载体基因组(或病毒基因组)或载体包装至 AAV 衣壳中。一些具体实施方案中,包括以下步骤:1)用杆状病毒载体和病毒构建体载体和/或 AAV 有效负载构建体载体共转染感受态细菌细胞,2)分离所得的病毒构建体表达载体和 AAV 有效负载构建体表达载体并分别转染病毒复制细胞,3)分离并纯化所得的有效负载和包含病毒构建体表达载体或 AAV 有效负载构建体表达载体的病毒构建体颗粒,4)用 AAV 有效负载和包含病毒构建体表达载体或 AAV 有效负载构建体表达载体的病毒构建体颗粒两者共感染病毒复制细胞,以及 5)收获和纯化包含病毒基因组的 AAV 颗粒。

25

一些实施方案中,提供了 rAAV 颗粒的生产方法,包括以下步骤:

1) 将本公开任意多核苷酸或载体基因组(或病毒基因组)或载体,和表达 Rep 和 Cap 基因的构建体以及辅助构建体(以实现辅助功能)同时共转染哺乳动物细胞(例如 HEK293 细胞);

30

2) 收获并纯化包含病毒基因组的 rAAV 颗粒。

一些实施方案中,前述 rAAV 颗粒的病毒基因组任选地编码选择标志物。选择标志物可以包括细胞表面标志物,例如在细胞表面上表达的任何蛋白质,包括但不限于受体 CD 标志物、凝集素、整联蛋白或其截短形式。

35

一些实施方案中,提供 AAV 生产系统,用于生产本公开中 rAAV 颗粒,其中,

所述生产系统包含：

- 1) 编码 AAV 衣壳的多核苷酸序列；
 - 2) 本公开任意多核苷酸或载体基因组(或病毒基因组)或载体；和
 - 3) 足够的 AAV rep 功能和辅助功能，以允许将(b)中的多核苷酸或载体基因组
- 5 (或病毒基因组)或载体包装到 AAV 衣壳中。

前述方案中，AAV 衣壳选自前述本公开任意的 AAV 衣壳，例如 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ 或 AAV-DJ8。

一些具体实施方案中，足够的 AAV rep 功能和辅助功能通过包装细胞提供，

10 所述包装细胞可以包含 pHelper、pRC9、pGOI 这三种质粒。

一些实施方案中，Rep 基因编码调节功能的非结构蛋白，例如 AAV 基因组的复制，可以选自 Rep78、Rep68、Rep52、Rep40。Rep78 和 Rep68 通常从 p5 启动子转录，而 Rep52 和 Rep40 通常从 p19 启动子转录。Cap 基因编码组装形成病毒壳体壳体的结构蛋白 VP1、VP2 和/或 VP3。Cap 基因通常从 p40 启动子转录。

15 一些实施方案中，提供上述 AAV 生产系统生产的 rAAV 颗粒。

细胞

本公开提供能够包装 AAV 的细胞，所述细胞为适于异源蛋白生产的任何细胞。

一些实施方案中，所述细胞为哺乳动物细胞，包括但不限于 HEK293、HELA、CHO、NSO、SP2/0、PER.C6、VERO、RD、BHK、HT 1080、A549、COS-7、ARPE-19

20 和 MRC-5。

一些实施方案中，所述细胞为昆虫细胞，可来自草地贪夜蛾、果蝇(Drosophila)细胞系，或蚊细胞系，如白纹伊蚊(Aedes albopictus)衍生细胞系，包括但不限于 Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、Ha2302、Hz2E5、HighFive(Invitrogen, CA, USA)、AO38 和 BM-N。药物组合物

25 本公开提供药物组合物，其含有预防或治疗有效量的活性成分(例如上述任意的本公开的多核苷酸(包括 AADC 多核苷酸和/或 GDNF 多核苷酸)或 rAAV 颗粒)，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

一些实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的多核苷酸(包括 AADC 多核苷酸和/或 GDNF 多核苷酸)或 rAAV 颗粒。另一些具体实施方案中，药物组合物单位剂量中含 AADC 基因拷贝量为 0.1 至 10×10^{13} ，和/或 GDNF 基因拷贝量为 0.1 至 10×10^{13} 。

30

一些实施方案中，所述药物组合物含有配制剂，所述配制剂包括但不限于生理盐水、脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、肽、蛋白质及其组合。所述配制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。

35 一些实施方案中，可以用 rAAV 颗粒转染细胞用于转移或移植入受试者。

一些实施方案中，药物组合物中含有 rAAV 颗粒，所述 rAAV 颗粒包裹有多核

苷酸，所述多核苷酸与 SEQ ID NO:13-25 任一所示序列具有至少 95%同一性，例如，所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:13-25 任一所示的序列。

治疗疾病的方法和制药用途

5 本公开提供前述任意的本公开的多核苷酸(包括 AADC 多核苷酸和/或 GDNF 多核苷酸)、rAAV 颗粒、药物组合物用于治疗、缓解或改善疾病或症状的方法或用途。

本公开提供前述任意多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物和左旋多巴联合治疗、缓解或改善前述神经学疾病或症状的方法或用途。

10 一些实施方案中，提供前述本公开任意多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物，所述任意多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物与左旋多巴联合施用。

一些实施方案中，提供左旋多巴，所述左旋多巴与前述本公开任意多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物联合施用。

一些实施方案中，所述疾病或症状是 AADC 蛋白缺乏导致或相关的，和/或所述疾病或症状是 GDNF 蛋白缺乏导致或相关的。

15 一些实施方案中，所述疾病或症状是神经学疾病或症状，例如中枢神经系统疾病或症状。所述中枢神经系统疾病或症状可以是影响脑的任何部分(包括脑半球，间脑，脑干和小脑)或脊髓的疾病或症状。所述神经学疾病或症状包括但不限于神经肌肉疾病、溶酶体疾病、创伤、骨髓损伤、疼痛(包括神经性疼痛)、神经系统癌症、脱髓鞘疾病、神经系统自身免疫性疾病、神经毒性综合征、睡眠病症、遗传性脑疾病和发育 CNS 病症为特征的疾病或症状。本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、
20 药物组合物可以缓解或减轻由有需要的受试者中的基因产物的水平和/或功能异常(例如、蛋白质的缺乏或缺陷)引起的症状、或以其他方式对有需要的受试者中的 CNS 病症赋予益处。

一些实施方案中，所述疾病或症状是神经学疾病或症状，包括但不限于阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)、亨廷顿氏病(HD)、弗里德赖希共济失调(FA)、帕金森病(PD)、多系统萎缩症(MSA)、脊髓性肌萎缩症(SMA)，多发性硬化症(MS)、原发性进行性失语、进行性核上性麻痹(PSP)、痴呆、脑癌、变性性神经病症、脑炎、癫痫、导致神经变性的遗传性脑病症、色素性视网膜炎(RP)、头和脑畸形、脑积水、中风、朊病毒病、
30 婴儿神经元蜡样质脂褐质沉积症(INCL)(由溶酶体酶棕榈酰蛋白硫酯酶-1(PPT1)的缺乏引起的儿童神经变性性疾病等)。

一些实施方案中，所述疾病或症状是中枢神经系统的生长和发育受损有关的疾病，即神经发育病症。在某些方面、此类神经发育病症可以是由遗传突变引起的、包括但不限于脆性 X 综合征(由 FMR1 基因突变引起)、唐氏综合征(由 21 号染色体
35 三体性引起)、Rett 综合征、威廉姆斯(Williams)综合征、安格尔曼(Angelman)综合征、Smith-Magenis 综合征、ATR-X 综合征、Barth 综合征、婴儿时期的免疫功能

障碍和/或传染病、例如 Sydenham 舞蹈病、精神分裂症、先天性弓形虫病、先天性风疹综合症、代谢性疾病(例如糖尿病和苯丙酮尿)、营养缺陷和/或脑外伤、自闭症和自闭症谱。

5 一些实施方案中，所述疾病或症状是中枢神经系统中的肿瘤，包括但不限于听神经瘤、星形细胞瘤(I、II、III 和 IV 级)、脊索瘤、CNS 淋巴瘤、颅咽管瘤、神经胶质瘤(例如、脑干神经胶质瘤、室管膜瘤、视神经神经胶质瘤、室管膜下瘤)、髓母细胞瘤、脑膜瘤、转移性脑瘤、少突胶质细胞瘤、垂体瘤、原始神经外胚层(PNET)和许旺细胞瘤。

10 一些实施方案中，所述疾病或症状是具有运动和/或感觉症状的功能性神经学病症，其在中枢神经系统中具有神经系统起源，包括但不限于慢性疼痛、癫痫发作、语言问题、不自主运动和睡眠障碍(sleep disorder)。

15 一些实施方案中，所述疾病或症状是白质病症(影响中枢神经系统中神经纤维的一组疾病)，包括但不限于 Pelizaeus-Merzbacher 病、低髓鞘化伴有基底神经节和小脑萎缩、Aicardi-Gouti è res 综合征、巨脑性白质脑病(Megalencephalic leukoencephalopathy)伴皮层下囊肿、先天性肌营养不良、肌强直性营养不良、Wilson 病、Lowe 综合征、综合征、PIBD 或 Tay 综合征、Cockayne 病、脑腱黄瘤病、Zellweger 综合征、新生儿肾上腺脑白质营养不良、婴儿雷夫叙姆病、Zellweger 样综合征、假 Zellweger 样综合征、假新生儿肾上腺脑白质营养不良、双功能蛋白缺乏症、X 连锁肾上腺脑白质营养不良和肾上腺脊髓神经病和 Refsum 病。

20 一些实施方案中，所述疾病或症状是可以是由中枢神经系统中的细胞不能分解代谢终产物而引起的溶酶体贮积症(LSD)、戈谢病(由 β -葡糖脑苷脂酶(GBA)基因突变引起)、GM1/GM2 神经节苷脂贮积病、粘多糖累积病病症、庞佩(Pompe)病、神经元蜡样脂褐质沉积症，所述 LSD 包括但不限于尼曼-皮克(Niemann-Pick)病、异染性脑白质营养不良(MLD)、球状细胞脑白质营养不良症
25 (Globoid-celleukodystrophy, GLD)、法布里病。

一些实施方案中，所述疾病或症状是弗里德赖希共济失调、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、亨廷顿氏病、脊髓性肌萎缩(SMA)。

一些实施方案中，提供前述任意的本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物用于治疗、缓解或预防帕金森病或症状的方法或用途。

30 一些实施方案中，在施用本文所述的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物之前，前患有帕金森病的受试者已经观察到运动症状例如震颤和运动的改变。震颤的非限制性实例包括单侧或双侧轻度震颤，双侧或中线中度震颤或顽固性震颤。运动的非限制性实例包括轻度运动迟缓、中度运动迟缓、重度运动迟缓和早晨运动迟缓。

35 一些实施方案中，帕金森病受试者可以具有平衡的改变，例如但不限于平衡受损、翻正反射受损、明显的平衡病症或摔倒。

一些实施方案中，帕金森病受试者可以有非运动症状的改变，作为非限制性实例，在施用本文所述的组合物之前，受试者可以患有轻度至中度的认知障碍；作为另一个非限制性实例，帕金森病受试者可以具有明显的认知障碍，例如痴呆，其也可以包括行为障碍，例如幻觉。

5 一些实施方案中，帕金森病受试者可以具有运动波动，引起对一种或多种多巴胺能药物的轻度至中度失能。

一些实施方案中，在施用本文所述的组合物之前，帕金森病受试者可以具有由“逐渐减弱(wearing off)”和/或左旋多巴诱导的运动失调组成的医学上难治性运动波动，其引起明显的失能。

10 一些实施方案中，受试者可以具有与帕金森氏病相关的轻度症状，例如但不限于无认知损伤(在过去 5 年内诊断)，对一种或多种多巴胺能药物具有有限波动的令人满意的响应，单侧或双侧轻度震颤，对生活质量具有很少的影响或无影响，和/或无平衡损伤。

15 一些实施方案中，受试者可以具有与帕金森氏病有关的中度症状，例如但不限于轻度至中度认知障碍，平衡受损和翻正反射的初步体征，对一种或多种多巴胺能药物引起轻度-中度失能的运动波动(在过去 5 到 10 年内诊断)，双侧或中线中度震颤，中度运动迟缓和/或日常生活活动经历一定限制的受试者。

20 一些实施方案中，受试者可以具有与帕金森氏病相关的晚期症状，例如但不限于诊断患有帕金森氏病超过 10 年，中等难治性运动波动逐渐消失和/或左旋多巴诱导的运动障碍，引起重大失能，顽固性震颤，明显的平衡病症和/或摔倒，明显的认知障碍(例如患有或不患有行为障碍的痴呆)，严重的运动迟缓，生活质量因疾病和/或早晨运动障碍而明显降低。

25 一些实施方案中，帕金森氏病受试者与本公开中多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物组合使用左旋多巴(例如 DUOPA™)。作为非限制性实例，受试者可以通过单独使用左旋多巴(例如 DUOPA™)获得成功。作为非限制性实例，单独使用 DUOPA™，受试者可以尚未获得任何成功或获得有限的成功。

30 一些实施方案中，在施用本公开中多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物前，评估受试者的 UPDRS-3(或 UPDRS-III)药物得分。一些实施方案中，施用本公开中多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物后，受试者的 UPDRS-3(或 UPDRS-III)药物得分降低。

一些实施方案中，施用本公开中多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物后，受试者具有改善的运动功能，和/或受试者管理症状所需要的左旋多巴药物量的减少。

35 一些实施方案中，提供前述任意的本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物用于治疗昼夜节律、觉醒周期相关疾病或症状的方法或用途，包括但不限于睡眠病症(例如失眠)、抑郁、双相型障碍、季节性情感障碍、肥胖和糖尿病。

一些实施方案中，可以通过任何导致治疗有效结果的递送途径施用本公开的多

核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物，包括但不限于肠、肠胃、硬膜外、口服、透皮、脑内、脑室内(包括侧脑室内)、表皮、皮内、皮下、鼻施用、静脉内、静脉内、动脉内、肌肉内、骨内输注(包括进入骨髓)、鞘内(包括进入椎管)、实质内(进入脑组织)、腹膜内(输注或注射入腹膜)、经皮(扩散通过完整的皮肤、用于系统性分布)、透粘膜、经气管(通过气管壁)等。例如，经口内、经鼻内、经皮下、经肌肉内、经血管(例如静脉)内、经鞘内、经脑和/或脑室内。

一些实施方案中，通过注射到 CSF 途径中来递送或施用本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物。例如，递送或施用至中枢神经系统(例如实质)的细胞。例如，递送或施用到鞘内和脑室内。例如，递送或施用到黑质或纹状体内，包括黑质致密部(SNpc)和腹侧被盖区(VTA)，或者可选地，纹状体内(进入尾状核和壳)或进入丘脑下核(STN)。例如，递送或施用到 DRG 伤害感受神经元、小脑延髓池以及转导脊髓运动神经元和/或星形胶质细胞。所述递送或施用可以是注射或直接输注。

一些实施方案中，以允许多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物穿过血脑屏障、血管屏障或其他上皮屏障的方式施用。

一些实施方案中，可以通过单部位或多部位(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个部位)施用本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物。

一些实施方案中，可以通过单剂量施用本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物。单剂量静脉内递送可为患有中枢神经系统(例如帕金森氏病)和/或相关症状的受试者提供持久的缓解。缓解可持续数分钟、数天、数周、数月(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个月)、数年(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 年或以上)。

前述多核苷酸包括本公开任意的 AADC 多核苷酸和/或 GDNF 多核苷酸。

试剂盒和装置

本公开提供包含前述任意本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物的试剂盒和装置。

一些实施方案中，试剂盒中含有容器装置，通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置，其中可以放置多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物。试剂盒通常还可以含有可以分开放置另外的组分的第二、第三或其他另外的容器，用于容纳例如无菌的药理学上可接受的缓冲液和/或其他稀释剂。一些二实施方案中，试剂盒中包含药品说明书。

一些实施方案中，本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物可以与装置组合，涂布到装置上或在装置中包埋。装置可以包括但不限于支架、泵和/或其他可植入治疗装置。另外，当受试者使用压缩装置，例如但不限于压缩装置以减少受试者中深静脉血栓形成(DVT)的机会时，可以将所述多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物递送至受试者。

一些实施方案中，可以使用装置，包括但不限于支架、管(包括导管、管道、吸管)、基因枪递送本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物。可以使用递送系统将本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物施用于受试者，所述递送系统整合图像引导疗法并整合成像，包括但不限于激光、MRgFUS、内窥镜和机器人手术装置。可以使用自动递送系统将本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物施用于受试者，作为非限制性实施例，此处全文引入 US5865744 中描述的装置，根据递送系统收集的图像，计算机将针施用调节为特定受试者的合适的深度。可以使用设备定位到受试者上的目标点、增强的递送装置或 MIR 引导装置来递送本公开的多核苷酸、rAAV 颗粒、药物组合物，作为非限制性实施例，此处全文引入 US8340743 中描述的方法、系统和/或计算机程序。

定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

“芳族 L-氨基酸脱羧酶”、“芳香族氨基酸多巴脱羧酶”或“AADC(Amino Acid Decarboxylase)”是一种同源二聚体的磷酸吡哆醛依赖性的酶，负责多巴胺和血清素的合成。AADC 催化 L-3, 4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA 或左旋多巴)脱羧为多巴胺，催化 L-5-羟基色氨酸脱羧为血清素，以及催化 L-色氨酸脱羧为色胺。本公开中的 AADC 蛋白及其编码多核苷酸涵盖野生型 AADC 蛋白、其变体及相关编码多核苷酸。示例性的 AADC 蛋白序列及其编码多核苷酸序列如本公开的 SEQ ID NO: 1 和 3 所示。野生型 AADC 蛋白可以是来自多巴胺化酶(DDC)基因的任何天然存在的同种型或变体，已经鉴定出编码 AADC 的不同同种型的多个可变剪接的转录变体。具体来说，DDC 基因产生七个转录物变体，其编码六个不同的同等型。DDC 转录物变体 1 和 2 均编码 AADC 同等型 1。在一些实施方案中，AADC 多核苷酸编码 DDC 转录物变体 2，从而编码天然 AADC 同等型 1(NCBI 数据库:NP_000781.1)。本公开也全文引入 WO2018232055A 中的 AADC 作为示例性 AADC。“AADC 多核苷酸”是编码 AADC 蛋白并且当存在于载体、质粒或可翻译的构建体中时在细胞、组织、器官或生物体中表达此类 AADC 蛋白的任何多核苷酸聚合物。

“神经胶质细胞源性神经营养因子”或“GDNF(Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor)”是一种神经营养因子，可支持周围交感神经、副交感神经、肠神经和感觉神经的神经元以及中脑多巴胺神经元和运动神经元的发育和存活，

本公开中的 GDNF 蛋白及其编码多核苷酸涵盖野生型 GDNF 蛋白、其变体及相关编码多核苷酸。已知存在 pre-(α)pro-GDNF(先前称为 GDNF α) 和 pre-(β)pro-GDNF(先前称为 GDNF β) 这两种 GDNF 剪接变体 (Suter-Crazzolara and Unsicker; 1994), 其是通过 GDNF mRNA 的不同剪接产生的。这两种剪接变体产生的成熟 GDNF 蛋白非常可能是一样的, 成熟 GDNF 由 134 个氨基酸组成, 含有两个推测的 N-糖基化位点和 7 个保守半胱氨酸, 这些半胱氨酸与 TGF- β 蛋白家族的其他成员处于同样的相对间距, 生物活性的成熟 GDNF 二聚体是通过单体中未配对的半胱氨酸之间的共价二硫键形成的(Lin et al., 1993; Eigenbrot and Gerber, 1997; Chang et al., 2002)。示例性的 GDNF 蛋白序列及其编码多核苷酸序列如本公开的 SEQ ID NO: 2 和 8 所示。本公开也全文引入 US6362319 中的(α)pro-GDNF 蛋白、US6184200 中的截短形式的 GDNF、WO2009053536A 中的 GDNF 作为示例性 GDNF。“GDNF 多核苷酸”是编码 GDNF 蛋白并且当存在于载体、质粒或可翻译的构建体中时在细胞、组织、器官或生物体中表达此类 GDNF 蛋白的任何多核苷酸聚合物。

“腺相关病毒(AAV)”涵盖“重组腺相关病毒(rAAV)”, 其是一种复制缺陷的无包膜病毒, 是依赖性病毒(Dependovirus)属细小病毒科的成员。“AAV 颗粒”或“rAAV 颗粒”由至少两种组分组成, 包括壳体和包裹在内的多核苷酸。AAV 颗粒可以源自本公开所述或本领域已知的任何血清型, 包括血清型的组合(即“假型化” AAV)或各种基因组(例如单链或自身互补)。另外, AAV 颗粒可以是复制缺陷的和/或靶向的。本公开的 AAV 涵盖变体, 所述变体可以在多核苷酸(基因组或衣壳)和氨基酸水平(衣壳)上具有显著同源性的序列, 以产生构建体, 该构建体通常为物理和功能等同物, 通过相似的机制复制, 并通过相似的机制组装。

“多肽”、“蛋白”或“蛋白质”可互换使用, 指氨基酸残基的聚合物, 适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明, 否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

“多肽变体”或“蛋白变体”是指与天然或起始序列相比其氨基酸序列具有一些差异的分子。所述变体可以在氨基酸序列内的某些位置具有取代、缺失和/或插入。“天然”或“起始”序列不应与野生型序列混淆。如本公开所用, 天然或起始序列是相对术语, 是指可以与之进行比较的原始分子。“天然”或“起始”序列或分子可以代表野生型(在自然界中发现的序列), 但不必是野生型序列。通常, 变体与天然序列具有至少约 70% 的同一性, 优选具有至少约 80%, 更优选至少约 90% 的同一性。

“类似物”是指包括相差一个或多个氨基酸改变(例如, 氨基酸残基的取代、添加或缺失), 且仍保持亲本多肽的性质的多肽变体。类似物可经由对亲本多肽的保守取代获得, 这种保守取代的方法是本领域所常规使用的。

“保守取代”当在蛋白或多肽中时, 是指取代为具有与原始氨基酸残基相似

的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、
5 缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当取代如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

10 “连接子”、“Linker”或“接头”指连接两个多肽片段或其编码多核苷酸的连接单元，通常具有一定的柔性，接头的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。连接子可以是肽连接子或其编码多核苷酸，其包含一个或多个氨基酸(典型的约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸)或其编码多核苷酸。应用于本公开的连接子可以是相同或不同的。

15 “融合”或“连接”是指部件(例如两个目的基因的编码多核苷酸或其编码获得的蛋白或多肽)直接地或经由一个或多个连接子而通过共价键连接。当连接子是肽连接子时，所述共价键是肽键。

“多核苷酸”、“多核苷酸”可互换使用，是指呈线性或环状构象并且呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。本公开中，所述术语不被解释为具有长度限制性的。所述术语可涵盖天然核苷酸的已知类似物，以及在碱基、
20 糖和/或磷酸部分(例如，硫代磷酸主链)中被修饰的核苷酸。一般来说，具体核苷酸的类似物具有相同的碱基配对特异性，例如，A 的类似物将与 T 碱基配对。当将多核苷酸与另一个多核苷酸序列置于功能关系中时，多核苷酸是“有效连接的”。例如，如果表达控制序列(例如启动子或增强子)影响目的基因的转录，那么表达控制序列有效地连接至所述目的基因。
25

“RNA”、“核糖多核苷酸”是指核糖核苷酸的聚合物。“DNA”、“脱氧核糖多核苷酸”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA 和 RNA 可以天然地合成(例如分别通过 DNA 复制和 DNA 转录)或通过化学合成。DNA 和 RNA 可以是单链的(即，分别为 ssRNA 或 ssDNA)或多链的(例如，双链，即分别为 dsRNA 和 dsDNA)。

30 “mRNA”或“信使 RNA”是指编码一条或多条多肽链的氨基酸序列的单链 RNA。

“可操作地连接”是指两个或更多个分子、构建体、转录物、实体，部分等之间的功能连接，涵盖表达控制序列与目的基因相邻以及表达控制序列反式或远距离起作用以控制目的基因表达的两种情况。

“多核苷酸与表达控制序列可操作地连接”是指所述多核苷酸在所述表达控制序列的调控下进行表达。两个或更多个多核苷酸可以在同一表达控制序列的调控下进行表达；也可以在两个相同或不同的表达控制序列的调控下进行表达。
35

本文所用的“表达控制序列”涵盖控制编码序列表达的任何多核苷酸，包括但不限于启动子、增强子等。

“序列”是指任何长度的氨基酸序列或多核苷酸序列，当为多核苷酸序列时，可以是 DNA 或 RNA；可以是线性的、环状的或分支的，并且可以是单链的或双链的。

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指聚合物(例如寡核苷酸、多核苷酸或多肽)分子之间的整体相关性。例如，可以通过比对两条多核苷酸序列来对两者的同一性百分比进行计算。由于计算中引入的缺口和罚分，同一性的数值可能不同，但可以选择最佳的方式(例如，可以在比对的两个序列中的一条或两条中引入缺口以实现最佳比对，并且可以忽略不同的序列以实现比较，所述两个序列一条为被比对的序列，另一条为参考序列)。一些实施方案中，被比对的序列的长度可以为参考序列长度的至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 或 100%，然后比较相应核苷酸位置处的核苷酸。当被比对的序列中的位置被与参考序列中的相应位置相同的核苷酸占据时，则两者在该位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分比为考虑到缺口的数量和每个缺口的长度，序列共享的相同位置的数目的函数，所述缺口需要被引入以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。例如，两条多核苷酸序列之间的同一性百分数可以使用方法，诸如以下中描述的那些方法测定：Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991(均全文并入本公开)。例如，可以使用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 Meyers 和 Miller(CABIOS, 1989, 4:11-17)算法，使用 PAM120 权重残基表、缺口长度罚分 12 和缺口罚分 4，测定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。或者，可以使用 NWSgapdna.CMP 矩阵，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序测定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。通常用于测定序列之间的同一性百分比的方法包括但不限于 Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073。

“保守的”指多核苷酸序列或多肽序列的核苷酸或氨基酸残基，其是在比较的两条或多个序列的相同位置中不变的那些。相对保守的核苷酸或氨基酸是与序列中其他位置出现的核苷酸或氨基酸相比更相关序列中保守的核苷酸或氨基酸。一些实施方案中，如果两个或多个序列彼此 100% 相同，则为“完全保守”；如果两个或多个序列彼此至少 70%、75%、80%、90%、95% 或以上相同，则为“高度

保守”；如果两个或多个序列彼此至少 30%、40%、50%、60%或以上相同，则为“保守”。序列的保守性可以应用于寡核苷酸、多核苷酸或多肽的全长，或者可以应用于其一部分或区域。保守序列可以是不连续的，本领域技术人员能够理解当序列之间存在连续比对中的缺口时如何实现比对，以及如何在不容忍存在的插入或缺失的情况下比对相应的残基。

“基因表达”是指将基因中所含的信息转换为基因产物，例如多核苷酸经历成功转录并且在大多数情况下翻译以产生蛋白质或肽的过程。基因产物可以是基因的直接转录产物(例如 mRNA、tRNA、rRNA、反义 RNA、核酶、结构 RNA 或任何其它类型的 RNA)或通过 mRNA 翻译产生的蛋白质。基因产物还包括通过诸如加帽、聚腺苷酸化、甲基化和编辑等过程修饰的 RNA，以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、肉豆蔻化和糖基化修饰的蛋白质。基因表达的“调节”是指基因活性的变化，表达的调节可包括但不限于基因活化、基因优化和基因阻遏。基因组编辑(例如，裂解、改变、灭活、随机突变)可用于调节表达。当提及“基因表达”的测量时，应理解为意指测量可以是转录的多核苷酸产物，例如 RNA 或 mRNA，或翻译的氨基酸产物，例如多肽或肽。测量 RNA、mRNA、多肽和肽的量或水平的方法是本领域公知的。

“转染”是指将外源多核苷酸导入细胞中的方法。转染的方法包括但不限于化学方法、物理处理和阳离子脂质或混合物。

“有效负载”是指由病毒基因组编码或在病毒基因组内编码的一种或多种多核苷酸或多核苷酸区域或者此类多核苷酸或多核苷酸区域的表达产物，例如转基因、编码多肽的多核苷酸或调控多核苷酸。本公开的一些实施方案中，有效负载编码或表达目的基因，所述目的基因例如是 AADC 和/或 GDNF。“有效负载构建体”是编码或包含在一侧或两侧侧翼有反向末端重复(ITR)序列的有效负载的一个或多个多核苷酸区域，有效负载构建体是在病毒生产细胞中复制以产生病毒基因组的模板。“有效负载构建体载体”是编码或包含有效负载构建体以及用于在细菌、细胞中复制和表达的调节区的载体。“有效负载构建体表达载体”是编码或包含有效负载构建体，并且还包含一个或多个编码或包含用于病毒复制细胞中病毒表达的组分的多核苷酸区域的载体。

“载体”是运输、转导或以其他方式用作异源分子的构建体，例如，能够在宿主细胞中递送并且表达一种或多种目的基因的构建体。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸露 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子聚合物结合的 DNA 或 RNA 表达载体、包封在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体。一些实施方案中，载体可以通过重组产生，可以基于 AAV 亲本或参考序列产生，也可以包含 AAV 亲本或参考序列。所述亲本或参考 AAV 序列可以充当工程化改造载体的原始或后续序列。所述亲本或参考 AAV 序列可包含表达目的基因的多核苷酸序列(编码目的蛋白、多肽或其部分)、调控原件(例如启动子、增强子)的多核

苷酸序列，所述序列可以是野生型的或经修饰的或经突变的。

“载体基因组”是包含编码至少一个反向末端重复(ITR)、至少一个调控序列和至少一个有效负载的多核苷酸。通过从有效负载构建体表达载体复制有效负载构建体来衍生载体基因组。载体基因组编码有效负载构建体的至少一个拷贝。

5 “病毒构建体载体”是包含一个或多个编码或包含 Rep 和/或 Cap 蛋白的多核苷酸区域的载体。“病毒构建体表达载体”是包含一个或多个编码或包含 Rep 和或 Cap 的多核苷酸区域的载体，其还包含一个或多个编码或包含用于在病毒复制细胞中病毒表达的组分的多核苷酸区域。

10 “修饰的”是指与亲本或参照分子或实体相比，分子或实体的改变的状态或结构，可以以多种方式，包括在化学、结构和功能上修饰。在一些实施方案中，通过引入非天然氨基酸或非天然核苷酸来修饰本公开的多核苷酸、多肽、载体、构建体、衣壳等。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。
15 宿主细胞可包括微生物(例如细菌)、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员，例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株；芽孢杆菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母
20 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)、NS0 细胞、293 细胞。

“药物组合物”表示含有一种或多种本公开所述 rAAV 与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

30 “药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时，允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触，例如治疗、药物代谢动力学、诊

断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

5 “治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，诸如包含本公开的任一种多核苷酸或其编码多肽、含有所述多核苷酸的 rAAV 或相关药物组合物作为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有的一种或多种神经退行性疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、
10 年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“组合施用”是指将两种或更多种药剂(例如，rAAV 颗粒)同时或在一定间隔
20 内施用于受试者，使得可以有每种药物对患者和/或受试者在某个时间点同时暴露于两者的作用的重叠。在一些实施方案中，它们在彼此约 60、30、15、10、5 或 1 分钟内或在至少一剂一种或多种其他药剂的约 24 小时、12 小时、6 小时、3 小时内施用。

“递送”是指对靶物递送化合物，诸如细小病毒、例如 AAV 和/或 AAV 化合物、物质、实体、部分、货物或有效负载的动作或方式。此类靶物可以是细胞、
25 组织、器官、生物体或系统。

“改善”指减轻状况或疾病的至少一种指标的严重性。例如，在神经变性疾病的背景下，改善包括减少神经元损失。

“有效量”包含治愈、缓解、改善一种或多种医学病症的症状或病症本身的
30 量，以在临床结果中实现有益或期望的结果。“有效量”取决于其应用的环境，用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。例如，在施用治疗帕金森病的药物组合物的情况下，与未施用该药物组合物的情况下获得的响应相比，有效量是例如足以实现如本公开所定义的帕金森病治疗的量。

35 “包裹”是指包封、围绕或包围，例如使用 AAV 衣壳包封、围绕或包围载体。

“递送”是指对靶物递送化合物，诸如细小病毒、例如 AAV 和/或 AAV 化合

物、物质、实体、部分、货物或有效负载的动作或方式。此类靶物可以是细胞、组织、器官、生物体或系统(无论是生物学还是生产)。“递送剂”是指至少部分促进多核苷酸和/或一种或多种物质(包括但不限于本发明的化合物和/或组合物,例如病毒颗粒或表达载体)对靶定细胞的体内和/或体外递送的任何药剂或物质。

5 “可选”、“任选”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

“受试者”、“患者”意指哺乳动物,尤其灵长类动物,尤其是人。

“约”、“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如,“约”
10 可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者,“约”或“基本上包含”可意味着至多 20%的范围,例如 1%至 15%之间、在 1%至 10%之间、在 1%至 5%之间、在 0.5%至 5%之间、在 0.5%至 1%之间变化,本公开中,数字或数值范围之前有术语“约”的每种情况也包括给定数的实施方案。除非另外说明,否则当具体值在本申请和
15 权利要求中出现时,“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

附图说明

图 1 为本公开表达 AADC 和/或 GDNF 的多核苷酸结构示意图。

图 2A 为质粒转染 SHSY5Y 细胞并给与 L-DOPA 处理后 HPLC 检测 DOPA 的
20 浓度;图 2B 为质粒转染 SHSY5Y 细胞后 ELISA 检测 GDNF 的浓度。

图 3A 为 AADC 密码子优化后的各个 AAV 质粒表达 AADC 蛋白量;图 3B 为 GDNF 密码子优化后的各个 AAV 质粒表达 GDNF 蛋白量。

图 4A 为 AAV2 和 AAV9 血清型转染后小鼠纹状体 AADC 的免疫荧光信号;
图 4B 为 AAV2 和 AAV9 血清型转染后小鼠纹状体 AADC 的免疫荧光覆盖面积。

25 图 5A 为 AAV2-02A 和 AAV9-02A 注射后纹状体 AADC 的表达量;图 5B 为 AAV2-02A 和 AAV9-02A 注射后纹状体 GDNF 的表达量。

图 6A 为 HRPDAAV02-AI(即,02AI,下同)和 HRPDAAV03-DI(即,03DI,下同)药物注射后小鼠对 L-DOPA 应答情况(逆时针旋转);图 6B 为 HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后小鼠对 L-DOPA 应答情况(对侧前肢利用率)。

30 图 7A 为 HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后小鼠对 L-DOPA 应答情况(非给药侧 DOPA 浓度);图 7B 为 HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后小鼠对 L-DOPA 应答情况(给药侧 DOPA 浓度);图 7C 为 HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后小鼠对 L-DOPA 应答情况(血液内 DOPA 浓度);图 7D 为 HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后小鼠对多巴胺神经元的保护
35 情况,对多巴胺神经末梢免疫荧光信号密度进行统计。

图 8A 为 6-OHDA 造模后各组动物对阿扑吗啡的应答情况;图 8B 为

HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后大鼠对 L-DOPA 的应答情况(旋转测试); 图 8C 为建立圆筒测试实验的大鼠模型的检测结果; 图 8D 为 HRPDAAV02-IA 和 HRPDAAV03-DI 药物注射后大鼠对 L-DOPA 的应答情况(对侧前肢利用率); 8E 为 HRPDAAV02-IA 和 HRPDAAV03-DI 给药后纹状体对 L-DOPA 的代谢能力检测结果(患侧/健侧的 DOPA 比值); 8F 为 HRPDAAV-03DI 给药后对 DA 神经元保护作用。

在本公开中, ****代表 $p < 0.0001$, ***代表 p 在 0.0001 至 0.001 之间, 两者均表示极其显著的统计学差异; **代表 p 在 0.001 至 0.01 之间, 表示十分显著的统计学差异; *代表 p 在 0.01 至 0.05 之间, 表示显著的统计学差异。

10

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开, 但这些实施例并非限制本公开的范围。

本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等, 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室; 当代分子生物学方法, Ausubel 等著, Greene 出版协会, Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂, 为市场购买的常规试剂。

实施例 1. AADC、GDNF 多核苷酸结构设计

本实施例对 AADC、GDNF 的编码多核苷酸进行序列设计和工程改造, 以用于转导细胞, 或用于人、动物的体内转导。所述序列可插入到质粒、慢病毒、腺病毒、mRNA-LNP、腺相关病毒(AAV)载体中, 例如通过重组腺相关病毒(rAAV)实现体内、体外转导。所述 rAAV 质粒结构 ITR 之间的具体序列参见表 2, 所使用的增强子例如可包括 CMV 增强子, 启动子例如可包括 CMV 启动子、CBA 启动子。

表 2 中的序列均为未经密码子优化。结构示意图参见图 1。

表 2. 改造的 AADC/GDNF 多核苷酸序列

rAAV 质粒名称	附图中名称	插入目的基因	序列编号	结构特征
HRPDAAV01-A	01A	AADC	SEQ ID NO:13	单基因表达框架
HRPDAAV01-B	01B	AADC	SEQ ID NO:14	单基因表达框架
HRPDAAV01-C	01C	AADC	SEQ ID NO:15	单基因表达框架
HRPDAAV02-A	02A	AADC/GDNF	SEQ ID NO:16	双基因单启动子框架
HRPDAAV02-B	02B	AADC/GDNF	SEQ ID NO:17	双基因单启动子框架
HRPDAAV03-A	03A	AADC/GDNF	SEQ ID NO:18	双基因双启动子框架
HRPDAAV03-B	03B	AADC/GDNF	SEQ ID NO:19	双基因双启动子框架
HRPDAAV03-C	03C	AADC/GDNF	SEQ ID NO:20	双基因双启动子框架

HRPDAAV03-D	03D	AADC/GDNF	SEQ ID NO:21	双基因双启动子框架
HRPDAAV03-E	03E	AADC/GDNF	SEQ ID NO:22	双基因双启动子框架
HRPDAAV03-F	03F	AADC/GDNF	SEQ ID NO:23	双基因双启动子框架

(注: AADC/GDNF 为同时包含 AADC 和 GDNF, 下同)

实施例 2. AADC/GDNF 多核苷酸在体外表达验证 AADC 对 L-DOPA 的转化效率和 GDNF 的表达

5 DOPA 主要在中脑黑质区域产生, 信号通路如下:



SHSY5Y 细胞是一种人类神经母细胞瘤细胞系。本实施例将含有 AADC/GDNF 的 rAAV 载体质粒转入 SHSY5Y 细胞(ATCC), 在培养基中添加左旋多巴 (L-DOPA), 后取上清。

10

1、通过 HPLC 检测多巴胺 (DOPA)的浓度, 以观察 rAAV 载体将 L-DOPA 转化为 DOPA 的转化效率。

方法如下: 第 0 天, 在 6 孔板内铺板 $2E+5$ 至 $6E+5$ 个 SHSY5Y 细胞/孔, 以使 24h 后转染时细胞密度达到 60%~80%。第 1 天, 分别配置 HRPDAAV01-A~HRPDAAV03-F 的转染体系, 包括 A 管(rAAV 质粒 $2.5\mu\text{g}$, Opti-MEM(GIBCO, 31985088) $250\mu\text{L}$, Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000001) $5\mu\text{L}$)和 B 管(Opti-MEM $250\mu\text{L}$, Lipofectamine 3000 $7.5\mu\text{L}$), 将 A 管和 B 管分别配置好后, 混匀后静置 2~3min, 然后将 A 管溶液缓慢加入 B 管内, 轻轻吹打后混匀, 静置 10~15min。转染前细胞换液 1.5mL (DMEM/F12 (GIBCO, 31331093) +15% FBS (GIBCO, 26140079)), 然后逐滴加入配置好的转染体系; 转染后 6h, 更换培养基 3mL (DMEM/F12+15%FBS); 转染后 24h, 更换含有 L-DOPA(Sigma-Aldrich, D9628)(2mM)的培养基(DMEM/F12 + 15%FBS) 3mL ; 转染后 48h, 取上清, 通过 HPLC 检测 DOPA 浓度, 以检测 AADC 的表达和功能。

15

20

HPLC 步骤如下: 裂解组织时加入预冷的 PBS(1mg 组织: $10\mu\text{L}$ PBS), 使用预冷的组织研磨仪充分匀浆样品后取 $100\mu\text{L}$ 匀浆液用作 HPLC 实验。等体积加入预冷的样品处理液(0.2M 高氯酸, 0.2mM 焦亚硫酸钠 0.01% EDTA 2Na), 同时含有 $0.6\mu\text{M}$ DHBA 作为内标, 4°C 预冷的离心机中 10000g 离心 20min, 取上清, 用 $0.22\mu\text{m}$ 水相微孔滤膜加压过滤。 20°C 保存。样品使用 HPLC EDC 系统检测。流动相为 16%甲醇水溶液(含有 40mM 乙酸钠、 15mM 柠檬酸、 0.25mM 辛烷磺酸钠、 0.2mM EDTA 2Na PH 为 4.3)。使用英谱色谱数据工作站软件 V5.0 对色谱峰进行

25

30

分析，以 DHBA 为内标对峰面积进行校正。通过标准品进样结果拟合标准曲线，计算样品中多巴胺的含量，用“ng 多巴胺/mg 组织”表示结果。

2、通过 ELISA 检测 GDNF 浓度，以观察 rAAV 载体表达 GDNF 的效率。

ELISA 实验严格按照试剂盒(RayBiotech, ELH-DDC)说明书进行，具体实验步骤如下：裂解组织时加入预冷的 PBS(1mg 组织：10 μ L PBS)，使用预冷的组织研磨仪充分匀浆样品后，离心取上清，作 ELISA 实验备用。在试剂盒 (RayBiotech, ELH-DDC)上每个孔添加 100 μ L 标准品或样品，室温孵育 2.5 h；每个孔添加 100 μ L biotin 抗体，室温孵育 1 h；每个孔添加 100 μ L Streptavidin 溶液，室温孵育 45min；每个孔添加 100 μ L TMB，室温孵育 30min。每个孔添加 50 μ L 终止液。立即在 450 nm 光谱读数。

检测结果参见图 2A 和图 2B，显示 HRPDAAV02-A 和 HRPDAAV03-D 在 AADC 和 GDNF 的表达和功能上相对较强。

实施例 3. AADC 和 GDNF 的密码子优化

本实施例针对 AADC 和 GDNF 分别设计了 4 条密码子优化的多核苷酸序列。AADC 的野生型多核苷酸序列参见 SEQ ID NO:3，密码子优化序列 AADC01、AADC02、AADC03、AADC04 分别参见 SEQ ID NO:4-7，SEQ ID NO:4-7 与 SEQ ID NO:3 的序列同一性分别为 80.83%、81.21%、79.18%、79.63%。GDNF 的野生型多核苷酸序列参见 SEQ ID NO:8，密码子优化序列 GDNF01、GDNF02、GDNF03、GDNF04 分别参见 SEQ ID NO:9-12，SEQ ID NO:9-12 与 SEQ ID NO:8 的序列同一性分别为 75.13%、73.99%、77.52%、77.83%。

将 AADC01、AADC02、AADC03、AADC04 分别替换 HRPDAAV02-A 中的 AADC 序列，获得 HRPDAAV02-A(AADC01)、HRPDAAV02-A(AADC02)、HRPDAAV02-A(AADC03)、HRPDAAV02-A(AADC04)，在附图中分别对应 02A(AADC01)、02A(AADC02)、02A(AADC03)、02A(AADC04)。将 GDNF 01、GDNF 02、GDNF 03、GDNF 04 分别替换 HRPDAAV02-A 中的 GDNF 序列，HRPDAAV02-A(GDNF01)、HRPDAAV02-A(GDNF02)、HRPDAAV02-A(GDNF03)、HRPDAAV02-A(GDNF04)，在附图中分别对应 02A(GDNF01)、02A(GDNF02)、02A(GDNF03)、02A(GDNF04)。然后重复实施例 2 的筛选，得到表达和功能最强的 AADC、GDNF 密码子优化序列 AADC01、GDNF04，结果参见图 3A 和图 3B。

将 HRPDAAV02-A 和 HRPDAAV03-D 中的 AADC 和 GDNF 替换成 AADC01 (SEQ ID NO:3)和 GDNF04(SEQ ID NO:12)后得到 HRPDAAV02-AI(SEQ ID NO:24)和 HRPDAAV03-DI(SEQ ID NO:25)。HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 在附图中分别对应 02AI 和 03DI。两者结构如表 3。

表 3. HRPDAAV02-AI 和 HRPDAAV03-DI 序列结构

HRPDAAV02-AI (即, 02AI)

区域	起始位置	终止位置	区域长度	序列编号
5'ITR	1	141	141	SEQ ID NO:26
CMV 增强子	157	442	286	SEQ ID NO:27
CBA 启动子	444	721	278	SEQ ID NO:28
杂合内含子	722	949	228	SEQ ID NO:29
AADC01	979	2418	1440	SEQ ID NO:4
P2A	2419	2475	57	SEQ ID NO:48
GDNF04	2476	3111	636	SEQ ID NO:12
WPRE	3118	3706	589	SEQ ID NO:34
SV40 poly(A)	3707	3828	122	SEQ ID NO:32
3'ITR	3848	3988	141	SEQ ID NO:31
HRPDAAV03-DI (即, 03DI)				
区域	起始位置	终止位置	区域长度	序列编号
5'ITR	1	141	141	SEQ ID NO:26
CMV 增强子 2	151	454	286	SEQ ID NO:37
CMV 启动子	455	657	203	SEQ ID NO:35
β -球蛋白内含子	658	1230	573	SEQ ID NO:38
GDNF04	1237	1872	636	SEQ ID NO:12
PA75 polyA	1873	1947	75	SEQ ID NO:36
CMV 增强子	1594	2239	304	SEQ ID NO:27
CBA 启动子	2241	2518	278	SEQ ID NO:28
杂合内含子	2519	2746	228	SEQ ID NO:29
AADC01	2746	4218	1443	SEQ ID NO:4
SV40 PolyA	4225	4346	122	SEQ ID NO:32
3'ITR	4366	4506	141	SEQ ID NO:31

实施例 4. AAV 血清型筛选

将 HRPDAAV-02A 分别用 AAV2 血清型(氨基酸序列参见 SEQ ID NO:41)和 AAV9 血清型(氨基酸序列参见 SEQ ID NO:42)进行包装和纯化, 获得 AAV2-02A 和 AAV9-02A。

病毒包装过程如下:

将包装细胞(viral production cell, Thermo A3152801)以 0.5×10^6 vc/mL 密度接种到装有 1L 培养基(Irvine 91165)的 3L 摇瓶中; CO_2 摇床培养 3 天后, 用新鲜培养基将细胞稀释到 3.0×10^6 vc/mL;

10 将共 4 μ g 三种包装质粒(pHelper、pRC9、pGOI)加入 25mL 新鲜培养基中, 混匀; 将 PEIpro(Polyplus 115-100)加入另一份 25mL 新鲜培养基中, 混匀; 然后将 PEIpro 稀释液倒入质粒稀释液, 迅速混匀; 室温静置 15min 后, 将转染复合物加

入包装细胞;

CO₂ 摇床培养 3 天后, 加入 50mL 细胞裂解液(0.5M hepes, 40mM MgCl₂, 10% tween-20)和 200μLBenzonase(Merck 1.01697.0010), 放回 CO₂ 摇床裂解 4 小时, 即为收获液。

5 病毒纯化过程如下:

收获液通过深层滤器(科百特)过滤去除细胞碎片, 然后使用 100kDa 中空纤维柱(瑞普利金, D06-E100-05-N)浓缩 10 倍并且取代到 PBS 中(5 倍体积);

将换液后的料液上样至 PBS 平衡过的亲和层析柱(Thermo A36652), 以 5 倍柱体积的 PBS 漂洗, 然后用 100mM glycine, pH 3.0 进行洗脱, 收集洗脱液后尽快加入适当体积的 1M BTP, pH 10.0 调节 pH 至 7.0 左右;

加入 30 倍体积 IEX 平衡缓冲液(25mM BTP, pH 9.5)对洗脱中和液进行稀释, 上样至缓冲液平衡过的阴离子交换柱(BIA 311.5113-2), 以 10 倍柱体积的 IEX 平衡缓冲液漂洗, 然后进行 NaCl 盐浓度梯度洗脱, 根据 UV 260/280 收集实心峰;

15 洗脱液通过超滤离心管(Merck, UFC810008)浓缩到 1mL 并且取代到 PBS+0.01% Pluronic F-68 中, 使用 0.22μm 针式滤器过滤后即为纯化病毒。将 AAV2-02A 和 AAV9-02A 进行大鼠(SD 品系, 雄性, 购自上海杰思捷实验动物有限公司)纹状体脑立体定位注射, 注射后 4 周和 8 周取部分大鼠的纹状体, 通过 EILSA 检测 AADC 和 GDNF 表达, 注射后 8 周进行 AADC 免疫荧光切片。

方法如下:

20 取 SD 雄性大鼠, 先用 50mg/kg 舒泰(i.p.)麻醉, 将动物绑定于脑立体定位仪, 沿颅顶正中矢状切开皮肤, 暴露前囟(Bregma), 定位于右侧纹状体区位置 1: AP-0.0mm, ML-2.6mm, DV-4.7mm; 位置 2: AP0.0mm, ML-2.6mm, DV-4.7mm。牙科钻开颅骨颅后插入微量注射器每个位点用微量蠕动泵自动注入 2μL 受试药物(0.2μL/min)。注射完毕留针 10min 后缓慢退出继而缝合伤口。每只大鼠皮下注射左氧氟沙星注射液 0.3mL 防止感染。手术后继续饲养 8 周。

1) 大鼠 4%多聚甲醛心脏灌流后取脑, 后固定 24h 以上, 将样本转入 30%的蔗糖溶液中充分沉底脱水。使用冰冻切片进行纹状体冠状连续切片切片厚度为 30μm 切片置于冻存液中放于 4℃冰箱保存。将脑切片在 PBS 中洗涤三次, 用 0.3%TritonX100 处理 10min, 在含 10%山羊血清的 PBS 中封闭 1h, 一抗为兔抗 AADC 抗体(Absin, abs110350)(1: 1000), 4℃孵育过夜。第二天, 切片用 PBS 洗 3 次, 每次 5min, 室温孵育驴抗兔 IgGAlexaFluor488 抗体(1: 1500)和细胞核染料 DAPI(1: 15000) 1h, PBS 洗 3 次, 用 Dako 抗荧光淬灭封片剂封片。奥林巴斯荧光显微镜下观察拍照, 如图 4A 和图 4B 所示, 染色结果显示, 与 AAV2-02A 相比, 注射 AAV9-02A 后 AADC 的荧光面积明显更大($P < 0.01$, AAV2-02A vs AAV9-02A), 证明 AAV9 比 AAV2 在纹状体区域有更高的表达效率。

2) 大鼠脑定位手术后饲养 4 周或 8 周后直接断头提取注射侧纹状体组织。组

织称重后置于-80℃冰箱冻存。裂解组织时加入预冷的 PBS(1mg 组织: 10μL PBS), 使用预冷的组织研磨仪充分匀浆样品后, 取 100 μL 匀浆液用作 HPLC 实验, 取 40 μL 匀浆液用作组织 DNA 提取以及 qPCR 实验, 剩余体积的匀浆液用作 ELISA 实验。

5 通过 ELISA 检测 AADC 和 GDNF 浓度。ELISA 实验严格按照试剂盒 (RayBiotech, ELH-DDC)说明书进行, 具体实验步骤如下:

用于检测 AADC 的方法为: 在试剂盒(RayBiotech, ELH-DDC)上每个孔添加 100 μL 溶解好的标准品或样品, 室温孵育 2.5 h, 甩干、清洗; 每个孔添加 100 μL biotin 抗体, 室温孵育 1 h, 甩干、清洗; 每个孔添加 100 μL Streptavidin 溶液, 室
10 温孵育 45min, 甩干、清洗; 每个孔添加 100 μL TMB, 室温孵育 30min, 甩干、清洗。每个孔添加 50 μL 终止液。立即在 450 nm 光谱读数。

用于检测 GDNF 的方法为: 在试剂盒 (R&D, DY212)上每个孔添加 100 μL 溶解好的标准品或样品, 室温孵育 2h, 甩干、清洗; 每个孔添加 100 μL 检测抗体, 室温孵育 2h, 甩干、清洗; 每个孔添加 100 μL Streptavidin-HRP 溶液, 室温孵育
15 20min, 甩干、清洗; 每个孔添加 100 μL 底物溶液, 室温孵育 20min。每个孔添加 50 μL 终止液。立即在 450 nm 光谱读数。

如图 5A 和图 5B 所示, 目的基因表达水平检测结果显示, AAV9-02A 比 AAV2-02A 组纹状体内 AADC 和 GDNF 的表达量均明显增高, 证明 AAV9 比 AAV2 在纹状体区域具有更高的转导效率。

20

实施例 5. MPTP 诱导的小鼠 PD 模型内药效验证

本实施例选择 1-甲基-4 苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP)建立小鼠帕金森病模型。MPTP 有高度的脂溶性并易透过血-脑脊液屏障, 进入脑内后可在胶质细胞单胺氧化酶 B 的作用下转化为甲基-苯基吡啶离子(MPP+), MPP+被 DA 转运体主动摄取到多巴胺(dopamine, DA)能神经元线粒体内, 导致 DA 能神经元变性、死亡, 该过程很好的模拟 PD 的症状和发病过程。在成年的雄性小鼠中, 连续 5 天腹腔注射 MPTP, 可以诱发 DA 神经元凋亡, 导致小鼠出现帕金森病样症状。

方法如下: 将小鼠分为四组, 分别为假手术对照组(即正常对照)、模型对照组(即 MPTP 模型对照, 下同)、02AI 组(即 HRPDAAV-02AI)、03DI 组(即 HRPDAAV-03DI)。在 8 周的雄性小鼠单侧纹状体中注射 HRPDAAV-02AI, HRPDAAV-03DI, 均使用 AAV9 衣壳。假手术对照组和模型对照组进行假手术。取 C57BL/6N 雄性小鼠, 采用 1%戊巴比妥钠(剂量为 35~50 mg/kg)腹腔注射对小鼠进行麻醉后, 确认小鼠进入麻醉状态后, 小鼠俯卧位固定于立体定位仪(瑞沃德, 型号 68018), 器械常规消毒后切开头皮, 钝性剥开软组织、骨外膜, 暴露右顶骨, 在前囟前方向 0.8 mm(AP=+ 0.8 mm)、中线旁 1.8 mm(ML=1.8 mm)处钻一骨窗。用
35 微量注射器(规格: 1 μL, 外径: 0.55 mm)注射 AAV 药物, 进针速度为 1 mm/min,

进针至硬膜下 3 mm(DV = -3 mm)，退针至 2.8 mm(DV = -2.8 mm)，以 0.2 uL/min 的速度匀速注射液体，注射完毕后留针 3 min，退针速度为 1 mm/min。

模型对照组和给药组小鼠在进行纹状体注射给药 28 天后，腹腔注射 30 mg/kg 的 MPTP，注射体积为 10 mL /kg，假手术组小鼠腹腔注射给予 10 mL /kg 的生理盐水。造模 5 天后休息 3 天，进行行为学检测。

1) 旋转实验(Rotation test)

为验证 HRPDAAV-02AI, HRPDAAV-03DI 药物递送的 AADC 在单侧纹状体表达后对 L-DOPA 的应答情况，进行旋转实验。对各组实验小鼠灌胃给药左旋多巴(L-DOPA)(20mg/kg)+苄丝肼(6mg/kg)。小鼠给予左旋多巴后即放入测试环境中适应，给药后 45min 之后开始记录小鼠的旋转次数，检测小鼠 30min 内的健侧旋转(左侧旋转)。

结果参见图 6A 和表 4，相比假手术对照组和模型对照组，HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 给药组在 L-DOPA 给药后旋转次数明显增多("02AI 组 vs. 模型对照组", $p = 0.07$; "03DI 组 vs. 模型对照组", $p = 0.01$)，证明了 AAV 递送表达的 AADC 对 L-DOPA 有很好的应答效果。

表 4.小鼠旋转实验结果

组别	动物数量	平均值±SEM
假手术对照组	6	5.00±0.86
模型对照组	13	14.08±3.19
02AI 组	11	66.45±26.59
03DI 组	12	44.92±7.72

2) 圆筒测试实验(Cylinder test)

为检测本底状态下小鼠前肢利用偏好，进行圆筒测试实验。在末次 MPTP 注射小鼠后 4 天，灌胃给药 L-DOPA(10mg/kg)+苄丝肼(3mg/kg)，将小鼠放置在透明圆筒(直径 10 cm、高度 45cm)内，观察并记录 5 min 内小鼠左、右前肢、双侧前肢触壁的次数，小鼠以后肢为支点、一侧或双侧前肢触壁后返回筒底，记一次(小鼠一侧肢体先触壁，另外一侧肢体随后触壁，记为双侧触壁)。每只小鼠实验后用酒精擦拭圆筒。分析小鼠的左前肢利用情况：左前肢使用率(%)=(左侧+0.5 双侧)/(右侧+左侧+双侧) ×100。

结果参见图 6B 和表 5，显示 L-DOPA 给药后，HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 给药组的对侧前肢利用率较模型对照组增多，02AI 组较模型对照组增加 20.4%，03DI 组较模型对照组增加 8.2%。再次证明了 AAV 递送表达的 AADC 对 L-DOPA 的应答效果。

表 5.小鼠圆筒测试结果

组别	动物数量	平均值±SEM	相比模型对照组的变化值(%)
----	------	---------	----------------

假手术对照组	6	0.52±0.08	6.1%
模型对照组	13	0.49±0.03	0
02AI 组	11	0.59±0.02	20.4%
03DI 组	12	0.53±0.03	8.2%

3) 纹状体和血液中多巴胺检测

行为学试验结束后, 取各组小鼠, 灌胃给药 L-DOPA(20 mg/kg, 5 mL/kg)和苄丝肼(5 mg/kg, 5 mL/kg)。给药结束后 1h 后处死小鼠; 处死前取外周血, 进行血液多巴胺检测。处死后分别取健侧和患侧纹状体。DOPA 采用 UPLC-MS/MS 法进行检测。

参见图 7A 和表 6-1, 左侧纹状体(非给药侧)DOPA 检测发现模型对照组和给药组相比假手术对照组 DOPA 均明显下降。证明了 MPTP 造模的成功。

表 6-1.小鼠左侧纹状体(非给药侧)DOPA 检测结果

组别	动物数量	平均值±SEM
假手术对照组	3	1122.0±49.7
模型对照组	7	224.9±44.6
02AI 组	4	274.7±4.2
03DI 组	6	287.9±34.2

10 参见图 7B 和表 6-2, 右侧纹状体(给药侧)DOPA 检测发现 HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 给药组相比模型对照组 DOPA 均明显上升。DOPA 水平恢复至假手术对照组水平。

表 6-2.小鼠右侧纹状体(给药侧)DOPA 检测结果

组别	动物数量	平均值±SEM	相比模型对照组的变化倍数
假手术对照组	3	1473.6±72.6	4.43
模型对照组	7	271.3±48.1	0
02AI 组	4	1277.1±385.1	3.71
03DI 组	6	880.8±200.2	2.25

15 参见图 7C 和表 6-3, 血浆 DOPA 检测发现各组差异不大, 证明 HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 发挥作用主要局限于脑部纹状体, 未发生明显泄露。

表 6-3.小鼠血浆 DOPA 检测结果

组别	动物数量	平均值±SEM
假手术对照组	3	6.33±2.67
模型对照组	7	4.44±2.19
02AI 组	4	1.29±0.68
03DI 组	6	1.85±0.29

4)脑组织免疫组织化学检测

对各组小鼠进行心脏灌注取脑组织进行荧光免疫组织化学检测，具体方法为实验小鼠进行大体观察后，游离胸腔的心脏组织，从左心室插入静脉输液针并固定，剪开右心耳，采用预冷的 PBS 进行灌注至右心耳流出透明的液体，后采用 4% 多聚甲醛经心脏进行灌注，切取脑组织，并放在固定剂(4%多聚甲醛溶液)中将固定好的组织使用石蜡切片进行酪氨酸脱氢酶 TH 染色。

参见图 7D 和表 7，通过荧光免疫组织化学分析，发现假手术对照组和模型对照组两侧 TH 荧光强度相当，而 HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 给药组右侧纹状体(给药侧)相比于左侧纹状体(非给药侧)TH 荧光强度明显增加。证明 HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 药物对小鼠的多巴胺神经元有很好的保护作用。

表 7.小鼠脑组织免疫组化检测结果

组别	动物数量	右侧平均值/左侧平均值
假手术对照组	3	0.94
模型对照组	3	0.88
02AI 组	4	2.34
03DI 组	3	1.26

实施例 6. 6-OHDA 诱导的大鼠 PD 模型内药效验证

本实施例使用 6-OHDA 建立大鼠 PD 模型。6-OHDA 是一种神经毒素，由于结构与多巴胺(DA)类似，常被误作为递质摄入到 DA 能神经元内，通过形成羟自由基、抑制线粒体氧化呼吸链复合物，干扰 ATP 合成，选择性引起 DA 能神经元死亡。损毁侧纹状体 DA 含量下降，导致大鼠出现与人类 PD 类似的症状，模型具有可靠稳定，不可逆转的特点，且可以直观的对其行为缺损进行定量分析，被广泛的用于对抗帕金森药物尤其是对 DA 及其受体有效果的药物进行评价，因此本实施例采用单侧 MFB 注射 6-OHDA 诱导帕金森模型，对 HRPDAAV-02AI, HRPDAAV-03DI 治疗帕金森效果进行评价。

方法如下：将 SD 大鼠分为 6 个实验组，分别为假手术对照组(即正常对照组)、模型对照组、02AI 高剂量组(1E+10 vg/dose)、02AI 低剂量组(2E+9 vg/dose)、03DI 高剂量组(1E+10 vg/dose)、03DI 低剂量组(2E+9 vg/dose)，均使用 AAV9 衣壳。采用 3%戊巴比妥钠(剂量为 50 ~ 60 mg/kg)腹腔注射对大鼠进行麻醉后，大鼠俯卧位固定，器械常规消毒后切开头皮，钝性剥开软组织、骨外膜，暴露右顶骨，除去中线附近的结缔组织，确定矢状缝、前凶和人字点，将抽好造模试剂的微量注射器(规格：10 μ L，外径：0.5 mm)固定在立体定位仪上进行坐标定位，纹状体以前凶作为定位中心点，定位在大鼠右侧，在前凶前方向 0.0 mm(AP=+ 0.0 mm)、中线旁 3 mm(ML=3 mm)处钻一骨窗。进针速度为 1 mm/min，进针至硬膜下 6 mm(DV =

-6 mm), 退针至 5.8 mm(DV = -5.8 mm), 以 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度匀速注射液体 2 μL , 注射完毕后退针至 3.8 mm(DV = -3.8 mm), 以 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度匀速注射液体 2 μL , 完成两点注射后留针 3 min, 退针速度为 2 mm/min, 将头皮缝合并消毒, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热垫上直到大鼠苏醒, 术后连续三天注射青霉素钠(8 万单位/天)及灌胃布洛芬口服液。

5 纹状体注射药物 3 周后进行造模, 采用 3% 戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉, 注射剂量为 60 mg/kg, 注射体积为 2 mL/kg。经过麻醉诱导的大鼠转移至操作台上, 取俯卧体位固定于脑立体定位仪, 保证颅脑处于水平面上, 观察大鼠眼睑反射和痛觉反应, 在眼睑反射反应及四肢和尾部痛觉反应消失后方可开始手术。使用最小号钻头垂直钻孔, 注意不要打偏和伤及脑组织。定位在大鼠右侧(给药侧), 在前
10 凶后方向 2.0 mm(AP=-2.0 mm)、中线旁 2 mm(ML=2 mm)处钻一骨窗。进针速度 6 mm/min, 进针至硬膜下 8.8mm(DV = -8.8 mm), 退针至 8.5 mm(-8.5mm), 以 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度匀速注射 6-OHDA, 每只大鼠注射 4 μL 6-OHDA(5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 注射完毕后留针 3 min, 退针速度 2 mm/min。将头皮缝合并消毒, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热垫上直到
15 大鼠苏醒, 术后连续三天注射青霉素钠(8 万单位/天)及灌胃布洛芬口服液。

造模三周后, 检测大鼠对阿扑吗啡药物的应答情况。大鼠腹腔注射给予阿扑吗啡(0.5 mg/kg), 10 min 后将大鼠放入测试环境中开始记录大鼠 30 min 内的旋转次数。

参见图 8A, 6-OHDA 造模的大鼠相比假手术对照组均有明显增多的旋转次数, 证明该造模实验是成功的。

1) 旋转实验(Rotation test)

为检测纹状体中外源表达的 AADC 对外源 L-DOPA 的应答, 检测大鼠灌胃给予 L-DOPA 后的健侧旋转(左侧旋转)。大鼠经口灌胃给予 L-DOPA(20 mg/kg, 5 mL/kg)+苳丝肼(5 mg/kg, 5 mL/kg), 45 min 后将大鼠放入测试环境中开始记录大鼠
25 30 min 内的旋转次数。

参见图 8B, 模型对照组相比假手术对照组旋转次数没有明显增多, 而 HRPDAAV-02AI, HRPDAAV-03DI 高低剂量给药组相比模型对照组均有明显增多, 说明 AAV 递送至纹状体表达的 AADC 对外源 L-DOPA 药物有很好的应答效果。

2) 圆筒测试实验(Cylinder test)

30 为检测本底状态下大鼠前肢利用偏好, 进行圆筒测试实验。将各组大鼠分别放入一个直径 20 cm 的透明圆筒内, 观察并记录 10 min 内大鼠左、右前肢、双侧前肢触壁的次数。大鼠以后肢为支点、一侧或双侧前肢触壁后返回筒底, 记一次(大鼠一侧肢体先触壁, 另外一侧肢体随后触壁, 记为双侧触壁)。计算大鼠左前肢的使用率: 左前肢使用率(%)=(左侧+0.5 双侧)/(右侧+左侧+双侧) $\times 100$ 。

35 参见图 8C, 模型鼠和给药组的左前肢利用率较空白对照组均有所下降。再一次验证了模型的有效性。

为检测 AAV 药物处理的大鼠对 L-DOPA 的利用情况，大鼠经口灌胃给予 L-DOPA(5 mg/kg, 5 mL /kg)和苄丝肼(2.5 mg/kg, 5 mL /kg)，30 min 后将大鼠放入一个直径 20 cm 的透明圆筒内，观察并记录 10 min 内大鼠左、右前肢、双侧前肢触壁的次数。

5 参见图 8D，补充 L-DOPA 后的模型对照组左前肢利用率没有明显改善，而 HRPDAAV-02AI、HRPDAAV-03DI 组左前肢利用率相比模型对照组有明显提高，证明给药后大鼠对 L-DOPA 的利用率明显提高。再次证明 AAV 递送至纹状体表达的 AADC 对外源 L-DOPA 药物有很好的应答效果。

10 3) 检测 HRPDAAV-02AI、HRPDAAV-03DI 给药后纹状体对 L-DOPA 的代谢能力

行为学试验结束后，取各组大鼠，灌胃给药 L-DOPA(20 mg/kg, 5 mL/kg)和苄丝肼(5 mg/kg, 5 mL/kg)。给药结束后 1h 后处死大鼠。处死后分别取健侧和患侧纹状体。DOPA 采用 UPLC-MS/MS 法进行检测。

15 参见图 8E 和表 8，检测患侧/健侧的 DOPA 比值，发现模型对照组和给药组相比，模型对照组患侧 DOPA 明显下降。证明了 6-OHDA 造模的成功。

表 8.大鼠双侧纹状体 DOPA 检测结果

组别	动物数量	患侧(平均值±SEM)	健侧(平均值±SEM)	患侧/健侧(%)
假手术对照组	3	27729.03±8121.90	28687.57±3329.29	95.49±20.20
模型对照组	9	7299.01±3113.39	25872.46±5398.04	30.05±19.39*
02AI 低剂量组	9	17323.06±5465.61	25432.89±12362.06	77.76±33.49
03DI 低剂量组	9	19029.10±6859.95	20756.06±5501.87	101.99±63.33

20 给药侧纹状体(患侧)DOPA 检测发现 HRPDAAV-02AI 和 HRPDAAV-03DI 给药组相比模型对照组 DOPA 均明显上升。与模型对照组相比，各给药组的患侧/健侧的 DOPA 比值，均有明显提升。证明 HRPDAAV-02AI、HRPDAAV-03DI 给药后纹状体对 L-DOPA 药物代谢能力明显提升。

4) 检测 HRPDAAV-03DI 给药后对 DA 神经元保护作用

25 对各组大鼠进行心脏灌注取脑组织进行荧光免疫组织化学检测，具体方法为实验大鼠进行大体观察后，游离胸腔的心脏组织，从左心室插入静脉输液针并固定，剪开右心耳，采用预冷的 PBS 进行灌注至右心耳流出透明的液体，后采用 4% 多聚甲醛经心脏进行灌注，切取脑组织，并放在固定剂(4%多聚甲醛溶液)中将固定好的组织使用石蜡切片进行酪氨酸脱氢酶 TH 染色。

参见图 8F，通过荧光免疫组织化学分析患侧/对侧的 TH 阳性细胞比值，发现实验模型对照组与假手术组相比，患侧的 TH 细胞存活率不足 15%，表明 6-OHDA 造模成功

30 而 HRPDAAV-03DI 低剂量给药组患侧相比于健侧 TH 荧光强度比值与模型对

catctgctgaacggcgtggagttgcccacagctttaactcaaccctcacagtgctgctggtaattttgactgctctccatgtgggtgaaga
 agaggacagacctgaccggcgcttttagctggatccaacctacctgaagcacagccatcaggacagcggcctgacacagactacagacact
 ggcagatcccactgggcagaaggtttcggctctgaagatgtggttcgtttcgcattatggcgtgaaggccctgcaggcttataccggaagc
 acgtgcagctgtctcatgagttcagtcctgtgctggcaggaccaagattgagatctgcgtggaggtaaatcctggcctgggtgcttcaggc
 5 tgaagggtcttaataagggtgaacgaggctctgctgcagaggatcaacagcggcaagaagatccatctggtgcttgcctatctgaggacaagttc
 gtgctgagatcccatctgctctagAACAGTGGAGTCTCTCATGTGCAGAGGGCTTGGAGCATATCAAGGAGCTGGCCGCTGACGTGCTGAG
 ggctgagagggagtga

>ADC02 DNA(SEQ ID NO:5)

atgaacgctagcagtttcggaggagaggcaaggagatggtggactacgtggccaactacatggaggccatcagaggcagacaggtgtacc
 10 agacgtggagcctggctatctgcggccactgatccctgctgcccacaggagccagatacccttgaggacatcatcaacgacgtggagaa
 galcatcatgcccggcgtgaccactggcattccccttactcttctacttctctacagcttctctatcctgccatgctggccgatatgctgtgc
 ggcgctatcggctgcatcggcttctcttggccgcttccccgcttgaccgagctggagaccgtgatgattggattggctggcaagatgctgga
 gctgcccaggcttctgtaagtagaaggctggcgaggcgcgctgatccagggtctgcttccgaggccactgtggccctgctggc
 15 tgcaggacaaggtaatccacagactgcaggctgctccccgagctgaccaggccgctatcatggagaagctggtggcttactcctctgac
 caggctcacttccgtggagagagctggcctgatcggcgcgtaagctgaaggctatccctctgatggcaatttcgcatgaggccttctgct
 ctgcaggaggctctggagagggataaggctcggcctgatcccttttcatggtggccaccctgggcacaaccacctgttcagctttgaca
 tctgctggaggtggccctatctgcaacaaggaggacatctggctgcacgtggatgctgctctacgctggcagcgccttcatctgcccagtttag
 gcacctgctgaatggcgtggagttgctgactccttaattcaacccccataagtgctgctggtaacttcgactgctctgctatgtgggtgaaga
 20 agaggacagatctgacaggcgcctttagctggaccaactacctgaagcactcccacagatagcggcctgatcaccgactaccggcact
 ggagatccctctggcaggcgcctttagatccctgaagatgtggttcgtttagatgtacggcgtgaaggcctgcaggcttataccggaagc
 atgtgcagctgtcccacgagttcagctctggtgcccaggaccaaggttagatctgcgtggaggtaaatcctggcctgggtgcttcagac
 tgaagggtccaataagggtgaacgaggctctgctgcagagaatcaactccgccaagaagatccacctggtgcttctgacactgagggaagttc
 gtgctgaggtttccatctgctctagAACCGTGGAGAGCGCCCATGTGCAGAGGGCTTGGAGCACATCAAGGAGCTGGCTGCCGACGTGCTGA
 gggctgagagagtgta

25 >ADC03 DNA(SEQ ID NO:6)

atgaatgcctctgagttccgacagcggcaaggagatggtggactacgtggctaactacatggaggccatcagaggcagacaggtgtacccc
 gacgtggagcctggctatctgaggccactgatccctgctgctgcccctcaggagcccacaccttcgaggatatacaatgacgtggagaaga
 tcatacatccaggcgtgaccattggcactctccatacttcttcttacttccctaccgcttctcctatccagctatgctggccgatatgctgtcgg
 30 cgccatcggctgcatcggctttagctggctgctctccagctgtaccgagctggagacagtgatgtagtggactggctggcgaagatgctggag
 ctgcctaaggccttctgaacgagaaggccggcaggggcgcgctgatccagggtcctcctgaggccaccctggctgctgctggct
 gccagaaccaaggtaatccacagctgcaggccgctagccctgagctgaccaggccgctatcatggagaagctgtggttactctccgac
 caggcccattctagcgtggagaggctggcctgatcggcgcgctgaagctgaaggctatccctctgacggcaacttcgcatgagagctagc
 gcccctgacggaggccctggagcgggacaaggctgcccgcctgatccattttctatggtgctaccctgggcacaacaacctgctgttcttctga
 caacctgctgaggtggccctatctgcaataaggaggacatctggctgcatgtggatgctgctctatgctggcagcgcctttatctgcccagagtt
 35 caggcatctgctgaaccggctggagtttccgactctttaaactcaatccccataagtgctgctggaactttgactgtagcgcctatgtgggtga
 agaaggacagatctgaccggccttccggctggatcctacctacctgaagcactctcatcaggattctggcctgatcaccgattacagacatt
 ggagatccctctgcccgggagatttcggagcctgaagatgtggttcgttttcggatgtatggcgtgaaggcctgcaggcctatatacagaag
 cacgtgcagctgtcccacgagtttagagcctgtgctgcccaggaccacggtttagatctgcgtggaggtaaatcctggcctgggtgtcttcag
 gctgaagggtcttaataagggtgaacgaggctctgctgcagcgalcaactccgctaaagaagatccacctggtgcttctgacactgcccgaag
 40 ttcgtgctgaggtttccatctgctccagaaccgtggagtctgcccattgtgcagagagcttgggagcatataaggagctgcccgtgatgtgctg
 agggctgagagagtgta

>ADC04 DNA(SEQ ID NO:7)

atgaacgcctctgagtttcggaggagggaaggagatggtggactacgtggctaactatataaggaggccatcagaggcagacaggtgtaccct
 gacgtggagccaggctacctgagaccactgatcccagccgctcctcaggagcctgacacctttgaggacatcatcaatgatgtggagaag
 45 atcatcatcctgctgacccattggcacagcccttacttttgcctatttcccaaccgctagctcctatccagccatgctggctgatatgctgtgc
 ggcgctatcggctgatcggctttagctggctgctcctctctgctgtacagagctggagacagtgatgattggctggcgaagatgctggag
 ctgcccgaaggccttctgaacgagaaggccggcaggggcgcgctgatccagggtctgcttctgaggccacactgggtgctctgctggcc

gctaggaccaaggtaatccacaggctgcaggctgccagcccagagctgaccaggctccatcatggagagctgggctactctagcga
 ccaggctcattcctctgtggagagggtggcctgacggcgcgctgaagctgaaggctatccctccgatggcaatttcgctatgagagccagcg
 ccctgcaggaggctctggagagggacaaggctgccggcctgaccccttctcatggtgccacactgggcacaaccacatgctgtcttctgac
 aactgtctggaggtggccccatctgcaataaggaggacatctggctgcatgtggatgctgcctacgccggctccgctttatctgccctgagtttc
 5 ggcactgtctgaacggcgtggagttgcccagacgtttaactcaatccccacaagtggctgctggtaacttcgactgctctgctatgtgggtgaa
 gaagaggacagatctgaccggcgcttfcagactggatccaacctacctgaagcactctc atcaggactctggcctgacaccgattaccggcatt
 ggcagatccctctggcccgccggttagagcctgaagatgtggttcgtgttcggatgtatggcgtgaagggcctgcaggcctatataccggaag
 catgtgcagctgtctcatgagtttagtccctgggtgccaggaccctagggtcagatctgcgtggaggtaatcctggccctgggtgtgtctcagg
 ctgaagggcagcaataaggtagaacgagctctgctgcagaggatcaattccgctaag aagatccacctgggtccttctcatctgcgggataagtt
 10 tgtctgagggtccatctgtagccgcaccgtggagctgtcccacgtgcagagagctgggagcacatcaaggagctggccgctg atgtgctg
 agagctgagaggagtgga

>GDNF 野生型 DNA(SEQ ID NO:8)

atgaagttagggatgtcgtggctgtctgctccacaccgctccgcttcccctgcccgggtaagaggcctcccaggcg
 ccgccaagaccgctccctcggccgcccggcgcccttcgctgagcagtgactcaaatatgccaggagattatcctgacagttcagtgatga
 15 tgtcatggattttattcaagccaccattaaaagactgaaaaggcaccagataaacaatggcagtgcttccatgaagagagcggaaatcggcagg
 ctgcagctgccaaccagagaattccagaggaaaaggctggagagggcagaggggcaaaaaccggggtgtgtcttaactgcaatacatftaa
 atgtcactgactgggtctgggctatgaaccaaggaggaaactgatttttaggtactgcagcggctcttgcg atgcagctgagacaactgacgaca
 aaatattgaaaaactatccagaaatagaaggctggtgagtgacaagtagggcaggcatgttgcagaccatcgcctttgatgatgacctgctgtt
 tttagatgataacctggtttaccatattctaagaagcattccgctaaaagggtggatgtatctga

20 >GDNF01 DNA(SEQ ID NO:9)

atgaagctgtgggatgtggtggccgtgtgcctggtgctgctgcatacagcttagcgccttcccctgccagctggcaagagaccacctgaggctcc
 tgcaggagacagatctctggcaggagacgggccccttctgctcttagcgtattccaacatgccgaggactatccagaccagttcagatgac
 gtgatggacttaccaggctaccatcaagaggctgaagagaagcccagacaagcagatggctgtgctgccttagacgcgagaggaaatagaca
 ggccgctgctccaatcctgagaacagcaggggcaagggccggaggggccagcggcgaagaatagaggctgctgctgaccgctatcca
 25 cctgaacgtgacagacctggcctgggctacgagaccaaggaggagctg atcttccgctattgttccggctcttgtatgccgctgagaccacat
 atgacaagatcctgaagaacctgagcagaaacaggagactggtgctgacaaagtgggccaggcctgttgcagaccatcgccttctgatgatga
 cctgagcttctggacgataacctgggtatcacatcctgagaagcactctgccaagagatgtggctgcatctga

>GDNF02 DNA(SEQ ID NO:10)

atgaagctgtgggatgtggtggccgtgtgcctggtgctgctgcatacagcttctgcttccctctgcccgtggcaagaggcctccagaggcccc
 30 agctgaggacagatccctgggcagaaaggagagccccttctgctgtccagcagacttaacatgccgaggattatcccagaccagttcagacatg
 tgatggacttaccaggctaccatcaagaggctgaagagaagcccagataagcagatggctgtgctgcctacgcagagagaggaaacagacag
 gccgctgctgtaacctgagaactctcggggcaagggcagaagggccagagaggcaagaatcggcgtgctgctgacagctatccacct
 gaacgtgacagatctggcctgggctacgagacaaggaggagctgatcttcagatactgttctggcagctgtgatgctgcccagacaacctac
 gacaagatcctgaagaacctgagcagaaatcggaggctggtgtccgataaggtggccaggcctgttgcagacctatcgttctgacgacgatc
 35 tgacttccctggacgataacctggtgtaccacatcctgagggaagcattctgccaagagatgaggctgtatctga

>GDNF03 DNA(SEQ ID NO:11)

atgaagctgtgggatgtggtggccgtgtgcctggtgctgctgcatacagcttctgcttccctctgcccagctggcaagagaccacctgaggcccc
 cgctgaggatagaagcctgggcccagaaaggctccttctccctgagctccgacttaaatatgctgaggattaccagaccagttcagatgacg
 tgatggacttaccaggccacaatcaagcgctgaagaggtctccagacaagcagatggctgtgctgcctaggagagagagaaccggcagg
 40 ctccgctgctaatccagagaactctaggggcaagggcaggagagggccagaggggcaagaatcggcgtgctgctgaccgctatccatctg
 aatgtgaccgatctggcctgggctacgagacaaggaggagctgatcttcaggctactgcagcggctcttgtgacggcgtgagaccacatcgc
 acaagatcctgaagaacctgagcagaaacccagactggtgtctgataaggtggccaggcctgttgcagacctatcgttctgacgacgatc
 tcttctgacgataatctggtgtaccacatcctgagggaagcactctgctaagcgggtggctgcatctga

>GDNF04 DNA(SEQ ID NO:12)

atgaagctgtgggatgtggtggccgtgtgcctggtgctgctgcacaccgcttctgcttcccactgctgcccggcaagagacctcccaggccc
 ctgccgaggacagaagcctgggacggcggagagccccatttctgctgctagcattccaacatgctgaggattaccggatcagttcagatga
 45 cgtgatggatttccagggccaccatcaagagactgaagagatctcctgacaagcagatggctgtgctgctccttagaaggagagaaacaggca

cgctccgccgacctcgccgccccccccgctctgactgaccgcttactcccacaggtagcgggcgggacggcccttctcctccggg
ctgtaattagctgagcaaggtaagggttaaggatggtgtggtgggtatggttttaattacctggagcacctgacctgaaatcactttttt
cagggtggggattcgaacatcggccgcccaccatgaacccagcaggttcaggaggaggggcaaggagatggtggactacgtggccaacla
catggaggcatcagaggcagcagggtgacctggacgtggagccccgtacctgaggccctgatccccccgcccagggagcc
5 cgacacctcagagacatcaaacgacgtggagaagatcatatgcccggcgtgaccactggcacagcccacttcttctgctacttcccc
ccgccagcagctaccccccatgctggccgacatgctgtgcccgcctatcgctgcatcggcttcagctggccgcccagccccgctgacc
gagctggagaccgtgatgatgactggctggcgaagatgctggagctgcccaggcccttctgaacgagaaggccggcagggcgggc
gtgatccagggcagcggcagcagccacctgggtggccctgctggccgaccagccaagggtatccacaggctgagggccgcccagcccc
gagctgaccaggccgcccacatggaagctggtggcctacagcagcagaccaggcccacagcagcgtggagaggccggcctgatggc
10 ggctgtaagctgaaggccatcccagcagcggcaacttcgcatgaggccagcggccctgagggagccctggagagggaacaaggccgccc
ggcctgatcccccttctatggtggccacctgggaccaccacctgctgagcttgcacaacctgctggaggtggccccatctgcaacaagg
aggacatctggctgcacgtggacggccctacccggcagcgccttacttgcctggagttcagcagctgtaacggcgtggagttcggc
acagctcaactcaacccccacaagtggtctggtgaacttcgactgagcggccatggtggtaagaagaggaccgacctgaccggcctt
caggctggacccccactacctaagcacagccaccaggacagcggcctgatcccgactacaggcactggcagatccccctgggcaggagg
15 ttcaggaggcctgaagatggttctgttctaggtatgtacggcgtgaaggccctgagggcctacatcagggaagcagctgagctgagccacgagt
tcgagagcctggtaggaggacccccagggttcgagatctgctggagggtatcctggcctgggtgtcttcaggctgaagggcagcaacaag
gtgaacgagccctgctgagaggatcaacagcggcaagaagatccacctggtccctgcccacctgagggaacaagttcgtgctgaggttcg
atctgacgaggaccgtggagagcggcccacgtgacagggcctgggagcacatcaaggagctggccgcccagctgctgagggccgagag
ggagtgactcagtaagatacattgatgagttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttggaaatttggatgctattgct
20 ttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttcggaccgagcggcagatcaggaaaccttagtgatggagttggccactccctctctgccc
ctgctcgtcactgaggccggcggaccacaaggtgccccagccccgggcttggccccggcggcctcagtagcagagcggcggcagctg
cctgagg

>HRPDAAV01-C(SEQ ID NO: 15)

cctgcaggcagctgcccgtcgtcgtcactgaggcccccgggcaaacccccggcgtcggcggcacccttggctgccccgctcagtag
25 cgagcagcggcagagagggtggccaactccatcactagggttctatcgtatcaagcttcttataacttaccgtaaatggcccggc
tggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaatagtaaccgcaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaac
tgcccacttggcagtaacatgtaacatgccaagtagccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccctggcattgtgccagtac
atgaccttatggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattaccatggtcagggtagccccacgttctgcttactctcccc
tccccccccccccccccccaatttggatttatttttttaattttttgctgagcagatggggggggggggggggggggggggcggcggccagg
30 cggggcggggcggggcggaggggcggggcggggcggaggcggagaggtgcccggcagccaatcagagcggcggcctccgaaagtcc
ttttatggcagggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcggcggcggcggggaggctgctgcccctgccccgctgccc
cgctccgcccggcctcggcggcccggcggcctgactgaccgcttactcccacaggtagcgggcgggacggcccttctcctccggg
ctgtaattagctgagcaaggtaagggttaaggatggtgtggtgggtatggttttaattacctggagcacctgacctgaaatcactttttt
cagggtggggattcgaacatcggccgcccaccatgaacccagcaggttcaggaggaggggcaaggagatggtggactacgtggccaacla
35 catggaggcatcagaggcagcagggtgacctggacgtggagccccgtacctgaggccctgatccccccgcccagggagcc
cgacacctcagagacatcaaacgacgtggagaagatcatatgcccggcgtgaccactggcacagcccacttcttctgctacttcccc
ccgccagcagctaccccccatgctggccgacatgctgtgcccgcctatcgctgcatcggcttcagctggccgcccagccccgctgacc
gagctggagaccgtgatgatgactggctggcgaagatgctggagctgcccaggcccttctgaacgagaaggccggcagggcgggc
gtgatccagggcagcggcagcagccacctgggtggccctgctggccgaccagccaagggtatccacaggctgagggccgcccagcccc
40 gagctgaccaggccgcccacatggaagctggtggcctacagcagcagaccaggcccacagcagcgtggagaggccggcctgatggc
ggcgtgaagctgaaggccatcccagcagcggcaacttcgcatgaggccagcggccctgagggagccctggagagggaacaaggccgccc
ggcctgatcccccttctatggtggccacctgggaccaccacctgctgagcttgcacaacctgctggaggtggccccatctgcaacaagg
aggacatctggctgcacgtggacggccctacccggcagcgccttacttgcctggagttcagcagctgtaacggcgtggagttcggc
acagctcaactcaacccccacaagtggtctggtgaacttcgactgagcggccatggtggtaagaagaggaccgacctgaccggcctt
45 caggctggacccccactacctaagcacagccaccaggacagcggcctgatcccgactacaggcactggcagatccccctgggcaggagg
ttcaggaggcctgaagatggttctgttctaggtatgtacggcgtgaaggccctgagggcctacatcagggaagcagctgagctgagccacgagt
tcgagagcctggtaggaggacccccagggttcgagatctgctggagggtatcctggcctgggtgtcttcaggctgaagggcagcaacaag

cttttacgctatgtggatagctgctttaatgctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctggtgctgtctct
 ttatgaggagtgtggcccgtgtcaggcaacgtggcggtgtgtgactgtgttgcctgacgcaacccccactggtggggcattgccaccacctg
 tcagctcctttccgggacttccgtttccccctccattgccacggcggaactcatcgccctgcttggcccgctgacaggggctcggtg
 ttgggactgacaattccgtgtgtgtcggggaaatcatcgtcctttcctggtgctcctgctgtgttccacctggtattctcgcgggacgtcctt
 5 tgcctacgtccctcggccctaatccagcggaccttccctcccgcgctgctcgggctctgctgcttcccgcttccgcttccgcttccctcaga
 cgagtcggatcctccttggggcgccctccccgtaagatacatgtatgagttggacaaccacaactagaaatgcagtgaaaaaatgctttattgt
 gaaattgtgatctattgctttattgtaaccattataagctgcaataacaagttcggaccgagcggcagatctaggaaacccctagtgatggagt
 gccactcctctctgctgctgctcactgaggccggcgaccaaagtcgcccagcccgggctttgccggcggtcagtgag
 cgagcagcgcgcagctgcctgcagg
 10 >HRPDAAV02-B(SEQ ID NO:17)
 cctgcaggcagctgcgcctgctcctcactgaggcccccgggcaaaagcccggcgctggggcagcctttggctgcccggcctcagtgag
 cgagcagcgcgcagagagggtgccaactccatcactaggggttctatcgtatcaagcttcttaccataactacggtaaatggcccggc
 tggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacccaataggacttccattgacgtcaatgggtgagatattacggtaaac
 15 tgcctactggcagtacatcaagtgatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccctggcattgtgccagtac
 atgacctatgggacttccacttggcagtacatctactgattagtcatcgtattaccatggtgagggagagcccacgttctgcttacttccccca
 tctccccccccctcccacccccaaattgtattattttttaaattttttgctcagcagatggggcgggggggggggggggggcgcgccagg
 cggggcgggcgggggcgagggcgggcgggggcgagggcgagggctcggcgccagccaatcagagcggcgctccgaaagtcc
 tttatggcgaggcggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgcgggcggggagtcgctgctgctccttcccccgtccc
 20 cgtccgcccggcctcgcggcccggccccggctctgactgaccggttactcccacaggtagagcggggcgggagggcccttctcctccggg
 ctgtaattagctgagcaagaggttaaggatggtgtgtgggtattaatgttaattacctggagcacctgcctgaaatcatttttt
 cagggtggggattcgaacatcgccgcccaccatgaagtattggatgctgctgctcctggtctgctcaccacccgctccgcttccc
 ctgcccgggtaagaggcctcccaggcggcccgaagaccgtcctcggccggccggcgccctcgcgctgagcagtgactcaa
 atatccagaggattatcctgatcagttcgatgatgatcagttatcagaaccacataaagactgaaaaggcaccagataaacaaatggca
 25 gtcttctagaagagcggaaatcggcaggctgcagctgccaaccagagaaatccagaggaaaaggctcggagaggccagaggggcaaa
 aaccgggtgtgtcttaactgaatacatttaaatgtcactgacttggctgtggtatgaaaccaaggaggaaactgatttttagtactgcagcgg
 ctctgctgctgagcaacgtacgaaaaatattgaaaaacttatccagaatagaaggctgtgagtgaaaaagtagggcagggcattgt
 gcagaccatcgcttctgctgacctgctgttttttagatgataacctggtttaccatattctaaagaaagcattccgtaaaagggtggtatgctg
 agccaccaacttctcctgctgaaagcaggccggcgacgtggaggagaacccccggccccatgaacggcagcagttcaggaggaggggca
 30 ggagatggtgactacgtgccaactacatggaggcctcagggcagcaggtgtaccccagctggagcccggctactgaggcccctg
 atcccccgccggccccccaggagcccacaccttcaggacatcatcaacgacgtggagaaatcatatgcccggcgtgaccactggca
 cagcccctacttctcctacttcccaccggcagcagctaccccggcctgctgcccagatgctgtgctggcgcacatcggtcgtcagcgttca
 gctggggccgagccccgctgacccgagctgagaccgtgagatgagactggtggcaagatgctgagctgcccgaagccttctgaa
 gagaaaggccggcagggcgggcggtgatccagggcagcggcagcagcaccctgtggtccctgctgcccggcaggaacaggtgat
 ccacaggctgacggccgagccccgagctgacccaggcccatatggagaagctggtggcctacagcagcaccagggcccacagcag
 35 cgtggagaggccggcctgacggcggtgaagctgaaggcctcccagcagcgaacttgcctatgaggccagcggcctgagga
 ggccctgagaggacaaggccggcctgaccccccttctatggtggcaccctgggcaccaccactgctgacgttccacaacctgct
 ggagggtggccccatctgaacaaggaggacatctgctgctgacgtggacggccctacggcgagcggccttacttccccagttcaggc
 acctgctgaacggcgtggagttccgacagctcaactcaacccccacaagtgctgctggtgaacttccactgagcggcctatgggtgaa
 gaagaggaccgactgaccggccttcaggctggaacccacclacclgaagcacagccaccaggacagcggcctgacaccgactacagg
 40 cactggcagatccccctgggcaggaggctcaggagcctgaagatggtgctgttcaggatgtacggcgtgaaggccctgacggcctacatca
 ggaagcacgtgagcgtgagccacgagttcagagcctggtgaggcagaccaccaggctcagatctgctggagggtactcctggcctggtg
 tcttcaggctgaaggcagcaaacaggtaaacaggccctgctgacagggatcaaacagcgaagaaatccacctggtgcccctgcccct
 gagggacaagtctgctgaggttcgcatctgcagcaggaccgtggagagcggccacgtcagaggcctgggagcacatcaaggagctg
 gccggcagctgctgaggccgagaggagtgactcgaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgtg
 45 ctcttttacgctatgtggatagctgctttaatgctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctggtgctgtc
 tctttatgaggagtgtggcccgtgtcaggcaacgtggcggtgtgtgactgtgttgcctgacgcaacccccactggtggggcattgccaccacc
 tgcagctcctttccgggacttccctccccctccattgccacggcggaactcatcgccgctccttggcccgtctggacaggggctcggc

tgttggcactgacaattccgtggttftcggggaatcctcttcccttggctctgcctgtgttccacctggattctgcgggacgtcct
 tctgtactgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgtctccgctcttccgcgttctgccttcgcccctca
 gacgagtcggatctcccttggccgctcccgcctaagatacattgatgagtttggacaaccacaactagaaatgagtaaaaaatgctttatt
 5 tggccactcctctctgcgcgtcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaggtgcccagcccgggctttgcccggcgccctcagtg
 agcagcagcgcgcagctgcctgcagg
 >HRPDAAV03-A(SEQ ID NO:18)
 cctgcaggcagctgcgcgtcgtcgtcactgaggcccccgggcaaaagcccggcgctcggcgaccttggctgcccggcctcagtgag
 cgagcagcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggtcctatcgaatcagcttcttataacttaccgttaaatggcccggc
 10 tggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacccaataggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaac
 tgcctcacttggcagtaacatgaagtgatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccggcctggcattgtcccagtac
 atgacctatggacttctacttggcagtaacatcactgattagtcactgctattaccatggtcagggtagccccacgttctcttcaacttccc
 tctccccccctccccacccccaafttgtatttatttttaatttttggcagcagatggggcgggggggggggggggggcgcgccagg
 15 cggggcgggcgggcgaggggcgggcgggggcgaggcggagaggctcggcgagccaatcagagcggcgctccgaaagtcc
 ttttatggcagggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcggcggggagtcgctgcgcgtgccttgcccccgtccc
 cgtcccggccgctcgcgcggcccggcctctgactgaccggttactcccacaggtagcggggcgggacggcccttctctccggg
 ctgtaattagctgagcaaggtaagggttaaggatggttgggtgggttattaatgtaacttggagcacctgctgaaactctttttt
 cagggtggggattcgaacatggccgaccatgaacccagcaggtcaggaggaggggcaaggagatggtggactacgtggcaacta
 20 catgagggcatcagggcagggcaggtgtaccggacgtggagcccggctacctgaggcccctgatccccgcccggccccccaggagcc
 cgacacctcagggacatcatcaacgacgtggagaaatcatcatgcccggcgtgaccactggcacagcccctacttctgcctacttccc
 ccgccagcagctaccccccatgctgcccacatgctgtcggcgccatcggctgcatcggctcagctggccgcccagccccgctgcacc
 gagctggagaccgtgatgaggactggctggcaagatgctggagctcccaggccttctgaacgagaaggccggcgaggcgggcgcc
 gtgatccaggggcagcggcagggccaccctgggtggccctgctgcccggccaggaccaagggtatccacaggctcagggccgcccagccc
 25 gagctgaccaggccgcatcagagaagctggtggcctacagcagcagaccaggcccacagcagcgtggagaggccggcctgatggc
 ggctgtaagctgaaggccatcccagcagcggcaacttgcctatgaggccagcgcctcagaggccctggagagggacaaggccgccc
 ggctgatcccccttctatggtggccaccctgggaccaccactgctgcagcttgcacaacctgctggagggtggccccatctgaacaagg
 aggacatctgctgcacgtggacgcccctacgcccggcagcgccttcatctgccccagttcaggcaccctgtaacggcggtggagtgcgg
 acagctcaactcaacccccacaagtggtgctggtgaacttgcactgagcgcctatggtggtaagaagaggaccgacctgaccggcgctt
 30 caggctggacccccactacctgaagcacagccaccagacagcggcctgacaccgactacaggcactggcagatccccctggcgaggag
 ttcaggagcctgaagatgtggtcgtgttcaggatgtacggcgtgaaggccctcagggcctacatcaggaaacagctgcagctgagccacgagt
 tcgagagcctggtgaggcaggaccccagggttcagatctgcgtggagggtatcctggcctggtgtgcttcagggctgaaggcgagcaaacg
 gtgaacgaggccctgctgcagaggatcaacagcggcaagaaatccacctggtccctgcccactgagggacaagtctgctgagggtcggc
 atctgcagcaggaccgtggagagcggccacgtgcagaggcctgggagcacatcaaggagctggccggcagctgctgaggcgagag
 35 ggagtgactcagtaagatacattgatgagtttggacaaccacaactagaatgagtaaaaaatgctttatttggtaaafttggatgctattgct
 ttatttgaacattataagctgcaataaacaagttcttataacttacggtaaatggcccctggctgaccgccaacgacccccgccattga
 cgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgtcaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaacctgcccacttggcagta
 catcaagtgatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccctggcattatgcccagtaacattatgggact
 40 ttcctacttggcagtaacatcactgattagtcactgctattaccatgggtatgcccgttttggcagtaacatggggcgtggatagcgggttactac
 ggggatttccaaagtcacccccattgacgtcaatgggagttgtttgaccacaaatcaacgggacttccaaaatgctglaacaactcggccc
 tgacgcaaatggggcgttagcgtgtacggtaggtctatataagcagagctccaccatgaagtattgggagtgctgctgctgctgctgctgctg
 ctgctccacaccgctccgcttcccctgcccggtaagaggcctcccagggcccggcgaagaccgctccctcggccgcccggcg
 cgccctcgcgctgagcagtgactcaaatatgcccagggttatcctgacagttcagatgagtcaggtatfttatcaagccaccatfaaaagactg
 45 aaaaggtcaccagataaacaatgagcagtgcttcttagaagagagcggaaatcggcaggctgcagctgccaaccagagaatccagaggaaa
 aggtcggagaggccagaggggcaaaaaccggggtgtgcttactgcaatacatttaaatgctactgacttgggtctgggctatgaaccaagg
 aggaactgatttttaggtactgcagcggccttgcgagcagctgagacaacgtacgacaaaatattgaaaacttatccagaaatagaaggctgg
 tgagtgacaaagtagggcaggcatgttcagaccatcgccttggatgacctgctgttttagatgataacctggttaccatattctaagaagc
 attccgctaaaagggtgtggatgtatctgaataaagctgagtgggcgccagcctgtgtgctcctgggtctctctgcccgaatgtgcaacaat

cttcggccctcaatccagcggaccttctcccggcctgctgcccgtctgcccctctcccgctcttcgcttccgctcagacgagtcgga
tctccctttgggcccctccccgaataaagtctgagtgggcgagcctgtgtgctggttctctctgcccgaatgtgcaacaatggag
gtcggaccgagcggcagatcaggaaccctagtatggagttggccacacctctctgcccgtcgtcagcagcggggcgacca
aaggctccccgacggcggtttgcccgggcccctcagtagcagcagcagcgcagctgcctgcagg
5 >HRPDAAV03-C(SEQ ID NO:20)
cctgcaggcagctgcccgtcgtcgtcactgaggcccccgggcaaaagcccggcgctcgggagacctttgctcccggcctcagttag
cgagcagcgcgcagagagggagtgccaactccatcactaggggttccatcgcgatcagaagcttcttaccataactacgggtaaattggcccgc
tggtcagaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaatagtaaccgaataggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacgggtaaac
10 tgcctacttggcagfacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattgtcccagtac
atgaccttatggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcactgtattaccatggtcagggtagccccacgttctcttactctcccca
tctcccccccctcccaccccccaatttgtatttatttttaattttttgagcagcagtgggggcgggggggggggggggggcgcgccagg
cggggcgggggcgggggcgaggggcgggggcgggggcgaggcggagaggctcggcgagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtftcc
ttttatggcagggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcccggggagtcgctgcccgtccttgcccccgtccc
15 cgtcccgcggcctcgcggcccggcctctgactgaccggttactcccacaggtagcggggcgggacggcccttctcctccggg
ctgtaattagctgagcaagaggtaaagggtaagggatggttgggtgggtattaatgtaataacttggagcacctgcctgaaactctttttt
cagggtggggattcgaacatcggccgaccatgaacgccagcaggtcaggaggaggggcaaggagatggtggactacgtggcaacta
catggagggcacagggcagcaggtgtaccccacgtggagcccgtactgaggcccctgaccccgcggccccccaggagcc
cgacacctcagagacatcaacgacgtggagaaatcatatgcccggcgtgaccactggcacagcccctacttctcctacttcccc
20 ccgcccagcagctaccccgcctgctggccgacatgctgcccgcctatgctgcatcggctcagctggccgcccagccccgcctgacc
gagctggagaccgtgatgatggactggctggcgaagatgctggagctgcccaggccttctgaaagcagggcgagggcgggc
gtgatccagggcagcggccagcagcccacctggtggccctgctggccgcccaggaccaaggtgatccacagctgcagccgcccagcccc
gagctgaccagggcccatcatgtagaagctggtggcctacagcagcagaccagcccacagcagcgtggagaggcgccgctgatggc
ggcgtgaagctgaagccatcccagcagcggcaacttgcctatgagggccagcggcccctgaggaggccctggagagggacaaggccgccc
25 ggctgaccccccttctatggtggccaccctgggaccaccacctgctgcagcttgcacaacctgctggagggtggccccatctgaacaagg
aggacatctgctgcacgtggacggccctacggcagcgccttactctccccagttcaggcacctgctgaacggcggtggagtgcggc
acagctcaactcaacccccacaagtggtcgtggtgaacttcgactgcagcgcctatgtgggtgaagaagaggaccgacctgaccggcgctt
caggctgacccccactacctgaagcacagccaccagacagcggcctgacaccgactacaggcactggcagatccccctgggcaggagg
ttcaggagcctgaagatgtggtctgttcaggatgtacggcgtgaagggcctcaggcctacatcaggaaagcacgtgcagctgagccacgagt
30 tcgagagcctggtgaggcaggaccccaggttcgagatctgctggagggtatcctggcctggtgtcttcaggctgaagggcagcaacaag
gtgaacgagggcctgctcagaggatcaacagcggcaagaaatccacctggtgcctgcccacctgagggaacaagttcgtgaggttcgccc
atctgcagcaggaccgtggagagcggcccactgacagaggcctggggagcacatcaaggagctggcccggacgtctgaggggcggagag
ggagtgactcagtaagatacatgtatggttggacaaccacaactagaatcagtgaaaaaatgctttattttgtaaaattgtgatctattgct
ttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgccattga
35 cgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgtcaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaacctgcccacttggcagta
catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggact
ttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacttaccatgggtatgcccgttttggcagtacatcaatggcggtggatagcgggttactac
ggggatttccaagtcaccaccattgacgtcaatgggagttgttttgcacaaaaatcaacgggacttccaaaaatgctgtaacaactccgcccac
tgacgcaaatggggcgtgtagcgtgtacgggtggaggctatataagcagagctgtgagtttgggaccctgatgtcttctttttcgtattgtaa
aatcatgttatatgagggggcaaaagtfttcagggtgttttagaatgggaagatgtccctgtatcacatggaccclcatgataattttgtcttct
40 acttctactctgttgaacaccattgtctctcttatttctttcttctgtaacttttctgtaaaccttagcttgcattgtaacgaatttttaaacctttt
gttatttgcagattgtaagtacttcttaactcttttttcaaggcaatcagggtatattatgttacttcagcacagttttagagaacaattgtataa
ftaaatgataaggtagaatatttctgcataaaattctggctggcgtggaaatattctattggttagaaacaactacatcctggtcacatcctgcttct
ctttatggttacaatgataacactgtttgagatgaggataaaaactctgagtccaaaccggcccctctgctaaccatgtcatgccccttctttttcc
45 tacaggccaccatgaagttatgggatgctgctgctgctcctggctgctcctcaccggcgtccgctcccgtcccgggtaagaggcct
cccgaggcggcccgaagaccgctcctcggcggccggcggcggccttccgctgagcagtgactcaaatatgccagagattatcctgat
cagttcgatgatgatgattttattcaagccaccataaaagactgaaaaggctaccagataaacaatggcagtgcttcttagaagagagcgg
aatcggcagcgtcagctgccaaccagagaattccagaggaaaaggtcgggagaggccagaggggcaaaaaccggggtgtgtcttaactgc

aatacattaaatgactgactgactggctctggctatgaaaccaaggaggaaactgatttttaggtactgcagcggctcttgcgatgcagctgagaca
acgtacgacaaaatattgaaaaactatccagaaatagaaggctggtgagtgacaagtagggcaggcatgttgcagaccatcgcctttgatg at
gacctgctgttttagatgataacctggtttaccatattcaagaagcattccgctaaagggtggtgatgtatcgaataaaagtctgagtggcggc
agcctgtgtgtgcctgggtctctctgtcccggaatgtgcaacaatgtagggtgaggaccgagcggcagatctaggaaaccctagtatggagtt
5 gggccactccctctctgcgcgctcgtcactgaggccggcgaccaaaggctgcccagccccgggctttgccccggcgccctcagtga
gcgagcggagcgcgagctgcctgcagg
>HRPDAAV03-D(SEQ ID NO:21)
cctgcaggcagctgcgcgctcgtcactgaggcccccggcgaagccccggcgtcggcgacccttggctgccccggcctcagtgag
cgagcggagcgcgagagggagtgccaactccatcactaggggtctatcgatccgttacataactfacggtaaatggccccctggct
10 gaccgccaacgaccccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgtcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt
attacggtaaacgtcccacttggcaglacatcaagtgtatcatatgccaaglacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccccctggca
ttatgccagtacatgacctatggactttctacttggcagtacatctacgtatttagtcatcgtctattaccatgggtgatgcgggtttggcagtacatca
atggcgctggatagcgggtttagctacggggtttccaagtctccacccatgacgtcaatgggagttgtttgaccaaaataacgggactttc
caaatgtcgtaaacactccgccccattgacgcaaatggcggtgagcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctgtgagttggggac
15 ccttgattgttcttttctgctattgtaaaatcattgtatataggggggcgaagtgttcagggtgtgttttagaatgggaagatgcccctgtatcac
catggacctcatgataatttttcttctacttctactctgttgaaccattgtctcctctattttctttctatttctgtaacttttctgtaaaacttagctt
gcatttgaacgaatttttaacttcttttattgtcagattgtaagtactttctaatcacttttttaagcgaatcagggtatattatattgtacttc
agcacagtttagagaacaattgtataaataatgataaggtagaatattctgcataaaattctgctgctggcggaaatattctattgtagaaca
actacatcctggtcatcctgccccttctttatggttacaatgataacactgtttgagataggataaaatacctgagtccaaaccgggccccct
20 gtaaccatgtcatgcttcttcttttctacaggccaccatgaaattatgggatgctgctgctgctgctccacaccgctccgccc
ttccccctgccccggtaagaggcctccccaggcggccccgaagaccgctccctggcggccgccccgctgagcagtg
actcaaatatgccagaggattatcctgacagttcgtatgctcagttttattcaagccaccataaaagactgaaaaggtcaccagataaaca
atggcagtgcttctagaaagagcgggaatcggcaggtgcagctgccaaccagagaattccagaggaaaaggctggagaggccagaggg
gcaaaaaccggggtgtgtcttaactgaatacattaaatgctactgacttgggtctggtctatgaaaccaaggaggaaactgatttttagtactgc
25 agcggctcttgcgatgcagctgagacaactgacgacaataatgtaaaaacttaccagaataagaaagcgtgtagtacaagaataggcagg
catgtgcagaccatcgcctttgatgatgacctgtcttttagatgataacctggtttaccatattctaagaaagcattccgctaaaagggtgtgag
tatctgaaataaagtctgagtgggcgagcctgtgtgcttgggtctctgtcccggaatgtgcaacaatggaggtagaacctgtttacata
acttacggtaaatggccccctggctgaccgccaacgaccccccccattgacgtcaatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaat
gggtggagatatttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc
30 cgctggcattgtcccagtacatgacctatggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgtattaccatggtcagggtagccc
cagttctgttctacttccccatccccccccctccccaccccccaattttgtatttttttaattttttgtagcagcagtgggggcggggggg
ggggggggcgcgccagggcgggggggggcgggggcgaggggcgggggcgaggcggagaggctcgggcgagccaatcagag
cggcgcgctccgaaagttcctttatggcagggcgcgggcgggccctataaaaagcgaagcggcgggcggggagtcgctgcg
cgctgcttgcctccgctccccgctccgcccgcctcgcgcggccccggcctgactgaccgcttactcccacaggtagcggggcg
35 ggacggcccttctctccgggctgtaattagctgagcaagaggaaggggttaagggatgggtgggtgggtgattaatgttaacttggag
cacctgctgaaatcactttttcagggtgggggttcgaacatcggccgaccatgaacgccagcagttcaggaggaggggcaaggagat
gggtgactacgtgccaactacatggaggcagcaggcaggtgtacccccagctggagccccgctacctgagccccctgatcccc
gccccgccccagggagccccacacctcaggagacatcatcaaacgacgtggagaagatcatcatgccccgctgaccactggcacagcc
cctacttctcgcctacttccccaccgagcagctaccccccatgctgcccagatgctgtcgcgccalcgctgcatcggttccagctgg
40 gcccagccccgctgaccgagctgagaccgtgatggtgactggctgggcaagatgctggagctgccaaggccttctgaaagagaa
ggccggcgaggcgcgcgctgatccagggcagcggcagcaggccacctggtgcccctgctggcccaggaaccaagggtatccaca
ggctgcagcccagccccagctgaccagggcccatatggagaagctggtggcctacagcagcagaccagcccacagcagctgg
agaggccggcctgatggcgcggtgaagctgaaggccatccccagcagcgaacttccatgaggccagcgcctgagggagggcc
tggagagggacaaggccggcctgatcccccttctatggtgcccacctgggaccaccactgctgacgttgcacaacctgctggagg
45 gggccccatctgcaacaaggaggacatctgctgcagctgacggcctacggcgagcgccttctctgccccgagttcaggcacctgct
gaacggcgtggagttccgacagcttcaacttcaacccccacaagtgctgctggtgaacttgcactgacgcccattggtgaaagag
gaccgacctgaccgcccctcaggctggaacccacctacctaagcacagccaccaggacagcggcctgatccgactacagccactgg

cagatccccctgggcaggaggttcaggagcctgaagatggttcgttcaggatgtacggcgtgaaggcctgcaggcctacatcaggaa
cacgtgcagctgagccacgagttcagagcctggtgaggcaggaccccagggttcgagatctgcgtggagggtatcctggcctgggtgcttc
aggctgaaggcagcaacaaggtaacgaggccctgctgcagaggatcaacacgcgaagaagatccacctgggtccctgcccctgaggg
acaagttcgtgctgaggttccatctgcagcaggaccgtgagagcggcccacgtgcagaggcctgggagcacatcaaggagctggccgc
5 cgacgtgctgaggccgagaggagtgactcgaagatacatgtagtgggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttat
ttgtgaaattgtgtagctattgctttattgtaaccattataagctgcaataaacaagttcggaccgagcggcagatctaggaaaccctagtatgga
gttggccactcccctctgcgcctcgtcgtcactgaggccggggcgaaccaaggctgcccagcgggggctttgcccggggcgccctcagt
gagcgagcagcgcgcagctgcctgcagg
>HRPDAAV03-E(SEQ ID NO:22)
10 cctgcaggcagctgcgcctcgtcgtcactgaggcccccgggcaaagcccggcgctggggcagaccttggctgcccggcctcagtgag
cgagcagcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggtccatcgalatccgttacataactfacgtaaatggcccgcctggct
gaccgccaacgaccccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgtcaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagt
atftaccgtaaacgtcccacttggcagtaacatcaagtgtatcatatgccaagtagcggcccctattgacgtcaatgagcgttaaatggcccgcctggca
15 ttatcccagtaacatgacctatgggacttccacttggcagtaacatcactgattagtcacgtctattaccatgggtgatgctgtttggcagtaacatca
atggcgctgtagagcgttggactcaacggggtttccaaagtctccaccccattgacgtcaatgggagttgtttgaccacaaatcaacgggacttcc
caaatgtcgtaacactccgccccattgacgcaaatggcggtgagcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctgcccaccatgaagt
atgggatgctgtggctgtcctggtgctgctccacaccgctccgctcccgctcccgggtaagaggcctcccaggcgcggccgga
20 agaccgctcccctggccggccgcccgcgtcgccttcgctgagcagtgactcaaatatgcccaggatfatcctgatcagttcgtatgatgcatgg
atftattcaagccaccattaaaagactgaaaaggtcaccagataaacaatggcagtgcttccctagaaagagcgggaatcggcagcgtgcagct
25 gccaaccagagaattccagaggaaaaggctcggagaggccagaggggcaaaaaccgggggtgtgtcttaactgcaatacttaaatgactg
acttgggtcgtggctatgaaaccaaggaggaactgattttaggactgcagcggctcttgcgtgagcagctgagacaacgtacgacaaaaattga
aaaactatccagaatagaaggctggtgagtgacaaagtggggcaggcatgtgacagaccatcgcctttgatgatgacctgctgttttagatga
taacctggtttaccatattcaagaagcattccgttaaaaaggtggtgaglatctgaaataagctgagtgggcggcagcctgtgtgtccctgggt
tctctctgcccggaatgtgcaacaatggagggtgaagctcgttacataacttacgtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccg
30 cccattgacgtcaatagtaaccgaataggacttccattgacgtcaatgggtggagattttaccgtaaacctcccacttggcagtaacatggt
atcatatgccaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattgtgccagtaacatgacctatgggacttccacttgg
cagtaacatcactgtatttagtcacgtctattaccatggctgaggtagccccacgttctgcttcaacttccccatccccccccccccaccacaatt
ttgtatttatttttttaattattttgtgcagcgtatggggggggggggggggggggcgccagggcggggcgggggcgagggg
cgggcgggcgaggcggagaggtgctggcggcagccaatcagagcggcgcgtccgaaagtcttctttatggcggaggcggcgggcg
35 gcgccctataaaaagcgaagcgcggcgggggagtcgtcgcgtgcttcccccgtccccgtcccgcggcggcctcgcggccg
cccggcccggctctgactgaccggttactcccacaggtagcggggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggta
agggttaaggatggttgggtgggttattaatgttaattacctggagcacctgctgaaatcattttttcaggttgggggattcgaaatcg
ggccaccatgaacgcccagcagttcaggaggaggggcaaggagatggtgactacgtggccaactacatgagggcacagggcagg
caggtgtaccccagcgtggagcccgtacctgaggcccctgatccccggccggccccaggagcccagacctcgaggacatcatcaa
40 cgacgtggagaagatcatatgcccggcgtgaccacttggcacagcccctacttctgcctacttccccaccgagcagctaccccgccatg
ctggccgacatgctgtcggcgcctacggctgcacggctcagctggccggccagccccgcctgaccggagctggagaccgtgatgagga
ctggctggcaagatgctggagctgcccaggccttctgaacgagaaggccggcagggcgggcgtgatccaggcagcggccagcga
ggccaccctggtggccctgctgcccagaccgaaggtgatccacagcctgacggccagcccagcccagctgaccaggccgacatcag
gagaagctgggtggcctacagcagcaccaggcccacagcagcgtggagaggccggcctgatcggcgggcgtgaaagctgaagccatcccc
45 agcagcggcaacttgcctatgaggccagcgcctcagggaggccctggagaggacaaaggccggcgtgatcccccttctcatggtggc
caccttgggcaccaccactctgcagcttcgacaacctgctggagggtggccccatctgcaacaaggaggacatctggtgctgcagctggacgc
cgcttacccggcagcgccttcatctgccccgagttcaggcacctgctgaacggcgtggagttcggccgacagcttcaactcaacccccacaag
tggctgctgtgaacttgcactgcagcgcctatgggtgaagaaggagaccgacctgaccggcgcctcaggctggaccaccctacctgaag
cacagccaccaggacagcggcctgacaccgactacaggcactggcagatccccctggcaggaggctcaggagcctgaagatgtgttctgt
50 gttcaggatgtacggcgtgaaggccctgcagcctacatcaggaaagcagctgacgtgagccacgagttcagagcctggtgaggcaggacc
ccaggtcagatctgcgtgagggtatcctgggcctggtgtctcagcgtgaaggcagcaacaagggtgaacgaggccctgctgcagaggga
taacagcgcgaagaagatccacctggtgcccctgaccactgagggacaagtctgctgaggttcgcctatctgcagcaggaccgtggagagcg

cccacgtcagaggcctgggagcacatcaaggagctggccgacgtgctgaggccgagaggagtgactcgaatcaacctctgga
 ttacaaaatttggaaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatcgcctttaatgcctttgatcatgctattgcttccc
 gtatggctttcattttctcctctgtataaatcctggtgctgctctttatgaggagttggtgcccgttcaggcaactggcgtggtgctgactggt
 ttgctgacgcaacccccactggtggggcattgccaccacctgacgtcctttccgggactttcgccttccccctccattgcccagcggaact
 5 catcgccgctgcttggcccgtgctggacaggggctgggctgttgggactgacaattcgtggtgtgctgggaaatcatgctcttcttgg
 ctgctgcctgtgttccacctggattctgcggggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctccgcgctgc
 tgcggctctgccccttccgctcttccgctcttccgctcagacgagtcggatccttggggccctccccgctaagatacattgatgatt
 ggacaaccacaactagaaatcagtgaaaaaatgctttatttggaaatttggatgctattgctttatttgaaccattataagctgaataaacaagt
 tcggaccgagcggcagatcaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgctcgtcctcactgaggccggcgacaaaa
 10 ggtcgcggcagcccgggcttggcccggcgccctcagtagcagcagcagcgcgagctgctcagg
 >HRPDAAV03-F(SEQ ID NO:23)
 cctcaggcagctgcgctcgtcgtcactgaggcccccgggcaaacccggcgctgggagacctttggcggccctcagtag
 cgagcagcgcgagagaggagtgccaactccatcactaggggtcctatcgalatccgttacataactfacgtaaatggcccgcctggct
 gaccgccaacgaccccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgtcaataggactttccattgacgtcaatgggtggagt
 15 attacggtaaacgcccacttggcaglacatcaagtgtatcatatgccaaglacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggca
 ttatcccagtacatgacctatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatttagtcatcgtctattaccatggtagtgggtttggcagtacatca
 atggcgctgtagcgggtttagctacggggatttccaaagtctccaccccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccataaacgggacttcc
 caaatgtcgaacaactccgcccattgacgcaatggcggtaggcgtgtacgggtggaggtctatataagcagagctaagaggtaagggtt
 taaggatggttgggtgggttattaatgtttaattacctggagcacctgctgaaatcactttttcagggtggccaccatgaagtatgggatg
 20 tctgtgctgtcctggctgctccacaccgctccgcttcccgtgcccgggtaagaggcctcccaggcggcccgaagaccgct
 cctcggccgcccgcgcccctcgcgctgagcagtagctcaaatatccagaggattatcctgacagtgatgcatggttatttca
 agccaccattaaaagactgaaaaggtcaccagataaacaatggcagtgcttctagaaagagcggcaatcggcaggtgcagctgccaacc
 agagaatccagaggaaaaggtcggagagggcagaggggcaaaaaccggggttggcttaactgcaalacattaaatgtaactgacttgggtc
 tgggctatgaaaccaaggaggaaactgatttttaggtactgcagcggctcttgcgtagcagctgagacaactgacgaaaaatattgaaaacttat
 25 ccagaaatagaaggctggtgagtgacaagtagggcagcatgttcagaccatcgctttgatgatgacctgctgttttagatgataacctggt
 ttaccatattctaagaaagcattccgctaaaaggtgtggtatgtatctgaaataaagtctgagtgggcggcagcctgtgtgtcctgggttctctgtc
 ccggaatgtgcaacaatggagggtgagcttgcataaactacggtaaatggcccgcctgctgaccgccaacgaccccccccattgac
 gtcaatagtaaccgaataggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgc
 caagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattgtcccagtacatgacctatggacttctacttggcagtacat
 30 ctacgtattagtcatcgtattaccatggtcagggtagccccacgttctgcttactctcccctccccccccctcccccccccaattttgtatttat
 ttatttttaattattttgtcagcagatggggcgggggggggggggggggcgcgccagggcgggggcgggggcgaggggcgggggcg
 gggcgaggcgagagggtcggcgggcagcaatcagagcggcgctccgaaagttccttttatggcagggcgggcgggcgggccct
 ataaaaagcgaagcggcgggggggagtcgctgctgcttccgcccgtgccccgctccgcccggcctcgcgcccggccc
 ggctctgactgaccggtactcccacaggtgagcggcgggcagcccttctcctcgggctgtaattagctgagcaagaggtaaagggttaa
 35 gggatggttgggtgggttattaatgtttaattacctggagcacctgctgaaatcactttttcagggtggggattcgaacatcggcccacc
 atgaaccagcaggtcagggaggagggaagagatgggtgactcgtggcaactacatggaggcatcagggcagcaggtgtacc
 ccgacgtggagcccggctacctgagcccctgacccccggccgccccccaggagcccacacctcggaggacatcaacgacgtgga
 gaagatcatatcccggcgtgaccactggcacagcccctactcttccctacttcccaccgcccagcagctaccccgcctgctggccgac
 atgctgtcggcgccatcggctgcatcggctcagctggccgcccagccccgcctgaccagagctggagaccgtgatgtaggactggctggg
 40 caagatgctggagctgccaagcctcctgaacgagaagggcggcgaggcgggcgctgacccagggcagcggcagcagccct
 ggtggccctgctggcccaggaccaagggtatccacagcgtgacggccgcccagccccgagctgaccagggcccatcatgagaagctg
 gtggcctacagcagcagaccaggcccacagcagcgtggagaggccggcctgacggcgggcgtgaagctgaaggccatcccagcagcgg
 caacttcgcatgaggccagcgcctcagggaggccctggagaggacaagggcggcctgaccccccttctatggtggccaccctgg
 gcaccaccactgctcagcttgcacaactctgtaggtggccccatctgcaacaaggaggacatctggctgcagctggacggcgcctacg
 45 ccggcagcgccttcatctgccccgagttagcaccctgtaacggcgtggagtccgacagcttcaactcaacccccacaagtgctgct
 ggtgaactcagctcagcgcctatggtgtaagaaaggaccgacctgaccggcctcaggctggaccccactacctgaagcacagcc
 accaggacagcggcctgacaccgactacaggcactggcagatccccctgggaggggttcaggagcctgaagatgtgttctgtttagga

ccaaggcttgcataagaggactcttgactttcagcaatgtcatc

>WPRES(EQ ID NO:34)

Aatcaacctctgattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatagctgctttaatgacctttgatc
atgctattgcttcccgatggtttcattttctctctgtataaatctgtgtgctgctctttatgaggagtgtggccccgtgtcaggcaacctggcgt
5 ggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgcccaccctgtcagctccttccgggactttcgtttccccctccctattgc
cacggcggaactcatcgcgcctgccttgcctgctgacaggggctcggctgttggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcat
cgtccttctgtgctcgcctgtgttggccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttccgcccctcaatccagcggacctcctt
ccccggcctgctgcccgtctgcggccttcccgcttctgccttcccccagacgagtcggatcctcctttgggcccctccccgc

> CMV 启动子(SEQ ID NO:35)

10 Gtgatgctggtttggcagtacatcaatggcggtgtagcggttgactcacgggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgt
tttcacaaaatcaacgggactttcaaaaatgtcgtataaacctccccattgacgcaaatggcggttagcggtgtacgggtgggaggtctatat
aagcagagct

> PA75 polyA(SEQ ID NO:36)

15 Aataaagtctgagtgccggcagcctgtgtgcttgggttctctgtcccgaatgtgcaacaatggagggtggcctacacaggaagcac
gtgcagctgagccacgagttcagagcctggtgaggcaggaccccagggtcagatctgctgagggtatcctggcctggtgtcttcagg
ctgaaggcagcaacaagggtgaacgaggcctgctgcagaggatcaacagcccaagaatccacctggtccttccacctgaggaca
agttcgtgctgagggtccatctgcagcaggaccgtgagagcggcctgctgagaggcctggagcacatcaaggagctgcccgcga
cgtgctgaggccgagagggtgactcagtaagatactatgtagtgggacaaccacaactagaaatgagtgaaaaaatgctttattgt
20 gaaattgtgatctattgctttattgtaaccattataagctgcaataaacaagttcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggtgaccgccc
aacgacccccgccattgacgtcaataatgctgtatgtccatagtaacgtcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggt
aactgcccacttggcagctacatcaaggtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcca
gtacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctactattagctacgtattaccatgggtatgctgggtttggcagctacatcaatggcgct
ggatagcgggtttgactcacggggtttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgtttgcacaaaatcaacgggactttcaaaaatg
25 cgtataaactccgccattgacgcaaatggcggttagcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctGCCACCatgaagttaggg
atgctgtggctgtctgctgctgctccacaccgctccgcttcccgtgcccgggtaagaggcctcccaggcggcccgaagacc
gctcccctggccgcccgcgccttccgctgagcagtgactcaaatatgcccagaggtatcctgatcagttcgtatgctatggtatttat
taagccaccattaaaagactgaaaaggtc

> CMV 增强子 2(SEQ ID NO:37)

30 Cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggtgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgtc
aatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagctacatcaagtgtatcatatgccaagtacccccct
ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggtgacattatgcccagctacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctacgtattatgctg
ctattaccatg

> β-球蛋白内含子(SEQ ID NO:38)

35 Gtgagttggggacccttgattgtcttctttctgctattgtaaaatcatgttatatggaggggcaagtttcagggtgtgttttagaatgggaag
atgtccctgtatcaccatggacctcatgataattttttcttctacttctctgttgaacaaccattgtctcctcttattttcttcttctgtaactttt
cgttaacttttagcttgcattgtaacgaatttttaaaatcactttgtttattgtcagattgtaagtacttctctaatcacttttttcaaggcaatcagggt
atattatattgacttcagcacagttttagagaacaattgtataaataatgataaggtagaatatttctgcatataaattctggctggctggaaatattc
ttattgtagaacaactacatcctgtcatcctccttctctttatggtacaatgatatacactgtttgagataggataaaatactctgagtcca
aaccgggcccctctgtaaccatgttcatgcttcttctttctacag

40 > MVM intron(SEQ ID NO:39)

aagaggtaagggttaaggatggtgtggtgggtattaatgttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttcagggtgg

> MCS(SEQ ID NO:40)

atcgatatccgttaca

> AAV2 衣壳(SEQ ID NO:41)

45 atggctccgatggtatcttccagattggctcagggacactctctgaaggataagacagtggtggaagctcaaacctggcccaccaccacc
aaagcccgcagagcggcatalaggacgacagcaggggtctgtcttctgggtacaaatgacctggaccttcaacggactcgaagaaggag

agccggtaacgaggcagacgcccggccctcagcagcagacaaagcctacgaccggcagctcagacagcggagacaacccgtacctcaagt
acaaccacgcccagcggagttcagggagcgcctfaaag aagatcgtctttggggcaacctcggacgagcagcttccaggcgaaaaag a
gggttctgaacctctggcctggttagaacctgftaagacggctccgggaaaaaaggccggtagagcactctcctgtagcagcagactc
ctcctcgggaaccggaaagcgggcccagcagcctgcaagaaaagattgaattttggtcagactggagacgcagactcagctaccccca
5 gctctcggacagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatacagtgctacaggcagtgccgaccatggcagacaataacgagg
gcgcccagggagtggttaattcctcgggaaattggcattgagattccacatggatgggacagagtcaccaccagcacccgaaacctggg
ccctgccacctacaacaaccacctctacaacaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcactactttggctacagacccttgg
gggtattttgactcaacagattccactgcccactttaccacgtgactggcaaaagactcatcaacaacaactggggattccgaccaagagactca
acttcaagctcttaacattcaagtcaaaagaggtcacgcagaatgacggtagcagacgattgccaataaccttaccagcaggttcagggtttac
10 tgaactcggagfaccagctcccgtacgtcctcggctcggcgcacatcaaggatgctcccgccgttcccagcagacgtcttcatggtgccacagfatg
gatacctcaccctgaacaacgggagtcagcagtaggacgctcttactttactgctggagtagtcttctctcagatgctcgtaccggaaacaa
ctttacctcagctacacttttaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagctggaccgtctcatgaaacctctcaccgaccagta
cctgtattacttgagcagaacaacactccaagtggaaaccaccagcagtcgaaggcttcagtttctcagccggagcggagtgacatcgggacc
agcttaggaactggcttctgtagccctgtaccgcccagcagcagagtatcaagacatctcgggataacaacaacagtgaaactcgtggactgga
15 gctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctgtagaattccgggcccggccatggcaagccacaaggacgatgaagaaaagtttttctca
gagcgggggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaatgtggacattgaaaaggctatgacagacgaagaggaaatcaggaca
accaatcccgtggtacggagcagfatggtctgtatctaccaacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgagatgtcaacacacaag
gctgttccaggcatggtctggcaggacagagatgtgtacctcagggcccactcgggcaagattccacacacggacggacattttacccc
tctcccctcatgggtggattcggacttaaacacctctccacagattctcatcaagaacaccccggtagctgcaatcctcagaccacctcagtg
20 cggcaagttgtctcttcatcacagactccacgggacaggtcagcgtggagatcagagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaacgct
ggaatcccgaatcagctactccaactacaacaagtctgtaattggacttactgtggacactaatggcgtgtatfcagagcctcggcccaatt
ggcaccagatacctgactcgtaatctgtaa

> AAV9 衣壳(SEQ ID NO:42)

atggctccgaggttatcttccagattggctcagaggacaacctagtgaaaggaaatcgcgagtggtggctttgaaacctggagcccctcaacc
25 aaggcaaatcaacaacatcaagacaacgctcagaggtctgtgcttccgggttacaataaccttggaccggcaacggactcgaagggggag
ccggtaacgcagcagacgcccggccctcagcagcagacaaggcctacgaccagcagctcaaggccggagacaacccgtacctcaagtac
aaccacgcccagcggagttccaggagcggctcaaag aagatcgtctttgggggcaacctcgggagcagcttccaggccaaaaagag
gcttctgaacctctggtctggttaggaaagcggcctaagacggctcctggaaagaaggcctgtagagcagctcctcaggaaccggactcct
30 ccgcccgtattggcaaatcgggtgcacagcccctaaaagagactcaattcgggtcagactggcgcacacagagtcagctccagacctcaac
caatcggagaacctcccagccccctcaggtgtggatcttacaatggttcagggtgtggtggcaccagtggcagacaataacgaagggtc
cgatggagtggtgtagtctcgggaaattggcattgctgattcccaatggtcggggacagagtcaccaccagcaccgaaacctgggcctg
cccactacaacaatcactctacaagcaaatctcaaacagcacatctggaggatctcaaatgacaacgctacttggctacagaccctctg
ggggattttgactcaacagattccactgcccacttccaccagtgactggcagcagactcaacaacaactggggattccggcctaagcagact
caactcaagctctcaacattcaggfcaaaagaggttacggacaacaatggagfcaagaccatgccaataaccttaccagcaggtccaggctt
35 caggactcagactatcagctccgtacgtctcgggtcggctcagagggtcctcccggcttcccagcggacgttttcatgattctcagta
cgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccggtggctgctcttcttactgctggaatattcccgtgcaaatgctaagaacgggtaac
aactccagttcagctacgagttgagaaacgtaccttccatagcagctacgctcacagccaagcctggaccgactaatgaaactcactcagac
caactgttactatctcaagactaataacggfctggacagaatcaacaacgctaaaatcagtggtggccggaccagcaacatggctgtcc
agggaagaaactacatacctggaccagctaccgacaacaacgtgtctcaaccactgtgactcaaaacaacaacagcgaattgtctggcctgg
40 agcttcttctggctcfaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaagaaggagaggaccgttcttcttcttctg
tggatcttaattttggcaaacaggaaactggaaagagacaacgtggatgctggacaagtcagataaccaacgaagaagaatlaaaactactaa
cccggtagcaacggagctctatggacaagtgccacaacaccagagtgcccaagcagaggcgcagaccggctgggtcaaaaaccaaggga
atactccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggaccatttggccaaaattcctcacacggacggcaacttccaccttct
cgctgatggagggtttggaaatgaaaccccctcctcagatcctcacaacacacctgtacctgagctcctcaacggccttcaacaag
45 gacaagctgaacttctcaccagatcttactggccaagtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaagcgtgga
accgggagatccagctactccaacttacaagctcaataatgtgaatttctgcttaatactgaaggtgtatfatgaaaccccggcccaattggca
ccagatacctgactcgtaatctgtaa

- > T2A 氨基酸序列(SEQ ID NO:43)
EGRGSLTTCGDVEENPGP
- > P2A 氨基酸序列(SEQ ID NO:44)
ATNFSLLKQAGDVEENPGP
- 5 > E2A 氨基酸序列(SEQ ID NO:45)
QCTNYALLKLAGDVESNPGP
- >F2A 氨基酸序列(SEQ ID NO:46)
VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
- > T2A 核苷酸序列(SEQ ID NO:47)
- 10 gagggcagaggcagtctgctgacatgcggtgacgtggaagagaatcccggccct
> P2A 核苷酸序列(SEQ ID NO:48)
gccaccaacttctccctgctgaagcaggccggcgacgtggaggagaaccccggcccc
- > E2A 核苷酸序列(SEQ ID NO:49)
cagtgcaccaactacgccctgctgaagctggccggcgatgtggagagcaaccccgggccc
- 15 >F2A 核苷酸序列(SEQ ID NO:50)
gtgaacagactttgaattttgaccttctcaagttggcgggagacgtggagtccaaccctggacct

权利要求书:

1. 核酸分子, 其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸, 其中, 所述第一多核苷酸编码芳族 L-氨基酸脱羧酶 (AADC) 蛋白, 所述第二多核苷酸编码神经胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 蛋白。
5
2. 如权利要求 1 所述的核酸分子, 其中, 所述 AADC 蛋白包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列, 和/或所述 GDNF 蛋白包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。
- 10 3. 如权利要求 1 或 2 所述的核酸分子, 其中, 所述第一多核苷酸包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 75%同一性的序列或与 SEQ ID NO:4-7 任一具有至少 95%同一性的序列, 和/或所述第二多核苷酸包含与 SEQ ID NO:8 具有至少 70%同一性的序列或与 SEQ ID NO:9-12 任一具有至少 95%同一性的序列;
优选地, 所述第一多核苷酸包含如 SEQ ID NO:3-7 任一所示的序列;
15 优选地, 所述第二多核苷酸包含如 SEQ ID NO: 8-12 任一所示的序列。
4. 如前权利要求任一项所述的核酸分子, 其中, 第一多核苷酸和第二多核苷酸通过第三多核苷酸连接;
优选地, 所述第三多核苷酸编码具有连接子功能的氨基酸序列, 更优选地,
20 所述第三多核苷酸编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43-46 任一所示, 最优选地, 所述第三多核苷酸的序列如 SEQ ID NO: 47-50 任一所示或与之具有至少 95%同一性。
5. 如前权利要求任一项所述的核酸分子, 其中, 所述核酸分子进一步包含与
25 第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作地连接的另一表达控制序列, 或者分别与所述第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作地连接的两个相同或不同的表达控制序列;
所述表达控制序列包含启动子和/或增强子。
6. 如前权利要求任一项所述的核酸分子, 其中, 所述核酸分子进一步包含 5'
30 反向末端重复(5'ITR)、3'反向末端重复(3'ITR)、内含子(intron)、转录后调控元件、多聚腺苷酸化信号(polyA)和多克隆位点(MCS)中的任意一个或任意组合。
7. 如权利要求 6 所述的核酸分子, 其中:
所述 5'ITR 和/或 3'ITR 源自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、
35 AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ 或 AAV-DJ8; 优选源自 AAV2 或 AAV9;
所述启动子选自 CMV、CAG、CBA、CBh、EFS、EF1、PGK、SV40、Ubi、

RSV 启动子或其任意组合；

所述增强子选自 Ubi、CMV、RSV 增强子或其任意组合；

所述内含子选自 MVM、SV40、 β 球蛋白、EF-1 α 、杂合内含子或其任意组合；

所述 polyA 选自 PA75 polyA、SV40 polyA、hGH polyA、BGH polyA、rbGlob
5 polyA 或其任意组合；和/或

所述转录后调控元件选自 WPRE、HPRE 或其组合。

8. 如前权利要求任一项所述的核酸分子，其中，所述核酸分子从 5' 端至 3' 端包含：

10 a) CMV 增强子、CBA 启动子、第一多核苷酸、第二多核苷酸和 polyA；可选地，在 CBA 启动子和第一多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

b) CMV 增强子、CBA 启动子、第二多核苷酸、第一多核苷酸和 polyA；可选地，在 CBA 启动子和第二多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；
15

c) CMV 增强子、CBA 启动子、第一多核苷酸、polyA、CMV 增强子、CMV 启动子、第二多核苷酸和 polyA；可选地，在 CBA 启动子和第一多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在 CMV 启动子和第二多核苷酸之间还包含 β 球蛋白内含子；可选地，在第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

20 d) CMV 增强子、CMV 启动子、第二多核苷酸、polyA、CMV 增强子、CBA 启动子、第一多核苷酸和 polyA；可选地，在 CMV 启动子和第二多核苷酸之间还包含 β 球蛋白内含子或 MVM 内含子；可选地，在 CBA 启动子和第一多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

e) CMV 增强子、CBA 启动子、第一多核苷酸、第三多核苷酸、第二多核苷酸
25 和 polyA；可选地，在 CBA 启动子和第一多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；或，

f) CMV 增强子、CBA 启动子、第二多核苷酸、第三多核苷酸、第一多核苷酸和 polyA；可选地，在 CBA 启动子和第二多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列；

30 优选地，所述 polyA 选自 hGH polyA、PA75 polyA 或 SV40 polyA。

9. 如权利要求 6-8 任一项所述的核酸分子，其中：

所述 CMV 增强子包含如 SEQ ID NO:27 或 37 所示序列；

所述 CBA 启动子包含如 SEQ ID NO:28 所示序列；

35 所述 CMV 启动子包含如 SEQ ID NO:35 所示序列；

所述 β 球蛋白内含子包含如 SEQ ID NO:38 所示序列；

所述杂合内含子包含如 SEQ ID NO:29 所示序列；
 所述 MVM 内含子包含如 SEQ ID NO:39 所示序列；
 所述 PA75 polyA 包含如 SEQ ID NO:36 所示序列；
 所述 SV40 polyA 包含如 SEQ ID NO:32 所示序列；
 5 所述 hGH polyA 包含如 SEQ ID NO:30 所示序列；
 所述 WPRE 序列如 SEQ ID NO:34 所示；
 所述 5'ITR 包含如 SEQ ID NO:26 所示序列；和/或
 所述 3'ITR 包含如 SEQ ID NO:31 所示序列。

10 10. 如前权利要求任一项所述的核酸分子，其中：所述核酸分子从 5' 端至 3' 端包含：

(1) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-第三多核苷酸-编码 GDNF 的第二多核苷酸-WPRE-SV40 polyA；

15 (2) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-第三多核苷酸-第一多核苷酸-WPRE-SV40 polyA；

(3) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-SV40 polyA-CMV 增强子-CMV 启动子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 polyA；

(4) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-SV40 polyA-CMV 增强子-CMV 启动子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-WPRE-PA75 polyA；

20 (5) CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-SV40 polyA-CMV 增强子-CMV 启动子-β 球蛋白内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 polyA；

(6) CMV 增强子-CMV 启动子-β 球蛋白内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 poly A-CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-SV40 polyA；

25 (7) CMV 增强子-CMV 启动子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 poly A-CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-WPRE-SV40 polyA；或

(8) CMV 增强子-CMV 启动子-MVM 内含子-编码 GDNF 的第二多核苷酸-PA75 poly A-CMV 增强子-CBA 启动子-杂合内含子-第一多核苷酸-WPRE-SV40 polyA。

30 11. 如前权利要求任一项所述的核酸分子，其包含如 SEQ ID NO:13-25 任一所示序列或与 SEQ ID NO:13-25 任一具有至少 95% 的序列同一性的序列。

12. 核酸分子，其包含编码 AADC 蛋白的多核苷酸，其包含如 SEQ ID NO:4-7 中任一所示序列，或与 SEQ ID NO:4-7 中的任一具有至少 95% 的序列同一性的序列。

35

13. 核酸分子，其包含编码 GDNF 蛋白的多核苷酸，其包含如 SEQ ID NO:9-12 中任一所示序列，或与 SEQ ID NO:9-12 中的任一具有至少 95% 的序列同一性的序

列。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的核酸分子，其进一步包含 5'ITR、3'ITR、启动子、增强子、内含子(intron)、转录后调控元件、多聚腺苷酸化信号(polyA)和多克隆位点(MCS)；

优选地，所述 5'ITR 和/或 3'ITR 源自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ 或 AAV-DJ8，

所述启动子选自 CMV、CAG、CBA、CBh、EFS、EF1、PGK、SV40、Ubi、RSV 启动子或其任意组合，

所述增强子选自 Ubi、CMV、RSV 增强子或其任意组合，

所述内含子选自 MVM、SV40、 β 球蛋白、EF-1 α 、杂合内含子或其任意组合，

所述 polyA 选自 PA75 polyA、SV40 polyA、hGH polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或其任意组合，和/或

所述转录后调控元件选自 WPRE、HPRE 或其组合；

更优选地，

所述 CMV 增强子包含如 SEQ ID NO:27 或 37 所示序列，

所述 CBA 启动子包含如 SEQ ID NO:28 所示序列，

所述 CMV 启动子包含如 SEQ ID NO:35 所示序列，

所述 β 球蛋白内含子包含如 SEQ ID NO:38 所示序列，

所述杂合内含子包含如 SEQ ID NO:29 所示序列，

所述 MVM 内含子包含如 SEQ ID NO:39 所示序列，

所述 PA75 polyA 包含如 SEQ ID NO:36 所示序列，

所述 SV40 polyA 包含如 SEQ ID NO:32 所示序列，

所述 hGH polyA 包含如 SEQ ID NO:30 所示序列，

所述 WPRE 序列如 SEQ ID NO:34 所示，

所述 5'ITR 包含如 SEQ ID NO:26 所示序列，和/或

所述 3'ITR 包含如 SEQ ID NO:31 所示序列；

优选地，所述核酸分子从 5'端向 3'端包含：g) CMV 增强子、CBA 启动子、第一多核苷酸或第二多核苷酸，和 polyA；可选地，在 CBA 启动子和第一多核苷酸之间还包含杂合内含子，或所述 CBA 和所述第二多核苷酸之间还包含杂合内含子；可选地，在第一多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列，或者，在第二多核苷酸和 polyA 之间还包含 WPRE 序列。

15. 重组腺相关病毒(rAAV)颗粒，其包含权利要求 1-14 任一项所述的核酸分子和 AAV 衣壳。

16. 如权利要求 15 所述的 rAAV 颗粒，其中 AAV 衣壳选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVPHP.B、AAVrh74、AAVrh8、AAVrh10、
5 AAV-DJ 或 AAV-DJ8，优选为 AAV2、AAV9，更优选为 AAV9。

17. 药物组合物，其包含权利要求 1-14 任一项所述的核酸分子或权利要求 15-16 任一项所述的 rAAV 颗粒，和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

10 18. 载体，含有权利要求 1-14 任一项所述的核酸分子，优选地，所述载体选自质粒、慢病毒、腺病毒、mRNA-LNP、腺相关病毒(AAV)载体和重组腺相关病毒(rAAV)载体。

19. 细胞，其包含或表达权利要求 1-14 任一项所述的核酸分子，或权利要求 15
18 所述的载体，或包装产生权利要求 15-16 所述的重组 rAAV 颗粒。

20. rAAV 生产系统，用于生产权利要求 15 或 16 所述的重组 rAAV 颗粒，其中，所述生产系统包含：

- (a) 编码 AAV 衣壳的氨基酸序列的多核苷酸序列；
- 20 (b) 如权利要求 1-14 任一项的核酸分子或权利要求 18 的载体；和
- (c) 足够的 AAV rep 功能和辅助功能，以允许将所述权利要求 1-14 任一项的核酸分子或权利要求 18 的载体包装到所述 AAV 衣壳中；

其中 AAV 衣壳选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、
25 AAVrh10、AAV-DJ 或 AAV-DJ8，优选为 AAV2、AAV9，更优选为 AAV9。

21. 如权利要求 20 所述的 rAAV 生产系统，其中，足够的 AAV rep 功能和辅助功能通过包装细胞提供，所述包装细胞优选包含 pHelper、pRC9、pGOI 三种质粒。

30

22. 生产权利要求 15 或 16 所述的 rAAV 颗粒的方法，包括使用包装细胞将权利要求 1-14 的任一项的多核苷酸或权利要求 18 所述的载体包装至 AAV 衣壳中，所述 AAV 衣壳选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、
35 AAV-DJ 或 AAV-DJ8，优选为 AAV2、AAV9，更优选为 AAV9。

23. 治疗、缓解或预防中枢神经系统疾病或症状的方法，包括向有需要的受试

者的脑内施用治疗、缓解有效量的权利要求 1-14 任一项所述的多核苷酸、或权利要求 15-16 任一项所述的 rAAV 颗粒、权利要求 17 所述的药物组合物或权利要求 18 所述的载体，以使得 AADC 蛋白和 GDNF 蛋白在所述受试者的脑内表达；

优选地，所述 AADC 蛋白和 GDNF 蛋白在受试者的纹状体表达；

- 5 优选地，所述中枢神经系统疾病或症状为神经退行性疾病或症状，更优选为运动障碍、睡眠障碍，最优选为帕金森病。

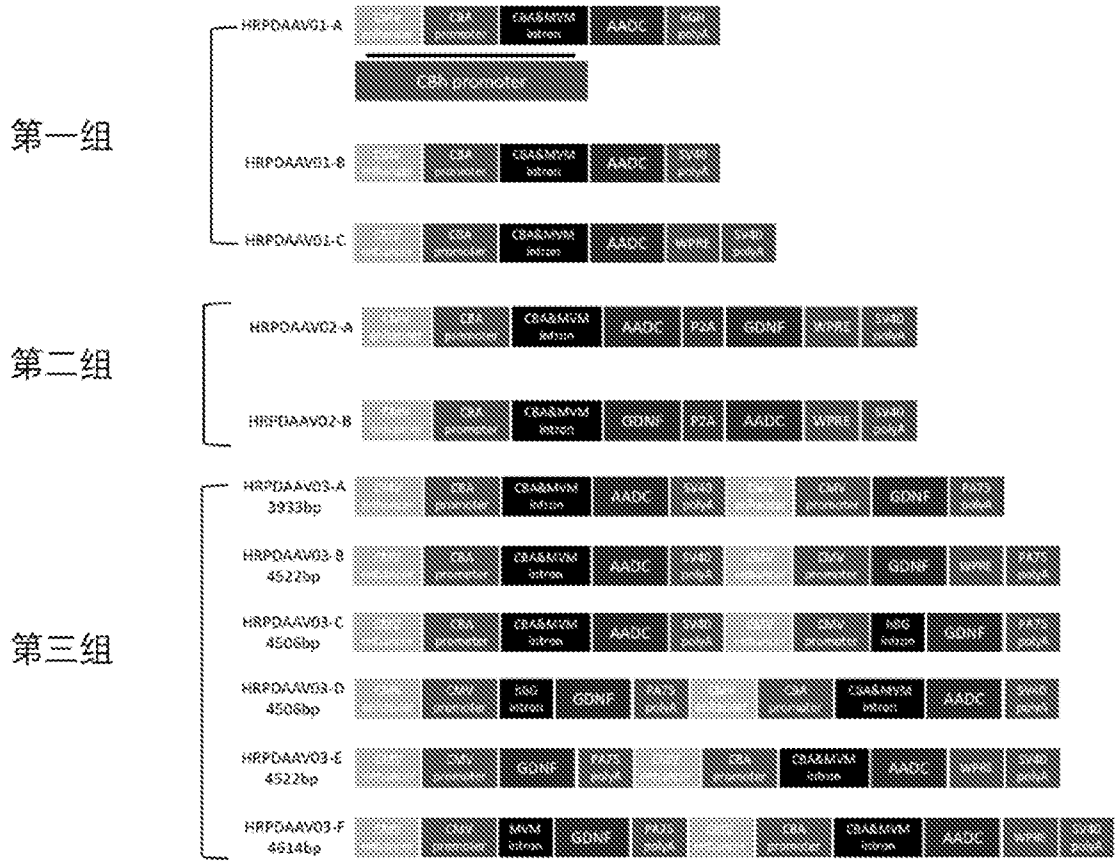


图 1

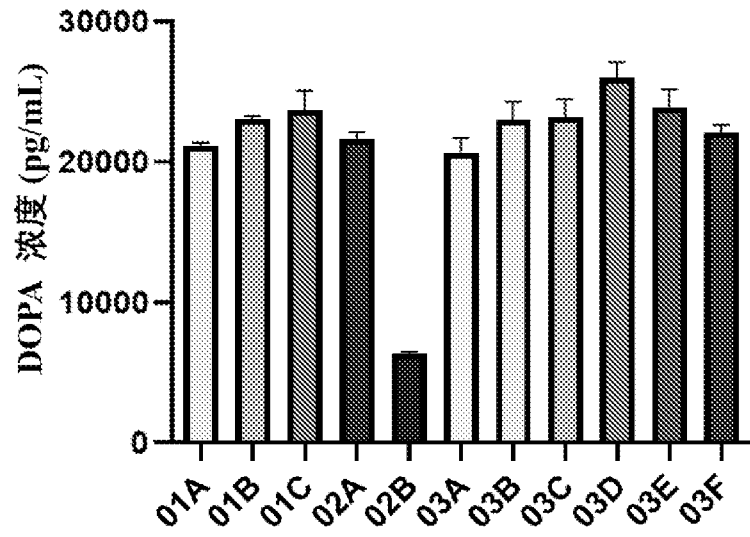


图 2A

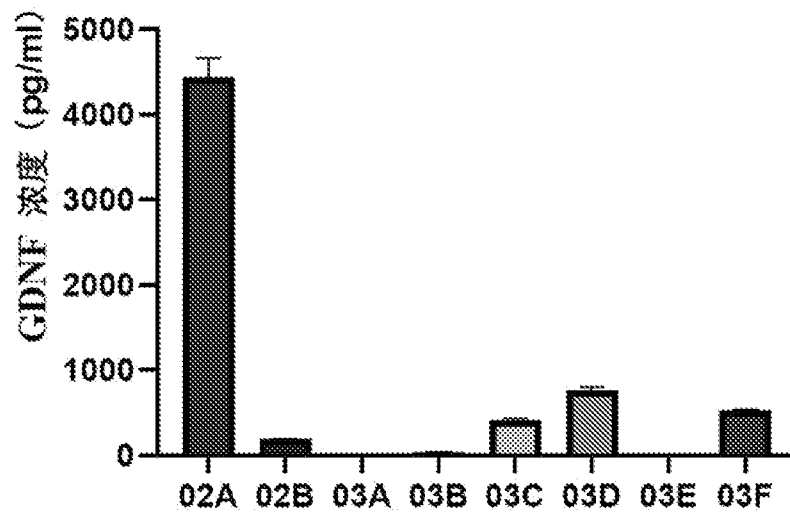


图 2B

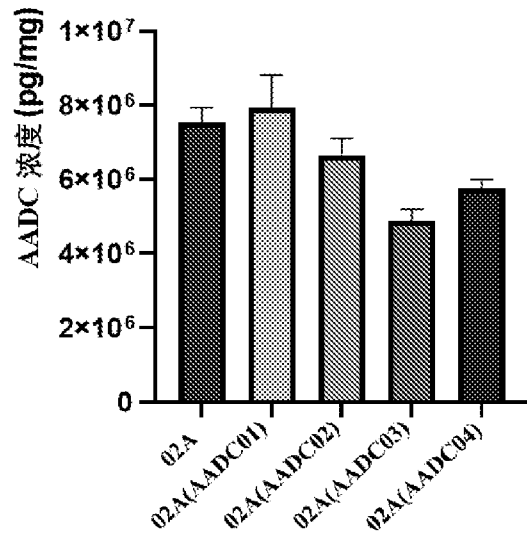


图 3A

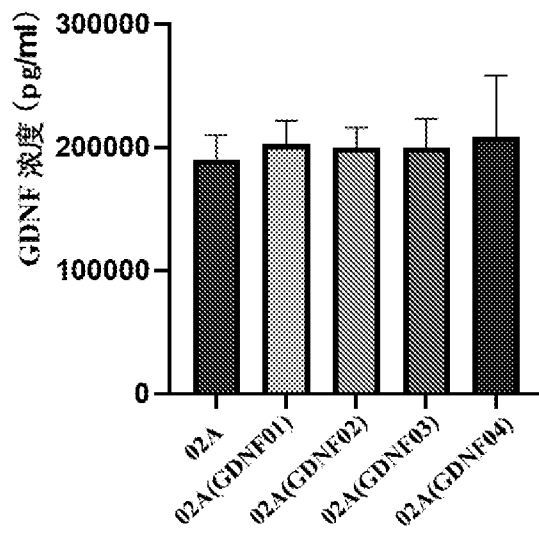


图 3B

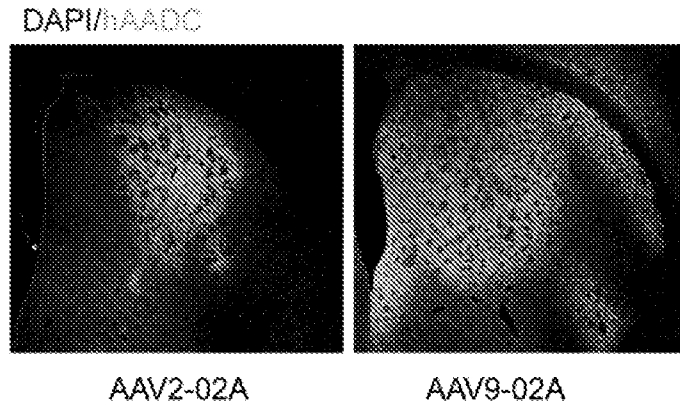


图 4A

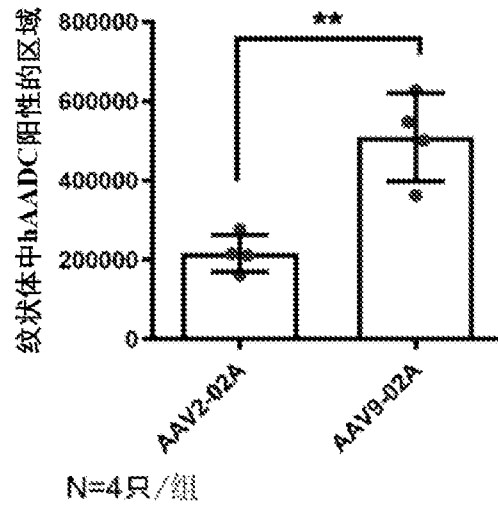


图 4B

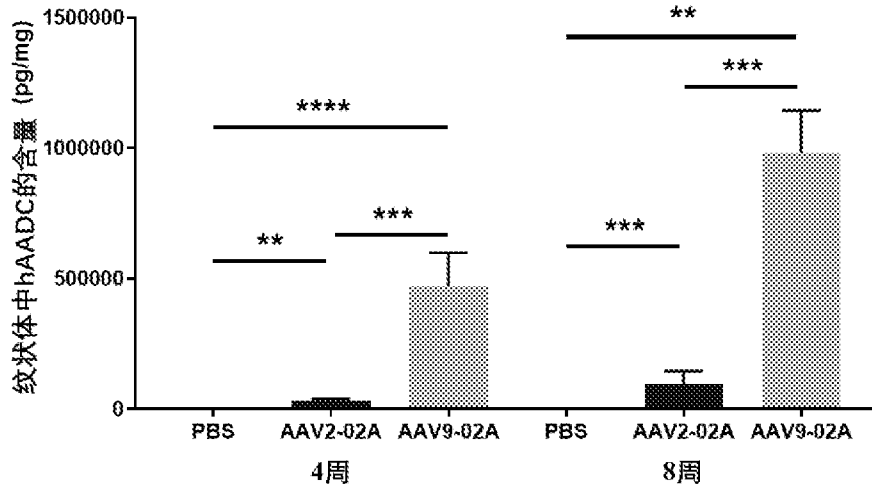


图 5A

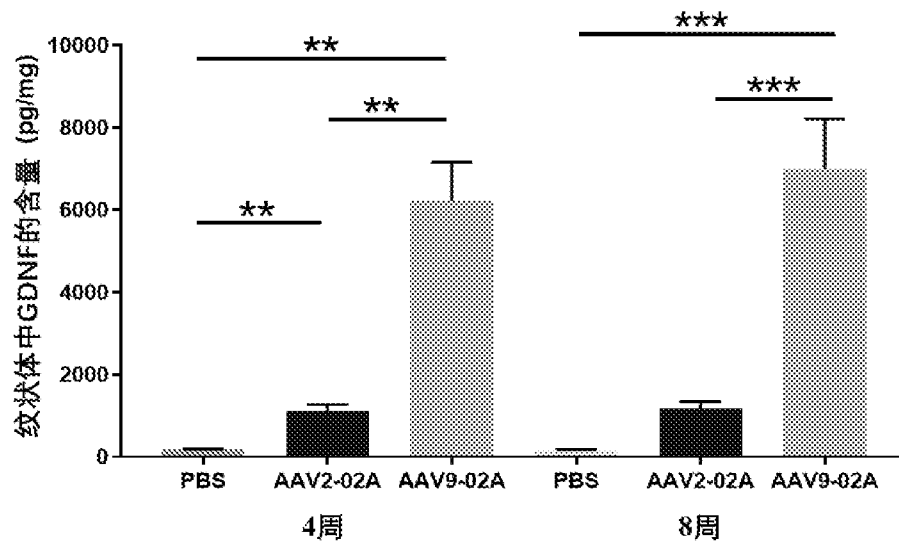


图 5B

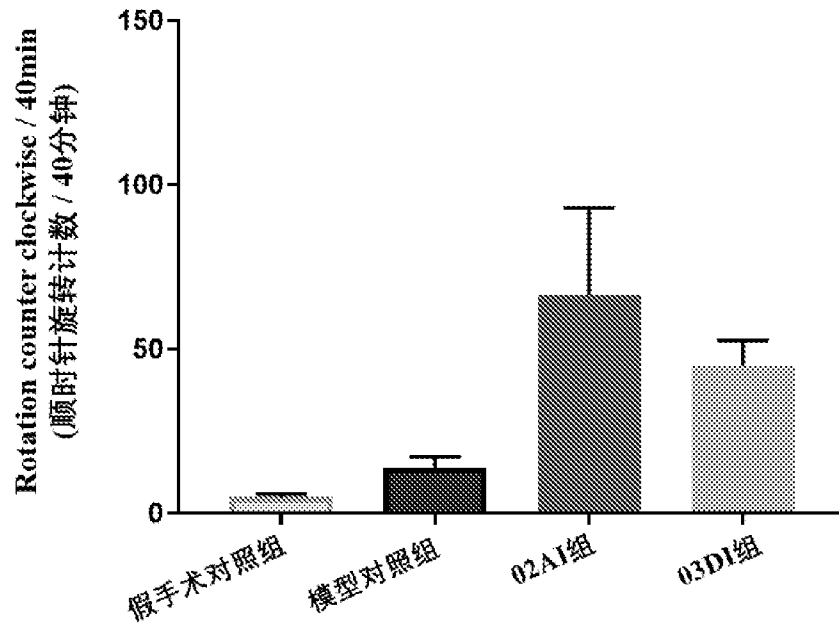


图 6A

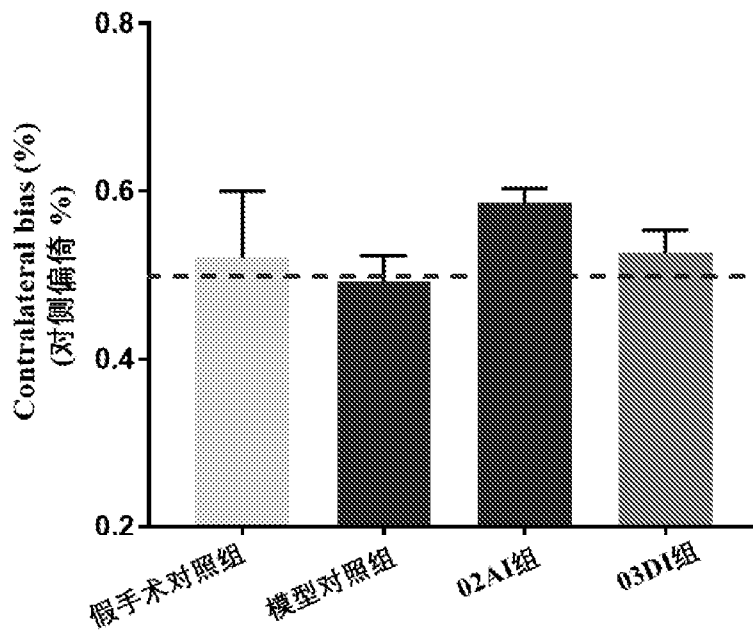


图 6B

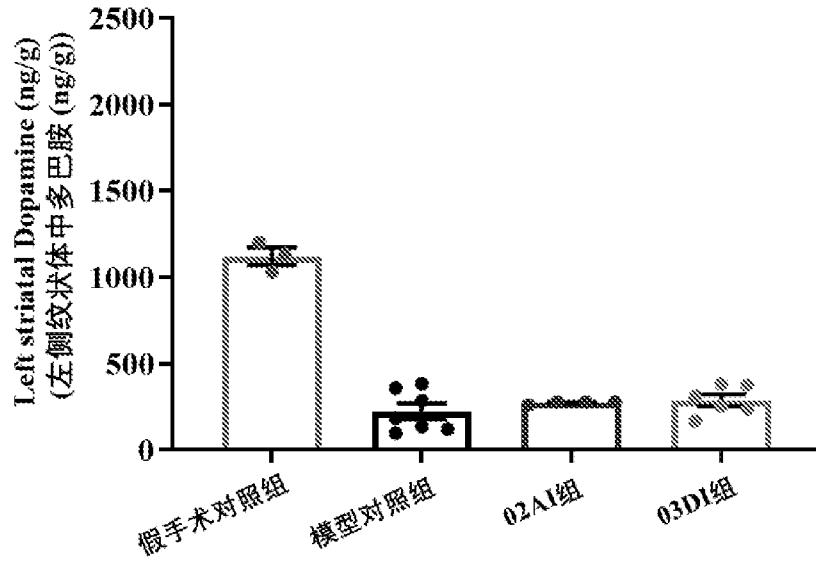


图 7A

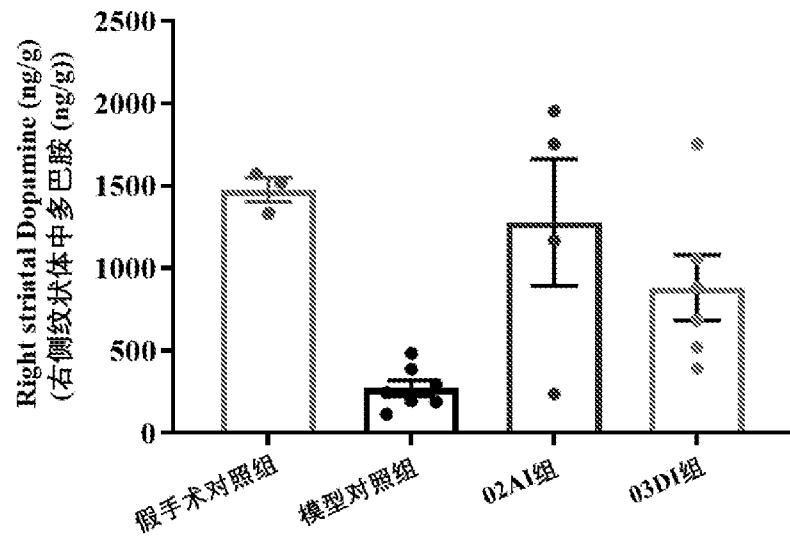


图 7B

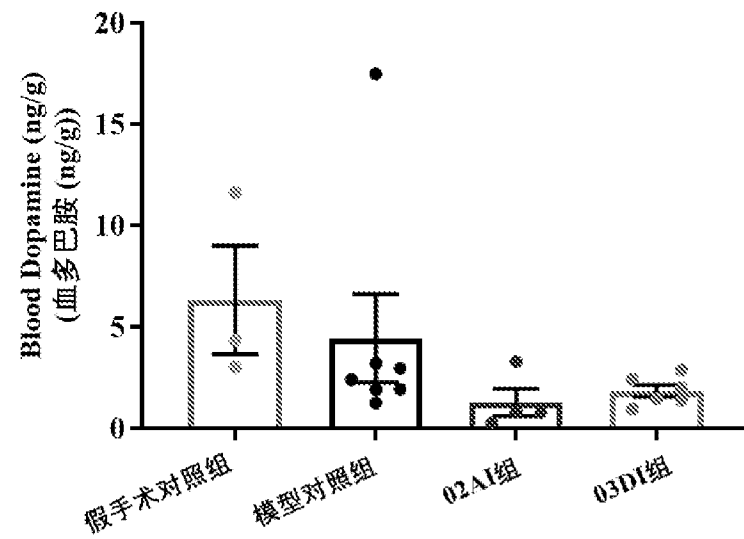


图 7C

对切片进行TH+染色，以标记投射到纹状体的多巴胺能神经元轴突末端的存活保存

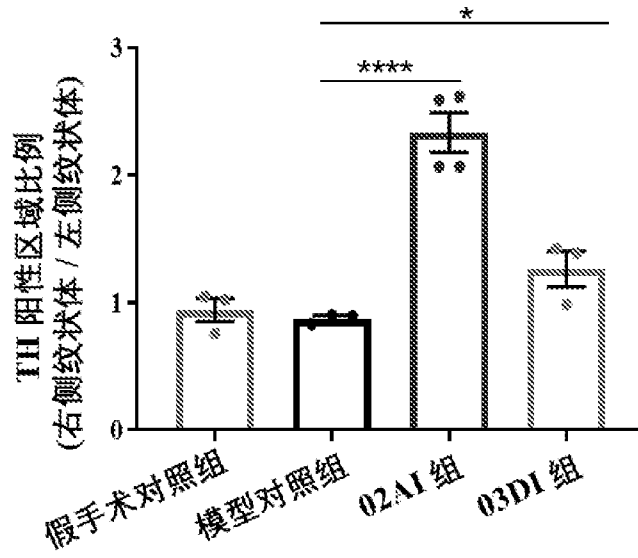
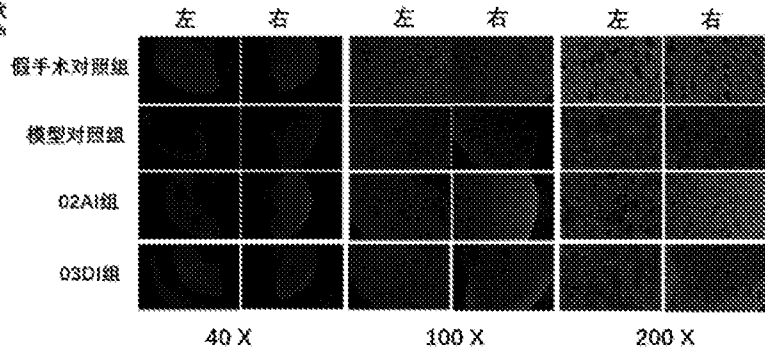
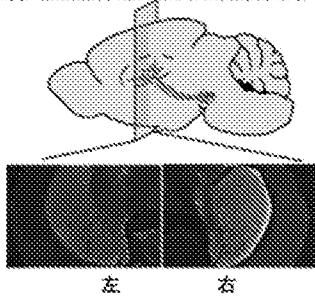


图 7D

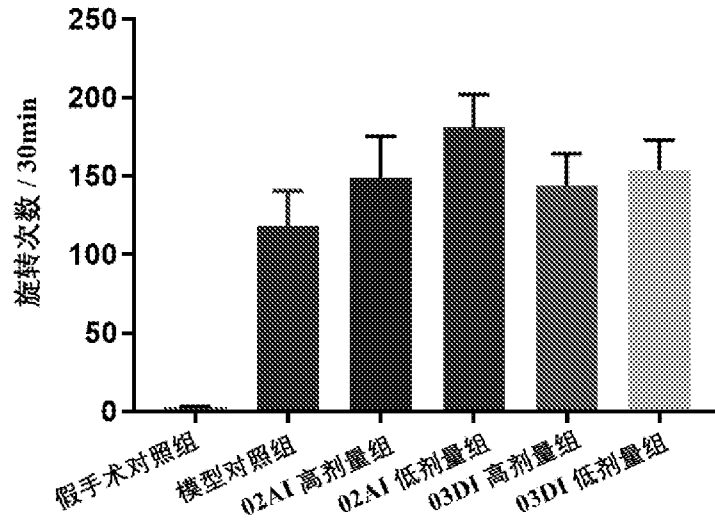


图 8A

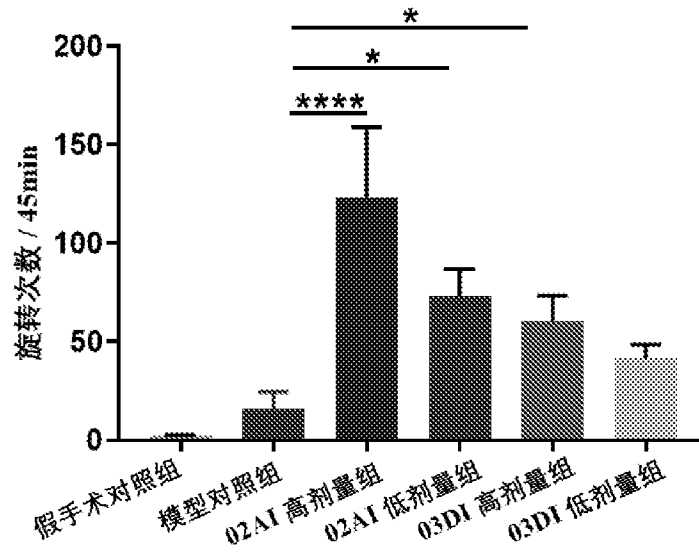


图 8B

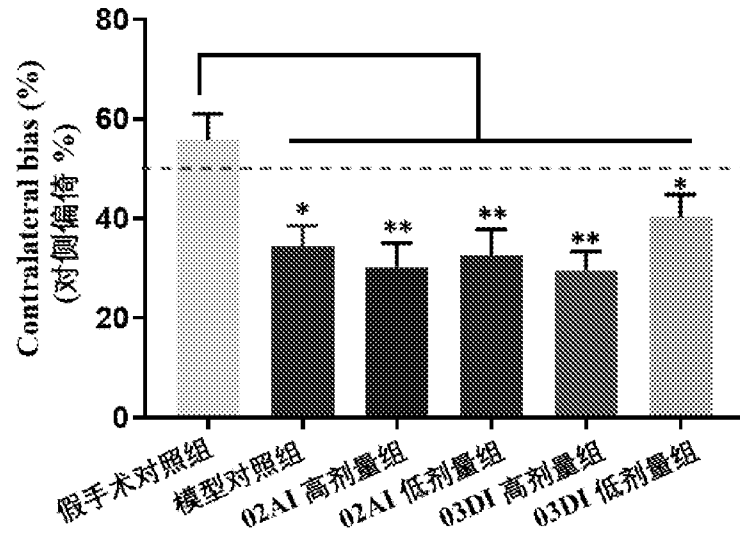


图 8C

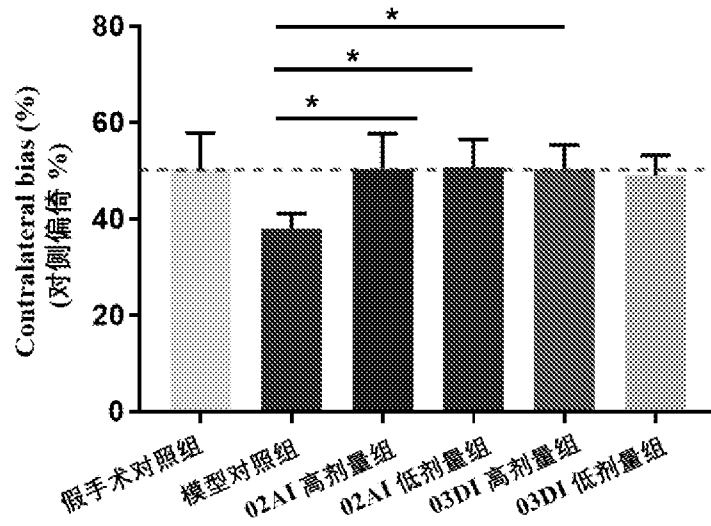


图 8D

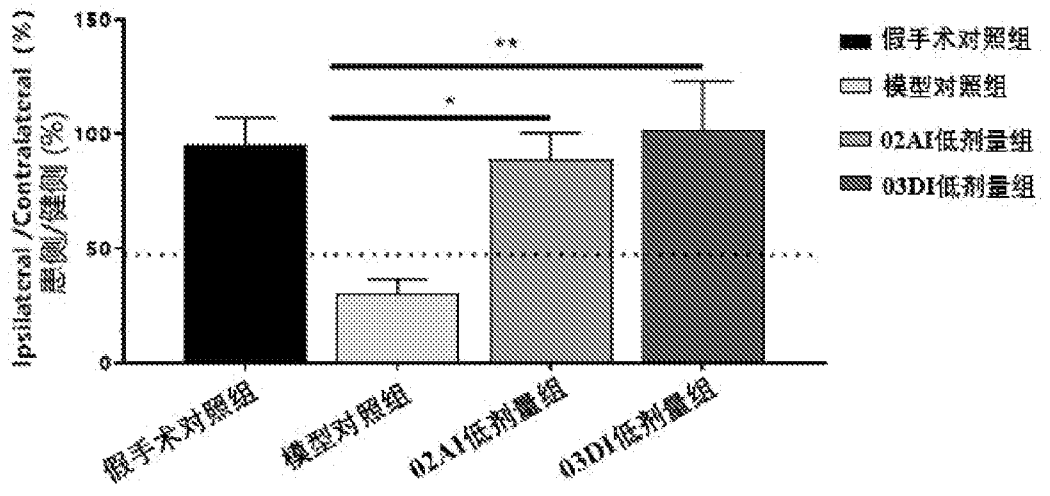


图 8E

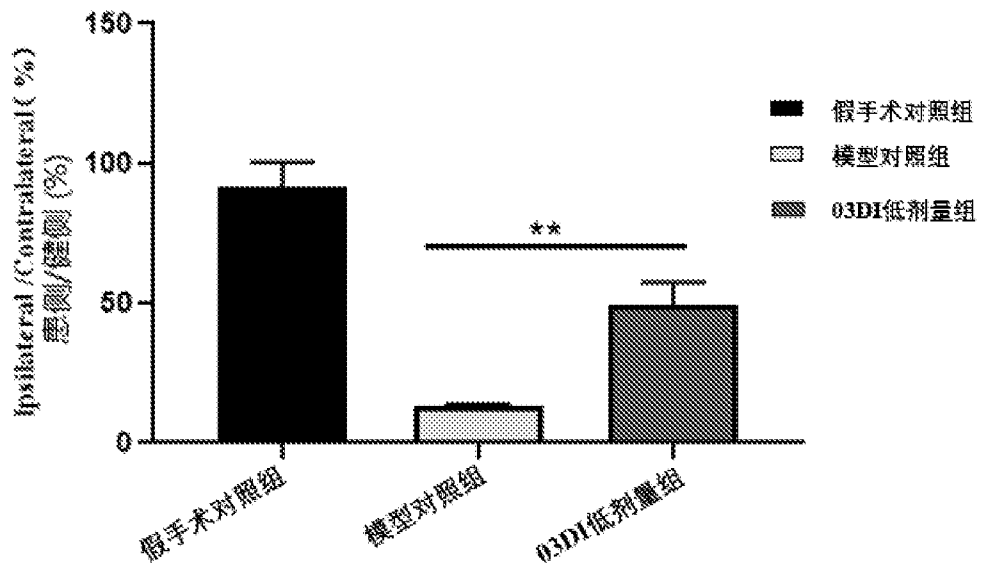


图 8F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/134993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/864(2006.01);A61K48/00(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) IPC: C12N, A61K 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, ENTXT, VEN, CNKI, NCBI, ISI, 万方数据库, WANFANG DATABASE: AADC, 芳族L-氨基酸脱羧酶, decarboxylase, GDNF, 神经胶质细胞源性神经营养因子, 神经退行性疾病, 帕金森, PD, Parkinson's, AAV, 腺相关病毒, AAV9, AAV2, SEQ ID NO: 1-12, 43-46, 发明人		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107106689 A (VOYAGER THERAPEUTICS, INC.) 29 August 2017 (2017-08-29) claims 1-34, and description, paragraphs 5, 9, 17-25, 33, 344-356 and 373-377 and sequences 1-9 and 17-23	12, 14-23
Y	CN 107106689 A (VOYAGER THERAPEUTICS, INC.) 29 August 2017 (2017-08-29) claims 1-34, and description, paragraphs 5, 9, 17-25, 33, 344-356 and 373-377 and sequences 1-9 and 17-23	2-11, 15-23
X	CN 109971729 A (SHANGHAI BELIEF-DELIVERY BIOMED CO., LTD.) 05 July 2019 (2019-07-05) claims 1-19, description, paragraphs 8 and 17-29, figure 1, and sequences 4 and 28	12, 14-23
Y	CN 109971729 A (SHANGHAI BELIEF-DELIVERY BIOMED CO., LTD.) 05 July 2019 (2019-07-05) claims 1-19, description, paragraphs 8 and 17-29, figure 1, and sequences 4 and 28	2-11, 15-23
X	CN 1575340 A (TANABE SEIYAKU CO., LTD.) 02 February 2005 (2005-02-02) claims 1-11, description, pages 1-2, 9 and 25, and figures 1 and 11	13-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 09 February 2023		Date of mailing of the international search report 20 February 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 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.
Y	CN 1575340 A (TANABE SEIYAKU CO., LTD.) 02 February 2005 (2005-02-02) claims 1-11, description, pages 1-2, 9 and 25, and figures 1 and 11	2-11, 15-23
X	冯霄 (FENG, Xiao). "8型腺相关病毒所介导的GDNF与产酶基因对6-OHDA损伤帕金森大鼠模型的保护与恢复研究 (AAV 8 Vector-Mediated GDNF and Enzyme-Produced Genes Transfer Induce Neuroprotection and Neuroregeneration in the 6-OHDA Impairment Rat Model of Parkinson's Disease)" <i>中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生辑 (Medicine & Public Health, China Master's Theses Full-Text Database)</i> , 15 January 2014 (2014-01-15), abstract, and pages 6-8, 10-13, 22-23, 29, 48-49 and 51-53	1, 5-10, 15-23
Y	冯霄 (FENG, Xiao). "8型腺相关病毒所介导的GDNF与产酶基因对6-OHDA损伤帕金森大鼠模型的保护与恢复研究 (AAV 8 Vector-Mediated GDNF and Enzyme-Produced Genes Transfer Induce Neuroprotection and Neuroregeneration in the 6-OHDA Impairment Rat Model of Parkinson's Disease)" <i>中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生辑 (Medicine & Public Health, China Master's Theses Full-Text Database)</i> , 15 January 2014 (2014-01-15), abstract, and pages 6-8, 10-13, 22-23, 29, 48-49 and 51-53	2-11, 15-23
Y	STRAUSBERG, R.L. et al. "AAH00485.1" <i>GenPept</i> , 15 July 2006 (2006-07-15), sequences	2-11, 15-23
X	STRAUSBERG, R.L. et al. "AAH00485.1" <i>GenPept</i> , 15 July 2006 (2006-07-15), sequences	12, 14-23
X	KONOVALOVA, J. et al. "NM_000514.4" <i>GenBank</i> , 31 October 2021 (2021-10-31), CDS, sequence	13-23
Y	KONOVALOVA, J. et al. "NM_000514.4" <i>GenBank</i> , 31 October 2021 (2021-10-31), CDS, sequence	2-11, 15-23
Y	FAJARDO-SERRANO, A. et al. "Adeno-Associated Viral Vectors as Versatile Tools for Parkinson's Research, Both for Disease Modeling Purposes and for Therapeutic Uses" <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. vol. 22, 15 June 2021 (2021-06-15), pp. 1-20	15-23
Y	CHOUDHURY, S.R. et al. "Viral Vectors for Therapy of Neurologic Diseases" <i>Neuropharmacology</i> , Vol. vol. 120, 01 July 2017 (2017-07-01), pp. 63-80	15-23
Y	蔡琼等 (CAI, Qiong et al.). "帕金森病基因治疗研究进展 (Non-official translation: Progress in Gene Therapy for Parkinson's Disease)" <i>中国神经精神疾病杂志 (Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases)</i> , Vol. 41, No. (11), 31 December 2015 (2015-12-31), pp. 701-705	15-23

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

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.: **23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 23 relates to a method for treating, alleviating or preventing central system diseases or illnesses, that is, claim 23 relates to the subject matter requiring no search by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1: (4) a method for the treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and a diagnostic method implemented on the human or animal body. The international search is carried out on the basis of an effective amount of the polynucleotides of any one of claims 1-14, or the rAAV particles of either of claims 15-16, the pharmaceutical compositions of claim 17 or the vectors of claim 18 in the preparation of a drug for treating, relieving or preventing central system diseases or illnesses.
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/CN2022/134993

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107106689	A	29 August 2017	SG	10202007103	TA	29 September 2020
				JP	2021106619	A	29 July 2021
				HK	1243922	A1	27 July 2018
				US	2019008933	A1	10 January 2019
				US	2019008932	A1	10 January 2019
				AU	2019202498	A1	02 May 2019
				AU	2019202498	B2	01 April 2021
				JP	2019010110	A	24 January 2019
				US	2019358306	A1	28 November 2019
				US	11027000	B2	08 June 2021
				US	2017333538	A1	23 November 2017
				US	10335466	B2	02 July 2019
				IL	251787	A0	29 June 2017
				IL	251787	B	28 February 2021
				RU	2020109343	A	17 March 2020
				SG	11201703148	TA	30 May 2017
				US	2021338786	A1	04 November 2021
				CA	2966620	A1	12 May 2016
				AU	2015343037	A1	11 May 2017
				AU	2015343037	B2	17 January 2019
				RU	2017115477	A	09 November 2018
				RU	2017115477	A3	26 March 2019
				RU	2716991	C2	17 March 2020
				EP	3215191	A2	13 September 2017
				EP	3215191	A4	01 August 2018
				WO	2016073693	A2	12 May 2016
				WO	2016073693	A3	30 June 2016
				US	2019008931	A1	10 January 2019
				BR	112017009497	A2	06 February 2018
				MX	2017005834	A	17 November 2017
				IL	280530	A	01 March 2021
KR	20170096998	A	25 August 2017				
JP	2017535291	A	30 November 2017				
JP	6401871	B2	10 October 2018				
JP	2018198622	A	20 December 2018				
JP	6878370	B2	26 May 2021				
CN	109971729	A	05 July 2019	CA	3136853	A1	22 October 2020
				JP	2022529701	A	23 June 2022
				EP	3956440	A1	23 February 2022
				AU	2020258972	A1	16 December 2021
				KR	20220003566	A	10 January 2022
				WO	2020211843	A1	22 October 2020
				BR	112021020926	A2	22 March 2022
				US	2022204950	A1	30 June 2022
CN	1575340	A	02 February 2005	DE	60237158	D1	09 September 2010
				AT	475716	T	15 August 2010
				WO	03018821	A2	06 March 2003
				WO	03018821	A3	30 October 2003
				KR	20040039316	A	10 May 2004
				JP	2005501127	A	13 January 2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/134993

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 4279141 B2	17 June 2009
		CA 2457057 A1	06 March 2003
		CA 2457057 C	10 May 2011
		AU 2002326163 B2	25 October 2007
		US 2003050273 A1	13 March 2003
		EP 1421199 A2	26 May 2004
		EP 1421199 B1	28 July 2010
<hr/>			

A. 主题的分类 C12N15/864(2006.01)i;A61K48/00(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) IPC: C12N, A61K 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, ENTXT, VEN, CNKI, NCBI, ISI, 万方数据库: AADC, 芳族L-氨基酸脱羧酶, decorboxylase, GDNF, 神经胶质细胞源性神经营养因子, 神经退行性疾病, 帕金森, PD, Parkinson's, AAV, 腺相关病毒, AAV9, AAV2, SEQ ID NO: 1-12、43-46, 发明人		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 107106689 A (沃雅戈治疗公司) 2017年8月29日 (2017 - 08 - 29) 权利要求1-34、说明书第5、9、17-25、33、344-356、373-377段, 序列1-9、17-23	12、14-23
Y	CN 107106689 A (沃雅戈治疗公司) 2017年8月29日 (2017 - 08 - 29) 权利要求1-34、说明书第5、9、17-25、33、344-356、373-377段, 序列1-9、17-23	2-11、15-23
X	CN 109971729 A (上海信致医药科技有限公司) 2019年7月5日 (2019 - 07 - 05) 权利要求1-19、说明书第8、17-29段、图1、序列4、28	12、14-23
Y	CN 109971729 A (上海信致医药科技有限公司) 2019年7月5日 (2019 - 07 - 05) 权利要求1-19、说明书第8、17-29段、图1、序列4、28	2-11、15-23
X	CN 1575340 A (田边制药株式会社) 2005年2月2日 (2005 - 02 - 02) 权利要求1-11、说明书第1-2、9、25-页、图1、11	13-23
Y	CN 1575340 A (田边制药株式会社) 2005年2月2日 (2005 - 02 - 02) 权利要求1-11、说明书第1-2、9、25-页、图1、11	2-11、15-23
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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 2023年2月9日		国际检索报告邮寄日期 2023年2月20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 罗洋 电话号码 (+86) 010-53961959

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	冯霄. "8型腺相关病毒所介导的GDNF与产酶基因对6-OHDA损伤帕金森大鼠模型的保护与恢复研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 2014年1月15日 (2014 - 01 - 15), 摘要、第6-8、10-13、22-23、29、48-49、51-53页	1、5-10、15-23
Y	冯霄. "8型腺相关病毒所介导的GDNF与产酶基因对6-OHDA损伤帕金森大鼠模型的保护与恢复研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 2014年1月15日 (2014 - 01 - 15), 摘要、第6-8、10-13、22-23、29、48-49、51-53页	2-11、15-23
Y	STRAUSBERG, R. L. 等. "AAH00485.1" GenPept, 2006年7月15日 (2006 - 07 - 15), 序列	2-11、15-23
X	STRAUSBERG, R. L. 等. "AAH00485.1" GenPept, 2006年7月15日 (2006 - 07 - 15), 序列	12、14-23
X	KONOVALOVA, J. 等. "NM_000514.4" GenBank, 2021年10月31日 (2021 - 10 - 31), CDS、序列	13-23
Y	KONOVALOVA, J. 等. "NM_000514.4" GenBank, 2021年10月31日 (2021 - 10 - 31), CDS、序列	2-11、15-23
Y	FAJARDO-SERRANO, A. 等. "Adeno-associated viral vectors as versatile tools for Parkinson's research, both for disease modeling purposes and for therapeutic uses" International Journal of Molecular Sciences, 第22卷, 2021年6月15日 (2021 - 06 - 15), 第1-20页	15-23
Y	CHOUDHURY, S. R. 等. "Viral vectors for therapy of neurologic diseases" Neuropharmacology, 第120卷, 2017年7月1日 (2017 - 07 - 01), 第63-80页	15-23
Y	蔡琼等. "帕金森病基因治疗研究进展" 中国神经精神疾病杂志, 第41卷, 第11期, 2015年12月31日 (2015 - 12 - 31), 第701-705页	15-23

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列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的;
- b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

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： 23
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求23涉及治疗、缓解或预防中枢系统疾病或病症的方法，即权利要求23涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于有效量的权利要求1-14中任一项所述的多核苷酸、或权利要求15-16任一项所述的rAAV颗粒、权利要求17所述的药物组合物或权利要求18所述的载体在制备治疗、缓解或预防中枢系统疾病或病症的药物中的用途作出
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/CN2022/134993

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	107106689	A	2017年8月29日	SG	10202007103	TA	2020年9月29日
				JP	2021106619	A	2021年7月29日
				HK	1243922	A1	2018年7月27日
				US	2019008933	A1	2019年1月10日
				US	2019008932	A1	2019年1月10日
				AU	2019202498	A1	2019年5月2日
				AU	2019202498	B2	2021年4月1日
				JP	2019010110	A	2019年1月24日
				US	2019358306	A1	2019年11月28日
				US	11027000	B2	2021年6月8日
				US	2017333538	A1	2017年11月23日
				US	10335466	B2	2019年7月2日
				IL	251787	A0	2017年6月29日
				IL	251787	B	2021年2月28日
				RU	2020109343	A	2020年3月17日
				SG	11201703148	TA	2017年5月30日
				US	2021338786	A1	2021年11月4日
				CA	2966620	A1	2016年5月12日
				AU	2015343037	A1	2017年5月11日
				AU	2015343037	B2	2019年1月17日
				RU	2017115477	A	2018年11月9日
				RU	2017115477	A3	2019年3月26日
				RU	2716991	C2	2020年3月17日
				EP	3215191	A2	2017年9月13日
				EP	3215191	A4	2018年8月1日
				WO	2016073693	A2	2016年5月12日
				WO	2016073693	A3	2016年6月30日
				US	2019008931	A1	2019年1月10日
				BR	112017009497	A2	2018年2月6日
				MX	2017005834	A	2017年11月17日
				IL	280530	A	2021年3月1日
KR	20170096998	A	2017年8月25日				
JP	2017535291	A	2017年11月30日				
JP	6401871	B2	2018年10月10日				
JP	2018198622	A	2018年12月20日				
JP	6878370	B2	2021年5月26日				
CN	109971729	A	2019年7月5日	CA	3136853	A1	2020年10月22日
				JP	2022529701	A	2022年6月23日
				EP	3956440	A1	2022年2月23日
				AU	2020258972	A1	2021年12月16日
				KR	20220003566	A	2022年1月10日
				WO	2020211843	A1	2020年10月22日
				BR	112021020926	A2	2022年3月22日
				US	2022204950	A1	2022年6月30日
CN	1575340	A	2005年2月2日	DE	60237158	D1	2010年9月9日
				AT	475716	T	2010年8月15日
				WO	03018821	A2	2003年3月6日
				WO	03018821	A3	2003年10月30日
				KR	20040039316	A	2004年5月10日
				JP	2005501127	A	2005年1月13日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/134993

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)
		JP 4279141 B2	2009年6月17日
		CA 2457057 A1	2003年3月6日
		CA 2457057 C	2011年5月10日
		AU 2002326163 B2	2007年10月25日
		US 2003050273 A1	2003年3月13日
		EP 1421199 A2	2004年5月26日
		EP 1421199 B1	2010年7月28日
<hr/>			