



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116801912 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 22

(21) 申请号 202180091788.X

(22) 申请日 2021.12.07

(30) 优先权数据

2019286.0 2020.12.08 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/053191 2021.12.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/123226 EN 2022.06.16

(71) 申请人 马阿夫克斯有限公司

地址 英国萨里郡

(72) 发明人 迈克尔·麦克唐纳

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

专利代理师 蒋洪之 安玉

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书51页

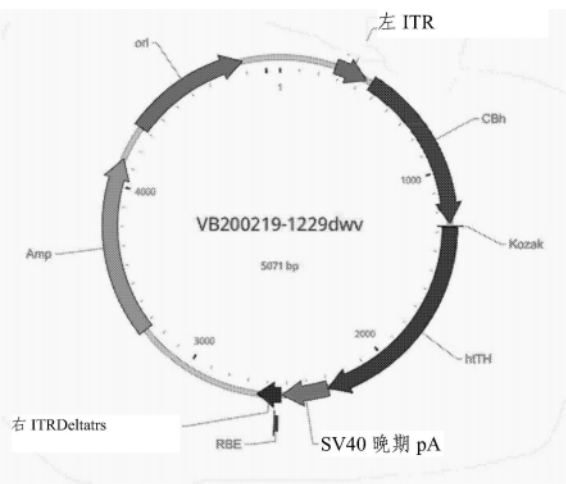
序列表25页 附图19页

(54) 发明名称

表达载体组合物

(57) 摘要

本发明涉及表达载体和包含所述载体的药物组合物和试剂盒,特别是它们在治疗帕金森病(PD)、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常的方法中的用途。



1. 一种组合物,其包含第一表达载体和第二表达载体,其中所述第一表达载体包含可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶 (TH) 的自互补编码序列的启动子,并且所述第二表达载体包含可操作地连接至编码GTP环化水解酶1 (GCH1) 的编码序列的启动子。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述第一表达载体和/或所述第二表达载体是裸DNA载体。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第一表达载体和/或所述第二表达载体是AAV载体。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第二表达载体是单链AAV (ssAAV) 载体。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第二表达载体是自互补的AAV载体。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第一表达载体是自互补的AAV载体,并且所述第二表达载体是ssAAV载体或裸DNA载体。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第一表达载体和/或第二表达载体衍生自AAV-1、AAV-2、AAV-3A、AAV-3B、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10和/或AAV-11。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第一表达载体和/或第二表达载体衍生自AAV1、AAV5或AAV9,并且更优选AAV5。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含编码芳香族氨基酸脱羧酶 (AADC) 的载体。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码TH的编码序列包含基本上如SEQ ID No:1或21所示的核苷酸序列,或其片段或变体,或其中所述编码TH的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:2或22所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码TH的编码序列包含编码缺少TH的调节结构域的截短的TH的核苷酸序列,任选地其中所述编码TH的编码序列包含基本上如SEQ ID No:3或23所示的核苷酸序列,或其片段或变体,或其中所述编码TH的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:4或24所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码GCH1的编码序列包含基本上如SEQ ID No:6所示的核苷酸序列,或其片段或变体,或其中所述编码GCH1的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:7所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的所述启动子是允许在个体的神经元中,或在所述个体的神经胶质细胞中,或在所述个体的神经元和神经胶质细胞中,或在所述个体的神经元和衬于脑室的室管膜细胞中,或在所述个体的神经元和神经胶质细胞和室管膜细胞中高表达的启动子。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子是CBh启动子,或其片段或变体,任选地,其中在第一载体和第二载体中的所述启动子包含所述CBh启动子。

15. 根据权利要求14所述的组合物,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的所述启动子序列包含基本上如SEQ ID No:8所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的所述启动子是人突触蛋白启动子, 或具有巨细胞病毒增强子的鸡 β 肌动蛋白启动子(CB7), 或四环素响应元件(TRE)启动子, 并且任选地不是CMV启动子或CMV增强子/启动子。

17. 根据权利要求16所述的组合物, 其中所述启动子包含基本上如SEQ ID No:9、10、11或25所示的核苷酸序列, 或其片段或变体。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述第一表达载体和/或所述第二表达载体包含位于其启动子和分别编码TH1或GCH1的核苷酸之间的内含子, 任选地, 其中

(i) 所述内含子的长度为至少25、50、75或100个核苷酸;

(ii) 所述内含子的长度为至少125、150、175或200个核苷酸; 或

(iii) 所述内含子的长度为至少225、250、275或300个核苷酸。

19. 根据权利要求18所述的组合物, 其中所述内含子选自下列内含子: 人生长激素(hGH)内含子; β -肌动蛋白内含子; 小鼠微小病毒(MVM)内含子; SV40内含子和EF-1 α 内含子。

20. 根据权利要求19所述的组合物, 其中所述内含子是所述MVM内含子, 优选其中所述内含子包含基本上如SEQ ID NO:27所示的核苷酸序列, 或其片段或变体。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的组合物, 其中:

(i) 所述第一表达载体和/或第二表达载体包含SYN1启动子, 所述启动子之后是内含子, 所述内含子是MVM内含子(SEQ ID NO:27)或人生长激素(hGH)内含子(SEQ ID NO:26);

(ii) 所述第一表达载体和/或第二表达载体包含具有巨细胞病毒增强子的鸡 β 肌动蛋白启动子(CB7), 所述鸡 β 肌动蛋白启动子之后是内含子, 所述内含子是所述MVM内含子或所述人生长激素(hGH)内含子;

(iii) 所述第一表达载体和/或第二表达载体包含四环素响应元件(TRE)启动子, 所述四环素响应元件(TRE)启动子之后是内含子, 所述内含子是所述MVM内含子或所述人生长激素(hGH)内含子; 或

(iv) 所述第一表达载体和/或第二表达载体包含CMV启动子, 所述CMV启动子之后是内含子, 所述内含子是所述MVM内含子或所述人生长激素(hGH)内含子。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中第二表达载体还包含编码土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)的核苷酸序列, 任选地其中所述WPRE编码序列位于GCH1编码序列的3', 和/或其中所述WPRE包含基本上如SEQ ID NO:12或13所示的核酸序列, 或其片段或变体。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述第一表达载体和/或第二表达载体包含编码polyA尾的核苷酸序列, 其中:

(i) 所述polyA尾包含猿猴病毒SV40 polyA尾, 任选地包含基本上如SEQ ID NO:14所示的核酸序列, 或其片段或变体; 和/或

(ii) 所述polyA尾包含牛生长激素(BGH) polyA尾, 任选地包含基本上如SEQ ID NO:15所示的核酸序列, 或其片段或变体。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述第一表达载体和/或所述第二表达载体包含编码3'非翻译区(3'UTR)的核苷酸序列, 任选地其中所述第一表达载体包含3'UTR编码序列, 所述3'UTR编码序列包含基本上如SEQ ID NO:28所示的核酸序列, 或其片

段或变体。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述第一表达载体和/或第二表达载体包含左反向末端重复序列和/或右反向末端重复序列(ITR), 任选地, 其中所述第一表达载体和/或第二表达载体包含一个反向末端重复(ITR)序列和一个其中末端解链位点缺失的修饰的ITR序列, 任选地, 包含含有基本上如SEQ ID No:16所示的核酸序列或其片段或变体的ITR。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述第一表达载体包含基本上如SEQ ID No:17所示的核酸序列, 或其片段或变体。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述第二表达载体包含基本上如SEQ ID No:18所示的核酸序列, 或其片段或变体。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含:

(i) 第一自互补腺相关病毒(scAAV)载体, 其包含可操作地连接至编码序列的启动子, 所述编码序列编码酪氨酸羟化酶(TH), 任选地编码缺少所述调节结构域的截短的TH; 和

(ii) 第二自互补腺相关病毒(scAAV)载体, 其包含可操作地连接至编码序列的启动子, 所述编码序列编码GTP环化水解酶1(GCH1)。

29. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1-28中任一项所述的组合物和药学上可接受的载体。

30. 根据权利要求1-28中任一项所述的组合物, 或根据权利要求29所述的药物组合物, 其用作药物或用于治疗。

31. 根据权利要求1-28中任一项所述的组合物, 或根据权利要求29所述的药物组合物, 其用于治疗、预防或改善帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常。

32. 用于根据权利要求31的用途的所述组合物或药物组合物, 其用于施用到血流、脑脊液、神经或脑中。

33. 用于根据权利要求31的用途的所述组合物或药物组合物, 其用于施用到纹状体、壳核或尾状核、黑质中致密部区域的多巴胺能神经元中。

34. 用于根据权利要求31-33中任一项用途的所述组合物或药物组合物, 其中所递送的所述组合物的剂量为300 μ l至20,000 μ l、300 μ l至10,000 μ l、300 μ l至5,000 μ l、300 μ l至4500 μ l、400 μ l至4000 μ l、500 μ l至3500 μ l、600 μ l至3000 μ l、700 μ l至2500 μ l、750 μ l至2000 μ l、800 μ l至1500 μ l、850 μ l至1000 μ l或约900 μ l。

35. 用于根据权利要求31-34中任一项用途的所述组合物或药物组合物, 其中, 如果作为AAV载体的混合物施用, 则每种AAV的滴定度为每mL 1E8至5E14、1E9至1E14、1E10至5E13、1E11至1E13、1E12至8E12、4E12至6E12或约5E12个基因组拷贝(GC/mL)。

36. 用于根据权利要求30-34中任一项用途的所述组合物或药物组合物, 其中, 如果作为裸DNA质粒载体的混合物施用, 则每种DNA质粒载体的剂量为每脑半球50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1750或2000微克(μ g)。

37. 用于治疗的第一表达载体和第二表达载体, 其中所述第一表达载体包含可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶(TH)的自互补编码序列的启动子, 所述第二表达载体可操作地连

接至编码GTP环化水解酶1 (GCH1)的编码序列的启动子,

任选地,用于治疗、预防或改善帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常。

38. 第一表达载体和第二表达载体,其用于根据权利要求37的用途,其中所述第一表达载体和所述第二表达载体如权利要求1-28中任一项所限定。

39. 一种成套试剂盒,其包含如权利要求1-28中任一项所限定的所述第一表达载体和第二表达载体,以及任选地,使用说明书。

40. 根据权利要求39所述的成套试剂盒,其中所述试剂盒包含其中含有所述第一表达载体的第一容器和其中含有所述第二表达载体的第二容器,任选地其中所述第一容器和/或第二容器是小瓶、注射器、艾本德管等。

表达载体组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及表达载体和包含所述载体的药物组合物和试剂盒,特别是它们在治疗帕金森病(PD)、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常的方法中的用途。

背景技术

[0002] 帕金森病是一种与纹状体中产生多巴胺的细胞的损失有关的神经退行性疾病(neurodegenerative disease)。脑细胞生产多巴胺需要三种酶:酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)、GTP环化水解酶1(GTP cyclohydrolase 1,GCH1)和芳香族氨基酸脱羧酶(aromatic amino acid decarboxylase,AADC)。TH和GCH1调节从酪氨酸产生L-DOPA(多巴胺的前体),AADC将L-DOPA转化为多巴胺。目前帕金森病的治疗方案包括口服L-DOPA,L-DOPA与多巴胺相比,可通过血脑屏障被吸收。这种治疗是有效的,因为AADC仍然存在于帕金森病患者的大脑中

[0003] 然而,口服L-DOPA疗法的一个问题是,它可能导致副作用,如运动异常。这些副作用被认为是由于L-DOPA的半衰期短,以及与其他氨基酸竞争主动运输而导致穿越肠道粘膜和血脑屏障的吸收不稳定,从而造成血液和大脑中L-DOPA水平的波动(Lees,2008年4月,The Importance of Steady-State plasma DOPA levels in reducing motor fluctuations in parkinson's disease,Expert Roundtable Supplement,CNS Spectr 13:4(Suppl7)P4-7)。

[0004] 为了将L-DOPA配制成一种会提供稳定的血液和大脑L-DOPA水平的缓释口服产品,已进行许多尝试。这些尝试都没有成功。目前,提供稳定的血浆L-DOPA水平的最有效方法是通过一根管子穿过病人的腹壁,将L-DOPA的凝胶制剂直接缓慢输注到病人的空肠中。较稳定的血浆L-DOPA水平使症状控制明显改善,运动障碍减少(Olanow et al Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease:a randomised,controlled,double-blind,double-dummy study.The Lancet Neurology Vol 13 2014年2月)。然而,终生需要穿过腹壁的管(伴有包括易位(dislodgement)、扭结、堵塞和感染等在内的不良事件),携带一个大的泵和每天更新(refresh)凝胶的供应,限制了这种疗法的使用,特别是对于老年PD患者来说,这不是最佳选择。

[0005] 因此,许多作者试图通过将基因疗法直接作用于大脑中受影响最大的区域,即纹状体,来恢复帕金森病患者的多巴胺水平。临床前和临床研究显示,各种构建体(constructs)都有一定的效果,但没有任何一种构建体显示出足够的疗效、安全性或以商业上可行的成本制造的能力,以便在任何国家被批准用于医药用途。

[0006] 三种分别编码TH、GCH或AADC的单顺反子单链AAV载体的混合物制剂的功效在1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)损伤的猕猴PD模型中得到证实。编码AADC的AAV载体

的贡献被认为是该制剂成功所必需的。该产品从未进行过临床评估 (Muramatsu 10February, 2002, Behavioural Recovery in a Primate Model of Parkinson's disease by Triple Transduction of Striatal Cells with Adeno-Associated Viral (AAV) Vectors Expressing dopamine-Synthesizing Enzymes, Human Gene Therapy, 12: 345-354)。生产和混合三种不同的AAV载体的要求以及由此产生的商品成本是决定不进一步开发该制剂的一个因素。

[0007] 编码所有三种基因的单个三顺反子慢病毒(single tricistronic Lente)载体在MPTP猕猴PD模型中显示出疗效 (Azzouz M, Martin-Rendon E, Barber RD, et al. Multicistronic Lentiviral Vector-Mediated Striatal Gene Transfer of Aromatic l-Amino Acid Decarboxylase, Tyrosine Hydroxylase, and GTP Cyclohydrolase I Induces Sustained Transgene Expression, Dopamine Production, and Functional Improvement in a Rat Model of Parkinson's Disease. J Neurosci. 2002; 22(23): 10302-10312.)。虽然这被推进到了临床试验阶段, 但报告的疗效并不明显。约有三分之一的治疗患者报告说, 他们口服L-DOPA和多巴胺激动剂的L-DOPA等效日剂量 (equivalent daily dose) 没有减少。其余的患者对口服L-DOPA或多巴胺激动剂的需求仅有少量减少。最常见报道的不良反应仍然是运动障碍和开/关波动 (Palfi S, Gurru J, Le H, et al. Long-term follow up of a phase 1/2 study of ProSavin, a lentiviral vector gene therapy for Parkinson's disease. Hum Gene Ther Cl Dev. Published online 2018.)。同样, AADC的贡献被认为是该产品疗效所必需的。然而, AADC也可能通过局部放大与持续需要口服L-DOPA有关的L-DOPA水平的不稳定峰值而促成了运动障碍的发生。

[0008] Rosenblad等人评估了一种只编码TH和GCH1的双顺反子(bicistronic) AAV, 其被直接施用至纹状体以产生L-DOPA (W02013/061076和W02010/055209)。尽管这种双顺反子AAV载体在6-羟多巴胺(6-OHDA)损伤的大鼠PD模型中导致了TH和GCH1的强烈表达, 并完全改善了运动障碍的症状, 但在MPTP损伤的猕猴PD模型中, 它并没有导致预期的纹状体TH表达的增加(通过免疫组织化学评估)或足够的运动改善, 这使得发明者写道: “在进行临床试验之前, 这个问题应该得到解决。” (Cederfjäll E, Nilsson N, Sahin G, et al. Continuous DOPA synthesis from a single AAV: dosing and efficacy in models of Parkinson's disease. Sci Rep-uk. 2013; 3(1).)。此外, 发明人表示“我们不能排除我们的载体的这一特性是由其设计的某些特点所导致的”(Rosenblad C, Li Q, Pioli EY, et al. Vector-mediated l-3,4-dihydroxyphenylalanine delivery reverses motor impairments in a primate model of Parkinson's disease. Brain. 2019; 142(8): 2402-2416.)。

发明内容

[0009] 尽管有这些现有技术, 但显然仍有未得到满足的临床需求, 需要一种有效的基因疗法来治疗PD。

[0010] 本发明人研究了用于治疗PD的新型表达载体, 发现使用两种分别编码GCH1和TH1的单顺反子(monocistronic)载体的组合, 会产生惊人的基因表达水平。这种方法优于Rosenblad的方法, 因为与Rosenblad的双顺反子(bicistronic)载体相比, 它所产生的TH表

达很容易被免疫组织化学检测到。与Muramatsu和Azzouz的方法相比,本发明在不增加AADC的情况下,改善了MPTP损伤的猕猴PD模型的运动功能。

[0011] 因此,根据本发明的第一方面,提供了一种包含第一表达载体和第二表达载体的组合物,其中第一表达载体包含自互补编码序列,该自互补编码序列包含可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶 (TH) 的序列的启动子,并且第二表达载体包含自互补编码序列,该自互补编码序列包含可操作地连接至编码GTP环化水解酶1 (GCH1) 的编码序列的启动子。

[0012] 优选地,该组合物不包括编码芳香族氨基酸脱羧酶 (AADC) 的载体(第一表达载体或第二表达载体或任何其他载体)。

[0013] 有利的是,本发明的组合物表现出以下独特的性能组合:

a) 它不需要制造和混合三种载体(它只需要两种载体),从而简化了制造并降低了成本;

b) 它不编码AADC,从而减少了在持续需要口服L-DOPA(尽管剂量减少)的病人中AADC表达的增加而扩大多巴胺峰值水平的可能性;以及

c) 它导致TH的强烈表达,例如在纹状体中,从而使内源性产生的L-DOPA和多巴胺的水平得到恢复,用于治疗帕金森病。

[0014] 优选地,在一个实施方案中,第一表达载体是AAV载体。优选地,在一个实施方案中,第二表达载体是AAV载体。

[0015] 优选地,在一个实施方案中,第一表达载体是自互补的AAV(scAAV)载体。优选地,在一个实施方案中,第二表达载体是自互补的AAV载体。

[0016] 在另一个实施方案中,第一表达载体是裸DNA载体。优选地,第二表达载体是裸DNA载体。

[0017] 优选地,在一个实施方案中,第二表达载体是单链AAV(ssAAV)载体。

[0018] 然而,在一个优选的实施方案中,第一表达载体是自互补的AAV载体,并且第二表达载体是ssAAV或裸DNA载体。

[0019] 技术人员会理解,自互补的载体是一种包括反向重复基因组(inverted repeat genome)的载体,其可以折叠成dsDNA而不需要DNA合成或多个载体基因组之间的碱基配对。自互补的腺相关病毒(scAAV)载体是一种腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体,其携带可以折叠成dsDNA而不需要DNA合成或多个载体基因组之间的碱基配对的反向重复基因组。

[0020] AAV(第一表达载体和/或第二表达载体)可以衍生自AAV-1、AAV-2、AAV-3A、AAV-3B、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10和/或AAV-11。优选地,AAV具有对神经组织的嗜性(tropism)。第一AAV表达载体和第二AAV表达载体可以是不同的血清型,但更优选是同一血清型。在一个优选的实施方案中,AAV(第一表达载体和/或第二表达载体)可以衍生自AAV1、AAV5或AAV9,更优选AAV5。

[0021] 如实施例所述,并如图17-19所示,使用scAAV5-人截短的TH和scAAV5-GCH1(均使用CBh启动子)的1:1混合物,可以导致非常明显的人截短的TH的表达。因此,AAV5最优选作为第一表达载体和/或第二表达载体。技术人员会理解,截短的TH缺乏TH的调节结构域。

[0022] 该组合物优选为第一表达载体和第二表达载体的组合或混合物。TH-编码载体优选为自互补的AAV(scAAV)。GCH-编码载体可以是自互补的或单链的。然而,优选地,第二载

体也是自互补的。因此,在一个最优的实施方案中,第一表达载体是scAAV,第二表达载体是scAAV。

[0023] 应该理解的是,基于现有技术,根本无法预测或预期两种不同的载体的施用会导致在整个灵长类纹状体的足够体积内以有效比例对足够的细胞进行充分的同时感染,以实现足够的新转导L-DOPA的产生,从而在MPTP猕猴PD模型中实现改善的(improved)运动功能。此外,由于scAAV的高表达水平,使用scAAV可使所需剂量明显降低,从而降低了治疗成本,鉴于AAV的高价格,这一点非常重要。

[0024] 该组合物可包括单独提供(如装在小瓶或注射器中),并在给药前或给药时立即混合的两种载体,或可作为单一的预混合制剂提供。第一载体与第二载体的比例可以优选为约50:50,但也可以是5:95、10:90、20:80、30:70、60:40、40:60、70:30、80:20、90:10或95:5。

[0025] 在一个实施方案中,编码TH的编码序列编码人TH,其在本文中称为SEQ ID No:1,如下所示:

[0026] atgccacccccgacgccaccacgccacaggccaagggttcgcagggccgtgtctgagctggac
gccaaagcaggcagaggccatcatgtccccgcgggttcattgggcgcaggcagagcctcatcgaggacgcc
gcaaggagcgggagggcggcggtggcagcagcgccgctgcagtccccctcggagccccggggacccctg
gaggctgtggcctttgaggagaaggaggggaaggccgtgctaaacctgctcttctccccgagggccaccaa
gccctcggcgctgtcccagctgtgaaggtgtttgagacgtttgaagccaaaatccaccatctagagacccgg
cccgccagaggccgcgagctgggggccccacctggagtacttcgtgcgcctcgaggtgcgccgaggg
gacctggccgcctgtcagtggtgtgcgccaggtgtcagaggacgtgcgcagccccgcggggcccaagg
tccctggttccaagaaaagtgtcagagctggacaagtgtcatcacctggtcaccaagttcgacctgacctg
gacttgaccacccgggcttctcgaccaggtgtaccgccagcgcaggaagctgattgctgagatcgcttc
cagtacaggcacggcgacccgattccccgtgtggagtacaccgccgaggagattgccacctggaaggaggt
ctacaccacgtgaaggcctctacgccacgcacgcctgcggggagcacctggaggcctttgctttgtgga
gcgcttcagcggctaccgggaagacaatatccccagctggaggacgttcccgttctgaaggagcgca
cgggcttcagctgcggcctgtggccggcctgtgtccggccgggacttctggccagcctggccttcgcg
tgttccagtgcaccagtatatccgccacgcgtcctcgccatgcactccccctgagccggactgtgccacga
gctgtgtggggcacgtgccccatgctggccgaccgcaccttcgcgcagttctcgcaggacattggcctggcgtc
cctgggggcctcggatgaggaaattgagaagctgtccacgctgtactggttcacggtggagttcgggctgtgt
aagcagaacggggaggtgaaggcctatggtgccgggctgtgtcctcctacggggagctcctgcactgcct
gtctgaggagcctgagattcgggccttcgacctgaggctgcggccgtgcagccctaccaagaccagacgta
ccagtcagttacttcgtgtctgagagcttcagtgacgccaaaggacaagctcaggagctatgcctcacgcatcc
agcggcccttctccgtgaagttcgacctgtacacgctggccatcgacgtgtggacagccccagggcctgc

ggcgctccctggagggtgtccaggatgagctggacacccttgcccatgcgctgagtgccattggctag

[SEQ ID NO: 1]

[0027] 因此,优选地,编码TH的编码序列包含基本上如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0028] 人TH可以具有根据NCBI参考序列:NP_000351.2的氨基酸序列,其在本文中被称为SEQ ID NO:2,如下所示:

[0029] MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQSLIEDA
RKEREA AVAAAAA AVPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKP
SALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDL
AALLSGVRQVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDL
LDHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVY
TTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGF
QLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELL
GHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQ
NGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQS
VYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRS
LEGVQDELDTLAHALSAIG*

[SEQ ID NO: 2]

[0030] 因此,优选地,编码TH的编码序列包含基本上如SEQ ID No:2所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0031] 然而,在另一个实施方案中,编码TH的编码序列编码人TH,其在本文中被称为SEQ ID No:21,如下所示:

[0032] atgcccacccccgacgccaccacgccacaggccaagggttcgcagggccgtgtctgagctggac
gccaagcaggcagaggccatcatgtccccgcggttcattgggcgcaggcagagcctcatcaggacgcc
gcaaggagcgggaggcggcggtggcagcagcggccgctgcagtcacctcgagccccgggacccccctg
gaggctgtggcctttgaggagaaggagggggaaggccgtgctaaacctgctcttctccccgagggccacaa
gccctcggcgctgtcccagctgtgaaggtgttgagacgtttgaagccaaaatccaccatctagagaccggg
ccgcccagaggccgcgagctggggggccccacctggagtacttcgtgcgcctcgaggtgcgccgaggg

gacctggccgcctgctcagtggtgtgcgccaggtgtcagaggacgtgcgcagccccgcggggcccaagg
tcccctggttccaagaaaagtgtcagagctggacaagtgtcatcacctggtcaccaagttcgacctgacctg
gacttgaccacccgggcttctcgaccaggtgtaccgccagcgcaggaagctgattgtgagatcgcttc
cagtacaggcacggcgacccgattccccgtgtggagtacaccgccgaggagattgccacctggaaggaggt
ctacaccacgctgaagggcctctacgccacgcacgcctgcggggagcacctggaggcctttgctttgtgga
ggccttcagcggctaccgggaagacaatatccccagctggaggacgtctcccgttctgaaggagcgca
cgggcttcagctgcggcctgtggcggcctgtgtccgccgggacttctggccagcctggccttcgcg
tgttcagtgacccagtatatccgccacgcgtcctcgccatgcactccccctgagccggactgtgccacga
gctgtggggcacgtgccatgtgtggccgaccgcaccttcgcgcagttctgcaggacattggcctggcgctc
cctgggggcctcgatgaggaaattgagaagctgtccacgctgtcatggttcacggtggagttcgggctgtgt
aagcagaacggggaggtgaaggcctatggtgccgggctgtgtcctctacggggagctcctgcactgcct
gtctgaggagcctgagattcgggccttcgacctgaggctgcggccgtgcagccctaccaagaccagacgta
ccagtcagctacttctgtgtgagagcttcagtgacgccaaggacaagctcaggagctatgcctcacgcatcc
agcggcccttctccgtgaagttcgacccgtacacgctggccatcgacgtgctggacagccccaggccgtgc
ggcgctccctggagggtgtccaggatgagctggacacccttgcccatgcgctgagtgccattggctag

[SEQ ID NO: 21]

[0033] 应该理解的是,除了在1109位和1110位将AC(在SEQ ID No:1中)颠倒为CA(在SEQ ID No:21中)之外,SEQ ID No:21与SEQ ID No:1完全相同。因此,优选地,编码TH的编码序列包含基本上如SEQ ID No:21所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0034] 由SEQ ID No:21编码的人TH可以具有在本文中被称为SEQ ID NO:22的氨基酸序列,如下所示:

[0035] MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQSLIEDA
RKEREAAVAAAAAAMPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKP
SALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDL
AALLSGVRQVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDL
LDHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVY
TTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGF

QLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELL
GHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLSWFTVEFGLCKQ
NGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQS
VYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRS
LEGVQDELDTLAHALSAIG*

[SEQ ID NO: 22]

[0036] 在1109位和1110位的A-C易位(从SEQ ID No:1到SEQ ID No:21)导致氨基酸401从酪氨酸变为丝氨酸。因此,优选地,编码TH的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:22所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0037] 然而,在另一个实施方案中,编码TH的编码序列包含编码人截短的TH的核苷酸序列。人截短的TH是去除调节结构域的TH变体。因此,优选地,第一载体包含编码缺乏TH调节结构域的TH的编码序列。有利的是,本发明组合物中的第一表达载体不编码TH调节结构域,从而限制了所产生的L-DOPA或多巴胺由于反馈抑制而抑制额外生产的可能性。可以理解的是,该构建体的优选实施方案包含编码人截短的TH的核苷酸序列,因为在一些实施方案中,非截短的形式(version)可能太长,无法最佳地适应scAAV。

[0038] TH的结构域及其作用在Daubner等人(Daubner SC,Lohse DL,Fitzpatrick' PF.Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase.Protein Sci.1993;2:1452-60)中描述。在一个实施方案中,人截短的TH包含在本文中被称为SEQ ID No:3的核苷酸序列,如下所示:

[0039] atgagccccgcggggcccaaggtcccctgggtcccaagaaaagtgtcagagctggacaagtgtcatc
acctggtcaccaagttcgaccctgacctggacttgaccacccgggcttctcggaccaggtgtaccgccagc
gcaggaagctgattgctgagatcgcttccagtacaggcacggcgacccgattccccgtgtggagtacaccg
ccgaggagattgccacctggaaggaggtctacaccacgctgaagggcctctacgccacgcacgcctgcgg
ggagcacctggaggcctttgcttggctggagcgcttcagcggctaccgggaagacaatatccccagctgga

ggacgtctcccgcttctgaaggagcgcacgggcttcagctgcggcctgtggccggcctgctgtccgccc
ggacttctggccagcctggccttccgcgtgttcagtgacccagtatatccgccacgcgtctcgcccatgc
actcccctgagccggactgctgccacgagctgctggggcacgtgcccatgtggccgaccgcaccttcgcg
cagttctcgcaggacattggcctggcgtccctgggggcctcggatgaggaaattgagaagctgtccacgtgt
actggttcacggtggagttcgggctgtgtaagcagaacggggaggtgaaggcctatggtgccgggctgctgt
cctcctacggggagctcctgcactgcctgtctgaggagcctgagattcgggccttcgacctgaggctcgggc
cgtgcagccctaccaagaccagacgtaccagtcagtcacttcgtgtctgagagcttcagtgacgccaaggac
aagctcaggagctatgcctcacgcatccagcgcccccttctcgtgaagttcgacctgacacgtggccatcg
acgtgctggacagccccagggcgtgcggcgctccctggagggtgtccaggatgagctggacaccttgc
catgcgtgagtgccattggctag

[SEQ ID NO: 3]

[0040] 因此,优选地,编码TH(并且优选地缺乏TH调节结构域)的编码序列包含基本上如SEQ ID No:3所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0041] 在一个优选的实施方案中,编码TH的编码序列包含编码人截短的TH的核苷酸序列。在一个实施方案中,人截短的TH包含本文中称为SEQ ID NO:4的氨基酸序列,如下所示:

[0042] **MSPAGPKVPWFPRKVSSELDKCHHLVTKFDPDLDDLHPGFSDQVY
RQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHAC
GEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSAR
DFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFA
QFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYGAGLL
SSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAK
DKLRSYASRIQRPF SVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDL
AHALSAIG***

[SEQ ID NO: 4]

[0043] 因此,优选地,编码TH的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:4所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0044] 在另一个实施方案中,人截短的TH(具有AC到CA易位)包含在本文中被称作SEQ ID No:23的核苷酸序列,如下所示:

[0045] **Atgagccccgcggggcccaagggtcccctggttccaagaaaagtgtcagagctggacaagtgtcatc**

acctggtcaccaagttcgaccctgacctggacttgaccacccgggtctcggaccaggtgtaccgccagc
gcaggaagctgattgctgagatcgcttccagtacaggcacggcgacccgattccccgtgtggagtacaccg
ccgaggagattgccacctggaaggaggtctacaccacgctgaagggcctctacgccacgcacgcctgcgg
ggagcacctggaggcctttgctttgctggagcgcttcagcgggtaccgggaagacaatatccccagctgga
ggacgtctcccgttctgaaggagcgcacgggttccagctgcggcctgtggcggcctgtgtccgccc
ggacttctggccagcctggccttccgctgttccagtgacccagtatatccgccacgcgtctcgccatgc
actcccctgagccggactgctgccacgagctgctggggcacgtgcccatgttgccgaccgcaccttcg
cagttctcgcaggacattggcctggcgtccctgggggcctcggatgaggaaattgagaagctgtccacgtgt
actggttcacggtggagttcgggctgtgtaagcagaacggggaggtgaaggcctatggtgccgggctgtgt
cctctacggggagctcctgcactgcctgtctgaggagcctgagattcgggccttcgacctgaggctgcggc
cgtgcagccctaccaagaccagacgtaccagtcagtctacttcgtgtctgagagcttcagtacgccaaggac
aagctcaggagctatgcctcacgcacccagcgccttctccgtgaagttcgaccgtacacgtggccatcg
acgtgctggacagccccaggccgtgcggcgctccctggagggtgtccaggatgagctggacaccttgc
catgcgctgagtgccattggctag

[SEQ ID NO: 23]

[0046] 优选地,编码TH(并且优选地缺乏TH调节结构域)的编码序列包含基本上如SEQ ID No:23所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0047] 在另一个实施方案中,人截短的TH(其中氨基酸401已经从酪氨酸变成丝氨酸)包含在本文中被称作SEQ ID NO:24的氨基酸序列,如下所示:

[0048] MSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHDPGFSDQVY
RQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEIATWKEVYTTLKGLYATHAC
GEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSAR
DFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELLGHVPMLADRTFA
QFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLSWFTVEFGLCKQNGEVKAYGAGLL
SSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAK
DKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDL
AHALSAIG

[SEQ ID NO: 24]

[0049] 因此,优选地,编码TH的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:24所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0050] 在一个实施方案中,编码GCH1的编码序列包含编码鼠GCH1的核苷酸序列。编码鼠

GCH1的核苷酸序列在本文中被称为SEQ ID No:5,如下所示:

[0051] ggtggttttccttgaaaaacacgatgataatatggccacaaccgcggccgtagatcccgggaccatgg
agaagccgcggggagtcaggtgcaccaatgggttctccgagcgggagctccgcggccccggggccagcc
cgctgccgagaagtcccggccgcccaggccaagggcgacagccggccgacgcctggaaggcaggg
cggcaccgcagcgaggaggaaaaccaggtgaacctcccaaactggcggctgcttactcgtccattctgctc
tcgctgggcgaggacccccagcggcaggggctgctcaagacgccctggagggcgccaccgccatgcag
tacttcaccaagggataccaggagaccatctcagatgtcctgaatgatgctatattgatgaagatcatgacgag
atggtgattgtgaaggacatagatatgttctccatgtgtgagcatcacctgttcattgttaggaagggtccatatt
ggctatcttctaacaagcaagtccttggtctcagtaaacttgccaggattgtagaaatctacagtagacgactac
aagttcaagagcgcctcaccaaacagattgcggtggccatcacagaagccttgacgcctgctggcgttgaggt
agtgattgaagcgacacacatgtgcatggtaatgcgaggcgtgcagaaaatgaacagcaagactgtcactag
caccatgctgggcgtgttccgggaagacccaagactcgggaggagttcctcacactaatcaggagctgag

[SEQ ID NO: 5]

[0052] 因此,编码序列可以包含基本上如SEQ ID No:5所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0053] 在一个优选的实施方案中,然而,编码GCH1的编码序列包含编码人GCH1的核苷酸序列。例如,编码人GCH1的核苷酸序列可以是根据GenBank NM 000161.2的序列,其在本文中被称为SEQ ID No:6,如下所示:

[0054] atggagaagggccctgtgcgggcaccggcgaggagaagccgcggggcgccaggtgcagcaatgggt
tccccgagcgggatccgccgcggccccggggccagcaggccggcgaggagaagccccgcggccccgagggc
caagagcgcgcagcccgcggacggctggaaggcgagcggccccgcagcgaggaggataacgagctg
aacctccctaacctggcagccgcctactcgtccatcctgagctcgttggcgagaacccccagcggcaagg
gctgctcaagacgccctggagggcggcctcggccatgcagttcttccaagggtaccaggagaccatctc
agatgtcctaaacgatgctatattgatgaagatcatgatgagatgggtgattgtgaaggacatagacatgtttcca
tgtgtgagcatcacttggttccatttgttgaaagggtccatattggttatcttctaacaagcaagtccttgccctca
gcaaacttgcgaggattgtagaaatctatagtagaagactacaagttcaggagcgccttataaaacaaattgct
gtagcaatcacggaagccttgcggcctgctggagtcggggtagtgttgaagcaacacacatgtgtatggtaa
tgcgaggtgtacagaaaatgaacagcaaaactgtgaccagcacaatgttgggtgtgttccgggaggatccaa
agactcgggaagagttcctgactctcattaggagctga

[SEQ ID NO: 6]

[0055] 因此,优选地,编码GCH1的编码序列包含基本上如SEQ ID No:6所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0056] 在一个优选的实施方案中,编码GCH1的编码序列包含编码人GCH1的核苷酸序列。人GCH1可以具有根据NCBI参考序列:NP_000152.1的氨基酸序列。人GCH1包含在本文中被称为SEQ ID NO:7的氨基酸序列,如下所示:

[0057] MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAK
SAQPADGWKGERPRSEEDNELNLPNLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLK
TPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEHDHDEMIVVKDIDMFSM
CEHHLVPFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQ
IAVAITEALRPAGVGVVVEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTSTMLGVF
REDPKTREEFLTLIRS*

[SEQ ID NO: 7]

[0058] 因此,优选地,编码GCH1的编码序列包含编码基本上如SEQ ID No:7所示的氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0059] 第一表达载体和第二表达载体各自包括启动子,该启动子可以是任何合适的启动子,包括组成型(constitutive)启动子、可激活型(activatable)启动子、可诱导型(inducible)启动子或组织特异性(tissue-specific)启动子。第一构建体和第二构建体中的启动子可以是相同的,或者每个构建体可以使用不同的启动子。

[0060] 在一个优选的实施方案中,第一表达载体和第二表达载体中的启动子是使TH和/或GCH1在最适合治疗帕金森病的一种组织或多种组织中表达的启动子。因此,在一个实施方案中,启动子是允许在个体的神经元、或个体的神经胶质细胞、或个体的神经元和神经胶质细胞、或个体的神经元和衬附于脑室的室管膜细胞或个体的神经元和神经胶质细胞及室管膜细胞中高表达的启动子。

[0061] 优选地,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子可以是CBh启动子,或其片段或变体。(Gray SJ,Foti SB,Schwartz JW,et al.Optimizing Promoters for Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in the Peripheral and Central Nervous System Using Self-Complementary Vectors.Hum Gene Ther.2011;22(9):1143-1153.)。如实施例所述,本发明人比较了不同的潜在构建体,并令人惊讶地证明了,尽管自互补载体的包装能力有限,需要使用两个不同的病毒载体(一个用于转导TH,一个用于转导GCH1)、但与使用最佳的单个双顺反子病毒载体相比,实现增加的转导所需的载体基因组拷贝总数更少。这一点很重要,至少有两个原因:(1)减少产品的制造成本;和(2)减少病人的AAV衣壳(capsid)负荷,从而减少与衣壳有关的毒性风险。

[0062] 表达载体中的任一或两个启动子可以是CBh启动子。优选地,第一表达载体和第二表达载体都包括CBh启动子。

[0063] 使用CBh启动子为治疗PD的构建体提供了至少有四个优点。首先,它的长度很短,可以在自互补的AAV构建体中容纳启动子转基因组合。第二,它比在以前的单顺反子构建体中被广泛使用的CMV启动子更不容易被沉默。第三,它缺乏神经元的特异性,使得星形胶质细胞(astrocytes)和神经胶质(glia)细胞可以被转导,增加在纹状体内这些细胞额外产生DOPA的可能性。第四,CBh启动子包含截短的鸡 β -肌动蛋白内含子和小鼠微小病毒(MVM)内

含子,它们一起作为间隔物(spacer),从而增加基因的表达。

[0064] 在一个实施方案中,CBh启动子的序列在本文中被称为SEQ ID NO:8,如下所示:

[0065] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTT
TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTG
GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
ATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCAT
CTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTA
TTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA
GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGA
GAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTC
CTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAA
GCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGC
CCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGAC
CGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCG
GGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGG
TTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATC
ACTTTTTTTCAGGTTGG

[SEQ ID No: 8]

[0066] 因此,优选地,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子序列包含基本上如SEQ ID No:8所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0067] 在另一个实施方案中,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子可以是人突触蛋白启动子。表达载体中的任一或两个启动子可以是人突触蛋白启动子。优选地,启动子是包含469个核苷酸的人突触蛋白1启动子。形成人突触蛋白I (SYN I) 启动子的核苷酸序列的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID NO:9,如下所示:

[0068] CTGCAGAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACC

AGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGAC
CCACTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCC
TATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGC
GCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTG
GCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGT
CACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCG
CGTCCGCGCCGCGCCGGGCCAGCCGGACCGCACCCACGCGAGGCG
CGAGATAGGGGGGACGCGGCGGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGG
CGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGT
GTCGTGCCTGAGAGCGCAG

[SEQ ID NO: 9]

[0069] 启动子可以包含基本上如SEQ ID No:9所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0070] 在另一个实施方案中,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子是具有巨细胞病毒增强子的鸡β肌动蛋白启动子(CB7)。表达载体中的任一或两个启动子可以包含具有巨细胞病毒增强子的鸡β肌动蛋白启动子。该启动子的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID NO:10,如下所示:

[0071] gacattgattattgactagttattaatagtaataattacgggggtcattagttcatagcccatatatggagttc
cgcggttacataacttacggtaaatggcccgccctgggtgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaataa
tgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgc
ccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccg
cctggcattatgccagtagcatgaccttatgggactttctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgtatatta
ccatgggtcgaggtgagccccacgttctgttctactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattta
ttattttttaattattttgtgcagcgatgggggcggggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggg
cggggcgaggggcggggcggggcgaggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctc
cgaaagtctctttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgcgggcgggcg

[SEQ ID No: 10]

[0072] 启动子可以包含基本上如SEQ ID No:10所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0073] 在一个实施方案中,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子是四环素响应元件(TRE)启动子。表达载体中的任一或两个启动子可以是TRE启动子,TRE启动子的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID NO:11,如下所示:

[0074] ACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATT

AGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA
ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGTCAATAGGGACTTTCCATT
GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGT
ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT
TTGACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGG
GAGTTTGTGTTTGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA
ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG
GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCC
TGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGG
ACCGATCCAGCCTCC

[SEQ ID No: 11]

[0075] 启动子可以包含基本上如SEQ ID No:11所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0076] 第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子可以不是CMV启动子,或CMV增强子/启动子。然而,在一些实施方案中,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子是CMV启动子。表达载体中的任一或两个启动子可以是CMV启动子,CMV启动子的一个实施方案在本文中被称作SEQ ID NO:25,如下所示:

[0077] TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC

ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG
GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA
TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT
CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGG
GATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGG
CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCC
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT
AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC

[SEQ ID No: 25]

[0078] 启动子可以包含基本上如SEQ ID No:25所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0079] 因此,在所述第一表达载体和/或第二表达载体中的启动子可以包含基本上如SEQ ID No:8、9、10、11或25所示的核苷酸序列,或其片段或变体。然而,最优选地,启动子可以包含基本上如SEQ ID No:8所示的核苷酸序列(即CBh启动子),或其片段或变体。优选地,第一载体和第二载体包含CBh启动子。

[0080] 在一些实施方案中,第一表达载体包含在其启动子和编码TH的核苷酸之间设置的内含子。在一些实施方案中,第二表达载体包含在其启动子和编码GCH1的核苷酸之间设置的内含子。

[0081] 内含子作为非编码DNA序列,具有通过多种机制调节真核生物中基因表达的功能,如增强RNA聚合酶II加工活性,促进剪接蛋白(splicing proteins)和某些转录因子之间的相互作用,连接和促进多种类型的RNA加工机制以及影响核mRNA的输出、翻译效率和RNA衰变。

[0082] 内含子的长度可以是至少25、50、75或100个核苷酸。内含子的长度可以是至少125、150、175或200个核苷酸。内含子的长度可以是至少225、250、275或300个核苷酸。

[0083] 内含子可选自一组包括人生长激素(hGH)内含子; β -肌动蛋白内含子;小鼠微小病毒(MVM)内含子;SV40内含子;以及EF-1 α 内含子的内含子,。

[0084] 内含子可以是人生长激素(hGH)内含子。hGH内含子的核苷酸序列在本文中被称作SEQ ID NO:26,如下所示:

[0085] TTCGAACAGGTAAGCGCCCCTAAAATCCCTTTGGGCACAATGT

GTCCTGAGGGGAGAGGCAGCGACCTGTAGATGGGACGGGGGCACT
AACCCCTCAGGTTTGGGGCTTCTGAATGTGAGTATCGCCATGTAAGC
CCAGTATTTGGCCAATCTCAGAAAGCTCCTGGTCCCTGGAGGGATG
GAGAGAGAAAAACAAACAGCTCCTGGAGCAGGGAGAGTGCTGGC
CTCTTGCTCTCCGGCTCCCTCTGTTGCCCTCTGGTTTCTCCCCAGGT
T

[SEQ ID No: 26]

[0086] 因此,所述第一表达载体和/或第二表达载体可以包含内含子,该内含子包含基本上如SEQ ID No:26所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0087] 优选地,内含子是 β -肌动蛋白内含子和/或小鼠微小病毒(MVM)内含子。优选地,内含子是MVM内含子。MVM内含子的核苷酸序列在本文中被称作SEQ ID NO:27,如下所示:

[0088] GTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTTGGGGTATTAATGTTTA
ATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTTTTTCAG

[SEQ ID No: 27]

[0089] 因此,所述第一表达载体和/或第二表达载体可以包含内含子,该内含子包含基本上如SEQ ID No:27所示的核苷酸序列,或其片段或变体。

[0090] 如上所述,使用CBh启动子的优点是它同时包括 β -肌动蛋白内含子和(MVM)内含子,这被认为有助于提高TH(优选截短的TH)和GCH1的表达水平。

[0091] 因此,第一表达载体和/或第二表达载体可以包含SYN1启动子,后跟内含子,该内含子可以是MVM内含子(SEQ ID No:27)或人生长激素(hGH)内含子(SEQ ID No:26)。

[0092] 可选地,所述第一表达载体和/或第二表达载体可以包含具有巨细胞病毒增强子的鸡 β 肌动蛋白启动子(CB7),后跟内含子,该内含子可以是MVM内含子或人生长激素(hGH)内含子。

[0093] 可选地,所述第一表达载体和/或第二表达载体可以包含四环素响应元件(TRE)启动子,后跟内含子,该内含子可以是MVM内含子或人生长激素(hGH)内含子。

[0094] 可选地,所述第一表达载体和/或第二表达载体可以包含CMV启动子,后跟内含子,该内含子可以是MVM内含子或人生长激素(hGH)内含子。

[0095] 在一个实施方案中,所述第一表达载体和/或第二表达载体可以进一步包含编码土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(Woodchuck Hepatitis Virus Post-transcriptional Regulatory Element,WPPE)的核苷酸序列,该调节元件分别进一步增强TH1和/或GCH1的表达。在一些实施方案中,第一表达载体不包括编码WPPE的核苷酸序列。

[0096] 优选地,第二表达载体进一步包含编码土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)的核苷酸序列。

[0097] 优选地,WPPE编码序列设置在第二表达载体上GCH1编码序列的3'。

[0098] WPPE的一个实施方案长592bp,包括 γ - α - β (gamma-alpha-beta)元件,其在本文中被称作SEQ ID No:12,如下所示:

[0099] AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTAT
TCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAAT
GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTC
CTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCG
TTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAAC
CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGC
CTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGAC
AATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGC
TCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTA
CGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTG
CTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA
CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG

[SEQ ID NO: 12]

[0100] 优选地, WPRE包含基本上如SEQ ID No:11所示的核酸序列, 或其片段或变体。

[0101] 然而, 在一个优选的实施方案中, 使用了截短的WPRE, 由于 β 元件缺失而长247bp, 其在本文中被称为SEQ ID No:13, 如下所示:

[0102] AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTAT
TCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAAT
GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTC
CTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCG
CCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA
CAATTCCGTGGTGT

[SEQ ID NO: 13]

[0103] 优选地, WPRE包含基本上如SEQ ID No:13所示的核酸序列, 或其片段或变体。

[0104] 优选地, 第一表达载体包含编码polyA尾的核苷酸序列。优选地, 第二表达载体包含编码polyA尾的核苷酸序列。优选地, polyA尾编码序列设置在TH和/或GCH1编码序列的3', 并且如果存在于第二载体中, 则优选地设置在WPRE编码序列的3'。

[0105] 在一个实施方案中, polyA尾包含猿猴病毒(simian virus)40poly-A224bp序列(即SV40 polyA尾)。SV40 polyA尾的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID No:14, 如下所示:

[0106] AGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACA

ACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGC
TATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAA
CAACAATTGCATTTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGG
GAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTA

[SEQ ID NO: 14]

[0107] 优选地, polyA尾包含基本上如SEQ ID No:14所示的核酸序列, 或其片段或变体。

[0108] 在另一个实施方案中, polyA尾包含牛生长激素 (bovine growth hormone, BGH) poly A 208bp序列。BGH polyA尾的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID No:15, 如下所示:

[0109] CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCC
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCT
AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
GAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGA

[SEQ ID No: 15]

[0110] 优选地, polyA尾包含基本上如SEQ ID No:15所示的核酸序列, 或其片段或变体。

[0111] 优选地, 第一表达载体包含左反向末端重复序列和/或右反向末端重复序列 (ITR)。优选地, 第二表达载体包含左反向末端重复序列和/或右反向末端重复序列 (ITR)。优选地, 每个ITR设置在表达载体的5' 和/或3'。

[0112] 优选的自互补的第一表达载体包含一个反向末端重复 (ITR) 序列和一个其中末端解链位点缺失的修饰的ITR序列。优选的自互补的第二表达载体包含一个反向末端重复 (ITR) 序列和一个其中末端解链位点 (terminal resolution site) 缺失的修饰的ITR序列。其中末端解链位点缺失的ITR的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID No:16:

[0113] CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG
ACCAAAGGTGCCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA

[SEQ ID No: 16]

[0114] 因此, 优选地, 所述第一表达载体和/或第二表达载体包含ITR, 该ITR包含基本上如SEQ ID No:16所示的核酸序列, 或其片段或变体。

[0115] 第一表达载体可以包含编码3' 非翻译区 (3' UTR) 的核苷酸序列。第二表达载体可以包含编码3' 非翻译区 (3' UTR) 的核苷酸序列。优选地, 3' UTR编码序列设置在TH和/或GCH1编码序列的3', 并且优选地设置在poly A尾 (如果存在的话) 的5' 和/或设置在WPRE编码序列 (如果存在的话) 的5'。

[0116] 第一表达载体中的3' UTR编码序列 (即TH的3' UTR) 的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID No:28:

[0117] GTGCACGGCGTCCCTGAGGGCCCTTCCCAACCTCCCCTGGTCC
TGCACTGTCCCGGAGCTCAGGCCCTGGTGAGGGGCTGGGTCCCGG
GTGCCCCCATGCCCTCCCTGCTGCCAGGCTCCCACTGCCCTGCA
CCTGCTTCTCAGCGCAACAGCTGTGTGTGCCCCGTGGTGAGGTTGTG
CTGCCTGTGGTGAGGTCCTGTCCTGGCTCCCAGGGTCCTGGGGGCT
GCTGCACTGCCCTCCGCCCTTCCCTGACACTGTCTGCTGCCCCAAT
CACCGTCACAATAAAAGAACTGTGGTCTCTA

[SEQ ID No: 28]

[0118] 因此,优选地,第一表达载体包含3'UTR编码序列,其包含基本上如SEQ ID No:28所示的核酸序列,或其片段或变体。

[0119] 第一表达载体可以包含编码5'非翻译区(5'UTR)的核苷酸序列。第二表达载体可以包含编码5'非翻译区(5'UTR)的核苷酸序列。优选地,5'UTR编码序列设置在TH和/或GCH1编码序列的5',并且优选地设置在启动子的3'。

[0120] 5'UTR编码序列优选地为科扎克序列(Kozak sequence)。所述第一表达载体和/或第二表达载体的5'UTR编码序列的一个实施方案在本文中被称为SEQ ID No:29:

[0121] GCCACC[SEQ ID No: 29]

[0122] 因此,优选地,所述第一表达载体和/或第二表达载体包含含有基本上如SEQ ID No:29所示的核酸序列的5'UTR编码序列,或其片段或变体。

[0123] 在一个实施方案中,第一表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'启动子;编码TH的序列和编码poly A尾的3'序列。在一个实施方案中,第二表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'启动子;编码GCH1的序列和编码poly A尾的3'序列。本文描述的5'和3'的使用表明这些特征是位于上游或下游的,而不是为了表明这些特征一定是末端特征。

[0124] 在一个实施方案中,第一表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;启动子;编码人截短的TH的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR。在一个实施方案中,第二表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;启动子;编码人GCH1的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR。

[0125] 在一个实施方案中,第一表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;启动子;内含子;编码人截短的TH的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR。在一个实施方案中,第二表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;启动子;内含子;编码人GCH1的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR。

[0126] 在一个实施方案中,第一表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;CBh启动子;编码人截短的TH的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR。在另一个实施方案中,第二表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;CBh启动子;编码GCH1的序列;编码WPRE的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR。

[0127] 在一个优选的实施方案中,第一表达载体可以按照这个指定的顺序包括5'ITR;CBh启动子;编码人截短的TH的序列;编码poly A尾的序列和3'ITR,其中末端解链位点缺

失。在一个优选的实施方案中,第二表达载体可以按照这个指定的顺序包括5' ITR;CBh启动子;编码GCH1的序列;编码WPRE的序列;编码poly A尾的序列和3' ITR,其中末端解链位点缺失。优选地,第一方面的组合物包括本文所述的第一达载体和第二表达载体。

[0128] 以下序列在本文中被称为SEQ ID No:17,并在图6中示出,描述了包含与htTH(人截短的TH)编码序列可操作地连接的CBh启动子的载体:

[0129] AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGAT
TCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGC
AGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCAC
CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT
GTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT
ACGCCAAGCTCTCGAGATCTAGAAAGCTTCCCGGGGGGATCTGGG
CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG
TTCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAGGCCAACTTTGTATAGAAAA
GTTGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACT
TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT
GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG
TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGAC
CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC
TATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCA

TCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATT
ATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC
AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG
AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTT
CCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA
AGCGCGCGGCGGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTG
CCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA
CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCC
GGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTG
GTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAAT
CACTTTTTTTCAGGTTGGCAAGTTTGTACAGCCACCATGAGCCCCG
CGGGGCCCAAGGTCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTCAGAGCTGG
ACAAGTGTCATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTT
GGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAA
GCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATT
CCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAG
GTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCCTGCGGG
GAGCACCTGGAGGCCTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACC
GGGAAGACAATATCCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAA
GGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTC
CGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCCGCGTGTTCCAGTGC
ACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGC
CGGACTGCTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCG
ACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCT
GGGGGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTG
GTTACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAA
GGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCCTCCTACGGGGAGCTCCTGCAC
TGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATTCTGGGCCTTCGACCCTGAGGCTG

CGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTT
CGTGTCTGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTA
TGCCTCACGCATCCAGCGCCCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTAC
ACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCCAGGCCGTGCGGGCGC
TCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTGGACACCCTTGCCCATGCGC
TGAGTGCCATTGGCTAACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG
GACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGA
AATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAA
ACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGG
GGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATG
TGGTAACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG
GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGACAGATCCGGGC
CCGCATGCGTCGACAATTCCTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGA
CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACAT
CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC
GCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGAT
GCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGC
CCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTC
TGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
CTGCATGTGTCAGAGGTTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTTATAGGTTAATGTCATGAT
AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCT
TTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTG

GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT
TACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTC
GCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCT
ATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTC
GGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACC
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTAC
TTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAG
CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
GTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTAC
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT
AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGT
TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTAT
CTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCA
GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTT
TAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGAC
CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAG

CTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA
GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG
GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTT
CGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTAT
CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGAT
ACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGC
GAGGAAGCGGAAG

[SEQ ID No: 17]

[0130] 优选地,第一表达载体包含基本上如SEQ ID No:17所示的核酸序列,或其片段或变体。

[0131] 以下序列在本文中被称为SEQ ID No:18,并在图7中示出,描述了包含与GCH-1编码序列可操作地连接的CBh启动子的载体:

[0132] AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGAT
TCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGC
AGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCAC
CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT
GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT
ACGCCAAGCTCTCGAGATCTAGAAAGCTTCCCGGGGGGATCTGGG
CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGG
TTCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAGGCAACTTTGTATAGAAAA
GTTGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACT
TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTT

GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG
TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGAC
CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC
TATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCA
TCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATT
ATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC
AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG
AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTT
CCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA
AGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTG
CCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA
CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCC
GGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTG
GTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAAT
CACTTTTTTTCAGGTTGGCAAGTTTGTACAGCCACCATGGAGAAGC
CGCGGGGTGTAAGGTGCACCAATGGGTTCCCCGAGCGGGAGCTGC
CGCGGCCCCGGGGCCAGCCGACCTGCCGAGAAGTCCCGGCCGCCCG
AGGCCAAGGGCGCACAGCCAGCCGACGCCTGGAAGGCAGGGCGG
CCCCGCAGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCCAACCTGGCG
GCCGCTTACTCGTCCATCCTGCGCTCGCTGGGCGAGGACCCCCAGC
GGCAGGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCACCGCCATGC
AGTTCTTCACCAAGGGATACCAGGAGACCATCTCAGATGTCCTGAA
CGATGCTATATTTGATGAGGACCATGACGAGATGGTGATTGTGAAG
GACATTGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACCTGGTCCCATTGT
GGGAAGGGTCCATATTGGTTATCTTCCTAACAAGCAAGTCCTTGGTC
TCAGCAAACCTTGCCAGGATTGTGGAAATCTACAGTAGAAGACTACA
AGTTCAAGAACGCCTTACCAAACAGATTGCAGTGGCCATCACAGA
AGCCTTGCAGCCTGCTGGCGTCGGGGTAGTGATTGAAGCAACACA

CATGTGTATGGTCATGCGAGGTGTGCAGAAAATGAACAGCAAGACT
GTCACTAGCACCATGCTAGGCGTGTTCCGGGAAGACCCAAAGACT
CGGGAGGAGTTCCTCACACTCATCAGGAGCTGAAATCAACCTCTGG
ATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGTTGCT
CCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCT
ATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG
TTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCT
GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTT
TATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATCTAGCT
TTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAG
CTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTC
AGG TTCAGGGGGAGAGACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT
CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCT
TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA
CAGATCCGGGGCCCGCATGCGTCGACAATCACTGGCCGTCGTTTTA
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCC
TTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTT
ACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
AGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGAC
CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTACCGTCATCACCG
AAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTTATAGG
TTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTT
CGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTC
AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC

GCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTGCTCAC
CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT
GCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC
TTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT
TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
AAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACA
GTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA
CCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGT
TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGAC
ACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAA
CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGG
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTC
CGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG
AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
TTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
AAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGA
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCT
ACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT
CCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTC
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA

GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTG
CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
CCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAG
AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCT
TTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTG
AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

[SEQ ID No: 18]

[0133] 优选地,第二表达载体包含基本上如SEQ ID No:18所示的核酸序列,或其片段或变体。

[0134] 以下序列在本文中被称为SEQ ID No:19,并在图8中示出,描述了包含与htTH编码序列可操作地连接的SYN1启动子的载体:

[0135] GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT
AGGGGTTCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAGGCAACTTTGTATA
GAAAAGTTGCTGCAGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAG
GCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGA
CAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAG
AGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCC
AGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGGCGC
GCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACCTCGC
CGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGC
GCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATA

GGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGGCGCCGGCGACTCA
GCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGC
CTGAGAGCGCAGGCCACCATGAGCCCCGCGGGGGCCCAAGGTCCCC
TGGTTCCCAAGAAAAGTGTCAGAGCTGGACAAGTGTCATCACCTG
GTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCT
CGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAAGCTGATTGCTGAGATCG
CCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACAC
CGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAA
GGGCCTCTACGCCACGCACGCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCTT
TGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCC
CAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAAGGAGCGCACGGGCTTC
CAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGG
CCAGCCTGGCCTTCCGCGTGTTCAGTGCACCCAGTATATCCGCCA
CGCGTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAG
CTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGT
TCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGCCTCGGATGAGGA
AATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGG
CTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTG
CTGTCCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTG
AGATTCGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCA
AGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTCTGAGAGCTTCAGT
GACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGC
CCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGC
TGGACAGCCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGG
ATGAGCTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCTAAAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA
ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTT
TGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTA

TAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGC
CTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT
CCGTGGTGTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAA
CCATCTAGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTA
ACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCA
TTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGAGCAATTGCATTCATTTTATGT
TTCAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAA
ACCTCTACAAATGTGGTAACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC
TCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGC
TTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA
CAGATCCGGGGCCCGCATGCGTCGACAATTCCTGGCCGTCGTTTTA
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCC
TTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTT
ACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
AGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGAC
CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTACCGTCATCACCG
AAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTTATAGG
TTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTT
CGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTC
AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
GCCCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTTGCTCAC
CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT
GCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC
TTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTT

TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
AAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACA
GTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTG
CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA
CCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGT
TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGAC
ACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAA
CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGG
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTC
CGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG
AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
TTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
AAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGA
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCT
ACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT
CCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTC
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA
GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTG
CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
CCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAG

AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCT
TTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTG
AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCG
CCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTT
CCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACA
CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG
AAAGCTTCCCGGGGGGATCTG

[SEQ ID No: 19]

[0136] 以下序列在本文中被称为SEQ ID No:20,并在图9中示出,描述了包含与GCH-1编码序列可操作地连接的SYN1启动子的载体(即,第一方面的组合物的第二表达载体):

[0137] GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT
AGGGGTTCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAGGCAACTTTGTATA
GAAAAGTTGCTGCAGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAG
GCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCGACCCACTGGA
CAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAG
AGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCC
AGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGGCGC
GCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACCTCGC
CGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGC

GCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATA
GGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGGCGCCGGCGACTCA
GCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGC
CTGAGAGCGCAGGCCACCATGGAGAAGCCGCGGGGTGTAAGGTGC
ACCAATGGGTTCCTCCGAGCGGGAGCTGCCGCGGGCCCGGGGCCAGC
CGACCTGCCGAGAAGTCCCGGCCGCCCGAGGCCAAGGGCGCACAG
CCAGCCGACGCCTGGAAGGCAGGGCGGGCCCGCAGCGAGGAGGAT
AACGAGCTGAACCTCCCCAACCTGGCGGCCGCTTACTCGTCCATCC
TGCGCTCGCTGGGCGAGGACCCCCAGCGGCAGGGGCTGCTCAAGA
CGCCCTGGAGGGCGGGCCACCGCCATGCAGTTCTTCACCAAGGGATA
CCAGGAGACCATCTCAGATGTCCTGAACGATGCTATATTTGATGAGG
ACCATGACGAGATGGTGATTGTGAAGGACATTGACATGTTTTCCAT
GTGTGAGCATCACCTGGTCCCATTTGTGGGAAGGGTCCATATTGGTT
ATCTTCCTAACAAGCAAGTCCTTGGTCTCAGCAAACCTTGCCAGGAT
TGTGGAAATCTACAGTAGAAGACTACAAGTTCAAGAACGCCTTACC
AAACAGATTGCAGTGGCCATCACAGAAGCCTTGCAGCCTGCTGGC
GTCGGGGTAGTGATTGAAGCAACACACATGTGTATGGTCATGCGAG
GTGTGCAGAAAATGAACAGCAAGACTGTCACTAGCACCATGCTAG
GCGTGTTCCGGGAAGACCCAAAGACTCGGGAGGAGTTCCTCACAC
TCATCAGGAGCTGAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG
ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATA
CGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTT
CATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGG
AACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCT
GTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTTATTTGTGAAATTTGTGATG
CTATTGCTTTATTTGTAACCATCTAGCTTTATTTGTGAAATTTGTGAT
GCTATTGCTTTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAACAAGTTAAC
AACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGAGCA

ATTGCATTCAATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTT
TTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAACTAGTCCACTC
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGC
GAGCGCGCAGAGAGGGACAGATCCGGGGCCCGCATGCGTCGACAAT
TCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCG
TTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGG
CGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC
GCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACG
CATCTGTGCGGTATTTTACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAAT
CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACA
CCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGT
TTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT
ACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGAC
GTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT
TTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTAT
TCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGGCATTTTGCCT
TCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT
GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCC
AATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCC
GTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTC
TCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTT
ACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA

ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
TGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA
GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC
AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC
CTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
TACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAG
TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGA
TACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC
AAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTT
ACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGA
ACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG
GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGC
CTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA
CGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCT
TTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAAC
CGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA

CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
CAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCT
TTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG
CTCTCGAGATCTAGAAAGCTTCCCGGGGGGATCTG

[SEQ ID No: 20]

[0138] 本发明优选提供一种组合物,该组合物包含:

(i) 第一自互补的腺相关病毒(scAAV)载体,其包含可操作地连接至编码序列的启动子,所述编码序列编码酪氨酸羟化酶(TH),任选地为缺少调节结构域的人截短的TH;和

(ii) 第二自互补的腺相关病毒(scAAV)载体,其包含可操作地连接至编码序列的启动子,所述编码序列编码GTP环化水解酶1(GCH1)。

[0139] 根据第二方面,提供了一种药物组合物,包括根据第一方面的组合物,和药学上可接受的载体。

[0140] 第一方面的包含重组载体的组合物,和第二方面的药物组合物特别适合于治疗。

[0141] 因此,根据第三方面,提供了根据第一方面的组合物或根据第二方面的药物组合物,用作药物或用于治疗。

[0142] 特别设想了对帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常的治疗。

[0143] 因此,在本发明的第四方面,提供了根据第一方面的组合物或根据第二方面的药物组合物,用于治疗、预防或改善帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常。

[0144] 技术人员会理解,第一载体和第二载体的治疗用途意味着它们不一定需要在同一组合物或制剂中提供。

[0145] 因此,在另一个方面,提供了第一表达载体和第二表达载体用于治疗的用途,第一表达载体包括可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶(TH)的自互补编码序列的启动子,第二表达载体包括可操作地连接至编码GTP环化水解酶1(GCH1)的编码序列的启动子。

[0146] 在又一个方面,提供了第一表达载体和第二表达载体用于治疗、预防或改善帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常,第一表达载体包含可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶(TH)的自互补编码序列的启动子,第二表达载体包含可操

作地连接至编码GTP环化水解酶1 (GCH1) 的编码序列的启动子。

[0147] 此处所用的第一表达载体和第二表达载体如第一方面所述。

[0148] 优选地, 本文所述的用途包括使用第一自互补腺相关病毒(scAAV) 载体, 该载体包括可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶(TH), 任选地缺少调节结构域的人截短的TH的编码序列的启动子。

[0149] 优选地, 本文所述的用途包括使用第二自互补腺相关病毒(scAAV) 载体, 该载体包括可操作地连接至编码GTP环化水解酶1 (GCH1) 的编码序列的启动子。

[0150] 根据第五方面, 提供了一种治疗、预防或改善个体的帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常的方法, 该方法包括向需要这种治疗的个体施用治疗有效量的根据第一方面的组合物, 或根据第二方面的组合物。

[0151] 在又一个方面, 提供了一种治疗、预防或改善个体的帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常的方法, 该方法包括向需要这种治疗的个体施用治疗有效量的第一表达载体和第二表达载体, 第一表达载体包含可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶(TH) 的自互补编码序列的启动子, 第二表达载体包含可操作地连接至编码GTP环化水解酶1 (GCH1) 的编码序列的启动子。

[0152] 优选地, 根据本发明的第一载体和第二载体或组合物被用于基因治疗技术。

[0153] 在实施方案中, 待治疗的疾病选自帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常。

[0154] 在最优选的实施方案中, 待治疗的疾病是帕金森病。

[0155] 所公开的基因治疗技术导致纹状体中L-DOPA的产生达到恒定水平。这消除或减少了对口服L-DOPA的需求, 因此导致了峰谷变化的减少。因此, 所公开的基因疗法可用于治疗与L-DOPA治疗帕金森病和L-DOPA诱导的运动障碍相关的副作用。

[0156] 所公开的基因治疗技术可用于治疗Segawa综合征。尽管有可能用仅递送GCH1或仅递送TH的基因疗法(取决于Segawa综合征的病因) 来治疗Segawa综合征, 但预计额外(分别) 加入TH或GCH1不会有损害, 并且可能是有益的。所公开的治疗方法特别有利, 因为由于Segawa综合征的罕见性, 开发仅用于该适应症(indication) 的治疗方法可能没有商业吸引力或可行性。针对这种适应症以及帕金森病生产所公开的发明将降低治疗的单位成本。

[0157] 在优选的实施方案中, 根据本发明的药物(medicaments) (即第一表达载体和第二表达载体) 可以通过注射到血流、脑脊液、神经或直接注射到需要治疗的部位而施用到个体。例如, 表达载体可以被递送至大脑。载体可以双侧(bilaterally) 或单侧(unilaterally) 递送。大脑的特定区域可以成为靶标, 如纹状体。壳核(putamen) 或尾状核可能是靶标。可选地, 也可以只针对壳核。治疗可以集中在黑质中的致密部区域的多巴胺能神经元上。

[0158] 递送方法可以是直接注射。注射入大脑(例如纹状体) 的方法在本领域是众所周知的(Bilang-Bleuel et al (1997) Proc. Acad. Nati. Sci. USA 94:8818-8823; Choi-Lundberg et al (1998) Exp. Neurol. 154:261 -275; Choi-Lundberg et al (1997) Science 275:838-

841;and Mandel et al(1997))Proc.Acad.Natl.Sci.USA 94:14083-14088)。可选地,或除此之外,所选择的载体可以具有针对特定所需组织(如神经元)的嗜性。

[0159] 对载体衣壳特性的修饰可以使载体在鞘内注射(IT)或注射到脑室(ICV)后也能靶向纹状体区域。注射到脑室中,使产生的L-DOPA或多巴胺升高,可以通过CSF扩散或轴突传递(axonal transfer)而传递到纹状体。另一种方法是产生嵌合的AAV血清型,该血清型将从混合的两种血清型中继承不同结合特性。

[0160] 然而,优选地,根据本发明的载体和组合物可以通过注射到纹状体中施用至个体。

[0161] 基因治疗载体可以通过本领域内已知的任何技术来生产。例如,AAV载体可以用经典的三重转染方法(triple transfection methodology)生产。生产腺相关病毒载体的方法在Matsushita et al.(Matsushita et al.,Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus.Gene Therapy(1998)5,938-945)中公开。

[0162] 可以理解的是,所需的本发明组合物的量以及在混合物内或单独提供的两种载体中每一种的量是由混合物中(或单独的)两种载体的生物活性和生物利用度决定的,而生物活性和生物利用度又取决于给药方式、载体的理化性质以及组合物是作为单一疗法还是与其他疗法结合使用。施用的最佳剂量可由本领域技术人员确定,并将随使用的特定表达载体、组合物和药物组合物的强度、给药方式和被治疗的神经退行性疾病的进展而变化。取决于被治疗的特定个体的其他因素(包括个体年龄、体重、性别、饮食和给药时间)将导致需要调整剂量。

[0163] 本发明组合物的递送剂量可以是300 μ l至20000 μ l、300 μ l至10000 μ l、300 μ l至5000 μ l、300 μ l至4500 μ l、400 μ l至4000 μ l、500 μ l至3500 μ l、600 μ l至3000 μ l、700 μ l至2500 μ l、750 μ l至2000 μ l、800 μ l至1500 μ l、850 μ l至1000 μ l,或约900 μ l。

[0164] 如果作为AAV载体的混合物给药,每种AAV的滴定度可以是每mL1E8至5E14、1E9至1E14、1E10至5E13、1E11至1E13、1E12至8E12、4E12至6E12,或约5E12个基因组拷贝(GC/ml)。

[0165] 如果作为裸DNA质粒载体的混合物给药,每种DNA质粒载体的剂量可以是每脑半球50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1250、1500、1750或2000微克(μ g)。

[0166] 组合物可在疾病发病期间或之后给药。在治疗过程中,剂量可作为一次给药,或给予多次剂量。可以对病人进行一次剂量给药,并对病人进行监测,以评估是否有必要进行第二次或更多次剂量给药。在AAV载体中重复使用相同的基因组可以通过转换AAV衣壳血清型来促进,以减少由以前的治疗引起的抗体或细胞介导的免疫反应的干扰概率。

[0167] 在一些实施方案中,治疗方法可包括在基因疗法治疗之前,测试输注L-DOPA。测试输注可用于证明个体对L-DOPA有反应,并受益于血浆和/或脑L-DOPA水平的峰谷变化减少,因此可以选择最有可能从基因治疗中受益的个体。L-DOPA测试输注可以通过任何能够在数小时或数天内产生稳定血药浓度的方法进行。合适的输注方法的实例包括通过鼻胃管、静脉输注、通过泵输注、通过使用DuoDOPA或任何其他合适的方法。

[0168] 可以理解的是,第一表达载体和第二表达载体本身,或根据第一方面的组合物,或第二方面的药物组合物可用于药物中,该药物可作为单一疗法(即使用根据本发明第一方面的载体组合物或根据第二方面的组合物),用于治疗、改善或预防本文公开的任何疾病。可选地,载体本身或根据本发明的组合物可作为已知疗法的辅助手段,或与已知疗法结合使用,以治疗、改善或预防本文公开的任何疾病。在某些情况下,载体可作为辅助手段,与旨

在改善基因治疗的治疗方法结合使用,或与之同时使用。例如,载体可与免疫抑制治疗结合使用,以减少、防止或控制由基因治疗本身引起的免疫反应。例如,免疫抑制治疗可以防止、减少或控制针对基因治疗载体的衣壳、包含在基因治疗载体内的基因组或在治疗期间由基因治疗载体产生的产物的免疫反应。免疫抑制机制可包括一般的免疫抑制剂,如类固醇。免疫抑制机制可包括更有针对性的免疫抑制,旨在减少特定的免疫反应,如对基因治疗构建体内发现的或由其产生的特定抗原进行免疫治疗。可选地,包含载体的组合物可与旨在提高靶细胞摄取载体的效率,或提高转染或转导的效率,或防止表达的下调或沉默的药剂组合施用或使用。

[0169] 根据本发明的组合物可以组合成具有许多不同形式的组合物,具体取决于组合物的使用方式。因此,例如,组合物可以是粉末、液体、胶束溶液、脂质体悬浮液,或可以给需要治疗的人或动物施用的任何其他合适的形式。可以理解的是,根据本发明的药物载体应该被给药的个体能够耐受良好的载体。优选地,该组合物为可注射液体的形式。

[0170] 已知的外科方法(procedures),如制药业常规采用的方法(如体内实验、临床试验等),可用于形成根据本发明的组合物的特定制剂和精准的治疗方案。

[0171] 根据第六方面,提供了一种制备根据第二方面的药物组合物的方法,该方法包括使根据第一方面的组合物与药学上可接受的载体接触。

[0172] “个体(subject)”可以是脊椎动物、哺乳动物或家畜。因此,根据本发明的组合物和药物可用于治疗任何哺乳动物,例如家畜(如马)、宠物,或可用于其他兽医应用。然而,最优选地,个体是人。

[0173] 载体或组合物的“治疗有效量(therapeutically effective amount)”是指向个体施用,为治疗疾病所需的前述量的任何量。

[0174] 本文所指的“药学上可接受的载体(pharmaceutically acceptable vehicle)”是本领域技术人员已知在配制药物组合物中是有用的任何已知化合物或已知化合物的组合。

[0175] 在一个优选的实施方案中,药学上可接受的载体可以允许将该组合物直接注射到个体体内。例如,该载体可适用于允许将组合物注射到纹状体中。

[0176] 在一个实施方案中,药学上可接受的载体可以是固体,并且组合物可以是粉末或悬浮液的形式。固体的药学上可接受的载体可包括一种或多种物质,这些物质也可作为润滑剂、增溶剂、悬浮剂、染料、填料、助流剂、压缩助剂、惰性粘合剂、防腐剂、染料、包衣(coatings)或固体崩解剂(solid-disintegrating agents)。载体也可以是一种封装材料(encapsulating material)。在粉剂中,载体是一种精细的固体(finely divided solid),与根据本发明的精细的活性剂(finely divided active agents)混合。在另一个实施方案中,药物载体可以是凝胶等。

[0177] 然而,药物载体可以是悬浮液或液体,并且药物组合物是悬浮液或溶液的形式。

[0178] 无菌溶液或悬浮液形式的液体药物组合物可以通过例如鞘内注射、硬膜外(epidural)注射、静脉内(intravenous)注射,特别是直接注射到脑的目标区域,如纹状体来利用。第一载体和第二载体可以制备成悬浮液或无菌固体或干燥的组合物,在给药时可以使用无菌水、生理盐水、含 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$ 的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(dPBS))、人工脑脊液或其他适当的无菌注射介质来溶解或悬浮。

[0179] 在一个实施方案中,本发明的第一方面和第二方面的组合物可以作为单一的预混合制剂(例如在一个小瓶或注射器中)提供。然而,在另一个实施方案中,该组合物包括单独提供(例如在两个小瓶或两个注射器中),但在一个试剂盒中的两种表达载体,并在给药前或给药时立即混合。

[0180] 因此,在第七方面,提供了成套试剂盒(kit of parts),包括根据第一方面定义的第一表达载体和第二表达载体,以及任选地,使用说明书。

[0181] 成套试剂盒可以包含第一容器,其中包含第一表达载体。成套试剂盒可以包含第二容器,其中包含第二表达载体。第一容器和/或第二容器可以是小瓶、注射器、艾本德管(Eppendorf)等。例如,注射器可以是一个预装的注射器。试剂盒可以包含混合容器,在给药前可在其中混合载体。可选地,一种载体可以被转移到装有另一种载体的容器中,在那里它们可以被混合。可选地,载体可以分开给药,但要充分同时给药,以便它们在个体体内同时具有治疗活性。使用说明书优选描述如何混合载体,如果适合的话,以及剂量。

[0182] 第一表达载体与第二表达载体的比例可以优选是约50:50,但也可以是5:95、10:90、20:80、30:70、60:40、40:60、70:30、80:20、90:10或95:5。

[0183] 可以理解的是,第七方面的试剂盒可用于治疗,优选用于治疗、预防或改善帕金森病、DOPA反应性肌张力障碍、血管性帕金森综合征、与L-DOPA治疗帕金森病相关的副作用、L-DOPA诱导的运动障碍、Segawa综合征或遗传性多巴胺受体异常。

[0184] 在另一个方面,提供了一种包含第一表达载体和第二表达载体的组合物,其中所述第一表达载体包含可操作地连接至编码酪氨酸羟化酶(TH)的自互补编码序列的启动子,并且第二表达载体包含编码GTP环化水解酶1(GCH1)的编码序列。

[0185] 可以理解的是,本发明扩展到基本包含本文提到的任何序列(包括其变体或片段)的氨基酸或核酸序列的任何核酸或肽或其变体、衍生物或类似物。术语“基本上的氨基酸/核苷酸/肽序列”“变体”和“片段”,可以是与本文提及的任何一个序列的氨基酸/核苷酸/肽序列具有至少40%的序列同一性,例如与确定为SEQ ID No:1-29的序列具有40%的同一性的序列等。

[0186] 也设想了氨基酸/多核苷酸/多肽序列的序列与本文提及的任何序列具有大于65%,更优选大于70%,甚至更优选大于75%,更优选大于80%的序列同一性。优选地,氨基酸/多核苷酸/多肽序列与本文提及的任何序列具有至少85%的同一性,更优选地与本文提及的任何序列具有至少90%的同一性,甚至更优选地至少92%的同一性,甚至更优选地至少95%的同一性,甚至更优选地至少97%的同一性,甚至更优选地至少98%的同一性,最优选地至少99%的同一性。

[0187] 技术人员将了解如何计算两个氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的同一性百分比。为了计算两个氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的同一性百分比,必须首先准备两个序列的比对,然后计算序列同一性值。两个序列的同一性百分比可以取不同的数值,这取决于:(i)用于比对序列的方法,例如ClustalW、BLAST、FASTA、Smith-Waterman(在不同的程序中实现),或来自三维比较的结构比对;以及(ii)比对方法使用的参数,例如局部比对与全局比对,使用的配对计分矩阵(pair-score matrix)(例如BLOSUM62、PAM250、Gonnet等),以及空位罚分(gap-penalty),例如函数形式和常数。

[0188] 在进行了比对之后,有许多不同的方法来计算两个序列之间的同一性百分比。例

如,可以用同一性(identities)的数量除以:(i)最短序列的长度;(ii)对齐的长度;(iii)序列的平均长度;(iv)非缺口位置(non-gap positions)的数量;或(v)不包括单链突出端(overhangs)的等价位置的数量。此外,可以理解的是,同一性百分比也强烈依赖于长度。因此,一对序列越短,人们可预期偶然发生的序列同一性就越高。

[0189] 因此,可以理解的是,蛋白质或DNA序列的精确比对是一个复杂的过程。流行的多重比对程序ClustalW(Thompson et al.,1994,Nucleic Acids Research,22,4673-4680; Thompson et al.,1997,Nucleic Acids Research,24,4876-4882)是根据本发明生成蛋白质或DNA多重比对的优选方法。ClustalW的合适参数可以是如下:对于DNA比对:缺口开放罚分(Gap Open Penalty)=15.0,缺口延伸罚分(Gap Extension Penalty)=6.66,矩阵(Matrix)=同一性(Identity)。对于蛋白质比对:缺口开放罚分=10.0,缺口延伸罚分=0.2,并且矩阵=Gonnet。对于DNA和蛋白质比对:ENDGAP=-1,GAPDIST=4。本领域的技术人员将意识到,可能有必要改变这些和其他的参数以达到最佳的序列比对。

[0190] 优选地,两个氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的同一性百分比的计算可以从 $(N/T) \times 100$ 这样的比对中计算出,其中N是序列共享相同残基的位置数,并且T是包括缺口和包括或不包括单链突出端的比较位置总数。优选地,计算中包括单链突出端。因此,计算两个序列之间同一性百分比的最优选方法包括:(i)使用ClustalW程序,使用一组合适的参数,例如,如上所述,准备序列比对;和(ii)将N和T的值插入以下公式:序列同一性 $= (N/T) \times 100$ 。

[0191] 确定相似序列的可选方法将是本领域技术人员所熟知的。例如,基本相似的核苷酸序列将由在严格条件下与DNA序列或其互补序列(complements)杂交的序列所编码。我们所说的严格条件是指核苷酸在约45℃下在3倍(3x)氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与滤膜结合(filter-bound)的DNA或RNA杂交,然后在约20-65℃下在0.2xSSC/0.1%SDS中至少洗涤一次。可选地,基本相似的多肽可以与例如SEQ ID No:1-29中包含的氨基酸序列所示的序列相差至少1个,但少于5、10、20、50或100个氨基酸。

[0192] 由于遗传密码的简并性,很明显,本文所述的任何核酸序列可以被改变或变更,而不会实质上影响由此编码的蛋白质的序列,以提供其功能变体。合适的核苷酸变体是那些具有通过替换序列内编码相同氨基酸的不同密码子而改变的序列,从而产生沉默的(silent)变化的核苷酸变体。其他合适的变体是那些具有同源核苷酸序列,但包括全部或部分序列的变体,该序列变体通过不同密码子的取代而改变,这些密码子编码的氨基酸具有与它所取代的氨基酸相似的生物物理特性的侧链,从而产生保守的(conservative)变化。例如,小的非极性疏水氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸和蛋氨酸。大的非极性疏水氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。极性中性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电(碱性)的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。因此,可以理解哪些氨基酸可以用具有类似生物物理特性的氨基酸替代,熟练的技术人员将知道编码这些氨基酸的核苷酸序列。

[0193] 本文描述的所有特征(包括任何所附的权利要求、摘要和附图),和/或如此公开的任何方法或过程的所有步骤,可以以任何组合方式与上述任何方面进行组合,但至少某些此类特征和/或步骤是相互排斥的组合除外。

附图说明

[0194] 为了更好地理解本发明,并示出如何实施本发明的实施方案,现在将以举例的方式参考附图,其中:

[0195] 图1是单链ssAAV-SYN1-hGCH-SYN1-EGFP-WPRE-pA载体(构建体A)的一个实施方案的质粒图谱。

[0196] 图2是自互补的质粒pscAAV-CBh-EGFP-WPRE-SV40pA载体(构建体B)的一个实施方案的质粒图谱。

[0197] 图3是自互补的质粒pscAAV-SYN1-EGFP-WPRE-SV40pA载体(构建体C)的一个实施方案的质粒图谱。

[0198] 图4是单链质粒sspAAV-SYN1-EGFP-T2A-GCH-WPRE-pA载体(构建体D)的一个实施方案的质粒图谱。

[0199] 图5是pAAV[TetOn]TRE-EGFP-rev(SYN1-tTS-T2A-rtTA)载体(构建体E)的一个实施方案的质粒图谱。

[0200] 图6是包含可操作地连接至htTH编码序列的CBh启动子的载体的一个实施方案的质粒图谱。

[0201] 图7是包含可操作地连接至GCH-1编码序列的CBh启动子的载体的一个实施方案的质粒图谱。

[0202] 图8是包含可操作地连接至htTH编码序列的SYN1启动子的载体的一个实施方案的质粒图谱。

[0203] 图9是包含可操作地连接至GCH-1编码序列的SYN1启动子的载体的一个实施方案的质粒图谱。

[0204] 图10A示出了通过蛋白质印迹(Western blot)对一些构建体A、B和C的报告基因EGFP的表达进行的定性分析。印迹示出了为37KDa的正确的EGFP分子量;并且图10B示出了报告基因EGFP的表达的DAB定量比色检测。

[0205] 图11A示出了通过蛋白质印迹对构建体A、B和C的报告基因EGFP的表达进行定性分析的第二组数据。印迹示出了为37KDa的正确的EGFP分子量,并且图11B示出了报告基因EGFP的表达的DAB定量比色检测。结果证实,构建体B示出了EGFP的最高剂量依赖性表达。

[0206] 图12示出了测试构建体转染后48小时的GFP的表达水平。

[0207] 图13示出了GFP细胞的平均数量随时间的推移而变化,在约48小时时出现最大信号。

[0208] 图14示出了用200ng DNA转染的细胞在48小时后的GFP表达。

[0209] 图15示出了用100ng DNA转染的细胞在48小时后的GFP表达。

[0210] 图16示出了用50ng的DNA转染的细胞在48小时后的GFP表达。

[0211] 图17示出了用小鼠抗-TH抗体染色的MPTP损伤的猕猴脑的冠状切片(2倍放大)。

[0212] 图18示出了用小鼠抗-TH抗体染色的MPTP损伤的猕猴脑的冠状切片(10倍放大)。

[0213] 图19示出了用小鼠抗-TH抗体染色的MPTP损伤的猕猴脑的冠状切片(20倍放大)。

[0214] 图20示出了猴子运动分析面板(mMAP;来自Gash等人,1999)。

[0215] 图21示出了猴子分析面板实验的结果,即处理前与处理后mMAP的变化。

具体实施方式

[0216] 实施例

[0217] 背景

[0218] 本发明人着手确定用于在体内表达TH和GCH1的最佳表达盒(和携带该表达盒的载体)。该研究的目的是在体外用五种不同浓度的质粒转染SH-SY5Y(人神经元细胞),并分析报告基因EGFP的表达。在这些构建体中,TH的序列被替换为EGFP,以便能够通过测量GFP的荧光来比较转导效率。

[0219] 实施例1

[0220] 材料和方法

[0221] SH-SY5Y细胞在P13代时从Sigma-Aldrich公司获得,在含有2mM L-谷氨酰胺(L-Glutamine)的10% FBS DMEM:F12中培养,在P15代时储存(banked)。共进行了五次转染实验以优化条件。简而言之,SH-SY5Y细胞直接从冷冻状态下铺板到96孔板中,每孔2万个细胞,培养24小时。去除培养基,在不含血清的基础培养基DMEM:F12中以1:1的TransFast试剂与质粒DNA的比例使用TransFast试剂进行转染。质粒被分配为代码A-E,如下表1所示。转染是根据TransFast试剂的说明进行的,每24孔使用0.5ug、0.75ug和1.0ug的当量。请注意,Even等人的出版物中使用了0.75ug。将总的40ul TransFast质粒混合物加入96孔板的每个孔中,并孵育1小时。转染试剂质粒混合物的计算方法如下表2所示。1小时后,除去TransFast质粒混合物,加入200ul 10% FBS DMEM:F12生长培养基,孵育2天。

[0222] 表1-质粒构建体

代码	质粒 ID	构建体
A	VB200507-30 49fzk	pAAV[Exp]SYN1>hGCH1[NM_000161.3](TAAstop) - SYN1>EGFP
B	VB200507-10 54ety	pscAAV[Exp]CBh>EGFP:WPR E3/SV40
C	VB200507-10 50huy	pscAAV[Exp]SYN1>EGFP:WP RE3/SV40 pA
D	VB200510-113 9ssd	pAAV[Exp]SYN1>EGFP(ns):T2A:rGch1[NM_02435 6.1]:WPRE
E	VB200519-12 35vjq	pAAV[TetOn]TRE>EGFP-rev(SYN1>tTS:T2A:rtTA)

[0223] 构建体A和D是单链AAV质粒。

[0224] 构建体B和C是自互补的AAV质粒。

[0225] 参照图1-9,示出了本文所述的构建体的不同实施方案的质粒图谱。图6(SEQ ID No:17)说明了编码人截短的TH的第一表达载体的一个优选实施方案的质粒图谱,图7(SEQ ID No:18)示出了编码人GCH-1的第二表达载体的图谱。

[0226] 表2--转染的计算

转染的计算	A	A1	A2	A3	B	B1	B2	B3	C	C1	C2	C3
四个条件/24孔	0	0.5	0.75	1	0	0.5	0.75	1	0	0.5	0.75	1
总DNA	0	0.875	1.312	1.75	0	0.875	1.312	1.75	0	0.875	1.313	1.75
DNA浓度 ug/ul	0	2.677	2.677	2.677	0	0.196	0.196	0.196	0	0.342	0.342	0.342
1-1 DNA ul	0.0	0.3	0.5	0.7	0.0	4.5	6.7	8.9	0.0	2.6	3.8	5.1
TransFast	0.0	2.6	3.9	5.3	0.0	2.6	3.9	5.3	0.0	2.6	3.9	5.3
培养基	0.0	347.0	345.6	344.1	0.0	342.9	339.4	335.8	350.0	344.8	342.2	339.6
1-1 总计	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0
	D	D1	D2	D3	E	E1	E2	E3				
条件/24孔	0	0.5	0.75	1	0	0.5	0.75	1				
总DNA	0	0.875	1.3125	1.75	0	0.875	1.3125	1.75				
DNA浓度 ug/ul	0	0.502	0.502	0.502	0	0.444	0.444	0.444				
2-1 DNA ul	0.0	1.7	2.6	3.5	0.0	2.0	3.0	3.9				
TransFast	0.0	2.6	3.9	5.3	0.0	2.6	3.9	5.3				
培养基	350.0	345.6	343.4	341.3	350.0	345.4	343.1	340.8				
1-1 总计	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0	350.0				

[0227] 每种条件下共转染8孔。孵育两天后,用1×200ul温热的PBS轻轻地洗涤细胞。每种条件下的两个孔(每个96孔板的顶部两行)用含有4%蔗糖的在PBS中的4%多聚甲醛固定15分钟。然后用1×200ul PBS洗涤孔,并保存在100ul PBS中。荧光板分析(Fluorescent plate analysis)是通过使用Tecan读板器扫描96孔板的顶部两行,使用485nm的激发滤光片和535nm的发射滤光片进行的。数据是通过从转染孔中减去非转染孔的信号而显示的(n=2)。

[0228] 所有其他孔用1x SDS PAGE样品缓冲液(NuPage,Invitrogen公司)裂解,每孔加入30ul,吹打以裂解基因组DNA。将每种条件下的六个孔合并在一个试管里,煮沸5分钟,然后将50ul细胞裂解液加载至4-12%的NuPage Bis-Tris凝胶上,在MES运行缓冲液中通过电泳分离。在Novex Mini印迹模块中,使用Bolt转移缓冲液和10%的甲醇在硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane)上对凝胶进行蛋白质印迹(Western blotting)。使用预染色的分子量标记物来确认转移(EZ-Run预染色的标记物Fisher)。简而言之,将膜干燥过夜,并用在含有0.05%吐温20的PBS(PBST)中的5%脱脂干奶粉(non-fat dried milk)进行封闭。用在PBST中的1:250的稀释度的兔抗egfp多克隆抗体(Invitrogen公司CAB4211)对处理(probed)膜1小时,然后用PBST洗涤3x5分钟。将膜在稀释度为1:2500的二抗兔IgG HRP(Invitrogen公司,目录号#31460)中孵育1小时,然后用PBST洗3x5分钟。然后使用Thermo Fisher公司,目录号#34002的比色DAB底物试剂盒对蛋白质印迹进行15分钟的显影。

[0229] 结果

[0230] 第一组数据

[0231] 如图10A所示,蛋白质印迹显示了37KDa为EGFP的正确表观分子量)的条带。在质粒构建体B中从0.5ug到1.0ug,条带都是清晰可见的。注意条件E1没有在凝胶上运行,因为每个凝胶只有10个孔。A、B和C是对照的非转染细胞。GFP的表达水平也是用荧光板阅读器测定的(图10B)。

[0232] 第二组数据

[0233] 第二组数据证实了第一组数据的发现,如图11A和图11B所示。即B构建体(质粒ID: VB200507-1054ety构建体:pscAAV[Exp]CBh>EGFP:WPR E3/SV40)示出了EGFP的最高的剂量依赖性表达,构建体C(pscAAV[Exp]SYN1>EGFP:WP RE3/SV40 pA)示出EGFP的表达要低得多

但可检测到。注意在这个实验中,整个板都被扫描了($n=8$),而在第一个实验中只扫描了顶部两行($n=2$)。在构建体A中可以检测到表达,但在用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 多西环素(doxycycline)孵育的构建体E中没有发现表达。

[0234] 蛋白质印迹分析中加载了比第一次更多的量的样品以增强信号。此外,TMB被用来使印迹显影,因为它的成像效果更好。在蛋白质印迹中,如图11A所示,在构建体B和构建体C中强烈检测到表达。然而,在用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 多西环素孵育的构建体E中,检测到的表达仅高于背景。可能需要更高浓度的多西环素,但这需要做毒性实验,因为在许多细胞系中多西环素 $>2\mu\text{g}/\text{ml}$ 是有毒的。在更高的加载量和TMB检测下,构建体A中EGFP的表达可见但仅高于背景。在构建体D中没有检测到EGFP的表达(Con为对照,MW为分子量标记物(Molecular Weight Marker))。

[0235] 总结

[0236] 该研究的目的是用5种不同质粒以三种不同浓度体外转染SH-SY5Y(人神经元细胞),并分析报告基因EGFP的表达,以确定用于体内研究和治疗的最佳表达盒。SH-SY5Y在第15代(P15)时在96孔板中用TransFast试剂以 $0.5\mu\text{g}$ 、 $0.75\mu\text{g}$ 和 $1\mu\text{g}$ (相当于24孔)进行转染,通过蛋白质印迹进行定性分析并通过荧光板阅读器进行定量分析。

[0237] 结果显示,在测试的所有五种质粒中自互补的质粒ID:VB200507-1054ety构建体:pscAAV[Exp]CBh>EGFP:WPR E3/SV40(构建体B)具有最高的EGFP的表达。此外,通过蛋白质印迹和荧光板阅读器两者,可以看出EGFP的表达从 $0.5\mu\text{g}$ 到 $1\mu\text{g}$ 是剂量依赖性地增加的。观察到只有另外一个质粒,即,自互补的pscAAV[Exp]SYN1>EGFP:WP RE3/SV40 pA,EGFP的表达水平较低。

[0238] 实施例2-初步研究(Pilot Study)-针对MPTP损伤的猕猴的酪氨酸羟化酶的表达评估AAV-TH/GCH1的能力

[0239] 研究概要

[0240] 该研究是一项非GLP研究,旨在评估AAV-TH/GCH1在壳核中3个部位给药后增加壳核中TH表达的能力。

[0241] MPTP是1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶,并可诱发帕金森氏病综合征。

[0242] 在研究的第1天(D-7),一只先前被MPTP系统性损伤,并表现出可通过L-DOPA逆转的明显的运动障碍的雌性食蟹猴(cynomolgus macaque)接受了T1加权MRI,目的是对解剖结构进行成像,从而得出手术靶点。

[0243] 在D0,该动物接受了立体定位手术,以在右侧壳核的3个部位注射AAV-TH/GCH1。左侧壳核则接受载体(vehicle)。

[0244] 在D28,用戊巴比妥(pentobarbital)对动物进行深度镇静,并肝素化生理盐水(heparinised saline)将其放血杀死。

[0245] 将脑迅速取出后,进行石蜡包埋,然后将其腹侧朝上放入不锈钢脑切片模具(brain matrix)中。大脑以4毫米的间隔被分割(blocked),以获得整个纹状体的切片(slabs)。对每个脑切片的载玻片(Slides)进行TH-IHC处理,并在40倍的载玻片扫描仪上成像。

[0246] 所有活体部分都是在位于中国江苏省苏州市吴中大道1336号的Atuka公司的非人灵长类研究机构(non-human primate facility)进行的。

[0247] 方法和材料

[0248] 构建体

[0249] 本发明的构建体,即scAAV-TH/CGH1,保存在-80℃下。

[0250] 载体(Vehicle)

[0251] 用于配制AAV-TH/CGH1的载体为含有5%山梨醇的PBS。

[0252] 动物饲养

[0253] 该研究是在IACUC的批准下进行的。猕猴从苏州西山中科实验动物公司(中国江苏省西山岛)获得。动物被分组饲养,每个笼子有2-3只动物。笼子的尺寸超过了UK、EU、NIH和CCAC的最小推荐尺寸,为152(宽)×136(长)×192(高)厘米。饲养室实行12小时的光-暗循环(早上7点开灯),温度为20-26℃,房间里只有相同性别的动物。新鲜的水果、灵长类动物颗粒(pellets)和水可以随意获得。

[0254] 动物由技术人员处理,并定期从家庭笼子(home caging)转移到观察笼子(observation caging)。动物的ID是通过单独刻制的金属项圈标签和皮下植入的编码有动物ID的应答器(Plexx,型号IPTT-300)来识别。在整个研究期间,每周对动物进行称重。

[0255] 病毒载体的外科输送

[0256] MRI

[0257] 为了计算每只动物和每个目标的手术坐标,进行了T1加权3T MRI。用Zoletil (4-6mg/kg,肌肉注射)/阿托品(0.04mg/kg,肌肉注射)对动物进行麻醉。充分镇静后,将动物固定(mount)在手术架上,并记录坐标,以便将动物以相同取向放回手术架。一旦在手术架中,动物被放置在MRI扫描仪中,在整个脑中获得0.3毫米厚的水平切片。图像被储存在外部硬盘上,并提交给Osirix成像软件用于进行查看和推导手术靶点。这个过程的一部分包括对脑进行定性检查,以记录任何异常的神经解剖学表现(如肿瘤、异常不对称)。

[0258] 手术(D0)

[0259] AAV载体的立体定位注射(Stereotaxic injection)是在无菌条件下,在异氟烷(isoflurane)麻醉下进行的。所有的颅内注射都是在立体定位的头固定架(head holder)上进行的。所有手术的精确立体定位坐标是在手术前根据每只动物的MRI扫描结果计算出来的。在无菌准备之后,在目标区域的头皮上做切口,并将皮肤、肌肉和筋膜(fascia)收回以暴露出颅骨表面。在目标区域上制作单个大的双边钻孔。然后在所需注射部位上方的硬脑膜上做一个小切口,将Hamilton注射器(26G)的尖端降至所需部位进行显微注射。将含有AAV的注射液以1.0μL/分钟的速度和15μL的体积注入壳核每个半球的3个部位(AC+1、AC-2和AC-5mm)。在每个部位,在2个不同的深度制作2个储药层(deposits)。每次注射后,针头在原位再保持5分钟,然后缓慢抽出,移到下一个部位。注射后,用明胶海绵(Gelfoam)覆盖暴露的硬脑膜,用6-0单丝缝合线间断缝合切口。动物在手术前接受抗生素治疗(氨苄西林(ampicillin),160mg/kg,肌肉注射),此后每天2次,持续3天。

[0260] 术后,为了控制疼痛,动物接受美洛昔康(meloxicam)5天(1次/天,0.1mg/kg,口服)。在术后期间对动物进行了仔细的监测(详见下文)。

[0261] 治疗

[0262] 该实验包含1只动物。详细情况见下表,

治疗组	外科手术, 右壳核 (第0天)	外科手术, 左壳核 (第0天)	尸检
1	AAV-TH/GCH1	载体	第 28 天

[0263] 脑组织制备

[0264] 在D28, 将动物从家笼中取出, 在尸检前30分钟施以NSD1015(剂量和途径待定)。然后用过量剂量的戊巴比妥钠(50mg/kg, 静脉注射)对动物进行深度镇静。

[0265] 迅速打开胸腔, 将14G导管插入升主动脉, 将降主动脉夹在心脏后面, 并在右心房做一个切口, 以允许回流的静脉血流出。使用灌注泵(perfusion pump)以100ml/分钟的速度灌注约200ml冰冷的肝素化的0.9%生理盐水(10000IU/L)。然后取出大脑, 将其腹侧朝上, 放入预先冷却的冰冷的脑切片模具中。横跨整个纹状体制作厚度为4mm的脑切片, 并从其中一个脑切片上分别取下两个半球的壳核的样本(punches), 储存在-80℃下。然后将组织切片在10%福尔马林中浸泡48小时, 再进行石蜡包埋。然后将组织切片到玻璃片上进行免疫组化(immunohistochemistry)。

[0266] 尸检措施(Postmortem measures)

[0267] 酪氨酸羟化酶组织学

[0268] 将来自两个半球的5um厚的石蜡包埋切片固定在载玻片上, 如下对载玻片进行脱蜡和复水: 在100%二甲苯中两次(每次5分钟), 在100%乙醇中两次(每次3分钟), 在95%乙醇中一次(1分钟), 在70%乙醇中一次(1分钟), 在双蒸水(double distilled water)中两次(每次3分钟)。通过将载玻片在柠檬酸盐缓冲液中孵育20分钟, 然后在室温下冷却约20分钟来进行热诱导抗原修复(Heat induced antigen retrieval)。在PBS中洗涤三次后, 用0.6%的过氧化氢溶液淬灭内源性过氧化物酶, 用10%正常山羊血清/2%牛血清白蛋白的0.1%Triton PBS溶液抑制背景染色。然后将组织与一抗(小鼠抗TH抗体(1:50, ThermoFisher公司, 185号))孵育过夜。在PBS中洗涤三次后, 将切片依次用生物素化的山羊抗-小鼠IgG(1:500, 杰克逊免疫研究实验室(Jackson Immuno Research Laboratories), 西格鲁甫, 宾夕法尼亚州, 目录号111-065-144)在室温下孵育1小时。在PBS中洗涤3次后, 将切片与Elite亲和素-生物素复合物(ABC试剂盒, Vector实验室, 伯林格姆, 加利福尼亚州, 目录号PK-6101)孵育30分钟。用3,3'-二氨基联苯胺(DAB试剂盒, Vector实验室, 伯林格姆, 加利福尼亚州, 目录号SK-4100)反应15分钟后, 免疫染色被可视化。使切片干燥, 通过分级醇(70%、95%、100%)脱水, 在二甲苯中透明化, 用DEPEX封片剂(电子显微镜科学公司(Electron Microscopy Sciences), 哈特菲尔德, 宾夕法尼亚州, 目录号13514)覆盖。每张载玻片在40倍放大率下进行数字扫描(Aperio XT, 徕卡公司), 并将提供图像。

[0269] 结果

[0270] 参考图17-19, 显示了用小鼠抗-TH抗体(1:50, 赛默飞世尔公司, 185号)染色的MPTP损伤的猕猴脑的冠状切片。表达TH的纤维和细胞体被染成棕色。在联合注射scAAV-htTH和scAAV-GCH1的区域TH的表达得到了证实。

[0271] 讨论

[0272] 进行本研究是因为之前其他人通过双顺反子载体转导在MPTP猕猴PD模型中转导出足够的TH表达进而通过免疫组化检测到的尝试失败了,即,Cederfjäll, E. 等人. Continuous DOPA synthesis from a single AAV: dosing and efficacy in models of Parkinson's disease. Sci Rep-uk 3, (2013), 其中作者指出:“目前仍不清楚组织学上缺乏转基因TH表达和微透析(microdialysis)上缺乏DOPA和多巴胺产生的原因。然而,这个问题需要在启动利用这种方法的临床试验之前得到解决”。

[0273] 相比之下,本文描述的研究表明,所要求保护的发明使TH在MPTP损伤的猕猴壳核中充分表达,可以用等效的免疫组化检测法轻松检测。

[0274] 实施例3-评估scAAV5-htTH和scAAV5-GCH1的1:1组合对MPTP损伤的猕猴行为的影响

[0275] 目的

[0276] 本研究的目的是评估scAAV-TH和scAAV-GCH1按1:1的比例混合后单侧给药至壳核改善已患有因接触MPTP导致的运动障碍的动物在伸手任务中的对侧运动表现的能力。

[0277] 动物福利(Animal Welfare)

[0278] 本研究根据CCAC指南和IACUC批准的动物使用方案(IACUC-approved Animal Use Protocols, AUPs)进行。

[0279] 研究概要

[0280] 本研究选择的动物之前已经通过MPTP的系统性给药发生了病变,并且显示出对L-DOPA治疗敏感的稳定的双侧运动障碍。研究的行为任务包括伸手任务(猴子运动评估面板(monkey movement assessment panel), mMAP)和独立的一般自发活动的观察笼测量(在2小时内通过被动红外线活动监测器评估,并在24小时内使用Actical评估)。

[0281] 行为评估(mMAP和活动)在手术前每周进行两次,为期3周(共6次观察),手术后每两周进行一次一周两次的行为评估,为期3个月(共12次观察)。

[0282] 在研究的第20天,所有的动物都将接受T1加权MRI,以便对解剖结构进行成像,从而得出手术的靶点。

[0283] 在第1天,动物将接受立体定位手术,将AAV-TH和AAV-GCH1的1:1比例的混合物,在右壳核内的3个部位进行注射。

[0284] 方法和材料

[0285] 将scAAV-TH和scAAV-GCH1保存在-80℃下,使其达到室温,在共同输注前在PBS中加入5%的山梨醇。

[0286] 猕猴从苏州西山中科实验动物公司(中国江苏省西山岛)获得。动物已经适应了实验环境。每天一次皮下注射0.2mg/kg MPTP,持续8-12天,直到首次出现帕金森病症状,使动物出现帕金森病。在此之后,帕金森综合征在约30天后达到中度到明显的水平,并稳定下来。对一些动物给予额外的MPTP施用,以滴定(titrate)到整个组中的个体出现类似程度的帕金森症。使猕猴恢复至少30天,直到它们的帕金森症被证明是稳定的。

[0287] 在开始施用MPTP的60天后,每天两次口服施用L-DOPA (25mg/kg),持续至少两个月。L-DOPA与脱羧酶抑制剂苄丝肼(Benserazide) (如MadoparTM)一起给药。这种治疗会导致运动波动的发展,包括运动障碍。一旦被选入当前的研究,动物就不再接受定期的L-DOPA给

药。

[0288] 为了计算每只动物和每个靶标的手术坐标,进行了T1加权的3T MRI。用Zoletil (4-6mg/kg,肌肉注射)/阿托品 (0.04mg/kg,肌肉注射)对动物进行麻醉。充分镇静后,将动物固定在手术架上,并记录坐标,以便将动物以相同取向放回手术架。一旦进入手术架,动物就被放入MRI扫描仪中,将获得整个大脑的0.3mm厚的水平切片。图像被储存在外部硬盘上,并提交给Osirix成像软件进行查看和推导手术目标。

[0289] AAV载体的立体定位注射是在无菌条件下,在异氟烷麻醉下进行的。含有两种AAV载体混合物的注射将由输液泵以2.0uL/分钟的速度进行 (Pump 11Elite Nanomite Programmable Syringe Pump,哈佛仪器)。针头是基于WIP0专利号W02006/042090A1 (Kankiewicz和Sommer)中描述的结构。两个堆叠的储药层 (deposits),每个15uL的AAV混合物,将沿着三个轨道等距排列。这三条轨道将被定位在小脑前、小脑和小脑后。因此,总共90 uL的AAV混合物将被放置在每只动物的右壳核。针尖定位在近端储药层的目标部位 (等待时间为1分钟),然后插管推进并在远端储药层处进行输液 (等待时间为5分钟)。

[0290] 动物在手术前接受抗生素治疗 (氨苄西林,160mg/kg,肌肉注射),此后3天内每天2次。术后,为了控制疼痛,动物将接受美洛昔康5天 (1/天,0.1mg/kg,口服)。

[0291]	外科手术右壳核	行为 左右臂mMAP和活动计数	动 物 的 数 量
	1:1 scAAV-TH: scAAV-GCH1 混合物	mMAP到达次数,手术前第3、2、1周每周两次,手术后每2周两次,持续3个月 (所有测试不施用L-DOPA/苄丝肼)	4

[0292] 行为

[0293] 本研究的主要终点是在动物的家笼里用伸手任务评估左右上肢的精细运动功能。在开始研究之前,训练动物使用左右手从猴子运动分析面板中取回正强化物 (positive reinforcer) (糖果),如图20所示 (mMAP基本上等同于Gash DM等人在J Neurosci Methods.1999;89:111-7.KoW Ltd,Mississauga,ON,Canada)中所描述的mMAP。

[0294] 当实验者将糖果 (Lifesaver)放在位于动物家笼外且在动物可触及的范围内的mMAP中时,试验开始。动物取回糖果 (“取回时间 (Retrieval Time)”)并将其手臂放回主笼内所需的时间 (最大截止时间为45秒),由不知晓所给治疗的观察者通过分析视频记录进行事后 (post-hoc)评估、评估了动物在三个难度递增的级别上的表现能力,其中Lifesaver糖果 (Lifesaver treat)要么放在mMAP容器 (receptacle)的底板上 (B级),要么放在该容器内的一个直销 (straight pin)上 (C级),或者最具挑战性的是放在该容器内的一个弯钩 (curved hook)上 (D级)。对MAP测试进行录像的方式是,所产生的数字视频文件将允许对治

疗分配或手术方面盲的第三方评审员独立重复测量检索时间。

[0295] 结果

[0296] 参考图21,示出了治疗前与治疗后mMAP中的变化。可以看出,与同侧手臂相比,治疗导致对侧手臂的到达时间(占基线到达时间的百分比)明显减少($p=0.018$)。对侧手臂到达时间的减少与病变半球内L-DOPA的产生增加是一致的。(观察到的同侧手臂到达时间的增加是无法解释的,可能是由于偶然的原因,或可能反映了已知在未经治疗的MPTP损伤的动物中发生的多巴胺D2受体增加的一些逆转情况。即使假定同侧手臂没有变化,到达时间的百分比减少也接近显著性($P=0.052$)。

[0297] 总体结论

[0298] 众所周知,帕金森病的症状是由于大脑纹状体中缺乏多巴胺的产生而出现。产生多巴胺需要三种酶,即酪氨酸羟化酶[TH]、GTP环化水解酶1[GCH]和氨基酸脱羧酶[AADC]。多种尝试,包括临床前和临床研究在内,都试图通过使用基因疗法,通过引入一种、两种或三种基因产生这些酶来恢复纹状体中多巴胺的生产,从而对帕金森病进行症状缓解。然而,到目前为止,这些尝试都没有形成一个最佳的解决方案。

[0299] 本文描述的发明体现了共同给药,优选是将编码转导酪氨酸羟化酶和GTP环化水解酶1的两个自互补的AAV病毒载体在脑实质内(intraparenchymal)注射到纹状体中。与唯一发表的仅将TH和GCH1(不含AADC)转导进入PD的MPTP NHP模型的壳核的研究相比,本发明使得可通过免疫组化检测到TH的表达。尽管以前发表过许多研究,其中将一种或两种基因注射到动物模型或病人的纹状体中以减少帕金森病的运动症状,但本文所述的组合物以前从未被描述过。重要的是,两个单顺反子自互补的AAV载体的新型共同给药还没有被视为一种明显的策略。本发明所产生的增强的疗效和降低的商品成本是令人惊讶的,而且在临床上很重要。

[0300] 发明人在已发表的文献或任何其他可公开获得的资料中没有发现关于两个自互补的AAV载体共同给药作为帕金森病治疗方法的参考。

[0301] 本发明的疗效和经济优势是有利的和令人惊讶的,原因如下:

[0302] (i) 以前发表的两种方法是将TH和GCH与AADC共同给药,结果改善了帕金森病动物模型的运动症状。虽然这两种方法都结合了TH和GCH的共同给药,但都没有证明在没有与AADC共同给药的情况下使用TH和GCH是有效的。这一点很重要,因为在非人灵长类动物和人类中的单独研究已经强调了AADC的缺失在临床帕金森病演变中的重要性,并证明了在向纹状体内脑实质内(intraparenchymal)单独注射AADC后,帕金森病的症状得到明显改善。根据发表的文章,所有三个基因都是作为三个单顺反子AAV载体或作为单个三顺反子慢病毒(single tricistronic lenti)载体共同给药的,因此不可能预测在没有AADC的情况下施用TH和GCH的疗效。

[0303] (ii) 一系列的临床前研究表明,直接向6-羟基多巴胺病变的大鼠的纹状体施用时,携带TH和GCH转基因的单链单顺反子AAV载体的共同给药改善运动表现。然而,这种方法没有在更大的动物或人身上进一步研究,研究人员的理由是:它“有一些局限性,因为转导的能效和转基因的表达很难通过体外试验预测,临床生产会变得非常麻烦”。其次,尽管在全球范围内,两种基因的表达模式可能看起来相似,但单个细胞中两种载体的拷贝数可能会有很大的不同,从而导致DOPA合成的等级不同。此外,许多细胞不接受或只接受一种基

因,因此显示出有限的DOPA合成(如果有的话),这种影响可能会加剧。此外,携带相同血清型的不同载体的共同给药被推测为存在载体之间对靶细胞上的相同结合位点的竞争的风险。最后,重要的是,人们还推断,需要两个单独的AAV载体的疗法的商品成本将大大高于需要单个双顺反子载体的疗法。由于这些原因,研究人员转而开发一种同时传递TH和GCH的双顺反子载体。

[0304] (iii)随后的一系列研究表明,施用在双顺反子单链的[即非自互补的]AAV载体中的TH和GCH,改善了大鼠的帕金森病运动症状。尽管这种方法在帕金森病的六羟基多巴胺大鼠模型中产生了运动症状的完全逆转,但当扩大到非人灵长类动物模型时,它只产生了轻微的改善。这与TH在接受治疗的非人灵长类动物纹状体中(通过免疫组化法评估)几乎无法辨别的低表达相一致。由于这些发现是在双顺反子载体的最高可行剂量下观察到的,该产品的开发被终止,没有进入临床试验。事实上,在随后发表的一篇文章中,作者指出:“目前仍不清楚组织学上缺乏转基因TH表达和微透析(microdialysis)上缺乏DOPA和多巴胺产生的原因。然而,这个问题需要在启动利用这种方法的临床试验之前得到解决”。由于这些发现,没有进一步的研究表明只有TH和GCH的双重使用已经被发表,并且这种方法似乎已经被放弃了,因为没有足够的功效。

[0305] (iv)两种自互补的AAV载体共同给药用于该适应症是新颖的,其结果是明显地增强了酪氨酸羟化酶的转导,其程度是无法预测的。两种自互补的单顺反子载体共同给药后,在MPTP损伤的非人灵长类动物中已经证实疗效的明确证据。

[0306] (v)本发明使用了从未被应用于旨在治疗帕金森病的载体的CBh启动子。CBh启动子与以前用于治疗帕金森病的载体中的启动子相比,具有以下优点,即(1)它的长度很短,使得可以在自互补的AAV构建体中容纳启动子转基因组合。(2)它比以前的单顺反子构建体中广泛使用的CMV启动子更不容易被沉默。(3)它缺乏神经元的特异性,使得可以转导星形胶质细胞和神经胶质,增加这些细胞在纹状体内另外产生DOPA的可能性。(4)CBh启动子包含截短的鸡 β -肌动蛋白内含子和小鼠微小病毒(MVM)内含子二者,它们一起作为间隔物,从而增加基因的表达。

[0307] (vi)重要的是,使用本发明在非人灵长类动物中观察到的疗效的增加使得两个单独的自互补的载体的剂量比先前研究的双顺反子因子的[中等(moderately)]有效剂量低50%以上。这一令人惊讶的发现对所得治疗产品的商品成本具有重大的潜在有利影响。

序列表

<110> 马阿夫克斯有限公司 (MaavRx Ltd)

<120> 表达载体组合物

<130> KHP232110939.0

<150> 2019286.0

<151> 2020-12-08

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1494

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

atgcccaccc cgcagccac cacgccacag gccaaagggt tccgcagggc cgtgtctgag	60
ctggagccca agcaggcaga ggccatcatg tccccgcggt tcattgggcg caggcagagc	120
ctcatcgagg acgcccgcaa ggagcgggag gcggcggtgg cagcagcggc cgctgcagtc	180
ccctcggagc ccggggaccc cctggaggct gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc	240
gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg	300
aagggtgtttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agaccgggcc cgcccagagg	360
ccgcgagctg ggggccccca cctggagtac ttcgtgcgcc tcgaggtgcg ccgaggggac	420
ctggccgccc tgctcagtgg tgtgcgccag gtgtcagagg acgtgcgcag ccccgcgggg	480
cccaaggtcc cctggttccc aagaaaagtg tcagagctgg acaagtgtca tcacctggtc	540
accaagttcg accctgacct ggacttggac caccggggt tctcggacca ggtgtaccgc	600
cagcgcagga agctgattgc tgagatcgcc ttccagtaca ggcacggcga cccgattccc	660
cgtgtggagt acaccgccga ggagattgcc acctggaagg aggtctacac cacgtgaag	720
ggcctctacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cctttgcttt gctggagcgc	780
ttcagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccg ctctctgaag	840
gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccg ggacttcctg	900
gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtccctgccc	960
atgcactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc	1020
gaccgcacct tcgcgcagtt ctcgcaggac attggcctgg cgtccctggg ggcctcgga	1080
gaggaaattg agaagctgtc cacgctgtac tggttcacgg tggagttcgg gctgtgtaag	1140
cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggtgctgt cctcctacgg ggagctcctg	1200
cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag	1260
ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt ctgagagctt cagtacgcc	1320
aaggacaagc tcaggagcta tgcctcacgc atccagcgcc ccttctccgt gaagttcgac	1380
ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agccccagg ccgtgcggcg ctccctggag	1440
ggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg ctag	1494

<210> 2
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Ser Pro
 20 25 30
 Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
 35 40 45
 Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro
 50 55 60
 Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala
 65 70 75 80
 Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu
 85 90 95
 Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His
 100 105 110
 Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu
 115 120 125
 Glu Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu
 130 135 140
 Leu Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys
 165 170 175
 His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro
 180 185 190
 Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu
 195 200 205
 Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr
 210 215 220
 Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys
 225 230 235 240
 Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala
 245 250 255
 Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu
 260 265 270

Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg
 275 280 285
 Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala
 290 295 300
 Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro
 305 310 315 320
 Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val
 325 330 335
 Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly
 340 345 350
 Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr
 355 360 365
 Leu Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu
 370 375 380
 Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu
 385 390 395 400
 His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala
 405 410 415
 Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe
 420 425 430
 Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala
 435 440 445
 Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu
 450 455 460
 Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu
 465 470 475 480
 Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile
 485 490 495

Gly

<210> 3

<211> 1029

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

atgagccccg cggggcccaa ggtcccctgg ttcccaagaa aagtgtcaga gctggacaag	60
tgatcatcacc tggtcaccaa gttcgaccct gacctggact tggaccaccc gggcttctcg	120
gaccaggtgt accgccagcg caggaagctg attgctgaga tcgccttcca gtacaggcac	180
ggcgaccCGa ttccccgtgt ggagtacacc gccgaggaga ttgccacctg gaaggaggtc	240
tacaccacgc tgaagggcct ctacgccacg cagcctgcg gggagcacct ggaggccttt	300

```

gctttgctgg agcgcttcag cggctaccgg gaagacaata tccccagct ggaggacgtc 360
tcccgcttcc tgaaggagcg cacgggcttc cagctgcggc ctgtggccgg cctgctgtcc 420
gcccgggact tcctggccag cctggccttc cgcgtgttcc agtgcacca gtatatccgc 480
cacgcgtcct cgcccatgca ctcccctgag ccggactgct gccacgagct gctggggcac 540
gtgcccattgc tggccgaccg caccttcgcg cagttctcgc aggacattgg cctggcgtcc 600
ctgggggcct cgcatgagga aattgagaag ctgtccacgc tgtactgggt cacggtggag 660
ttcgggctgt gtaagcagaa cggggaggtg aaggcctatg gtgccgggct gctgtcctcc 720
tacggggagc tcctgcactg cctgtctgag gagcctgaga ttcgggcctt cgaccctgag 780
gctgcggccg tgcagcccta ccaagaccag acgtaccagt cagtctactt cgtgtctgag 840
agcttcagtg acgccaagga caagctcagg agctatgcct cacgcatcca gcgcccttc 900
tccgtgaagt tcgaccgta cacgctggcc atcgacgtgc tggacagccc ccaggccgtg 960
cggcgctccc tggagggtgt ccaggatgag ctggacacce ttgcccattgc gctgagtgcc 1020
attggctag 1029

```

<210> 4

<211> 342

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

```

Met Ser Pro Ala Gly Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser
1          5          10          15
Glu Leu Asp Lys Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu
          20          25          30
Asp Leu Asp His Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg
          35          40          45
Lys Leu Ile Ala Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile
          50          55          60
Pro Arg Val Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val
65          70          75          80
Tyr Thr Thr Leu Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His
          85          90          95
Leu Glu Ala Phe Ala Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp
          100          105          110
Asn Ile Pro Gln Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr
          115          120          125
Gly Phe Gln Leu Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe
          130          135          140
Leu Ala Ser Leu Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg
145          150          155          160
His Ala Ser Ser Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu

```

165							170							175			
Leu	Leu	Gly	His	Val	Pro	Met	Leu	Ala	Asp	Arg	Thr	Phe	Ala	Gln	Phe		
180							185							190			
Ser	Gln	Asp	Ile	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile		
195							200							205			
Glu	Lys	Leu	Ser	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Thr	Val	Glu	Phe	Gly	Leu	Cys		
210							215							220			
Lys	Gln	Asn	Gly	Glu	Val	Lys	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser		
225							230							240			
Tyr	Gly	Glu	Leu	Leu	His	Cys	Leu	Ser	Glu	Glu	Pro	Glu	Ile	Arg	Ala		
245							250							255			
Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	Val	Gln	Pro	Tyr	Gln	Asp	Gln	Thr	Tyr		
260							265							270			
Gln	Ser	Val	Tyr	Phe	Val	Ser	Glu	Ser	Phe	Ser	Asp	Ala	Lys	Asp	Lys		
275							280							285			
Leu	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ser	Arg	Ile	Gln	Arg	Pro	Phe	Ser	Val	Lys	Phe		
290							295							300			
Asp	Pro	Tyr	Thr	Leu	Ala	Ile	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Pro	Gln	Ala	Val		
305							310							320			
Arg	Arg	Ser	Leu	Glu	Gly	Val	Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	His		
325							330							335			
Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Gly												
340																	

<210> 5

<211> 792

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 5

ggtggttttc ctttgaaaaa cacgatgata atatggccac aaccgcggcc gtagatcccc	60
ggaccatgga gaagccgcgg ggagtcaggt gcaccaatgg gttctccgag cgggagctgc	120
cgcgggcccgg ggccagcccg cctgccgaga agtcccggcc gcccgaggcc aagggcgcac	180
agccggcccga cgcttggaag gcagggcggc accgcagcga ggaggaaaac caggtgaacc	240
tccccaaact ggcggtgct tactcgtcca ttctgtcttc gctgggcgag gacccccagc	300
ggcaggggct gctcaagacg ccctggaggg cggccaccgc catgcagtac ttcaccaagg	360
gataccagga gaccatctca gatgtcctga atgatgctat atttgatgaa gatcatgacg	420
agatggatgat tgtgaaggac atagatatgt tctccatgtg tgagcatcac cttgttccat	480
ttgtaggaag ggtccatatt ggctatcttc ctaacaagca agtccttggt ctcagtaaac	540
ttgccaggat ttagaaaatc tacagtagac gactacaagt tcaagagcgc ctcaccaaac	600
agattgcggt ggccatcaca gaagccttgc agcctgctgg cgttggagta gtgattgaag	660

cgacacacat gtgcatggta atgcgaggcg tgcagaaaat gaacagcaag actgtcacta 720
gcaccatgct gggcgtgttc cgggaagacc ccaagactcg ggaggagtgc ctcacactaa 780
tcaggagctg ag 792

<210> 6

<211> 753

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

atggagaagg gccctgtgcg ggcaccggcg gagaagccgc ggggcgccag gtgcagcaat 60
gggttccccg agcgggatcc gccgcggccc gggcccagca ggccggcgga gaagcccccg 120
cggcccagg ccaagagcgc gcagcccgcg gacggctgga agggcgagcg gccccgcagc 180
gaggaggata acgagctgaa cctccctaac ctggcagccg cctactcgtc catcctgagc 240
tcgctgggcg agaacccccca gcggcaaggg ctgctcaaga cgccctggag ggcggcctcg 300
gccatgcagt tcttcaccaa gggctaccag gagaccatct cagatgtcct aaacgatgct 360
atatattgatg aagatcatga tgagatggtg attgtgaagg acatagacat gttttccatg 420
tgtgagcatc acttggttcc atttggttga aaggtccata ttggttatct tcctaacaag 480
caagtccttg gcctcagcaa acttgcgagg attgtagaaa tctatagtag aagactacaa 540
gttcaggagc gccttacaaa acaaattgct gtagcaatca cggaagcctt gcggcctgct 600
ggagtcgggg tagtggttga agcaacacac atgtgtatgg taatgcgagg tgtacagaaa 660
atgaacagca aaactgtgac cagcacaatg ttgggtgtgt tccgggagga tccaaagact 720
cgggaagagt tcctgactct cattaggagc tga 753

<210> 7

<211> 250

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Met Glu Lys Gly Pro Val Arg Ala Pro Ala Glu Lys Pro Arg Gly Ala
1 5 10 15
Arg Cys Ser Asn Gly Phe Pro Glu Arg Asp Pro Pro Arg Pro Gly Pro
20 25 30
Ser Arg Pro Ala Glu Lys Pro Pro Arg Pro Glu Ala Lys Ser Ala Gln
35 40 45
Pro Ala Asp Gly Trp Lys Gly Glu Arg Pro Arg Ser Glu Glu Asp Asn
50 55 60
Glu Leu Asn Leu Pro Asn Leu Ala Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp
85 90 95
Arg Ala Ala Ser Ala Met Gln Phe Phe Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr

100	105	110
Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile Phe Asp Glu Asp His Asp Glu		
115	120	125
Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met Phe Ser Met Cys Glu His His		
130	135	140
Leu Val Pro Phe Val Gly Lys Val His Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys		
145	150	155
Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser		
165	170	175
Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala		
180	185	190
Ile Thr Glu Ala Leu Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Val Val Glu Ala		
195	200	205
Thr His Met Cys Met Val Met Arg Gly Val Gln Lys Met Asn Ser Lys		
210	215	220
Thr Val Thr Ser Thr Met Leu Gly Val Phe Arg Glu Asp Pro Lys Thr		
225	230	235
Arg Glu Glu Phe Leu Thr Leu Ile Arg Ser		
245	250	

<210> 8

<211> 798

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CBh启动子(CBh promoter)

<400> 8

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtcgaccg cccaacgacc cccgcccatt	60
gacgtcaata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtattttacg	120
gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga	180
cgatcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttgtgcccag tacatgacct tatgggactt	240
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtcg aggtgagccc	300
cacgttctgc ttactctcc ccctctccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt	360
tatTTTTTtaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggggggc gcgcgccagg	420
cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg agaggtgcgg cggcgccaa	480
tcagagcggc gcgctccgaa agtttcttt tatggcgagg cggcggcggc ggcggcccta	540
taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagt cgctgcgcgc tgccttcgcc ccgtgccccg	600
ctccgccgcc gcctcgccgc gcccgcggcg gctctgactg accgcgttac tcccacaggt	660
gagcgggcgg gacggccctt ctccctccgg ctgtaattag ctgagcaaga ggtaagggtt	720
taagggatgg ttggttggtg gggtattaat gtttaattac ctggagcacc tgcctgaaat	780

cacttttttt caggttgg	798
<210> 9	
<211> 469	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 9	
ctgcagaggg ccctgcgtat gagtgcaagt gggtttttagg accaggatga ggcggggtgg	60
gggtgcctac ctgacgaccg accccgaccc actggacaag cacccaaccc ccattcccca	120
aattgcgcat cccctatcag agagggggag gggaaacagg atgcggcgag gcgcgtgcgc	180
actgccagct tcagcaccgc ggacagtgcc ttcgcccccg cctggcgggc cgcgccaccg	240
ccgcctcagc actgaaggcg cgtgacgtc actcgccggt ccccgcaaa ctcccccttc	300
cggccacctt ggtcgcgtcc gcgcgcgcgc cggcccagcc ggaccgcacc acgcgaggcg	360
cgagataggg gggcacgggc gcgaccatct gcgctgcggc gccggcgact cagcgctgcc	420
tcagtctgcg gtgggcagcg gaggagtcgt gtcgtgcctg agagcgag	469
<210> 10	
<211> 659	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 具有巨细胞病毒增强子的鸡β肌动蛋白启动子(CB7)	
<400> 10	
gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc	60
catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca	120
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga	180
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	240
aagtgtatca tatgccaatg acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccgcct	300
ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat	360
tagtcatcgc tattaccatg gtcgaggtga gcccacgtt ctgcttact ctccccatct	420
cccccccctc cccaccccca attttgtatt tattttattt ttaattattt tgtgcagcga	480
tgggggcggg gggggggggg gggcgcgcg caggcggggc ggggcggggc gaggggcggg	540
gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtttc	600
cttttatggc gaggcggcgg cggcgggcgg cctataaaaa gcgaagcgcg cggcgggcg	659
<210> 11	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> TRE启动子	
<400> 11	

acgcgtggag ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat	60
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg ctaggctgacc gcccaacgac	120
ccccgccc at tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgtcaat agggactttc	180
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt	240
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcctggcat	300
tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc	360
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt	420
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttgcacc	480
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	540
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg	600
cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc	660
tcc	663

<210> 12

<211> 592

<212> DNA

<213> 土拨鼠乙型肝炎病毒(Woodchuck hepatitis B virus)

<400> 12

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct	60
ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt	120
atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagt	180
tggcccggtg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact	240
ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt cccctcct	300
attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggtg	360
ttgggcactg acaattccgt ggtgtgtcg gggaagctga cgtcctttcc atggctgctc	420
gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc	480
aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt	540
cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgcc tg	592

<210> 13

<211> 247

<212> DNA

<213> 土拨鼠乙型肝炎病毒

<400> 13

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct	60
ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt	120
atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttag ttcttgccac ggcggaactc	180
atgccgcct gccttgcccc ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc	240
gtgggtgt	247

<210> 14

<211> 224

<212> DNA	
<213> 猿猴病毒40(Simian virus 40)	
<400> 14	
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa	60
aaaatgccttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg	120
caataaaca gtaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt	180
gtgggaggtt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggta	224
<210> 15	
<211> 208	
<212> DNA	
<213> 牛(Bos taurus)	
<400> 15	
ctgtgccttc tagttgccag ccattctgtt tttgccctc ccccgctgcct tccttgaccc	60
tggaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc	120
tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt	180
gggaagagaa tagcaggcat gctgggga	208
<210> 16	
<211> 113	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ITR序列	
<400> 16	
ccactccctc tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgc	60
gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag gga	113
<210> 17	
<211> 5071	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 包含可操作地连接至htTH编码序列的CBh启动子的表达载体	
<400> 17	
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc	60
acgacaggtt tcccgaactg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaactct	240
cgagatctag aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc	300
tcactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgccggg ctttgcccgg gcggcctcag	360
tgagcgagcg agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctggaggg	420

gtggagtcgt	gacctaggca	actttgtata	gaaaagttgc	gttacataac	ttacggtaaa	480
tggcccgcc	ggctgaccgc	ccaacgaccc	cgcccatg	acgtcaatag	taacgccaat	540
agggactttc	cattgacgtc	aatgggtgga	gtatttacgg	taaactgccc	acttggcagt	600
acatcaagt	tatcatatgc	caagtacgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaattggcc	660
cgccctggcat	tgtgcccagt	acatgacctt	atgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	720
cgtattagtc	atcgctatta	ccatggtcga	ggtgagcccc	acgttctgct	tcactctccc	780
catctccccc	ccctccccac	ccccaatttt	gtatttattt	atTTTTtaat	tattttgtgc	840
agcgatgggg	gcgggggggg	ggggggggcg	cgcgccaggc	ggggcggggc	ggggcgaggg	900
gcggggcggg	gcgaggcgga	gaggtgcggc	ggcagccaat	cagagcgggc	cgctccgaaa	960
gtttcctttt	atggcgaggc	ggcggcgggc	gcggccctat	aaaaagcgaa	gcgcgcggcg	1020
ggcgggagtc	gctgcgcgct	gccttcgccc	cgtgccccgc	tccgccgcgc	cctgcgcgcg	1080
cccgccccgg	ctctgactga	ccgcgttact	cccacaggtg	agcgggcggg	acggcccttc	1140
tcctccgggc	tgttaattagc	tgagcaagag	gtaagggttt	aagggatggt	tggttggtgg	1200
ggtattaatg	tttaattacc	tggagcacct	gcctgaaatc	actTTTTttc	aggttggcaa	1260
gtttgtacag	ccaccatgag	ccccgcgggg	cccaaggtcc	cctggttccc	aagaaaagt	1320
tcagagctgg	acaagtgtca	tcacctggtc	accaagttcg	accctgacct	ggacttggac	1380
cacccgggct	tctcggacca	ggtgtaccgc	cagcgcagga	agctgattgc	tgagatcgcc	1440
ttccagtaca	ggcacggcga	cccgattccc	cgtgtggagt	acaccgccga	ggagattgcc	1500
acctggaagg	aggtctacac	cacgtgaag	ggcctctacg	ccacgcacgc	ctgcggggag	1560
cacctggagg	cctttgcttt	gctggagcgc	ttcagcggct	accggaaga	caatatcccc	1620
cagctggagg	acgtctcccc	cttcctgaag	gagcgcacgg	gcttccagct	gcggcctgtg	1680
gccggcctgc	tgtccgcccc	ggacttcctg	gccagcctgg	ccttccgcgt	gttccagtgc	1740
accaggtata	tccgccacgc	gtcctcgccc	atgcactccc	ctgagccgga	ctgctgccac	1800
gagctgctgg	ggcacgtgcc	catgctggcc	gaccgcacct	tcgcgcagtt	ctcgcaggac	1860
attggcctgg	cgtccctggg	ggcctcggat	gaggaaattg	agaagctgtc	cacgctgtac	1920
tggttcacgg	tggagttcgg	gctgtgtaag	cagaacgggg	aggtgaaggc	ctatggtgcc	1980
gggctgctgt	cctcctacgg	ggagctcctg	cactgcctgt	ctgaggagcc	tgagattcgg	2040
gccttcgacc	ctgaggctgc	ggccgtgcag	ccctaccaag	accagacgta	ccagtcagtc	2100
tacttcgtgt	ctgagagctt	cagtacgcc	aaggacaagc	tcaggagcta	tgcctcacgc	2160
atccagcgcc	ccttctccgt	gaagttcgac	ccgtacacgc	tggccatcga	cgtgctggac	2220
agcccccagg	ccgtgcggcg	ctccctggag	ggtgtccagg	atgagctgga	cacccttgcc	2280
catgcgctga	gtgccattgg	ctaacagaca	tgataagata	cattgatgag	tttggaacaa	2340
ccacaactag	aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	2400
tatttgaac	cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	2460
tgtttcaggt	tcagggggag	gtgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	2520
gtggtaacta	gtccactccc	tctctgcgcg	ctcgcctcgt	cactgaggcc	gggcgaccaa	2580
aggtcgcccc	acgcccgggc	tttgccccgg	cggcctcagt	gagcgagcga	gcgcgcagag	2640
agggacagat	ccgggccccg	atgcgtcgac	aattcactgg	ccgtcgtttt	acaacgtcgt	2700
gactgggaaa	accctggcgt	tacccaactt	aatgccttg	cagcacatcc	ccctttcgcc	2760

agctggcgta	atagcgaaga	ggccccgacc	gatcgccctt	cccaacagtt	gcgcagcctg	2820
aatggcgaat	ggcgctgat	gcggtatitt	ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	2880
cgcatatggt	gcactctcag	tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	ccagccccga	2940
cacccgccaa	cacccgctga	cgcgccctga	cgggcttgct	tgctcccggc	atccgcttac	3000
agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	3060
aaacgcgcga	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatitt	tataggttaa	tgtcatgata	3120
ataatggttt	cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	3180
tgtttatitt	tctaaataca	ttcaaataat	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	3240
atgcttcaat	aataattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgctgccttt	3300
attccctitt	ttgcggcatt	ttgccttcc	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	3360
gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	3420
agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	3480
aaagttctgc	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggt	3540
cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	3600
cttacggatg	gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtct	ccataacat	gagtataaac	3660
actgcggcca	acttacttct	gacaacgata	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	3720
cacaacatgg	gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	3780
ataccaaacg	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	3840
ctattaactg	gcgaactact	tactctagct	ttccggcaac	aattaataga	ctggatggag	3900
gcggataaag	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttattgct	3960
gataaatctg	gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	4020
ggtaagccct	cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	4080
cgaaatagac	agatcgctga	gataggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	4140
caagtttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	4200
taggtgaaga	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	4260
cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	4320
cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgccg	4380
gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	4440
aatactgttc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	4500
cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	4560
tgtcttaccg	ggttggaact	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	4620
acgggggggt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	4680
ctacagcgtg	agctatgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	4740
ccggtaaagc	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	4800
tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	4860
tgctcgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	4920
ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	4980
gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	5040
cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcgga	g			5071

<210> 18

<211> 4954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含可操作地连接至GCH-1编码序列的CBh启动子的表达载体

<400> 18

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc      60
acgacaggtt tcccgaactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc      120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa      180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagtct      240
cgagatctag aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc      300
tactgagggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag      360
tgagcgagcg agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctggaggg      420
gtggagtcgt gacctaggca actttgtata gaaaagttgc gttacataac ttacggtaaa      480
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaatag taacgccaat      540
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt      600
acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc      660
cgcttgccat tgtgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta      720
cgtattagtc atcgctatta ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcactctccc      780
catctcccc cctccccac cccaatttt gtattttatt attttttaat tattttgtgc      840
agcgatgggg gcgggggggg ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg      900
gcggggcggg gcgaggcgga gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa      960
gtttcctttt atggcgaggg gcggggcgcg gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg     1020
ggcgggagtc gctgcgcgct gccttcgccc cgtgccccgc tccgccgccg cctcgcgccg     1080
ccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacagggt agcgggcggg acggcccttc     1140
tcctccgggc tgtaattagc tgagcaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg     1200
ggtattaatg ttttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttggcaa     1260
gtttgtacag ccaccatgga gaagccgagg ggtgtaagggt gcaccaatgg gttccccgag     1320
cgggagctgc cgcggccccg ggccagccga cctgccgaga agtcccggcc gcccgaggcc     1380
aagggcgcac agccagccga cgcctggaag gcaggcgggc cccgcagcga ggaggataac     1440
gagctgaacc tccccaacct ggcgggcgct tactcgtcca tcctgcgctc gctgggcgag     1500
gacccccagc ggcaggggct gctcaagacg ccctggaggg cggccaccgc catgcagttc     1560
ttaccaagg gataccagga gaccatctca gatgtcctga acgatgctat atttgatgag     1620
gacatgacg agatggtgat tgtgaaggac attgacatgt tttccatgtg tgagcatcac     1680
ctgggtcccat ttgtgggaag ggtccatatt ggttatcttc ctaacaagca agtccttggt     1740
ctcagcaaac ttgccaggat tgtggaaatc tacagtagaa gactacaagt tcaagaacgc     1800
cttaccaaac agattgcagt ggccatcaca gaagccttgc agcctgctgg cgtcggggta     1860
gtgattgaag caacacacat gtgtatggtc atgcgaggtg tgcagaaaat gaacagcaag     1920

```

actgtcacta	gcaccatgct	aggcgtgttc	cgggaagacc	caaagactcg	ggaggagttc	1980
ctcacactca	tcaggagctg	aaatcaacct	ctggattaca	aaatttgtga	aagattgact	2040
ggtattctta	actatgttgc	tccttttacg	ctatgtggat	acgctgcttt	aatgcctttg	2100
tatcatgcta	ttgcttcccg	tatggctttc	attttctcct	ccttgtataa	atcctggtta	2160
gttcttgcca	cggcggaaact	catcgccgcc	tgcttgccc	gctgctggac	aggggctcgg	2220
ctgttgggca	ctgacaattc	cgtgggtgtt	atttgtgaaa	tttgtgatgc	tattgcttta	2280
tttghtaacca	tctagcttta	tttgtgaaat	tttgtatgct	attgctttat	ttgtaaccat	2340
tataagctgc	aataaacaag	ttaacaacaa	caattgcatt	cattttatgt	ttcaggttca	2400
gggggagaga	ctagtccact	ccctctctgc	gcgctcgctc	gctcactgag	gccgggcgac	2460
caaaggtcgc	ccgacgcccg	ggctttgccc	gggcggcctc	agtgagcgag	cgagcgcgca	2520
gagagggaca	gatccggggc	cgcatgcgtc	gacaattcac	tggccgtcgt	tttacaacgt	2580
cgtgactggg	aaaaccctgg	cgttacccaa	cttaatcgcc	ttgcagcaca	tccccctttc	2640
gccagctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	cttcccaaca	gttgccgcagc	2700
ctgaatggcg	aatggcgcct	gatgcggtat	tttctcctta	cgcatctgtg	cggtatttca	2760
caccgcatat	ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	ccgcatagt	aagccagccc	2820
cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	2880
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	2940
ccgaaacgcg	cgagacgaaa	gggcctcgtg	atacgccat	ttttataggt	taatgtcatg	3000
ataataatgg	tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaccctt	3060
atttgtttat	ttttctaaat	acattcaa	atgtatccgc	tcatgagaca	ataaccctga	3120
taaatgcttc	aataatat	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	3180
cttattccct	tttttgcggc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccaga	aacgctggtg	3240
aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	actggatctc	3300
aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	3360
tttaaagt	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtattg	acgccgggca	agagcaactc	3420
ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	cacagaaaag	3480
catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagt	ctgccataac	catgagtgat	3540
aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	3600
ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	3660
gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	aacgttgcg	3720
aaactattaa	ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	3780
gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgctcgggcc	ttccggctgg	ctggtttatt	3840
gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggt	tcattgcagc	actggggcca	3900
gatggtaagc	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	3960
gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	4020
gaccaagt	actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	atttaaaagg	4080
atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaaa	tcccttaacg	tgagttttcg	4140
ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	4200
ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcgg	ggtttgtttg	4260

ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaaactg gcttcagcag agcgcagata	4320
ccaaataactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca	4380
ccgcctacat acctcgctct gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag	4440
tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc	4500
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga	4560
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccc aaggagagaaa ggcgacagg	4620
tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac	4680
gcctgggtatc tttatagtcc tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg	4740
tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcc gcaacgcggc ctttttacgg	4800
ttcctggcct tttgctggcc ttttgcac atgttcttct ctgcgttatc ccctgattct	4860
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgcag ccgaacgacc	4920
gagcgcagcg agtcagtga cgaggaagcg gaag	4954
<210> 19	
<211> 4984	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 包含可操作地连接至htTH编码序列的SYN1启动子的表达载体	
<400> 19	
ggccactccc tctctgcgcg ctgcgtcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccc	60
acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc	120
caactccatc actaggggtt cctggagggg tggagtcgtg acctaggcaa ctttgtatag	180
aaaagtgtgct gcagagtgca agtgggtttt aggaccagga tgaggcgggg tgggggtgcc	240
tacctgacga ccgaccccga cccactggac aagcaccaa ccccatctcc ccaaattgcg	300
catcccctat cagagagggg gaggggaaac aggatgcggc gaggcgcgtg cgcactgcc	360
gcttcagcac gcgcgcagct gccttcgccc ccgcctggcg gcgcgcgcca ccgccgcctc	420
agcactgaag gcgcgcgtgac gtcactcgcc ggtccccgc aaactcccct tcccggccac	480
cttggtcgcg tccgcgccgc cgccggccca gccggaccgc accacgcgag gcgcgagata	540
ggggggcacg ggcgcgacca tctgcgtgc ggcgccggcg actcagcgt gcctcagtct	600
gcggtgggca gcggaggagt cgtgtcgtgc ctgagagcgc aggccaccat gagccccgcg	660
gggcccgaag tcccctggtt cccaagaaaa gtgtcagagc tggacaagtg tcatcacctg	720
gtcaccaagt tcgaccctga cctggacttg gaccaccgg gcttctcgga ccaggtgtac	780
cgccagcgca ggaagctgat tgctgagatc gccttcagct acaggcacgg cgaccgatt	840
ccccgtgtgg agtacaccgc cgaggagatt gccacctgga aggaggtcta caccacgctg	900
aagggcctct acgccacgca cgctgcggg gagcacctgg aggcctttgc tttgctggag	960
cgttcagcg gctaccggga agacaatat cccagctgg aggacgtctc ccgcttctg	1020
aaggagcgca cgggcttcca gctgcggcct gtggccggcc tgctgtccgc ccgggacttc	1080
ctggccagcc tggccttccg cgtgttccag tgcaccagct atatccgcca cgcgtcctcg	1140
cccatgcact cccctgagcc ggactgctgc cacgagctgc tggggcacgt gcccatgctg	1200

gccgaccgca	ccttcgcgca	gttctcgcag	gacattggcc	tggcgtccct	gggggcctcg	1260
gatgaggaaa	ttgagaagct	gtccacgctg	tactggttca	cgggtggagtt	cgggctgtgt	1320
aagcagaacg	gggaggtgaa	ggcctatggg	gccgggctgc	tgtcctccta	cggggagctc	1380
ctgcaactgcc	tgtctgagga	gcctgagatt	cgggccttcg	accctgaggc	tgcggccgtg	1440
cagccctacc	aagaccagac	gtaccagtca	gtctacttcg	tgtctgagag	cttcagtgc	1500
gccaaaggaca	agctcaggag	ctatgcctca	cgcattccagc	gccccttctc	cgtgaagtcc	1560
gacccgtaca	cgctggccat	cgacgtgctg	gacagccccc	aggccgtgcg	gcgctccctg	1620
gaggggtgtcc	aggatgagct	ggacaccctt	gcccattgcg	tgagtgccat	tggtctaaat	1680
caacctctgg	attacaaaaat	ttgtgaaaga	ttgactggta	ttcttaacta	tgttgctcct	1740
tttacgctat	gtggatacgc	tgttttaatg	cctttgtatc	atgctattgc	ttcccgtatg	1800
gctttcatctt	tctcctcctt	gtataaatcc	tggttagttc	ttgccacggc	ggaactcatc	1860
gccgcctgcc	ttgcccgtcg	ctggacaggg	gctcggtgtg	tgggcactga	caattccgtg	1920
gtgtttatctt	gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatttg	taaccatcta	gctttatttg	1980
tgaaatttgt	gatgctattg	ctttatttgt	aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	2040
caacaacaat	tgcattcatt	ttatgtttca	ggttcagggg	gagagcaatt	gcattcatctt	2100
tatgtttcag	gttcaggggg	aggtgtggga	ggttttttaa	agcaagtaaa	acctctacaa	2160
atgtggtaac	tagtccactc	cctctctgcg	cgctcgtcgc	ctcactgagg	ccgggcgacc	2220
aaaggctgcc	cgacgcccgg	gctttgcccg	ggcggcctca	gtgagcgagc	gagcgcgagc	2280
agagggacag	atccggggcc	gcattgcgtc	acaattcact	ggccgtcggt	ttacaacgtc	2340
gtgactggga	aaaccctggc	gttaccacaac	ttaatcgctt	tgcagcacat	ccccctttcg	2400
ccagctggcg	taatagcgaa	gaggcccgca	ccgatcgccc	ttcccaacag	ttgcgcagcc	2460
tgaatggcga	atggcgccctg	atgcgggtatt	ttctccttac	gcattctgtgc	ggtatttcac	2520
accgcatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	cgcattagtt	agccagcccc	2580
gacacccgcc	aacacccgct	gacgcgcctt	gacgggcttg	tctgctcccc	gcattccgctt	2640
acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	gcattgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	2700
cgaaacgcgc	gagacgaaag	ggcctcgtga	tacgcctatt	tttatagggt	aatgtcatga	2760
taataatggt	ttcttagacg	tcaggtggca	cttttcgggg	aaatgtgcgc	ggaaccctca	2820
tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	2880
aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	2940
ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcaccagaa	acgttggtga	3000
aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	3060
acagcggtaa	gattccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	3120
ttaaagtctt	gctatgtggc	gcggtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	3180
gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	3240
atcttacgga	tgcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgcataacc	atgagtgata	3300
acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	gaaggagcta	accgtttttt	3360
tgcacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcggtg	ggaaccggag	ctgaatgaag	3420
ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	tgctgttagc	aatggcaaca	acgttgcgca	3480
aactattaac	tgcggaacta	cttactctag	cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	3540

```

aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 3600
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag 3660
atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 3720
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 3780
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 3840
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt 3900
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc 3960
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc 4020
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac 4080
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 4140
cgcttacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 4200
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 4260
gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 4320
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt 4380
atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 4440
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 4500
gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 4560
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg 4620
tgataaacgg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 4680
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc 4740
ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaagcggg 4800
gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac 4860
actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag 4920
gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tctcgagatc tagaaagctt cccgggggga 4980
tctg 4984

```

<210> 20

<211> 4681

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含可操作地连接至GCH-1编码序列的SYN1启动子的表达载体

<400> 20

```

ggccactccc tctctgcgcg ctgcgtcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccc 60
acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc 120
caactccatc actaggggtt cctggagggg tggagtcgtg acctaggcaa ctttgtatag 180
aaaagttgct gcagagtgca agtgggtttt aggaccagga tgaggcgggg tgggggtgcc 240
tacctgacga ccgaccccgga cccactggac aagcacccaa ccccatcc ccaaattgcg 300
catccctat cagagagggg gaggggaaac aggatgcggc gaggcgcgtg cgcactgcc 360
gcttcagcac cgcgacaggt gccttcgccc ccgcctggcg gcgcgcgcca ccgccgcctc 420

```

agcactgaag	gcgcgctgac	gtcactcgcc	gttccccgc	aaactcccct	tcccggccac	480
cttggtcgcg	tccgcgccgc	cgccggccca	gccggaccgc	accacgcgag	gcgcgagata	540
ggggggcacg	ggcgcgacca	tctgcgctgc	ggcgcgggcg	actcagcgct	gcctcagtct	600
gcggtgggca	gcggaggagt	cgtgtcgtgc	ctgagagcgc	aggccaccat	ggagaagccg	660
cggggtgtaa	ggtgcaccaa	tgggttcccc	gagcgggagc	tgccgcggcc	cggggccagc	720
cgacctgccg	agaagtcccc	gccgcccag	gccaaaggcg	cacagccagc	cgacgcctgg	780
aaggcagggc	ggccccgcag	cgaggaggat	aacgagctga	acctcccaa	cctggcggcc	840
gcttactcgt	ccatcctgcg	ctcgtctggc	gaggaccccc	agcggcaggg	gctgctcaag	900
acgccctgga	gggcggccac	cgccatgcag	ttcttcacca	agggatacca	ggagaccatc	960
tcagatgtcc	tgaacgatgc	tatatattgat	gaggaccatg	acgagatggg	gattgtgaag	1020
gacattgaca	tgttttccat	gtgtgagcat	cacctggtcc	catttgtggg	aagggtccat	1080
attggttatc	ttcctaacaa	gcaagtcctt	ggtctcagca	aacttgccag	gattgtggaa	1140
atctacagta	gaagactaca	agttcaagaa	cgcttacca	aacagattgc	agtggccatc	1200
acagaagcct	tgcagcctgc	tggcgtcggg	gtagtgattg	aagcaacaca	catgtgtatg	1260
gtcatgcgag	gtgtgcagaa	aatgaacagc	aagactgtca	ctagcaccat	gctaggcgtg	1320
ttccgggaag	acccaaagac	tcgggaggag	ttcctcacac	tcatcaggag	ctgaaatcaa	1380
cctctggatt	acaaaatttg	tgaaagattg	actggtattc	ttaactatgt	tgctcctttt	1440
acgctatgtg	gatacgctgc	tttaatgcct	ttgtatcatg	ctattgcttc	ccgtatggct	1500
ttcattttct	cctccttgta	taaatcctgg	ttagttcttg	ccacggcgga	actcatcgcc	1560
gcctgccttg	cccgtgctg	gacaggggct	cggctgttgg	gactgacaa	ttccgtggtg	1620
tttattttgtg	aaatttgtga	tgctattgct	ttatttgtaa	ccatctagct	ttatttgtga	1680
aatattgtgat	gctattgctt	tatttgtaac	cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	1740
caacaattgc	attcatttta	tgtttcaggt	tcagggggag	agcaattgca	ttcattttat	1800
gtttcagggt	cagggggagg	tgtgggaggt	tttttaaagc	aagtaaaacc	tctacaaatg	1860
tggttaactag	tccactccct	ctctgcgcgc	tcgctcgctc	actgaggccg	ggcgacccaa	1920
ggtcgcccga	cgcccgggct	ttgcccgggc	ggcctcagtg	agcgagcgag	cgcgagaga	1980
gggacagatc	cgggcccgc	tgctcgaca	attcactggc	cgctgtttta	caacgtcgtg	2040
actgggaaaa	ccctggcggt	acccaactta	atcgcccttg	agcacatccc	cctttcgcca	2100
gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	atcgcccttc	ccaacagttg	cgcagcctga	2160
atggcgaaatg	gcgcctgatg	cgggtattttc	tccttacgca	tctgtgcggt	atttcacacc	2220
gcatatgggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	2280
acccgccaac	acccgtgac	gcgcctgac	gggcttgtct	gctcccggca	tccgcttaca	2340
gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttcaccg	tcatcaccga	2400
aacgcgcgag	acgaaagggc	ctcgtgatac	gcctatTTTT	ataggTTaat	gtcatgataa	2460
taatggtttc	ttagacgtca	ggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	acccctatTT	2520
gtttatTTTT	ctaaatacat	tcaaataatg	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	2580
tgtttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	gtcgccctta	2640
ttccctTTTT	tgcggcattt	tgcccttctg	TTTTTgtca	cccagaaacg	ctgggtgaaag	2700
taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaactg	gatctcaaca	2760

g	2820
g	2880
g	2940
g	3000
g	3060
g	3120
g	3180
g	3240
g	3300
g	3360
g	3420
g	3480
g	3540
g	3600
g	3660
g	3720
g	3780
g	3840
g	3900
g	3960
g	4020
g	4080
g	4140
g	4200
g	4260
g	4320
g	4380
g	4440
g	4500
g	4560
g	4620
g	4680
g	4681
<210> 21	
<211> 1494	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 21	
g	60

```

ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg tccccgcggt tcattgggcg caggcagagc 120
ctcatcgagg acgccccgaa ggagcgggag gcggcggttg cagcagcggc cgctgcagtc 180
ccctcggagc ccggggaccc cctggaggct gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc 240
gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg 300
aaggtgtttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agacccggcc cgcccagagg 360
ccgcgagctg ggggccccca cctggagtac ttcgtgcgcc tcgaggtgcg ccgaggggac 420
ctggccgccc tgctcagtgg tgtgcgccag gtgtcagagg acgtgcgcag ccccgcgggg 480
cccaaggtcc cctggttccc aagaaaagtg tcagagctgg acaagtgtca tcacctggtc 540
accaagttcg accctgacct ggacttggac caccggggt tctcggacca ggtgtaccgc 600
cagcgcagga agctgattgc tgagatcgcc ttccagtaca ggcacggcga cccgattccc 660
cgtgtggagt acaccgccga ggagattgcc acctggaagg aggtctacac cacgtgaag 720
ggcctctacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cttttgcttt gctggagcgc 780
ttcagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccg ctctctgaag 840
gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccg ggacttctg 900
gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtctctgccc 960
atgcactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc 1020
gaccgcacct tcgcgcagtt ctgcgaggac attggcctgg cgtccctggg ggcctcgat 1080
gaggaaattg agaagctgtc cacgctgtca tggttcacgg tggagttcgg gctgtgtaag 1140
cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggctgctgt cctcctacgg ggagctcctg 1200
cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag 1260
ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt ctgagagctt cagtgcgcc 1320
aaggacaagc tcaggagcta tgcctcacgc atccagcgcc ctttctccgt gaagtgcac 1380
ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agccccagg ccgtgcggcg ctccctggag 1440
ggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg ctag 1494

```

<210> 22

<211> 497

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

```

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
1           5           10           15
Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Ser Pro
          20           25           30
Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
          35           40           45
Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro
          50           55           60
Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala
65           70           75           80

```

Val	Leu	Asn	Leu	Leu	Phe	Ser	Pro	Arg	Ala	Thr	Lys	Pro	Ser	Ala	Leu		
85						90						95					
Ser	Arg	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Glu	Ala	Lys	Ile	His	His		
100						105						110					
Leu	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gln	Arg	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Pro	His	Leu		
115						120						125					
Glu	Tyr	Phe	Val	Arg	Leu	Glu	Val	Arg	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Ala	Leu		
130						135						140					
Leu	Ser	Gly	Val	Arg	Gln	Val	Ser	Glu	Asp	Val	Arg	Ser	Pro	Ala	Gly		
145						150						155				160	
Pro	Lys	Val	Pro	Trp	Phe	Pro	Arg	Lys	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Lys	Cys		
165						170						175					
His	His	Leu	Val	Thr	Lys	Phe	Asp	Pro	Asp	Leu	Asp	Leu	Asp	His	Pro		
180						185						190					
Gly	Phe	Ser	Asp	Gln	Val	Tyr	Arg	Gln	Arg	Arg	Lys	Leu	Ile	Ala	Glu		
195						200						205					
Ile	Ala	Phe	Gln	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Pro	Ile	Pro	Arg	Val	Glu	Tyr		
210						215						220					
Thr	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Thr	Trp	Lys	Glu	Val	Tyr	Thr	Thr	Leu	Lys		
225						230						235				240	
Gly	Leu	Tyr	Ala	Thr	His	Ala	Cys	Gly	Glu	His	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala		
245						250						255					
Leu	Leu	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Tyr	Arg	Glu	Asp	Asn	Ile	Pro	Gln	Leu		
260						265						270					
Glu	Asp	Val	Ser	Arg	Phe	Leu	Lys	Glu	Arg	Thr	Gly	Phe	Gln	Leu	Arg		
275						280						285					
Pro	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Arg	Asp	Phe	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala		
290						295						300					
Phe	Arg	Val	Phe	Gln	Cys	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	His	Ala	Ser	Ser	Pro		
305						310						315				320	
Met	His	Ser	Pro	Glu	Pro	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Leu	Leu	Gly	His	Val		
325						330						335					
Pro	Met	Leu	Ala	Asp	Arg	Thr	Phe	Ala	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Ile	Gly		
340						345						350					
Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Ser	Thr		
355						360						365					
Leu	Ser	Trp	Phe	Thr	Val	Glu	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Gln	Asn	Gly	Glu		
370						375						380					
Val	Lys	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Leu	Leu		

385	390	395	400
His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala			
	405	410	415
Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe			
	420	425	430
Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala			
	435	440	445
Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu			
	450	455	460
Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu			
465	470	475	480
Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile			
	485	490	495

Gly

<210> 23

<211> 1029

<212> DNA

<213> 智人

<400> 23

```

atgagccccg cggggcccaa ggtcccctgg ttcccaagaa aagtgtcaga gctggacaag      60
tgtcatcacc tggtcaccaa gttcgaccct gacctggact tggaccaccc gggcttctcg      120
gaccagggtgt accgccagcg caggaagctg attgctgaga tcgccttcca gtacaggcac      180
ggcgacccga ttccccgtgt ggagtacacc gccgaggaga ttgccacctg gaaggaggtc      240
tacaccacgc tgaagggcct ctacgccacg cagcctgcg gggagcacct ggaggccttt      300
gcttttctgg agcgcttcag cggctaccgg gaagacaata tccccagct ggaggacgtc      360
tcccgccttc tgaaggagcg cacgggcttc cagctgcggc ctgtggccgg cctgctgtcc      420
gcccgggact tcctggccag cctggccttc cgctgtttcc agtgcacca gtatatccgc      480
cacgcgtcct cgcccatgca ctcccctgag ccgactgct gccacgagct gctggggcac      540
gtgcccattgc tgcccgaccg caccttcgcg cagttctcgc aggacattgg cctggcgctc      600
ctgggggcct cgcatgagga aattgagaag ctgtccacgc tgtactgggt cacggtggag      660
ttcgggctgt gtaagcagaa cggggaggtg aaggcctatg gtgccgggct gctgtcctcc      720
tacggggagc tcctgcactg cctgtctgag gagcctgaga ttcgggcctt cgaccctgag      780
gctgcggccg tgcagcccta ccaagaccag acgtaccagt cagtctactt cgtgtctgag      840
agcttcagtg acgccaagga caagctcagg agctatgcct cacgcatcca gcgcccttc      900
tccgtgaagt tcgaccgta cacgtggcc atcgacgtgc tggacagccc ccaggccgtg      960
cggcgctccc tggagggtgt ccaggatgag ctggacaccc ttgcccatgc gctgagtgcc     1020
attggctag                                     1029

```

<210> 24

<211> 342

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

```

Met Ser Pro Ala Gly Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser
1           5           10           15
Glu Leu Asp Lys Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu
           20           25           30
Asp Leu Asp His Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg
           35           40           45
Lys Leu Ile Ala Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile
           50           55           60
Pro Arg Val Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val
65           70           75           80
Tyr Thr Thr Leu Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His
           85           90           95
Leu Glu Ala Phe Ala Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp
           100          105          110
Asn Ile Pro Gln Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr
           115          120          125
Gly Phe Gln Leu Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe
           130          135          140
Leu Ala Ser Leu Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg
145          150          155          160
His Ala Ser Ser Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu
           165          170          175
Leu Leu Gly His Val Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe
           180          185          190
Ser Gln Asp Ile Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile
           195          200          205
Glu Lys Leu Ser Thr Leu Ser Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys
           210          215          220
Lys Gln Asn Gly Glu Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser
225          230          235          240
Tyr Gly Glu Leu Leu His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala
           245          250          255
Phe Asp Pro Glu Ala Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr
           260          265          270
Gln Ser Val Tyr Phe Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys
           275          280          285

```

Leu Arg Ser Tyr Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe
 290 295 300
 Asp Pro Tyr Thr Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val
 305 310 315 320
 Arg Arg Ser Leu Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His
 325 330 335
 Ala Leu Ser Ala Ile Gly
 340

<210> 25

<211> 589

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CMV 启动子

<400> 25

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acgggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatc	589

<210> 26

<211> 272

<212> DNA

<213> 智人

<400> 26

ttcgaacagg taagcgcccc taaaatccct ttgggcacaa tgtgtcctga ggggagaggc	60
agcgacctgt agatgggacg ggggcactaa ccctcaggtt tggggcttct gaatgtgagt	120
atcgccatgt aagcccagta tttggccaat ctcagaaagc tcctgggtccc tggagggatg	180
gagagagaaa aacaaacagc tcctggagca gggagagtgc tggcctcttg ctctccggct	240
ccctctgttg ccctctgggt tctccccagg tt	272

<210> 27

<211> 82

<212> DNA

<213> 小鼠微小病毒(Mice minute virus)

<400> 27	
gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg ggtattaatg tttaattacc tggagcacct	60
gcctgaaatc acttttttttc ag	82
<210> 28	
<211> 304	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 3'UTR编码序列	
<400> 28	
gtgcacggcg tccctgaggg cccttcccaa cctcccctgg tctgcactg tcccggagct	60
caggccctgg tgaggggctg ggtcccgggt gcccccatg ccctccctgc tgccaggctc	120
ccactgcccc tgcacctgct tctcagcgca acagctgtgt gtgcccgtgg tgaggttggtg	180
ctgcctgtgg tgaggtcctg tcctggetcc cagggtcctg ggggctgctg cactgccctc	240
cgcccttccc tgacactgtc tgctgcccc aacacgtca caataaaaga aactgtggtc	300
tcta	304
<210> 29	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 5'UTR编码序列	
<400> 29	
gccacc	6

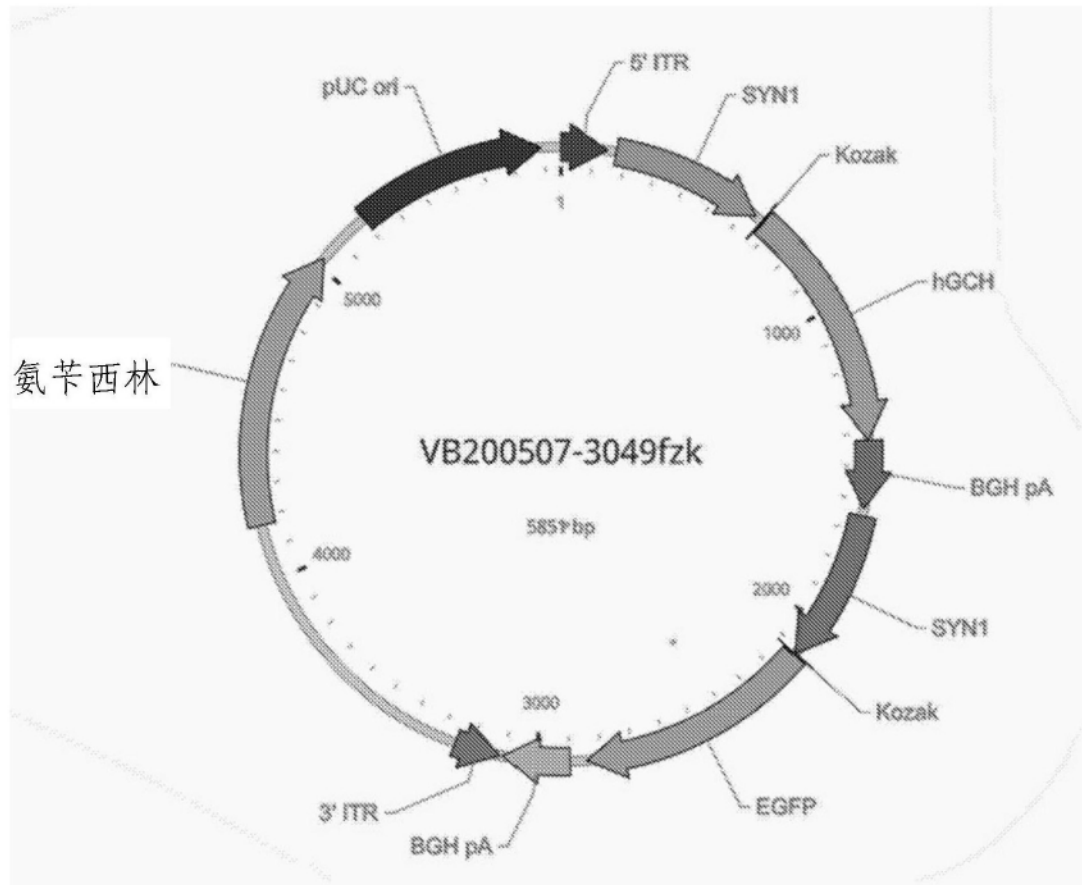


图1

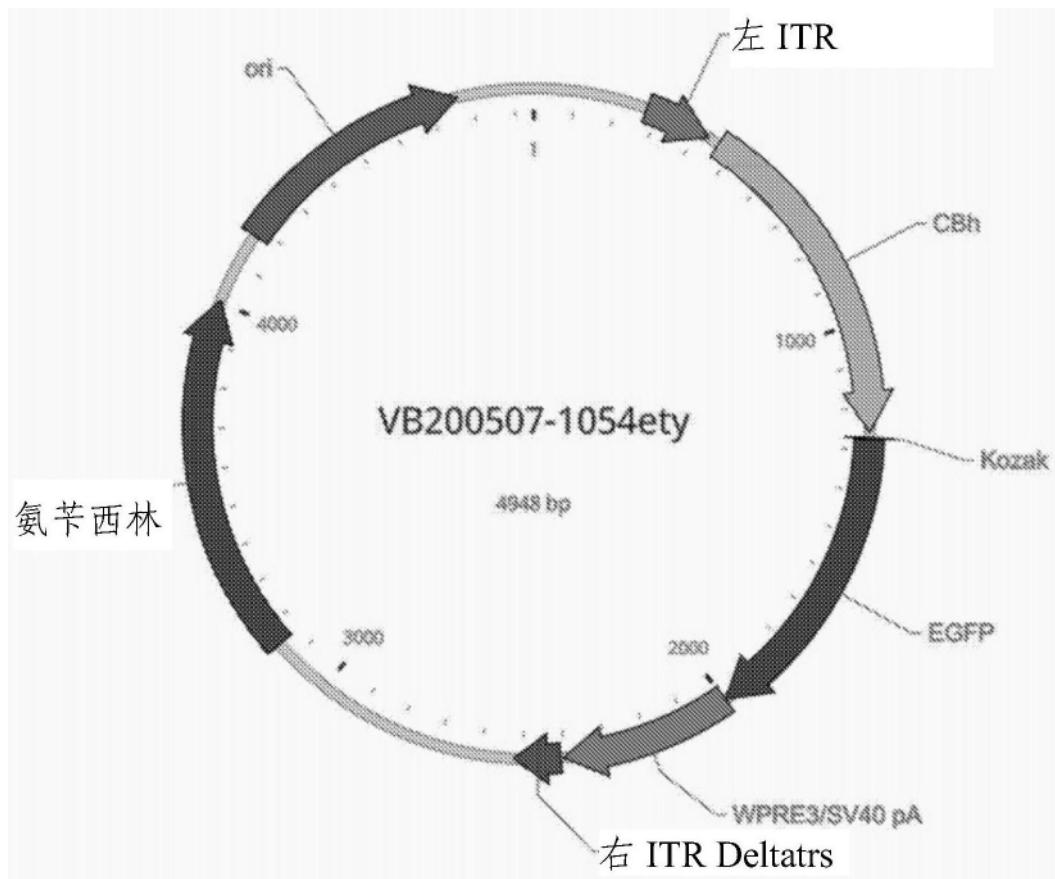


图2

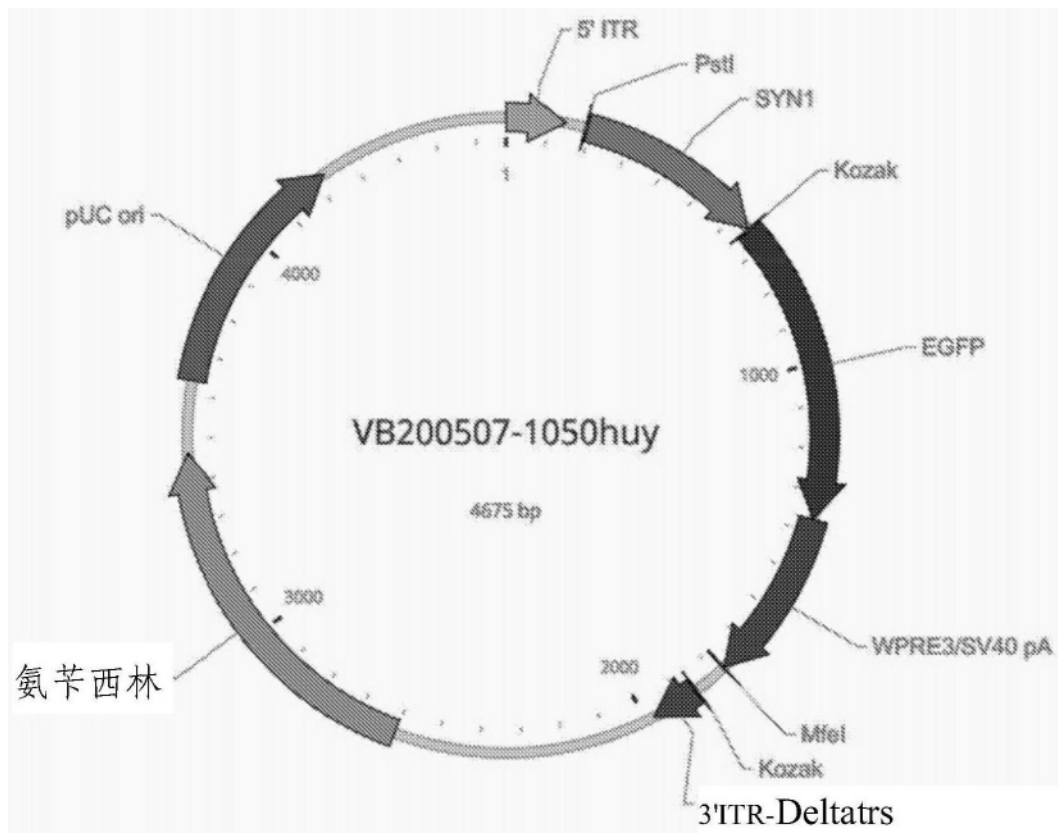


图3

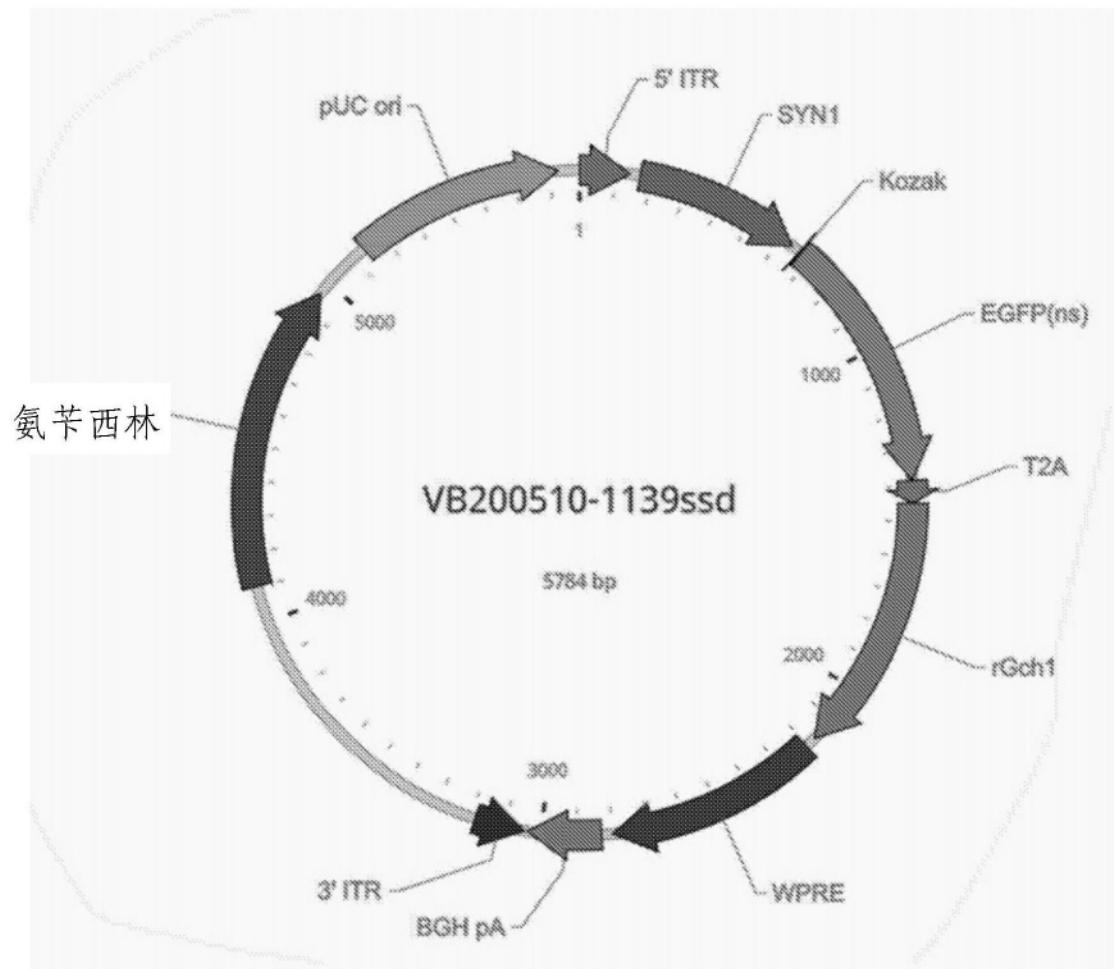


图4

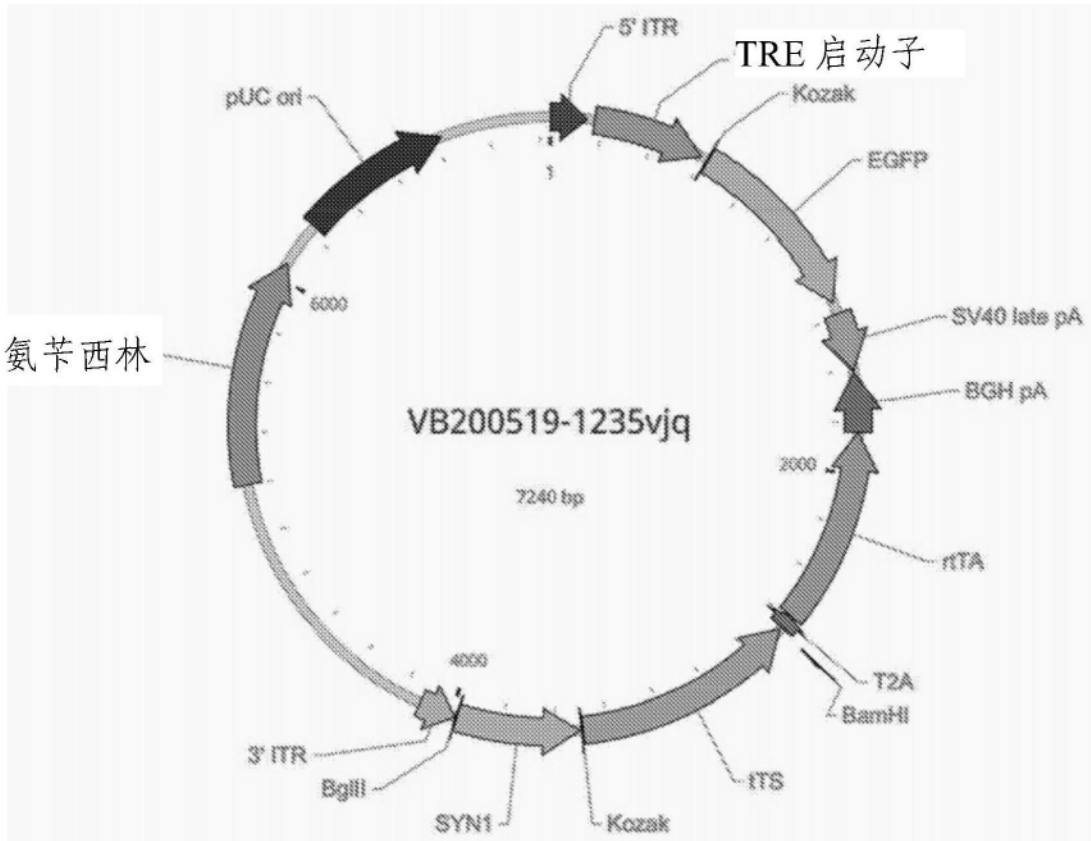


图5

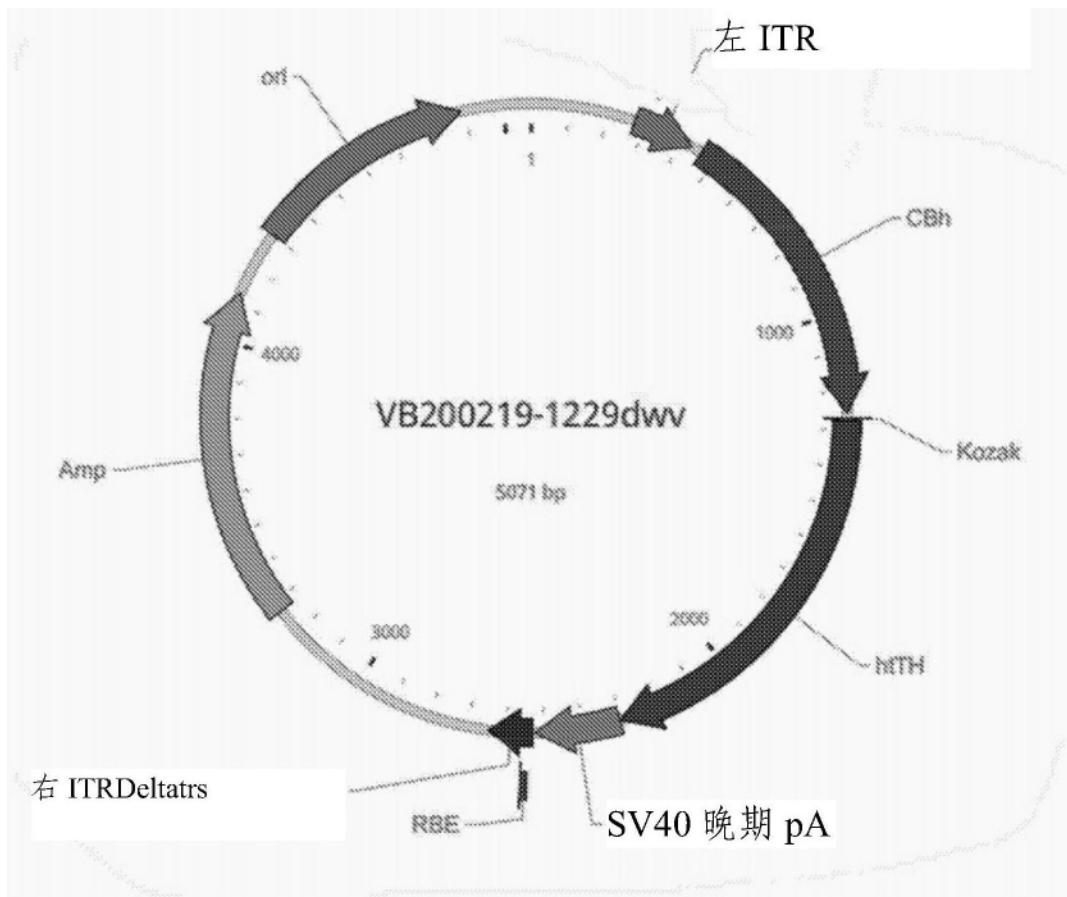


图6

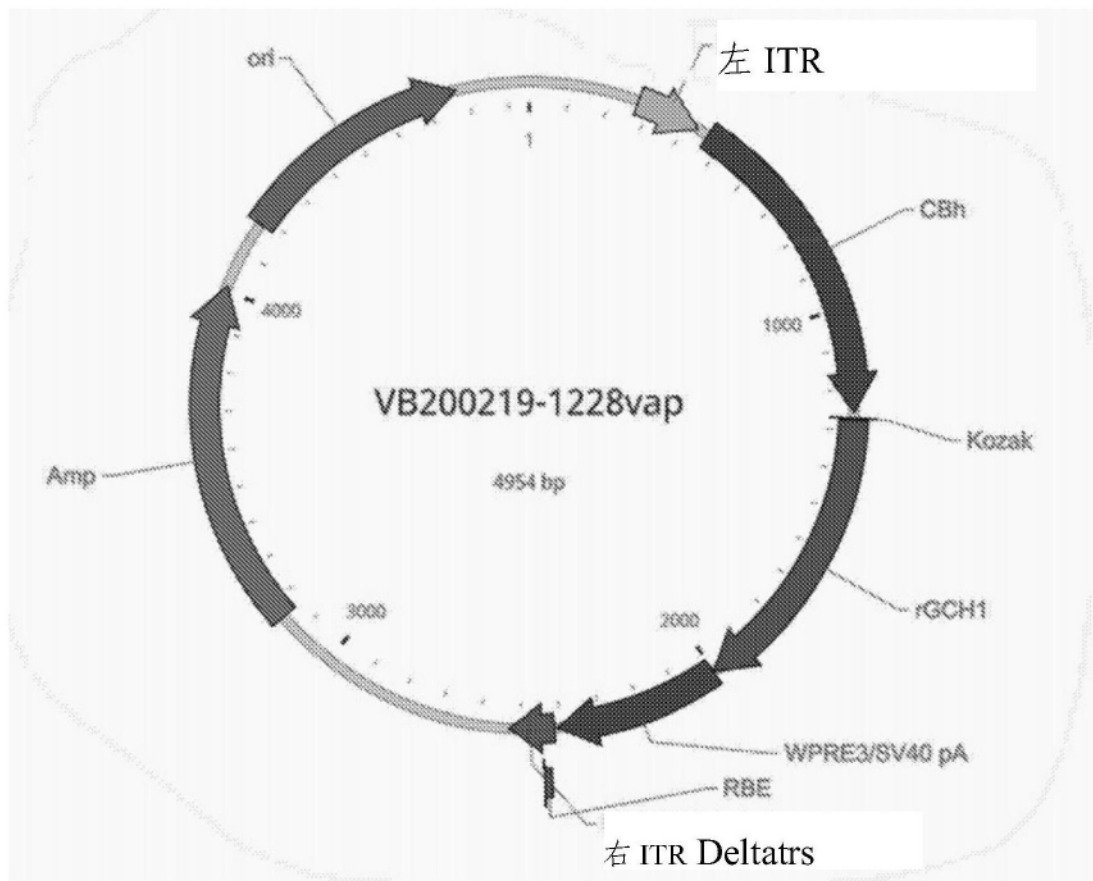


图7

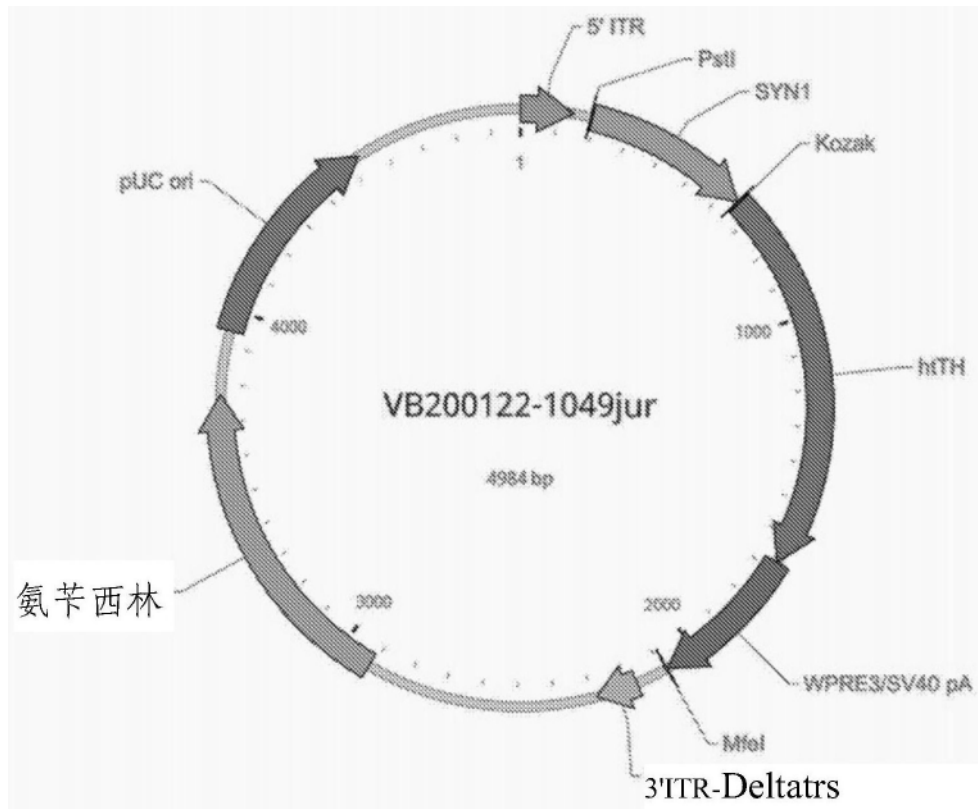


图8

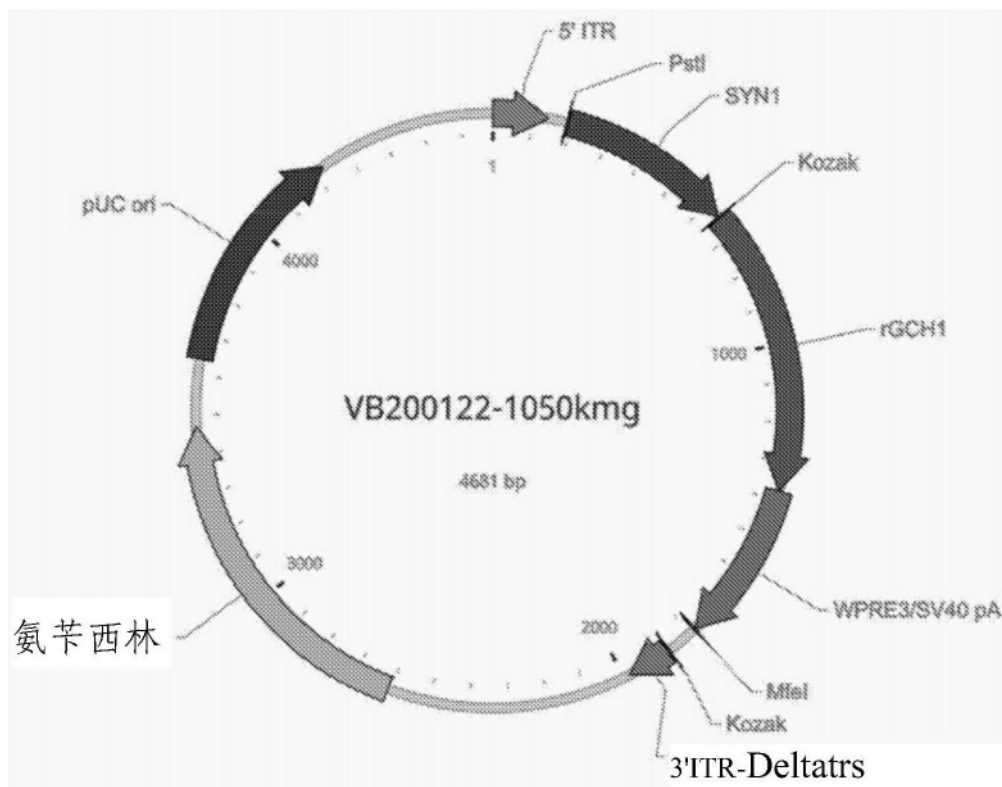


图9

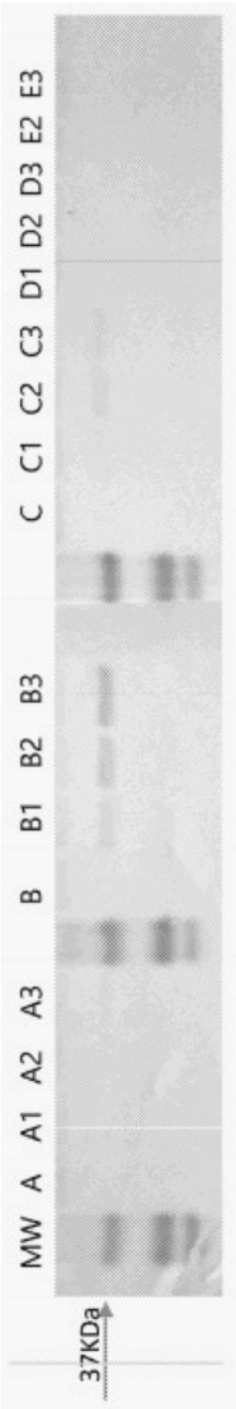


图10A



图10B

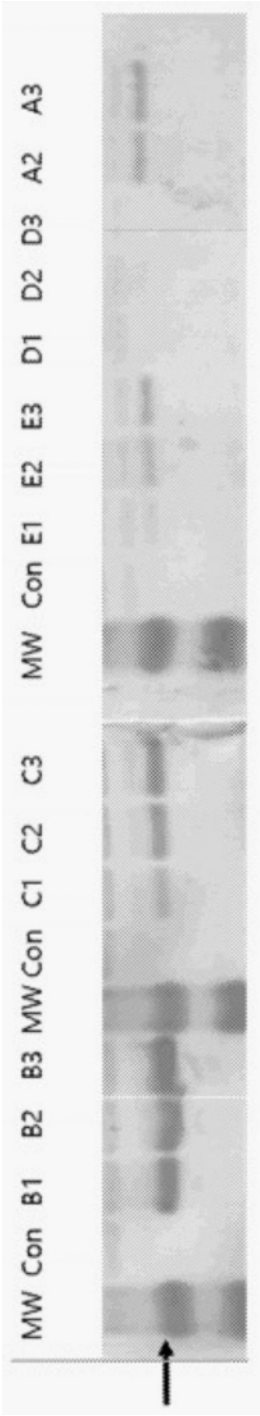


图11A

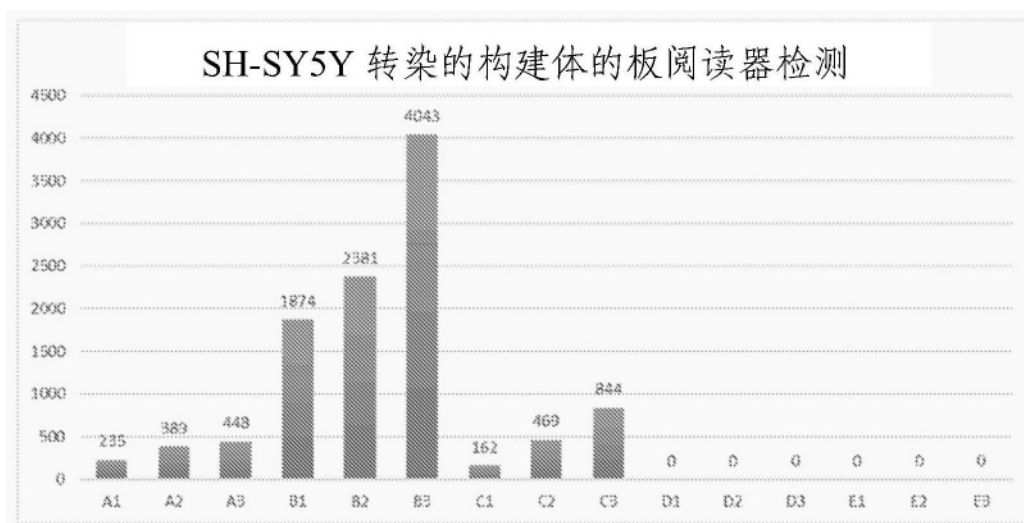


图11B

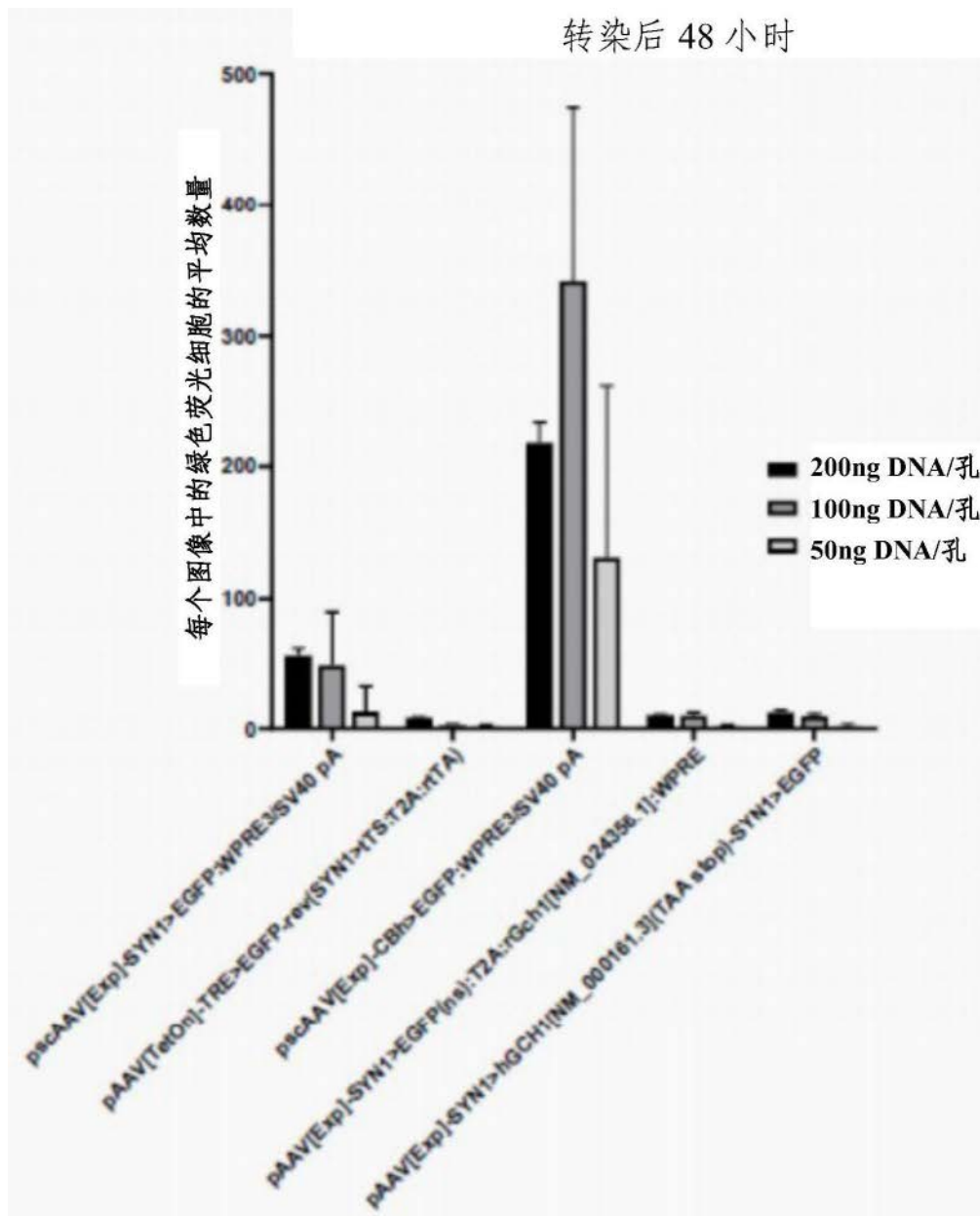


图12

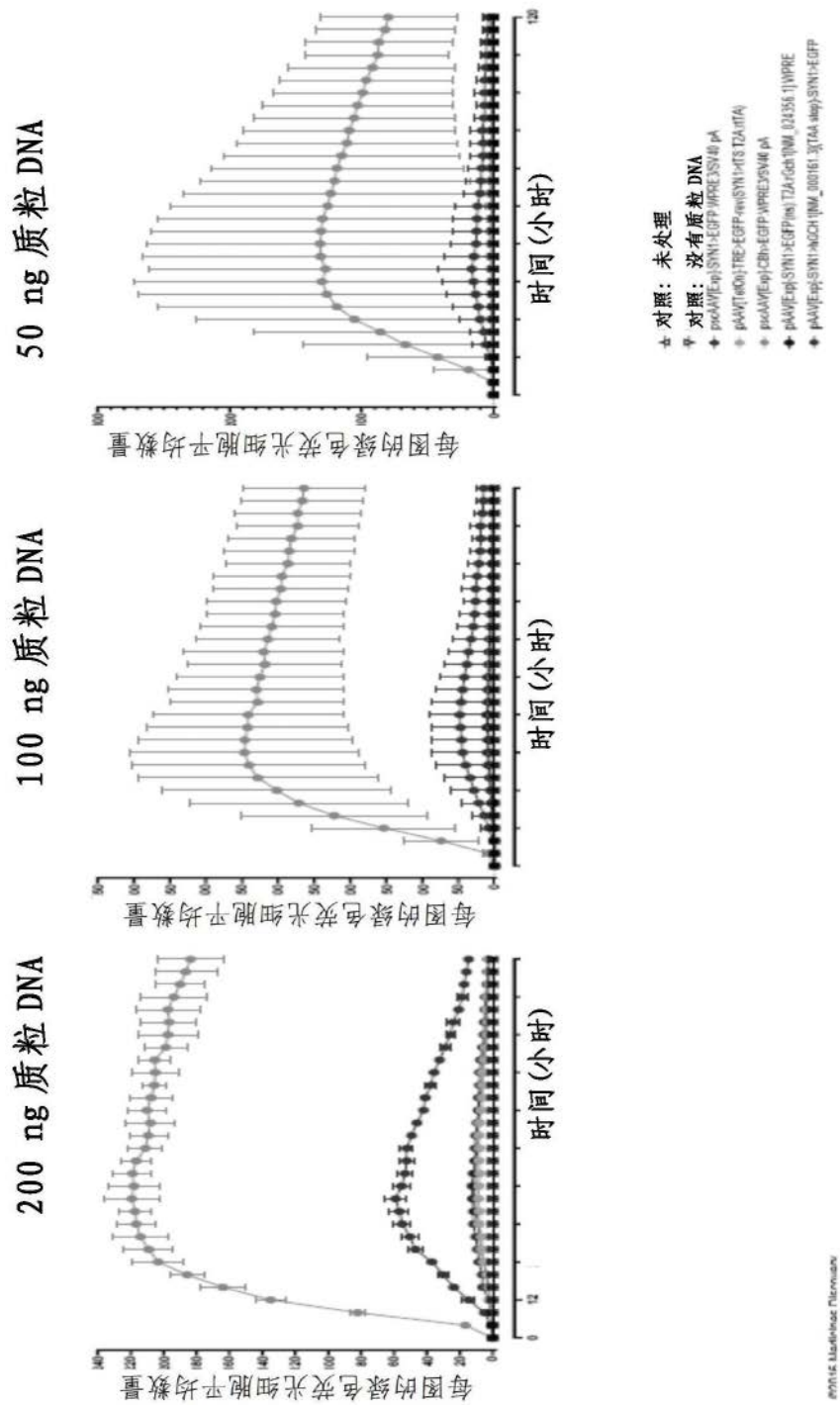


图13

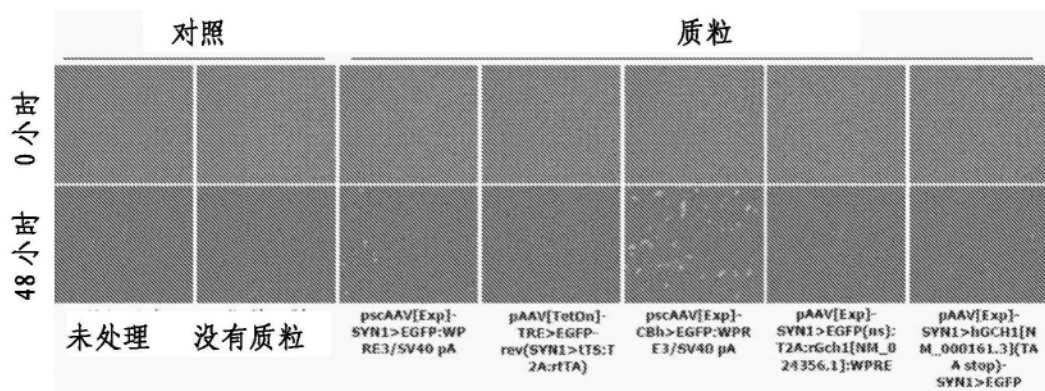


图14

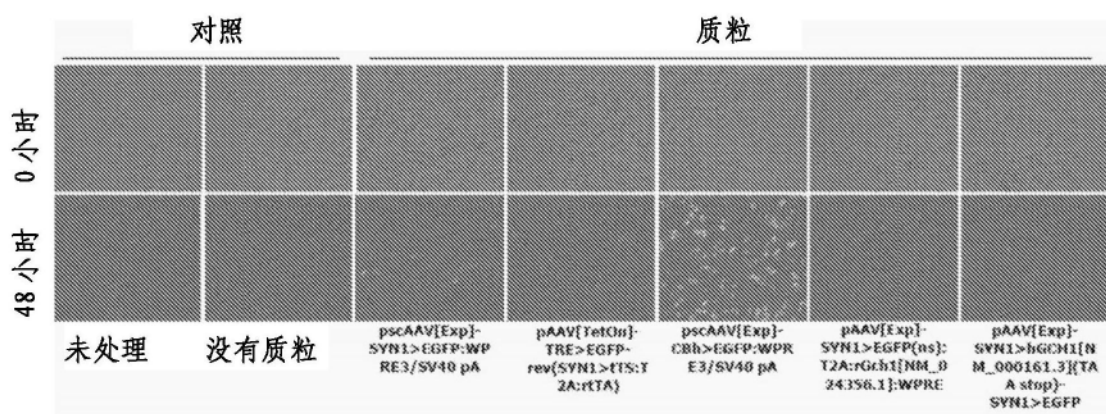


图15

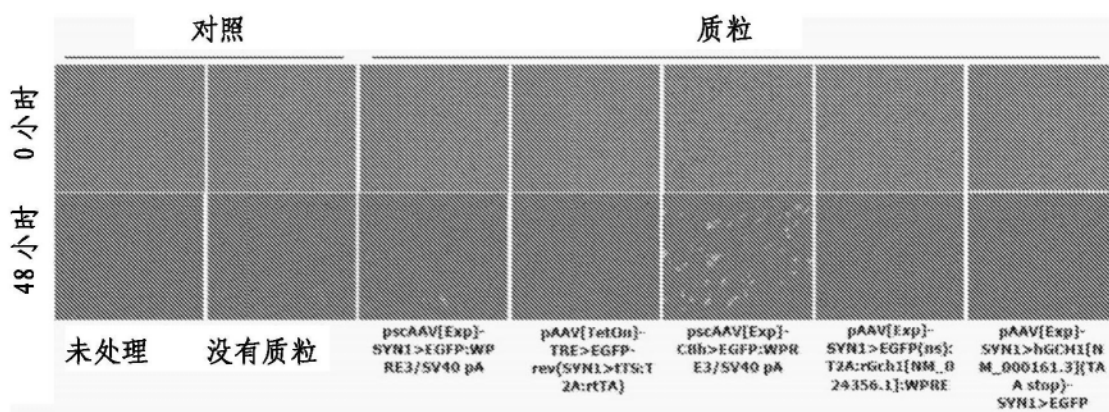


图16

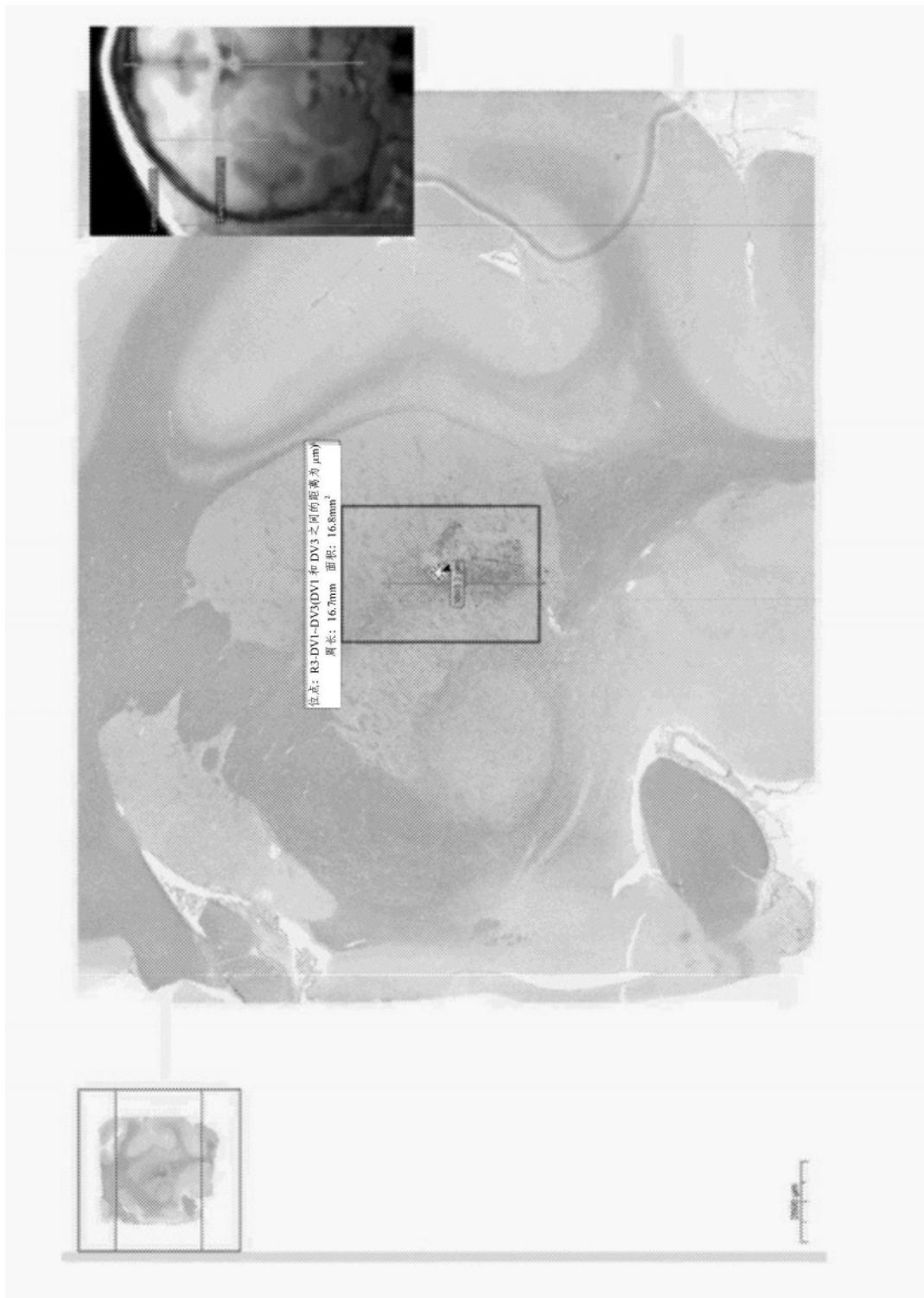


图17

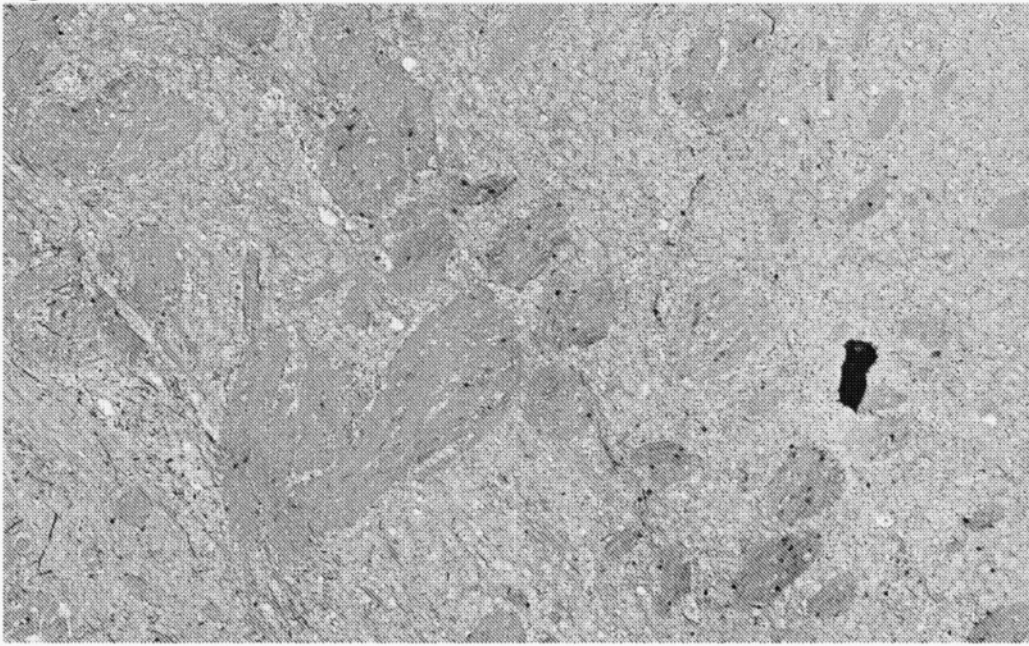


图18

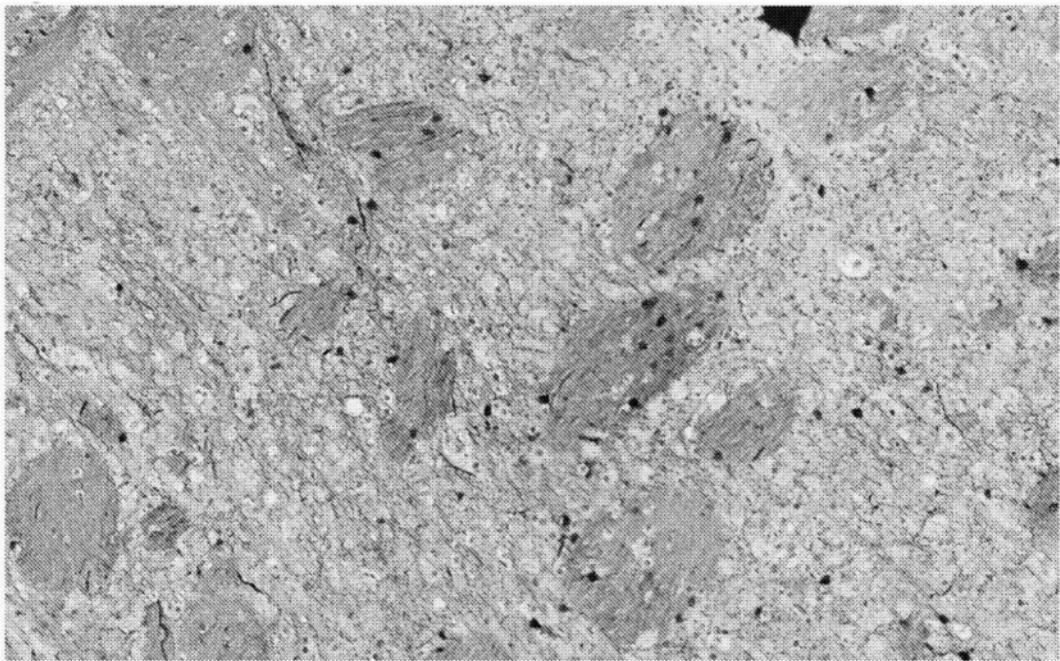


图19

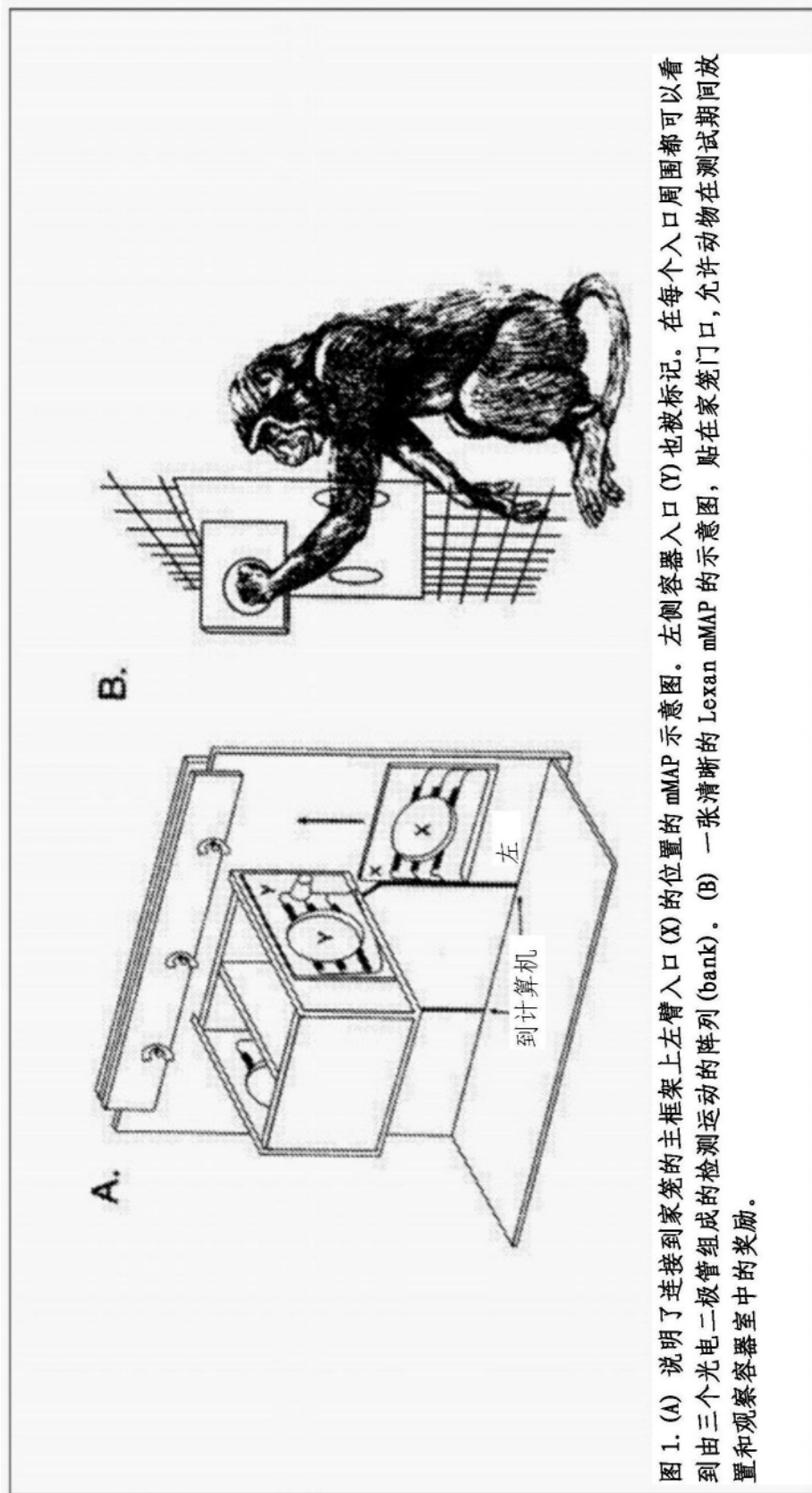


图 1. (A) 说明了连接到家笼的主框架上左臂入口 (X) 的位置的 mMAP 示意图。左侧容器入口 (Y) 也被标记。在每个入口周围都可以看到由三个光电二极管组成的检测运动的阵列 (bank)。 (B) 一张清晰的 Lexan mMAP 的示意图，贴在家笼门口，允许动物在测试期间放置和观察容器室中的奖励。

图20

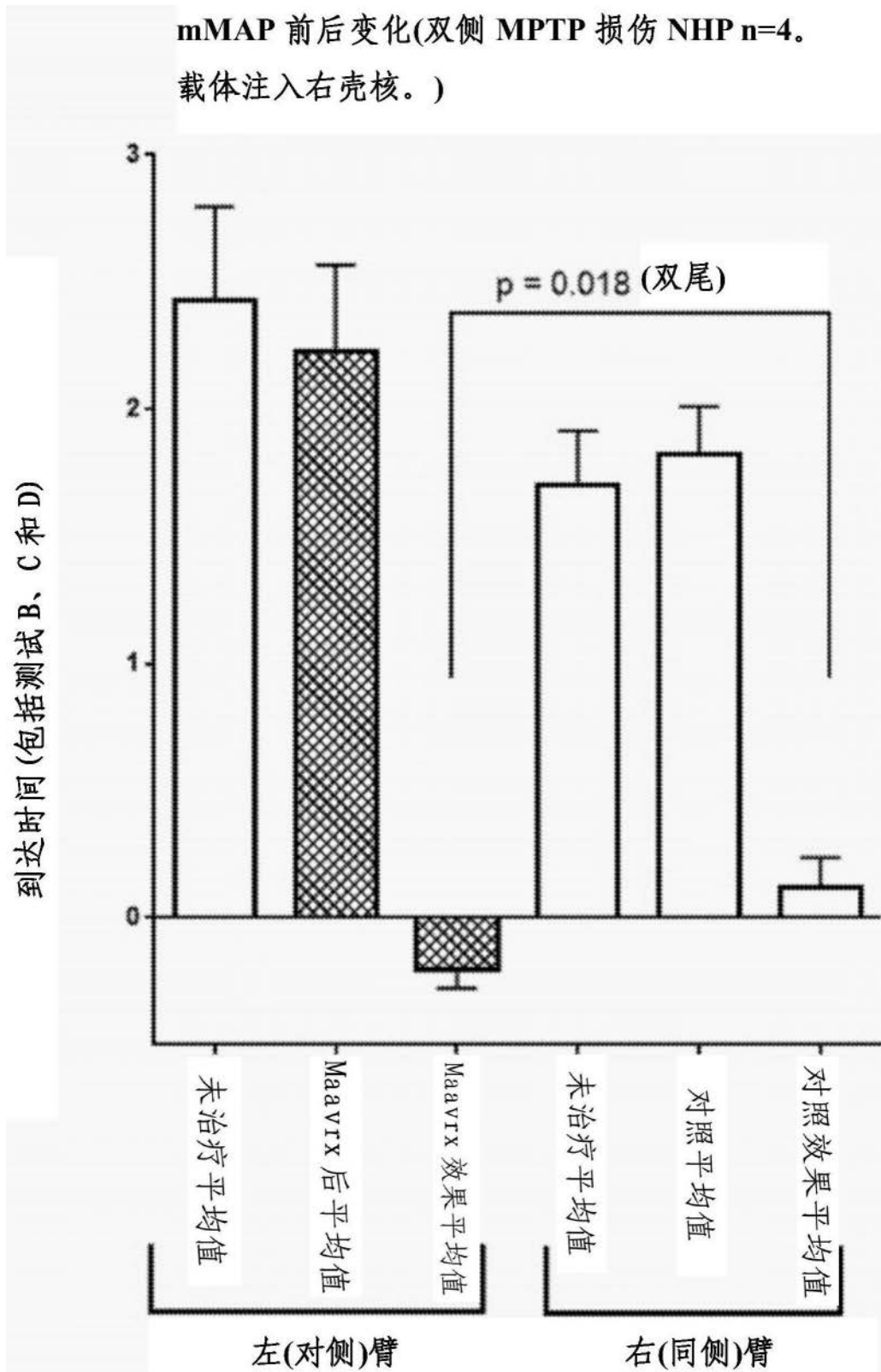


图21