



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108136048 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680045737.2

(22)申请日 2016.08.01

(30)优先权数据

62/200,151 2015.08.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/068315 2016.08.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/021359 EN 2017.02.09

(71)申请人 米奥多巴有限公司

地址 英国吉尔福德

(72)发明人 迈克尔·麦克唐纳德

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 张晶 李娟娟

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/86(2006.01)

C12N 15/864(2006.01)

权利要求书10页 说明书65页

序列表63页 附图9页

(54)发明名称

左旋多巴的系统合成和调节

(57)摘要

本发明涉及酶替代疗法用的表达系统,其旨在获得或维持左旋多巴在个体血液中的稳定含量,这通过全身投与所述表达系统来实现。本发明因此适用于治疗儿茶酚胺缺乏症,如多巴胺缺乏症,包括帕金森病。

1. 一种表达系统,包含:

第一聚核苷酸(N1),其在表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第一启动子,且其中所述生物活性是GCH1的酶活性;

和

第二聚核苷酸(N2),其在表达时编码酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第二启动子,且其中所述生物活性是TH的酶活性;

和

第三聚核苷酸(N3),其在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS,EC4.2.3.12)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第三启动子,且其中所述生物活性是PTPS的酶活性。

2. 根据权利要求1所述的表达系统,其中所述表达系统包含:

可操作地连接到至少一个第一启动子的聚核苷酸(N');其中N'在表达时编码第一多肽(P1)和第二不同多肽(P2);

和

可操作地连接到至少一个第二启动子的第二聚核苷酸(N''),其中N''在表达时编码第三多肽(P3);

其中P1、P2和P3是不同的,且

其中P1、P2和P3独立地选自由以下组成的群组:GCH1、TH和PTPS多肽,或其生物活性片段或变异体。

3. 根据权利要求2所述的表达系统,其中所述至少一个第一启动子是两个启动子。

4. 根据权利要求3所述的表达系统,其中所述两个启动子是相同的。

5. 根据权利要求3所述的表达系统,其中所述两个启动子是不同的。

6. 根据权利要求2所述的表达系统,进一步包含位于编码P1的所述聚核苷酸序列与编码P2的所述聚核苷酸序列之间的内部核糖体进入位点(IRES)。

7. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统包含可操作地连接到第一启动子的第一聚核苷酸,

其中所述第一聚核苷酸在表达时编码

第一多肽,

第二多肽和

第三多肽,

其中所述第一、第二和第三多肽独立地选自由以下组成的群组:GCH1多肽、TH多肽和PTPS多肽或其生物活性片段或变异体。

8. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述GTP-环水解酶1(GCH1)多肽与选自由以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少75%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少80%一致:SEQ ID NO:1、SEQ

ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少85%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少90%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少95%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少96%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少97%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少98%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少99%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽100%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

9. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述酪氨酸羟化酶 (TH) 多肽与选自自由以下组成的群组的多肽至少70%一致:或SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少75%一致:或SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少80%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少85%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少90%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少95%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少96%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少97%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少98%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少99%一致:SEQ ID NO:

40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自以下组成的群组的多肽100%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。

10.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)与SEQ ID NO:41至少70%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少75%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少80%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少85%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少90%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少95%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少96%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少97%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少98%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少99%一致,更优选与SEQ ID NO:41 100%一致。

11.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述GTP-环水解酶1(GCH1)多肽或其生物活性片段或变异体与选自以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

12.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述酪氨酸羟化酶(TH)多肽或其生物活性片段或变异体与选自以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。

13.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)多肽或其生物活性片段或变异体与SEQ ID NO:41至少70%一致。

14.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述片段或变异体的生物活性是选自以下组成的群组的所述相应全长酶的酶活性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:41。

15.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述生物活性片段是酪氨酸羟化酶(SEQ ID NO:12)和/或(SEQ ID NO:40)的催化域。

16.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述生物活性变异体是突变的酪氨酸羟化酶多肽,其中SEQ ID NO:7的残基S19、S31、S40或S404中的一个或多个已改变为另一个氨基酸残基。

17.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中编码GTP-环水解酶1(GCH1)多肽或其生物活性片段或变异体的所述核苷酸序列包含序列SEQ ID NO:20。

18.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中编码酪氨酸羟化酶(TH)多肽或其生物活性片段或变异体的所述第二核苷酸序列包含选自以下组成的群组的序列:SEQ ID NO:23、24、25、26和27。

19.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述第一启动子和所述第二启动子和所述第三启动子是不同启动子序列。

20.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述第一启动子和所述第二启动子和所述第三启动子是相同的启动子序列。

21. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是对哺乳动物细胞具有选择性的启动子。

22. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述哺乳动物细胞是对肝细胞、肌细胞和成肌细胞具有选择性的启动子。

23. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是组成型启动子。

24. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是选自由以下组成的群组的组成型活性启动子: MCK, 如p-MCK1350; 人类缓慢肌钙蛋白I基因增强子的多个拷贝、CAG、CBA、CMV、人类UbiC、RSV、EF-1 α 、SV40、Mt1、pGK、H1和/或U3。

25. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是诱导型启动子。

26. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是选自由以下组成的群组的诱导型启动子: Tet-开、Tet-关、Mo-MLV-LTR、Mx1、孕酮、RU486和/或雷帕霉素诱导型启动子。

27. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是LP1、hAPO-HCR和/或hAAT。

28. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子对肌肉细胞具有特异性。

29. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是选自由以下组成的群组的肌肉特异性启动子:

- a. 使用CMV启动子和SPc5-12元件的肌肉特异性组合或双重启动子,
- b. SPc5-12合成肌肉特异性启动子,
- c. 肌肉特异性肌酸激酶启动子或其缩写形式, 如dMCK或tMCK或p-MCK1350, 或所述人类缓慢肌钙蛋白I基因增强子的多个拷贝,
- d. CMV启动子,
- e. 肌肉CAT启动子,
- f. 骨架 α 肌动蛋白448启动子,
- g. a至f任一项中的任何活性类似物或片段。

30. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中在表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体的所述聚核苷酸可操作地连接到肝脏特异性启动子。

31. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中在表达时编码GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体的所述聚核苷酸可操作地连接到肝脏特异性启动子。

32. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是选自由以下组成的群组的肝脏特异性启动子: 肝脏启动子/增强子1 (LP1) 或其生物活性片段或变异体和/或杂合肝脏特异性启动子 (HLP) 或其生物活性片段或变异体。

33. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述启动子是肝脏特异性启动子, 所述肝脏特异性启动子与选自由SEQ ID NO:38 (HLP) 和/或SEQ ID NO:39 (LP1)

组成的群组的聚核苷酸至少70%一致;更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少75%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少80%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少85%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少90%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少95%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少96%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少97%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少98%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少99%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸100%一致。

34.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述启动子的表达模式由可全身性投与的药剂调控。

35.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是质体。

36.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是裸质体DNA。

37.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是封装于载体内的质体DNA。

38.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是载体。

39.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述载体是病毒载体。

40.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是合成载体。

41.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是粘质体载体。

42.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是人工染色体。

43.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统不包含编码芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)多肽的核苷酸序列。

44.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统具有1到40kb的封装容量,例如1到30kb,如1到20kb,例如1到15kb,如1到10kb,例如1到8kb,如2到7kb,例如3到6kb,如4到5kb。

45.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统具有4.5到4.8kb的封装容量。

46.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述病毒载体选自整合和非整合型病毒载体组成的群组。

47.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述病毒载体选自以下组成的群组:腺相关载体(AAV)、慢病毒载体、腺病毒载体和逆转录病毒载体。

48.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述病毒载体选自腺相关载体(AAV)、腺病毒载体和逆转录病毒载体组成的群组。

49. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述病毒载体是腺相关载体 (AAV)。

50. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV 载体是自互补 AAV (scAAV) 载体。

51. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中编码酪氨酸羟化酶的所述核苷酸序列是自互补序列。

52. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述腺相关载体 (AAV) 选自自由血清型 AAV5、AAV1、AAV6 和 AAV2 载体组成的群组。

53. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述腺相关载体 (AAV) 选自自由血清型 AAV8、AAV5、AAV2、AAV9 和 AAV7 载体组成的群组。

54. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV8 载体的基因组封装于除 AAV8 衣壳之外的 AAV 衣壳中, 如封装于 AAV5、AAV9、AAV7、AAV6、AAV2 或 AAV1 衣壳中。

55. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV7 载体的基因组封装于除 AAV7 衣壳之外的 AAV 衣壳中, 如封装于 AAV8、AAV9、AAV5、AAV6、AAV2 或 AAV1 衣壳中。

56. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV6 载体的基因组封装于除 AAV6 衣壳之外的 AAV 衣壳中, 如封装于 AAV8、AAV9、AAV7、AAV5、AAV2 或 AAV1 衣壳中。

57. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV5 载体的基因组封装于除 AAV5 衣壳之外的 AAV 衣壳中, 如封装于 AAV8、AAV9、AAV7、AAV6、AAV2 或 AAV1 衣壳中。

58. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV2 载体的基因组封装于除 AAV2 衣壳之外的 AAV 衣壳中, 如封装于 AAV8、AAV9、AAV7、AAV6、AAV5 或 AAV1 衣壳中。

59. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述 AAV1 载体的基因组封装于除 AAV1 衣壳之外的 AAV 衣壳中, 如封装于 AAV8、AAV9、AAV7、AAV6、AAV2 或 AAV5 衣壳中。

60. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述表达系统是能够感染、转染或转导哺乳动物细胞的载体。

61. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述哺乳动物细胞是肝脏细胞, 如肝细胞。

62. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述哺乳动物细胞是肌肉细胞, 如肌细胞或肌肉细胞前体, 如成肌细胞。

63. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述生物活性片段包含至少 100 个邻接氨基酸, 其中所述所选序列中说明的任何氨基酸改变为不同氨基酸, 条件是所述序列中如此改变的氨基酸残基不超过 10 个。

64. 根据权利要求 60 所述的表达系统, 其中所述片段的酶活性是所述全长酶的酶活性的至少 10%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 20%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 30%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 40%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 50%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 60%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 70%, 优选是至少所述全长酶的酶活性的 80%, 优选是所述全长酶的酶活性的至少 95%, 优选与所述全长酶的酶活性基本上相同。

65. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述表达系统是选自包含以下的群组的载体: SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID

NO:35、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37。

66.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,进一步包含一个或多个聚腺苷酸化序列。

67.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述一个或多个聚腺苷酸化序列是SV40聚腺苷酸化序列。

68.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述SV40聚腺苷酸化序列或序列具有选自SEQ ID NO:21和22组成的群组的序列。

69.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述聚腺苷酸化序列可操作地连接到编码所述TH和/或GCH-1的所述核酸序列的3'端。

70.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,进一步包含转录后调控元件。

71.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述转录后调控元件是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

72.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件包含序列SEQ ID NO:28或29。

73.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,进一步包含内含子。

74.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,进一步包含内含子,其中所述内含子可操作地连接到所述TH和/或GCH-1转录物的5'端。

75.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述比率是通过测量样品中的所表达TH和GCH1酶的活性来测定,所述样品来自经根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统转染或转导的样品宿主。

76.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述TH:GCH1比率是通过测量样品中的四氢生物蝶呤(BH₄)含量来测定,所述样品来自经根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统转染或转导的样品宿主。

77.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述TH:GCH1比率是依据样品中的所转录的mRNA的量来测定,所述样品来自经根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统转染或转导的样品宿主。

78.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述TH:GCH1比率是依据样品中的所表达的蛋白质的量来测定,所述样品来自经根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统转染或转导的样品宿主。

79.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是最小整合型表达系统。

80.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述表达系统是能够感染、转染或转导哺乳动物细胞的载体,所述哺乳动物细胞如肌肉细胞,如肌细胞或肌肉细胞前体,如成肌细胞。

81.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,进一步包含第四聚核苷酸。

82.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述第四聚核苷酸在表达时编码能够报告编码TH、GCH1或PTPS的所述聚核苷酸中的至少一种的表达的报告体。

83.根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统,其中所述报告体是荧光蛋白,如GFP或eGFP。

84. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述第四聚核苷酸在表达时编码转运蛋白, 如囊泡单胺转运体 (VMAT)。

85. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统, 其中所述第四聚核苷酸在表达时编码 VMAT 抑制剂。

86. 一种经分离的宿主细胞, 其被根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统转导或转染。

87. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的宿主细胞, 其中所述细胞是真核细胞。

88. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的宿主细胞, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

89. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的宿主细胞, 其中所述细胞是灵长类动物细胞。

90. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的宿主细胞, 其中所述细胞是人类细胞。

91. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的宿主细胞, 其中所述细胞选自肝细胞、肌细胞和成肌细胞组成的群组。

92. 一种医药组合物, 其包含根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统或宿主细胞。

93. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 用于医学用途。

94. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法中, 其中所述表达系统在周边投与。

95. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 其中所述用途包含获得和/或维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度。

96. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 用于维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法中, 所述方法包含在有需要的人的周边投与所述表达系统。

97. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进一步包含以全身投与治疗有效量的左旋多巴作为投与所述表达系统或所述宿主细胞的补充。

98. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进一步包含投与治疗有效量的四氢生物蝶呤 (BH₄) 或其类似物。

99. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进一步包含投与治疗有效量的四氢生物蝶呤 (BH₄) 类似物, 其中所述类似物是沙普蝶呤。

100. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进一步包含投与治疗有效量的周边脱羧酶抑制剂。

101. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进一步包含投与治疗有效量的周边脱羧酶抑制剂, 所述抑制剂选自苄丝肼和卡比多巴组成的群组。

102. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进一步包含投与治疗有效量的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂。

103. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物, 进

一步包含投与治疗有效量的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂,所述抑制剂选自由托卡朋、恩他卡朋和硝替卡朋组成的群组。

104. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和其类似物的所述投与是全身投与。

105. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和其类似物的所述投与是肠内或肠胃外投与。

106. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和其类似物的所述投与是经口、静脉内或肌肉内投与。

107. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述表达系统的所述周边投与是在CNS外部进行的肠胃外投与。

108. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和其类似物的所述投与是肢体隔离灌注。

109. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述表达系统的所述周边投与是肌肉内投与。

110. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述表达系统的所述周边投与是静脉内投与。

111. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述表达系统的所述静脉内投与是在门静脉中进行。

112. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述表达系统的所述周边投与是肝内投与。

113. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述表达系统的所述周边投与是皮下投与。

114. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述儿茶酚胺机能不良是儿茶酚胺缺乏症。

115. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述儿茶酚胺缺乏症是多巴胺缺乏症。

116. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中与儿茶酚胺机能不良相关的所述疾病是中枢和/或周边神经系统的疾病、病症或损伤。

117. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中中枢和/或周边神经系统的所述疾病、病症或损伤是神经退化性病症。

118. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中与儿茶酚胺机能不良相关的所述疾病是基底神经节的疾病。

119. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其用于治疗选自由以下组成的群组的疾病的方法中: 帕金森病 (PD); 运动障碍, 包括左旋多巴诱发性运动障碍 (LID); 多巴反应肌张力障碍; ADHD; 精神分裂症; 抑郁症; 血管型帕金森氏症; 原发性震颤; 慢性应激; 基因多巴胺受体异常; 长期类鸦片、可卡因、酒精或大麻服用; 肾上腺不足; 高血压; 低血压; 去甲肾上腺素缺乏症; 创伤后应激障碍; 病态性赌博症; 痴呆症; 路易体性痴呆症和遗传性酪氨酸羟化酶缺乏症。

120. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,用于治疗以下的方法:帕金森病;非典型帕金森病,包括如多发性系统萎缩症、进行性核上麻痹、血管或动脉硬化帕金森病、药物诱发帕金森氏症和GTP环水解酶1缺乏症等病状,和/或因多巴胺缺乏症所致的任何肌张力障碍病状。

121. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物,其中所述神经退化性病症是帕金森病(PD)。

122. 一种维持左旋多巴在患者血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含向所述患者投与根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物。

123. 一种用于减少、延迟和/或预防左旋多巴诱发型运动障碍(LID)出现的方法,所述方法包含在有需要的患者的周边投与根据权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物。

124. 一种获得和/或维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含在周边投与所述表达系统、所述宿主细胞或所述医药组合物。

125. 一种获得和/或维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含在周边投与包含在表达时编码至少一种治疗多肽的核苷酸序列的载体,其中所述至少一种治疗多肽是酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽,或其生物活性片段或变异体。

126. 一种治疗或预防儿茶酚胺机能不良的方法,所述儿茶酚胺机能不良如帕金森病或左旋多巴诱发型运动障碍,所述方法包含在周边投与根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞或医药组合物。

127. 根据权利要求126所述的方法,其中所述表达系统通过肢体隔离灌注投与。

128. 根据权利要求127所述的方法,其中所述肢体隔离灌注包含至少一个将所述表达系统注入肌肉或静脉中的步骤。

129. 根据权利要求125到128中任一权利要求所述的方法,其中在肌肉中注射所述表达系统、所述宿主细胞或所述医药组合物至少两次。

130. 根据权利要求125到128中任一权利要求所述的方法,其中在静脉中注射所述表达系统、所述宿主细胞或所述医药组合物至少一次。

131. 一种试剂盒,包含根据前述权利要求中任一权利要求所述的表达系统、宿主细胞和/或医药组合物,以及使用说明书。

左旋多巴的系统合成和调节

[0001] 本申请中所引用的所有专利和非专利参考文献均以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含聚核苷酸序列的表达系统,所述聚核苷酸序列编码有差异地表达于目标细胞中的多肽;且所述表达系统周边投与有需要的患者用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的医学病状,具体地说,与多巴胺缺乏症相关的疾病,如帕金森病和相关病症,包括左旋多巴诱发运动障碍。

背景技术

[0003] 帕金森病(PD)是一种普通神经退化性疾病,其在临床上的特征为静止性震颤、硬度、自主运动缓慢和姿势不稳。黑质致密部(SNpc)内的多巴胺能神经元损失、神经元内细胞质包涵体或“路易小体”神经胶质过多症和纹状体多巴胺耗竭是主要的神经病理学发现。除与占病例10%的特定基因缺陷有关的遗传病例之外,PD是病因不明的偶发性病状。

[0004] 多巴胺不能穿越血脑屏障。纹状体多巴胺缺失不能通过周边投与多巴胺来解决。多巴胺(DA)前体L-3,4-二羟基苯丙氨酸(左旋多巴)疗法是针对帕金森病的最有效疗法。然而,虽然治疗反应初始极佳,但在多年期间,大部分患者出现治疗相关的不良作用,如左旋多巴诱发运动障碍。(Obeso, Olanow和Nutt,2000)(Ahlskog和Muentner,2001)。这些并发症被认为起因于超敏感DA受体对纹状体神经元的间歇性和脉冲式刺激。(Chase,1998)(Nutt, Obeso和Stocchi,2000)。

[0005] 黑质多巴胺神经元按约4个循环/秒的稳定速率紧张放电。提供意外或奖励性的刺激物(如食物)后,这种背景放电被相位爆发短暂中断。由于神经传递素释放数量通常反映了神经元放电速率,因此纹状体多巴胺浓度保持在相当窄的范围内,且黑质纹状体突触处的多巴胺受体被暴露于浓度相当稳定的其同源神经传递素。随着黑质纹状体多巴胺能神经元的去神经支配增加,暴露于由外源多巴形成的纹状体多巴胺变得越来越短暂,且多巴胺浓度的相对升高和下降的幅度大于生理上发生的幅度。在早期疾病中,口服后多巴递送随之发生不可避免的变化,这在很大程度上被忽视,且大部分患者持久受益。这种稳定反应反映了残余多巴胺能神经元的足以存活的补体存在于早期帕金森病中保护了纹状体不受脑多巴变化的影响。

[0006] 随着治疗继续进行,左旋多巴的药物动力学特性开始呈现更大的临床相关性,且依据90分钟半衰期预测的较短期运动反应变得明显。

[0007] 使用十二指肠(Syed,Murphy,Zimmerman,Mark和Sage,1998)(Nyholm等人,2003)或静脉内(Mouradian,Heuser,Baronti和Chase,1990)输注左旋多巴或皮下输注DA受体促效剂阿朴吗啡(apomorphine)(Poewe和Wenning,2000)进行的连续DA受体刺激已表明使帕金森病患者的异常非自主运动的频率和严重程度显著降低。

[0008] 左旋多巴/卡比多巴(carbidopa)的凝胶配方通过经皮管和便携泵连续递送至十

十二指肠内使得血浆浓度比口服药物疗法更恒定。所述疗法(复方多巴(Duodopa))在美国和欧盟中已根据罕用药豁免予以批准并且目前用于约800位患者。这种疗法的证据基础仍在发展。Nyholm进行了随机化交叉研究且证明十二指肠左旋多巴输注在缩短重度运动障碍的关闭期和开启时间方面优于口服多重用药。(Nyholm等人,2005)这种对症好处已在开放标记研究中证实(Nilsson,Nyholm和Aquilonius,2001),(Nyholm等人,2008)。最近,(Antonini,Chaudhuri,Martinez-Martin,和Odin,2010)展望评估了所述疗法对九位晚期帕金森病患者的健康相关生活品质的长期影响。所述疗法明显缩短了关闭期和运动障碍的每日持续时间。这使得PDQ-39的四个领域(运动性、ADL、病的特征和身体不适)出现明显改善。(Wolters,Lees,Volkman, van Laar,和Hovestadt,2008)。

[0009] 复方多巴针对PD的药物动力学-药效学研究指出50%效果下的浓度为1.55mg/L左旋多巴(Westin等人,2011)。使用肠内输注左旋多巴甲酯的类似研究通过3000-4000ng/mL左旋多巴的血浆含量实现了PD和运动障碍控制的改善。

[0010] 将病毒载体直接注入帕金森病脑中使得以脑中的特定靶点为中心,即,在DA耗竭的纹状体中,局域连续产生左旋多巴。通过使用DA合成酶酪氨酸羟化酶(TH)的纹状体内基因转移的活体内基因疗法实现局域左旋多巴递送已经作为帕金森病的潜在治疗性干预加以研究(Horellou等人,1994)(Kaplitt等人,1994)。已表明除非将TH表达和四氢生物蝶呤(TH的辅因子)的外源投与组合或其限速合成酶GTP环水解酶1(GCH1)的共表达组合,否则多巴产生水平极低(Mandel,Spratt,Snyder,和Leff,1997)(Bencsics等人,1996)(Corti等人,1999)。迄今为止最有希望的长期结果已使用重组腺相关病毒(rAAV)载体获得(Mandel等人,1998)(Kirik,Rosenblad,和Björklund,1998),(Szczypka等人,1999)。

[0011] 已表明纹状体内注射编码TH和GCH1基因的高效价rAAV载体能够使通过注射6-羟基多巴胺(6-OHDA)而呈现帕金森氏病的大鼠出现明显的行为恢复,条件是纹状体多巴产生水平超过临界阈值(Kirik等人,2002)。进一步的研究指出,rAAV介导多巴合成酶TH和GCH1在纹状体中的表达能够消除左旋多巴诱导大鼠帕金森病模型发生的运动障碍。使用rAAV-TH和rAAV-GCH1载体的活体内基因疗法具有双重作用:(i)缓解全身间歇性左旋多巴治疗所诱发的运动障碍;和(ii)几乎完全逆转病灶诱发的自发运动行为缺陷。这些变化与纹状体类鸦片基因表达的正常化和异常DFosB表达的逆转相关,两者均被认为是左旋多巴治疗所诱发的可塑性适应不良的标志。(Carlsson等人,2005)。

[0012] 帕金森病的疗法改进允许通过不需要干预性脑外科手术、终身静脉内输注或不需要外科植入经皮内窥镜胃造口管的途径来实现左旋多巴的长期恒定投与,所述各种投药途径带来风险和并发症。

[0013] 虽然直接产生于预定使用部位具有许多优点(剂量需求最少且不存在周边效应),但投药途径需要神经外科手术。纹状体内注射的要求可能限制了临床上应用于预期受益于所述干预的一小群患者。目前的神经外科机构和神经外科医生不足以确保所有合格患者均能够用此类方法治疗。

发明内容

[0014] 使治疗或亚治疗含量的左旋多巴直接连续分泌到周边循环中将避开与肠内投药相关的问题,包括肠道中发生不想要的脱羧基和因所摄食物、幽门螺旋杆菌感染、肠道活动

性和胃酸性变化、饮食中性氨基酸竞争跨越肠道壁吸收以及肠道菌群所形成多巴代谢物引起的吸收不一致。

[0015] 虽然使治疗含量的左旋多巴直接连续分泌到血管系统中可能是最优的,但亚治疗含量的连续分泌仍可能有价值,从而促使纹状体多巴胺的恒定背景含量足以防止或延迟运动障碍的发展且使达到功效所需的口服左旋多巴补充剂的剂量降到最低。

[0016] 已提出使一种或多种周边组织(如肝脏或肌肉)能够连续分泌左旋多巴到周边循环中,而不是通过肠道或肠胃外方式连续输注左旋多巴。这是通过将允许分泌左旋多巴的基因引入目标组织来实现。酪氨酸羟化酶 (TH) 催化酪氨酸羟基化而产生左旋多巴且需要四氢生物蝶呤 (BH4) 作为辅因子。BH4生物合成可能需要GTP环水解酶1 (GCH1)。

[0017] 各种含量的左旋多巴分泌到周边循环中将减少因多巴胺缺乏所致的病状(如帕金森病)对其它形式的多巴胺能疗法(如口服左旋多巴或多巴胺促效剂)的需求。最优的左旋多巴分泌水平将免除对额外多巴胺促效剂的需要。左旋多巴分泌水平即使小于最优也减少额外促效剂的剂量。这能够减少与针对多巴胺缺乏症使用口服或肠胃外左旋多巴或多巴胺促效剂或其它疗法相关的不良事件。

[0018] 口服和肠胃外左旋多巴疗法和多巴胺能促效剂(如左旋多巴)诱发性运动障碍和开/关综合症的令人麻烦的并发症据信是因为这些药剂在口服或肠胃外给药之后出现药物动力学峰值和谷值水平的波动。实现左旋多巴按治疗或亚治疗水平恒定分泌到周边循环中将使得血浆左旋多巴的基线含量提高且促进其它多巴胺能药剂剂量的减少,从而减少峰谷变化。

[0019] 本发明的目的是开发新颖的病症治疗分子工具,其中当前治疗策略不充分或其中当前疗法与重度副作用相关及/或其中所治疗个体产生针对所述疗法的抗性。更具体地说,本发明涉及一种新颖表达构筑体,其调节儿茶酚胺生物合成中所涉及的酶的含量,因此适用于使有需要的受试者恢复到正常儿茶酚胺平衡的方法中。

[0020] 具体地说,本发明涉及所述表达构筑体的用途,其用于治疗神经病症、优选不可治愈的退行性神经病症的方法中,其中大部分患者在延长的治疗期间经历减弱的治疗反应和增加的不良事件。

[0021] 本发明主要涉及帕金森病和左旋多巴诱发性运动障碍 (LID) 的治疗,其中当前治疗策略涉及投与左旋多巴或其它多巴胺受体刺激剂。现行治疗方案主要对疾病的早期有效,但在延长的治疗期间,大部分患者产生左旋多巴诱发性运动障碍。运动障碍的发展据信与左旋多巴或其它多巴胺受体刺激剂的非连续递送相关。因此,本发明的一个主要目标是通过在需要时按减轻任何不良作用的连续速率局部供应治疗尤其帕金森病所需的化合物来改进当前疗法。

[0022] 本发明涉及表达系统,包含在周边组织中投与以便调节全身左旋多巴含量的表达系统。

[0023] 在一个方面中,本发明涉及一种表达系统,其包含:

[0024] 表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0025] 和/或

[0026] 表达时编码GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体

的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子。

[0027] 在一个方面中,本发明涉及一种表达系统,其包含:

[0028] 第一聚核苷酸(N1),其在表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第一启动子,且其中所述生物活性是GCH1的酶活性;

[0029] 和

[0030] 第二聚核苷酸(N2),其在表达时编码酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第二启动子,且其中所述生物活性是TH的酶活性;

[0031] 和

[0032] 第三聚核苷酸(N3),其在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS,EC 4.2.3.12)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第三启动子,且其中所述生物活性是PTPS的酶活性。

[0033] 在一个方面中,本发明涉及一种经分离的宿主细胞,其由上文中所定义的表达系统转导或转染。

[0034] 在另一个方面中,本发明涉及一种医药组合物,其包含上文中所定义的表达系统,且任选地包含医药学上可接受的盐、载剂或佐剂。

[0035] 在一个方面中,本发明涉及一种如上文所定义的用于医学用途的表达系统。

[0036] 在另一方面中,本发明涉及如上文所定义的表达系统,其用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法中,其中所述表达系统在周边投与,即,在CNS外部投与。

[0037] 在另一个方面中,本发明涉及包含一种或多种核苷酸序列的表达系统,所述表达系统在表达时编码一种或多种选自由以下组成的群组的多肽:

[0038] 酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体;和/或

[0039] GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体;

[0040] 所述表达系统用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法中,其中所述表达系统在周边投与。

[0041] 本发明在另一个方面中涉及一种维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含在有需要的人的周边投与(即,在CNS外部投与)上文中所定义的表达系统。

[0042] 在另一个方面中,本发明涉及一种治疗和/或预防与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法,所述方法包含在有需要的人、在有需要的患者的周边投与治疗有效量的上文中所定义表达系统。

[0043] 在又另一个方面中,本发明涉及一种维持左旋多巴在患者血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含向所述患者投与如上文所定义的表达系统。

[0044] 在又另一个方面中,本发明涉及一种减少、延迟和/或防止左旋多巴诱发性运动障碍(LID)出现的方法,所述方法包含在有需要的患者的周边投与上文中所定义的表达系统。

[0045] 在又另一个方面中,本发明涉及一种获得和/或维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含在周边投与包含核苷酸序列的表达系统,所述表达系统在表达时编码至少一种治疗多肽,其中所述至少一种治疗多肽是酪氨酸羟化酶(TH;EC1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体。

[0046] 在一个方面中,本发明涉及一种试剂盒,其包含上文所定义的医药组合物和使用说明书。

附图说明

[0047] 图1:左旋多巴生物合成概述

[0048] 图2:用于在肝脏中连续合成左旋多巴的AAV载体。A) 双顺反子载体: ITR=反向末端重复序列, LP1=肝脏启动子/增强子1, HLP=杂合肝脏特异性启动子(参见McIntosh J等人,《血液(Blood)》2013 121 (17) 3335-3344), tTH=截断的酪氨酸羟化酶(SEQ ID NO:24), GCH1=GTP环水解酶1(SEQ ID NO:20), WPRE=土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(SEQ ID NO:28或29)。B-E) 单顺反子载体。HLP:短肝脏特异性启动子(McIntosh J等人,《血液》2013年4月25日;121 (17):3335-44)与LP1同样强。

[0049] 图3:动物研究。A) 小鼠随机分成3组各6只动物。第一天,动物相应地不接受治疗(未经治疗),或接受如表A中所详述的病毒载体。B) 小鼠随机分成2组各2只动物。第一天,动物接受如表B中所详述的病毒载体。A)和B):第28天,小鼠接受10mg/kg 苄丝肼(beserazide)以阻断左旋多巴的脱羧基和COMT抑制剂以阻断儿茶酚-O-甲基转移酶使左旋多巴发生代谢,一小时之后处死且收集血浆用于左旋多巴分析和肝脏用于免疫组织化学。COMT抑制剂的预定剂量是30mg/g托卡朋(tolcapone)投与两次(4小时和1小时),随后处死且收集血浆用于左旋多巴分析。C) 实验配置的说明:尾静脉注射之后为第28天低剂量的苄丝肼和恩他卡朋(entacapone),1小时之后处死且收获器官。

[0050] 图4:GCH1染色。A) 来自未经治疗的小鼠或经总剂量为 7.02×10^{10} vg/小鼠的表达载体scAAV-LP1-GCH1和/或scAAV-LP1-tTH治疗的小鼠的肝脏切片,如关于图3A所述。切片表明转导<1%。B) 来自未经治疗的小鼠或经总剂量为 3.6×10^{12} vg/小鼠的表达载体scAAV-HLP-GCH1和scAAV-HLP-tTH治疗的小鼠的肝脏切片,如关于图3B所述。切片表明转导为约25%。

[0051] 图5:动物研究-小鼠血浆左旋多巴浓度。小鼠血浆左旋多巴含量。A) 是指示平均左旋多巴含量的表格,而B) 描绘了指示所有测试小鼠的左旋多巴含量的图。所述群组如下治疗:

[0052] A:无载体(对照)

[0053] B:scAAV-LP1-tTH(3.5×10^{10})+scAAV-LP1-GCH1(3.5×10^{10})

[0054] C:scAAV-LP1-tTH(7.0×10^{10})

[0055] D:scAAV HLP-tTH(1.8×10^{12})+scAAV HLP-GCH1(1.8×10^{12})

[0056] E:scAAV-HLP-tTH(3.6×10^{12})

[0057] 载体是通过静脉内注射来投与。给药之后28天,用苄丝肼(10mg/kg)和恩他卡朋治疗之后一小时收集血浆。

[0058] 图6:动物研究-H&E染色。来自未经治疗的小鼠或经总剂量为 3.6×10^{12} vg/小鼠的表达载体scAAV-HLP-GCH1和/或scAAV-HLP-tTH治疗的小鼠的肝脏切片(如关于图3B所述)用苏木精和曙红染色。染色表明没有组织损伤或白细胞浸润的迹象。

[0059] 图7:双顺反子构筑体的同源重组。在双顺反子ITR-LP1-GCH1-LP1-tTH-WPRE-ITR载体产生期间,在共同LP1位点发生的同源重组还引起单顺反子ITR-LP1-tTH-WPRE-ITR的产生。

[0060] 图8:三顺反子表达系统。此图表示本发明的表达系统的一个实例。所述系统是三顺反子。TH基因处于组成型启动子EF-1 α 的控制下,且包含IRES和编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)的序列。ITR:反向末端重复序列。WPRE:土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件。

具体实施方式

[0061] 定义

[0062] 双顺反子:如本文所用,术语“双顺反子”可以指表达系统、载体或质体。双顺反子质体或载体包含位于单一质体或载体内的两种基因。双顺反子表达系统係指包含至少一种双顺反子质体或至少一种双顺反子载体的表达系统。

[0063] 生物活性:术语‘生物活性’当在本文中结合由本发明的表达系统构筑体编码的酶使用时,是指所述酶的酶活性,意指催化某种酶反应的能力。具体地说,生物活性可以指酪氨酸羟化酶(TH)、GTP环水解酶(GCH-1)或6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)或由本发明的表达系统编码且可能有助于实现治疗效果的任何其它酶的酶活性。

[0064] 生物活性片段:如本文所用,术语“生物活性片段”是指多肽(包括酶)的一部分,其分享全长多肽的生物活性。所述片段的生物活性可以小于、大于或等于原生全长多肽的酶活性。多肽的生物活性片段包括与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、40、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18中的任一种具有至少70%序列一致性的片段。所指定多肽的生物活性片段还包括其中已缺失所述多肽的氨基酸残基的不超过30%的片段,如已缺失所述多肽的氨基酸残基的不超过29%,例如不超过28%,如不超过27%,例如不超过26%,如不超过25%,例如不超过24%,如不超过23%,例如不超过22%,如不超过21%,例如不超过20%,如不超过19%,例如不超过18%,如不超过17%,例如不超过16%,如不超过15%,例如不超过14%,如不超过13%,例如不超过12%,如不超过11%,例如不超过10%,如不超过9%,例如不超过8%,如不超过7%,例如不超过6%,如不超过5%,例如不超过4%,如不超过3%,例如不超过2%,如不超过1%。

[0065] 生物活性变异体:如本文所用,术语“生物活性变异体”是指蛋白质(如酶)的多肽部分,其具有与原生全长蛋白质相同的生物活性。所述片段的生物活性可以小于、大于或等于原生全长多肽的酶活性。

[0066] 儿茶酚胺机能不良:如本文所用,术语儿茶酚胺机能不良是指儿茶酚胺合成、调节、储存、释放、吸收或代谢相较于健康个体的相同参数的异常。具体地说,儿茶酚胺机能不良是多巴胺机能不良,如多巴胺缺乏症。所属领域的技术人员能够诊断出儿茶酚胺机能不良。

[0067] 认知障碍:本文中所用的术语‘认知障碍’是指一种心理功能不良病状,其与意识模糊、健忘和集中注意力困难相关。

[0068] 表达:术语编码多肽的核酸序列的‘表达’意指核酸序列作为mRNA转录和/或所述核酸序列的转录和转译,从而产生所述蛋白质。

[0069] 表达盒:如本文所用,术语‘表达盒’是指一种基因组序列,其提供引起蛋白质活体内合成所需的所有元件。这可以包括(但不必限于)驱动DNA转录成mRNA的序列(即,启动子序列)、包括所关注蛋白质的基因组序列的开放阅读框架,和允许mRNA聚腺苷酸化的3’非转译区。

[0070] 表达系统:如本文所用,术语‘表达系统’是指一种专门设计的系统,其用于产生基因产物,具体地说,多肽。表达系统包含在表达时编码多肽的核苷酸序列。表达系统可以是(但不限于)载体,如病毒载体,例如AAV载体构筑体。

[0071] 在哺乳动物细胞中具有功能:如本文所用,术语‘在哺乳动物细胞中具有功能’是指一种序列,例如核苷酸序列,如表达系统,其当引入哺乳动物细胞中时引起转译成生物活性多肽。

[0072] HLP:如本文所用,术语“杂合肝脏特异性启动子”或“HLP”是指如McIntosh J等人,《血液》2013 121 (17) 3335中所述的启动子。本发明的HLP包含人类肝脏特异性增强子、人类肝脏特异性启动子和经修饰的内含子。在一个实施例中,LP1或其生物活性片段或变异体具有聚核苷酸序列SEQ ID NO:45。

[0073] 同源性:出于本申请的目的,如本文所用,术语序列‘同源性’和‘同源’应理解为与序列‘一致性’和‘一致’等效。

[0074] LP1:如本文所用,术语“肝脏启动子/增强子1”或“LP1”是指如Nathwani AC等人《血液》2006;107 (7) :2653-2661和Miao HZ等人《血液》2004;103 (9) :3412-3419中所述的启动子。本发明的LP1包含截断的肝脏特异性增强子和截断的肝脏特异性启动子。在一个实施例中,LP1或其生物活性片段或变异体具有聚核苷酸序列SEQ ID NO:39。

[0075] 可操作地连接:如本文所用,术语‘可操作地连接’表示编码所关注的一种或多种多肽的核酸序列和转录调控序列按照当核酸序列引入细胞中时允许所述核酸序列表达的方式连接。

[0076] 周边投药:如本文所用,术语‘周边投药’是指相对于中枢神经系统(CNS)的周边。具体地说,周边投药是指投与骨骼肌和肝脏组织。所属领域的技术人员熟悉将医药组合物和其成分投与所述组织的方式。

[0077] 医药组合物:或药物、药品或药剂是指当正确投与患者时能够诱导所期望的治疗效果的任何化学或生物物质、化合物或组合物。一些药物是以非活性形式出售,其在活体内转化成具有医药活性的代谢物。出于本发明的目的,术语“医药组合物”和“医药”涵盖非活性药物和活性代谢物。

[0078] 质体:术语‘质体’在本文中是指可以裸露或封装于载体内的聚核苷酸。在本发明中,质体优选与其被转移于其中的细胞的染色体DNA实体分离,且能够独立地复制。在一些实施例中,本发明的表达系统包含裸露(即,未封装)或封装于载体中的一种或多种质体,如所属领域中已知。

[0079] 多肽:如本文所用,术语‘多肽’是指包含至少两个氨基酸的分子。氨基酸可以是天然的或合成的。‘寡肽’在本文中定义为长度不超过100个氨基酸的多肽。术语“多肽”还旨在包括蛋白质,即,包含至少一种多肽的功能性生物分子;当包含至少两种多肽时,这些多肽可以形成共价连接或非共价连接的复合物。蛋白质中的多肽能发生糖基化和/或脂质化和/或包含辅基。

[0080] 聚核苷酸:本文中所用的术语‘聚核苷酸’是指一种分子,其为由共价键结成链的核苷酸单体组成的有机聚合物分子。如本文所用,“聚核苷酸”是指包含至少两种核酸的分子。核酸可以是天然存在的或经修饰的,如锁核酸(LNA),或肽核酸(PNA)。如本文所用,聚核苷酸通常是关于

[0081] i) 包含预定编码序列的聚核苷酸,或

[0082] ii) 编码预定氨基酸序列的聚核苷酸,或

[0083] iii) 编码由聚核苷酸(i)或(ii)编码的多肽的片段的聚核苷酸,其中所述片段具有至少一种如本文中所说明的预定活性;和

[0084] iv) 互补链在严格条件下与如(i)、(ii)和(iii)中任一个中所定义的聚核苷酸杂交的聚核苷酸,其编码具有至少一种如本文中所说明的预定活性的多肽或其片段;和

[0085] v) 包含与聚核苷酸(iii)或(iv)的核苷酸序列简并的核苷酸序列的聚核苷酸;

[0086] 或此类聚核苷酸的互补链。

[0087] 启动子:本文中所用的术语‘启动子’是指促进特定基因转录的DNA区域。启动子因此是充当RNA聚合酶的初始结合位点的操纵子区域。启动子典型地定位于其调节的基因的附近,位于同一链上的上游。如本文所用,术语‘启动子’不限于经典启动子的结构,而应理解为具有上述功能的核苷酸序列的区域。

[0088] 三顺反子:如本文所用,术语“三顺反子”可以指表达系统、载体或质体。三顺反子质体或载体包含位于单一质体或载体内的三种基因。三顺反子表达系统是指包含至少一种三顺反子质体或至少一种三顺反子载体的表达系统。

[0089] 载体:根据本发明的载体是一种DNA分子,其作为媒介用于将外来遗传物质转移到另一个细胞中。载体的四种主要类型是质体、病毒、粘质体和人工染色体。

[0090] 病毒载体:病毒载体应理解为包含衣壳和基因组的病毒颗粒。基因组典型地被衣壳包封。

[0091] 表达系统

[0092] 周边恒定地产生和分泌基本左旋多巴到循环中能够实现与通过经皮胃造口术(目前用于治疗PD的治疗方式)恒定输注到小肠中类似的治疗作用。

[0093] 本发明背后的基本原理是使得左旋多巴连续日间或连续24小时分泌到患者的全身循环中,所述患者患有帕金森病或可指出左旋多巴的内源周边分泌升高的任何其它病状,如遗传性酪氨酸羟化酶缺乏症(Wevers等人,1999)和腿不宁综合症。

[0094] 本发明是周边组织的转导或转染而产生足以在治疗上适用于治疗帕金森病或其它病状(包括酪氨酸羟化酶缺乏症或腿不宁综合症)的基本含量的循环左旋多巴。

[0095] 周边组织的转导是通过投与由转移遗传物质的表达系统组成的基因治疗系统来实现,从而允许目标周边组织产生能够将酪氨酸转化成L-3,4-二羟基丙苯氨酸(左旋多巴)的酶。所述表达系统可以按照如下文中详述的一种或多种载体形式提供。优选的是,所述表达系统允许至少三种多肽(即,TH、GCH1和PTPS)表达且任选地允许第四种多肽表达。在一些实施例中,表达系统按照两种双顺反子载体或质体形式提供。在其它实施例中,表达系统按照一种三顺反子载体或质体形式提供,任选地使用单顺反子载体或质体。在其它实施例中,表达系统是按照三种或四种单顺反子载体或质体形式提供。

[0096] 本发明表达系统靶向的细胞可优选成年受试者中具有低细胞更新率的细胞。这是因为不受理论束缚据信由于本发明的载体或质体未整合于目标细胞的染色体DNA中,所述载体或质体通过每次细胞分裂被稀释。因此,预期治疗效果随着细胞再生而衰退。可能是使用本发明表达系统的特别有利基因治疗目标的细胞是肌肉细胞,具体地说,横纹肌细胞和肝细胞。

[0097] 举例来说,本发明可以采取基于表达系统的基因治疗形式,所述表达系统包含至少一种(如两种)腺相关病毒载体血清型8(靶向肝转导)且递送编码人类酪氨酸羟化酶(例如hTH2)的基因序列。转染基因组可以包括位于TH基因序列上游的肝特异性启动子且可以包括位于TH基因序列下游的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)用于最大表达。治疗优选需要提供作为口服补充剂或通过GPT环水解酶-1(GCH1)基因共转染而内源性产生的四氢蝶呤。虽然共转染免除了口服补充剂的需要,但是依赖口服补充剂使得转染位点处的左旋多巴产生可能“关闭”,这应该是管理毒性或在夜间提供左旋多巴产生减少期所期望的。需要GCH1的程度可根据目标组织类型而变(举例来说,肝脏组织中的GCH1内源含量高于横纹肌组织)。在优选实施例中,治疗还需要提供6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS, EC 4.2.3.12),其催化7,8-二氢新蝶呤三磷酸盐转化成6-丙酮酰四氢蝶呤和三磷酸盐。优选的是,PTPS是通过PTPS基因的共转染而内源性产生,如本文所述。

[0098] 在另一个实施例中,表达系统可包含至少一种(如两种)腺相关病毒载体血清型1(靶向横纹肌)。在这类实施例中,与表达系统内所含的聚核苷酸连接的任一种启动子可以具有肌肉特异性。肌肉细胞(具体地说,成熟横纹肌细胞)的更新率极低(肌肉细胞的目标,如成熟横纹肌细胞)相信是特别有利的。

[0099] 表达系统可以是双顺反子,即,包含至少一种双顺反子载体或质体。双顺反子系统可以进一步包含单顺反子载体或质体。或者,表达系统可以是三顺反子,即,包含至少一种三顺反子载体或质体。三顺反子系统可以进一步包含单顺反子载体或质体。

[0100] 关于现行口服左旋多巴药品,优选投与周边脱羧酶抑制剂(例如苄丝肼或卡比多巴)以阻断左旋多巴在周边转化成多巴胺,从而改善纹状体的耐受性和生物利用率。

[0101] 在一个方面中,本发明涉及一种表达系统,其包含:

[0102] 表达时编码酪氨酸羟化酶(TH; EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0103] 和/或

[0104] 表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1; EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子。

[0105] 在一个方面中,本发明涉及一种表达系统,其包含:

[0106] 第一聚核苷酸(N1),其在表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1; EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第一启动子,且其中所述生物活性是GCH1的酶活性;

[0107] 和

[0108] 第二聚核苷酸(N2),其在表达时编码酪氨酸羟化酶(TH; EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第二启动子,且其中所述生物活性是TH的酶活性;

[0109] 和

[0110] 第三聚核苷酸(N3),其在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS, EC 4.2.3.12)多肽或其生物活性片段或变异体,其中所述聚核苷酸可操作地连接到第三启动子,且其中所述生物活性是PTPS的酶活性。

[0111] 在一个方面中,本发明涉及一种表达系统,其包含:

[0112] 表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0113] 和/或

[0114] 表达时编码GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子。

[0115] 在一个实施例中, 本发明的表达系统包含:

[0116] 第一聚核苷酸, 其在表达时编码GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到第一启动子;

[0117] 和

[0118] 第二聚核苷酸, 其在表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到第二启动子。

[0119] 在一个实施例中, 本发明的表达系统包含:

[0120] 第一聚核苷酸, 其在表达时编码GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到第一启动子;

[0121] 和

[0122] 第二聚核苷酸, 其在表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到第二启动子

[0123] 和

[0124] 第三聚核苷酸, 其在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体, 其中所述聚核苷酸可操作地连接到第三启动子。

[0125] 在一个方面中, 本发明涉及一种包含核苷酸序列的双顺反子表达系统, 所述表达系统在表达时编码:

[0126] 酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体; 和

[0127] GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体。

[0128] 应理解, 在通篇本公开内容中, 术语“第一”、“第二”、“第三”和“第四”并非指特定的次序, 而是用于清楚了解之故。因此, 一些实施例中的第三聚核苷酸可以定位于第一聚核苷酸与第二聚核苷酸与之间。

[0129] 本发明的双顺反子表达系统适于投与需治疗疾病和病症的个体, 如人类。因此, 在一个方面中, 本发明涉及一种如上文所定义的用于医学用途的表达系统。

[0130] 本发明的表达系统特别适用于治疗与儿茶酚胺水平不均衡相关和/或由儿茶酚胺水平不均衡引起和/或导致儿茶酚胺水平不均衡的疾病和病症。相应地, 在另一方面中, 本发明涉及如上文所定义的表达系统, 其用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法中, 其中所述表达系统在周边投与, 即, 在CNS外部投与。

[0131] 即, 本发明在所述方面中涉及一种包含核苷酸序列的双顺反子表达系统, 所述表达系统在表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体; 和GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体; 所述表达系统用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法中, 其中所述表达系统在周边投与, 即, 在CNS外部投与。

[0132] 在另一个方面中, 本发明涉及包含一种或多种核苷酸序列的表达系统, 所述表达

系统在表达时编码一种或多种选自由以下组成的群组的多肽：酪氨酸羟化酶 (TH; EC1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和/或GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体;所述表达系统用于治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法中,其中所述表达系统在周边投与。

[0133] 在一个实施例中,用于所述用途的表达系统包含如上文所定义的双顺反子表达系统。

[0134] 表达系统还可以是三种单顺反子表达系统的组合或一种单顺反子表达系统与一种双顺反子表达系统的组合。在所述表达系统在表达时编码四种聚核苷酸的实施例中,所述系统可以是一种单顺反子表达系统与一种三顺反子表达系统的组合,或两种单顺反子表达系统与一种双顺反子表达系统的组合,或四种单顺反子表达系统的组合。

[0135] 因此,在一个实施例中,本发明的表达系统包含:

[0136] a) 双顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0137] i) 酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0138] ii) GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体。

[0139] 在另一个实施例中,本发明的表达系统包含:

[0140] a) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0141] i) 酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0142] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0143] i) GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体。

[0144] 在又另一个实施例中,本发明的表达系统包含:

[0145] a) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0146] i) 酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0147] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0148] i) GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体。

[0149] 在一个实施例中,本发明的表达系统包含:

[0150] a) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0151] i) 酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0152] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0153] i) GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体。

[0154] 因此,在一个实施例中,本发明的表达系统包含:

[0155] a) 三顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0156] i) 酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0157] ii) GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0158] iii) 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS,EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体。

[0159] 在另一个实施例中,所述表达系统包含:

[0160] a) 双顺反子表达系统,其在表达时编码:

[0161] i) 酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

[0162] ii) GTP-环水解酶1 (GCH1;EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体;和

- [0163] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0164] iii) 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体。
- [0165] 在另一个实施例中,所述表达系统包含:
- [0166] a) 双顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0167] i) 酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和
- [0168] ii) 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体;和
- [0169] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0170] iii) GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体。
- [0171] 在另一个实施例中,所述表达系统包含:
- [0172] a) 双顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0173] i) GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体,和
- [0174] ii) 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体;和
- [0175] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0176] iii) 酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体。
- [0177] 在另一个实施例中,本发明的表达系统包含:
- [0178] a) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0179] i) 酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体;和
- [0180] b) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0181] ii) GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体;和
- [0182] c) 单顺反子表达系统,其在表达时编码:
- [0183] iii) 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体。
- [0184] 所述表达系统在表达时可以另外编码第四多肽,如下文中详述。
- [0185] 本发明表达系统的使用目的是获得和/或维持左旋多巴在经本发明表达系统治疗的个体的血液中的治疗有效浓度。
- [0186] 本发明中所应用的左旋多巴活体内生物合成所必需的酶替代疗法依赖于以下三种酶中的一种或多种:酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 和/或GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 和/或6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12)。
- [0187] 所述酶可以按全长多肽形式或按全长酶的生物活性片段或变异体形式表达。生物活性意指所述片段或变异体应该保留发挥野生型全长酶的至少一部分催化活性的能力。
- [0188] 因此,在一个实施例中,根据本发明的表达系统能够表达GTP-环水解酶1 (GCH1) 多肽或其生物活性片段或变异体,其与选自由以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。
- [0189] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统能够表达酪氨酸羟化酶 (TH) 多肽或其生物活性片段或变异体,其与选自由以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、

SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。

[0190] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统能够表达6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)多肽或其生物活性片段或变异体,其与SEQ ID NO:41至少70%一致。

[0191] 所述表达系统原则上可以具有任何适合形式或结构,条件是所述形式或结构产生的基因产物与如上文所定义的酶或其片段或变异体中的任一种一致或基本上一致或至少具有如本文中所定义的一致程度。

[0192] 病毒载体

[0193] 广泛地说,基因疗法寻求将新遗传物质转移到患者的细胞中,从而给患者带来治疗益处。此类益处包括治疗或预防广泛范围的疾病、病症和其它病状。

[0194] 活体外基因治疗途径涉及修饰经分离的细胞(包括但不限于)干细胞、神经和神经胶质前驱细胞,以及胎儿干细胞),接着输注、植入或以其它方式移植到患者中。参见例如美国专利第4,868,116号、第5,399,346号和第5,460,959号。活体内基因疗法寻求活体内直接靶向宿主患者组织。

[0195] 适用作基因转移载体的病毒包括乳多空病毒、腺病毒、痘疮病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和逆转录病毒。适合的逆转录病毒包括由以下组成的群组:HIV、SIV、FIV、EIAV、MoMLV。另一组适合的逆转录病毒包括由以下组成的群组:HIV、SIV、FIV、EIV、CIV。另一组优选病毒载体包括由以下组成的群组:α病毒、腺病毒、腺相关病毒、杆状病毒、HSV、冠状病毒、牛科动物乳头瘤病毒、MoMLV,优选腺相关病毒。

[0196] 用于转导肝细胞或横纹肌细胞的优选病毒是腺相关病毒和慢病毒。

[0197] 用于制备AAV的方法描述于所属领域中,例如US 5,677,158。

[0198] 慢病毒载体是复制缺陷型慢病毒颗粒。此类慢病毒颗粒能用慢病毒载体产生,所述慢病毒载体包含5'慢病毒LTR、tRNA结合位点、包装信号、可操作地连接到编码所述融合蛋白的聚核苷酸信号的启动子、第二链DNA合成起点和3'慢病毒LTR。

[0199] 表达载体

[0200] 本发明中使用的供TH和/或GCH1和/或PTPS多肽重组表达用的载体的构筑可以使用无需向所属领域的技术人员详细解释的常规技术完成。然而,为了回顾,希望所属领域的技术人员可以参考Maniatis等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory), (NY 1982)。表达载体可以用于产生生产细胞以便重组产生TH和/或GCH1和/或PTPS多肽供医学使用,以及用于产生治疗细胞,其分泌TH和/或GCH1和/或PTPS多肽用于裸露或囊封疗法。

[0201] 简单地说,重组表达载体的构筑是采用标准连接技术。为了分析证实所构筑载体中的序列正确,使用例如Messing等人(《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,9:309-,1981)的方法、Maxam等人(《酶学方法(Methods in Enzymology)》,65:499,1980)的方法或所属领域的技术人员已知的其它适合方法对所述基因进行测序。

[0202] 裂解片段的尺寸分离是使用常规凝胶电泳法进行,如例如Maniatis等人(《分子克隆(Molecular Cloning)》,第133-134页,1982)所述。

[0203] 为了产生有效表达载体,这些表达载体应该含有在正确阅读框架中表达编码基因所需的调控序列。基因表达在转录、转译或转译后层面受到控制。转录起始是基因表达中的早期关键事件。这取决于启动子和增强子序列且受到与这些序列相互作用的特定细胞因子

的影响。许多基因的转录单元由以下组成：启动子和一些情况下的增强子或调控元件（Banerji等人，《细胞》27:299 (1981)；Corden等人，《科学》209:1406 (1980)；以及Breathnach和Chambon，《生物化学年鉴 (Ann.Rev.Biochem.)》50:349 (1981)）。本发明的强启动子和其它调控元件更详细地描述于下文中。

[0204] 在一个实施例中，表达系统是载体，如病毒载体，例如病毒载体表达系统。

[0205] 在另一个实施例中，表达系统是质体载体表达系统。在又一个实施例中，表达系统是基于合成载体。

[0206] 在又一个实施例中，表达系统是粘质体载体或人工染色体。

[0207] 在某些实施例中，将AADC基因纳入载体中可因多种原因中的任一种而为不利的。首先，其产生了新系统，所述新系统能够不经调节而将酪氨酸转化成多巴胺。当所转导的细胞缺乏将多巴胺螯合到囊泡中的机制时，多巴胺能够在细胞溶质中快速积聚。若TH酶保留N末端调控域，则所产生的多巴胺能够通过负反馈来直接抑制多巴合成，这会严重限制治疗的功效。另一方面，若TH酶被截断（例如SEQ ID NO:40），则细胞溶质多巴胺含量能够快速提高，因为所转导的细胞还缺乏释放多巴胺的机制。

[0208] 在本发明的一个实施例中，上文定义的表达系统不包含编码芳香族氨基酸脱羧酶（AADC）多肽的核苷酸序列。

[0209] 在一个实施例中，根据本发明的表达系统具有1到40kb的封装容量，例如1到30kb，如1到20kb，例如1到15kb，如1到10kb，例如1到8kb，如2到7kb，例如3到6kb，如4到5kb。

[0210] 在一个实施例中，根据本发明的表达系统是具有4.5到4.8kb封装容量的病毒载体。

[0211] 在一个实施例中，根据本发明的表达系统是病毒载体，其选自由腺相关载体（AAV）、腺病毒载体和逆转录病毒载体组成的群组。

[0212] 在一个实施例中，载体是整合型载体。在另一实施例中，载体是非整合型载体。

[0213] 在本发明的一个实施例中，本发明的载体是最小整合型载体。

[0214] 在一个优选实施例中，根据本发明的表达系统是腺相关载体（AAV）。

[0215] 用于制备AAV载体的方法已为所属领域的技术人员所知。参见例如US 5,677,158、US 6,309,634和US 6,451,306，其描述将AAV递送到中枢神经系统的实例。

[0216] 在一个实施例中，根据本发明的AAV载体选自由以下组成的群组：血清型AAV5、AAV1、AAV6、AAV9和AAV2载体。优选使用这些载体靶向肌肉细胞，如肌细胞或成肌细胞。

[0217] 在另一个实施例中，根据本发明的AAV载体选自由以下组成的群组：血清型AAV8、AAV5、AAV2、AAV9和AAV7载体。优选使用这些载体靶向肝脏的细胞，优选肝细胞。

[0218] 研究已经证明（McCarty (2008)《分子治疗学 (Mol Ther.)》16 (10) :1648-56) 重组腺相关病毒（rAAV）基因递送载体的功效，且最近的临床试验已展示有前景的结果。然而，表达之前，这些载体的效率（就转导所需的含基因组颗粒数目来说）受困于将单链DNA（ssDNA）基因组转变成双链DNA（dsDNA）的需求。此步骤完全能够通过使用自互补载体来规避，所述自互补载体封装有可折叠成dsDNA的反向重复基因组，而无需DNA合成或多个载体基因组之间的碱基配对。此效率的重要折衷是载体编码容量损失了一半，但是能够容纳小蛋白质编码基因（最多55kd）和目前可获得的任何基于RNA的疗法。利用自互补AAV（scAAV）载体获得的效率增加范围为中等到令人吃惊，这取决于组织、细胞类型和投药途径。McCarthy的评论

中概述了多种组织(包括肝脏、肌肉和中枢神经系统(CNS))的不同反应的基础,以及自互补载体的构筑和物理特性。

[0219] 相应地,在一个实施例中,本发明的AAV载体是自互补AAV(scAAV)载体。

[0220] 在一个实施例中,AAV8载体的基因组封装于除AAV8衣壳之外的AAV衣壳中,如封装于AAV5、AAV9、AAV7、AAV6、AAV2或AAV1衣壳中。

[0221] 在另一个实施例中,AAV7载体的基因组封装于除AAV7衣壳之外的AAV衣壳中,如封装于AAV8、AAV9、AAV5、AAV6、AAV2或AAV1衣壳中。

[0222] 在又一个实施例中,AAV6载体的基因组封装于除AAV6衣壳之外的AAV衣壳中,如封装于AAV8、AAV9、AAV7、AAV5、AAV2或AAV1衣壳中。

[0223] 在又一个实施例中,AAV5载体的基因组封装于除AAV5衣壳之外的AAV衣壳中,如封装于AAV8、AAV9、AAV7、AAV6、AAV2或AAV1衣壳中。

[0224] 在另一个实施例中,AAV2载体的基因组封装于除AAV2衣壳之外的AAV衣壳中,如封装于AAV8、AAV9、AAV7、AAV6、AAV5或AAV1衣壳中。

[0225] 在另一个实施例中,AAV1载体的基因组封装于除AAV1衣壳之外的AAV衣壳中,如封装于AAV8、AAV9、AAV7、AAV6、AAV2或AAV5衣壳中。

[0226] 在另一个优选实施例中,所述表达系统是一种或多种质体,其可以封装于任一种上列载体中,或者可以是裸露的,即未封装。在一个优选实施例中,所述质体是裸露的。

[0227] 在一个实施例中,根据本发明的载体能够感染或转导哺乳动物细胞。

[0228] 在一个实施例中,根据本发明的载体是选自包含以下的群组的载体:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53。

[0229] 启动子

[0230] 启动子是启动特定基因转录的核苷酸序列。启动子定位于其转录的基因附近,位于同一链上且位于核苷酸序列上游(朝向反义链的3'区,也称为模板链和非编码链)。启动子典型地由约100-1000个碱基对组成。

[0231] 在一个实施例中,本发明的表达系统包含如本文所述的第一和第二启动子。在一个实施例中,所述第一和所述第二启动子序列是不同的启动子序列。在另一个实施例中,所述第一和所述第二启动子序列是相同的启动子序列。

[0232] 在一个实施例中,所述表达系统包含定位于编码三种多肽TH、GCH1和PTPS的聚核苷酸中的两种之间的单一启动子,以及IRES。

[0233] 在另一个实施例中,本发明的表达系统包含在表达时编码如上文所述的酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接到肝脏特异性启动子。

[0234] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述在表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接到肝脏特异性启动子。

[0235] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS,EC 4.2.3.12)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接到肝脏特异性启动子。

[0236] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述的启动子,其中所述启动子是选自由以下组成的群组的肝脏特异性启动子:肝脏启动子/增强子1 (LP1) 或其生物活性片段或变异体和/或杂合肝脏特异性启动子 (HLP) 或其生物活性片段或变异体。

[0237] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述的启动子,其中所述启动子是肝脏特异性启动子,其与选自由SEQ ID NO:38 (HLP) 和/或SEQ ID NO:39 (LP1) 组成的群组的聚核苷酸至少70%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少75%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少80%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少85%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少90%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少95%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少96%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少97%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少98%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少99%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸100%一致。

[0238] 在另一个实施例中,本发明的表达系统包含如上文中所述在表达时编码酪氨酸羟化酶 (TH; EC 1.14.16.2) 多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接到肌肉特异性启动子。

[0239] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述在表达时编码GTP-环水解酶1 (GCH1; EC 3.5.4.16) 多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接到肌肉特异性启动子。

[0240] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,所述聚核苷酸可操作地连接到肌肉特异性启动子。

[0241] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述的启动子,其中所述启动子是选自由以下组成的群组的肌肉特异性启动子:pMCK1350、dMCK、tMCK和作为人类缓慢肌钙蛋白I基因增强子的多个拷贝的启动子,或其生物活性片段或变异体。

[0242] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含如上文中所述的启动子,其中所述启动子是肝脏特异性启动子,其与选自由SEQ ID NO:38 (HLP) 和/或SEQ ID NO:39 (LP1) 组成的群组的聚核苷酸至少70%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少75%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少80%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少85%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少90%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少95%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少96%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少97%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少98%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸至少99%一致,更优选与选自由SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸100%一致。

组成的群组的聚核苷酸至少99%一致,更优选与选自SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:39组成的群组的聚核苷酸100%一致。

[0243] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统包含对哺乳动物细胞具有选择性的启动子,如(但不限于)哺乳动物肝脏和骨架或平滑肌细胞。在一个实施例中,本发明的启动子对选自肝细胞、肌细胞和成肌细胞组成的群组的哺乳动物细胞具有特异性。

[0244] 启动子可以是天然存在的启动子或合成启动子。

[0245] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统包含组成型启动子,如(但不限于)一种或多种选自以下组成的群组的启动子:p-MCK(用于肌肉肌酸激酶的启动子),例如p-MCK1350;作为人类缓慢肌钙蛋白I基因增强子的多个拷贝的启动子、LB1、HLP、CAG、CBA、CMV、人类UbiC、RSV、EF-1 α 、SV40、Mt1、pGK、H1和/或U3。

[0246] 在一些实施例中,所述表达系统包含EF-1 α 启动子。EF-1 α 启动子可以定位于TH或GCH1上游。

[0247] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统包含诱导型启动子,如(但不限于)Tet-开、Tet-关、Mo-MLV-LTR、Mx1、孕酮、RU486和/或雷帕霉素诱导型启动子。

[0248] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统包含对肝脏细胞(例如肝细胞)具有特异性的启动子。此类启动子包括LP1、hAPO-HCR和/或hAAT。本发明可以使用任何肝脏特异性启动子,如基因组数据库中所发现的启动子,如可在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>发现的基因库,如可在<http://rulai.cshl.edu/LSPD/>发现的“肝脏特异性基因启动子数据库”。

[0249] 在另一个实施例中,根据本发明的表达系统包含对肌肉细胞具有特异性的一种或多种启动子,如(但不限于)选自以下组成的群组的启动子:

[0250] a. 肝脏启动子/增强子1 (LP1),

[0251] b. 杂合肝脏特异性启动子 (HLP) (参见McIntosh J等人,《血液》2013 121 (17) 3335-3344),

[0252] c. 使用CMV启动子和SPc5-12元件的肌肉特异性组合或双重启动子,

[0253] d. SPc5-12合成肌肉特异性启动子,

[0254] e. 肌肉特异性肌酸激酶启动子或其缩写形式,如dMCK或tMCK、p-MCK1350,或作为人类缓慢肌钙蛋白I基因增强子的多个拷贝的启动子,

[0255] f. CMV启动子,

[0256] g. 肌肉CAT启动子,

[0257] h. 骨架 α 肌动蛋白448启动子,

[0258] i. a至f任一项中的任何活性类似物或片段。

[0259] 在一个实施例中,启动子的表达模式可以利用全身性投与的药剂(例如四环素开启或四环素关闭的基因表达系统)调控。

[0260] 在一个优选实施例中,根据本发明的表达系统包含一种或多种选自包含LB1和HLP的群组的启动子。在一个更优选实施例中,根据本发明的表达系统包含一种或多种选自包含SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39的群组的启动子。

[0261] 在一些实施例中,表达系统包含在表达时编码TH的聚核苷酸和在表达时编码GCH1的聚核苷酸,并且另外包含两种启动子,其中第一启动子可操作地连接到TH且第二启动子

可操作地连接到GCH1。

[0262] 两种启动子中的一种或两种可以是选自由以下组成的群组的组成型启动子:LB1、HLP、CAG、CBA、CMV、人类UbiC、RSV、EF-1 α 、SV40、Mt1、pGK、H1和/或U3。在一个实施例中,两种启动子均是EF-1 α 。

[0263] 两种启动子之一可以是选自由以下组成的群组的组成型启动子:LB1、HLP、CAG、CBA、CMV、人类UbiC、RSV、EF-1 α 、SV40、Mt1、pGK、H1和/或U3,两种启动子中的另一个可以是对肌肉细胞具有特异性的启动子,如(但不限于)选自由以下组成的群组的启动子:

[0264] a. 肝脏启动子/增强子1 (LP1),

[0265] b. 杂合肝脏特异性启动子 (HLP) (参见McIntosh J等人,《血液》2013 121 (17) 3335-3344),

[0266] c. 使用CMV启动子和SPc5-12元件的肌肉特异性组合或双重启动子,

[0267] d. SPc5-12合成肌肉特异性启动子,

[0268] e. 肌肉特异性肌酸激酶启动子或其缩写形式,如dMCK或tMCK、p-MCK1350,或作为人类缓慢肌钙蛋白I基因增强子的多个拷贝的启动子,

[0269] f. CMV启动子,

[0270] g. 肌肉CAT启动子,

[0271] h. 骨架 α 肌动蛋白448启动子,

[0272] a至f任一项中的任何活性类似物或片段。

[0273] 两种启动子之一可以是选自由以下组成的群组的组成型启动子:LB1、HLP、CAG、CBA、CMV、人类UbiC、RSV、EF-1 α 、SV40、Mt1、pGK、H1和/或U3,且两种启动子中的另一个可以是诱导型启动子,如(但不限于)Tet-开、Tet-关、Mo-MLV-LTR、Mx1、孕酮、RU486和/或雷帕霉素诱导型启动子。

[0274] 两种启动子之一可以是选自由以下组成的群组的组成型启动子:LB1、HLP、CAG、CBA、CMV、人类UbiC、RSV、EF-1 α 、SV40、Mt1、pGK、H1和/或U3,且两种启动子中的另一个可以是对肝脏细胞(例如肝细胞)具有特异性的启动子,如上文中所详述。

[0275] 调控元件

[0276] 除上文所论述的启动子之外,根据本发明的表达系统还可以包含其它调控元件,所述其它调控元件当包括在内时使得编码TH和/或GCH-1的一种或多种基因的转录受到调节。

[0277] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统包含聚腺苷酸化序列,如SV40聚腺苷酸化序列。

[0278] 聚腺苷酸化序列典型地可操作地连接到编码所述TH和/或GCH-1的核酸序列的3'端。

[0279] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统另外包含转录后调控元件,例如土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

[0280] 在各种实施例中,所述土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件包含序列SEQ ID NO:28或29。在一个优选实施例中,所述土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件包含序列SEQ ID NO:29。

[0281] 在一个实施例中,所述表达系统另外包含内含子,所述内含子典型地可操作地连接到TH和/或GCH-1转录物的5'端。

[0282] 在一些实施例中,所述表达系统包含内部核糖体进入位点(IRES)。此类IRES能实现在mRNA内部启动核苷酸序列的转译。因此,在一些实施例中,所述表达系统包含在表达时编码酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0283] 和

[0284] 表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0285] 和

[0286] 至少一个内部核糖体进入位点。在此类实施例中,所述表达系统可以进一步包含第二聚核苷酸,所述第二聚核苷酸在表达时编码选自以下组成的群组的第三多肽或其生物活性片段或变异体:酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽、GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽和6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS,EC 4.2.3.12),其中所述第二聚核苷酸可操作地连接到启动子。

[0287] 在一些实施例中,编码GCH1的聚核苷酸定位于编码TH的聚核苷酸的上游且IRES定位于编码GCH1的聚核苷酸的下游和编码TH的聚核苷酸的上游。在其它实施例中,编码TH的聚核苷酸定位于编码GCH1的聚核苷酸的上游,且IRES定位于编码TH的聚核苷酸的下游和编码GCH1的聚核苷酸的上游。

[0288] 相应地,在一些实施例中,所述表达系统允许TH和GCH1存在独立的转译启动事件。TH和GCH1的蛋白质合成水平因此可以是不同的。

[0289] 在一个实施例中,调控所表达的酶之间的比率(如TH:GCH1之间的比率)受到特别关注。

[0290] 在一个实施例中,TH:GCH1比率是7:1。

[0291] 在一些实施例中,所述表达系统包含在表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0292] 和

[0293] 在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS,EC 4.2.3.12)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子,

[0294] 和

[0295] 至少一个内部核糖体进入位点。

[0296] 在此类实施例中,所述表达系统可以进一步包含在表达时编码酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体的第二聚核苷酸,所述第二聚核苷酸可操作地连接到启动子。

[0297] 在一些实施例中,编码GCH1的聚核苷酸定位于编码PTPS的聚核苷酸的上游且IRES定位于编码GCH1的聚核苷酸的下游和编码PTPS的聚核苷酸的上游。在其它实施例中,编码PTPS的聚核苷酸定位于编码GCH1的聚核苷酸的上游,且IRES定位于编码PTPS的聚核苷酸的下游和编码GCH1的聚核苷酸的上游。

[0298] 相应地,在一些实施例中,所述表达系统允许PTPS和GCH1存在独立的转译启动事件。PTPS和GCH1的蛋白质合成水平因此可以是不同的。

[0299] 在一个实施例中,调控所表达的酶之间的比率(如PTPS:GCH1之间的比率)受到特别关注。

[0300] 在一个实施例中,本发明的表达系统中的启动子和/或其它调控元件能够引导PTPS和GCH1的表达,其中所表达的PTPS:GCH1的比率是至少3:1,如至少4:1,例如至少5:1,如至少6:1,例如至少7:1,如至少10:1,例如15:1,如20:1,例如25:1,如30:1,例如35:1,如40:1,例如45:1,如50:1。

[0301] 在一个实施例中,PTPS:GCH1比率是7:1。

[0302] 在一些实施例中,表达系统包含在表达时编码酪氨酸羟化酶(TH;EC 1.14.16.2)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子;

[0303] 和

[0304] 在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS,EC 4.2.3.12)多肽或其生物活性片段或变异体的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接到启动子,

[0305] 和

[0306] 至少一个内部核糖体进入位点。

[0307] 在此类实施例中,所述表达系统可以进一步包含在表达时编码GTP-环水解酶1(GCH1;EC 3.5.4.16)多肽或其生物活性片段或变异体的第二聚核苷酸,所述第二聚核苷酸可操作地连接到启动子。

[0308] 在一些实施例中,编码TH的聚核苷酸定位于编码PTPS的聚核苷酸的上游且IRES定位于编码TH的聚核苷酸的下游和编码PTPS的聚核苷酸的上游。在其它实施例中,编码PTPS的聚核苷酸定位于编码TH的聚核苷酸的上游,且IRES定位于编码PTPS的聚核苷酸的下游和编码TH的聚核苷酸的上游。

[0309] 相应地,在一些实施例中,表达系统允许PTPS和TH存在独立的转译启动事件。PTPS和TH的蛋白质合成水平因此可以是不同的。

[0310] 在一个实施例中,调控所表达的酶之间的比率(如TH:GCH1之间的比率)受到特别关注。

[0311] 在一个实施例中,本发明的表达系统中的启动子和/或其它调控元件能够引导PTPS和TH的表达,其中所表达的PTPS:TH的比率是至少3:1,如至少4:1,例如至少5:1,如至少6:1,例如至少7:1,如至少10:1,例如15:1,如20:1,例如25:1,如30:1,例如35:1,如40:1,例如45:1,如50:1。

[0312] 在一个实施例中,PTPS:TH比率是7:1。

[0313] TH:GCH1、PTPS:TH或PTPS:GCH1之间的比率可以通过测量样品中的所表达TH和GCH1酶的活性来测定,所述样品来自经如上文所定义的载体转染或转导的样品宿主。

[0314] 或者,所述比率是通过测量样品中的四氢生物蝶呤(BH₄)含量来测定,所述样品来自经如上文所定义的载体转染或转导的样品宿主。

[0315] 或者,所述比率是依据样品中的所转录mRNA的量来测定,所述样品来自经如上文所定义的载体转染或转导的样品宿主。

[0316] 或者,所述比率是依据样品中的所表达蛋白质的量来测定,所述样品来自经如上文所定义的载体转染或转导的样品宿主。

[0317] 酪氨酸羟化酶

[0318] 酪氨酸羟化酶(缩写为TH)是一种单氧酶,其催化酪氨酸转化成多巴胺前体3,4-二羟基丙苯氨酸(多巴)。TH活性是通过转录和转译后机制响应于环境变化以及神经元和激素刺激来调节。TH活性的最敏锐调控是通过磷酸化对蛋白质进行转译后修饰来发生。

[0319] 如所提及,酪氨酸羟化酶的主要功能是使酪氨酸转化成多巴胺。TH主要发现于多巴胺能神经元中,但不限于这些。TH基因在胚胎发育中是必不可少的,因为TH敲除基因型小鼠在胚胎第14天内死亡,而TH突变的杂合小鼠正常发育,其中仅儿茶酚胺含量稍微降低。

[0320] TH酶具有高特异性,其不接受吲哚衍生物,这是异乎寻常的,因为涉及产生儿茶酚胺的许多其它酶接受吲哚衍生物。作为儿茶酚胺合成中的限速酶,TH在肾上腺素能神经元的生理学中具有关键作用。儿茶酚胺(如多巴胺)在所述肾上腺素能神经元的信号传导中起主要作用。一般来说,肾上腺素能神经元的功能障碍导致若干种神经退化性病症,如周边神经病变、肌肉萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森病、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、缺血性中风、急性脑损伤、急性脊髓损伤、神经系统肿瘤、多发性硬化症、周边神经创伤或损伤、暴露于神经毒素、代谢疾病,如糖尿病或肾功能障碍,以及传染媒介物引起的损伤,或情绪障碍,如抑郁症。

[0321] TH联合本发明的构筑体和方法投与可以用于治疗帕金森病。如图1中所表明,氨基酸L-酪氨酸通过酶酪氨酸羟化酶(TH)生物合成左旋多巴。

[0322] 氨基酸苯丙氨酸通过酶苯丙氨酸水解酶(PAH)生物合成L-酪氨酸。

[0323] 苯丙氨酸被输送跨越细胞(包括肝细胞和横纹肌细胞)的质膜(Thöny,2010)。

[0324] 酪氨酸羟化是儿茶酚胺合成中的限速步骤。

[0325] 人的TH具有R域不同的四种同工酶,因为前mRNA剪接在met30之后产生了其它氨基酸。

[0326] 已知酶的调控错综复杂,其分为两种宽泛的类别:酶活性的短期直接调控(酪氨酸引起的底物抑制(Reed,Lieb,和Nijhout,2010)、反馈抑制(Kumer和Vrana,1996)、异位调控,以及酶磷酸化),以及基因表达的中期到长期调控(转录调控、交替的RNA剪接、RNA稳定性、转译调控以及酶稳定性)。

[0327] 一旦TH已经合成,则酶具有活性而不发生磷酸化,除非其与儿茶酚胺结合,在此情况下,其于是需要激活磷酸化(Bobrovskaya等人,2007)。

[0328] TH是酶同族中的一员,其还含有芳香族氨基酸羟化酶(AAAH)、苯丙氨酸羟化酶(PheH)和色氨酸羟化酶(TrpH)。所有三种酶均执行氨基酸的芳香族环的羟基化。其皆使用二原子氧和还原的生物蝶呤与所结合的铁原子反应。铁原子在两个组胺酸残基和谷氨酸残基间隙的活性位点被固定就位,且其必须处于亚铁态以进行催化。除活性位点的这些类似处之外,所述同族共享3D结构的其它特征。TH具有多域结构:160个氨基酸残基的胺基末端调控域,继之为催化域(C)和位于羧基末端的短得多的卷曲螺旋域。所述酶形成四聚体。

[0329] R域含有位置8、19、31和40的丝氨酸。其都通过cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)发生磷酸化(Fitzpatrick,1999)。当TH通过PKA发生磷酸化时,其对儿茶酚胺引起的反馈抑制不太敏感(Daubner,Lauriano,Haycock和Fitzpatrick,1992)。虽然晶体结构不能证明其,但是合理的是假设磷酸化使R域移动离开活性位点的开口,且磷酸酶的去磷酸化作用使其返回到其阻塞性位置(Daubner,Le和Wang,2011)。

[0330] 其调控域中的三个丝氨酸残基中的任一个发生磷酸化之后,TH被激活。Ser40主要

通过PKA发生磷酸化,导致对儿茶酚胺的亲合力降低。Ser31通过若干种激酶发生磷酸化,导致对四氢生物蝶呤的 K_M 值降低。Ser19通过修饰单独ser19或ser19和ser 40的酶发生磷酸化,且在缺乏其它因子的情况下不引起激活。ser19通过CaMKII发生的磷酸化加速了相同激酶使ser40发生的磷酸化。多位点磷酸化的任何其它结果然而尚未确定,但是稳定化和更紧密地结合至伴随蛋白是可能的。多巴胺、正肾上腺素和肾上腺素都是TH的反馈抑制剂,且ser40磷酸化后的TH活性的最大变化是针对儿茶酚胺的 K_d 值的变化。当所述酶发生磷酸化时,DA对TH的亲合力减小300倍(Ramsey和Fitzpatrick,1998)。

[0331] 已经研究了缺乏前32个(TH Δ 32)、前68个(TH Δ 68)、前76个或前120个氨基酸的rTyrH缺失变异体存在多巴胺抑制(Daubner和Piper,1995)。通过与化学计算量的多巴胺一起预培育来测试缺失变异体的抑制;TyrHD32被多巴胺抑制90%,但TyrHD68和其它截断体未受到抑制。另外,研究多巴胺结合和释放速率时,THA32不释放多巴胺,但THA68却快速释放多巴胺(Ramsey和Fitzpatrick,1998)。多巴胺结合的紧密性是多巴的1000倍,而二羟基苯基乙酸盐结合的紧密性比多巴小100倍(Ramsey和Fitzpatrick,2000)。

[0332] TH还含有第二个低亲和力($K(D) = 90nM$)多巴胺结合位点,其以酶的非磷酸化形式和Ser40磷酸化形式存在。多巴胺结合到高亲和力位点对于辅因子四氢生物蝶呤来说使 V_{max} 降低且使 K_M 增加,而多巴胺结合到低亲和力位点则通过提高四氢生物蝶呤的 K_M 来调控TH活性。动力学分析表明两个位点均存在于四种人类TH同功异型物中的每一种中。

[0333] 多巴胺脱离低亲和力位点使TH活性增强12倍(对于非磷酸化酶)和9倍(对于Ser40磷酸化酶)。低亲和力多巴胺结合位点潜在地成为负责在大部分条件下调控儿茶酚胺合成的主要机制(Gordon,Quinsey,Dunkley和Dickson,2008)。

[0334] 缺乏N末端调控域的大约前160个氨基酸的截断TH仍具有催化酪氨酸转化成多巴(例如SEQ ID NO:40)的活性。TH的另一种截断形式是除去前155个氨基酸。位置8、19、31、40的丝氨酸在反馈控制或TH的调控方面被认为是特别重要的磷酸化/去磷酸化位点。因此,其它截断形式也可以适用于本发明。在一个实施例中,本发明的TH缺乏前10-300个氨基酸,如缺乏前100-250个氨基酸,如缺乏前130-210个氨基酸,优选如缺乏前140-170个氨基酸,更优选如缺乏前150-160个氨基酸。

[0335] 鉴于三种芳香族氨基酸羟化酶TH、苯丙氨酸羟化酶(PAH)和色氨酸羟化酶(TRPH)在C末端皆共有大约330个氨基酸的高同源性催化域,因此已经提出底物特异性部分地归因于每一者的调控域。构筑TH和PAH的嵌合突变体,其中各种酶的R域连接至另一种酶的C域(Daubner,Hillas,和Fitzpatrick,1997)。使用这些嵌合突变体以及缺乏其N末端R域的截断型突变体以及野生型酶,Daubner等人证明了胺基末端域在限定这些酶的氨基酸底物特异性方面的作用。截断的蛋白质对任一种氨基酸均展现低结合特异性。任一种调控域的连接均大大增强了特异性,但所述特异性是由嵌合蛋白中的催化域决定。

[0336] 本发明中的编码TH的聚核苷酸序列阐述于SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中。在一个优选实施例中,本发明涉及编码TH多肽的聚核苷酸,所述聚核苷酸包含与SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27至少70%的序列一致性,更优选75%序列一致性,例如与SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27至少80%序列一致性,如至少85%序列一致性,例如至少90%序列一致性,如至少95%序列一致性,例如至少96%序列一

致性,如至少97%序列一致性,例如至少98%序列一致性,如至少99%序列一致性。

[0337] 本发明的表达系统构筑体中所包含的编码TH的聚核苷酸还可以编码TH多肽的生物活性片段或变异体。

[0338] 在一个优选实施例中,TH聚核苷酸的此类片段或变异体编码TH多肽,所述TH多肽包含至少50个邻接氨基酸,如75个邻接氨基酸,例如100个邻接氨基酸,如150个邻接氨基酸,例如200个邻接氨基酸,如250个邻接氨基酸,例如300个邻接氨基酸,如350个邻接氨基酸,例如400个邻接氨基酸,如450个邻接氨基酸。

[0339] 在一个实施例中,生物活性片段是酪氨酸羟化酶的催化域 (SEQ ID NO:13) 或 (SEQ ID NO:40)。

[0340] 在某些实施例中,所指定的酪氨酸羟化酶是本发明的所编码TH多肽的SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的突变和/或取代变异体,这些变异体也被涵盖。在一个实施例中,氨基酸序列中的取代是保守的,其中氨基酸被具有类似化学和/或物理特征的另一个氨基酸取代。突变可以发生于SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17内的一个或多个位点处和或所编码的TH多肽内。在一个优选实施例中,本发明涉及使TH具有生物活性的任何突变,如中性突变或静默突变。在一个更优选实施例中,本发明涉及突变,其中SEQ ID NO:7中的任一种的丝氨酸残基S8、S19、S31、S40或S404或SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中的任一种的等效氨基酸残基中的一个或多个已改变。

[0341] 在一个实施例中,生物活性变异体是突变酪氨酸羟化酶多肽,其中SEQ ID NO:7的残基S19、S31、S40或S404中的一个或多个已改变为另一氨基酸残基。

[0342] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统构筑体所表达的酪氨酸羟化酶 (TH) 多肽与选自由以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少75%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少80%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少85%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少90%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少95%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID

NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少96%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少97%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少98%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽至少99%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,更优选与选自自由以下组成的群组的多肽100%一致:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。

[0343] GTP-环水解酶1

[0344] GTP-环水解酶1 (GCH1) 是GTP环水解酶同族的一员。GCH1是叶酸盐和生物蝶呤生物合成路径的一部分。GCH1是四氢生物蝶呤 (BH₄) 生物合成中的第一限速酶,其催化GTP转化成7,8-DHNP-3'-TP。BH₄是芳香族氨基酸羟化酶 (AAAH) 在生物合成单胺神经传递素血清素 (5-羟色胺 (5-HT)、褪黑素、多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素时所需的必不可少的辅因子。此基因的突变与恶性苯丙酮尿症和高苯丙氨酸血症以及左旋多巴反应性肌张力障碍相关。

[0345] 编码不同同功异型物的若干种交替剪接转录物变异体已有描述;然而,并非所有的变异体都产生功能酶。

[0346] GCH1具有涉及若干病症的多种临床意义。GCH1的缺陷是GTP环水解酶1缺乏症 (GCH1D; 亦称为非典型重度苯丙酮尿症,起因于GTP环水解酶1缺乏症) 的病因。GCH1D是归因于四氢生物蝶呤缺乏症的恶性高苯丙氨酸血症的病因之一。其还因神经传递素多巴胺和血清素的耗竭而引起神经传递不足,导致疾病,如帕金森病。主要症状包括:精神运动迟钝、张力障碍、抽搐、嗜眠、易怒、异常运动、体温过高、唾液分泌过多和吞咽困难。一些患者可能呈现重度高苯丙氨酸血症与轻度肌张力障碍5型之间的中等严重程度的表型 (日间波动的肌张力障碍-帕金森氏症)。在此中间表型中,存在着显著的运动迟缓,但无智力迟钝,且若有,则仅最低程度地存在最高苯丙氨酸血症。GCH1的缺陷引起肌张力障碍5型 (DYT5); 也称为日间波动的进行性肌张力障碍、常染色体显性瀨川综合征 (Segawa syndrome) 或日间波动的肌张力障碍-帕金森氏症。DYT5是多巴反应性肌张力障碍。肌张力障碍定义为存在持续的非自主肌肉收缩,通常引起异常姿势。DYT5典型地出现于儿童期,因下肢的肌张力障碍和傍晚时的肌张力障碍恶化而引起行走问题。其特征是姿势和运动紊乱,表现出显著的日间波动。躯干的扭转与众不同。症状在睡眠之后缓解且因疲劳和运动而加剧。对左旋多巴存在着良好的反应而无副作用。

[0347] 联合本发明的构筑体和方法投与的GCH1可以用于治疗帕金森病。

[0348] 本发明的编码GCH1的聚核苷酸序列阐述于SEQ ID NO:30中。在一个优选实施例

中,本发明涉及SEQ ID NO:30和编码GCH1多肽的聚核苷酸的序列变异体,所述序列变异体包含与SEQ ID NO:30至少70%的序列一致性,更优选75%序列一致性,例如与SEQ ID NO:30至少80%的序列一致性,如至少85%序列一致性,例如至少90%序列一致性,如至少95%序列一致性,例如至少96%序列一致性,如至少97%序列一致性,例如至少98%序列一致性,如至少99%序列一致性。

[0349] 本发明的表达系统构筑体中所含的编码GCH1的聚核苷酸还可以编码GCH1多肽的生物活性片段或变异体。

[0350] 在一个优选实施例中,本发明所编码的GCH1聚核苷酸的此类片段或变异体包含至少50个邻接氨基酸,如75个邻接氨基酸,例如100个邻接氨基酸,如150个邻接氨基酸,例如200个邻接氨基酸,如250个邻接氨基酸,其中所讨论的序列中所指定的任何氨基酸改变为不同氨基酸,条件是所述片段或变异体中如此改变的氨基酸不超过15个。

[0351] 还涵盖本发明的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6以及所编码GCH1多肽的突变和取代形式。在一个实施例中,氨基酸序列中的取代是保守的,其中氨基酸被具有类似化学和/或物理特征的另一个氨基酸取代。突变可以发生于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6内的一个或多个位点处和/或所编码的GCH1多肽内。在一个优选实施例中,本发明涉及使GCH1具有生物活性的任何突变,如中性突变或静默突变。

[0352] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统构筑体所表达的生物活性片段包含至少50个邻接氨基酸,其中所选序列中所指定的任何氨基酸改变为不同氨基酸,条件是所述序列中如此改变的氨基酸残基不超过15个。

[0353] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统构筑体所表达的GTP-环水解酶1 (GCH1)多肽与选自由以下组成的群组的多肽至少70%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少75%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少80%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少85%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少90%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少95%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少96%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少97%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少98%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽至少99%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,更优选与选自由以下组成的群组的多肽100%一致:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0354] 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12)

[0355] 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 是催化7,8-二氢新蝶呤三磷酸盐转化成6-丙酮酰四氢蝶呤和三磷酸盐的酶。反应是可逆的。6-丙酮酰四氢蝶呤是四氢生物蝶呤 (BH₄) 生物合成中的中间物。具体地说,PTPS似乎促进GCH1的产生和活性。已报道BH₄在苯丙氨酸羟化酶的稳定性和活性方面起作用,且从而在左旋多巴的生物合成中起作用。PTPS表达于肝脏中。不希望受理论束缚,假设PTPS在肝脏中的初始内源表达水平足以允许发生左旋多巴的生物合成。相应地,如下详述在宿主细胞中转染的本发明表达系统可以进一步包含在表达时编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶 (PTPS, EC 4.2.3.12) 的聚核苷酸。在宿主细胞不是肝脏细胞的实施例中(例如宿主细胞是肌肉细胞,如肌细胞或肌肉细胞前体,如成肌细胞),这尤其相关。

[0356] PTPS联合本发明的构筑体和方法投与可以用于治疗帕金森病。

[0357] 本发明的编码PTPS的聚核苷酸序列阐述于SEQ ID NO:41中。在一个优选实施例中,本发明涉及SEQ ID NO:41和编码PTPS多肽的聚核苷酸的序列变异体,所述序列变异体包含与SEQ ID NO:41至少70%的序列一致性,更优选75%序列一致性,例如与SEQ ID NO:41至少80%序列一致性,如至少85%序列一致性,例如至少90%序列一致性,如至少95%序列一致性,例如至少96%序列一致性,如至少97%序列一致性,例如至少98%序列一致性,如至少99%序列一致性。

[0358] 本发明的表达系统构筑体中所包含的编码PTPS的聚核苷酸还可以编码PTPS多肽的生物活性片段或变异体。

[0359] 在一个优选实施例中,本发明所编码的PTPS聚核苷酸的此类片段或变异体包含至少50个邻接氨基酸,如75个邻接氨基酸,例如100个邻接氨基酸,如150个邻接氨基酸,例如200个邻接氨基酸,如250个邻接氨基酸,其中所讨论的序列中所指定的任何氨基酸改变为不同氨基酸,条件是所述片段或变异体中如此改变的氨基酸不超过15个。

[0360] 还涵盖本发明的SEQ ID NO:41和所编码PTPS多肽的突变和取代形式。在一个实施例中,氨基酸序列中的取代是保守的,其中氨基酸被具有类似化学和/或物理特征的另一个氨基酸取代。突变可以发生于SEQ ID NO:41内的一个或多个位点处和/或所编码的PTPS多肽内。在一个优选实施例中,本发明涉及使PTPS具有生物活性的任何突变,如中性突变或静默突变。

[0361] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统构筑体所表达的生物活性片段包含至少50个邻接氨基酸,其中所选序列中所指定的任何氨基酸改变为不同氨基酸,条件是所述序列中如此改变的氨基酸残基不超过15个。

[0362] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统构筑体所表达的PTPS多肽与SEQ ID NO:41至少70%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少75%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少80%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少85%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少90%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少95%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少96%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少97%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少98%一致,更优选与SEQ ID NO:41至少99%一致,更优选与SEQ ID NO:41 100%一致。

[0363] 细胞系

[0364] 在一个方面中,本发明涉及经分离的宿主细胞,其以基因方式经根据本发明的载

体/表达系统修饰。

[0365] 本发明还涉及适于通过裸细胞生物递送TH和/或GCH-1的细胞,所述细胞经基因修饰以过度表达TH和/或GCH-1,且能够移植到患者中以在所关注的周边组织中局部递送生物活性TH和/或GCH-1多肽。此类细胞可以宽泛地称为治疗细胞。

[0366] 对于活体外基因疗法来说,优选的细胞群组包括被如上文所定义的表达系统转导或转染的经分离的宿主细胞。宿主细胞选自由以下组成的群组:真核细胞,优选哺乳动物细胞,更优选灵长类动物细胞,更优选人类细胞。

[0367] 在一个实施例中,宿主细胞在活体外转染且随后投与(如移植)到哺乳动物中。

[0368] 在一个实施例中,宿主细胞选自由肝细胞、肌细胞和成肌细胞组成的群组。

[0369] 在一个实施例中,所述哺乳动物细胞是肝脏细胞,如肝细胞。

[0370] 在另一个实施例中,哺乳动物细胞是肌肉细胞,如肌细胞或肌肉细胞前体,如成肌细胞。在此类实施例中,表达系统还优选包括可操作地连接到启动子的编码6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)的聚核苷酸。

[0371] 表达系统的医学用途

[0372] 如上文中所指出,根据本发明的表达系统旨在用于医学用途。

[0373] 在高度优选的方面中,根据本发明的表达系统用于周边投与,以便治疗与儿茶酚胺机能不良相关的疾病或病症。

[0374] 相应地,在一个实施例中,根据本发明的表达系统特别适用于维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法中,所述方法包含在有需要的人的周边投与所述表达系统。

[0375] 血浆左旋多巴的治疗有效量或换句话说,治疗范围,通常在0.2-1.5mg/L范围内,但任何时间点时的血浆含量与治疗状态之间的相关性在一天期间是变化的。此变化与以下因素有关,如到达血浆和穿越血脑屏障之间的滞后,以及与其它氨基酸竞争以便主动输送跨越血脑屏障。

[0376] 全身基因疗法诱导左旋多巴基本含量平稳,从而防止左旋多巴的循环含量出现谷值,否则若给与传统口服左旋多巴,则会出现谷值。因此,本发明适用于治疗和/或预防左旋多巴诱发性运动障碍(LID)。

[0377] 所述表达系统因此根据周边投药来设计且配制,目的是治疗与儿茶酚胺机能不良相关的病状或疾病,如帕金森病和左旋多巴诱发性运动障碍。

[0378] 本发明在另一个方面中涉及一种维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含在有需要的人的周边投与(即,在CNS外部投与)上文中所定义的表达系统。

[0379] 在另一个方面中,本发明涉及一种治疗和/或预防与儿茶酚胺机能不良相关的疾病的方法,所述方法包含在有需要的人、在有需要的患者的周边投与治疗有效量的上文中所定义表达系统。

[0380] 在又一个方面中,本发明涉及一种维持左旋多巴在患者血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含向所述患者投与如上文所定义的表达系统。

[0381] 在又一个方面中,本发明涉及一种减少、延迟和/或防止左旋多巴诱发性运动障碍(LID)出现的方法,所述方法包含在有需要的患者的周边投与上文中所定义的表达系统。

[0382] 在又一个方面中,本发明涉及一种获得和/或维持左旋多巴在血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含周边投与包含核苷酸序列的载体,所述核苷酸序列在表达时

编码至少一种治疗多肽,其中所述至少一种治疗多肽是酪氨酸羟化酶 (TH;EC 1.14.16.2) 多肽,或其生物活性片段或变体。

[0383] 本发明可治疗的适应症包括与儿茶酚胺机能不良相关的适应症,具体地说,儿茶酚胺缺乏症,如多巴胺缺乏症。

[0384] 在一个实施例中,与儿茶酚胺机能不良相关的疾病是中枢和/或周边神经系统的疾病、病症或损伤,如神经退化性病症。

[0385] 在一个实施例中,本发明可治疗的疾病是基底神经节疾病。

[0386] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统是在周边投与,用于治疗选自以下组成的群组的疾病:帕金森病 (PD)、运动障碍、多巴反应肌张力障碍、ADHD、精神分裂症、抑郁症、血管型帕金森氏症、原发性震颤、慢性应激、基因多巴胺受体异常;长期类鸦片、可卡因、酒精或大麻服用;肾上腺不足、高血压、低血压、去甲肾上腺素缺乏症、创伤后应激障碍、病态性赌博症、痴呆症、路易体性痴呆症和遗传性酪氨酸羟化酶缺乏症。

[0387] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统和/或宿主细胞用于治疗帕金森病、非典型帕金森病(包括如以下之病状:多发性系统萎缩症、进行性核上麻痹、血管或动脉硬化帕金森病、药物诱发帕金森氏症和GTP环水解酶1缺乏症和/或因多巴胺缺乏症所致的任何肌张力障碍病状)的方法中。

[0388] 具体地说,所述表达系统适用于治疗帕金森病 (PD) 和与之相关的症状和病状。

[0389] 在一个方面中,本发明涉及一种维持左旋多巴在患者血液中的治疗有效浓度的方法,所述方法包含向所述患者投与如上文所定义的表达系统。

[0390] 在一个方面中,本发明涉及一种减少、延迟和/或防止左旋多巴诱发性运动障碍 (LID) 出现的方法,所述方法包含在有需要的患者的周边投与如本文所定义的表达系统。

[0391] 表达系统的投与

[0392] 为了实现本发明的适当效果,需要在周边(即,局部或全身性,但在任一种情况下,均在CNS外部)投与表达系统,但一些表达系统最终可以渗透CNS。

[0393] 本发明的表达系统通常以适合的医药组合物形式投与。相应地,本发明还涉及一种包含如本文所定义的表达系统的医药组合物。此类组合物典型地含有表达系统和医药学上可接受的载剂。如本文所用,言辞“医药学上可接受的载剂”旨在包括与投药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌药剂、等张剂和吸收延迟剂等。这类介质和药剂用于医药活性物质的用途在所属领域中众所周知。除非任何常规介质或药剂与表达系统不相容,否则涵盖其用于组合物的用途。还可以将补充活性化合物并入组合物中。

[0394] 本发明的医药组合物经配制可与其预定投与途径相容。适合的投药途径的实例包括肠胃外,例如肌肉内、静脉内、肝内、皮内、皮下和经粘膜投药,或肢体隔离灌注。

[0395] 适用于可注射用途的医药组合物包括无菌水溶液(其中水可溶)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内投药来说,适合的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM. (巴斯夫,新泽西州派西派尼 (BASF, Parsippany, N.J.)) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的且流动性应达到能容易注射的程度。其在制造和储存条件下必须是稳的且必须保存以防微生物(如细菌和真菌)的污染作用。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等)以及其适合混合物的溶剂或分散介质。微生物作用的预防能通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例

如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,组合中优选包括等张剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。

[0396] 无菌可注射溶液可以通过将所述表达系统以所需量、视需要与上文所列成分之一或组合一起并入适当溶剂中、随后过滤灭菌来制备。

[0397] 全身投药还可以通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮投药来说,配方中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂在所属领域中通常已知,并且对于经粘膜投药来说,包括例如清洁剂、胆汁盐以及梭链孢酸衍生物。经粘膜投药可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂实现。如所属领域中通常已知,对于经皮投药来说,活性化合物配制成软膏、药膏、凝胶或乳膏。

[0398] 在一个实施例中,药剂是用将保护化合物以免从身体快速消除的载剂制备,如控释配方,包括植入物和微囊封递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯以及聚乳酸。用于制备此类配制物的方法对于所属领域的技术人员来说将是显而易见的。所述物质还可以从Alza公司和诺华制药有限公司(Nova Pharmaceuticals, Inc.)购得。还可以使用脂质体悬浮液(包括以针对病毒抗原的单克隆抗体靶向所感染细胞的脂质体)作为医药学上可接受的载剂。这些物质可根据所属领域的技术人员已知的方法制备,例如如美国专利第4,522,811号中所述。

[0399] 将肠胃外组合物配制成容易投药和剂量均一的单位剂型特别有利。如本文所用,单位剂型是指适合作为单一剂型用于待治疗的受试者的实体离散单元;每个单元含有经计算以产生所期望治疗效果的预定量的活性化合物和所需的医药载剂。本发明的单位剂型的规格取决于且直接依赖于活性化合物的独特特征和欲实现的特定治疗效果,以及所属领域中混配用于治疗个体的此类活性化合物固有的局限性。

[0400] 因此,在一个方面中,本发明涉及包含如上文所定义的表达系统的医药组合物。

[0401] 医药组合物可以连同投药说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0402] 因此,在一个方面中,本发明涉及一种试剂盒,其包含上文所定义的医药组合物和使用说明书。

[0403] 如上文中所述,本发明的一个目的是提供一种用于基因疗法的表达系统,所述表达系统相对于CNS在周边投与,即,在CNS外部投与,以避免使用脑外科手术,包括注射到脑中。

[0404] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统通过静脉内投药而在周边投与。

[0405] 在一个实施例中,投药是在门静脉中进行。此类投药靶向肝脏。

[0406] 根据本发明的表达系统还可以通过肝内投药而在周边投与。

[0407] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统通过肌肉内投药而在周边投与。

[0408] 在一个实施例中,根据本发明的表达系统通过肢体隔离灌注来投与。在这种情况下,可以如Hagstrom等人(2004)《分子疗法(Mol. Ther.)》10(2):386-398中所述投与裸质体DNA。

[0409] 表达系统可能需要多次投与以达到治疗效果。在一些实施例中,表达系统投与至少一次,如一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次。

[0410] 投药剂量可以取决于多种因素,包括欲治疗的个体、表达系统和启动子。在本发明的一些实施例中,表达系统可以至少 1×10^{11} vg/kg体重的剂量投与,如至少 1×10^{12} vg/kg体

重。在本发明的一些实施例中,表达系统可以至少 1×10^{11} vg/kg肌肉的剂量投与,如至少 1×10^{12} vg/kg肌肉。此类剂量可以适用于例如人类。

[0411] 组合疗法

[0412] 上文中所定义的表达系统的治疗方案可以补充其它适合的化合物。在一个此类实施例中,本发明另外包含以全身投与治疗有效量的左旋多巴作为投与表达系统的补充。

[0413] 在一个实施例中,治疗有效量的四氢生物蝶呤(BH₄)或其类似物通过本发明的表达系统投与接受基因疗法的患者。

[0414] 在一个实施例中,BH₄类似物是沙普蝶呤(sapropterin)。

[0415] 在本发明的一个实施例中,投与治疗有效量的周边脱羧酶抑制剂。脱羧酶抑制剂典型地选自苄丝肼和卡比多巴组成的群组。

[0416] 在另一个实施例中,向有需要的患者投与治疗有效量的儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂。

[0417] 儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂典型地选自托卡朋(tolcapone)、恩他卡朋(entacapone)和硝替卡朋(nitecapone)组成的群组。

[0418] 在某些实施例中,BH₄、脱羧酶抑制剂和/或儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂经口投与。

[0419] 或者,BH₄、脱羧酶抑制剂和/或儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂是静脉内或肌肉内投与。

[0420] 在组合疗法中,BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和/或其类似物的投与是全身投与。

[0421] 在一种组合疗法中,BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和其类似物的投与是肠内或肠胃外投与。

[0422] 在一种组合疗法中,BH₄、脱羧酶抑制剂和/或COMT抑制剂和其类似物的投与是口服、静脉内或肌肉内投与。

[0423] VII. 实例

[0424] 实例1: AAV产生质体的载体构筑克隆

[0425] 单顺反子自互补性AAV产生质体的产生

[0426] 简单地说,分别产生双链rAAV2/8-LP1-GCH1和rAAV2/8-LP1-tTH所用的AAV产生质体scAAV-LP1-GCH1(pAA009)和scAAV-LP1-tTH(pAA010)(SEQ ID NO:34)如下构筑:用Xba1和Spe1消化scAAV-LP1-hFIXco且使其分别与从pLA100(ssAAV-SYN-GCH1-SYN-TH-WPRE)和pLA109(ssAAV-SYN-GCH1-SYN-tTH)分离的GCH1或tTH Nhe1/Nhe1 PCR片段连接。如下构筑scAAV-LP1-GCH1(pAA009)(SEQ ID NO:35)和scAAV-LP1-tTH(pAA010)(SEQ ID NO:34)载体:在适当缓冲液中,使用25ng模板DNA、200μM dNTP(NEB)和GoTaq聚合酶(普洛麦格(Promega)),使用浓度为0.75pmol/μl的引物AA16(含有Nhe1位点的正向引物,5'-ccaagctagcATGGAGAAGGGCCCTGTG-3',SEQ ID NO:42)和AA17(含有Nhe1位点的反向引物,5'-ccaagctagcGGTCGACTAAAAACCTCC-3',SEQ ID NO:43)扩增pLA100的992bp GCH1片段(ssAAV-SYN-GCH1-SYN-TH)。PCR扩增条件如下:95℃(2分钟),随后为30个循环的95℃(30秒)/65℃(30秒)/72℃(30秒),以及在72℃历时5分钟的最终延长。在适当缓冲液中,使用25ng DNA、200μM dNTP(NEB)和Phusion聚合酶(赛默科技(Thermo Scientific)),使用浓度

为 $0.4 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ 的引物 AA33 (含有 NheI 位点的正向引物, $5' - \text{CCAAgctagcATGAGCCCCGCGGGCCCAAG} - 3'$, SEQ ID NO:44) 和 AA34 (含有 NheI 位点的反向引物, $5' - \text{CCAAgctagcGGGGGATCTTCGATGCTA GAC} - 3'$, SEQ ID NO:45) 扩增 pLA109 (ssAAV-SYN-GCH1-SYN-tTH) 的 1858bp tTH-WPRE 片段。PCR 扩增条件如下: 98°C (30秒), 随后为 30 个循环的 98°C (10秒) / 63°C (30秒) / 72°C (1分钟), 以及在 72°C 历时 10 分钟的最终延长。PCR 产物 (插入) 在 37°C 用 NheI 消化 3 小时且质体 scAAV-LP1-hFIXco (载体) (SEQ ID NO:43) 在 37°C 用 XbaI/SpeI 消化 3 小时, 以便除去 hFIXco 基因。在 100V 下、在 1% 琼脂糖凝胶中迁移 1 小时之后, 通过凝胶电泳来分析消化且在紫外透射仪上可视化。使用解剖刀刀片从凝胶中切出且使用 QIAquick 凝胶萃取试剂盒 (凯杰 (Qiagen)) 从凝胶中提纯片段 (GCH1 插入: 992bp; tTH 插入: 1858; 载体: 3525bp)。使载体在 16°C 与插入连接整夜且转化到 SURE 细菌中。挑选菌落且通过 XcmI 消化来分析以检验 GCH1 或 tTH PCR 片段的存在且随后送交测序以确认每种构筑体含有预期的序列。

[0427] 最后的转基因构筑体是用于 dsAAV 产生的两种质体, 其含有人类 GCH1 或截断的人类 TH 基因 (例如 SEQ ID NO:40), 处于肝脏特异性 LP1 增强子/启动子的控制下, 全部侧接 AAV2ITRs。

[0428] 用 HLP 替代 pAA009 和 pAA010 中的 LP1 启动子

[0429] AAV 产生质体 scAAV-HLP-GCH1 (pAA011) (SEQ ID NO:31) 和 scAAV-HLP-tTH (pAA016) (SEQ ID NO:32) 分别用于产生双链 rAAV2/8-HLP-GCH1 和 rAAV2/8-HLP-tTH。简单地说, 如下构筑 pAA011 (SEQ ID NO:35): 分别用引物组 AA43/AA44 ($5' - \text{CCAATGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTCTAGATGTTTGCTGC TTGCAATGTTTGC} - 3' / 5' - \text{CCAAGAATTCGCTAGCGATTCACTGTCCCAGGTCAGTG} - 3'$, SEQ ID NO:46 和 SEQ ID NO:47) 扩增来自 AV-HLP-codop-hFVIII-V3 的 HLP 启动子 (Amit Nathwani 友情提供), 且用 MscI 和 EcoRI 将其替代 LP1 启动子克隆到 pAA009 中 (SEQ ID NO:35)。通过重叠 PCR 扩增片段 HLP-tTH 来产生 pAA016 (SEQ ID NO:32)。分别使用引物对 AA57/AA67 (分别为 $5' - \text{CCAAGCTAGCTGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGC} - 3' / 5' - \text{GATCCTTGCTACGAGCTTGAATGATTCAGTGTCCCAGGTCAGT} - 3'$, SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:49) 和 AA68/RmuscThext2 (分别为 $5' - \text{ACTGACCTGGGACAGT GAATCATTCAAGCTCGTAGCAAGGATC} - 3' / 5' - \text{AAAgctagcTTCGATGCTAGACGATCCA G} - 3'$, SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:51) 来产生含有重叠序列的片段 HLP 和 tTH。使用引物 AA57/AA67, 通过重叠 PCR 来使 HLP 与 tTH 融合且使用 NheI 限制性核酸内切酶亚克隆到 pcDNA3.1 (+) 中, 借此产生 pAA015。最后, 使用 NheI 从 pAA015 切出 HLP-tTH 片段且连接到载体 pAV-LP1-hFIXco 中, 介于限制位点 NheI 与 SpeI 之间, 借此产生 pAA016 (SEQ ID NO:32)。

[0430] 在适当缓冲液中, 使用 20ng 模板 DNA、 $200\mu\text{M}$ dNTP (NEB) 和 Phision 高保真度聚合酶 (飞世尔科技 (Fischer Scientific)), 在 $20\mu\text{l}$ PCR 反应中扩增 298bp HLP 片段。PCR 扩增条件如下: 98°C (30秒), 随后为 30 个循环的 98°C (10秒) / 65°C (15秒) / 72°C (60秒), 以及在 72°C 最后延长历时 10 分钟。

[0431] 使用 45ng HLP 模板 DNA 和 306ng tTH 模板 DNA (各预先通过 PCR 产生), 在 $20\mu\text{l}$ PCR 反应中扩增通过重叠 PCR 所产生的 2.1kb HLP-tTH 片段。在适当缓冲液中使用 $200\mu\text{M}$ dNTP (NEB) 和 Phision 高保真度聚合酶 (飞世尔科技) 且 PCR 扩增的循环条件如下: 98°C (30秒), 随

后为30个循环的98℃ (10秒) /60℃ (15秒) /72℃ (60秒),和在72℃最后延长历时10分钟。

[0432] 双顺反子单股AAV产生质体的产生

[0433] 使用AAV产生质体ssAAV-LP11-GCH1-LP1-tTH (pAA019) (SEQ ID NO:33) 产生单链rAAV2/8-LP1-GCH1-LP1-tTH和其重组副产物rAAV2/8-LP1-tTH。简单地说,将表达盒LP1-GCH1-LP1-tTH-WPRE亚克隆到pBluescript II SK (+) 中,从而制备pAA018,随后克隆到含有ITR的AAV主链pSUB201,借此形成pAA019 (SEQ ID NO:33)。使用12.5ng scAAV-LP1-hFIXco作为模板,使用引物AA01/AA02扩增启动子LP1,且使用B1p1和Sbf1限制位点克隆到pTRUF11中,借此产生pAA001。接着,使用27ng pAAV-Syn-GCH1-Syn-TH作为模板,使用引物AA03/AA004扩增GCH1基因,且随后使用Sbf1和Tth 1111位点克隆到pAA001中,借此形成pAA002。接着,使用引物对AA37/AA38从pAA002扩增LP1-GCH1片段,所述引物对分别含有具有Xba1/B1p1和Xba1/Sph1/BstBI/Tth 1111限制位点的突出端,以允许构筑模块化载体。通过Xba1限制位点将LP1-GCH1片段连接到AAV主链pSub201中,借此形成pAA003。为了避免因主链中存在ITR所致的克隆困难,通过Xba1位点将LP1-GCH1转移到克隆载体pUC18中,借此形成pAA004。如下添加第二LP1启动子:使用引物对AA006/AA07从pAA010扩增且使用BstBI和Tth1111限制位点将其克隆到pAA004中,借此形成pAA005。为了将tTH基因添加到构筑体中,LP1-GCH1-LP1片段因pUC18中存在额外的Sph1位点而须改变为主链pBluescript II SK (+)。这使用Xba1位点在pAA005中进行且在连接到pBluescript II SK (+) 中之后,将新构筑体命名为pAA006。接着,使用引物对AA53/AA65和50ng模板,从pLA109 (AAV-Syn-GCH1-Syn-tTH) 扩增tTH-WPRE片段。通过限制位点Sph1和BstBI将tTH基因插入pAA006中,借此形成pAA018。对pAA018测序之后,发现Tth1111位点上的突变且此通过再克隆GCH1-LP1序列来固定。在此,设计新引物组以在Tth1 111位点下游紧靠着添加Bg111限制位点且允许并入与pLA100和pLA109精确相同的GCH1克扎克序列(kozak sequence)。使用引物对AA73/AA84和AA85/AAA07分别扩增新GCH1序列和第二LP1启动子。使用引物对AA73/AA07进行重叠PCR以融合GCH1-LP1,随后使用限制位点Sbf1和BstBI克隆到pAA017中,借此形成pAA018。最后,将整个双顺反子LP1-GCH1-LP1-tTH表达盒转移回到AAV主链pSub201中以允许重组AAV产生且命名为pAA019 (SEQ ID NO:33)。

[0434] 单顺反子自互补AAV-HLP-tTH是通过重叠PCR使HLP启动子与tTH基因融合来产生。从AV-HLP-codop-hFVIII-V3 (Amit Nathwani实验室提供的质体) 扩增HLP序列。tTH序列是TH序列,其N末端160个氨基酸已截断(例如SEQ ID NO:40) 以除去原本涉及允许多巴胺或左旋多巴对TH实现反馈抑制的关键丝氨酸磷酸化位点。HLP和tTH一经扩增,则通过重叠PCR将其融合且使用Nhe1限制位点将其亚克隆到pcDNA3.1 (+) 中。品控消化和测序之后,将表达盒HLP-tTH克隆到Amit Nathwani提供的AAV自互补主链中(图2)。

[0435] 单顺反子自互补AAV-HLP-GCH如下产生:从pGPT001 (SYN-GCH1-SYN-TH) 扩增GCH1基因且将其克隆到自互补AAV主链pAV-LP1-hFIXco (SEQ ID NO:36) (Amit Nathwani提供) 中,借此产生AAV-LP1-GCH1。第二步,从AV-HLP-codop-hFVIII-V3 (SEQ ID NO:37) 扩增HLP启动子序列且连接到scAAV-LP1-GCH1中,借此用HLP替代LP1,形成scAAV-HLP-GCH1 (图2)。

[0436] 使用AAV质体pSUB201作为主链来产生双顺反子单链AAV-LP1-GCH1-LP1-tTH。为了产生其中各元件(基因或启动子)可容易除去或替代的模块化载体,鉴别出侧接ITR的最优限制位点。两种LP1序列均通过PCR从pAV-LP1-hFIXco扩增且克隆到pSUB201中。从用于脑研

究的预先存在双顺反子载体 (SYN-GCH1-SYN-tTH) 扩增GCH1和tTH且克隆到pSUB201中,形成ssAAV-LP1-GCH1-LP1-tTH。克隆时序是第一LP1-GCH1-第二LP1-tTH(图2)。

[0437] 其它载体通过所属领域中已知的常规方法构筑。将所关注的序列通过限制、连接和吉布森组装(Gibson assembly)亚克隆到载体中。

[0438] AAV载体通过在贴壁HEK293细胞中三次转染来制备,且任选地通过碘克沙醇(iodixanol)梯度离心来浓缩。

[0439] 实例2:左旋多巴抑制

[0440] 设计给药方案,以评估携带GTP环水解酶1和/或酪氨酸羟化酶(分别为AAV2/8GCH1或AAV2/8tTH)基因的腺相关病毒载体诱导帕金森病(PD)患者肝脏产生左旋多巴的能力。

[0441] 进行两项研究。在第一项研究中,将18只CD1小鼠随机分成3组各6只动物。第1天,如下表中所示处理动物:

[0442]	分组	载体 (AAV2/8)	动物数	剂量 (vg/小鼠)
	1	-	6	-
	2	scLP1-GCH1	6	3.51×10^{10}
		scLP1-tTH		3.51×10^{10}
	3	scLP1-tTH	6	7.02×10^{10}

[0443] 如实例1中所述制备载体scLP1-GCH1 (SEQ ID NO:35) 和scLP1-tTH (SEQ ID NO:34)。通过静脉内(尾静脉)推注来投与载体。

[0444] 在第二项研究中,将4只CD1小鼠随机分成2组各2只动物。第1天,如下表中所示处理动物:

[0445]	分组	载体 (AAV2/8)	动物	剂量 (vg/小鼠)
	1	scHLP-tTH	2	3.60×10^{12}
	2	scHLP-GCH1	2	1.80×10^{12}
		scHLP-tTH		1.80×10^{12}

[0446] 如实例1中所述制备载体scHLP-GCH1 (SEQ ID NO:31) 和scHLP-tTH (SEQ ID NO:32)。

[0447] 在第一项与第二项研究中,载体通过静脉内(尾静脉)推注来投与(图3)。

[0448] 在不进行进一步实验的情况下观察小鼠28天。未记录到不良事件。第28天,处死之前的一小时,小鼠通过腹膜内注射给与10mg/kg苄丝肼且通过腹膜内注射给与低剂量的恩他卡朋。恩他卡朋的标示注射剂量是30mg/kg(图3)。

[0449] 处死时,通过心脏穿刺获得血液样品,随后向动物灌注PBS,随后灌注PFA且采集肝脏。

[0450] 将血液收集到含有肝素的小瓶中且在冰上储存直到最后一个动物处死为止,接着在4度离心,随后使血浆在没有抗氧化剂的情况下在-70℃冷冻。

[0451] 左旋多巴是通过ABS实验室有限公司(英国赫特福德郡韦林花园城布奥德沃特路生物园(BioPark, Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 3AX, United Kingdom)使用验证方法分析且根据欧洲医药管理局(European Medicines Agency)生物分析指南、使用适当校准标准物和品控样品进行,使用样品和氘化内标物双重

复进行。

[0452] 结果描绘于图5中,其中A、B和C组来自第一项动物研究,而D和E组来自第二项动物研究。

[0453] 使肝脏在PFA中固定,接着包埋于石蜡中,固定于载玻片上且分析。

[0454] 使用GCH1特异性抗体分析肝脏切片的GCH1表达。适用的GCH1特异性抗体可以购得且包括例如小鼠IgG MCA3138Z (英国牛津Serotec),其可以1:2000AbD使用(英国)。第一项动物研究所得的结果描绘于图4a中。转导率经测定为<1%。第二项动物研究所得的结果描绘于图4b中。转导率经测定为约25%。

[0455] TH的表达可以使用多种抗酪氨酸羟化酶抗体测定,包括Pel Freez和Abeam制备的那些抗体。

[0456] 适用于IHC的稀释度:

[0457] Pel freez抗酪氨酸羟化酶兔多克隆抗体1:750

[0458] Abeam抗酪氨酸羟化酶兔单株[EP1532Y]-1:1000

[0459] 肝脏切片还使用标准程序、用苏木精和曙红染色。苏木精和曙红染色未显示组织损伤或白细胞浸润迹象(参见图6)。

[0460] 结论

[0461] 在第一项动物研究中,投与低剂量的载体(7.02×10^{10} vg/小鼠)。如通过肝脏免疫组织化学所表明,此产生了<1%的转导率(参见图4a)。在第二项动物研究中,投与更高剂量的载体(3.6×10^{12} vg/小鼠)且转导率显著升高,即约25%(参见图4b)。Hiroyuki Nakai等人《病毒学杂志(J.Virol.)》2005,79(1):214已提出,实现>70%转导率需要AAV8载体的剂量(vg/小鼠)超过 2×10^{12} 。与此相符,更高剂量引起转导增强。

[0462] HLP是与LP1同样强的短肝脏特异性启动子(McIntosh J等人,《血液》2013年4月25日;121(17):3335-44)。左旋多巴分析的对照证实整个动物研究1和2的灵敏性一致。

[0463] 如图5所示,第一项动物研究中的第2组和第3组小鼠中的全身左旋多巴含量(分别表示为B和C)略高于对照组含量。然而,第二项动物研究中的第1组和第2组小鼠中的全身左旋多巴含量(分别表示为D和E)显著高于对照组。两项研究中所观察的全身左旋多巴含量差异相信是由剂量差异引起,从而导致转导效率不同。

[0464] 在其它研究中,投与两次或三次剂量的苄丝肼和恩他卡朋或托卡朋,8小时后收集血液供左旋多巴分析用且血浆在分析之前是在抗氧化剂(25%w/v焦亚硫酸钠水溶液)存在下储存。

[0465] 实例3:载体合成

[0466] 合成一系列载体以转染和转导周边组织,使其以稳定速率分泌左旋多巴到周边循环中,所述左旋多巴能穿越血脑屏障且用作合成多巴胺的前药。

[0467] 这些载体包括具有以下配置或元件的载体:

[0468] • 载体包括编码人类酪氨酸羟化酶同功异型物的核酸序列,其中所述核酸序列配置为自互补基因组。

[0469] • 在一个实施例中,截断核酸序列以编码缺乏功能酶的约160个N末端氨基酸的N末端截断酪氨酸羟化酶(SEQ ID NO:15)或(SEQ ID NO:40)。N末端截断酶具有功能,但不容易受到酶催化反应产物的反馈抑制。从而实现了所期望的左旋多巴产物的产生增加直到治

疗有效含量。

[0470] • 在一个实施例中,构筑体不利用自互补基因组。

[0471] • 载体构筑体是使用靶向肝脏和肌肉的多种AAV血清型产生。血清型包括针对肝脏的血清型8、5、2和7以及针对肌肉的血清型5、1、6和2。

[0472] • 载体构筑体包括多种组织特异性启动子,如用于肝脏的LP1。

[0473] • 模型载体序列是利用Nathwani等人的论文(随附)的下述附件提供。在我们的载体序列与Nathwani等人的类似的情况下,插入因子IX基因组(但具有自互补TH码)替代FIX码。

[0474] 实例4:GCH和TH在肝脏中的表达

[0475] 第1天,小鼠接受:静脉内(尾静脉)推注0.15ml双顺反子载体制剂(ssAAV2/8-LP1-GCH1-LP1-截断的TH) 3.60×10^{12} vg/小鼠(此制剂包括一定比例的通过同源重组形成的单顺反子ssLP1-tTH);静脉内(尾静脉)推注0.15ml媒剂制剂;或10mg/kg口服左旋多巴。

[0476] 观察小鼠10-15天后处死且收集血浆,如实例3中所述。

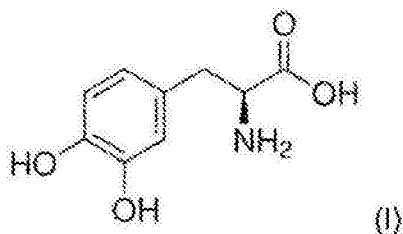
[0477] 通过qPCR对GCH1和TH在肝脏中的表达进行分析。

[0478] 免疫组织化学分析如实例3中所述进行,以显示GCH1在肝脏切片中的表达,所述肝脏切片来源于已接受双顺反子载体的小鼠。GCH1的表达可以用作载体转染的标记。

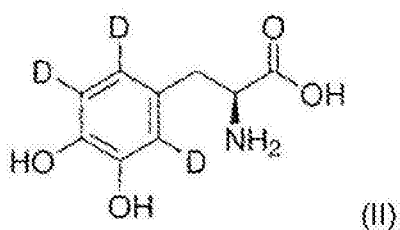
[0479] 进行西方印迹分析以表明GCH1仅表达于已接受载体静脉内推注的小鼠的肝脏中。

[0480] 实例5:左旋多巴在肝脏中的合成

[0481] 通过用0.4M过氯酸使蛋白质沉淀于血浆中来测定EDTA血浆中的左旋多巴含量。通过离心除去所沉淀的蛋白质之后,将过氯酸层的一部分转移到96孔板中且用0.1%甲酸稀释。通过LC-MS/MS分析左旋多巴(I)和其稳定的同位素标记内标物左旋多巴-d₃(II)。



[0482]



[0483] 由于左旋多巴在血浆中不稳定,因此含有左旋多巴的所有血浆均通过添加1%焦亚硫酸钠来稳定化且在-80℃的标示温度下冷冻储存。校准标准物是按照0(空白)、0.020、0.050、0.100、0.250、1.00、2.50、5.00和10.0μg/mL制备且品控样品(QCs)是按0.060、0.800和8.00μg/mL制备。

[0484] 使用Agilent 1100系列二元泵和CTC Analytics™CTC HTS-xt PAL自动取样器,在ACE AQ 50mm x 3mm液相色谱柱上使用0.1%甲酸乙腈梯度进行分析。使用装配有Turbolonspray™离子源的Applied Biosystems™API4000进行质谱分析。针对左旋多巴和

左旋多巴-d₃监测的多反应离子 (MRM) 分别是m/z 198.2→152.1和201.2→155.1。使用1/x²加权的线性回归拟合校准曲线。

[0485] 实例6:筛选

[0486] • 将如上文所述制备的各种载体注射到一组小鼠 (每组大约6只) 的尾静脉或后肢肌肉块中。给药后观察小鼠2-6周。收集周边血液且分析左旋多巴。

[0487] • 动物接受伴随给与的四氢生物喋呤 (经口或腹膜内) 或AAV载体, 所述AAV载体转导GCH1和/或PTPS产生于肝脏或肌肉中以便提供左旋多巴合成所需的这种辅因子。

[0488] • 动物接受全身性投与 (经口或腹膜内) 的脱羧酶抑制剂 (例如苄丝肼) 和儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂以限制左旋多巴代谢。这些药剂投与最少24小时后, 收集样品以评估周边左旋多巴含量。

[0489] • 动物对照组用相同方式处理, 但不注射载体。这组充当对照组, 据以与经载体处理的动物的左旋多巴含量进行比较。

[0490] • 可以对表达不同比率的TH、GCH1和PTPS的单顺反子、双顺反子或三顺反子载体、质体或表达系统进行比较, 以实现最优的左旋多巴产生。

[0491] • 可以对载体 (各表达一种或多种基因) 的不同比率进行比较, 以实现最优的左旋多巴产生。

[0492] 实例7:临床前

[0493] • 在急性和慢性研究中, 在啮齿动物和非人类灵长类动物中测试产生周边左旋多巴含量最高的载体, 以证明左旋多巴按照治疗相关的水平持续分泌且证明可接受的耐受性和安全性。

[0494] • 在急性研究中, 啮齿动物和非人类灵长类动物肌肉内或静脉内注射载体 (注射到周边静脉中或直接注射到门静脉中)。注射后观察动物28天。观察结果包括体重、食物消耗、任何临床征象或症状的观察结果、全血细胞计数、尿素和电解质、肝功能测试, 和肌酸磷酸激酶的测量结果。尸检之后, 检查组织任何组织病理学异常的证据且评估载体的生物分布。

[0495] • 在慢性研究中, 啮齿动物和非人类灵长类动物肌肉内或静脉内注射载体 (注射到周边静脉中或直接注射到门静脉中)。注射后观察动物6到12个月。观察结果包括体重、食物消耗、任何临床征象或症状的观察结果、全血细胞计数、尿素和电解质、肝功能测试, 和肌酸磷酸激酶的测量结果。尸检之后, 检查组织任何组织病理学异常的证据且评估载体的生物分布。

[0496] • 其它临床前研究将包括致突变性测试、致癌性测试和启动临床研究所需的其它测试 (例如评估载体或载体生产物对心脏QT间期的影响)

[0497] 实例8:临床

[0498] • 以上述研究中令人满意的结果为准: 使用IM、IV定向输注到门静脉中或肢体隔离灌注, 基于性能最优的载体来设计临床研究。

[0499] • 临床研究将包括详细评估在同时投与 (口服或腹膜内) 脱羧酶抑制剂 (例如苄丝肼) 和儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂存在和不存在的条件下且在不投与BH₄或口服左旋多巴的情况下, 已治疗患者中的左旋多巴药物动力学。

[0500] • 临床研究将评估急性左旋多巴产生 (载体注射之后的大约4到8周) 和慢性左旋

多巴产生(时间点包括载体注射之后的3、6、12、18和24个月)。

[0501] • 临床研究将包括评估本发明作为帕金森病治疗佐剂的急性和慢性安全和功效。

[0502] 实例9:序列概述

[0503] SEQ ID NO:1:GTP环水解酶1(人类)

[0504] SEQ ID NO:2:GTP环水解酶1同功异型物GCH-2(人类)

[0505] SEQ ID NO:3:GTP环水解酶1同功异型物GCH-3(人类)

[0506] SEQ ID NO:4:GTP环水解酶1同功异型物GCH-4(人类)

[0507] SEQ ID NO:5:GTP环水解酶1(大鼠)

[0508] SEQ ID NO:6:GTP环水解酶1(小鼠)

[0509] SEQ ID NO:7:酪氨酸3-羟化酶(人类)

[0510] SEQ ID NO:8:酪氨酸3-单氧酶(人类)

[0511] SEQ ID NO:9:酪氨酸羟化酶(人类)

[0512] SEQ ID NO:10:酪氨酸羟化酶(人类)

[0513] SEQ ID NO:11:酪氨酸3-单氧酶(人类)

[0514] SEQ ID NO:12:截断的酪氨酸羟化酶,TH(对应于催化域;人类)

[0515] SEQ ID NO:13:在ser40突变的TH

[0516] SEQ ID NO:14:SEQ ID NO:14:在Ser19+Ser40突变的TH

[0517] SEQ ID NO:15:SEQ ID NO:15:在Ser19+Ser31+Ser40突变的TH

[0518] SEQ ID NO:16:SEQ ID NO:16:酪氨酸3-羟化酶(大鼠)

[0519] SEQ ID NO:17:酪氨酸3-羟化酶(小鼠)

[0520] SEQ ID NO:18:腺相关病毒2左末端核苷酸序列

[0521] SEQ ID NO:19:腺相关病毒2右末端核苷酸序列

[0522] SEQ ID NO:20:智人GTP环水解酶1(GCH1)转录物变异体1

[0523] SEQ ID NO:21:猿猴病毒40早期聚腺苷酸化核苷酸序列

[0524] SEQ ID NO:22:猿猴病毒40晚期聚腺苷酸化核苷酸序列

[0525] SEQ ID NO:23:智人酪氨酸羟化酶(TH)转录物变异体2核苷酸序列

[0526] SEQ ID NO:24:编码催化域的截断TH核苷酸序列

[0527] SEQ ID NO:25:在ser40突变的TH核苷酸序列

[0528] SEQ ID NO:26:ser19和ser40突变的TH核苷酸序列

[0529] SEQ ID NO:27:ser19、ser31和ser40突变的TH核苷酸序列

[0530] SEQ ID NO:28:土拨鼠B型肝炎病毒(WHV8)转录后调控元件核苷酸序列

[0531] SEQ ID NO:29:突变的土拨鼠B型肝炎病毒(WHV8)转录后调控元件核苷酸序列

[0532] SEQ ID NO:30:编码GCH-1的核苷酸序列

[0533] SEQ ID NO:31:pAA011-scAAV-HLP-GCH1

[0534] SEQ ID NO:32:pAA016-scAAV-HLP-tTH

[0535] SEQ ID NO:33:pAA019-scAAV-LP1-GCH1-LP1-tTH

[0536] SEQ ID NO:34:pAA010scAAV-LP1-tTH

[0537] SEQ ID NO:35:pAA009scAAV-LP1-GCH1

[0538] SEQ ID NO:36:scAAV-LP1-hFIXco

- [0539] SEQ ID NO:37:pAV HLP FVIII V3kan
- [0540] SEQ ID NO:38:杂合肝脏特异性启动子(HLP)
- [0541] SEQ ID NO:39:肝脏启动子/增强子1(LP1)
- [0542] SEQ ID NO:40:tTH=截断的酪氨酸羟化酶
- [0543] SEQ ID NO:41:PTPS=6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶
- [0544] SEQ ID NO:42:引物AA16
- [0545] SEQ ID NO:43:引物AA17
- [0546] SEQ ID NO:44:引物AA33
- [0547] SEQ ID NO:45:引物AA34
- [0548] SEQ ID NO:46:引物AA43
- [0549] SEQ ID NO:47:引物AA44
- [0550] SEQ ID NO:48:引物AA57
- [0551] SEQ ID NO:49:引物AA67
- [0552] SEQ ID NO:50:引物AA68
- [0553] SEQ ID NO:51:引物RmiscTHext2
- [0554] SEQ ID NO:52:单顺反子递送质体TH
- [0555] SEQ ID NO:53:双顺反子递送质体GCH1PTPS
- [0556] SEQ ID NO:1:GTP环水解酶1(人类)
- [0557] >sp|P30793|GCH1_人类GTP环水解酶1OS=智人GN=GCH1PE=1SV=1EC=3.5.4.16
- [0558] 替代名称:
- [0559] GTP环水解酶1
- [0560] 短名=GTP-CH-1或GCH-1或GCH1或GCH1
- [0561] 生物体:智人(人类)
- [0562] <http://www.uniprot.org/uniprot/P30793>
- [0563] MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRSEEDNELNLP
NLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEDHDEMVIKIDIMFSMCEHHLV
PFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITEALRPAGVGVVVEATHMCMVMRGVQKMNS
KTVTSTMLGVFREDPKTREEFLTLIRS
- [0564] SEQ ID NO:2:GTP环水解酶1同功异型物GCH-2(人类)
- [0565] >sp|P30793-2|GCH1_GTP环水解酶1的人类同功异型物GCH-2OS=智人GN=GCH1
- [0566] MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRSEEDNELNLP
NLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEDHDEMVIKIDIMFSMCEHHLV
PFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITEALRPAGVGVVVEATSAEP
- [0567] SEQ ID NO:3:GTP环水解酶1同功异型物GCH-3(人类)
- [0568] >sp|P30793-3|GCH1_GTP环水解酶1的人类同功异型物GCH-3 OS=智人GN=GCH1
- [0569] MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRSEEDNELNLP
NLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEDHDEMVIKIDIMFSMCEHHLV
PFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITEALRPAGVGVVVEAT

[0570] SEQ ID NO:4:GTP环水解酶1同功异型物GCH-4(人类)

[0571] >sp|P30793-4|GCH1_GTP环水解酶1的人类同功异型物GCH-40S=智人GN=GCH1

[0572] MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRSEEDNELNLP
NLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEHDHDEMVIKIDIMFSMCEHHLV
PFVGVKHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITEALRPAGVGVVEATKSNKYNGLSPLLS
SCHLFVAILK

[0573] SEQ ID NO:5:GTP环水解酶1(大鼠)

[0574] >sp|P22288|GCH1_大鼠GTP环水解酶10S=褐家鼠GN=Gch1 PE=1 SV=1

[0575] MEKPRGVRCNTNGFPERELPRPGASRPAEKSRRPEAKGAQPADAWKAGRPRSEEDNELNLPNLAAAYSSI
LRSLGEDPQRQGLLKTPWRAATAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEHDHDEMVIKIDIMFSMCEHHLVPFVGRVHIG
YLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITEALQPAGVGVVIEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTSTMLG
VFREDPKTREFFLTLIRS

[0576] SEQ ID NO:6:GTP环水解酶1(小鼠)

[0577] >sp|Q05915|GCH1_小鼠GTP环水解酶1 OS=小家鼠GN=Gch1 PE=2 SV=1

[0578] MEKPRGVRCNTNGFSERELPRPGASPPAEKSRRPEAKGAQPADAWKAGRHRSEENQVNLPKLAAAYSSI
LLSLGEDPQRQGLLKTPWRAATAMQYFTKGYQETISDVLNDAIFDEHDHDEMVIKIDIMFSMCEHHLVPFVGRVHIG
YLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITEALQPAGVGVVIEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTSTMLG
VFREDPKTREFFLTLIRS

[0579] SEQ ID NO:7:酪氨酸3-羟化酶(人类)

[0580] EC=1.14.16.2

[0581] 替代名称:酪氨酸3-单氧酶或酪氨酸3-羟化酶或酪氨酸羟化酶

[0582] 短名=TH

[0583] 生物体:智人(人类)

[0584] MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLE
AVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLS
GVRQVSEDVRSAPGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDP IPRVE
YTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFG
LCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRP
FSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAI

[0585] SEQ ID NO:8:酪氨酸3-单氧酶(人类)

[0586] >sp|P07101|TY3H_人类酪氨酸3-单氧酶OS=智人GN=TH PE=1 SV=5

[0587] MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMVRGQGAPGPSLTGSPWPGTAAPAASYTPTPRSPRFIGRR
QSLIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLE
RPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVRQVSEDVRSAPGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHP
GFSQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDP IPRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNI
PQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELLGHVPMLADRTFAQ
FSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFG LCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQ
DQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0588] SEQ ID NO:9:酪氨酸羟化酶(人类)

[0589] >tr|Q2M3B4|Q2M3B4_人类酪氨酸羟化酶OS=智人GN=TH PE=2 SV=1

[0590] MPTPDATTPQAKGFRRRAVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLE
AVAFEEKEGKAMLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLS
GVRQVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVE
YTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFG
LCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRP
FSVKFDPYTTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0591] SEQ ID NO:10:酪氨酸羟化酶(人类)

[0592] >tr|B7ZL73|B7ZL73_人类TH蛋白质OS=智人GN=TH PE=2 SV=1

[0593] MPTPDATTPQAKGFRRRAVSELDAKQAEAIMVRGQSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPG
DPLEAVAFEEKEGKAMLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLA
ALLSGVRQVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPI
PRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSA
RDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADHTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFT
VEFGLCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASR
IQRPFVKFDPYTTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0594] SEQ ID NO:11:酪氨酸3-单氧酶(人类)

[0595] >sp|P07101|TY3H_人类酪氨酸3-单氧酶OS=智人GN=TH PE=1 SV=5

[0596] MPTPDATTPQAKGFRRRAVSELDAKQAEAIMVRGQGAPGPSLTGSPWPGTAAPAASYTPTPRSPRFIGRR
QSLIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLET
RPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVRQVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHP
GFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNI
PQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQ
FSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQ
DQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0597] SEQ ID NO:12:截断的TH(对应于催化域)

[0598] MPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEE
IATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLA
FRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQ
NGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKF
DPYTTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0599] SEQ ID NO:13:在ser40突变的TH

[0600] MPTPDATTPQAKGFRRRAVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQELIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLE
AVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLS
GVRQVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVE
YTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFG

LCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRP
FSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0601] SEQ ID NO:14:在ser19+ser40突变的TH

[0602] MPTPDATTPQAKGFRRRAVEELDAKQAEAIMSPRFIGRRQELIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLE
AVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHL ETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGD LAALLS
GVRQVSEDVRSAPGPKVPWFPRKVS ELDKCHHLVTKFDPDL DHPGFS DQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVE
YTAE EIATWKEVYTT LKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHV PMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFG
LCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRP
FSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0603] SEQ ID NO:15:在ser19+ser31+ser40突变的TH

[0604] MPTPDATTPQAKGFRRRAVEELDAKQAEAIMSPRFIGRRQELIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLE
AVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHL ETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGD LAALLS
GVRQVSEDVRSAPGPKVPWFPRKVS ELDKCHHLVTKFDPDL DHPGFS DQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVE
YTAE EIATWKEVYTT LKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHV PMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFG
LCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRP
FSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0605] SEQ ID NO:16:酪氨酸3-羟化酶(大鼠)

[0606] >sp|P04177|TY3H_大鼠酪氨酸3-单氧酶OS=褐家鼠GN=Th PE=1 SV=3

[0607] MPTPSAPSPQPKGFRRAVSEQDAKQAEAVTSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AAAAAAAAAAVASSEPGNPL
EAVVFEERDGNVNLNLLFSLRGTKPSSLSRAVKVFETFEAKIHHL ETRPAQRPLAGSPHLEYFVRFEVPSGD LAALL
SSVRRVSDDVRSAREDKVPWFPRKVS ELDKCHHLVTKFDPDL DHPGFS DQVYRQRRKLIAEIAFQYKHGEPIPHV
EYTAEEIATWKEVYVTLKGLYATHACREHLEGFQLLERYCYREDSIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDF
LASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHV PMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTVYWFTVEF
GLCKQNGELKAYGAGLLSSYGELLHSLSEEPEVRAFDPD TAAVQPYQDQTYQP VYFVSESFNDAKDKLRNYASRIQR
PFSVKFDPYT LAIDVLDSPHTIQRSLEGVQDELHTLAHALSAIS

[0608] SEQ ID NO:17:酪氨酸3-羟化酶(小鼠)

[0609] >sp|P24529|TY3H_小鼠酪氨酸3-单氧酶OS=小家鼠GN=Th PE=1 SV=3

[0610] MPTPSASSPQPKGFRRAVSEQDTKQAEAVTSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AAAAAAAAAAVASAEPGNPL
EAWFEERDGNVNLNLLFSLRGTKPSSLSRALKVFETFEAKIHHL ETRPAQRPLAGSPHLEYFVRFEVPSGD LAALLS
SVRRVSDDVRSAREDKVPWFPRKVS ELDKCHHLVTKFDPDL DHPGFS DQAYRQRRKLIAEIAFQYKQGEPIPHVE
YTKEEIATWKEVYATL KGLYATHACREHLEAFQLLERYCYREDSIPQLEDVSHFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHV PMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTVYWFTVEFG
LCKQNGELKAYGAGLLSSYGELLHSLSEEPEVRAFDPD TAAVQPYQDQTYQP VYFVSESFSDAKDKLRNYASRIQRP
FSVKFDPYT LAIDVLDSPHTIRRSLEGVQDELHTLTQALSAIS

[0611] SEQ ID NO:18:腺相关病毒2左末端核苷酸序列

[0612]

ttggccactccctctctctgcgcgctcgcctcgcctcactgaggccggcgaccaaaggtcgcccgacgccccgggctttgc

ccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgggcaactccatcactaggggttcct

[0613] SEQ ID NO:19:腺相关病毒2右末端核苷酸序列

[0614]

aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagccc
ggcgctcgggcgaccttttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgggcaa

[0615] SEQ ID NO:20:智人GTP环水解酶1 (GCH1) 转录物变异体1

[0616] ATGGAGAAGGGCCCTGTGCGGGCACCGGCGGAGAAGCCGCGGGGCGCCAGGTGCAGCAATGGGTTCCCC
GAGCGGGATCCGCCGCGGCCCCGGGCCCAGCAGGCCGGCGGAGAAGCCCCGCGGCCGAGGCCAAGAGCGCGCAGCC
CGCGGACGGCTGGAAGGGCGAGCGGCCCCGACGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCTAACCTGGCAGCCGCT
ACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCCAGCGGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCTCG
GCCATGCAGTTCTTCACCAAGGGCTACCAGGAGACCATCTCAGATGTCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGATCA
TGATGAGATGGTGATTGTGAAGGACATAGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACTTGGTTCCATTTGTTGAAAGG
TCCATATTGGTTATCTTCCTAACAAAGCAAGTCCTTGGCCTCAGCAAACCTTGCAGGATTGTAGAAATCTATAGTAGA
AGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTTACAAAACAAATTGCTGTAGCAATCACGAAGCCTTGCGGCCTGCTGGAGTCGG
GGTAGTGGTTGAAGCAACACACATGTGTATGGTAATGCGAGGTGTACAGAAAATGAACAGCAAACCTGTGACCAGCA
CAATGTTGGGTGTGTTCCGGGAGGATCCAAAGACTCGGAAGAGTTCCTGACTCTCATTAGGAGCTAA

[0617] SEQ ID NO:21:猿猴病毒40早期聚腺苷酸化核苷酸序列

[0618] TTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAA
TAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCAAAACCTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGTCT
AGCATCGAA

[0619] SEQ ID NO:22:猿猴病毒40晚期聚腺苷酸化核苷酸序列

[0620] CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTA
TTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGC
ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTT

[0621] SEQ ID NO:23:智人酪氨酸羟化酶 (TH) 转录物变异体2核苷酸序列

[0622] ATGCCACCCCCGACGCCACCACGCCACAGGCCAAGGGCTTCCGCGAGGGCCGTGTCTGAGCTGGACGCC
AAGCAGGCAGAGGCCATCATGTCCCCGCGTTTCATTGGGCGCAGGCAGAGCCTCATCGAGGACGCCCGCAAGGAGCG
GGAGGCGGCGGTGGCAGCAGCGGCCGCTGCAGTCCCCTCGAGCCCCGGGACCCCCCTGGAGGCTGTGGCCTTTGAGG
AGAAGGAGGGGAAGGCCGTGCTAAACCTGCTCTTCTCCCCGAGGGCCACCAAGCCCTCGGCGCTGTCCCGAGCTGTG
AAGGTGTTTGAGACGTTTGAAGCCAAAATCCACCATCTAGAGACCCGGCCCCGAGAGGCCGCGAGCTGGGGGCC
CCACCTGGAGTACTTCGTGCGCCTCGAGGTGCGCCGAGGGGACCTGGCCGCCCTGCTCAGTGGTGTGCGCCAGGTGT
CAGAGGACGTGCGCAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTGTCAGAGCTGGACAAGTGTCTAT
CACCTGGTCACCAAGTTGACCCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAG
GAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGA
TTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCC
TTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGCTACCGGGAAGACAATATCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAA
GGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCC
GCGTGTTCCAGTGACCCAGTATATCCGCCACGCGTCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGACTGCTGCCACGAG
CTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGG

GGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACG
GGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAG
ATTCGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTC
TGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCCTTCTCCGTGAAGTTCC
ACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAG
CTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGG

[0623] SEQ ID NO:24:截断的TH(编码催化域)核苷酸序列

[0624] ATGAGCCCCGCGGGGCCCAAGGTCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTGAGAGCTGGACAAGTGTATCAC
CTGGTACCAAGTTGACCCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAA
GCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTG
CCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCTTT
GCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCTGAAGGA
GCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCCGCG
TGTTCCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAGCTG
CTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGC
CTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGG
AGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATT
CGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTCTGA
GAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCCTTCTCCGTGAAGTTCCGACC
CGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTG
GACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCTAA

[0625] SEQ ID NO:25:在ser40突变的TH核苷酸序列

[0626] ATGCCCCCCCCGACGCCACCACGCCACAGGCCAAGGGCTTCCGCAGGGCCGTGTCTGAGCTGGACGCC
AAGCAGGCAGAGGCCATCATGTCCCCGCGGTTTCATTGGGCGCAGGCAGGAGCTCATCGAGGACGCCCGCAAGGAGCG
GGAGGCGGGGTGGCAGCAGCGGCCGTGCAGTCCCCTCGGAGCCCGGGGACCCCTGGAGGCTGTGGCCTTTGAGG
AGAAGGAGGGGAAGGCCGTGCTAAACCTGCTCTTCTCCCCGAGGGCCACCAAGCCCTCGGCGCTGTCCCGAGCTGTG
AAGGTGTTTGAGACGTTTGAAGCCAAAATCCACCATCTAGAGACCCGGCCCGCCAGAGGCCGCGAGCTGGGGGCCC
CCACCTGGAGTACTTCGTGCGCCTCGAGGTGCGCCGAGGGGACCTGGCCGCCCTGCTCAGTGGTGTGCGCCAGGTGT
CAGAGGACGTGCGCAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTGAGAGCTGGACAAGTGTAT
CACCTGGTACCAAGTTGACCCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAG
GAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGA
TTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCC
TTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCTGAA
GGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCC
GCGTGTTCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAG
CTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGG
GGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACG
GGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAG
ATTCGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTC

TGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCTTCTCCGTGAAGTTCCG
ACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAG
CTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGC

[0627] SEQ ID NO:26:ser19和ser40突变的TH核苷酸序列

[0628] ATGCCCCACCCCGACGCCACCACGCCACAGGCCAAGGGCTTCCGCAGGGCCGTGGAGGAGCTGGACGCC
AAGCAGGCAGAGGCCATCATGTCCCCGCGGTTTCATTGGGCGCAGGCAGGAGCTCATCGAGGACGCCCCGCAAGGAGCG
GGAGGGCGGCGGTGGCAGCAGCGGCCGTGCAGTCCCCTCGGAGCCCCGGGGACCCCTGGAGGGCTGTGGCCTTTGAGG
AGAAGGAGGGGAAGGCCGTGCTAAACCTGCTCTTCTCCCCGAGGGCCACCAAGCCCTCGGCGCTGTCCCGAGCTGTG
AAGGTGTTTTGAGACGTTTGAAGCCAAAATCCACCATCTAGAGACCCGGCCCCGCCAGAGGCCGCGAGCTGGGGGCC
CCACCTGGAGTACTTCGTGCGCCTCGAGGTGCGCCGAGGGGACCTGGCCGCCCTGCTCAGTGGTGTGCGCCAGGTGT
CAGAGGACGTGCGCAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCGTGTTCCCAAGAAAAGTGTGTCAGAGCTGGACAAGTGTTCAT
CACCTGGTACCAAGTTTCGACCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAG
GAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGA
TTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCC
TTTGCTTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAA
GGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCC
GCGTGTTCCAGTGACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAG
CTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGG
GGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACG
GGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAG
ATTCGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTC
TGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCTTCTCCGTGAAGTTCCG
ACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAG
CTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGC

[0629] SEQ ID NO:27:ser19、ser31和ser40突变的TH核苷酸序列

[0630] ATGCCCCACCCCGACGCCACCACGCCACAGGCCAAGGGCTTCCGCAGGGCCGTGGAGGAGCTGGACGCC
AAGCAGGCAGAGGCCATCATGGAGCCGCGGTTTCATTGGGCGCAGGCAGGAGCTCATCGAGGACGCCCCGCAAGGAGCG
GGAGGGCGGCGGTGGCAGCAGCGGCCGTGCAGTCCCCTCGGAGCCCCGGGGACCCCTGGAGGGCTGTGGCCTTTGAGG
AGAAGGAGGGGAAGGCCGTGCTAAACCTGCTCTTCTCCCCGAGGGCCACCAAGCCCTCGGCGCTGTCCCGAGCTGTG
AAGGTGTTTTGAGACGTTTGAAGCCAAAATCCACCATCTAGAGACCCGGCCCCGCCAGAGGCCGCGAGCTGGGGGCC
CCACCTGGAGTACTTCGTGCGCCTCGAGGTGCGCCGAGGGGACCTGGCCGCCCTGCTCAGTGGTGTGCGCCAGGTGT
CAGAGGACGTGCGCAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCGTGTTCCCAAGAAAAGTGTGTCAGAGCTGGACAAGTGTTCAT
CACCTGGTACCAAGTTTCGACCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAG
GAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGA
TTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCC
TTTGCTTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAA
GGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCC
GCGTGTTCCAGTGACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAG
CTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGG

GGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACG
GGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAG
ATTCGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTC
TGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCTTCTCCGTGAAGTTCCG
ACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAG
CTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGC

[0631] SEQ ID NO:28:土拔鼠B型肝炎病毒 (WHV8) 转录后调控元件核苷酸序列

[0632]

CGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGC
TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGAT
AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGC
T G A C G C A A C C C C C A C T G G T T G G G G C A T T G C C A C C A C C T G T C A G
CTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTGGTGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCATGGCTGCTCG
CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTCG
GGCCGCTCCCCGCTGGAATTCGAGCT

[0633] SEQ ID NO:29:突变的土拔鼠B型肝炎病毒 (WHV8) 转录后调控元件核苷酸序列

[0634] CGTCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCC
TTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCT
CCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACT
GTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTTCGCTTTCCC
CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG
ACAATTCGTGGTGTGTGTCGGGAAATCATCGTCCTTTCCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGC
GGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCG
GCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCCGCTGGAATTCGAG
CT

[0635] SEQ ID NO:30GCH1核苷酸序列

[0636] ATGGAGAAGGGCCCTGTGCGGGCACCGGCGGAGAAGCCGCGGGGCGCCAGGTGCAGCAATGGGTTCCCC
GAGCGGGATCCGCCGCGGCCCCGGGCCAGCAGGCCGCGGAGAAGCCCCCGGGCCGAGGCCAAGAGCGCGCAGCC
CGCGGACGGCTGGAAGGGCGAGCGGCCCCGAGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCTAACCTGGCAGCCGCT
ACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCCAGCGGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCTCG
GCCATGCAGTTCTTACCAAGGGCTACCAGGAGACCATCTCAGATGTCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGATCA
TGATGAGATGGTGATTGTGAAGGACATAGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACTTGGTTCCATTTGTTGGAAAGG
TCCATATTGGTTATCTTCTAACAAGCAAGTCCTTGGCCTCAGCAAACTTGCAGGATTGTAGAAATCTATAGTAGA
AGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTTACAAAACAAATTGCTGTAGCAATCACGGAAGCCTTGCGGCCTGCTGGAGTCGG
GGTAGTGGTTGAAGCAACACACATGTGTATGGTAATGCGAGGTGTACAGAAAATGAACAGCAAACTGTGACCAGCA
CAATGTTGGGTGTGTTCCGGGAGGATCCAAAGACTCGGGAAGAGTTCCCTGACTCTCATTAGGA

[0637] SEQ ID NO:31pAA011-scAAV-HLP-GCH1:

[0638] AAAGCTTCCCGGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGATGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGACACAGGACGCTGTGG
TTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCGTGTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACC
TTGGTTAATATTACACAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCT
GTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGCTAGCGAATTCTAGCATGGAGAAGGGCCCTG
TGCGGGCACC GGCGGAGAAGCCGCGGGGCGCCAGGTGCAGCAATGGGTTCCTCCGAGCGGGATCCGCCGCGGCCCGG
CCCAGCAGGCCGGCGGAGAAGCCCCGCGGCCCGAGGCCAAGAGCGCGCAGCCCCGCGGACGGCTGGAAGGGCGAGCG
GCCCCGAGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCTAACCTGGCAGCCGCTACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGG
GCGAGAACCCCCAGCGGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCCTCGGCCATGCAGTTCTTACCAAGGGC
TACCAGGAGACCATCTCAGATGTCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGATCATGATGAGATGGTGATTGTGAAGGA
CATAGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACTTGGTTCCATTTGTTGGAAGGTCCATATTGGTTATCTTCCTAACA
AGCAAGTCCTTGGCCTCAGCAAACCTGCGAGGATTGTAGAAATCTATAGTAGAAGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTT
ACAAAACAAATTGCTGTAGCAATCACGGAAGCCTTGCGGCCTGCTGGAGTCGGGGTAGTGTTGAAGCAACACACAT
GTGTATGGTAATGCGAGGTGTACAGAAAATGAACAGCAAACCTGTGACCAGCACAAATGTTGGGTGTGTTCCGGGAGG
ATCCAAAGACTCGGGAAGAGTTCCTGACTCTCATTAGGAGCTAATGCATCCCCATCGATGATCCAGACATGATAAGA
TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTAT
TGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTT
AGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAGTCGACCGCTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
GGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGACAG
ATCCGGGCCCCGATGCGTCGACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCC
AACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACA
CCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATG
TGTCAGAGGTTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA
TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTAT
TTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCA
CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGT
GGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAAACCTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACAC
CACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAAC
AATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGCGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCG
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCT

CACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
CAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGC
TTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGT
TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTG
GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGT
ATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGC
CTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCC
TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGAAACCGCTCTCCCCGCGCTTGCGCG
ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTA
GCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC
AATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG

[0639] SEQ ID NO:32:pAA016-scAAV-HLP-tTH:

[0640] AAAGCTTCCCGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCTTGAGGGGTGGAGTCGTGACCCCTAAAATGGGCAAACATTGCGCTAGCTGTTTGCTGCTT
GCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGT
GGACTTAGCCCCGTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCC
CTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGA
CAGTGAATCATTCAAGCTCGTAGCAAGGATCCACCGGTCACCATGAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCTGGTTCCC
AAGAAAAGTGTCAGAGCTGGACAAGTGTATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTTGGAACACCCGG
GCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCG
ATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGC
CACGCACGCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCCTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTACGCGGTACCGGGAAGACAATATCC
CCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCTGAAGGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCC
GCCCGGGACTTCTGGCCAGCCTGGCCTTCCGCGTGTTCAGTGACCCAGTATATCCGCCACGCGTCTCTGCCCCAT
GCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGTGCCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGT
TCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTTC
ACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGGA
GCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATTTCGGGCCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAG
ACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTCTGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCA
CGCATCCAGCGCCCCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCCAGGCCGT
GCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTGGACACCCCTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCTAACTAGTGG
ATCCGTCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA
CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTG

TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT
TGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCC
CTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCCTGCCCTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT
TCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCCTTGCGTGTCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC
GTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCCGCGGCCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTC
TTCCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCCCTCCCCGCCTGGAATTCGAGCTCGG
TACAGCTTATCGATACCGTCGACTTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCAT
CACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATC
ATGTCTGGATCGTCTAGCATCGAAGATCCCCGCTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
GGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGACAG
ATCCGGGCCCCGATGCGTCGACAATTCAGTGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCC
AACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACA
CCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATG
TGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA
TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTAT
TTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCA
CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGT
GGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCA
TGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAAC
ATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACAC
CACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAAC
AATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCG
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCT
CACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
CAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC
TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT
TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTG
GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGT
ATCTTTATAGTCCTGTGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGC

CTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC
TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCG
ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTA
GCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC
AATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG

[0641] SEQ ID NO:33:pAAo19-scAAV-LP1-GCH1-LP1-tTH:

[0642]

CAGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGC
CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCGATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACC
CGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGAgc tgageCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAG
CAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCT
CCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTCGGTGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTGGCGTGTTTAGGTAGTGTGAGA
GGGGAATGACTCCTTTCCGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGC
GACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGTTAATATTCACCA
GCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGG
CACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCCGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTAAGTGTATAATGTGTAAACT
ACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAGTGAacctgcaggATTCAAGCTGCTAGCAAGGAT
CCACCGGTAACATGGAGAAGGGCCCTGTGCGGGCACCGGCGGAGAAGCCGCGGGCGCCAGGTGCAGCAATGGGTTC
CCCAGCGGGATCCGCCGCGGCCCGGGCCAGCAGGCCGGCGGAGAAGCCCCGCGGCCCGAGGCCAAGAGCGCGCA
GCCCCGCGACGGCTGGAAGGGCGAGCGCCCCCGCAGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCTAACCTGGCAGCCG
CCTACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCCAGCGGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCC
TCGGCCATGCAGTTCTTCACCAAGGGCTACCAGGAGACCATCTCAGATGTCCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGA
TCATGATGAGATGGTGATTGTGAAGGACATAGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACTTGGTTCCATTTGTTGGAA
AGGTCCATATTGGTTATCTTCCTAACAAGCAAGTCCTTGGCCTCAGCAAACCTTGCGAGGATTGTAGAAATCTATAGT
AGAAGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTTACAAAACAAATGTCTGTAGCAATCACGGAAGCCTTGCGGCCTGCTGGAGT
CGGGGTAGTGGTTGAAGCAACACACATGTGTATGGTAATGCGAGGTGTACAGAAAATGAACAGCAAAACTGTGACCA
GCACAATGTTGGGTGTGTTCCGGGAGGATCCAAAGACTCGGGAAGAGTTCTTGACTCTCATTAGGAGCTAATGCATC
CCCATCGATGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAAAAAATG
CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA
ATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAGTCGACCAGATCTGACAAGGTCCCC
TAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGAGCTGGGGCAG
AGGTGAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTCGGTGAGAGGAGCAGA
GGTTGTCTTGGCGTGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGACTCCTTCGGTAAGTGCAAGTGAAGCTGTACACTGC
CCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGAAGTACCCCTGTTTGCTCCTCCG
ATAACTGGGGTGACCTTGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGA
CGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAAAT
ATAAAATTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAC
TGATTCGAAATTCAAGCTGCTAGCAAGGATCCACCGGTCACCATGAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCTGGTTCCC

AAGAAAAGTGTGACAGCTGGACAAGTGTGTCATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGG
GCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCG
ATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGC
CACGCACGCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCCTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCC
CCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAAGGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCC
GCCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCCGCGTGTTCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCAT
GCACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGT
TCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTC
ACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCATATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCCTACGGGA
GCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATTGGGGCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAG
ACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTCTGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCA
CGCATCCAGCGCCCCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCCAGGCCGT
GCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTGGACACCCCTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCTAACTAGTGG
ATCCGTCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA
CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTG
TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT
TGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCC
CTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT
TCCGTGGTGTGTGCGGGAAATCATCGTCCTTTCCCTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC
GTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTC
TTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTGGAATTCGAGCTCGG
TACAGCTTATCGATACCGTCGACTTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCAT
CACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATC
ATGTCTGGATCGTCTAGCATCGAAGATCCCCCGCATGCTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTT
AATCATTAATACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
GGCGACCAAAGGTCGCCGACGCGCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGGCGTAAT
AGCGAAGAGGCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAATTCAGACGATTGAG
CGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGTAATATTGTTCTGGATATTACCAG
CAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTA
ATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCG
TTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGT
GCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTT
TCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAC
TTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG
TTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGG
GATTTTGCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATAT
TAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCTGTGTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACGGGGGTACAT
ATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGAT

AGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATAT
TGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTA
AAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCAT
AATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTTCTTTGCCTTGCT
GTATGATTTATTGGATGTTGGAATTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATA
TGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGC
GCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTAAATGTCATG
ATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTA
AATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
TGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCCCTGTTTTTGCTCACCCAGAA
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG
TATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCAGAAATGACTTGGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA
TAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGG
ATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTA
GTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT
TAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAA
GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCA
GAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT
ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGCTGCTGCCAGTGCGGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTC
AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
TAGTCCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA
AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTA
TCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAAT
AATGC

[0643] SEQ ID NO:34:pAA010scAAV-LP1-tTH

[0644] AAAGCTTCCCGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAAC

ACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAC
ATCCACTCGACCCCTTGGAATTCGGTGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGA
ATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTC
AGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTACCAGCAGC
CTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCA
CCACTGACCTGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGA
TTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAGTGAATTTCTAGCATGAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCC
CTGGTTCCCAAGAAAAGTGTGAGAGCTGGACAAGTGTATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTTGG
ACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCAGTACAGGCAC
GGCGACCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGG
CCTCTACGCCACGCACGCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCCTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAG
ACAATATCCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAAGGAGCGCACGGGCTTCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGC
CTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCGCGTGTTCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCGTC
CTCGCCCATGCACTCCCCTGAGCCGGAAGTGTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCT
TCGCGCAGTTCTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGCCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTG
TACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTC
CTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATTGGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGGCGTGCAGC
CCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCACTTTCGTGTCTGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGC
TATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCC
CCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCT
AACTAGTGGATCCGTCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG
CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTC
TCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTG
CACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTT
TCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC
ACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTC
TGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCTGGAATT
CGAGCTCGGTACAGCTTATCGATACCGTCGACTTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG
CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATG
TATCTTATCATGTCTGGATCGTCTAGCATCGAAGATCCCCCGTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA
CTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGACAGATCCGGGCCCCGATGCGTCGACAATTCAGTGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTG
GCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCCTTACGCATCTGTGCGG
TATTTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGC
CAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG
AGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCAATACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTT
ATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTA

TTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAT
TGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTGCTTCCTGT
TTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAC
TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAA
TGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTG
CCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTT
TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA
GCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGGCACTACTTACTCTAGCTT
CCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGC
TGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA
TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTT
CATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT
GCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA
CTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC
TTACCGGGTTGGAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAG
CCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA
ACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGG
GGGCGGAGCCTATGGAACAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACAT
GTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGA
GCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCG
CGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAA
TGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG

[0645] SEQ ID NO:35:pAA009 scAAV-LP1-GCH1

[0646]

AAAGCTTCCCGGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCG
CCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGAGTGGCCAACTCCATCACT
AGGGGTTCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCCCTAAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCC
CTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTC
GACCCCTTGGAATTTCCGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGACTCC
TTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGGCACTCAGATCCCA
GCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTACCAGCAGCCTCCCCCG
TTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGAC
CTGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATT

GTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAGTGAATTc tagcATGGAGAAGGGCCCTGTGCGGGCACCGGCGGAGA
AGCCGCGGGGCGCCAGGTGCAGCAATGGGTTCCTCCGAGCGGGATCCGCCGCGGCCCGGGGCCAGCAGGCCGGCGGAG
AAGCCCCCGCGGCCCGAGGCCAAGAGCGCGCAGCCCGCGGACGGCTGGAAGGGCGAGCGGCCCGCAGCGAGGAGGA
TAACGAGCTGAACCTCCCTAACCTGGCAGCCGCCTACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCCAGCGGC
AAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCTCGGCCATGCAGTTCCTTACCAAGGGCTACCAGGAGACCATCTCA
GATGTCCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGATCATGATGAGATGGTGATTGTGAAGGACATAGACATGTTTTCCAT
GTGTGAGCATCACTTGGTTCCATTTGTTGGAAAAGTCCATATTGGTTATCTTCCTAACAAGCAAGTCCTTGGCCTCA
GCAAACCTTGCAGGATTGTAGAAATCTATAGTAGAAGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTTACAAAACAAATTGCTGTA
GCAATCACGGAAGCCTTGCGGCCTGCTGGAGTCGGGTAGTGTTGAAGCAACACACATGTGTATGGTAATGCGAGG
TGTACAGAAAAATGAACAGCAAAACTGTGACCAGCACAATGTTGGGTGTGTTCCGGGAGGATCCAAAGACTCGGGAAG
AGTTCCTGACTCTCATTAGGAGCTAATGCATCCCCATCGATGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGG
CAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCAT
TATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGG
TTTTTTAGTCGACCgCTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC
GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGACAGATCCGGGCCCCGCATGCGT
CGACAATTCCTGCGCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAG
CACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTG
AATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCT
CAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGG
CTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCG
TCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGT
TTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAA
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA
CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAA
AGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTG
AGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
ATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCAC
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGG
CCAACCTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAAC
CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGG
AGGCGGATAAAGTTGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAC
GACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTG
AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA
AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTAC
CAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA
CCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGC

TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT
TACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC
GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCTG
GGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGC
AACGCGGCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGATTC
TGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAG
TGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGG
CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC
CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA
GCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG

[0647] SEQ ID NO:36:scAAV-LP1-hFIXco

[0648] AAAGCTTCCCGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCTTGAGAGGGTGAGTCGTGACCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAAC
ACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAC
ATCCACTCGACCCCTTGGAATTTGCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGA
ATGACTCCTTTGCGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTC
AGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGTTAATATTCACCAGCAGC
CTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCA
CCACTGACCTGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAAAATTTTAAAGTGATAATGTGTTAACTACTGA
TTCTAATTGTTTCTCTTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAGTGAATCTAGACCACCATGCAGAGGTGAACATGATC
ATGGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCTGCCTGCTGGGCTACCTGCTGTCTGCTGAGTGCAGTGTGTTTCTGGA
CCATGAGAATGCCAACAAAGATCCTGAACAGGCCCAAGAGATACAACCTCTGGCAAGCTGGAGGAGTTTGTGCAGGGCA
ACCTGGAGAGGGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCAGCTTTGAGGAGGCCAGGGAGGTGTTTGAGAACACTGAGAGGACC
ACTGAGTTCTGGAAGCAGTATGTGGATGGGGACCAGTGTGAGAGCAACCCCTGCCTGAATGGGGGCAGCTGCAAGGA
TGACATCAACAGCTATGAGTGCTGGTGCCCTTTGGCTTTGAGGGCAAGAACTGTGAGCTGGATGTGACCTGCAACA
TCAAGAATGGCAGATGTGAGCAGTTCTGCAAGAACTCTGCTGACAACAAGTGGTGTGCAGCTGCACTGAGGGCTAC
AGGCTGGCTGAGAACCAGAAGAGCTGTGAGCCTGCTGTGCCATTCCCATGTGGCAGAGTGTCTGTGAGCCAGACCAG
CAAGCTGACCAGGGCTGAGGCTGTGTTCCCTGATGTGGACTATGTGAACAGCACTGAGGCTGAAACCATCCTGGACA
ACATCACCCAGAGCACCCAGAGCTTCAATGACTTCACCAGGGTGGTGGGGGGGAGGATGCCAAGCCTGGCCAGTTC
CCCTGGCAAGTGGTGCTGAATGGCAAGGTGGATGCCTTCTGTGGGGGCAGCATTGTGAATGAGAAGTGGATTGTGAC
TGCTGCCCCACTGTGTGGAGACTGGGGTGAAGATCACTGTGGTGGCTGGGGAGCACAAACATTGAGGAGACTGAGCACA
CTGAGCAGAAGAGGAATGTGATCAGGATCATCCCCACCACAACCTACAATGCTGCCATCAACAAGTACAACCATGAC
ATTGCCCTGCTGGAGCTGGATGAGCCCTGGTGCTGAACAGCTATGTGACCCCATCTGCATTGCTGACAAGGAGTA
CACCAACATCTTCTGAAGTTTGCTCTGGCTATGTGTCTGGCTGGGGCAGGGTGTCCACAAGGGCAGGTCTGCCC
TGGTGCTGCAGTACCTGAGGGTGCCCTGGTGACAGGGCCACCTGCCTGAGGAGCACCAGTTCACCATCTACAAC
AACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAGGGGGCAGGGACAGCTGCCAGGGGGACTCTGGGGGGCCCCATGTGACTGA
GGTGGAGGGCACCAGCTTCTGACTGGCATCATCAGCTGGGGGGAGGAGTGTGCCATGAAGGGCAAGTATGGCATCT

ACACCAAAGTCTCCAGATATGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACCAAGCTGACCTGACTCGATGCTTTATTTGTGAAA
TTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTT
ATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA
GGGACAGATCCGGGCCCCGATGCGTCGACAATTCAGTGCGCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGC
GTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCG
CCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
TTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
CTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTAT
AGGTAAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTG
AAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCTTCTGTTT
TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTG
GATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG
ACTTGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
ATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC
GTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
GTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCA
TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGT
TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGTGCG
TTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT
AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT
CTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC
CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT
TCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGC
CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCG
TTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
GGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG

[0649] SEQ ID NO:37:pAV HLP FVIII V3 kan

[0650]

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGAC
TGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT
GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
CCAAGCTTCCCGGGGGGATCTTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCC
CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCA
CTAGGGGTTCCGGAGGGGTGGAGTCGTGACGTGAATTACGTCATAGGGTTAGGGAGGTCGTATACTGTTTGCTGCTT
GCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGT
GGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCC
CTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGA
CAGTGAATCGCGGCCGCCACCATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCGTGTCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTC
TGCCACCAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTG
TGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCCTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTT
GTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCA
GGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGG
TGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTG
TTCCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCTGTGCCT
GACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCA
GGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGC
AAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGAT
GCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCATG
TGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGG
CAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTTCCTGCT
GTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCC
AGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGG
TTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTA
CATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCTGGTGCTGGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGT
ACCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTC
AAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCT
GATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCTGTACA
GCAGGAGGCTGCCAAGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGG
ACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACAT
GGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACC
AGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAAC
ATCCAGAGGTTCTGCCAACCCTGCTGGGGTGACGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAG
CATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCA
TTGGGGCCCAGACTGACTTCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACC
CTGACCCTGTTCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCA

CAACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACT
ATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAG
AATGCCACTAATGTGTCTAACAACAGCAACACCAGCAATGACAGCAATGTGTCTCCCCCAGTGCTGAAGAGGCACCA
GAGGGAGATCACCAGGACCACCTGTCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGA
AGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTAC
TTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTC
TGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCAGGAGTTCACCTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAG
GGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTC
AGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGA
GCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCCCACC
AGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATT
GGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCT
GTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACCTGCAGGGCCCCCTGCA
ACATCCAGATGGAGGACCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTG
CCTGGCCTGGTGTGAGGCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCC
ACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTAC
CCTGGGGTGTGTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCA
CCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCC
ACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCT
GGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCA
TGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGG
ATGGCAAGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCT
GGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCATCAG
GAGCACCCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCA
TCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTG
CACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAA
GACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACCCAGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGA
TCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAG
GACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTACCCCCAGAGCTG
GGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGATCGCGAATAAAAGATC
TTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGATGCAGCCCAAGCTGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAA
TCATTAATACTACCCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGG
AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAAG
ATCCGGGCCCCGATGCGTCGACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCC
AACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAA
TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTA
CCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCT
TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTT

ACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCAC
GTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACG
TTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGA CTCTGTTCAAA CTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTT
TGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATT
TTAACAAAAATTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGAC
CCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCACT
GGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACC GGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTC
TGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAA
GATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCT
TGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC
AGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGC
GGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGG
CTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC
TGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTA CTGCGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCC
GAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCCAGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCC
GAATATCATGGTGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGG
ACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGT
ATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAAGGAAGAGT
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGA
AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCG
GTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG
ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG
GATCATGTA ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT
GCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTA ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA
TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGAT
AAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA
TTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA ACTTCATTTTTTAATTTAAA
AGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTC
AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAA
AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGC
AGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTG TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACT
CAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGA
ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGA

CAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTT
ATAGTCCTGTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGG
AAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTT
ATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGC
GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

[0651] SEQ ID NO:38:杂合肝脏特异性启动子 (HLP)

[0652] TGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGGG
CGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACC
AGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAG
GCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATC

[0653] SEQ ID NO:39:肝脏启动子/增强子1 (LP1)

[0654] CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGG
AGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTGGTG
AGAGGAGCAGAGGTTGTCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGACTCCTTTCCGTAAGTGCAGTGAAG
CTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGT
TTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGC
TTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCCGGACT
CTAAGGTAAATATAAAATTTTAAAGTGATAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCA
ACCTTTGGAAGTGA

[0655] SEQ ID NO:40:t_{TH}=截断的酪氨酸羟化酶

[0656] MSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFYRHDPIPRVEY
TAEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLA
SLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELLGHVPM LADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGL
CKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSEFSDAKDKLRSYASRIQRPF
SVKFDPTYLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

[0657] SEQ ID NO:41:PTPS=6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶

[0658] >ENA|BAA04959|BAA04959.1智人(人类)6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶

[0659] ATGAGCACGGAAGGTGGTGGCCGTCGCTGCCAGGCACAAGTGTCGCCGCCGATCTCCTTCAGCGCGAGC
CACCGATTGTACAGTAAATTTCTAAGTGATGAAGAAAACCTGAAACTGTTTGGGAAATGCAACAATCCAAATGGCCA
TGGGCACAATTATAAAGTTGTGGTGACAGTACATGGAGAGATTGACCCTGCTACGGGAATGGTTATGAATCTGGCTG
ATCTCAAAAAATATATGGAGGAGGCGATTATGCAGCCCCCTGATCATAAGAATCTGGATATGGATGTGCCATACTTT
GCAGATGTGGTGAGCAGACTGAAAATGTAGCTGTTTATATCTGGGACAACCTCCAGAAAGTTCTTCTGTAGGAGT
TCTTTATAAAGTAAAAGTATACGAAACTGACAATAATATTGTGGTTTATAAAGGAGAATAG

[0660] SEQ ID NO:42:引物AA16

[0661] ccaagctagcATGGAGAAGGGCCCTGTG

[0662] SEQ ID NO:43:引物AA17

[0663] ccaagctagcGGTCGACTAAAAAACCTCC

[0664] SEQ ID NO:44:引物AA33

[0665] CCAAgctagcATGAGCCCCGCGGGGCCCAAG

[0666] SEQ ID NO:45:引物AA34
[0667] CCAAgctagcGGGGATCTTCGATGCTAGAC
[0668] SEQ ID NO:46:引物AA43
[0669] CCAATGGCCAACTCCATCACTAGGGTTCTTCTAGATGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGC
[0670] SEQ ID NO:47:引物AA44
[0671] CCAAGAATTCGCTAGCGATTCACTGTCCCAGGTCAGTG
[0672] SEQ ID NO:48:引物AA57
[0673] CCAAGCTAGCTGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGC
[0674] SEQ ID NO:49:引物AA67
[0675] GATCCTTGCTACGAGCTTGAATGATTCACTGTCCCAGGTCAGT
[0676] SEQ ID NO:50:引物AA68
[0677] ACTGACCTGGGACAGTGAATCATTCAAGCTCGTAGCAAGGATC
[0678] SEQ ID NO:51:引物RmuscTHext2
[0679] AAAGctagcTTCGATGCTAGACGATCCAG
[0680] SEQ ID NO:52:MLF003noefgp
[0681] GCGATCGCGGTCCCGACATCTTGACCATTAGCTCCACAGGTATCTTCTTCCCTCTAGTGGTCATAAC
AGCAGCTTCAGCTACCTCTCAATTCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTATCAATC
GTTGCGTTACACACACAAAAACCAACACACATCCATCTTCGATGGATAGCGATTTTATTATCTAACTGCTGATCGA
GTGTAGCCAGATCTAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAG
TACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGC
GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCAGATCTTTGTGATCCTACCATCC
ACTCGACACACCCGCCAGCTAGAGATCCCGGGACCATGAGCCCCGCGGGGCCAAGGTCCCCTGGTTCCCAAGAAAA
GTGTACAGAGCTGGACAAGTGTATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTC
GGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCC
GTGTGGAGTACACCGCCAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCAC
GCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGAAGACAATATCCCCAGCT
GGAGGACGTCTCCCGCTTCTGAAGGAGCGCACGGGCTTCAGCTGCGGCCGTGGCCCGCCTGCTGTCCGCCCGGG
ACTTCTTGCCAGCCTGGCCTTCCGCGTGTCCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCTCCTCGCCCATGCACTCC
CCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCA
GGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGCTGTACTGGTTACGGTGG
AGTTGGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCTCTCTACGGGGAGCTCCTG
CACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATTCGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGAC
GTACCAGTCAGTCTACTTCGTGTCTGAGAGCTTCAGTGACCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCC
AGCGCCCCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCAGGCCGTGCGGCGC

TCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCTAAGACGCCACCTAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATAC
GCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTT
GCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCC
CCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG
GAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTGTC
GGGGAAATCATCGTCCTTTCCCATCTTGACTGACTGAGATACAGCGTACCTTCAGCTCACAGACATGATAAGATACA
TTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT
TTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCAATTTTATGTTTCAGGTTACGGG
GGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATTGGCCCATCTCTATCGGTATCGTAGC
ATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGTGCCCTCGGGCCGATTGCTATCTACCGGCATT
GGCGCAGAAAAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCACATATGCCAGATTACAGCAACGGATACGGC
TTCCCCAACTTGGCCACTTCCATACGTGTCTCCTTACCAGAAATTTATCCTTAAGTTCGTCAGCTATCCTGCAGGC
GATCTCTCGATTTTCGATCAAGACATTCCCTTAATGGTCTTTTCTGGACACCACTAGGGGTCAGAAGTAGTTCATCAA
ACTTTCTTCCCTCCCTAATCTCATTGGTTACCTTGGGCTATCGAACTTAATTAACCAGTCAAGTCAGCTACTTGGC
GAGATCGACTTGTCTGGGTTTCGACTACGCTCAGAATTGCGTCAGTCAAGTTCGATCTGGTCCTTGCTATTGCACCC
GTTCTCCGATTACGAGTTTCATTTAAATCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGC
TTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA
GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTT
GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGC
TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC
TTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAG
TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCATTTAAATTTT
CGAACTCTCCAAGGCCCTCGTCGGAAAAATCTTCAAACCTTTTCGTCCGATCCATCTTGCAGGCTACCTCTCGAACGAA
CTATCGCAAGTCTCTTGCCCGGCTTGCGCCTTGCTATTGCTTGGCAGCGCCTATCGCCAGGTATTACTCCAATCC
CGAATATCCGAGATCGGGATCACCCGAGAGAAGTTCAACCTACATCCTCAATCCCGATCTATCCGAGATCCGAGGAA
TATCGAAATCGGGGCGCGCCTGGTGTACCGAGAACGATCCTCTCAGTGCGAGTCTCGACGATCCATATCGTTGCTTG
GCAGTCAGCCAGTCGGAATCCAGCTTGGGACCCAGGAAGTCCAATCGTCAGATATTGTACTCAAGCCTGGTCACGGC
AGCGTACCGATCTGTTTAAACCTAGATATTGATAGTCTGATCGGTCAACGTATAATCGAGTCCTAGCTTTTGCAAAC
ATCTATCAAGAGACAGGATCAGCAGGAGGCTTTCGCATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTT
TGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG
CGCGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGCTTTCCA
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTATTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG

TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATTGGAGGA
CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA
TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACCTTGCGTAACTATTAAGTG
GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAGTTGATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGC
AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC
GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACCGATTCTAGGTGCATTGGCGCAGAAA
AAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCACATATGCCAGATTCAGCAACGGATACGGCTTCCCCAACT
TGCCCACTTCCATACGTGTCTCCTTACCAGAAAATTTATCCTTAAGATCCCGAATCGTTTAACTCGACTCTGGCTC
TATCGAATCTCCGTGCTTTTCGAGCTTACGCGAACAGCCGTGGCGCTCATTTGCTCGTCGGGCATCGAATCTCGTCAG
CTATCGTCAGCTTACCTTTTTTGGCA

[0682] SEQIDNO:53 MDL004

[0683] GCGATCGCGGCTCCCGACATCTTGACCATTAGCTCCACAGGTATCTTCTTCCCTCTAGTGGTCATAAC
AGCAGCTTCAGCTACCTCTCAATTCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTATGCTATCAATC
GTTGCGTTACACACACAAAAACCAACACACATCCATCTTCGATGGATAGCGATTTTATTATCTAACTGCTGATCGA
GTGTAGCCAGATCTAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAG
TACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGC
GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCAGATCTTTGTCGATCCTACCATCC
ACTCGACACACCCGCCAGCAATATGGCCACAACCGCGGCCGTAGATCCCGGGACCATGGAGAAGCCGCGGGGAGTCA
GGTGCACCAATGGGTTCTCCGAGCGGGAGCTGCCGCGGCCCGGGGCCAGCCCGCTGCCGAGAAGTCCCGGCCGCC
GAGGCCAAGGGCGCACAGCCGGCCGACGCTGGAAGGCAGGGCGGCACCGCAGCGAGGAGGAAAACAGGTGAACCT
CCCCAACTGGCGGCTGCTTACTCGTCCATTCTGCTCTCGCTGGGCGAGGACCCCAAGCGGCAGGGGCTGCTCAAGA
CGCCCTGGAGGGCGGCCACCGCCATGCAGTACTTCACCAAGGGATACCAGGAGACCATCTCAGATGTCCTGAATGAT
GCTATATTTGATGAAGATCATGACGAGATGGTGATTGTGAAGGACATAGATATGTTCTCCATGTGTGAGCATCACCT
TGTTCCATTTGTAGGAAGGGTCCATATTGGCTATCTTCCTAACAAGCAAGTCCTTGGTCTCAGTAACTTGCCAGGA
TTGTAGAAATCTACAGTAGACGACTACAAGTTCAAGAGCGCCTCACCAAACAGATTGCGGTGGCCATCACAGAAGCC
TTGCAGCCTGCTGGCGTTGGAGTAGTGATTGAAGCGACACACATGTGCATGGTAATGCGAGGCGTGAGAAAATGAA
CAGCAAGACTGTCACTAGCACCATGCTGGGCGTGTCCGGGAAGACCCCAAGACTCGGGAGGAGTTCTCACACTAA
TCAGGAGCTGAGACTATAGGGTGGGTATTATGTGTTTCATCAACCATCCTAAAAATACCCGGTAAACAGGTGCAGCCC
CAGATCTGGGCAGCAGGAGGGGGCAGTGGGAAGCTTAACGCGCCACGACTATAGGGTGGGTATTATGTGTTTCATCA
CCATCCTAAAAATACCCGGTAAACAGGTGCAGCCCCAGATCTGGGCAGCAGGAGGGGGCAGTGGGAAGCTTATCTAG
TCTCGAGGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCTCGAGATCTGGATATCGACTATAGGGTGGGTATTATGTGTTTCATC
AACCATCCTAAAAATACCCGGTAAACAGGTGCAGCCCCAGATCTGGGCAGCAGGAGGGGGCAGTGGGTCTGTTCTAT
TTTTACCAGCCAGTTGCTGCTGGACACAGTTTTTCATAGCCTCCCCCTCGGCTCTGCCCCTCACAGTCTGCAGTCTACG

GCGAGGCACAGGCCAGCCCAGCTCCACGAGGACTGAACAAGAAGCTTGATATCGAATTGGTACCATCGAGGAAGTGA
AAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATC
AAAGAACTGCTCCTCAGTGGATATCGCCTTTACTTCTAGGCCACCATGAGCGCGGCGGGTGACCTTCGTGCGCCGCGC
GCGACTGTGCGCCTCGTGTCTTCAGCGCGAGCCACCGGCTGCACAGCCCATCTCTGAGCGATGAAGAGAACTTAA
GAGTGTGTTGGGAAATGCAACAATCCGAATGGCCACGGGCACAACCTATAAAGTTGTGGTGACAGTCCATGGAGAGATT
GATCCTGTTACAGGAATGGTTATGAATTTGACCGACCTCAAAGAATACATGGAGGAGGCCATCATGAAGCCTCTTGA
TCACAAGAACCTGGACCTGGATGTGCCGTACTTTGCGGATGCTGTGAGCACGACAGAAAATGTAGCTGTCTACATCT
GGGAAAGCCTCCAGAAACTTCTTCCAGTGGGAGCTCTTTATAAAGTAAAAGTGTGTTGAAACCGACAACAACATCGTA
GTCTATAAAGGAGAATAGTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG
CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTC
TCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTG
CACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTCGCTT
TCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC
ACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCCTTCCCATCTTGACTGACTGAGATACAGCGTACCTTCA
GCTCACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATT
CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATTGG
CCCATCTCTATCGGTATCGTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGTGCCCTCGGG
CCGATTGCTATCTACCGGCATTGGCGCAGAAAAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCACATATG
CCAGATTCAGCAACGGATACGGCTTCCCCAACTTGCCCACTTCCATACGTGTCCTCCTTACCAGAAATTTATCCTTA
AGGTCGTGAGCTATCCTGCAGGCGATCTCTCGATTTCGATCAAGACATTCCTTTAATGGTCTTTTCTGGACACCACT
AGGGGTCAGAAGTAGTTCATCAAACTTTCTTCCCTCCCTAATCTCATTGGTTACCTTGGGCTATCGAACTTAATTA
ACCAGTCAAGTCAGCTACTTGGCGAGATCGACTTGCTGGGTTTCGACTACGCTCAGAATTGCGTCAGTCAAGTTGCG
ATCTGGTCCTTGCTATTGCACCCGTTCTCCGATTACGAGTTTCATTTAAATCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
CTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATA
GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG
GCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT
TGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGG
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGG
TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
ATCCATAGTTGCATTTAAATTTCCGAACCTCTCCAAGGCCCTCGTCGGAAAAATCTTCAAACCTTTCGTCCGATCCATC
TTGCAGGCTACCTCTCGAACGAACCTATCGCAAGTCTCTTGCCCGGCCTTGCGCCCTGGCTATTGCTTGGCAGCGCCT
ATCGCCAGGTATTACTCCAATCCCGAATATCCGAGATCGGGATCACCCGAGAGAAGTTCAACCTACATCCTCAATCC
CGATCTATCCGAGATCCGAGGAATATCGAAATCGGGGCGCGCCTGGTGTACCGAGAACGATCCTCTCAGTGCGAGTC

TCGACGATCCATATCGTTGCTTGGCAGTCAGCCAGTCGGAATCCAGCTTGGGACCCAGGAAGTCCAATCGTCAGATA
TTGTACTCAAGCCTGGTCACGGCAGCGTACCGATCTGTTTAAACCTAGATATTGATAGTCTGATCGGTCAACGTATA
ATCGAGTCCTAGCTTTTTGCAAACATCTATCAAGAGACAGGATCAGCAGGAGGCTTTCGCATGAGTATTCAACATTTC
CGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTGCTTTTTTGCTCAGGAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCGGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTT
TTCGCCCCGAAGAACGCTTTCGAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC
GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTATTCACCAGTCACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACT
TACTTCTGACAACGATTGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAAC
AACCTTGCGTAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAGTTGATAGACTGGATGGAGGCGG
ATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG
CGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG
GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCGA
TTCTAGGTGCATTGGCGCAGAAAAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCCACATATGCCAGATTGAG
CAACGGATACGGCTTCCCCAACTTGCCCACTTCCATACGTGTCCTCCTTACCAGAAATTTATCCTTAAGATCCCGAA
TCGTTTTAACTCGACTCTGGCTCTATCGAATCTCCGTCGTTTCGAGCTTACGCGAACAGCCGTGGCGCTCATTTCG
TCGTCGGGCATCGAATCTCGTCAGCTATCGTCAGCTTACCTTTTTTGCA

序列表

<110> 肌多巴有限公司

<120> 左旋多巴的系统合成和调控

<130> P2868PC01

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 250

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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 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          160
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		240
	245	250
<210> 2		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Met Glu Lys Gly Pro Val Arg Ala Pro Ala Glu Lys Pro Arg Gly Ala		
1	5	10
Arg Cys Ser Asn Gly Phe Pro Glu Arg Asp Pro Pro Arg Pro Gly Pro		
	20	25
Ser Arg Pro Ala Glu Lys Pro Pro Arg Pro Glu Ala Lys Ser Ala Gln		30
	35	40
Pro Ala Asp Gly Trp Lys Gly Glu Arg Pro Arg Ser Glu Glu Asp Asn		45
	50	55
Glu Leu Asn Leu Pro Asn Leu Ala Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Ser		60
65	70	75
Ser Leu Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp		80
	85	90
Arg Ala Ala Ser Ala Met Gln Phe Phe Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr		95
	100	105
Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile Phe Asp Glu Asp His Asp Glu		110
	115	120
Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met Phe Ser Met Cys Glu His His		125
	130	135
Leu Val Pro Phe Val Gly Lys Val His Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys		140
145	150	155
Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser		160
	165	170
Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala		175
	180	185
Ile Thr Glu Ala Leu Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Val Val Glu Ala		190
	195	200
Thr Ser Ala Glu Pro		205
210		
<210> 3		

<211> 209

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

```

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          160
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

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

```

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	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						160
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	Lys	Ser	Asn	Lys	Tyr	Asn	Lys	Gly	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser		
		210						215						220			
Cys	His	Leu	Phe	Val	Ala	Ile	Leu	Lys									
225					230												

 $\langle 210 \rangle$ 5

241

<212> PRT

〈213〉 褐家鼠

$\langle 400 \rangle$ 5

Met	Glu	Lys	Pro	Arg	Gly	Val	Arg	Cys	Thr	Asn	Gly	Phe	Pro	Glu	Arg
1				5				10						15	
Glu	Leu	Pro	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Ala	Glu	Lys	Ser	Arg	Pro
			20					25					30		
Pro	Glu	Ala	Lys	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Asp	Ala	Trp	Lys	Ala	Gly	Arg
		35					40					45			
Pro	Arg	Ser	Glu	Glu	Asp	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Ala	Ala

50	55	60
Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Arg Ser Leu Gly Glu Asp Pro Gln Arg Gln		
65	70	75
Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp Arg Ala Ala Thr Ala Met Gln Phe Phe		
85	90	95
Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile		
100	105	110
Phe Asp Glu Asp His Asp Glu Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met		
115	120	125
Phe Ser Met Cys Glu His His Leu Val Pro Phe Val Gly Arg Val His		
130	135	140
Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala		
145	150	155
Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu		
165	170	175
Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala Ile Thr Glu Ala Leu Gln Pro Ala Gly		
180	185	190
Val Gly Val Val Ile Glu Ala Thr His Met Cys Met Val Met Arg Gly		
195	200	205
Val Gln Lys Met Asn Ser Lys Thr Val Thr Ser Thr Met Leu Gly Val		
210	215	220
Phe Arg Glu Asp Pro Lys Thr Arg Glu Glu Phe Leu Thr Leu Ile Arg		
225	230	235
240		
Ser		
<210> 6		
<211> 241		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 6		
Met Glu Lys Pro Arg Gly Val Arg Cys Thr Asn Gly Phe Ser Glu Arg		
1	5	10
Glu Leu Pro Arg Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Glu Lys Ser Arg Pro		
20	25	30
Pro Glu Ala Lys Gly Ala Gln Pro Ala Asp Ala Trp Lys Ala Gly Arg		
35	40	45
His Arg Ser Glu Glu Glu Asn Gln Val Asn Leu Pro Lys Leu Ala Ala		
50	55	60
Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Leu Ser Leu Gly Glu Asp Pro Gln Arg Gln		
65	70	75
80		

Gly	Leu	Leu	Lys	Thr	Pro	Trp	Arg	Ala	Ala	Thr	Ala	Met	Gln	Tyr	Phe	
85						90				95						
Thr	Lys	Gly	Tyr	Gln	Glu	Thr	Ile	Ser	Asp	Val	Leu	Asn	Asp	Ala	Ile	
100						105				110						
Phe	Asp	Glu	Asp	His	Asp	Glu	Met	Val	Ile	Val	Lys	Asp	Ile	Asp	Met	
115						120				125						
Phe	Ser	Met	Cys	Glu	His	His	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gly	Arg	Val	His	
130						135				140						
Ile	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asn	Lys	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	
145						150				155					160	
Arg	Ile	Val	Glu	Ile	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Gln	Val	Gln	Glu	Arg	Leu	
165						170				175						
Thr	Lys	Gln	Ile	Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Glu	Ala	Leu	Gln	Pro	Ala	Gly	
180						185				190						
Val	Gly	Val	Val	Ile	Glu	Ala	Thr	His	Met	Cys	Met	Val	Met	Arg	Gly	
195						200				205						
Val	Gln	Lys	Met	Asn	Ser	Lys	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Met	Leu	Gly	Val	
210						215				220						
Phe	Arg	Glu	Asp	Pro	Lys	Thr	Arg	Glu	Glu	Phe	Leu	Thr	Leu	Ile	Arg	
225						230				235					240	
Ser																
<210> 7																
<211> 496																
<212> PRT																
<213> 智人																
<400> 7																
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	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
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
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
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
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							
<210> 8															
<211> 528															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 8															
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	Val	Arg
20				25				30							
Gly	Gln	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Ser	Leu	Thr	Gly	Ser	Pro	Trp	Pro	Gly
35				40				45							
Thr	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Thr	Pro	Thr	Pro	Arg	Ser	Pro	Arg
50				55				60							
Phe	Ile	Gly	Arg	Arg	Gln	Ser	Leu	Ile	Glu	Asp	Ala	Arg	Lys	Glu	Arg
65				70				75				80			
Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly
85				90				95							
Asp	Pro	Leu	Glu	Ala	Val	Ala	Phe	Glu	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Ala	Val
100				105				110							
Leu	Asn	Leu	Leu	Phe	Ser	Pro	Arg	Ala	Thr	Lys	Pro	Ser	Ala	Leu	Ser
115				120				125							
Arg	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Glu	Ala	Lys	Ile	His	His	Leu
130				135				140							
Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gln	Arg	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Pro	His	Leu	Glu
145				150				155				160			
Tyr	Phe	Val	Arg	Leu	Glu	Val	Arg	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu
165				170				175							
Ser	Gly	Val	Arg	Gln	Val	Ser	Glu	Asp	Val	Arg	Ser	Pro	Ala	Gly	Pro
180				185				190							

Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys His		
195	200	205
His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro Gly		
210	215	220
Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu Ile		
225	230	235
Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr Thr		
	245	250
Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys Gly		
	260	265
Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala Leu		
	275	280
Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu Glu		
	290	295
Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg Pro		
305	310	315
Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala Phe		
	325	330
Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro Met		
	340	345
His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val Pro		
	355	360
Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly Leu		
	370	375
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr Leu		
385	390	395
Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu Val		
	405	410
Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu His		
	420	425
Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala Ala		
	435	440
Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe Val		
	450	455
Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala Ser		
465	470	475
Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu Ala		
	485	490
Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu Gly		

500	505	510
Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr	Leu Ala His Ala Leu Ser	Ala Ile Gly
515	520	525
<210> 9		
<211> 497		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 9		
Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr	Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg	
1	5	10
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
Met 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
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
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> 10			
<211> 501			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 10			
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 Val Arg		
20	25	30
Gly Gln Ser Pro Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp		
35	40	45
Ala Arg Lys Glu Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val		
50	55	60
Pro Ser Glu Pro Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys		
65	70	75
Glu Gly Lys Ala Met Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys		
85	90	95
Pro Ser Ala Leu Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala		
100	105	110
Lys Ile His His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly		
115	120	125
Gly Pro His Leu Glu Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp		
130	135	140
Leu Ala Ala Leu Leu Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg		
145	150	155
Ser Pro Ala Gly Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu		
165	170	175
Leu Asp Lys Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp		
180	185	190
Leu Asp His Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys		
195	200	205
Leu Ile Ala Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro		
210	215	220
Arg Val Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr		
225	230	235
Thr Thr Leu Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu		
245	250	255
Glu Ala Phe Ala Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn		
260	265	270
Ile Pro Gln Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly		
275	280	285
Phe Gln Leu Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu		
290	295	300
Ala Ser Leu Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His		
305	310	315
Ala Ser Ser Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu		

	325		330		335
Leu Gly His Val Pro Met Leu Ala Asp His Thr Phe Ala Gln Phe Ser					
	340		345		350
Gln Asp Ile Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu					
	355		360		365
Lys Leu Ser Thr Leu Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys					
	370		375		380
Gln Asn Gly Glu Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr					
385		390		395	400
Gly Glu Leu Leu His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe					
	405		410		415
Asp Pro Glu Ala Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln					
	420		425		430
Ser Val Tyr Phe Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu					
	435		440		445
Arg Ser Tyr Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp					
	450		455		460
Pro Tyr Thr Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg					
465		470		475	480
Arg Ser Leu Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala					
	485		490		495
Leu Ser Ala Ile Gly					
	500				
<210> 11					
<211> 528					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 11					
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 Val Arg					
	20		25		30
Gly Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ser Leu Thr Gly Ser Pro Trp Pro Gly					
	35		40		45
Thr Ala Ala Pro Ala Ala Ser Tyr Thr Pro Thr Pro Arg Ser Pro Arg					
	50		55		60
Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu Arg					
65		70		75	80
Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro Gly					

85	90	95
Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe	Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala Val	
100	105	110
Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg	Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu Ser	
115	120	125
Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe	Glu Ala Lys Ile His His Leu	
130	135	140
Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg	Ala Gly Gly Pro His Leu Glu	
145	150	155
Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg	Gly Asp Leu Ala Ala Leu Leu	
165	170	175
Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp	Val Arg Ser Pro Ala Gly Pro	
180	185	190
Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val	Ser Glu Leu Asp Lys Cys His	
195	200	205
His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp	Leu Asp Leu Asp His Pro Gly	
210	215	220
Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg	Arg Lys Leu Ile Ala Glu Ile	
225	230	235
Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro	Ile Pro Arg Val Glu Tyr Thr	
245	250	255
Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu	Val Tyr Thr Thr Leu Lys Gly	
260	265	270
Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu	His Leu Glu Ala Phe Ala Leu	
275	280	285
Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu	Asp Asn Ile Pro Gln Leu Glu	
290	295	300
Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg	Thr Gly Phe Gln Leu Arg Pro	
305	310	315
Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp	Phe Leu Ala Ser Leu Ala Phe	
325	330	335
Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile	Arg His Ala Ser Ser Pro Met	
340	345	350
His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His	Glu Leu Leu Gly His Val Pro	
355	360	365
Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln	Phe Ser Gln Asp Ile Gly Leu	
370	375	380
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu	Ile Glu Lys Leu Ser Thr Leu	
385	390	395
		400

Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu Val			
405	410	415	
Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu His			
420	425	430	
Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala Ala			
435	440	445	
Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe Val			
450	455	460	
Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala Ser			
465	470	475	480
Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu Ala			
485	490	495	
Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu Gly			
500	505	510	
Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile Gly			
515	520	525	
<210> 12			
<211> 338			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 对应于催化域的截断TH			
<400> 12			
Met Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys			
1	5	10	15
Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His			
20	25	30	
Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala			
35	40	45	
Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu			
50	55	60	
Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu			
65	70	75	80
Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe			
85	90	95	
Ala Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln			
100	105	110	
Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu			
115	120	125	

Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu		
130	135	140
Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser		
145	150	155 160
Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His		
	165	170 175
Val Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile		
	180	185 190
Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser		
	195	200 205
Thr Leu Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly		
	210	215 220
Glu Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu		
225	230	235 240
Leu His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu		
	245	250 255
Ala Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr		
	260	265 270
Phe Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr		
	275	280 285
Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr		
	290	295 300
Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu		
305	310	315 320
Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala		
	325	330 335

Ile Gly

<210> 13

<211> 497

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ser40 TH突变体

<400> 13

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 Glu Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu		

	35				40				45							
Arg	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	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> 14

<211> 497

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ser19 Ser40 TH突变体

<400> 14

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Glu Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Ser Pro
 20 25 30
 Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Glu 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
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
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
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
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> 15
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Ser 19 Ser31 Ser40 TH突变体
 <400> 15
 Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Glu Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Glu Pro
 20 25 30
 Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Glu 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> 16
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠
 <400> 16
 Met Pro Thr Pro Ser Ala Pro Ser Pro Gln Pro Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Ser Glu Gln Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Val Thr 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 Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ser Ser Glu
 50 55 60
 Pro Gly Asn Pro Leu Glu Ala Val Val Phe Glu Glu Arg Asp Gly Asn
 65 70 75 80
 Ala Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Leu Arg Gly Thr Lys Pro Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His
 100 105 110
 His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ala Gly Ser Pro His
 115 120 125
 Leu Glu Tyr Phe Val Arg Phe Glu Val Pro Ser Gly Asp Leu Ala Ala
 130 135 140
 Leu Leu Ser Ser Val Arg Arg Val Ser Asp Asp Val Arg Ser Ala Arg
 145 150 155 160
 Glu Asp Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys
 165 170 175
 Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His
 180 185 190
 Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala
 195 200 205
 Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Lys His Gly Glu Pro Ile Pro His Val Glu
 210 215 220
 Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Val Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Arg Glu His Leu Glu Gly Phe

	245	250	255
Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Cys Gly Tyr Arg Glu Asp Ser Ile Pro Gln			
	260	265	270
Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu			
	275	280	285
Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu			
	290	295	300
Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser			
305	310	315	320
Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His			
	325	330	335
Val Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile			
	340	345	350
Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser			
	355	360	365
Thr Val Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly			
	370	375	380
Glu Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu			
385	390	395	400
Leu His Ser Leu Ser Glu Glu Pro Glu Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp			
	405	410	415
Thr Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Val Tyr			
	420	425	430
Phe Val Ser Glu Ser Phe Asn Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Asn Tyr			
	435	440	445
Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr			
	450	455	460
Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro His Thr Ile Gln Arg Ser Leu			
465	470	475	480
Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu His Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala			
	485	490	495
Ile Ser			
<210> 17			
<211> 498			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 17			
Met Pro Thr Pro Ser Ala Ser Ser Pro Gln Pro Lys Gly Phe Arg Arg			
1	5	10	15

Ala Val Ser Glu Gln Asp Thr Lys Gln Ala Glu Ala Val Thr 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 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ser Ala Glu		
50	55	60
Pro Gly Asn Pro Leu Glu Ala Val Val Phe Glu Glu Arg Asp Gly Asn		
65	70	75
Ala Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Leu Arg Gly Thr Lys Pro Ser Ser		
85	90	95
Leu Ser Arg Ala Leu Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His		
100	105	110
His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ala Gly Ser Pro His		
115	120	125
Leu Glu Tyr Phe Val Arg Phe Glu Val Pro Ser Gly Asp Leu Ala Ala		
130	135	140
Leu Leu Ser Ser Val Arg Arg Val Ser Asp Asp Val Arg Ser Ala Arg		
145	150	155
Glu Asp Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys		
165	170	175
Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His		
180	185	190
Pro Gly Phe Ser Asp Gln Ala Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala		
195	200	205
Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Lys Gln Gly Glu Pro Ile Pro His Val Glu		
210	215	220
Tyr Thr Lys Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Ala Thr Leu		
225	230	235
Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Arg Glu His Leu Glu Ala Phe		
245	250	255
Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Cys Gly Tyr Arg Glu Asp Ser Ile Pro Gln		
260	265	270
Leu Glu Asp Val Ser His Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu		
275	280	285
Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu		
290	295	300
Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser		
305	310	315
Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His		

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

Ile Ser

<210> 18

<211> 145

<212> DNA

<213> 腺相关病毒2

<400> 18

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgccccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 19

<211> 145

<212> DNA

<213> 腺相关病毒2

<400> 19

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgccccggc aaagccccgg cgtcgggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgag agagggagtg gcca 145

<210> 20

<211> 753

<212> DNA

<213> 智人

<400> 20

```
atggagaagg gccctgtgcg ggcaccggcg gagaagccgc ggggcgccag gtgcagcaat 60
gggttccccg agcgggatcc gccgcggccc gggcccagca ggccggcgga gaagcccccg 120
cggcccgagg ccaagagcgc gcagcccgcg gacggctgga agggcgagcg gccccgcagc 180
gaggaggata acgagctgaa cctccctaac ctggcagccg cctactcgtc catcctgagc 240
tcgctggggcg agaaccceca gcggcaaggg ctgctcaaga cgccctggag ggcggcctcg 300
gccatgcagt tcttcaccaa gggctaccag gagaccatct cagatgtcct aaacgatgct 360
atatttgatg aagatcatga tgagatgggtg 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 taa 753
```

<210> 21

<211> 155

<212> DNA

<213> 猿猴病毒40

<400> 21

```
ttcgagcaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 60
tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 120
tgtatcttat catgtctgga tcgtctagca tcgaa 155
```

<210> 22

<211> 192

<212> DNA

<213> 猿猴病毒40

<400> 22

```
cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt 180
gggaggtttt tt 192
```

<210> 23

<211> 1490

<212> DNA

<213> 智人

<400> 23

atgcccaccc ccgacgccac cacgccacag gccaaagggt tccgcagggc cgtgtctgag 60
 ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg tccccgcggt tcattgggcg caggcagagc 120
 ctcatcgagg acgccccgaa ggagcgggag gcggcggttg cagcagcggc cgctgcagtc 180
 ccttcggagc ccggggaccc cctggaggct gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc 240
 gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg 300
 aagggtgttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agaccgggcc cgcccagagg 360
 ccgcgagctg ggggccccca cctggagtac ttctgtcgcc 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
 ggctctacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cctttgcttt gctggagcgc 780
 ttcagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccc cttectgaag 840
 gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccg ggacttccctg 900
 gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtctctgccc 960
 atgcactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc 1020
 gaccgcacct tcgcgcagtt ctgcgaggac attggcctgg cgtccctggg ggctcggat 1080
 gaggaattg agaagctgtc cacgtgttac tggttcacgg tggagttcgg gctgtgtaag 1140
 cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggctgctgt cctcctacgg ggagctcctg 1200
 cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag 1260
 ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttctgtg ctgagagctt cagtgcgcc 1320
 aaggacaagc tcaggagcta tgcctcacgc atccagcgcc ccttctccgt gaagttcgac 1380
 ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agccccagg ccgtgcggcg ctccctggag 1440
 ggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg 1490

<210> 24

<211> 1029

<212> DNA

<213> 智人

<400> 24

atgagccccg cggggcccaa ggtcccctgg ttcccaagaa aagtgtcaga gctggacaag 60
 tgtcatcacc tggtcaccaa gttcgacct gacctggact tggaccaccc gggcttctcg 120
 gaccaggtgt accgccagcg caggaagctg attgctgaga tcgccttcca gtacaggcac 180
 ggcgaccgga ttccccgtgt ggagtacacc gccgaggaga ttgccacctg gaaggaggtc 240
 tacaccacgc tgaagggcct ctacgccacg cacgcctgcg gggagcacct ggaggccttt 300
 gctttgctgg agcgcttcag cggtaccgg gaagacaata tccccagct ggaggacgtc 360
 tcccgttcc 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 cggatgagga aattgagaag ctgtccacgc tgtactgggt cacggtggag 660
 ttcgggctgt gtaagcagaa cggggagggt aaggcctatg gtgccgggct gctgtcctcc 720
 tacggggagc tcctgcactg cctgtctgag gaggctgaga ttcgggcctt cgaccctgag 780
 gctgcggccg tgcagcccta ccaagaccag acgtaccagt cagtctactt cgtgtctgag 840
 agcttcagtgc acgccaagga caagctcagg agctatgcct cacgcatcca gcgccccttc 900
 tccgtgaagt tcgaccgta cacgctggcc atcgacgtgc tggacagccc ccaggccgtg 960
 cggcgctccc tggagggtgt ccaggatgag ctggacaccc ttgcccattgc gctgagtgc 1020
 attggctaa 1029

<210> 25

<211> 1491

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ser40 TH突变体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1491)

<223> Ser40 TH突变体

<400> 25

atgcccaccc ccgacgccac cacgccacag gccaaagggt tccgcagggc cgtgtctgag 60
 ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg tccccgcgtt tcattgggcg caggcaggag 120
 ctcatcgagg acgcccga ggagcgggag gcggcggttg cagcagcggc cgctgcagtc 180
 cccctcggagc ccggggaccc cctggagggt gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc 240
 gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg 300
 aagggtgttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agaccgggcc cgcccagagg 360
 ccgcgagctg gggggcccca cctggagtac ttctgtgcgc tcgaggtgcg ccgaggggac 420
 ctggccgccc tgctcagtgg tgtgcgccag gtgtcagagg acgtgcgcag cccgcggggg 480
 cccaaggctc cctggttccc aagaaaagtg tcagagctgg acaagtgtca tcacctggtc 540
 accaagtctg accctgacct ggacttggac caccggggt tctcggacca ggtgtaccgc 600
 cagcgcagga agctgattgc tgagatcgcc ttccagtaca ggcacggcga cccgattccc 660
 cgtgtggagt acaccgccga ggagattgcc acctggaagg aggtctacac cacgctgaag 720
 ggctctacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cttttgcttt gctggagcgc 780
 ttcagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccg ctctctgaag 840
 gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccg ggacttcttg 900
 gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtctctgccc 960
 atgcactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc 1020
 gaccgcacct tcgcgcagtt ctgcgaggac attggcctgg cgtccctggg ggctctggat 1080
 gaggaaattg agaagctgtc cacgctgtac tggttcacgg tggagttcgg gctgtgtaag 1140

cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggctgctgt cctcctacgg ggagctcctg 1200
 cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag 1260
 ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt ctgagagctt cagtgcagcc 1320
 aaggacaagc tcaggagcta tgcctcacgc atccagcgcc ccttctccgt gaagttcgac 1380
 ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agccccagg ccgtgcggcg ctccctggag 1440
 ggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg c 1491

<210> 26

<211> 1491

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ser19 Ser49 TH突变体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1491)

<223> Ser19, Ser40 TH突变体

<400> 26

atgcccaccc ccgacgccac cacgccacag gccaaaggct tccgcagggc cgtggaggag 60
 ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg tccccgcggt tcattgggcg caggcaggag 120
 ctcatcgagg acgcccga aa ggagcgggag gcggcggttg cagcagcggc cgctgcagtc 180
 cctcggagc ccggggaccc cctggaggct gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc 240
 gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg 300
 aagggtgttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agaccgggcc cgcccagagg 360
 ccgcgagctg gggggcccca cctggagtac ttcgtgcgcc tcgaggtgcg ccgaggggac 420
 ctggccgccc tgctcagtgg tgtgcgccag gtgtcagagg acgtgcgcag ccccgcgggg 480
 cccaaggctc 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 cacgctgaag 720
 ggctctacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cctttgcttt gctggagcgc 780
 ttcagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccg cttcctgaag 840
 gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccg ggacttctctg 900
 gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtccctgccc 960
 atgcactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc 1020
 gaccgcacct tcgcgcagtt ctgcgaggac attggcctgg cgtccctggg ggccctcgat 1080
 gaggaaattg agaagctgtc cacgctgtac tggttcacgg tggagttcgg gctgtgtaag 1140
 cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggctgctgt cctcctacgg ggagctcctg 1200
 cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag 1260
 ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt ctgagagctt cagtgcagcc 1320

aaggacaagc tcaggagcta tgcctcacgc atccagegcc ccttctccgt gaagttcgac 1380
 ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agcccccagg ccgtgcggcg ctccctggag 1440
 ggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg c 1491

<210> 27

<211> 1491

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ser19 Ser31 Ser40 TH突变体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1491)

<223> Ser19, Ser31, Ser40 TH突变体

<400> 27

atgccacccc ccgacgccac cacgccacag gccaaaggct tccgcagggc cgtggaggag 60
 ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg gagccgcggt tcattgggcg caggcaggag 120
 ctcatcgagg acgcccga gtagcgggag gcggcggttg cagcagcggc cgctgcagtc 180
 ccctcggagc ccggggaccc cctggaggct gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc 240
 gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg 300
 aagggtgttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agaccgggcc cgcccagagg 360
 ccgcgagctg gggggcccca cctggagtac ttctgtgcgc tcgaggtgcg ccgaggggac 420
 ctggccgccc tgctcagtgg tgtgcgccag gtgtcagagg acgtgcgcag ccccgcgggg 480
 cccaaggtcc cctgggtccc aagaaaagtg tcagagctgg acaagtgtca tcacctggtc 540
 accaagttcg accctgacct ggacttggac caccggggct tctcgacca ggtgtaccgc 600
 cagcgcagga agctgattgc tgagatcgcc ttccagtaca ggcacggcga cccgattccc 660
 cgtgtggagt acaccgccga ggagattgcc acctggaagg aggtctacac cacgctgaag 720
 ggctcttacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cctttgcttt gctggagcgc 780
 ttcagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccg cttcctgaag 840
 gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccc ggacttccctg 900
 gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtccctgccc 960
 atgcaactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc 1020
 gaccgcacct tcgcgcagtt ctcgcaggac attggcctgg cgtccctggg ggccctcgat 1080
 gaggaattg agaagctgtc cacgctgtac tggttcacgg tggagtccgg gctgtgtaag 1140
 cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggtctgtgt cctcctacgg ggagctcctg 1200
 cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag 1260
 ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt ctgagagctt cagtgcgcc 1320
 aaggacaagc tcaggagcta tgcctcacgc atccagegcc ccttctccgt gaagttcgac 1380
 ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agcccccagg ccgtgcggcg ctccctggag 1440
 ggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg c 1491

<210> 28

<211> 610

<212> DNA

<213> 土拔鼠B型肝炎病毒

<400> 28

```
cgctcgacaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta 60
tggttgctcct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc 120
ttcccgtatg gctttcattt tctcctcett gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga 180
ggagttgttg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac 240
ccccactggg tggggcattg ccaccacctg tcagctcett tccgggactt tcgctttccc 300
cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgctgcett gcccgtgct ggacaggggc 360
tcggctgttg ggcaactgaca attccgtggg gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg 420
gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc 480
ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggctcttccc 540
gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccett tgggccgctt ccccgctgg 600
aattcgagct 610
```

<210> 29

<211> 610

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 土拔鼠B型肝炎病毒(WHV8)转录后调控元件

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (610)

<223> 突变型WHV8

<400> 29

```
cgctcgataat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta 60
tggttgctcct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc 120
ttcccgtatg gctttcattt tctcctcett gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga 180
ggagttgttg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac 240
ccccactggg tggggcattg ccaccacctg tcagctcett tccgggactt tcgctttccc 300
cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgctgcett gcccgtgct ggacaggggc 360
tcggctgttg ggcaactgaca attccgtggg gttgtcgggg aatcatcgt cctttccttg 420
gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc 480
ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggctcttccc 540
gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccett tgggccgctt ccccgctgg 600
aattcgagct 610
```

<210> 30

<211> 748

<212> DNA

<213> 智人

<400> 30

```

atggagaagg gccctgtgcg ggcaccggcg gagaagccgc ggggcgccag gtgcagcaat 60
gggttccccg agcgggatcc gccgcggccc gggcccagca ggccggcgga gaagcccccg 120
cggcccgagg 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
atatttgatg aagatcatga tgagatgggt 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 cattagga 748

```

<210> 31

<211> 4205

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAA011 - scAAV-HLP-GCH1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (4205)

<223> pAA011 - scAAV-HLP-GCH1

<400> 31

```

aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcactgaggc 60
cgggcgacca aaggtcgcgc gacgcccggt ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 120
agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tccttctaga tgtttgctgc 180
ttgcaatgtt tgcccatttt aggggtggaca caggacgctg tggtttctga gccagggggc 240
gactcagatc ccagccagtg gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc 300
ttggttaata ttcaccagca gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg 360
gacgaggaca gggccctgtc tcctcagett caggcaccac cactgacctg ggacagtga 420
tcgctagcga attctagcat ggagaagggc cctgtgcggg caccggcgga gaagccgcgg 480
ggcgccaggt gcagcaatgg gttccccgag cgggatccgc cgcggccccg gccagcagg 540
ccggcggaga agccccgcgc gcccgaggcc aagagcgcgc agcccgcgga cggctggaag 600
ggcgagcggc cccgcagcga ggaggataac gagctgaacc tccctaacct ggcagccgcc 660

```

tactcgtcca tcctgagctc gctgggcgag aacccccagc ggcaagggtc gctcaagacg 720
 ccctggaggc cggcctcggc catgcagttc ttcaccaagg gctaccagga gaccatctca 780
 gatgtcctaa acgatgctat atttgatgaa gatcatgatg agatggtgat tgtgaaggac 840
 atagacatgt tttccatgtg tgagcatcac ttggttccat ttggttgaaa ggtccatatt 900
 gggtatcttc ctaacaagca agtccttggc ctacagcaaac ttgcgaggat tgtagaaatc 960
 tatagtagaa gactacaagt tcaggagcgc cttacaaaac aaattgctgt agcaatcacg 1020
 gaagccttgc ggctgctgg agtcggggta gtggttgaag caacacacat gtgtatggta 1080
 atgcgagggtg tacagaaaat gaacagcaaa actgtgacca gcacaatgtt ggggtgtgttc 1140
 cgggaggatc caaagactcg ggaagagttc ctgactctca ttaggagcta atgcatcccc 1200
 atcgatgatc cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg 1260
 cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 1320
 ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag 1380
 ggggagggtg gggaggtttt ttagtcgacc gctagtccac tccctctctg cgcgctcgtc 1440
 cgctcactga ggccgggcca ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 1500
 cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggac agatccgggc ccgcatgcgt cgacaattca 1560
 ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc 1620
 cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 1680
 ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt 1740
 acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat 1800
 gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct 1860
 tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt 1920
 cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatagccta 1980
 tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg cacttttcgg 2040
 ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 2100
 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 2160
 attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc tttttgagg cattttgcct tcctgttttt 2220
 gctcaccagc aaacgctggt gaaagtataa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt 2280
 gggtacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa 2340
 cggttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt 2400
 gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 2460
 tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 2520
 gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcgaggga 2580
 ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggagc atgtaactcg cttgatcgt 2640
 tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 2700
 gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaa tacttactct agcttcccgg 2760
 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccattct gcgctcgccc 2820
 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcgg 2880
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgt tctagttat ctacacgacg 2940
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 3000

attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttataaa 3060
 cttcatTTTT aatttataaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaaa 3120
 atccccctaac gtgagttttt gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3180
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3240
 ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3300
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac 3360
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatect gttaccagt 3420
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3480
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3540
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 3600
 gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3660
 agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3720
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgtctg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3780
 agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 3840
 cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 3900
 gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc 3960
 ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac 4020
 aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact 4080
 cattaggcac ccaggtctt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg 4140
 agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacctg attacgcaa gctctcgaga 4200

tctag 4205

<210> 32

<211> 5129

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAA016 - scAAV-HLP-tTH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (5129)

<223> pAA016 - scAAV-HLP-tTH

<400> 32

aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgcgcgc tcaactgaggc 60
 cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 120
 agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctggaggg gtggagtcgt 180
 gacccctaaa atgggcaaac attgcgctag ctgtttgctg cttgcaatgt ttgccattt 240
 taggggtggac acaggacgct gtggtttctg agccaggggg cgactcagat cccagccagt 300
 ggacttagcc cctgtttgct cctccgataa ctgggggtgac cttggttaat attcaccagc 360
 agcctccccc gttgcccctc tggatccact gcttaaatac ggacgaggac agggccctgt 420

```

ctcctcagct tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atcattcaag ctcgtagcaa 480
ggatccaccg gtcaccatga gccccgcggg gcccaaggtc ccctggttcc caagaaaagt 540
gtcagagctg gacaagtgtc atcacctggg caccaagttc gaccctgacc tggacttgga 600
ccacccgggc ttctcggacc aggtgtaccg ccagcgcagg aagctgattg ctgagatcgc 660
cttccagtac aggcacggcg acccgattcc ccgtgtggag tacaccgccg aggagattgc 720
cacctggaag gaggtctaca ccacgtgaa gggcctctac gccacgcacg cctgcgggga 780
gcacctggag gcctttgctt tgcctggagc cttcagcggc taccgggaag acaatatccc 840
ccagctggag gacgtctccc gcttctgaa ggagcgcacg ggcttccagc tgcggcctgt 900
ggccggcctg ctgtccgccc gggacttccg ggccagcctg gccttccgcg tgttccagtg 960
caccagtat atccgccacg cgtcctcgcc catgcactcc cctgagccgg actgctgcca 1020
cgagctgctg gggcacgtgc ccatgctggc cgaccgcacc ttcgcgcagt tctgcagga 1080
cattggcctg gcgtccctgg gggcctcgga tgaggaaatt gagaagctgt ccacgtgta 1140
ctggttcacg gtggagtctg ggtgtgttaa gcagaacggg gaggtgaagg cctatggtgc 1200
cgggctgctg tctcctacg gggagctcct gcactgcctg tctgaggagc ctgagattcg 1260
ggccttcgac cctgaggctg cggccgtgca gccctacca gaccagacgt accagtcagt 1320
ctacttcgtg tctgagagct tcagtgcgc caaggacaag ctcaggagct atgcctcacg 1380
catccagcgc ccttctccg tgaagtcca cccgtacacg ctggccatcg acgtgctgga 1440
cagccccag gccgtgcggc gctccctgga ggggtgtccag gatgagctgg acacccttgc 1500
ccatgcgctg agtgccattg gctaactagt ggatccgtcg ataataacc tctggattac 1560
aaaatttgtg aaagattgac tggattctt aactatgttg ctccttttac gctatgtgga 1620
tacgtgctt taatgccttt gtatcatgct attgcttccc gtatggcttt cattttctcc 1680
tcttgtata aatcctggtt gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccgt tgtcaggcaa 1740
cgtggcgtgg tgtgcaactg gtttctgac gcaaccccca ctggttgggg cattgccacc 1800
acctgtcagc tctttccgg gactttcgct tccccctcc ctattgccac ggcggaactc 1860
atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc 1920
gtgggtgtgt cggggaaatc atcgtccttt ccttggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg 1980
attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc cttcggccc tcaatccagc ggaccttcc 2040
tcccgcggcc tgctgccggc tctgcggcct cttccgcgtc ttcgccttcg ccctcagacg 2100
agtcggatct cctttgggc cgcctcccc cctggaattc gagctcggta cagcttatcg 2160
ataccgtcga cttcgagcaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat 2220
agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc 2280
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcgtctagc atcgaagatc cccgctagt 2340
ccactccctc tctgcgcgtc cgtcgtctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgc 2400
gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggacagatcc 2460
gggcccgcac gcgtcgacaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 2520
cctggcgtaa cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 2580
agcgaagagg cccgcaccga tcgcccctcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 2640
cgctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc 2700
actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca 2760

```

```

cccgtctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctccccgcat ccgcttacag acaagctgtg 2820
accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgaga 2880
cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct 2940
tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 3000
taaatacatt caaataatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 3060
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 3120
gcggcatttt gccttcctgt ttttctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3180
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 3240
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3300
tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac 3360
tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3420
atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3480
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3540
gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3600
gagcgtgaca ccacgatgcc tntagcaatg gcaacaacgt tgcgcaact attactggc 3660
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3720
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttcg gctggctggt ttattgctga taaatctgga 3780
gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3840
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3900
atcgtctgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac tgtcagacca agtttactca 3960
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4020
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 4080
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc 4140
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 4200
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agatacaaaa tactgttctt 4260
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 4320
gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 4380
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg 4440
tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 4500
ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 4560
agggtcggaa caggagagcg cacgaggagg cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 4620
agtccgtgctg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgctcagg 4680
gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc 4740
tggccttttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt 4800
accgcctttg agtgagctga taccgtcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca 4860
gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg 4920
attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 4980
gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg 5040
gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 5100

```

catgattacg ccaagctctc gagatctag 5129

<210> 33

<211> 8013

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAAo19 - scAAV-LP1-GCH1-LP1-tTH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (8013)

<223> pAAo19 - scAAV-LP1-GCH1-LP1-tTH

<400> 33

```

cagcagctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcggggcg 60
acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagaggaggt ggccaactcc 120
atcactaggg gtcccttgta gttaatgatt aaccgcccat gctacttata tacgtagcca 180
tgctctagag ctgagcccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac 240
agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggcccc 300
tgccacctcc aacatccact cgaccccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgctc 360
ctggcggtgt ttaggtagtg tgagagggga atgactcctt tcggttaagt cagtgggaagc 420
tgtacactgc ccaggcaaag cgtccgggca gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag 480
tggaacttagc cctgtttgac tcctccgata actggggtga ccttggttaa tattcaccag 540
cagcctcccc cgttgcccct ctggatccac tgcttaaata cggacgagga cagggccctg 600
tctctcagc ttcaggcacc accactgacc tgggacagtg aatccggact ctaaggtaaa 660
tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt ctctctttta 720
gattccaacc tttggaactg acctgcagga ttcaagctgc tagcaaggat ccaccggtaa 780
catggagaag ggccctgtgc gggcaccggc ggagaagccg cggggcgcca ggtgcagcaa 840
tggggtcccc gagcgggata cgccgcggcc cgggcccagc aggccggcgg agaagcccc 900
gcggcccagc gccaagagcg cgagcccgc ggacggctgg aagggcgagc ggcccgcag 960
cgaggaggat aacgagctga acctccctaa cctggcagcc gcctactcgt ccatcctgag 1020
ctcgctgggc gagaaccccc agcggcaagg gctgctcaag acgccctgga gggcggcctc 1080
ggccatgcag ttcttcacca agggctacca ggagaccatc tcagatgtcc taaacgatgc 1140
tatatttgat gaagatcatg atgagatggt gattgtgaag gacatagaca tgttttccat 1200
gtgtgagcat cacttggttc catttggttg aaaggtccat attggttata ttctaactaa 1260
gcaagtcctt ggccctcagc aacttgcgag gattgtagaa atctatagta gaagactaca 1320
agttcaggag cgccttacta aacaaattgc tgtagcaatc acggaagcct tgcggcctgc 1380
tggaagtcgg gtagtggttg aagcaacaca catgtgtatg gtaatgcgag gtgtacagaa 1440
aatgaacagc aaaactgtga ccagcacaat gttgggtgtg ttccgggagg atccaaagac 1500
tcgggaagag ttctgactc tcattaggag ctaatgcate cccatcgatg atccagacat 1560
gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 1620

```

tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca 1680
agttaacaac aacaattgca ttcatTTTTat gtttcaggtt cagggggagg tgtgggaggt 1740
tttttagtcg accagatctg acaaggtccc ctaaaatggg caaacattgc aagcagcaaa 1800
cagcaaacac acagccctcc ctgcctgctg accttgagc tggggcagag gtcagagacc 1860
tctctgggcc catgccacct ccaacatcca ctcgaccctt tggaatttcg gtggagagga 1920
gcagaggttg tcctggcgtg gtttaggtag tgtgagaggg gaatgactcc tttcggtag 1980
tgcagtggaa gctgtacact gcccaggcaa agcgtccggg cagcgtaggc gggcgactca 2040
gatcccagcc agtggactta gcccctgttt gctcctccga taactggggg gaccttggtt 2100
aatattcacc agcagcctcc cccgttgccc ctctggatcc actgcttaa tacggacgag 2160
gacagggccc tgtctcctca gcttcaggca ccaccactga cctgggacag tgaatccgga 2220
ctctaaggta aatataaaat ttttaagtgt ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt 2280
ttctctcttt tagattccaa cctttggaac tgattcgaaa ttcaagctgc tagcaaggat 2340
ccaccgtca ccatgagccc cgcggggccc aaggtccctt ggttcccaag aaaagtgtca 2400
gagctggaca agtgtcatca cctggtcacc aagtctgacc ctgacctgga cttggaccac 2460
ccgggcttct cggaccaggt gtaccgccag cgcaggaagc tgattgctga gatcgcttc 2520
cagtacaggc acggcgaccc gattccccgt gtggagtaca ccgccgagga gattgccacc 2580
tggaaggagg tctacaccac gctgaagggc ctctacgcca cgcacgcctg cggggagcac 2640
ctggaggcct ttgctttgct ggagcgcttc agcggtacc gggaagacaa tatccccag 2700
ctggaggacg tctcccgtt cctgaaggag cgcacgggt tccagctgcg gcctgtggcc 2760
ggcctgctgt ccgcccggga cttcctggcc agcctggcct tccgcgtgtt ccagtgcacc 2820
cagtatatcc gccacgcgtc ctgccccatg cactccctg agccggactg ctgccacgag 2880
ctgctggggc acgtgcccatt gctggccgac cgcaccttcg cgcagttctc gcaggacatt 2940
ggcctggcgt ccttgggggc ctcggtatgag gaaattgaga agctgtccac gctgtactgg 3000
ttcacggtgg agttcgggct gtgtaagcag aacggggagg tgaaggccta tgggtgccggg 3060
ctgctgtcct cctacgggga gctcctgcac tgctgtctg aggagcctga gattcgggcc 3120
ttcgaccctg aggtcgcggc cgtgcagccc taccaagacc agacgtacca gtcagtctac 3180
ttcgtgtctg agagcttcag tgacgccaag gacaagctca ggagctatgc ctcacgcatc 3240
cagcgccctt tctccgtgaa gttcgaccg tacacgtgg ccatcgacgt gctggacagc 3300
ccccaggccg tgcggcgctc cctggagggt gtccaggatg agctggacac cttgcccatt 3360
gcgctgagtg ccattggcta actagtggat ccgtcgataa tcaacctctg gattacaaaa 3420
tttgtgaaaag attgactggg attcttaact atgttgctcc ttttacgcta tgtggatacg 3480
ctgctttaat gcccttgtat catgtattg ctccccgtat ggctttcatt ttctctcct 3540
tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagtgtg gcccgttgct aggcaacgtg 3600
gcgtgggtgt cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt gccaccacct 3660
gtcagctcct ttccgggact ttcgcttcc cctccctat tgccacggcg gaactcatcg 3720
ccgctgcct tgcccgtgc tggacagggg ctcggtgtt gggcactgac aattccgtgg 3780
tgttgctggg gaaatcatcg tccttccctt ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc 3840
tgcgcgggac gtcttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcgagc ctctctccc 3900
gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgcct cagacgagtc 3960

```

ggatctccct ttgggccgcc tccccgcctg gaattcgagc tcggtacagc ttatcgatac 4020
cgctcgacttc gagcaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca 4080
tcacaaatTT cacaataaaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac 4140
tcatcaatgt atcttatcat gtctggatcg tctagcatcg aagatcccc gcattgctcta 4200
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccacct 4260
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcactgaggc cgggcgacca 4320
aaggctcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgagc 4380
tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat 4440
ggcgaatgga attccagacg attgagcgtc aaaatgtagg tatttccatg agcgTTTTT 4500
ctgttgcaat ggctggcggt aatattgttc tggatattac cagcaaggcc gatagtttga 4560
gttctttctac tcaggcaagt gatgttatta ctaatcaaag aagtattgcg acaacggtta 4620
atttgcgta tggacagact cttttactcg gtggcctcac tgattataaa aacacttctc 4680
aggattctgg cgtaccgttc ctgtctaaaa tccctttaat cggcctcctg ttagctccc 4740
gctctgattc taacgaggaa agcacgttat acgtgctcgt caaagcaacc atagtacgcg 4800
ccctgtagcg gcgcattaag cgcgggcggt gtggtggtta cgcgagcgt gaccgtaca 4860
cttgccagcg ccctagcgcc cgtcccttc gttttcttc ctccctttct cgccacgttc 4920
gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg atttagtgct 4980
ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg 5040
ccctgataga cggTTTTTcg ccctttgacg ttggagtcca cgTTTttta tagtggaactc 5100
ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct attcttttga tttataaggg 5160
attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga ttaacaaaa atttaacgcg 5220
aatTTtaaca aaatattaac gtttacaatt taaatattg cttatacaat ctccctgttt 5280
ttggggcttt tctgattatc aaccggggta catatgattg acatgctagt tttacgatta 5340
ccgttcacg attctcttgt ttgctccaga ctctcaggca atgacctgat agcctttgta 5400
gagacctctc aaaaatagct accctctccg gcatgaattt atcagctaga acggttgaat 5460
atcatattga tggtgatttg actgtctccg gcctttctca cccgtttgaa tctttaccta 5520
cacattactc aggcattgca tttaaaatat atgagggttc taaaaatttt tatccttgcg 5580
ttgaaataaa ggcttctccc gcaaaagtat tacagggtca taatgttttt ggtacaaccg 5640
atttagcttt atgctctgag gctttattgc ttaattttgc taattctttg cttgacctgt 5700
atgatttatt ggatgttgga attcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt 5760
atttcacacc gcatatgggt cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 5820
cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga 5880
tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttaccg 5940
tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctctgtatag gcctattttt ataggTTaat 6000
gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 6060
accctatTT gtttattttt cttaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 6120
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 6180
gtcgccttta ttcccttttt tgccgcatTT tgcttctctg tttttgctca ccagaaacg 6240
ctggtgaaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 6300

```

gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 6360
agcacttttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 6420
caactcgggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 6480
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctgc cataaccatg 6540
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 6600
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccctg atcgttggga accggagctg 6660
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 6720
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 6780
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 6840
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 6900
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 6960
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 7020
ctgtcagacc aagtttactc atataactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 7080
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaactccc ttaacgtgag 7140
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 7200
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 7260
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 7320
cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 7380
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 7440
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 7500
tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 7560
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 7620
gacaggatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttcaggg 7680
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 7740
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 7800
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccct 7860
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gactgagctg ataccgctcg ccgagccga 7920
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg 7980
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgc 8013

<210> 34

<211> 5369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAA010 scAAV-LP1-tTH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (5369)

<223> pAA010 scAAV-LP1-tTH

<400> 34

```

aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgcgcgc tctactgaggc 60
cgggcgacca aaggtcgcgc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 120
agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctggaggg gtggagtcgt 180
gacccctaaa atgggcaaac attgcaagca gcaaacagca aacacacagc cctccctgcc 240
tgctgacctt ggagctgggg cagaggtcag agacctctct gggcccatgc cacctccaac 300
atccactcga ccccttgga tttcggtgga gaggagcaga ggttgctctg gcgtggttta 360
ggtagtgatga gaggggaatg actcctttcg gtaagtgcag tggaagctgt acactgcccc 420
ggcaaagcgt ccgggcagcg taggcgggcg actcagatcc cagccagtgg acttagcccc 480
tgtttgctcc tccgataact ggggtgacct tggttaatat tcaccagcag cctccccctg 540
tgccccctctg gatccactgc tttaaatacgg acgaggacag ggccctgtct cctcagcttc 600
aggcaccacc actgacctgg gacagtgaat ccggactcta aggtaaatat aaaattttta 660
agtgtataat gtgttaaact actgattcta attgtttctc tcttttagat tccaaccttt 720
ggaactgaat tctagcatga gccccgcggg gccaaggtc ccctggttcc caagaaaagt 780
gtcagagctg gacaagtgtc atcacctggt caccaagttc gacctgacc tggacttgga 840
ccacccgggc ttctcggacc aggtgtaccg ccagcgcagg aagctgattg ctgagatcgc 900
cttcagctac aggcacggcg acccgattcc ccgtgtggag tacaccgccg aggagattgc 960
cacctggaag gaggtctaca ccacgtgaa gggcctctac gccacgcacg cctgcgggga 1020
gcacctggag gcctttgctt tgctggagcg cttcagcggc taccgggaag acaatatccc 1080
ccagctggag gacgtctccc gcttcctgaa ggagcgcacg ggcttccagc tgcggcctgt 1140
ggccggcctg ctgtccgccc gggacttcct ggccagcctg gccttccgcg tgttccagt 1200
caccagctat atccgccacg cgtcctcgcc catgcactcc cctgagccgg actgctgcca 1260
cgagctgctg gggcacgtgc ccatgctggc cgaccgcacc ttcgcgcagt tctcgcagga 1320
cattggcctg gcgtccctgg gggcctcgga tgaggaaatt gagaagctgt ccacgtgta 1380
ctggttcacg gtggagtctg ggctgtgtaa gcagaacggg gaggtgaagg cctatggtgc 1440
cgggctgctg tcctcctacg gggagctcct gcactgcctg tctgaggagc ctgagattcg 1500
ggccttcgac cctgaggctg cggccgtgca gccctacca gaccagacgt accagtcagt 1560
ctacttcgtg tctgagagct tcagtgcgc caaggacaag ctcaggagct atgcctcacg 1620
catccagcgc cccttctccg tgaagtctga cccgtacacg ctggccatcg acgtgctgga 1680
cagccccccag gccgtgcggc gtcctctgga ggggtgtccag gatgagctgg acacccttgc 1740
ccatgcgctg agtgccattg gctaactagt ggatccgtcg ataataacc tctggattac 1800
aaaatttgtg aaagattgac tgggtattctt aactatgttg ctccctttac gctatgtgga 1860
tacgtgctt taatgccttt gtatcatgct attgttccc gtatggcttt cattttctcc 1920
tccttgata aatcctggtt gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccggt tgcaggcaa 1980
cgtggcgtgg tgtgcaactgt gtttctgac gcaaccccc ctggttgggg cattgccacc 2040
acctgtcagc tcctttccgg gactttcgtt tccccctcc ctattgccac ggcggaactc 2100
atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc 2160
gtgggtgtgt cggggaaaac atcgctcctt ccttggtctg tcgcctgtgt tgccacctgg 2220
attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc ccttcggccc tcaatccagc ggaccttctt 2280

```

```

tccccgcgcc tgctgccggc tctgcggcct cttccgcgtc ttcgccttcg ccctcagacg 2340
agtcggatct cccittgggc cgcctccccg cctggaattc gagctcggta cagcttatcg 2400
ataccgtcga cttcgagcaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat 2460
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttag tggtttgtcc 2520
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcgtctagc atcgaagatc ccccgctagt 2580
ccactccctc tctgcgcgct cgtcgcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgcg 2640
gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggacagatcc 2700
gggcccgcgt gcgtcgacaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 2760
cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 2820
agcgaagagg cccgcaccga tcgccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 2880
cgcctgatgc ggatattttt ccttacgcgt ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc 2940
actctcagta caatctgtc tgatgccga tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca 3000
cccgtgacg cgcctgacg ggttgtctg ctcccggcat ccgtttacag acaagctgtg 3060
accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg tttcacccgt catcaccgaa acgcgcgaga 3120
cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct 3180
tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 3240
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gtttcaataa 3300
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 3360
gcggcatttt gccttcctgt ttttctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3420
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggttaagatc 3480
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3540
tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 3600
tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3660
atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3720
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3780
gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3840
gagcgtgaca ccacgatgcc ttagtcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc 3900
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3960
gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggtggtt ttattgctga taaatctgga 4020
gccggtgagc gtgggtctcg cgttatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 4080
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 4140
atcgtgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac tgtcagacca agtttactca 4200
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4260
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 4320
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc 4380
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 4440
ccaactcttt ttccgaaggt aactggttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt 4500
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc 4560
gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 4620

```

ttggactcaa gacgatatgt accggataag ggcagcgggt cgggctgaac ggggggttcg 4680
 tgcacacagc ccagcttga gcaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 4740
 ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaagg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 4800
 agggctcgga caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 4860
 agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 4920
 gggcgagacc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc 4980
 tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt 5040
 accgcctttg agtgagctga taccgctgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagtgca 5100
 gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg 5160
 attcattaat gcagctggca cgacaggttt ccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 5220
 gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcacccagc ctttacactt tatgcttccg 5280
 gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 5340
 catgattacg ccaagctctc gagatctag 5369

<210> 35

<211> 4503

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAA009 scAAV-LP1-GCH1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (4503)

<223> pAA009 scAAV-LP1-GCH1

<400> 35

aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcaactgagc 60
 cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 120
 agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctggaggg gtggagtcgt 180
 gacccctaaa atgggcaaac attgcaagca gcaaacagca aacacacagc cctccctgcc 240
 tgctgacctt ggagctgggg cagaggtcag agacctctct gggcccatgc cacctccaac 300
 atccactcga ccccttgga tttcggtgga gaggagcaga ggttgctctg gcgtggttta 360
 ggtagtgtga gaggggaatg actcctttcg gtaagtgcag tggaagctgt aactgcccc 420
 ggcaaagcgt ccgggcagcg taggcgggag actcagatcc cagccagtgg acttagcccc 480
 tgtttgctcc tccgataact ggggtgacct tggtaatat tcaccagcag cctccccctg 540
 tgccccctct gatccactgc tttaaatacgg acgaggacag ggccctgtct cctcagcttc 600
 aggcaccacc actgacctgg gacagtgaat ccggactcta aggtaaatat aaaattttta 660
 agtgtataat gtgttaaact actgattcta attgtttctc tcttttagat tccaaccttt 720
 ggaactgaat tctagcatgg agaagggcc tgtgcgggca ccggcggaga agccgcgggg 780
 cgccaggtgc agcaatgggt tccccgagcg ggatccgccg cgccccgggc ccagcaggcc 840
 ggccggagaag cccccgcggc ccgaggccaa gagcgcgcag cccgcggacg gctggaaggg 900

cgagcggccc cgcagcgagg aggataacga gctgaacctc cctaacctgg cagccgccta 960
 ctcgtccatc ctgagctcgc tgggcgagaa cccccagcgg caagggctgc tcaagacgcc 1020
 ctggagggcg gcctcggcca tgcagttctt caccaagggc taccaggaga ccatctcaga 1080
 tgtcctaaac gatgctatat ttgatgaaga tcatgatgag atggtgattg tgaaggacat 1140
 agacatgttt tccatgtgtg agcatcactt ggttcattt gttggaaagg tccatattgg 1200
 ttatcttcct aacaagcaag tccttggcct cagcaaactt gcgaggattg tagaaatcta 1260
 tagtagaaga ctacaagtgc aggagcgcct tacaaaacaa attgctgtag caatcacgga 1320
 agccttgccg cctgctggag tcggggtagt ggttgaagca acacacatgt gtatggtaat 1380
 gcgagggtga cagaaaaatga acagcaaac tgtgaccagc acaatgttgg gtgtgttccg 1440
 ggaggatcca aagactcggg aagagtctct gactctcatt aggagctaata gcatcccat 1500
 cgatgatcca gacatgataa gatacattga tgagtttga caaacacaa ctagaatgca 1560
 gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat 1620
 aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgttgc aggttcaggg 1680
 ggagggtgtg gaggtttttt agtcgaccgc tagtccactc cctctctgcg cgctcgtcgc 1740
 ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcgccctca 1800
 gtgagcgagc gagcgcgag agaggacag atccggggcc gcatgcgtcg acaattcact 1860
 ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt 1920
 tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc 1980
 ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac 2040
 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 2100
 cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg 2160
 tctgctcccc gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 2220
 gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 2280
 tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg 2340
 aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 2400
 catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat 2460
 tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgccgca ttttgccctc ctgtttttgc 2520
 tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 2580
 ttacatcgaa ctggatctca acagcggtta gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 2640
 ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 2700
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta 2760
 ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 2820
 tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 2880
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 2940
 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccgtgtagc 3000
 aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaaacta cttactctag ctccccgga 3060
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct 3120
 tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat 3180
 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 3240

gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat 3300
 taagcattgg taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact 3360
 tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaaat 3420
 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 3480
 ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 3540
 accagcggtg gtttggttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 3600
 cttcagcaga gcgcagatac caaataactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca 3660
 cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctctg ctaatcctgt taccagtggc 3720
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 3780
 taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac 3840
 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccgga 3900
 agggagaaaag gcggacaggt atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 3960
 ggagcttcca gggggaaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 4020
 acttgagcgt cgatttttgt gatgtctctc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag 4080
 caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 4140
 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 4200
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc 4260
 aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 4320
 gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca 4380
 ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag 4440
 cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tctcgagatc 4500
 tag 4503

<210> 36

<211> 5059

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> scAAV-LP1-hFIXco

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (5059)

<223> scAAV-LP1-hFIXco

<400> 36

aaagcttccc ggggggatct gggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcaactgaggc 60
 cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 120
 agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tcctggaggg gtggagtcgt 180
 gacccctaaa atgggcaaac attgcaagca gcaaacagca aacacacagc cctccctgcc 240
 tgctgacctt ggagctgggg cagaggtcag agacctctct gggcccatgc cacctccaac 300
 atccactcga ccccttgga tttcggtgga gaggagcaga ggttgtcctg gcgtggttta 360

```

ggtagtgtga gaggggaatg actcctttcg gtaagtgcag tggaagctgt acactgcccc 420
ggcaaagcgt ccgggcagcg taggcgggcg actcagatcc cagccagtgg acttagcccc 480
tgtttgctcc tccgataact ggggtgacct tggttaatat tcaccagcag cctccccctgt 540
tgccccctctg gatccactgc ttaaatacgg acgaggacag ggccctgtct cctcagcttc 600
aggcaccacc actgacctgg gacagtgaat ccggactcta aggtaaatat aaaattttta 660
agtgtataat gtgttaaact actgattcta attgtttctc tcttttagat tccaaccttt 720
ggaactgaat tctagaccac catgcagagg gtgaacatga tcatggctga gagccctggc 780
ctgatcacca tctgcctgct gggctacctg ctgtctgctg agtgcactgt gttcctggac 840
catgagaatg ccaacaagat cctgaacagg cccaagagat acaactctgg caagctggag 900
gagtttgtgc agggcaacct ggagaggagg tgcatggagg agaagtgcag ctttgaggag 960
gccagggagg tgtttgagaa cactgagagg accactgagt tctggaagca gtatgtggat 1020
ggggaccagt gtgagagcaa cccctgcctg aatgggggca gctgcaagga tgacatcaac 1080
agctatgagt gctgggtgccc ctttggett t gagggaaga actgtgagct ggatgtgacc 1140
tgcaacatca agaattggcag atgtgagcag ttctgcaaga actctgctga caacaagggtg 1200
gtgtgcagct gcactgaggg ctacaggctg gctgagaacc agaagagctg tgagcctgct 1260
gtgccattcc catgtggcag agtgtctgtg agccagacca gcaagctgac cagggtgag 1320
gctgtgttcc ctgatgtgga ctatgtgaac agcactgagg ctgaaacct cctggacaac 1380
atcaccaga gcaccagag cttcaatgac ttcaccaggg tgggtggggg ggaggatgcc 1440
aagcctggcc agttcccctg gcaagtgtg ctgaatggca aggtggatgc cttctgtggg 1500
ggcagcattg tgaatgagaa gtggattgtg actgctgccc actgtgtgga gactgggggtg 1560
aagatcactg tgggtggctgg ggagcacaac attgaggaga ctgagcacac tgagcagaag 1620
aggaatgtga tcaggatcat cccccaccac aactacaatg ctgcatcaa caagtacaac 1680
catgacattg cctgctgga gctggatgag cccctggtgc tgaacagcta tgtgaccccc 1740
atctgcattg ctgacaagga gtacaccaac atcttctga agtttggtc tggctatgtg 1800
tctggctggg gcagggtgtt ccacaagggc aggtctgccc tgggtgctgca gtacctgagg 1860
gtgccccctg tggacagggc cacctgcctg aggagcacca agttcacat ctacaacaac 1920
atgttctgtg ctggcttcca tgaggggggc agggacagct gccaggggga ctctgggggc 1980
ccccatgtga ctgaggtgga gggcaccagc ttctgactg gcatcatcag ctggggggag 2040
gagtgtgcca tgaagggcaa gtatggcatc tacaccaaag tctccagata tgtgaactgg 2100
atcaaggaga agaccaagct gacctgactc gatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta 2160
ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc 2220
attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttaaactagt cactccctc 2280
tctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccag gcccggtt 2340
tgccccggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggacagatcc gggcccgcat 2400
gcgtcgacaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta 2460
cccaacttaa tcgccttga gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 2520
cccgaccga tcgcccctcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgatgg cgctgatgc 2580
ggatattttct ccttacgcat ctgtgcgta ttacacccg catatggtgc actctcagta 2640
caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgtgacg 2700

```

cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 2760
 ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcacgaa acgcgcgaga cgaaagggcc 2820
 tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag 2880
 gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt 2940
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 3000
 ggaagagtat gagtattcaa cttttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 3060
 gccttcctgt ttttgtctac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 3120
 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt 3180
 ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg 3240
 tattatccccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 3300
 atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 3360
 gagaattatg cagtgtctgc ataacctga gtgataacac tgcggccaac ttactttctga 3420
 caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 3480
 ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 3540
 ccacgatgcc ttagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta 3600
 ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 3660
 ttctgcgctc ggcccttcgg gctggctggg ttattgtctga taaatctgga gccggtgagc 3720
 gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 3780
 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga 3840
 taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt 3900
 agattgatit aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 3960
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 4020
 aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa 4080
 caaaaaaacc accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt 4140
 ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc 4200
 cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa 4260
 tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 4320
 gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 4380
 ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa 4440
 gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa 4500
 caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgctg gtatctttat agtcctgtcg 4560
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctgctcaggg gggcggagcc 4620
 tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggcccttttg tggccttttg 4680
 ctcacatgtt ctttctgctg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 4740
 agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 4800
 aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat 4860
 gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg 4920
 tgagttagct cactcattag gcacccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt 4980
 tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg 5040

ccaagctctc gagatctag 5059

<210> 37

<211> 9189

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pAV HLP FVIII V3 kan

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (9189)

<223> pAV HLP FVIII V3 kan

<400> 37

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttc 240
ccgggggggat ctttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgcccgg 300
gcaaagcccc ggcgtcgggc gacctttggt cgcccgccct cagtgagcga gcgagcgcg 360
agagagggag tggccaactc catcactagg ggttcggag ggggtggagtc gtgacgtgaa 420
ttacgtcata gggtaggga ggtcgtatac tgtttctgc ttgcaatgtt tgcccatttt 480
agggtggaca caggacgctg tggtttctga gccagggggc gactcagatc ccagccagt 540
gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca 600
gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 660
tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtga tgcgggccgc caccatgcag 720
attgagctga gcacctgctt cttcctgtgc ctgctgaggt tctgcttctc tgccaccagg 780
agatactacc tgggggctgt ggagctgagc tgggactaca tgcagtctga cctgggggag 840
ctgcctgtgg atgccagggt cccccccaga gtgcccaga gcttccccct caacacctct 900
gtgggtgtaca agaagaccct gtttgtggag ttcactgacc acctgttcaa cattgccaa 960
cccaggcccc cctggatggg cctgctgggc cccaccatcc aggetgaggt gtatgacact 1020
gtgggtgatca ccctgaagaa catggccagc caccctgtga gcctgcatgc tgtgggggtg 1080
agctactgga aggcctctga gggggctgag tatgatgacc agaccagcca gagggagaag 1140
gaggatgaca aggtgttccc tgggggcagc cacacctatg tgtggcaggt gctgaaggag 1200
aatggcccca tggcctctga cccctgtgc ctgacctaca gctacctgag ccatgtggac 1260
ctgggtgaagg acctgaactc tggcctgatt ggggcctgc tgggtgtcag ggagggcagc 1320
ctggccaagg agaagacca gacctgcac aagtcatcc tgctgtttgc tgtgtttgat 1380
gagggaaga gctggcactc tgaaaccaag aacagcctga tgcaggacag ggatgctgcc 1440
tctgccaggg cctggcccaa gatgcacact gtgaatggct atgtgaacag gacacctgc 1500
ggcctgattg gctgccacag gaagtctgtg tactggcatg tgattggcat gggcaccacc 1560
cctgaggtgc acagcatctt cctggagggc cacaccttc tggtcaggaa ccacaggcag 1620

```

```

gccagcctgg agatcagccc catcaccttc ctgactgccc agaccctgct gatggacctg 1680
ggccagttcc tgctgttctg ccacatcagc agccaccagc atgatggcat ggaggcctat 1740
gtgaaggtgg acagctgccc tgaggagccc cagctgagga tgaagaacaa tgaggaggct 1800
gaggactatg atgatgacct gactgactct gagatggatg tggtagggtt tgatgatgac 1860
aacagcccca gcttcatcca gatcaggctt gtggccaaga agcaccccaa gacctgggtg 1920
cactacattg ctgctgagga ggaggactgg gactatgccc ccctggtgct ggcccctgat 1980
gacaggagct acaagagcca gtacctgaac aatggccccc agaggattgg caggaagtac 2040
aagaaggtca ggttcatggc ctacactgat gaaaccttca agaccaggga ggccatccag 2100
catgagtctg gcatcctggg cccctgctg tatggggagg tgggggacac cctgctgac 2160
atcttcaaga accaggccag caggccctac aacatctacc cccatggcat cactgatgtg 2220
aggccctgt acagcaggag gctgccaag ggggtgaagc acctgaagga cttcccatc 2280
ctgcctgggg agatcttcaa gtacaagtgg actgtgactg tggaggatgg cccaccaag 2340
tctgaccca ggtgcctgac cagatactac agcagctttg tgaacatgga gagggacctg 2400
gcctctggcc tgattggccc cctgctgac tgctacaagg agtctgtgga ccagaggggc 2460
aaccagatca tgtctgacaa gaggaatgtg atcctgttct ctgtgtttga tgagaacagg 2520
agctggtacc tgactgagaa catccagagg ttctgccc accctgctgg ggtgcagctg 2580
gaggaccctg agttccaggc cagcaacatc atgcacagca tcaatggcta tgtgtttgac 2640
agcctgcagc tgtctgtgtg cctgcatgag gtggcctact ggtacatcct gagcattggg 2700
gccagactg acttccctgc tgtgttcttc tctggctaca cttcaagca caagatggtg 2760
tatgaggaca cctgaccct gttccccttc tctggggaga ctgtgttcat gagcatggag 2820
aaccctggcc tgtggattct gggctgccac aactctgact tcaggaacag gggcatgact 2880
gccctgctga aagtctccag ctgtgacaag aactctggg actactatga ggacagctat 2940
gaggacatct ctgcctacct gctgagcaag aacaatgcc ttagcccag gagcttcagc 3000
cagaatgcca ctaatgtgtc taacaacagc aacaccagca atgacagcaa tgtgtctccc 3060
ccagtgtga agaggcacca gagggagatc accaggacca ccctgcagtc tgaccaggag 3120
gagattgact atgatgacac catctctgtg gagatgaaga aggaggactt tgacatctac 3180
gacgaggacg agaaccagag cccaggagc ttccagaaga agaccaggca ctacttcatt 3240
gctgctgtgg agaggctgtg ggactatggc atgagcagca gcccctatgt gctgaggaa 3300
aggggccagt ctggctctgt gcccagttc aagaaggtgg tgttccagga gttcactgat 3360
ggcagcttca cccagccct gtacagaggg gagctgaatg agcacctggg cctgctgggc 3420
ccctacatca gggctgaggt ggaggacaac atcatggtga cttcaggaa ccaggccagc 3480
aggccctaca gcttctacag cagcctgac agctatgagg aggaccagag gcagggggct 3540
gagcccagga agaactttgt gaagcccaat gaaaccaaga cctacttctg gaaggtgcag 3600
caccacatgg ccccccacaa ggatgagttt gactgcaagg cctgggccta cttctctgat 3660
gtggacctgg agaaggatgt gcactctggc ctgattggcc ccctgctggt gtgccacacc 3720
aacacctga accctgccc tggcaggcag gtgactgtgc aggagtttgc cctgttcttc 3780
accatctttg atgaaaccaa gagctggtac ttcactgaga acatggagag gaactgcagg 3840
ggcccctgca acatccagat ggaggacccc acctcaagg agaactacag gttccatgcc 3900
atcaatggct acatcatgga caccctgcct ggctggtga tggcccagga ccagaggatc 3960

```

```

aggtggtacc tgctgagcat gggcagcaat gagaacatcc acagcatcca cttctctggc 4020
catgtgttca ctgtgaggaa gaaggaggag tacaagatgg ccctgtacaa cctgtaccct 4080
ggggtgtttg agactgtgga gatgctgccc agcaaggctg gcatctggag ggtggagtgc 4140
ctgattgggg agcacctgca tgctggcatg agcacctgt tcctggtgta cagcaacaag 4200
tgccagaccc ccctgggcat ggcctctggc cacatcaggg acttccagat cactgcctct 4260
ggccagtatg gccagtgggc cccaagctg gccaggctgc actactctgg cagcatcaat 4320
gcctggagca ccaaggagcc cttcagctgg atcaaggctg acctgctggc ccccatgata 4380
atccatggca tcaagaccca gggggccagg cagaagttca gcagcctgta catcagccag 4440
ttcatcatca tgtacagcct ggatggcaag aagtggcaga cctacagggg caacagcact 4500
ggcaccctga tgggtgttctt tggcaatgtg gacagctctg gcatcaagca caacatcttc 4560
aaccccccca tcattgccag atacatcagg ctgcaccca cccactacag catcaggagc 4620
accctgagga tggagctgat gggtctgtac ctgaacagct gcagcatgcc cctgggcatg 4680
gagagcaagg ccatctctga tgcccagatc actgccagca gctacttcac caacatgttt 4740
gccacctgga gccccagcaa ggccaggctg cacctgcagg gcaggagcaa tgccctggagg 4800
ccccaggta acaaccccaa ggagtggctg cagggtggact tccagaagac catgaagggtg 4860
actgggggtga ccaccagggt ggtgaagagc ctgctgacca gcatgtatgt gaaggagttc 4920
ctgatcagca gcagccagga tggccaccag tggacctgt tcttcagaa tggcaagggtg 4980
aagggtgtcc agggcaacca ggacagcttc acccctgtgg tgaacagcct ggaccccccc 5040
ctgctgacca gatactgag gattcacccc cagagctggg tgcaccagat tgccctgagg 5100
atggagggtgc tgggctgtga ggcccaggac ctgtactgat cgcaataaa agatctttat 5160
tttcattaga tctgtgtgtt ggttttttgt gtgatgcagc ccaagctgta gataagtagc 5220
atggcggggt aatcattaac tacacccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc 5280
gctcgctcgc tactgaggc cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc 5340
ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgaga gagggagtgg ccaaagatcc gggcccgcat 5400
gcgtcgacaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta 5460
cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 5520
cccgcaccga tcgcccctcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgatgg catccatcac 5580
actggcggcc gctcgagcat gcatctagag ggccaattc gccctatagt gagtcgtatt 5640
acaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacceaac 5700
ttaatcgct tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca 5760
ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggacgcgc cctgtagcgg 5820
cgcattaagc gcggcggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc 5880
cctagcgccc gtccttttcg cttttctccc ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc 5940
ccgtcaagct ctaaatcggg ggtcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct 6000
cgaccccaaa aaacttgatt aggtgatgg ttacgtagt gggccatcgc cctgatagac 6060
ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac 6120
tggaacaaca ctcaacccta tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat 6180
ttcgccctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa 6240
aattcagggc gcaagggtg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 6300

```

cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 6360
 gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 6420
 ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc cctctggtaa ggttggaag 6480
 ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 6540
 agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 6600
 gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 6660
 atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc gtttcttttt 6720
 gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 6780
 tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga 6840
 agggactggc tgctattggg cgaagtgcg gggcaggatc tctgtcatc ccacctgtct 6900
 cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 6960
 gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagcacg tactcggatg 7020
 gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 7080
 gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat 7140
 ggcatgacct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac 7200
 tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggtac ccgtgatatt 7260
 gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgt tgctttacgg tatcgccgct 7320
 cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg aattgaaaaa 7380
 ggaagagtat gaggattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 7440
 gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 7500
 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt 7560
 ttgccccga agaactttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg 7620
 tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctc ccgcatacac tattctcaga 7680
 atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 7740
 gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga 7800
 caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 7860
 ctgcacctga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 7920
 ccacgatgcc ttagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc gaactactta 7980
 ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 8040
 ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc 8100
 gtgggtctcg cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 8160
 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga 8220
 taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt 8280
 agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 8340
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 8400
 aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcctgcaaa 8460
 caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt 8520
 ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc 8580
 cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa 8640

tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 8700
 gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 8760
 ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa 8820
 gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa 8880
 caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 8940
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat tttgtgatg ctctgcaggg gggcggagcc 9000
 tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg 9060
 ctcacatggt ctttcctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 9120
 agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 9180
 aagcggaag 9189

<210> 38

<211> 252

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合肝脏特异性启动子 (HLP)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (252)

<223> 杂合肝脏特异性启动子 (HLP)

<400> 38

tgtttctgctc ttgcaatggt tgccatttt aggggtggaca caggacgctg tggtttctga 60
 gccagggggc gactcagatc ccagccagtg gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac 120
 tggggtgacc ttggtaata ttcaccagca gcctcccccg ttgccctctt ggatccactg 180
 cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc tctcagctt caggcaccac cactgacctg 240
 ggacagtga tc 252

<210> 39

<211> 545

<212> DNA

<213> 智人

<400> 39

ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60
 tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120
 cactcgaccc cttggaattt cgggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt 180
 agtgtgagag gggaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca ctgcccaggc 240
 aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagccccgtg 300
 ttgtctctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatatcca ccagcagcct cccccgttgc 360
 ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct cagcttcagg 420
 caccaccact gacctgggac agtgaatccg gactctaagg taaatataaa atttttaagt 480

gtataatgtg ttaaactact gattctaatt gtttctctct tttagattcc aacctttgga 540
actga 545
<210> 40
<211> 342
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> tTH = 截断的酪氨酸羟化酶
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1) .. (342)
<223> tTH = 截断的酪氨酸羟化酶
<400> 40
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
 225 230 235 240
 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> 41

<211> 438

<212> DNA

<213> 智人

<400> 41

atgagcacgg aaggtggtgg ccgtcgctgc caggcacaag tgtccccgcc catctccttc 60
 agcgcgagcc accgattgta cagtaaattt ctaagtgatg aagaaaactt gaaactgttt 120
 gggaaatgca acaatccaaa tggccatggg cacaattata aagttgtggt gacagtacat 180
 ggagagattg accctgctac gggaatggtt atgaatctgg ctgatctcaa aaaatatatg 240
 gaggaggcga ttatgcagcc cttgatcat aagaatctgg atatggatgt gccatacttt 300
 gcagatgtgg tgagcacgac tgaaaatgta gctgtttata tctgggacaa cctccagaaa 360
 gttcttcctg taggagttct ttataaagta aaagtatacg aaactgacaa taatattgtg 420
 gtttataaag gagaatag 438

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物AA16

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (28)
<223> 引物AA16
<400> 42
ccaagctagc atggagaagg gccctgtg 28
<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA17
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (29)
<223> 引物AA17
<400> 43
ccaagctagc ggtcgactaa aaaacctcc 29
<210> 44
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA33
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (31)
<223> 引物AA33
<400> 44
ccaagctagc atgagccccg cggggccc aa g 31
<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA34
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (21)
<223> 引物AA34
<400> 45

ccaagctagc gggggatctt cgatgctaga c 31
<210> 46
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA43
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (60)
<223> 引物AA43
<400> 46
ccaatggcca actccatcac taggggttcc ttctagatgt ttgctgcttg caatgtttgc 60
<210> 47
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA44
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> 引物AA44
<400> 47
ccaagaattc gctagcgatt cactgtccca ggtcagtg 38
<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA57
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (33)
<223> 引物AA57
<400> 48
ccaagctagc tgtttgctgc ttgcaatggt tgc 33
<210> 49
<211> 43

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA67
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (43)
<223> 引物AA67
<400> 49
gatccttgct acgagcttga atgattcact gtcccaggtc agt 43
<210> 50
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物AA68
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (43)
<223> 引物AA68
<400> 50
actgacctgg gacagtgaat cattcaagct cgtagcaagg atc 43
<210> 51
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物RmiscTHext2
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (29)
<223> 引物RmiscTHext2
<400> 51
aaagctagct tcgatgctag acgatccag 29
<210> 52
<211> 5638
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 单顺反子递送质体TH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (5638)

<223> 单顺反子递送质体TH

<400> 52

```

gcgatcgcg  ctcccgacat  cttggaccat  tagctccaca  ggtatcttct  tccctctagt  60
ggtcataaca  gcagcttcag  ctacctetca  attcaaaaaa  cccctcaaga  cccgtttaga  120
ggccccaagg  gggtatgcta  tcaatcgttg  cgttacacac  acaaaaaacc  aacacacatc  180
catcttcgat  ggatagcgat  tttattatct  aactgctgat  cgagtgtagc  cagatctagt  240
aatcaattac  ggggtcatta  gttcatagcc  catatatgga  gttccgcgtt  acataactta  300
cggtaaattg  cccgcctggc  tgaccgccc  acgacccccg  cccattgacg  tcaataatga  360
cgtatgttcc  catagtaacg  ccaataggga  ctttccattg  acgtcaatgg  gtggagtatt  420
tacggtaaac  tgcccacttg  gcagtacatc  aagtgtatca  tatgccaaat  acgcccccta  480
ttgacgtcaa  tgacggtaaa  tggcccgct  ggcattatgc  ccagtacatg  accttatggg  540
actttcctac  ttggcagtac  atctacgtat  tagtcatcgc  tattaccatg  ctgatgcggt  600
tttggcagta  catcaatggg  cgtggatagc  ggtttgactc  acggggattt  ccaagtctcc  660
acccattga  cgtcaatggg  agtttgtttt  ggcacaaaaa  tcaacgggac  tttccaaaat  720
gtcgtaaaca  ctccgcccc  ttgacgcaa  tgggcggtag  gcgtgtacgg  tgggaggtct  780
atataagcag  agctggttta  gtgaaccgtc  agatcagatc  tttgtcgatc  ctaccatcca  840
ctcgacacac  ccgccagcta  gagatcccg  gaccatgagc  cccgcggggc  ccaaggtccc  900
ctggttccca  agaaaagtgt  cagagctgga  caagtgtcat  cacctgggtc  ccaagttcga  960
ccctgacctg  gacttggacc  accggggctt  ctcgaccag  gtgtaccgcc  agcgcaggaa  1020
gctgattgct  gagatcgctt  tccagtacag  gcacggcgac  ccgattcccc  gtgtggagta  1080
caccgccgag  gagattgcc  cctggaagga  ggtctacacc  acgctgaagg  gcctctacgc  1140
cacgcacgcc  tcgggggagc  acctggaggc  ctttgctttg  ctggagcgct  tcagcggcta  1200
ccgggaagac  aatatcccc  agctggagga  cgtctcccg  ttctgaagg  agcgcacggg  1260
cttccagctg  cggcctgtgg  ccggcctgct  gtccgcccgg  gacttcctgg  ccagcctggc  1320
cttccgcgtg  ttccagtgc  cccagtatat  ccgccacgcg  tctctgccc  tgactcccc  1380
tgagccggac  tgctgccacg  agctgctggg  gcacgtgccc  atgctggccg  accgcacctt  1440
cgcgcagttc  tcgcaggaca  ttggcctggc  gtccctgggg  gcctcggatg  aggaaattga  1500
gaagctgtcc  acgctgtact  ggttcacggg  ggagttcggg  ctgtgtaagc  agaacgggga  1560
gggtgaaggcc  tatggtgccg  ggctgctgtc  ctctacggg  gagctcctgc  actgcctgtc  1620
tgaggagcct  gagattcggg  cttcgaccc  tgaggtgctg  gccgtgcagc  cctaccaaga  1680
ccagacgtac  cagtcagtct  acttcgtgtc  tgagagcttc  agtgacgcca  aggacaagct  1740
caggagctat  gcctcacgca  tccagcgc  cttctccgtg  aagttcgacc  cgtacacgct  1800
ggccatcgac  gtgctggaca  gccccaggc  cgtgcggcgc  tccctggagg  gtgtccagga  1860
tgagctggac  acccttgccc  atgcgctgag  tgccattggc  taagacgcca  cctaataaac  1920
ctctggatta  caaaatttgt  gaaagattga  ctggtattct  taactatgtt  gctcctttta  1980

```

cgctatgtgg atacgtgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt 2040
 tcattttctc ctcttgtat aaatcctggg tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccc 2100
 ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgactg tgtttgctga cgcaaccccc actggttggg 2160
 gcattgccac cacctgtcag ctcttttccg ggactttcgc tttccccctc cctattgcc 2220
 cggcggaact catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca 2280
 ctgacaattc cgtgggtgtg tcggggaaat catcgctcct tcccatcttg actgactgag 2340
 atacagcgta ccttcagctc acagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca 2400
 caactagaat gcagtgaata aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat 2460
 ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt 2520
 ttcaggttca gggggagggtg tgggagggtt tttaaagcaa gtaaacctc tacaatgtg 2580
 gtattggccc atctctatcg gtatcgtagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt 2640
 gaggggtttt ttgtccccct cgggcccgat tgctatctac cggcattggc gcagaaaaa 2700
 atgcctgatg cgacgtgcg cgtcttatac tccacatat gccagattca gcaacggata 2760
 cggttcccc aacttgcca cttccatacg tgtctcctt accagaaatt tatecttaag 2820
 gtcgtcagct atcctgcagg cgatctctcg atttcgatca agacattcct ttaatggtct 2880
 tttctggaca ccactagggg tcagaagtag ttcacaaac tttcttcct ccctaattctc 2940
 attggttacc ttgggctatc gaaacttaat taaccagtca agtcagctac ttggcgagat 3000
 cgacttgtct gggtttcgac tacgtcaga attgcgtcag tcaagttcga tctggtcctt 3060
 gctattgcac ccgttctccg attacgagtt tcatttaaat catgtgagca aaaggccagc 3120
 aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc 3180
 ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaaccg acaggactat 3240
 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc 3300
 cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct 3360
 cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 3420
 aacccccgt tcagcccgc cgctgcgcct tatccggtta ctatcgtctt gagtccaacc 3480
 cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 3540
 ggtatgtagg cgggtgctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa 3600
 gaacagtatt tggatctgc gctctgtga agccagttac ctccgaaaa agagttggta 3660
 gctcttgatc cggcaaaaca accaccgtg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc 3720
 agattacgcg cagaaaaaaaa ggatectcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg 3780
 acgctcagtg gaacgaaaaac tcacgttaag ggattttgtt catgagatta tcaaaaagga 3840
 tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg 3900
 agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct 3960
 gtctatttcg ttcattccata gttgcattta aatttcgaa ctctccaagg ccctcgtcgg 4020
 aaaatcttca aacctttcgt ccgatccatc ttgcaggcta cctctcgaac gaactatcgc 4080
 aagtctcttg gccggccttg cgccttggtt attgcttggc agcgcctatc gccaggtatt 4140
 actccaatcc cgaatatccg agatcgggat caccgagag aagttcaacc tacatctca 4200
 atcccgatct atccgagatc cgaggaatat cgaaatcggg gcgcgcctgg tgtaccgaga 4260
 acgatcctct cagtgcgagt ctcgacgatc catatcgttg cttggcagtc agccagtcgg 4320

aatccagctt gggaccacagg aagtccaatc gtcagatatt gtactcaagc ctgggtcacgg 4380
cagcgtaccg atctgtttta acctagatat tgatagtctg atcgggtcaac gtataatcga 4440
gtcctagctt ttgcaaacat ctatcaagag acaggatcag caggaggctt tcgcatgagt 4500
attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt 4560
gctcaccacg aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgccgcgagt 4620
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa 4680
cgcttttcaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtatt 4740
gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 4800
tattcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 4860
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gattggagga 4920
ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atggggggatc atgtaactcg ctttgatcgt 4980
tggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 5040
gcaatggcaa caaccttgcg taaactatta actggcgaaac tacttactct agcttcccgg 5100
caacagttga tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcgcc 5160
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcgg 5220
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtat tcgtagttat ctacacgacg 5280
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 5340
attaagcatt ggtaaccgat tctaggtgca ttggcgcaga aaaaaatgcc tgatgcgacg 5400
ctgcgcgtct tatactccca catatgccag attcagcaac ggatacggct tcccactt 5460
gcccacttcc atacgtgtcc tccttaccag aaatttatcc ttaagatccc gaatcgttta 5520
aactcgactc tggctctatc gaatctccgt cgtttcgagc ttacgcgaac agccgtggcg 5580
ctcatttgct cgtcgggcat cgaatctcgt cagctatcgt cagcttacct ttttggca 5638

<210> 53

<211> 6431

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 双顺反子递送质体GCH1 PTPS

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (6431)

<223> 双顺反子递送质体GCH1 PTPS

<400> 53

gcgatcgagg ctcccacat cttggaccat tagctccaca ggtatcttct tccctctagt 60
ggtcataaca gcagcttcag ctacctetca attcaaaaaa cccctcaaga cccgtttaga 120
ggccccaagg gggtatgcta tcaatcgttg cgttacacac acaaaaaacc aacacacatc 180
catcttcgat ggatagcgat tttattatct aactgctgat cgagtgtagc cagatctagt 240
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 300
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccc aacgaccccc cccattgacg tcaataatga 360

cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 420
 tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt acgcccccta 480
 ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcatatgc ccagtacatg accttatggg 540
 actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg ctgatgcggt 600
 tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 660
 accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat 720
 gtcgtaacaa ctccgcccc a ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct 780
 atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatcagatc tttgtcgate ctaccatcca 840
 ctcgacacac ccgccagcaa tatggccaca accgcggccg tagatcccgg gaccatggag 900
 aagccgcggg gaggcaggtg caccaatggg ttctccgagc gggagctgcc gcggccccgg 960
 gccagcccg ctcgcgagaa gtcccgccg cccgaggcca agggcgcaaca gccggccgac 1020
 gcctggaagg cagggcggca ccgcagcgag gaggaaaacc aggtgaacct ccccaaactg 1080
 gcggctgctt actcgtccat tctgtctctg ctgggcgagg acccccagcg gcaggggctg 1140
 ctcaagacgc cctggagggc ggccaccgcc atgcagtact tcaccaaggg ataccaggag 1200
 accatctcag atgtcctgaa tgatgtata tttgatgaag atcatgacga gatggtgatt 1260
 gtgaaggaca tagatatgtt ctccatgtgt gagcatcacc ttgttccatt ttaggaagg 1320
 gtccatatgt gctatcttcc taacaagcaa gtccttggtc tcagtaaact tgccaggatt 1380
 gtagaaatct acagtagacg actacaagtt caagagcgcc tcaccaaaaca gattgcggtg 1440
 gccatcacag aagccttgca gcctgctggc gttggagtag tgattgaagc gacacacatg 1500
 tgcattgtaa tgcgaggcgt gcagaaaatg aacagcaaga ctgtcactag caccatgctg 1560
 ggcgtgttcc gggaagaccc caagactcgg gaggagtctc tcacactaat caggagctga 1620
 gactataggg tgggtattat gtgttcatca accatcctaa aaatacccgg taaacaggtg 1680
 cagccccaga tctgggcagc aggagggggc agtgggaagc ttaacgcgcc acgactatag 1740
 ggtgggtatt atgtgttcat caaccatcct aaaaataccc ggtaaacagg tgcagcccca 1800
 gatctgggca gcaggagggg gcagtgggaa gcttatctag tctcgaggta ccgagctctt 1860
 acgcgtgcta gctcgagatc tggatatcga ctatagggtg ggtattatgt gttcatcaac 1920
 catcctaaaa ataccggta aacaggtgca gcccagatc tgggcagcag gaggggcgag 1980
 tgggtctgtt ctatttttac cagccagttg ctgctggaca cagttttcat agcctcccct 2040
 cggctctgcc cctcacagtc tgcagtctac ggcgaggcac aggccagccc agctccacga 2100
 ggactgaaca agaagcttga tatcgaattg gtaccatcga ggaactgaaa aaccagaaag 2160
 ttaactggta agtttagtct ttttgtcttt tatttcaggt cccggatccg gtggtggtgc 2220
 aaatcaaaga actgctcctc agtggatata gcctttactt ctaggccacc atgagcgcg 2280
 cgggtgacct tcgtcgccgc gcgcgactgt cgcgcctcgt gtccttcagc gcgagccacc 2340
 ggctgcacag cccatctctg agcgatgaag agaacttaag agtgtttggg aaatgcaaca 2400
 atccgaatgg ccacgggcac aactataaag ttgtggtgac agtccatgga gagattgate 2460
 ctgttacagg aatggttatg aatttgaccg acctcaaaga atacatggag gaggccatca 2520
 tgaagcctct tgatcacaag aacctggacc tggatgtgcc gtactttgcg gatgctgtga 2580
 gcacgacaga aaatgtagct gtctacatct gggaaagcct ccagaaactt cttccagtgg 2640
 gagctcttta taaagtaaaa gtgtttgaaa ccgacaacaa catcgtagtc tataaaggag 2700

```

aatagtaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat tcttaactat 2760
gttgctcctt ttacgctatg tggatacgct gctttaatgc ctttgtatca tgctattgct 2820
tcccgtatgg ctttcatttt ctccctcctt tataaatcct ggttgctgtc tctttatgag 2880
gagttgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc 2940
cccactgggt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgctttcccc 3000
ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct 3060
cggctgttgg gcaactgaaa ttccgtgggt ttgtcgggga aatcatcgtc ctttcccatc 3120
ttgactgact gagatacagc gtaccttcag ctacacagaca tgataagata cattgatgag 3180
tttgacaaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat 3240
gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc 3300
attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtggggagg ttttttaaag caagtaaaac 3360
ctctacaaat gtggtattgg cccatcteta tcggtatcgt agcataacce cttggggcct 3420
ctaaacgggt cttagggggt tttttgtgcc cctcggggcg gattgctatc taccggcatt 3480
ggcgcagaaa aaaatgcctg atgcgacgct gcgcgtctta tactcccaca tatgccagat 3540
tcagcaacgg atacggcttc cccaacttgc ccacttccat acgtgtcttc cttaccagaa 3600
atttatcctt aaggtcgtca gctatcctgc aggcgatctc tcgatttcga tcaagacatt 3660
cctttaatgg tcttttctgg acaccactag gggtcagaag tagttcatca aactttcttc 3720
cctccctaata ctcatgggtt accttgggct atcgaaactt aattaaccag tcaagtcagc 3780
tacttggcga gatcgacttg tctgggtttc gactacgctc agaattgcgt cagtcaagtt 3840
cgatctggtc ctgctattg cacccttctt ccgattacga gtttcattta aatcatgtga 3900
gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 3960
aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 4020
ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct 4080
gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg 4140
ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg 4200
ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 4260
cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 4320
attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 4380
ggctacacta gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 4440
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 4500
gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 4560
tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga 4620
ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 4680
taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 4740
atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcat ttaaatttcc gaactctcca 4800
aggccctcgt cggaaaatct tcaaaccctt cgtccgatcc atcttgcagg ctacctctcg 4860
aacgaactat cgcaagtctc ttggccggcc ttgcgccttg gctattgctt ggcagcgctt 4920
atcgccaggt attactccaa tcccgaatat ccgagatcgg gatcacccga gagaagttca 4980
acctacatcc tcaatcccga tctatccgag atccgaggaa tatcgaaatc ggggcgcgcc 5040

```

tgggtgtaccg agaacgatcc tctcagtgcg agtctcgacg atccatatcg ttgcttggca 5100
gtcagccagt cggaatccag cttgggaccc aggaagtcca atcgtcagat attgtactca 5160
agcctgggtca cggcagcgtc ccgatctgtt taaacctaga tattgatagt ctgatcggtc 5220
aacgtataat cgagtcctag cttttgcaaa catctatcaa gagacaggat cagcaggagg 5280
ctttcgcatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg 5340
ccttcctgtt ttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 5400
gggtgcgcga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 5460
tcgccccgaa gaacgcttcc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt 5520
attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa 5580
tgacttgggt gagtattcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 5640
agaattatgc agtgctgcc aaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac 5700
aacgattgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgca aacatggggg atcatgtaac 5760
tcgcttgat cgttggggaa cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 5820
cacgatgcct gtagcaatgg caacaacctt gcgtaacta ttaactggcg aactacttac 5880
tctagcttcc cggcaacagt tgatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 5940
tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 6000
tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 6060
tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 6120
aggtgcctca ctgattaagc attggtaacc gattctaggt gcattggcgc agaaaaaat 6180
gcctgatgcg acgctgcgcg tcttatactc ccacatatgc cagattcagc aacggatacg 6240
gcttcccaa cttgccact tccatacgtg tctccttac cagaaattta tccttaagat 6300
cccgaatcgt ttaaactcga ctctggctct atcgaatctc cgtcgtttcg agcttacgcg 6360
aacagccgtg gcgctcattt gctcgtcggg catcgaatct cgtcagctat cgtcagctta 6420
cctttttggc a 6431

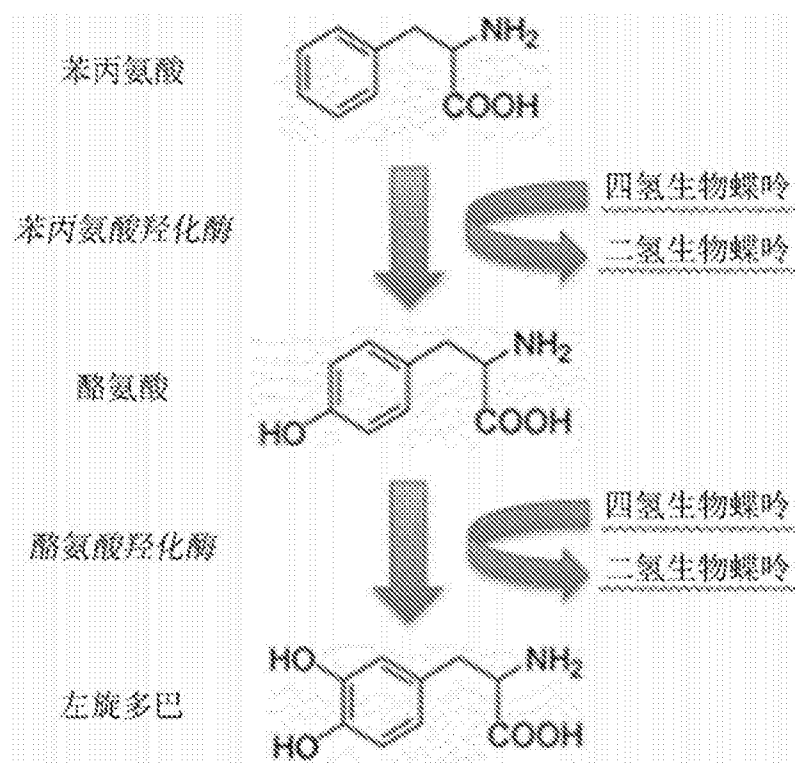


图1

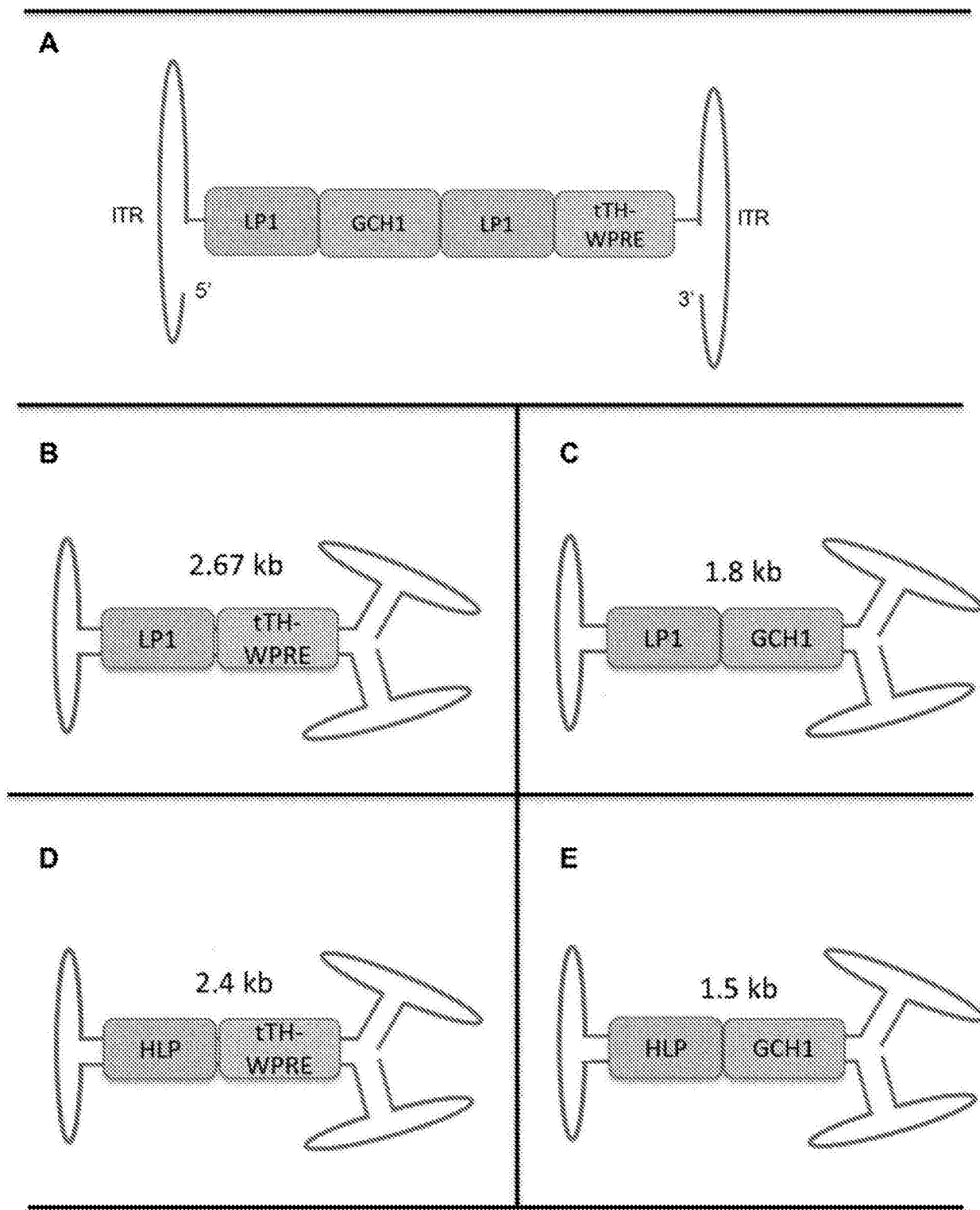


图2

A

分组	载体 (AAV2/8)	动物	剂量 (vg/小鼠)
1	-	6	-
2	scLP1-GCH1	6	3.51×10^{10}
	scLP1-tTH		3.51×10^{10}
3	scLP1-tTH	6	7.02×10^{10}

B

分组	载体 (AAV2/8)	动物	剂量 (vg/小鼠)
1	scHLP-tTH	2	3.60×10^{12}
2	scHLP-GCH1	2	1.80×10^{12}
	scHLP-tTH		1.80×10^{12}

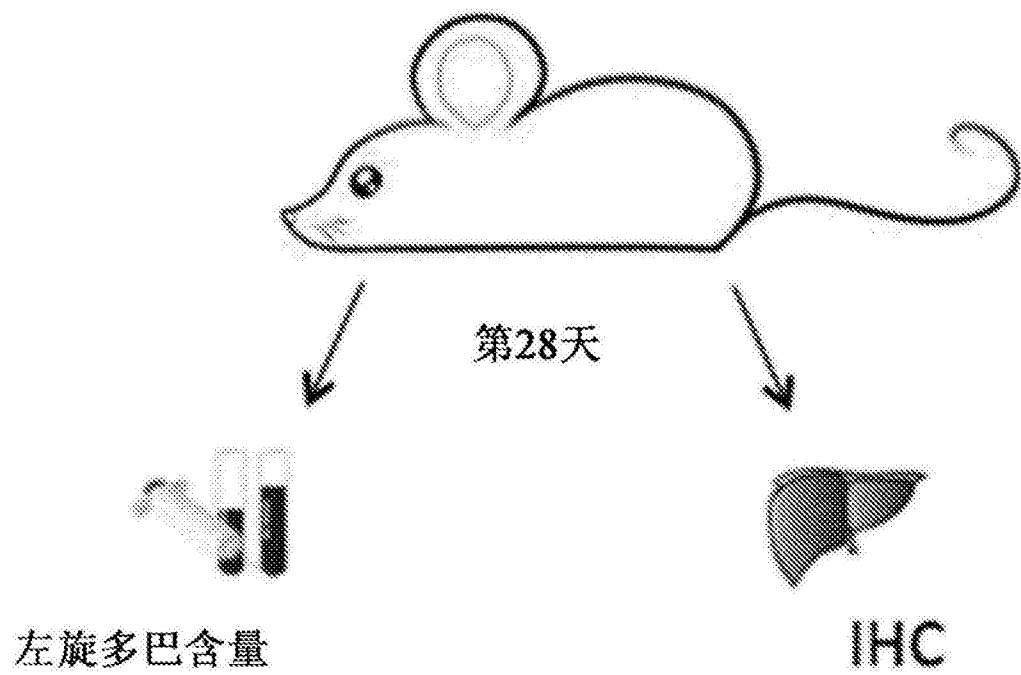
C

图3

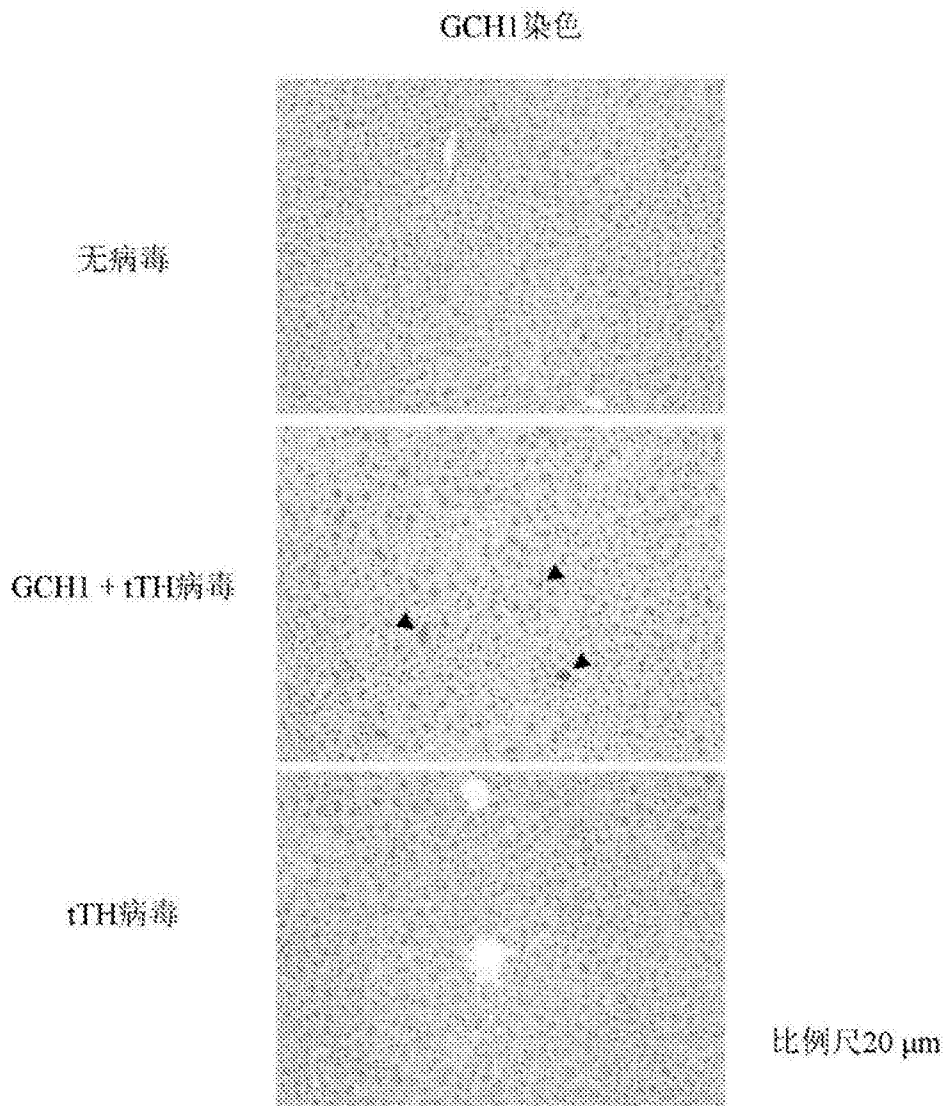


图4A

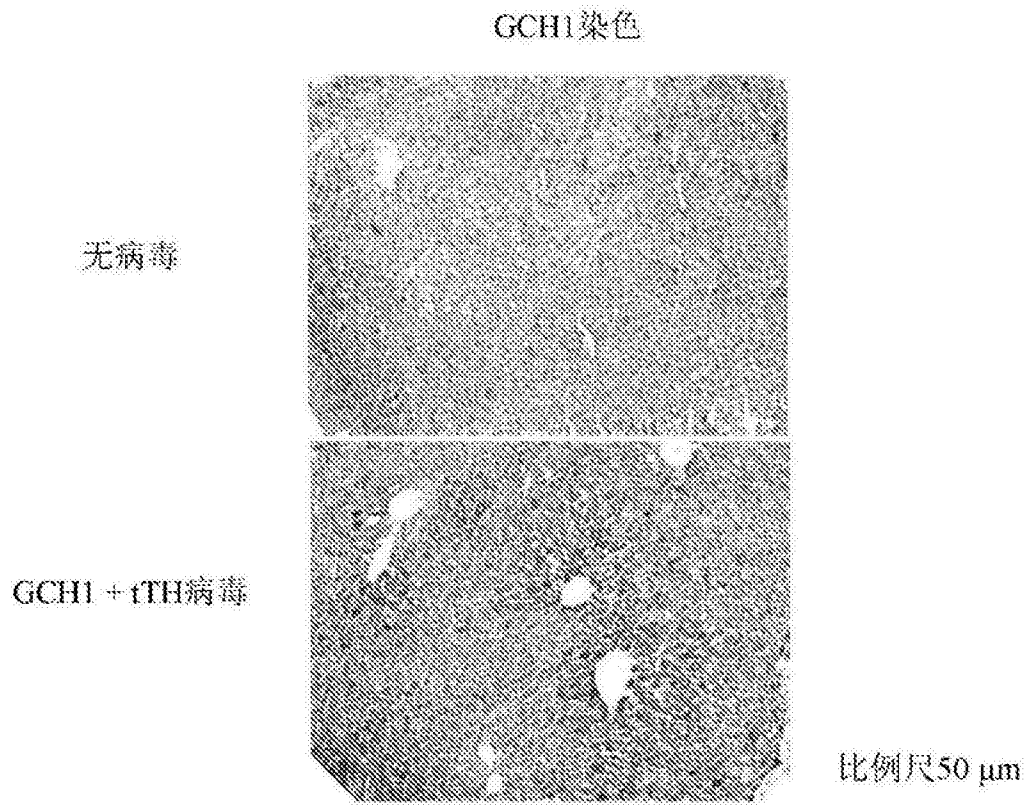


图4B

A)

分组	n	载体 (scAAV2/8)	剂量 (vg)	左旋多巴 ($\mu\text{g/ml}$)
A	6	无病毒	-	0.149 ± 0.04
B	6	LP1-tTH	3.51×10^{10}	0.157 ± 0.02
		LP1-GCH1	3.51×10^{10}	
C	6	LP1-tTH	7.02×10^{10}	0.170 ± 0.02
D	2	HLP-tTH	3.6×10^{12}	0.298
E	2	HLP-GCH1	1.8×10^{12}	0.303
		HLP-tTH	1.8×10^{12}	

B)

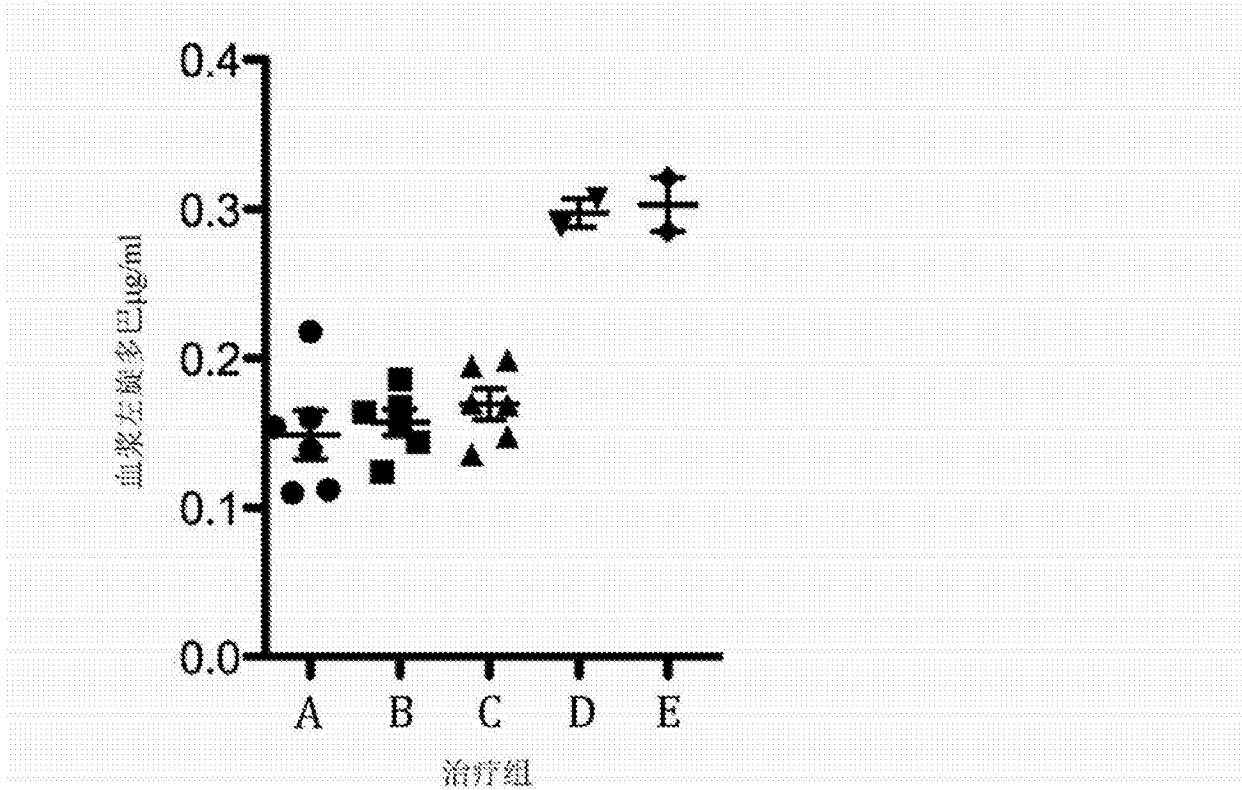
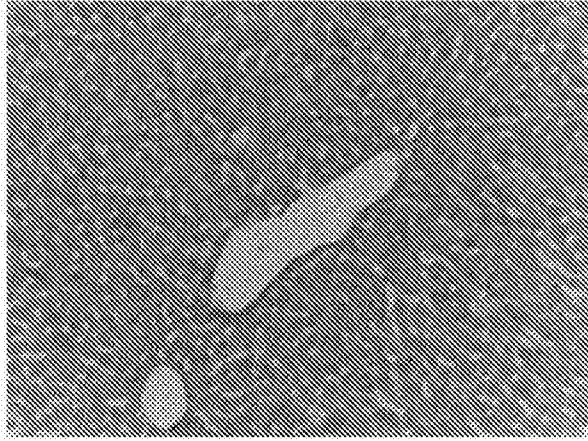
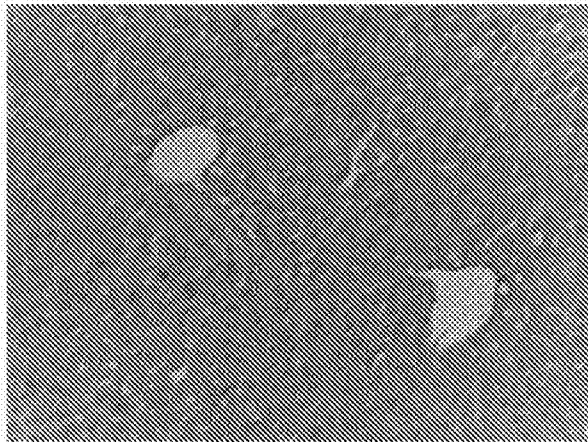


图5

无病毒



GCHI + tTH病毒



tTH病毒

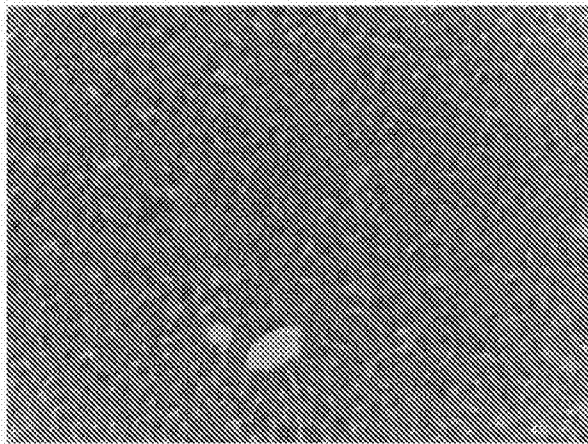


图6

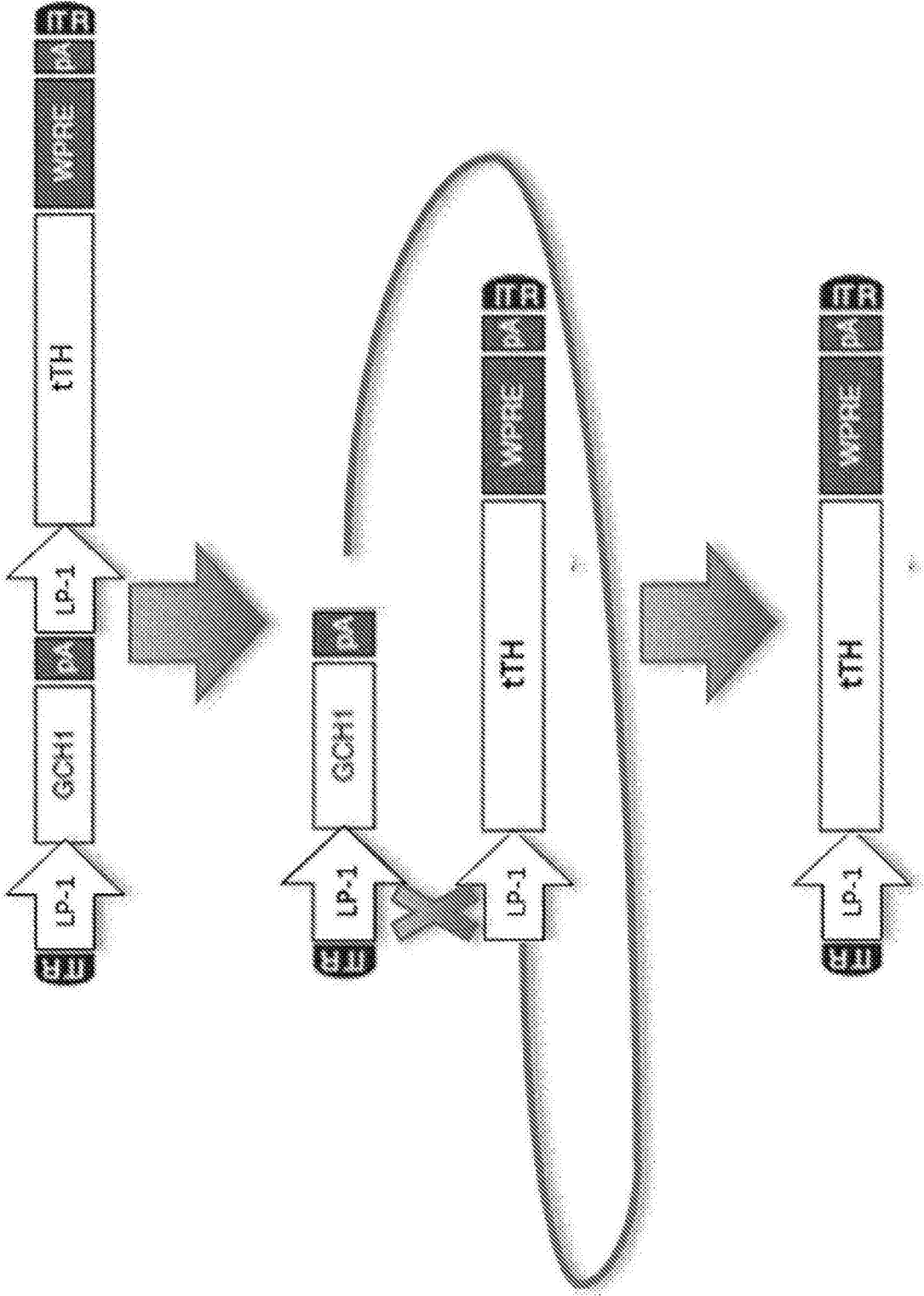


图7

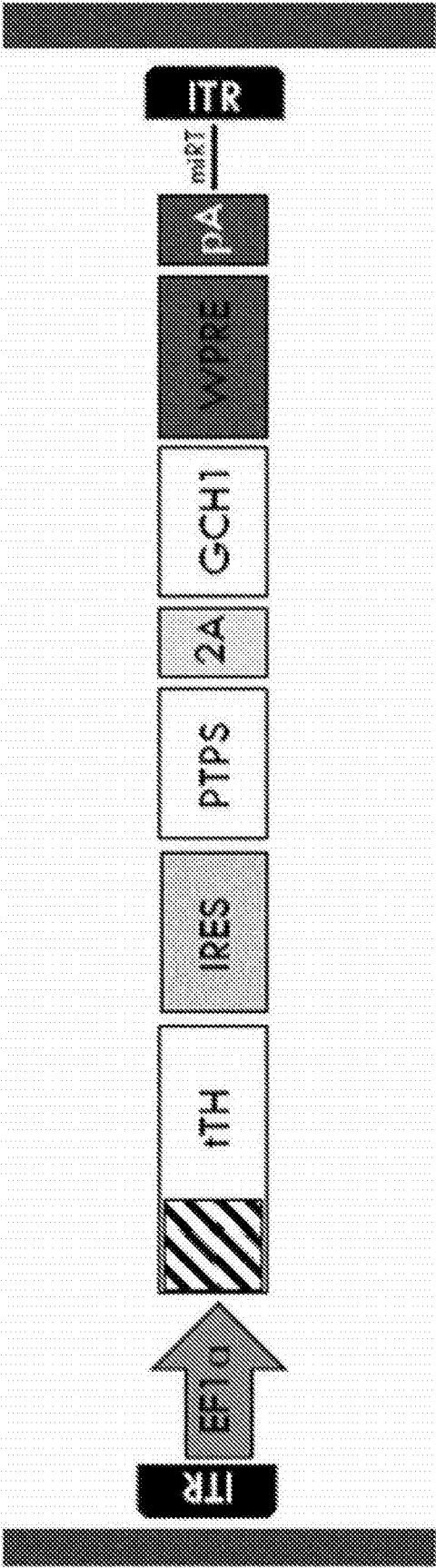


图8