

用于治疗帕金森病的基因治疗载体及其用途

技术领域

本申请涉及基因治疗领域，具体涉及用于治疗帕金森病的基因治疗载体和组合物。

背景技术

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病。PD患者以黑质区多巴胺能神经元丢失为特征。多巴胺能神经元主要是一类能产生多巴胺的神经元，能将神经冲动信号传递至纹状体，而纹状体主要控制骨骼肌的运动，因此多巴胺合成的减少导致了机体的运动障碍。患者的主要临床表现为：运动迟缓、肌强直、静止性震颤、姿势步态异常等。PD影响全球约1%的55岁以上的人群，随着社会步入老年化，患者群体还会持续扩大。

帕金森病的常见治疗方法是口服给药多巴胺的前体—左旋多巴，该药物在治疗早期病情缓解效果较好，但是随着治疗“蜜月期”的结束，左旋多巴会导致多种运动并发症。而多巴胺激动剂类药物虽能一定程度缓解症状，但长期使用会导致消化道反应和精神症状等不良反应。手术治疗虽能改善症状，但不能根治疾病，术后仍需应用药物治疗，也可能带来相关并发症，如舌头和手的麻痹、辨距不清和意识不清等症状，也存在一定局限性。

基因治疗对于帕金森病治疗具有独特优势，一方面是将相关基因通过载体导入病灶部位，对靶点区域的细胞进行修复、补偿和校正，以恢复相关区域正常生理功能。主要是通过导入神经营养因子(包括胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、Neurturin和脑源性神经营养因子(BDNF))促进和保护相关神经元的存活。但是，多数PD患者发病时大量的多巴胺神经元丢失，因此，通过提升患者相关神经核团对多巴胺的合成可能是治疗该疾病的关键。多巴胺的合成主要由以下几个酶参与：酪氨酸羟化酶(TH)、芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)和GTP-环化水解酶1(GCH1)。酪氨酸经过酪氨酸羟化酶(TH)催化合成左旋多巴，随后芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)将左旋多巴转化为多巴胺。TH需要由四氢生物蝶呤作为辅酶，而四氢生物蝶呤由GTP-环化水解酶1(GCH1)催化合成。因此，表达TH、AADC和GCH1可以高效合成多巴胺。

目前处于研发阶段的以多巴胺合成酶为靶点的帕金森病基因治疗策略，

- 是采用慢病毒载体携带包含TH、GCH1和AADC的表达载体导入病灶部位，依靠高效表达的TH、GCH1及AADC来提高中脑纹状体部位的局部多巴胺有效浓度，用于治疗帕金森病。英国的Oxford Biomedica和美国的Axovant Gene Therapy联合开发的以多巴胺合成酶为靶点的帕金森病基因治疗在研药
- 5 AXO-Lenti-PD(OXB-102)就是采用的这种策略。目前该在研药处于临床 I/II 期研究阶段，动物及临床试验数据证据证明该药可以有效的提高中脑纹状体的局部多巴胺，并且改善相关帕金森病症状，长期药效学研究尚在调查中。然而，慢病毒包装的三基因载体在体内神经细胞中转导效率低，多巴胺合成效率低，导致临床前模型动物药效和临床药效未获得大幅改善。
- 10 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体隶属于细小病毒科依赖病毒属，是一类微小、无被膜的线性单链DNA病毒。因其转染效率高，安全性高，已成为目前基因治疗中应用最广泛的病毒载体之一。由于AAV载体的包装载量局限性，只能够包装4.7kb以内的DNA片段，目前国际上还未报道由AAV包装三个基因来表达多巴胺合成酶以治疗帕金森病的临床试验
- 15 进展。美国公司Voyager Therapeutics以AAV2-hAADC作为载体，将其颅内注射至病人的壳核区域以高效表达AADC，通过提高左旋多巴转变成多巴胺的效率来实现治疗帕金森病的目的。然而，这种治疗策略依旧需要依靠患者摄入多巴胺前体药物来实现，改变不了患者长期对美多芭等多巴胺前体药物的依赖。
- 20 目前迫切需要一种优化的治疗帕金森病的基因治疗载体。

## 发明概述

- 针对现有治疗技术的不足，本发明提供了包含编码合成多巴胺的三种关键酶——酪氨酸羟化酶(TH)、芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)和GTP-环化水解
- 25 酶1(GCH1)的AAV载体，其中TH、GCH1和AADC中的任意一种或多种是野生型或其功能性变体的截短形式，并且编码三种酶的核酸序列以多种排列顺序和连接方式串联。本发明突破了AAV载体包装三个目的基因的难点，通过不断的构建体优化，截取目的基因的功能区域，从而减少三个基因串联后片段大小，满足AAV载体包装需求。本发明的AAV载体在递送至小鼠脑
- 30 内神经细胞后能够有效提高多巴胺合成效率，并且在帕金森病大鼠模型中达到接近功能性治愈的优异的治疗效果。

相应地，在第一方面，本发明提供了 AAV 载体，其包含编码酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶 1(GCH1)和芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核酸序列，其中编码 TH、GCH1 和/或 AADC 的核酸序列通过编码接头的核酸序列符合读码框地连接，其中，所述 TH、GCH1 和 AADC 中的任意一种或多种是野生型或其功能性变体的截短形式且具有多巴胺合成通路中所需的催化活性。

在一些实施方案中，本发明的 AAV 载体编码的 TH 是野生型 TH 或其功能性变体的截短形式且具有催化酪氨酸合成左旋多巴的活性。在一些实施方案中，TH 包含 330 至 390 个氨基酸残基。在一些实施方案中，TH 包含 330 至 380、330 至 370、330 至 360、330 至 350、330 至 340、335 至 340、335 至 380、340 至 380、350 至 380、360 至 380 或 370 至 380 个氨基酸残基。在一些优选的实施方案中，TH 包含 330 至 340 个氨基酸残基。在一些更优选的实施方案中，TH 包含 335 至 340 个氨基酸残基，例如，335、336、337、338、339 或 340 个氨基酸残基。

在一些实施方案中，TH 包含与 SEQ ID NO: 11 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，GCH1 包含与 SEQ ID NO: 9 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，AADC 包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，连接 TH、GCH1 和/或 AADC 的接头包括融合接头、2A 肽类接头和/或内部核糖体进入位点(IRES)。

在一些实施方案中，融合接头为肽接头。在一些实施方案中，肽接头选自(GGS)<sub>n</sub>、(GGGS)<sub>n</sub>或(GGGGS)<sub>n</sub>，其中 n 为 1 至 5 的整数。在一些优选的实施方案中，融合接头为(GGGGS)<sub>3</sub>。

在一些实施方案中，2A 肽类接头包含选自以下的 2A 肽：口蹄疫病毒 2A 肽(F2A)、猪捷申病毒 2A 肽(P2A)、Thosea asign 病毒 2A 肽(T2A)和/或马鼻病毒 2A 肽(E2A)。在一些实施方案中，2A 肽类接头的 N 末端和/或 C 末端还包含 GSG 氨基酸序列，优选 N 末端包含 GSG 氨基酸序列。在一些优选的实施方案中，2A 肽类接头包含与 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 15 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性

的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明的 AAV 载体中编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列从上游至下游以选自以下任一项的顺序排列：

- (1) TH、GCH1、AADC;
- (2) AADC、GCH1、TH;
- (3) AADC、TH、GCH1;
- (4) GCH1、TH、AADC;
- (5) GCH1、AADC、TH; 或
- (6) TH、AADC、GCH1。

10 在一些实施方案中，本发明的 AAV 载体中编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列从上游至下游以选自以下任一项的方式连接：

- 1) TH-F2A-GCH1-P2A-AADC;
- 2) GCH1-P2A-TH-P2A-AADC;
- 3) GCH1-P2A-AADC-P2A-TH;
- 15 4) AADC-E2A-GCH1-(G4S)3-TH;
- 5) GCH1-F2A-TH-F2A-AADC;
- 6) AADC-(G4S)3-TH-T2A-GCH1;
- 7) AADC-(G4S)4-TH-T2A-GCH1;
- 8) AADC-P2A-GCH1-P2A-TH;
- 20 9) AADC-T2A-GCH1-(G4S)3-TH;
- 10) GCH1-F2A-TH-P2A-AADC;
- 11) GCH1-F2A-AADC-F2A-TH;
- 12) AADC-(G4S)3-GCH1-F2A-TH;
- 13) GCH1-E2A-TH-T2A-AADC;
- 25 14) GCH1-F2A-AADC-P2A-TH;
- 15) AADC-(G4S)3-GCH1-P2A-TH;
- 16) AADC-(G4S)5-GCH1-P2A-TH;
- 17) TH-(G4S)3-GCH1-P2A-AADC;
- 18) GCH1-T2A-AADC-E2A-TH;
- 30 19) AADC-(G4S)3-GCH1-T2A-TH;
- 20) GCH1-E2A-TH-P2A-AADC;

- 21) AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1-E2A-TH;  
22) GCH1-E2A-AADC-P2A-TH;  
23) AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH;  
24) GCH1-T2A-TH-E2A-AADC;  
5 25) GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH-T2A-AADC;  
26) GCH1-(G4S)<sub>2</sub>-TH-T2A-AADC;  
27) GCH1-P2A-AADC-T2A-TH;  
28) TH-P2A-GCH1-P2A-AADC;  
29) TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1-T2A-AADC;  
10 30) GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH-E2A-AADC;  
31) GCH1-T2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
32) TH-P2A-GCH1-F2A-AADC;  
33) GCH1-F2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
34) TH-F2A-GCH1-F2A-AADC;  
15 35) TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1-E2A-AADC;  
36) TH-G4S-GCH1-E2A-AADC;  
37) GCH1-P2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
38) AADC-F2A-GCH1-P2A-TH;  
39) TH-T2A-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
20 40) GCH1-E2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
41) TH-E2A-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
42) TH-T2A-GCH1-E2A-AADC;  
43) AADC-F2A-GCH1-F2A-TH;  
44) TH-F2A-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
25 45) GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
46) TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1-F2A-AADC;  
47) TH-E2A-GCH1-T2A-AADC;  
48) AADC-P2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
49) TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-AADC;  
30 50) AADC-F2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
51) TH-F2A-AADC-F2A-GCH1;

- 52) TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC-T2A-GCH1;  
53) TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC-E2A-GCH1;  
54) AADC-P2A-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH;  
55) TH-F2A-AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
5 56) AADC-F2A-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH;  
57) TH-P2A-AADC-F2A-GCH1;  
58) TH-P2A-AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
59) GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH-P2A-AADC;  
60) TH-T2A-AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
10 61) TH-T2A-AADC-E2A-GCH1;  
62) GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH-F2A-AADC;  
63) TH-E2A-AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
64) AADC-E2A-GCH1-T2A-TH;  
65) GCH1-P2A-TH-F2A-AADC;  
15 66) TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
67) TH-E2A-AADC-T2A-GCH1;  
68) GCH1-P2A-AADC-F2A-TH;  
69) AADC-T2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
70) AADC-T2A-GCH1-E2A-TH;  
20 71) TH-F2A-AADC-P2A-GCH1;  
72) AADC-E2A-TH-(G4S)<sub>3</sub>-GCH1;  
73) AADC-P2A-GCH1-F2A-TH;  
74) TH-(G4S)<sub>3</sub>-AADC-F2A-GCH1;  
75) AADC-P2A-TH-F2A-GCH1;  
25 76) AADC-(G4S)<sub>3</sub>-TH-P2A-GCH1;  
77) AADC-T2A-TH-E2A-GCH1;  
78) AADC-(G4S)<sub>3</sub>-TH-E2A-GCH1;  
79) AADC-E2A-TH-T2A-GCH1; 或  
80) AADC-(G4S)<sub>3</sub>-TH-F2A-GCH1。

- 30 在一些优选的实施方案中, 本发明的 AAV 载体包含与 SEQ ID NO: 19-  
21 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%

或 100%同一性的核酸序列。

在一些实施方案中,本发明的 AAV 载体还包含可操作地连接至编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列的启动子。在一些实施方案中,启动子选自: CBH 启动子、嵌合型突触蛋白 I(Synapsin I)启动子、CMV 启动子、CAG 启动子、CAGG 启动子或 CASI 启动子。在一些实施方案中,启动子包含与 SEQ ID NO: 1-6 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。在一些优选的实施方案中,启动子包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的核酸序列。在一些更优选的实施方案中,启动子包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。

10 在一些实施方案中,本发明的 AAV 载体还包含选自 KOZAK 序列、SV40 病毒的聚腺苷酸化信号(SV40 poly A)和反向末端重复(ITR)的一个或多个元件。

在第二方面,本发明提供了 AAV 病毒颗粒,其包含根据本发明第一方面的 AAV 载体,以及衣壳蛋白。在一些实施方案中,AAV 病毒颗粒的衣壳蛋白来源于选自以下血清型的 AAV: AAV5、AAV9、AAVPHP.eB、AAVPHP.S 或 AAVPHP.B。在一些实施方案中,衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 33-37 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中,衣壳蛋白包含选自 SEQ ID NO: 34 或 37 所示的氨基酸序列。在一些更优选的实施方案中,衣壳蛋白包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

20 在第三方面,本发明提供了组合物,其包含本发明第一方面的 AAV 载体和编码衣壳蛋白的包装质粒,以及任选的辅助质粒。

在一些实施方案中,包装质粒还包含编码 Rep 蛋白的核酸序列,其中 Rep 蛋白来源于具有 AAV2 或 AAVPHP.B 血清型的 AAV。在一些实施方案中,Rep 蛋白包含与 SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 46 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中,Rep 蛋白包含与 SEQ ID NO: 46 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中,组合物中的包装质粒包含与 SEQ ID NO: 24-28、48 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%

或 100%同一性的核酸序列。在一些优选的实施方案中，包装质粒包含选自 SEQ ID NO: 25 或 28 所示的核酸序列。在一些更优选的实施方案中，包装质粒包含 SEQ ID NO: 25 所示的核酸序列。

5 在一些实施方案中，辅助质粒包含与 SEQ ID NO: 29 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的核酸序列。

在一些实施方案中，组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在第四方面，本发明提供了包含本发明第二方面的 AAV 病毒颗粒，以及任选的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。

10 在关于本发明第三方面和第四方面的组合物的实施方案中，药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂为缓冲剂。在一些实施方案中，缓冲剂中包含磷酸缓冲液、氯化钠和 F68 表面活性剂(也称为泊洛沙姆 188、Poloxamer 188)。

在一些实施方案中，磷酸缓冲液为磷酸钠缓冲液或磷酸钾缓冲液。在一些优选实施方案中，磷酸缓冲液为磷酸钠缓冲液。

15 在一些实施方案中，缓冲剂的 pH 为 6.5-8，例如 pH 为 6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8 或 7.9。在一些优选的实施方案中，缓冲剂中包含 5-15mM 磷酸缓冲液、130-170 mM 氯化钠和 0.0005%-0.002% F68 表面活性剂。例如，在缓冲剂中，磷酸缓冲液的浓度可以为 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15mM；氯化钠的浓度可以为 130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、20 146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169 或 170 mM；F68 表面活性剂的含量可以为 0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.0011%、0.0012%、0.0013%、0.0014%、0.0015%、0.0016%、0.0017%、0.0018%、0.0019%、0.002%。

25 在一些实施方案中，缓冲剂中包含 10mM 磷酸钠缓冲液、150mM 氯化钠和 0.001% F68 表面活性剂，pH 为 7.4。

在第五方面，本发明提供了细胞，其包含根据本发明第一方面的 AAV 载体、第二方面的 AAV 病毒颗粒、第三方面或第四方面的组合物。

30 在一些实施方案中，所述细胞为神经细胞，按功能区分，所述神经细胞选自：抑制性神经元(优选地，所述细胞为中棘神经元、中间神经元)、兴奋性神经元(优选地，所述细胞为多巴胺能神经元)、小神经胶质细胞、星形胶

质细胞、少突胶质细胞或施旺细胞。在一些优选的实施方案中,按脑区分,所述细胞为中脑纹状体神经元和胶质细胞。

在第六方面,本发明提供了根据本发明第一方面的 AAV 载体、第二方面的 AAV 病毒颗粒、第三方面或第四方面的组合物以及第五方面的细胞在制备用于预防和/或治疗受试者多巴胺缺陷引起的疾病的药物中的用途。在一些实施方案中,疾病为帕金森病。

#### 附图说明

图 1 显示了本发明使用的不同 AAV 载体的结构示意图。

图 2 显示了 pAAV-MCS-CBH-SV40 质粒图谱。MCS 代表多克隆位点。

图 3 显示了利用 Western Blot 检测的 AAV9-CBH-TFPGD 病毒转导 293T 细胞后细胞内目的蛋白的表达情况。AADC 为芳香族氨基酸脱羧酶, GCHI 为 GTP-环化水解酶 1, TH 为酪氨酸羟化酶, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(作为内参)。对照病毒为 AAV9-CBH-EGFP。

图 4 显示了 AAV-CBH-TFPGD 载体在体外条件下感染 293T 细胞 72h 后细胞上清中多巴胺的浓度。误差线代表标准误(SEM), 对照病毒为 AAV9-CBH-EGFP, DA 代表多巴胺。使用单因素方差分析进行统计分析, \*\*\*:  $p < 0.005$ 。

图 5 显示了不同 AAV 载体在小鼠体内介导的多巴胺合成效率。误差线代表标准误(SEM), 对照病毒为 AAV9-CBH-EGFP, DA 代表多巴胺, HVA 代表多巴胺代谢产物高香草酸。使用单因素方差分析进行统计分析, ns 代表无显著性差异, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图 6 显示了具有不同血清型的 AAV 载体在小鼠体内介导的多巴胺合成效率。误差线代表标准误(SEM), DA 代表多巴胺, HVA 代表多巴胺代谢产物高香草酸。使用双尾 t 检验进行显著性分析, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ 。

图 7 显示了包含不同启动子的 AAV 载体在小鼠体内介导的多巴胺合成效率。误差线代表标准误(SEM), DA 代表多巴胺, HVA 代表多巴胺代谢产物高香草酸。使用双尾 t 检验进行显著性分析, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ 。

图 8 显示了包含不同接头的 AAV 载体在小鼠体内介导的多巴胺合成效率。

率。误差线代表标准误(SEM), DA 代表多巴胺。使用单因素方差分析进行统计分析, ns 代表无显著性差异, \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图 9 显示了不同 AAV 载体在帕金森病大鼠模型中的药效。折线图代表不同给药组 APO 诱导旋转速度(r/min), 误差线代表标准误(SEM)。各剂量给药组分别与安慰剂组进行对比, 使用单因素方差分析进行统计分析, \*\*\*:  $p < 0.001$ 。

图 10 显示野生型 C57/B6 小鼠在接受 AAV 病毒颗粒与缓冲体系组合物的注射后, 小鼠纹状体的尼氏染色图片。

## 10 发明详述

本发明提供了 AAV 载体、AAV 病毒颗粒或组合物, 其可以用于对帕金森病等以多巴胺缺陷为特征的疾病的高效基因治疗。具体地, 本发明提供了包含一系列构建体的 AAV 载体, 将功能性酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶 1(GCH1)、芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)三个蛋白以接头连接, 然后克隆至 AAV 表达载体中。其中, TH、GCH1 和 AADC 中的任意一种或多种是野生型或其功能性变体的截短形式且具有多巴胺合成通路中所需的催化活性。优选地, TH 为野生型 TH 的截短形式, 并且其保留了野生型 TH 的功能。

与现有技术相比, 本发明至少具有如下优点:

1. 本发明的 AAV 载体在体外 293T 细胞内的基因转导效率显著提高, 目的蛋白表达水平和多巴胺及其代谢产物水平均有显著增加;
2. 本发明的包含不同构建体的 AAV 载体在体内神经细胞内的基因转导效率均显著提高, 多巴胺及其代谢产物水平均有显著增加;
3. 本发明的具有不同血清型的 AAV 病毒颗粒均能成功转导小鼠脑内神经细胞, 并且细胞内多巴胺及其代谢产物水平均有显著增加;
4. 本发明的包含不同启动子的 AAV 载体均能成功转导小鼠脑内神经细胞, 并且细胞内多巴胺及其代谢产物水平均有显著增加;
5. 本发明的包含不同接头的 AAV 载体均能成功转导小鼠脑内神经细胞, 并且细胞内多巴胺及其代谢产物水平均有显著增加;
6. 本发明的 AAV 载体能够显著改善帕金森病大鼠模型的运动能力, 相较于用于治疗帕金森病的慢病毒载体药物 Prosavin (Mimoun Azzouz, et al. The

Journal of Neuroscience, 2002, 22(23):10302–10312), 本发明的 AAV 载体在大鼠中药效结果有明显提高, 并且本发明的 AAV 载体在药效模型中体现出明显的量效关系;

7. 本发明打破技术瓶颈, 在 AAV 上搭载了三个基因的同时实现了基因转导效率显著提高, 目的蛋白表达水平和多巴胺及其代谢产物水平均有显著增加, 且不受启动子、血清型、基因顺序、接头的限制。

下文将更全面地描述根据本发明的一些实施方案。然而, 本发明的各方面可以以不同的形式来体现, 并且不应被解释为限于本文所阐述的实施方案。相反, 提供这些实施方案是为了使本发明透彻和完整, 并且将向本领域技术人员充分传达本发明的范围。在本文的描述中使用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的, 而不是旨在限制。

除非另有定义, 否则本文所用的所有术语(包括技术和科学术语)具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。还应当理解, 诸如在常用词典中定义的那些术语应当被解释为具有与它们在本申请和相关领域的上下文中的含义一致的含义, 并且不应当以理想化或过于正式的意义来解释, 除非在此明确地定义。

除非明确地指出, 否则在本文所述的本发明的各种特征可以以任何组合使用。此外, 本发明还预期在实施方案中, 可以排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。

除非明确地指出, 否则所有指定的一些实施方案、特征和术语旨在包括所叙述的实施方案、特征或术语以及它们的生物学等同物。

本文引用的所有参考文献、文章、出版物、专利公布和专利申请出于所有目的以引用方式整体并入。然而, 本文引用的任何参考文献、文章、出版物、专利公布和专利申请的提及不得且不应被视为承认或以任何形式表明它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家公知常识的一部分。

## 定义

除非另有说明, 本发明的实施将采用有机化学、药理学、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组 DNA 的常规技术, 这些技术在本领域的技术范围内。参见, 例如, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版 (1989); Current Protocols In Molecular Biology(F.M.Ausubel 等编辑, (1987)); the series Methods in

Enzymology(Academic Press,Inc.):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames 和 G.R.Taylor 编辑(1995)), Harlow 和 Lane 编辑, (1988)Antibodies,a Laboratory Manual,and Animal Cell Culture(RI.Freshney, 编(1987))。

- 5 如本文所用,术语“包括”、“包含”、“具有”旨在表示载体、组合物或方法包括所述的要素,但不排除其他要素。

如本文所用,“和/或”是指并且包括相关联的所列项目中的一个或多个项目的任意和所有可能组合。例如,组合物包含 A 和/或 B 可以解释为组合物包含 A、组合物包含 B 或组合物包含 A 和 B。

- 10 所有的数字名称,例如 pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围,都是近似值,其以 1.0 或 0.1 的增量适当地,或以+/-15%、10%、5%、2%的变化可选地改变(+)或(-)。应当理解,所有的数字名称前面都有术语“约”。还应理解,本文所述的试剂仅是示例性的,并且其等同物是本领域已知的。当涉及可测量值如量或浓度等时,本文所用的术语“约”是指包括指定量的 20%、  
15 10%、5%、1%、0.5%或 0.1%之内的变化。

本文所用的术语“可接受的”、“有效的”或“足够的”当用于描述任何组分、范围、剂型等的选择时意指所述组分、范围、剂型等适用于所公开的目的。

- 如本文所用,术语“核酸序列”、“核苷酸序列”和“多核苷酸”可以互  
20 换使用,并且指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此,该术语包括但不限于单链、双链或双链 DNA 或 RNA、基因组 DNA、cDNA、DNA-RNA 杂交体或包含、由或基本上由嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基组成的聚合物。

- 25 术语“蛋白质”、“肽”、“多肽”和“氨基酸序列”可以互换使用,并且在最广泛的意义上是指两个或更多个氨基酸亚基、氨基酸类似物或肽模拟物的聚合形式。“蛋白质”、“肽”、“多肽”和“氨基酸序列”含有至少两个氨基酸,并且对氨基酸的最大数目没有限制。本文所用术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括 D 和 L 光学异构体和氨基酸类似物

- 30 “同源性”或“同一性”是指两个多肽之间或两个核酸序列之间的序列相似性。同一性百分比可以通过比较每个序列中的位置来确定,所述序列可

以为了比较的目的而比对。当被比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时，则分子在该位置是相同的。序列之间的同一性程度取决于共享的匹配位置数目。“无关”或“非同源”序列与本发明的序列之一共享小于 40% 的同一性、小于 25% 的同一性。通过将核酸或氨基酸序列导入 ClustalW(可从  
5 <https://genome.jp/tools-bin/clustalw/> 获得)并使用该 ClustalW，可以确定本文提供的核酸或氨基酸序列的比对和序列同一性百分比。

当涉及特定分子、生物材料或细胞物质时，术语“等同物”或“生物等同物”可以互换使用，并且是指具有最小同源性同时仍保持所需结构或功能的那些。等同多肽的非限制性实例包括与参照多肽(例如野生型多肽)具有至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约  
10 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%同一性的多肽；或由与参考多核苷酸(例如野生型多核苷酸)具有至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或至少约 99%同一性的多核苷酸编码的多肽。

如本文所用，氨基酸修饰可以是氨基酸取代、氨基酸缺失或氨基酸插入。氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代。保守置换(也称为保守突变、保守置换或保守变异)是蛋白质中的氨基酸置换，其将给定氨基酸改变为具有相似生化性质(例如电荷、疏水性或大小)的不同氨基酸。如本文所用，“保守变异”是指氨基酸残基被另一个生物学上相似的残基置换。保守  
20 变异的实例包括一个疏水残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个；或一个带电荷或极性残基取代另一个，如精氨酸取代赖氨酸，谷氨酸取代天冬氨酸，谷氨酰胺取代天冬酰胺等。保守取代的其它示例性实例包括以下变化：丙氨酸变为丝氨酸；天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸；天冬氨酸变为谷氨酸；半胱氨酸变为丝氨酸；甘氨酸变为脯氨酸；组氨酸变为天冬酰胺或谷氨酰胺；赖氨酸变为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸；苯丙氨酸变为酪氨酸，丝氨酸变为苏氨酸；苏氨酸变为丝氨酸；色氨酸变为酪氨酸；酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸；等等。

如本文所用，“表达”是指核酸序列被转录成 mRNA 的过程和/或转录的 mRNA 随后被翻译成肽、多肽、氨基酸序列或蛋白质的过程。如果核酸序列  
30 来自基因组 DNA，则表达可包括在真核细胞中剪接 mRNA。

当术语“编码”应用于核酸序列时，是指如果在其自然状态下或当通过

本领域技术人员熟知的方法操作时，其可以被转录以产生 mRNA 和/或被翻译以产生多肽，则称其为“编码”多肽的核酸序列。反义链是这种核酸的互补物，并且可以从其推导出编码序列。

本文所用的术语“启动子”是指表达控制序列，其控制基因或转基因的转录的起始和速率。启动子可以是例如组成型的、诱导型的、阻遏型的或组织特异性的。启动子可以含有调节蛋白和分子如 RNA 聚合酶和转录因子可以结合的遗传元件。

启动子的非限制性示例性包括 pol I 启动子、pol II 启动子、pol III 启动子、T7 启动子、U6 启动子、H1 启动子、逆转录病毒劳斯肉瘤病毒 LTR 启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40 启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 $\beta$ -肌动蛋白启动子、延伸因子 1 $\alpha$  短(EFS)启动子、 $\beta$  葡萄糖醛酸酶(GUSB)启动子、巨细胞病毒(CMV)即早期(IE)增强子和/或启动子、鸡  $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子或其衍生物如 CAG 启动子、CB 启动子、(人)延伸因子 1 $\alpha$ -亚基(EF1 $\alpha$ )启动子、泛素 C(UBC)启动子、朊病毒启动子、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝轻链(NFL)启动子、神经丝重链(NFH)启动子、血小板衍生生长因子(PDGF)启动子、血小板衍生生长因子 B 链(PDGF- $\beta$ )启动子、突触蛋白(Syn)启动子、突触蛋白 1(Syn1)启动子、甲基-CpG 结合蛋白 2(MeCP2)启动子、Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(CaMKII)启动子、代谢型谷氨酸受体 2(mGluR2)启动子、神经丝轻链(NFL)启动子、神经丝重链(NFH)启动子、 $\beta$ -珠蛋白小基因 n $\beta$ 2 启动子、前脑啡肽原(PPE)启动子、脑啡肽(Enk)启动子、兴奋性氨基酸转运蛋白 2(EAAT2)启动子、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子、或其功能片段。

本领域已知，可以修饰这些启动子的核苷酸序列以提高或降低 mRNA 转录的效率。合成来源的启动子可用于普遍存在的或组织特异性表达。此外，病毒来源的启动子，其中一些如上所述，可用于本文公开的方法中，例如 CMV、HIV、腺病毒和 AAV 启动子。在实施方案中，启动子与增强子一起使用可以增加转录效率。增强子的非限制性实例包括间隙类视黄醇结合蛋白(IRBP)增强子、RSV 增强子或 CMV 增强子。

如本文所用，“poly A”或“聚 A”是指腺嘌呤核糖核苷酸或腺苷一磷酸的串(例如，其中每个碱基是腺嘌呤的 RNA 的串)。这种 poly A 序列对于 mRNA 的核输出、翻译和稳定性很重要。本发明的不同 mRNA 或 RNA 序列

中 poly A 序列的长度可以不同, 并且可以是 poly A 的约 250 个核苷酸、约 230 个核苷酸、约 200 个核苷酸、约 180 个核苷酸、约 160 个核苷酸、约 140 个核苷酸、约 120 个核苷酸约 100 个核苷酸、或更少。

如本文所用, “poly A 信号序列”、“聚腺苷酸化信号序列”或“聚 A 信号序列”是指位于最 3' 编码区下游的 RNA 序列(如 AAUAAA), 并由 RNA 切割复合物识别, 所述复合物通过 RNA 聚合酶(如 Pol II)切割新转录的 RNA 的 3' 末端序列, 从而可以发生聚腺苷酸化。然后, 通过将腺苷一磷酸单元从 ATP 添加到 RNA 的新生切割的 3' 端, 聚腺苷酸聚合酶添加并延伸聚 A 尾。由 RNA 切割复合物识别的聚 A 信号序列在不同的真核生物组中存在不同, 大多数人聚腺苷酸化位点含有 AAUAAA 序列, 尽管这种序列在植物和真菌 mRNA 中不太常见。由 RNA 切割复合物识别以使 RNA 切割以及随后的聚腺苷酸化的所有这些序列基序都在聚 A 信号序列的范围内。

示例性的聚 A 信号序列包括牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH poly A)、小聚 A 信号(SPA)、人生长激素聚腺苷酸化信号(hGH poly A)、SV40 病毒的聚腺苷酸化信号(SV40 poly A)、兔  $\beta$  珠蛋白聚 A 序列(rBG poly A)、或它们的变体。

如本文所用, 术语“载体”是指能够携带编码目的蛋白的核酸序列并且当例如通过转染、感染或转化过程将载体置于细胞内时, 能够促进目的蛋白的表达的核酸。本领域理解, 一旦进入细胞, 载体可以作为染色体外(附加型)元件复制或者可以整合到宿主细胞染色体中。载体包括质粒、粘粒、噬菌粒、或人工染色体等。载体可以包括来源于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、杆状病毒或其它天然存在的或经修饰的病毒的核酸。

如本文所用, “病毒载体”是指能够被包装而重组产生病毒颗粒的载体, 其含有将在体内、离体或体外递送至宿主细胞中的多核苷酸。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、AAV 载体、慢病毒载体、腺病毒载体、甲病毒载体等。

“基因治疗载体”定义为任何可以携带插入的多核苷酸进入宿主细胞的分子。基因治疗载体的实例是脂质体、胶束、生物相容的聚合物, 包括天然聚合物和合成聚合物、脂蛋白、多肽、多糖、脂多糖、人工病毒包膜、金属颗粒、细菌、病毒(如杆状病毒、腺病毒和逆转录病毒)、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体以及本领域通常使用的其它重组载体, 其已经被描述用于在多

种真核和原核宿主中表达，并且可以用于基因疗法以及用于蛋白质表达。

“质粒”是通常与染色体 DNA 分离并能够独立于染色体 DNA 复制的 DNA 分子。在许多情况下，它是环状的和双链的。质粒提供了在微生物群体内水平基因转移的机制，并且通常在给定的环境状态下提供选择性优势。质粒可以携带在竞争性环境小生境中提供对天然存在的抗生素的抗性的基因，或可选地，产生的蛋白质可以在类似的环境下充当毒素。本领域已知，尽管质粒载体通常以染色体外环状 DNA 分子存在，但也可以设计质粒载体以随机或靶向方式稳定整合到宿主染色体中，并且可以使用环状质粒或在引入宿主细胞之前已经线性化的质粒完成这种整合。

基因工程中使用的“质粒”被称为“质粒载体”。许多质粒可商购获得用于这样的用途。将待复制的基因插入到质粒的拷贝中，所述质粒含有使细胞对特定抗生素具有抗性的基因和多克隆位点(MCS 或多接头)，所述多克隆位点是含有若干个常用限制性位点(允许在该位置容易地插入 DNA 片段)的短区。质粒的另一个主要用途是产生大量的蛋白质。在这种情况下，研究人员培养含有携带目标基因的质粒的细菌或真核细胞，所述目标基因可被诱导以从插入的基因产生大量蛋白质。

本文所用的术语“组织”是指活的或死亡的生物体的组织或任何来源于或设计成模仿活的或死亡的生物体的组织。所述组织可以是健康的、患病的和/或具有基因突变。生物组织可以包括任何单个组织(例如，可以相互连接的细胞的集合)，或构成器官或生物体的身体的部分或区域的组织。该组织可以包含、基本上由或由均质的细胞材料组成，或者它可以是复合结构，例如在包括胸腔的身体区域中发现的结构，例如可以包括肺组织、骨骼组织和/或肌肉组织。示例性组织包括但不限于源自肝脏、肺、甲状腺、皮肤、胰腺、血管、膀胱、肾脏、脑、胆道、十二指肠、腹主动脉、髂静脉、心脏和肠的那些，包括其任何组合。

术语“受试者”受试者不限于特定物种。在一些实施方案中，受试者包括接受诊断或治疗的非人动物和接受感染或动物模型的那些动物，包括但不限于猿、鼠、大鼠、犬或兔类物种，以及其它家畜、运动类动物或宠物。在一些实施方案中，受试者是人。

如本文所用，受试者的疾病的“治疗”是指(1)预防受试者中发生的症状或疾病，所述受试者易患或尚未表现出疾病的症状；(2)抑制疾病或阻止其发

展；或(3)改善疾病的症状或引起症状的消退。如本领域所理解的，“治疗”是用于获得有益或期望结果的方法，包括临床结果。出于本发明的目的，有益或期望的结果可以包括减轻一种或多种疾病或病状的程度、延缓或减缓疾病或病状的进展、改善或减轻疾病或病状的状态(无论部分或全部)。

5       本文所用的术语“有效量”意指足以达到所需效果的量。在治疗或预防应用的情况下，有效量将取决于所讨论的病症的类型和严重性以及个体受试者的特征，例如一般健康、年龄、性别、体重和对药物的耐受性。在基因疗法的背景下，有效量是足以导致在受试者中缺陷的基因恢复部分或全部功能的量。在一些实施方案中，AAV 载体的有效量是足以导致基因在受试者中表  
10       达的量。在一些实施方案中，有效量是在有此需要的受试者中增加多巴胺表达所需的量。

有效量将取决于所讨论的应用的性质、目标受试者的个体特征和敏感性以及使用的方法。本领域技术人员将能够基于这些因素来确定有效量。在一些实施方案中，有效量可以包括 AAV 载体、AAV 病毒颗粒或组合物的一次  
15       或多次施用。

如本文所用，术语“施用”旨在表示将物质递送至受试者，诸如动物或人。施用可以在整个治疗过程中以单一剂量、连续或间歇地进行。确定最有效的施用方式和剂量的方法是本领域技术人员已知的，并且将随着用于治疗  
20       的组合物、治疗目的以及被治疗的受试者的年龄、健康或性别等因素而变化。在一些实施方案中，可以进行单次或多次施用，其剂量水平和模式由医师选择，或者在宠物和其它动物的情况下，由兽医选择。

### AAV 载体

“腺相关病毒”或“AAV”属于依赖性细小病毒(Dependoparvovirus)属，  
25       细小病毒(Parvoviridae)科。AAV 是单链 DNA 病毒，由病毒基因组和衣壳构成。AAV 基因组包括 rep 基因和 cap 基因，两侧有两个末端反向重复(ITR)。其中，rep 基因编码的 Rep 蛋白与病毒的复制以及包装有关，cap 基因编码病毒的衣壳蛋白。“ITR”或“反向末端重复”可以形成 T 形回文结构，参与 AAV 的复制和包装过程，其通常是完成 AAV 的裂解和潜伏生命周期所必需的。

30       术语“病毒衣壳”或“衣壳”是指病毒颗粒的蛋白质外壳。衣壳的功能是包壳、保护、转运病毒基因组，并将其释放到宿主细胞中。衣壳通常由蛋

白质的寡聚结构亚基(衣壳蛋白)组成。AAV 的病毒衣壳由三种病毒衣壳蛋白的混合物组成: VP1、VP2 和 VP3。

AAV 本身是复制缺陷型的, 在没有辅助病毒存在的情况下只能在宿主细胞呈潜伏状态。因此, AAV 载体的生产通常需要辅助质粒(helper)提供参与 AAV 复制的关键基因。

本文所用的“AAV 载体”和“重组 AAV(rAAV)载体”可以互换使用, 意指包含一个或多个异源核酸序列和一个或多个 ITR 的载体。当 AAV 载体存在于提供功能性 rep 和 cap 基因产物的宿主细胞中时, 在辅助病毒或辅助质粒的帮助下, AAV 载体可以被复制并包装到感染性病毒颗粒中。

10 在一些实施方案中, 本发明的 AAV 载体包含编码酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶 1(GCHI)和芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核酸序列, 其中编码 TH、GCHI 和 AADC 的核酸序列通过编码接头的核酸序列符合读码框地连接, 其中, 所述 TH、GCHI 和 AADC 中的任意一种或多种是野生型或其功能性变体的截短形式且具有多巴胺合成通路中所需的催化活性。

15 在一些实施方案中, 本发明的 AAV 载体编码的 TH 是野生型 TH 或其功能性片段的截短形式, 该截短形式的 TH 具有催化酪氨酸合成左旋多巴的活性。在一些实施方案中, TH 包含 330 至 390 个氨基酸残基。在一些实施方案中, TH 包含 330 至 380、330 至 370、330 至 360、330 至 350、330 至 340、335 至 340、335 至 380、340 至 380、350 至 380、360 至 380 或 370 至 380  
20 个氨基酸残基。在一些优选的实施方案中, TH 包含 330 至 340 个氨基酸残基。在一些更优选的实施方案中, TH 包含 335 至 340 个氨基酸残基, 例如, 335、336、337、338、339 或 340 个氨基酸残基。

25 在一些实施方案中, TH 包含与 SEQ ID NO: 11 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, GCHI 包含与 SEQ ID NO: 9 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, AADC 包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中, 连接 TH、GCHI 和/或 AADC 的接头包括融合接头、2A 肽类接头和/或内部核糖体进入位点(IRES)。

在一些实施方案中, 融合接头为肽接头。在一些实施方案中, 肽接头选

自(GGS)<sub>n</sub>, (GGGS)<sub>n</sub>或(GGGGS)<sub>n</sub>, 其中 n 为 1 至 5 的整数。在一些优选的实施方案中, 融合接头为(G4S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17, GGGGSGGGGSGGGGS)。

5 在一些实施方案中, 2A 肽类接头包含选自以下的 2A 肽: 口蹄疫病毒 2A 肽(F2A)、猪捷申病毒 2A 肽(P2A)、Thosea asign 病毒 2A 肽(T2A)和/或马 5 鼻病毒 2A 肽(E2A)。

2A 肽是来源于病毒的短肽 (约 18-25 个氨基酸, 例如 ATNFSLLKQAGDVEENPGP), 能使一条转录产物翻译产生多条多肽链。2A 肽通过使核糖体跳过 2A 元件 C-末端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用, 最终导致 2A 序列末端和下游多肽链分离。由编码 2A 肽的核苷酸序列  
10 连接的两个蛋白质在翻译完成后, 上游蛋白的 C 端将会添加一些额外的 2A 残基, 而下游蛋白的 N 端将会有额外的脯氨酸。

在一些实施方案中, 2A 肽类接头的 N 末端和/或 C 末端还包含 GSG 氨基酸序列, 优选 N 末端包含 GSG 氨基酸序列。在一些优选的实施方案中, 2A 肽类接头包含与 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 15 具有至少 75%、80%、  
15 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 本发明的 AAV 载体中编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列从上游至下游以选自以下任一顺序排列:

- (1) TH、GCH1、AADC;
- (2) AADC、GCH1、TH;
- 20 (3) AADC、TH、GCH1;
- (4) GCH1、TH、AADC;
- (5) GCH1、AADC、TH; 或
- (6) TH、AADC、GCH1。

25 在一些实施方案中, 本发明的 AAV 载体中编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列从上游至下游以选自以下任一的方式连接:

- 1) TH-F2A-GCH1-P2A-AADC;
- 2) GCH1-P2A-TH-P2A-AADC;
- 3) GCH1-P2A-AADC-P2A-TH;
- 4) AADC-E2A-GCH1-(G4S)<sub>3</sub>-TH;
- 30 5) GCH1-F2A-TH-F2A-AADC;
- 6) AADC-(G4S)<sub>3</sub>-TH-T2A-GCH1;

- 7) AADC-(G4S)4-TH-T2A-GCH1;  
8) AADC-P2A-GCH1-P2A-TH;  
9) AADC-T2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
10) GCH1-F2A-TH-P2A-AADC;  
5 11) GCH1-F2A-AADC-F2A-TH;  
12) AADC-(G4S)3-GCH1-F2A-TH;  
13) GCH1-E2A-TH-T2A-AADC;  
14) GCH1-F2A-AADC-P2A-TH;  
15) AADC-(G4S)3-GCH1-P2A-TH;  
10 16) AADC-(G4S)5-GCH1-P2A-TH;  
17) TH-(G4S)3-GCH1-P2A-AADC;  
18) GCH1-T2A-AADC-E2A-TH;  
19) AADC-(G4S)3-GCH1-T2A-TH;  
20) GCH1-E2A-TH-P2A-AADC;  
15 21) AADC-(G4S)3-GCH1-E2A-TH;  
22) GCH1-E2A-AADC-P2A-TH;  
23) AADC-(G4S)3-GCH1-(G4S)3-TH;  
24) GCH1-T2A-TH-E2A-AADC;  
25) GCH1-(G4S)3-TH-T2A-AADC;  
20 26) GCH1-(G4S)2-TH-T2A-AADC;  
27) GCH1-P2A-AADC-T2A-TH;  
28) TH-P2A-GCH1-P2A-AADC;  
29) TH-(G4S)3-GCH1-T2A-AADC;  
30) GCH1-(G4S)3-TH-E2A-AADC;  
25 31) GCH1-T2A-TH-(G4S)3-AADC;  
32) TH-P2A-GCH1-F2A-AADC;  
33) GCH1-F2A-TH-(G4S)3-AADC;  
34) TH-F2A-GCH1-F2A-AADC;  
35) TH-(G4S)3-GCH1-E2A-AADC;  
30 36) TH-G4S-GCH1-E2A-AADC;  
37) GCH1-P2A-TH-(G4S)3-AADC;

- 38) AADC-F2A-GCH1-P2A-TH;  
39) TH-T2A-GCH1-(G4S)3-AADC;  
40) GCH1-E2A-TH-(G4S)3-AADC;  
41) TH-E2A-GCH1-(G4S)3-AADC;  
5 42) TH-T2A-GCH1-E2A-AADC;  
43) AADC-F2A-GCH1-F2A-TH;  
44) TH-F2A-GCH1-(G4S)3-AADC;  
45) GCH1-(G4S)3-TH-(G4S)3-AADC;  
46) TH-(G4S)3-GCH1-F2A-AADC;  
10 47) TH-E2A-GCH1-T2A-AADC;  
48) AADC-P2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
49) TH-(G4S)3-GCH1-(G4S)3-AADC;  
50) AADC-F2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
51) TH-F2A-AADC-F2A-GCH1;  
15 52) TH-(G4S)3-AADC-T2A-GCH1;  
53) TH-(G4S)3-AADC-E2A-GCH1;  
54) AADC-P2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
55) TH-F2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
56) AADC-F2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
20 57) TH-P2A-AADC-F2A-GCH1;  
58) TH-P2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
59) GCH1-(G4S)3-TH-P2A-AADC;  
60) TH-T2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
61) TH-T2A-AADC-E2A-GCH1;  
25 62) GCH1-(G4S)3-TH-F2A-AADC;  
63) TH-E2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
64) AADC-E2A-GCH1-T2A-TH;  
65) GCH1-P2A-TH-F2A-AADC;  
66) TH-(G4S)3-AADC-(G4S)3-GCH1;  
30 67) TH-E2A-AADC-T2A-GCH1;  
68) GCH1-P2A-AADC-F2A-TH;

- 69) AADC-T2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
70) AADC-T2A-GCH1-E2A-TH;  
71) TH-F2A-AADC-P2A-GCH1;  
72) AADC-E2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
5 73) AADC-P2A-GCH1-F2A-TH;  
74) TH-(G4S)3-AADC-F2A-GCH1;  
75) AADC-P2A-TH-F2A-GCH1;  
76) AADC-(G4S)3-TH-P2A-GCH1;  
77) AADC-T2A-TH-E2A-GCH1;  
10 78) AADC-(G4S)3-TH-E2A-GCH1;  
79) AADC-E2A-TH-T2A-GCH1; 或  
80) AADC-(G4S)3-TH-F2A-GCH1。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 载体包含与 SEQ ID NO: 19-21 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%  
15 或 100%同一性的核酸序列。

在一些实施方案中，本发明的 AAV 载体还包含可操作地连接至编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列的启动子。适用于本发明的启动子包括但不限于：pol I 启动子、pol II 启动子、pol III 启动子、T7 启动子、U6 启动子、H1 启动子、逆转录病毒劳斯肉瘤病毒 LTR 启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、  
20 SV40 启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 $\beta$ -肌动蛋白启动子、延伸因子 1 $\alpha$  短(EFS)启动子、 $\beta$  葡萄糖醛酸酶(GUSB)启动子、巨细胞病毒(CMV)即早期(IE)增强子和/或启动子、鸡  $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子或其衍生物如 CAG 启动子、CB 启动子、(人)延伸因子 1 $\alpha$ -亚基(EF1 $\alpha$ )启动子、泛素 C(UBC)启动子、朊病毒启动子、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝轻链(NFL)启动子、神经丝  
25 重链(NFH)启动子、血小板衍生生长因子(PDGF)启动子、血小板衍生生长因子 B 链(PDGF- $\beta$ )启动子、突触蛋白(Syn)启动子、突触蛋白 I(Syn I)启动子、甲基-CpG 结合蛋白 2(MeCP2)启动子、Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(CaMKII)启动子、代谢型谷氨酸受体 2(mGluR2)启动子、神经丝轻链(NFL)启动子、神经丝重链(NFH)启动子、 $\beta$ -珠蛋白小基因 n $\beta$ 2 启动子、前脑啡肽  
30 原(PPE)启动子、脑啡肽(Enk)启动子、兴奋性氨基酸转运蛋白 2(EAAT2)启动子、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子、或其功

能片段。

在一些实施方案中，启动子选自：CBH 启动子、嵌合型突触蛋白 I(Synapsin I)启动子、CMV 启动子、CAG 启动子、CAGG 启动子或 CASI 启动子。在一些实施方案中，启动子包含与 SEQ ID NO: 1-6 中任一项具有至少 5 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的核酸序列。在一些优选的实施方案中，启动子包含与 SEQ ID NO: 1-3 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的核酸序列。在一些更优选的实施方案中，启动子包含与 SEQ ID NO: 1 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的核酸序列。10 在一些最优选的实施方案中，启动子包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。

在一些实施方案中，本发明的 AAV 载体还包含位于编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列下游的 poly A 信号序列。示例性的 poly A 信号序列包括牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH poly A)、小聚 A 信号(SPA)、人生长激素聚 15 腺苷酸化信号(hGH poly A)、SV40 病毒的聚腺苷酸化信号(SV40 poly A)、兔  $\beta$  珠蛋白聚 A 序列(rBG poly A)、或它们的变体。

在一些实施方案中，本发明的 AAV 载体从 5'至 3'依次包括：AAV 的 5'ITR、启动子、KOZAK 序列、编码 TH、GCH1、AADC 三种蛋白的核酸序列(以不同的顺序和连接方式排列)、poly A 信号序列、AAV 的 3'ITR。

20 在一些具体的实施方案中，本发明的 AAV 载体从 5'至 3'依次包括：

(1) 5'ITR-CBH 启动子-KOZAK-TH-F2A-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3'ITR;

(2) 5'ITR-CBH 启动子-KOZAK-AADC-P2A-GCH1-P2A-TH-SV40 polyA-3'ITR;

25 (3) 5'ITR-CBH 启动子-KOZAK-TH-GS15-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3'ITR;

(4) 5'ITR-嵌合型突触蛋白 I(Synapsin I)启动子-KOZAK-TH-GS15-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3'ITR; 或

30 (5) 5'ITR-CMV 启动子-KOZAK-TH-GS15-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3'ITR;

其中，GS15 即 (G4S)<sub>3</sub> 接头，其包含 SEQ ID NO: 17

(GGGGSGGGGSGGGGS)所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，KOZAK 序列包含 GCCACC 核酸序列。在一些实施方案中，SV40 polyA 包含如 SEQ ID NO: 47 所示的核酸序列。

## 5 AAV 病毒颗粒

本发明提供了 AAV 病毒颗粒，其包含本发明的 AAV 载体以及衣壳蛋白。

目前已经发现的 AAV 存在十几种常见血清型以及上百种变种，它们的主要区别在于编码衣壳蛋白的 cap 基因的不同。AAV 的血清型主要由衣壳蛋白的结构所决定，这些血清型包括但不限于：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh10、AAV-DJ、AAV-DJ/B、AAV PHP.B、AAV PHP.eB、AAV PHP.S、AAVrh74。

在一些实施方案中，衣壳蛋白来源于选自以下血清型的 AAV：AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAV PHP.B、AAV PHP.eB 或 AAV PHP.S。在一些实施方案中，衣壳蛋白来源于选自以下血清型的 AAV：AAV5、AAV9、AAVPHP.eB、AAVPHP.S 或 AAVPHP.B。

在一些实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒的衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 33-37 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒的衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 或 37 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些更优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒的衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。在一些最优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒的衣壳蛋白包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒包含 AAV 载体和衣壳蛋白，其中该 AAV 载体从 5'至 3'依次包括：5'ITR-CBH 启动子-KOZAK-TH-F2A-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3'ITR；其中该衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒包含 AAV 载体和衣壳蛋白，其中该 AAV 载体从 5' 至 3' 依次包括：5' ITR-CBH 启动子-KOZAK-AADC-P2A-GCH1-P2A-TH-SV40 polyA-3' ITR；其中该衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒包含 AAV 载体和衣壳蛋白，其中该 AAV 载体从 5' 至 3' 依次包括：5' ITR-CBH 启动子-KOZAK-TH-GS15-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3' ITR；其中该衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒包含 AAV 载体和衣壳蛋白，其中该 AAV 载体从 5' 至 3' 依次包括：5' ITR-嵌合型突触蛋白 I (Synapsin I) 启动子-KOZAK-TH-GS15-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3' ITR；其中该衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒包含 AAV 载体和衣壳蛋白，其中该 AAV 载体从 5' 至 3' 依次包括：5' ITR-CMV 启动子-KOZAK-TH-GS15-GCH1-P2A-AADC-SV40 polyA-3' ITR；其中该衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，本发明的 AAV 病毒颗粒包含 AAV 载体和衣壳蛋白，其中该 AAV 载体包含 SEQ ID NO: 19-21 中任一项所示的核苷酸序列，并且该衣壳蛋白包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

## 25 组合物

在一个方面，本发明提供了组合物，其包含本发明的 AAV 载体和编码衣壳蛋白的包装质粒，以及任选的辅助质粒。

在一些实施方案中，包装质粒还包含编码 Rep 蛋白的核酸序列，其中 Rep 蛋白来源于具有 AAV2 或 AAVPHP.B 血清型的 AAV。在一些实施方案中，Rep 蛋白包含与 SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 46 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，组合物中的包装质粒包含与 SEQ ID NO: 24-28 和 48 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的核酸序列。在一些优选的实施方案中，包装质粒包含与 SEQ ID NO: 25 或 28 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的核酸序列。在一些更优选的实施方案中，包装质粒包含与 SEQ ID NO: 25 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的核酸序列。在一些最优选的实施方案中，包装质粒包含 SEQ ID NO: 25 所示的核酸序列。

在一些实施方案中，组合物中的辅助质粒包含与 SEQ ID NO: 29 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的核酸序列。在一些实施方案中，组合物中的辅助质粒包含 SEQ ID NO: 29 所示的核酸序列。

在另一个方面，本发明提供了组合物，其包含本发明的 AAV 病毒颗粒，该 AAV 病毒颗粒包含本发明的 AAV 载体和衣壳蛋白。

在一些实施方案中，本发明的组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

如本文所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断的范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、变应性应答或其它问题或并发症，与合理的益处/风险比相称的载体、赋形剂或稀释剂。

用于本发明的组合物中的示例性载体包括盐水、缓冲盐水、葡萄糖和水。用于本发明的组合物中的示例性赋形剂包括填充剂、粘合剂、崩解剂、包衣剂、吸附剂、抗粘附剂、助流剂、防腐剂、抗氧化剂、调味剂、着色剂、甜味剂、溶剂、共溶剂、缓冲剂、螯合剂、粘度赋予剂、表面活性剂、稀释剂、润湿剂、载体、稀释剂、防腐剂、乳化剂、稳定剂和张力调节剂。本领域技术人员已知选择合适的赋形剂以制备本发明的组合物。通常，合适的赋形剂的选择尤其取决于所使用的活性剂、待治疗的疾病和组合物的期望剂型。

在关于组合物的一些实施方案中，药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂为缓冲剂。在一些实施方案中，缓冲剂中包含磷酸缓冲液、氯化钠和表面活性剂。

在一些实施方案中，所述表面活性剂选自聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物（泊洛沙姆 188，F68）、聚山梨酯（吐温，Tween）、聚乙二醇（PEG）、聚

乙二醇对异辛基苯基醚(曲拉通)、脂肪酸山梨坦(Span)、蔗糖脂肪酸酯(SE)、聚氧乙烯脂肪醇醚(Brij)和聚氧乙烯脂肪酸酯(Myeij)中的一种或多种。

在一些实施方案中,表面活性剂选自下组:F68、Tween、或其组合。

在一些实施方案中,Tween包括Tween20。

5 在一些实施方案中,磷酸缓冲液为磷酸钠缓冲液或磷酸钾缓冲液。在一些优选实施方案中,磷酸缓冲液为磷酸钠缓冲液。

在一些实施方案中,缓冲剂的pH为6.5-8,例如pH为6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8或7.9。在一些优选的实施方案中,缓冲剂中包含5-15mM磷酸缓冲液、130-170 mM氯化钠和0.0005%-  
10 0.002% F68。例如,在缓冲剂中,磷酸缓冲液的浓度可以为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15mM;氯化钠的浓度可以为130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169或170 mM; F68的含量可以为  
15 0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.0011%、0.0012%、0.0013%、0.0014%、0.0015%、0.0016%、0.0017%、0.0018%、0.0019%、0.002%。

在一些实施方案中,缓冲剂中包含10mM磷酸钠缓冲液、150mM氯化钠和0.001% F68, pH为7.4。

20 **实施例**

为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,下面结合具体实施例和附图来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。应当理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。以下实施例中未注明具体条件的实验方法,通过按照本领域的常规条件,例  
25 如,Sambrook和Russei等人,分子克隆:实验室手册(第三版)(2001),CSHL出版社中所述的条件,或按照制造商所建议的条件。除非另有说明,否则以下实施例中所用的实验材料和试剂均可商购获得。

**实施例 1. AAV 载体的设计和构建**

30 构建本发明的AAV载体使用的核心序列如下表1所示。

**表 1. 本发明使用的启动子、蛋白质、部分接头序列。**

|                 |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID<br>NO: 1 | CBH 启动子                       | CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA<br>ACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT<br>GTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA<br>TTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT<br>GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG<br>CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT<br>GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAG<br>GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC<br>CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAG<br>CGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGG<br>CGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG<br>CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTT<br>ATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG<br>CGCGGCGGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCC<br>CCGCTCCGCCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA<br>CCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCT<br>CCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATG<br>GTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCC<br>TGAAATCACTTTTTTTCAGGT |
| SEQ ID<br>NO: 2 | 突触蛋白 I<br>(Synapsin I)<br>启动子 | CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA<br>ACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT<br>GTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA<br>TTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT<br>GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG<br>CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT<br>GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGCTGCA<br>GAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATG<br>AGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACT<br>GGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTAT<br>CAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGC<br>ACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTG<br>GCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACG<br>TCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGT<br>CGCGTCCGCGCCCGCCCGGCGCCAGCCGGACCGCACACGCGAG<br>GCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGC<br>G                                                                                                                      |
| SEQ ID<br>NO: 3 | CMV 启动子                       | GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT<br>CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTA<br>CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA<br>TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG<br>GACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTG<br>CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCC<br>CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGC<br>CCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA<br>CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA<br>CATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAA<br>GTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAA<br>ATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTG<br>ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA<br>GCAG                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID          | CAG 启动子                       | CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                 |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NO: 4           | 子            | AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA<br>CTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG<br>CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATT<br>TGCCCAAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCA<br>CGTTCGTCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAA<br>TTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG<br>GGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGG<br>CGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCC<br>AATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCG<br>GCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGG<br>GGAGTCGTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGC<br>CGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCC<br>ACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATT<br>AGCGCTTGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTG<br>AAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGGCCCTTGTGCGGGGGGAG<br>CGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG<br>ACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCT<br>CTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACA<br>GCTCCTGGGCAACGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| SEQ ID<br>NO: 5 | CAGG 启<br>动子 | GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAA<br>CGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG<br>TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT<br>TTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT<br>GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCG<br>CCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTT<br>GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAG<br>GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC<br>CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAG<br>CGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGG<br>CGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG<br>CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTT<br>ATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG<br>CGCGGCGGGGCGGGGAGTCGTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGC<br>CCCGCTCCGCCGCCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTG<br>ACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCC<br>TCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGTTTAATGACGGCTTGTTCCTT<br>TCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTT<br>TGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTGC<br>GTGGGGAGCGCCGCGTGGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGA<br>GCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTGTGCGCTCCGAGTGTGC<br>GCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGG<br>GGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTG<br>GGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAAC<br>CCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTT<br>CGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTG<br>CCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGG<br>GGCCGCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGG<br>CCCCCGAGCGCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGC<br>CATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCC<br>TTTGTCCCAAATCTGTGCGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCC |

|                 |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 |            | GCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGG<br>CAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGC<br>CGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG<br>GACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCT<br>TCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTT<br>ATGCCTTCTTCTTTTCTACAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| SEQ ID<br>NO: 6 | CASI 启动子   | GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA<br>CGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG<br>TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT<br>TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT<br>GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG<br>CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT<br>GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAG<br>GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC<br>CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGTGCAG<br>CGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGG<br>CGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG<br>CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTT<br>ATGGCGAGGCGGCGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG<br>CGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCC<br>CGCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGAC<br>CGCGTTACTAAAACAGGTAAGTCCGGCCTCCGCGCCGGGTTTTG<br>GCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCAC<br>GTCAGACGAAGGGCGCAGCGAGCGTCCTGATCCTTCCGCCCGGA<br>CGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAA<br>CCCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGA<br>CTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGG<br>AAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGG<br>GGCGGTGAACGCCGATGATGCCTCTACTAACCATGTTTCATGTTTT<br>CTTTTTTTTTCTACAGGTCTGGGTGACGAACAGGCTAGC |
| SEQ ID<br>NO: 7 | AADC 氨基酸序列 | MNASEFRRRGKEMVDYMANYMEGIEGRQVYPDVEPGYLRLIPAA<br>APQEPDTFEDIINDVEKIIMPGVTHWHSPYFFAYFPTASSYPAMLAD<br>MLCGAIGCIGFSWAASPACTELETVMMDWLGLKMLELPKAFLEKA<br>GEGGGVIQGSASEATLVALLAARTKVIHRLQAASPELTQAAMEKL<br>VAYSSDQAHSSVERAGLIGGVKLKAIPSDGNFAMRASALQEALERD<br>KAAGLIPFFMVATLGTTTCCSFDNLLEVGPICNKEDIWLHVDAAYA<br>GSAFICPEFRHLLNGVEFADSFNPNPHKWLLVNFDCSAMWVKKRT<br>DLTGAFRLDPTYLKHSHQDSGLITDYRHWQIPLGRRFRSLKMWFVF<br>RMYGVKGLQAYIRKHVQLSHEFESLVRQDPRFEICVEVILGLVCFR<br>LKGSNKVNEALLQRINSAKKIHLVPCHLRDKFVLRFAICSRTVESAH<br>VQRAWEHKELAADVLRAERE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID<br>NO: 8 | AADC 核苷酸序列 | ATGAACGCAAGTGAATTCCGAAGGAGAGGGAAGGAGATGGTGG<br>ATTACATGGCCAACATACATGGAAGGCATTGAGGGACGCCAGGTC<br>TACCCTGACGTGGAGCCCGGGTACCTGCGGCCGCTGATCCCTGC<br>CGCTGCCCCCTCAGGAGCCAGACACGTTTGAGGACATCATCAACG<br>ACGTTGAGAAGATAATCATGCCTGGGGTGACGCACTGGCACAGC<br>CCCTACTTCTTCGCCTACTTCCCCACTGCCAGCTCGTACCCGGCC<br>ATGCTTGCGGACATGCTGTGCGGGGCCATTGGCTGCATCGGCTT<br>CTCCTGGGCGGCAAGCCCAGCATGCACAGAGCTGGAGACTGTGA<br>TGATGGACTGGCTCGGGAAGATGCTGGAACACCAAAGGCATTT<br>TTGAATGAGAAAGCTGGAGAAGGGGGAGGAGTGATCCAGGGAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                  |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |            | <p>GTGCCAGTGAAGCCACCCTGGTGGCCCTGCTGGCCGCTCGGACC<br/> AAAGTGATCCATCGGCTGCAGGCAGCGTCCCCAGAGCTCACACA<br/> GGCCGCTATCATGGAGAAGCTGGTGGCTTACTCATCCGATCAGG<br/> CACACTCCTCAGTGGAAAGAGCTGGGTAAATTGGTGGAGTGAAA<br/> TTAAAAGCCATCCCCTCAGATGGCAACTTCGCCATGCGTGCGTC<br/> TGCCCTGCAGGAAGCCCTGGAGAGAGACAAAGCGGCTGGCCTG<br/> ATTCCTTTCTTTATGGTTGCCACCCTGGGGACCACAACATGCTGC<br/> TCCTTTGACAATCTCTTAGAAGTCGGTCCTATCTGCAACAAGGA<br/> AGACATATGGCTGCACGTTGATGCAGCCTACGCAGGCAGTGCAT<br/> TCATCTGCCCTGAGTTCCGGCACCTTCTGAATGGAGTGGAGTTTG<br/> CAGATTCAATTCAACTTTAATCCCCACAAATGGCTATTGGTGAATT<br/> TTGACTGTTCTGCCATGTGGGTGAAAAAGAGAACAGACTTAACG<br/> GGAGCCTTTAGACTGGACCCCACTTACCTGAAGCACAGCCATCA<br/> GGATTCAAGGGCTTATCACTGACTACCGGCATTGGCAGATACCAC<br/> TGGGCAGAAGATTTTCGCTCTTTGAAAATGTGGTTTGTATTTAGGA<br/> TGTATGGAGTCAAAGGACTGCAGGCTTATATCCGCAAGCATGTC<br/> CAGCTGTCCCATGAGTTTGAGTCACTGGTGCGCCAGGATCCCCG<br/> CTTTGAAATCTGTGTGGAAGTCATTCTGGGGCTTGTCTGCTTTCG<br/> GCTAAAGGGTTCCAACAAAGTGAATGAAGCTCTTCTGCAAAGAA<br/> TAAACAGTGCCAAAAAAATCCACTTGGTTCCATGTCACCTCAGG<br/> GACAAGTTTGTCTGCGCTTTGCCATCTGTTCTCGCACGGTGGAA<br/> TCTGCCCATGTGCAGCGGGCTGGGAACACATCAAAGAGCTGGC<br/> GGCCGACGTGCTGCGAGCAGAGAGGGAG</p> |
| SEQ ID<br>NO: 9  | GCH1 氨基酸序列 | <p>MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKS<br/> AQPADGWKGERPRSEEDNELNLPNLAAAYSSILSSLGENPQRQGLL<br/> KTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEDDHEMIVVKDIDMF<br/> SMCEHHLVPFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQER<br/> LTKQIAVAITEALRPAGVGVVVEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTS<br/> TMLGVFREDPKTREEFLTIRS</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID<br>NO: 10 | GCH1 核苷酸序列 | <p>ATGGAGAAGGGCCCTGTGCGGGCACCGGCGGAGAAGCCGCGGG<br/> GCGCCAGGTGCAGCAATGGGTTCCTCCGAGCGGGATCCGCCGCGG<br/> CCCGGGCCAGCAGGCCGCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG<br/> CCAAGAGCGCGCAGCCCGCGGACGGCTGGAAGGGCGAGCGGCC<br/> CCGCAGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCTAACCTGGCA<br/> GCCGCTACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCA<br/> GCGGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCTCGGCC<br/> ATGCAGTTCTTACCAAGGGCTACCAGGAGACCATCTCAGATGT<br/> CCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGATCATGATGAGATGGTGA<br/> TTGTGAAGGACATAGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACTTG<br/> GTTCCATTTGTTGGAAAGGTCCATATTGGTTATCTTCCCTAACAA<br/> CAAGTCCTTGGCCTCAGCAAACTTGCGAGGATTGTAGAAATCTA<br/> TAGTAGAAGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTTACAAAACAAATTG<br/> CTGTAGCAATCACGAAGCCTTGCGGCCTGCTGGAGTCGGGGTA<br/> GTGGTTGAAGCAACACACATGTGTATGGTAATGCGAGGTGTACA<br/> GAAAATGAACAGCAAACTGTGACCAGCACAAATGTTGGGTGTGT<br/> TCCGGGAGGATCCAAAGACTCGGGAAGAGTTCCTGACTCTCATT<br/> AGGAGC</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| SEQ ID<br>NO: 11 | TH 氨基酸序列   | <p>MVKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLHPGFSDQVYRQRR<br/> KLIAEIAFQYRHGDIPIRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGE<br/> HLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSAR<br/> DFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELLGHVPMADRT</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                  |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                | FAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYG<br>AGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSES<br>FSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQ<br>DELDTLAHALSAIG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID<br>NO: 12 | TH 核苷酸<br>序列   | ATGGTGAAGGTCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTCAGAGCTGGA<br>CAAGTGTCATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACT<br>TGGACCACCCGGGCTTCTCGGACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGG<br>AAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCC<br>GATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGA<br>AGGAGGTCTACACCACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCC<br>TGCGGGGAGCACCTGGAGGCCTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAG<br>CGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCC<br>GCTTCTGAAGGAGCGCACGGGCTTCCAGCTGCGGCCCTGTGGCC<br>GGCCTGCTGTCCGCCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGCCTTCCGC<br>GTGTTCCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCATG<br>CACTCCCCTGAGCCGGACTGCTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGT<br>GCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTTCTCGCAGGACA<br>TTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAG<br>CTGTCCACGCTGTACTGGTTCACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAA<br>GCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCCGGGCTGCTGTCCT<br>CCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATT<br>CGGGCCTTCGACCCTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGA<br>CCAGACGTACCAAGTCAGTCTACTTCGTGTCTGAGAGCTTCAGTG<br>ACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGC<br>CCCTTCTCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGT<br>GCTGGACAGCCCCCAGGCCGTGCGGCGCTCCCTGGAGGGTGTCC<br>AGGATGAGCTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGA |
| SEQ ID<br>NO: 13 | P2A 氨基<br>酸序列  | GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID<br>NO: 14 | P2A 核苷<br>酸序列  | GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGCGA<br>CGTGGAGGAGAACCCTGGACCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID<br>NO: 15 | F2A 氨基<br>酸序列  | GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID<br>NO: 16 | F2A 核苷<br>酸序列  | GGAAGCGGAGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTT<br>GGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCTGGACCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| SEQ ID<br>NO: 17 | GS15 氨基<br>酸序列 | GGGSGGGGSGGGGS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID<br>NO: 18 | GS15 核苷<br>酸序列 | GGAGGCGGCGGCTCTGGTGGAGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGTT<br>CT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

人工合成 AADC-P2A-GCH1-P2A-TH(SEQ ID NO: 19)、TH-GS15-GCH1-P2A-AADC(SEQ ID NO: 20)以及 TH-F2A-GCH1-P2A-AADC(SEQ ID NO: 21)的核苷酸序列(其中 TH 为截短形式的 TH);同时合成突触蛋白 I 启动子(SEQ ID NO: 2)和 CMV 启动子(SEQ ID NO: 3)。将合成的基因以重组连接的方式克隆到申请人自研的腺相关病毒骨架上 pAAV-MCS-CBH-SV40(其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示,质粒图谱如图 2 所示)以制备重组腺相关病毒载

体(rAAV)，得到如下各载体，其结构示意图如图 1 所示。

CBH-DGT 载体：

将 AADC-P2A-GCH1-P2A-TH 用 AgeI 和 SalI 酶切/连接克隆到腺相关病毒骨架载体 pAAV-MCS-CBH-SV40 的 CBH 和 SV40 之间，将该载体命名为 CBH-DGT 载体。

CBH-TFGPD 载体：

将 TH-F2A-GCH1-P2A-AADC 用 AgeI 和 SalI 酶切/连接克隆到腺相关病毒骨架载体 pAAV-MCS-CBH-SV40 的 CBH 和 SV40 之间，将该载体命名为 CBH-TFGPD 载体。

CBH-TGPD 载体：

将 TH-GS15-GCH1-P2A-AADC 用 AgeI 和 SalI 酶切/连接克隆到腺相关病毒骨架载体 pAAV-MCS-CBH-SV40 的 CBH 和 SV40 之间，将该载体命名为 CBH-TGPD 载体。

CMV-TGPD 载体：

用 CMV 启动子置换 CBH-TGPD 载体中的 CBH 启动子，将该载体命名为 CMV-TGPD 载体。

synapsin-TGPD 载体：

用 Synapsin I 启动子置换 CBH-TGPD 载体中的 CBH 启动子，将该载体命名为 synapsin-TGPD 载体。

CBH-EGFP 载体：

克隆 EGFP 序列，用其置换 CBH-DGT 载体中的 AADC-P2A-GCH1-P2A-TH 序列，将该载体命名为 CBH-EGFP 载体。

**实施例 2. AAV 病毒颗粒包装及测定**

将实施例 1 得到的包含目的基因的载体(CBH-DGT、CBH-TGPD、CBH-TFGPD、CMV-TGPD、synapsin-TGPD、CBH-EGFP)与不同血清型包装质粒(KL-pAAV5(SEQ ID NO: 24)、KL-pAAV9(SEQ ID NO: 25)、KL-pAAVPHP.eB(SEQ ID NO: 26)、KL-pAAVPHP.S(SEQ ID NO: 27)、KL-pAAVPHP.B(SEQ ID NO: 28))和辅助质粒(KL-pAAV-Helper, 核苷酸序列 SEQ ID NO: 29)共同转染 293T 细胞(购自美国模式菌种收集中心(ATCC)，保藏号为 CRL-3216)，利用 293T 系统进行 AAV 的包装。转染方法为 PEI 阳离子聚

合物(PEI-Max 转染试剂, 购自 Polysciences, 货号: 24765-1)介导的真核细胞瞬时转染, 转染操作参照生产商推荐的标准化操作进行, 转染规模为 15 cm<sup>2</sup> 细胞培养皿。

转染完成 72 小时后, 将细胞上清及细胞一起收集至 50 mL 离心管中。

- 5 使用台式离心机室温 4200 rpm 离心 10 分钟分离细胞及上清。将上清转移至新的 50 mL 离心管中, 添加 MgCl<sub>2</sub> 及核酶, 混匀待用。剩余细胞添加核酶和细胞裂解液, 室温静置 1h, 随后室温 10000g 离心 10min。转移上清至上一步获得的细胞上清中, 混匀, 最后进行亲和纯化浓缩, 得到不同血清型的 AAV 病毒颗粒(AAV9-CBH-DGT、AAV9-CBH-TGPD、AAV9-CBH-TFGPD、AAV9-CMV-TGPD、AAV9-synapsin-TGPD、AAV5-CBH-TGPD、AAVPHP.eB-CBH-TGPD、AAVPHP.S-CBH-TGPD、AAVPHP.B-CBH-TGPD 和 AAV9-CBH-EGFP)。

通过本领域熟知的方法, 根据定量 PCR 结果以及 AAV 标准品为参照计算出 AAV 的物理滴度(见表 2)。定量 PCR 使用的引物探针序列为:

- 15 CMV-正向引物:  
ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG (SEQ ID NO: 30)  
CMV 探针:  
5'- CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC -3' (SEQ ID NO: 31)  
CMV-反向引物:  
20 AGGTCATGTACTGGGCATAATGC (SEQ ID NO: 32)  
其中 CMV 探针中 5'端带有 FAM 荧光基团, 3'带有 BHQ1 荧光基团。

表 2. 不同 AAV 病毒颗粒的物理滴度

| 病毒名称               | 病毒滴度 (vg/ml) |
|--------------------|--------------|
| AAV9-CBH-EGFP      | 9.05E+12     |
| AAV9-CBH-DGT       | 8.96E+12     |
| AAV9-CBH-TGPD      | 1.91E+13     |
| AAV9-CBH-TFGPD     | 1.34E+13     |
| AAV9-CMV-TGPD      | 4.28E+12     |
| AAV9-synapsin-TGPD | 1.27E+13     |
| AAV5-CBH-TGPD      | 3.47E+13     |
| AAVPHP.eB-CBH-TGPD | 8.44E+12     |
| AAVPHP.S-CBH-TGPD  | 7.19E+12     |
| AAVPHP.B-CBH-TGPD  | 3.88E+12     |

由表 2 结果可知, 对于实施例 1 中不同的 AAV 载体, 具有不同 AAV 血清型的衣壳蛋白均能够有效对其进行包装, 从而获得高物理滴度的 AAV 病

毒颗粒。

实施例 3. AAV 病毒颗粒感染 293T 细胞后胞内目的蛋白的表达检测

将包装好的 AAV 病毒颗粒 AAV9-CBH-TFGPD 以相同的感染复数(MOI)

5 感染 293T 细胞。感染细胞后，裂解细胞产生细胞裂解液，使用细胞裂解液进行 Western blot 实验。经 SDS-PAGE 电泳后，将目的蛋白转移到 PVDF 膜上，以抗 GCH1、抗 TH、抗 AADC 抗体为一抗检测目的蛋白的表达，以抗 GAPDH 抗体为内参一抗检测内参蛋白的表达。实验结果(见图 3)显示，AAV 病毒颗粒 AAV9-CBH-TFGPD 在体外转导细胞后能高效地表达目的蛋白

10 GCH1、TH1 和 AADC。

实施例 4. AAV 载体介导的体外多巴胺合成水平检测

将包装好的 AAV 病毒颗粒以相同的 MOI 感染 293T 细胞，72h 后取细胞上清，通过高效液相色谱检测细胞上清中多巴胺及其代谢产物浓度。实验

15 结果(见表 3 和图 4)显示，AAV9-CBH-TFGPD 在体外转导细胞后，细胞内多巴胺合成显著增加，多巴胺代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸和高香草酸均显著增加,证明 AAV9-CBH-TFGPD 在体外条件下能够介导细胞高效地合成多巴胺。

表 3. AAV 载体介导的体外多巴胺合成水平及其代谢产物检测

| AAV 载体         | MOI      | 3,4-二羟基苯乙酸 | 高香草酸  | 多巴胺    |
|----------------|----------|------------|-------|--------|
|                |          | 浓度 ng/mL   |       |        |
| AAV9-CBH-EGFP  | 5.00E+05 | 75.8       | 186.7 | 37.1   |
|                |          | 76.1       | 174.6 | 49.1   |
|                |          | 76.2       | 175.8 | 49.2   |
| AAV9-CBH-TFGPD |          | 340.3      | 845.9 | 4394.0 |
|                |          | 305.7      | 807.6 | 4448.5 |
|                |          | 318.4      | 768.2 | 4650.8 |

20 实施例 5. 不同 AAV 载体介导的体内多巴胺合成效率检测

将包装有不同 AAV 载体的 AAV 病毒颗粒以相同剂量，通过脑立体定位的注射方式，递送至野生型 C57/B6 小鼠脑内来感染小鼠脑内神经细胞。注射两周后取材，每 30 mg 脑组织加入 200  $\mu$ L 含 0.2 mM HClO<sub>4</sub>、1 mM 半胱氨酸的溶液，匀浆破碎成细胞裂解液。4℃、12000 rpm 离心 5 min 取上清，

25 通过高效液相色谱检测细胞裂解液中多巴胺及其代谢产物浓度。实验结果

(见表 4 和图 5)显示, AAV9-CBH-DGT 虽然在多巴胺合成水平上未体现出显著性差异, 但多巴胺的代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸和高香草酸相较于对照组均有明显增加, 表明多巴胺合成后被迅速代谢。这些结果说明, 相比于对照组, 不同的 AAV 载体在体内感染神经细胞后均能高效地介导多巴胺合成。

5                   表 4. 不同 AAV 载体介导的体内多巴胺合成及其代谢产物含量

| AAV 载体        | 3,4-二羟基苯乙酸 | 高香草酸  | 多巴胺   |
|---------------|------------|-------|-------|
|               | ng/mg      | ng/mg | ng/mg |
| AAV9-CBH-EGFP | 0.30       | 0.13  | 0.21  |
|               | 0.37       | 0.13  | 0.27  |
|               | 0.35       | 0.10  | 0.27  |
| AAV9-CBH-DGT  | 0.91       | 1.99  | 0.32  |
|               | 0.63       | 1.15  | 0.39  |
|               | 0.75       | 1.25  | 0.40  |
| AAV9-CBH-TGPD | 3.14       | 5.37  | 0.81  |
|               | 2.02       | 3.64  | 0.74  |
|               | 4.71       | 5.79  | 1.64  |

**实施例 6. 不同血清型的 AAV 载体介导的体内多巴胺合成效率检测**

                  将不同血清型的 AAV 载体以相同剂量, 通过脑立体定位注射方式递送至野生型 C57/B6 小鼠脑内来感染小鼠脑内神经细胞。注射两周后取材, 每  
10   30 mg 脑组织加入 200  $\mu$ L 含 0.2mM HClO<sub>4</sub>、1 mM 半胱氨酸的溶液, 匀浆破碎成细胞裂解液。4℃、12000 rpm 离心 5 min 取上清, 通过高效液相色谱检测细胞裂解液中多巴胺及其代谢产物浓度。实验结果(见表 5 和图 6)显示, AAV9、AAV5、AAVPHP.eB、AAVPHP.S 以及 AAVPHP.B 血清型的 AAV 载体在多巴胺合成水平上均有显著增加, 并且多巴胺的代谢产物 3,4-二羟基苯  
15   乙酸和高香草酸相较于对照组的增加更为明显, 表明多巴胺合成后, 被迅速代谢。因此, 实验结果说明, 相比于对照组, 不同血清型的 AAV 载体在体内感染神经细胞后均能高效地合成多巴胺。

                  表 5. 不同血清型 AAV 载体介导的体内多巴胺合成及其代谢产物含量

| AAV 载体        | 多巴胺   | 3,4-二羟基苯乙酸 | 高香草酸  |
|---------------|-------|------------|-------|
|               | ng/mg | ng/mg      | ng/mg |
| AAV9-CBH-EGFP | 0.12  | <min       | 0.08  |
|               | 0.14  | <min       | 0.07  |
|               | 0.19  | <min       | 0.09  |
| AAV9-CBH-TGPD | 1.37  | 3.84       | 4.67  |
|               | 0.86  | 2.05       | 2.87  |

|                    |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|
|                    | 1.41 | 3.67 | 4.96 |
| AAV5-CBH-TGPD      | 0.35 | 0.11 | 0.87 |
|                    | 0.41 | 0.75 | 1.13 |
|                    | 0.46 | 0.82 | 1.26 |
|                    | 0.54 | 0.11 | 1.17 |
| AAVPHP.eB-CBH-TGPD | 0.39 | 0.12 | 1.36 |
|                    | 0.74 | 1.32 | 3.97 |
|                    |      |      |      |
| AAVPHP.S-CBH-TGPD  | 0.33 | 0.08 | 0.56 |
|                    | 0.57 | 0.68 | 2.00 |
|                    | 0.32 | 0.34 | 1.41 |
|                    |      |      |      |
| AAVPHP.B-CBH-TGPD  | 1.04 | 1.91 | 3.98 |
|                    | 0.41 | 0.86 | 1.60 |
|                    | 0.82 | 1.83 | 4.65 |

实施例 7. 使用不同启动子的 AAV 载体介导的体内多巴胺合成效率检测

将包装有使用不同启动子的 AAV 载体的病毒颗粒以相同剂量，通过脑  
5 立体定位注射方式递送至野生型 C57/B6 小鼠脑内来感染小鼠脑内神经细胞。  
注射两周后取材，每 30 mg 脑组织加入 200  $\mu$ L 含 0.2 mM  $\text{HClO}_4$ 、1 mM 半  
胱氨酸的溶液，匀浆破碎成细胞裂解液。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000rpm 离心 5min 取上清，  
通过高效液相色谱检测细胞裂解液中多巴胺浓度。实验结果(见表 6 和图 7)  
10 显示，相比于对照组，使用不同启动子的 AAV 载体在体内感染神经细胞后  
均能高效地合成多巴胺。

表 6. 使用不同启动子的 AAV 载体介导的体内多巴胺合成水平

| AAV 载体        | 多巴胺   |
|---------------|-------|
|               | ng/mg |
| AAV9-CBH-EGFP | 0.20  |
|               | 0.23  |
|               | 0.16  |
| AAV9-CBH-TGPD | 1.02  |
|               | 1.01  |
|               | 0.96  |
| AAV9-Syn-TGPD | 0.50  |
|               | 0.89  |
|               | 0.50  |
| AAV9-CMV-TGPD | 0.49  |
|               | 0.36  |
|               | 0.38  |

实施例 8. 使用不同接头的 AAV 载体介导的体内多巴胺合成效率检测

将包装有使用不同接头的 AAV 载体的 AAV 病毒颗粒以相同剂量, 通过脑立体定位注射方式递送至野生型 C57/B6 小鼠脑内感染小鼠脑内神经细胞。

5 注射两周后取材, 每 30 mg 脑组织加入 200  $\mu$ L 含 0.2 mM  $\text{HClO}_4$ 、1 mM 半胱氨酸的溶液, 匀浆破碎成细胞裂解液。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 离心 5 min 取上清, 通过高效液相色谱检测细胞裂解液中多巴胺浓度。实验结果(见表 7 和图 8)显示, 相比于对照组, 使用不同接头的 AAV 载体在体内感染神经细胞后均能高效地合成多巴胺。

10 表 7. 使用不同接头的 AAV 载体介导的体内多巴胺合成水平

| AAV 载体         | 多巴胺浓度 |
|----------------|-------|
|                | ng/mg |
| AAV9-CBH-EGFP  | 0.22  |
|                | 0.25  |
|                | 0.2   |
| AAV9-CBH-TGPD  | 1.37  |
|                | 0.86  |
|                | 1.39  |
| AAV9-CBH-TFGPD | 1.26  |
|                | 0.85  |
|                | 0.78  |

实施例 9. AAV9-CBH-TGPD 在帕金森病大鼠模型中的药效评价

通过将 6-羟多巴胺(6-OHDA)脑立体定位注射到 SD 大鼠单侧内侧前脑束(MFB)脑区构建单侧帕金森病大鼠模型。SD 大鼠注射 6-OHDA 后第 4 周

15 腹腔注射盐酸阿扑吗啡(APO)(1 mg/kg), 诱导其向健康侧旋转, 由旋转速度评定动物成模质量。

筛选出合适的帕金森病大鼠模型后, 按照动物 APO 诱导结果将成模动物进行分组, 通过脑立体定位注射分别向损伤侧纹状体给予 AAV9-CBH-EGFP 病毒颗粒和不同剂量的 AAV9-CBH-TGPD 病毒颗粒(见表 8)。分别在

20 给药后第 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、17、19、21 和 23 周, 腹腔注射盐酸阿扑吗啡(1 mg/kg), 分别在给予诱导药后 5~10 min、15~20 min 和 25~30 min 对动物旋转次数进行计数。AAV9-CBH-TGPD 各给药组和对照组相比, APO 诱导后转圈数均显著下降, 且 AAV9-CBH-TGPD 给药剂量与

诱导后转圈数呈现负相关(见图 9)，即给药剂量越高，APO 诱导后转圈数越低，证明 AAV9-CBH-TGPD 在帕金森病大鼠模型中有良好的治疗效果。

表 8. 动物分组及给药

| 组别 | 动物数量/性别    | AAV 载体        | 注射位点/体积       | 受试物剂量<br>(vg/纹状体) |
|----|------------|---------------|---------------|-------------------|
| 1  | 帕金森病大鼠 7 雄 | AAV9-CBH-EGFP | 纹状体(4 点* 5μL) | 3.2E10            |
| 2  | 帕金森病大鼠 7 雄 | AAV9-CBH-TGPD | 纹状体(4 点*5 μL) | 2.0E9             |
| 3  | 帕金森病大鼠 7 雄 | AAV9-CBH-TGPD | 纹状体(4 点*5 μL) | 8.0E9             |
| 4  | 帕金森病大鼠 7 雄 | AAV9-CBH-TGPD | 纹状体(4 点*5 μL) | 3.2E10            |

5           用于治疗帕金森病的慢病毒载体药物 Prosavin (Mimoun Azzouz, et al. The Journal of Neuroscience, 2002, 22(23):10302–10312)的最好治疗效果为，对于阿扑吗啡诱导的旋转行为从对照组 8 转/分钟降低到治疗组 5 转/分钟(效果和临床试验数据相似)。本发明的 AAV-CBH-TGPD 已达到接近功能性治愈的效果，使阿扑吗啡诱导的旋转行为从对照组 10 转/分钟降低到治疗组接近 10 转/分钟。

实施例 10. AAV 病毒颗粒和缓冲体系的安全性检测

使用实施例 2 的方法，将实施例 1 得到的载体 CBH-TGPD 用 AAV9、AAV2 和 AAV5 血清型包装质粒分别包装，得到不同血清型的 AAV 病毒颗粒。其中 AAV9 和 AAV5 包装质粒与实施例 2 相同，AAV2 包装质粒序列如 SEQ ID NO: 48 所示。

将 AAV 病毒颗粒以 8.0E+9vg 的总剂量与缓冲体系混合，制备组合物。缓冲体系为 10mM 磷酸钠缓冲液 (NaH2PO4&Na2HPO4)，150mM 的氯化钠，和 0.001% F68，pH7.4，总体积为 10 微升。通过脑立体定位注射方式，

将缓冲体系、或 AAV 病毒颗粒与缓冲体系组合物分别递送至野生型 C57/B6 小鼠脑内，观察缓冲体系与不同血清型 AAV 组合物的神经毒性。

- 5 注射两周后，对小鼠进行尼氏染色以判断神经毒性。将小鼠大脑部位取材，在纹状体区域进行石蜡切片，按照尼氏染色试剂盒（生工生物工程（上海）股份有限公司，E607316-0100）说明书染色后，光学显微镜拍照。尼氏染色如图 10 所示，可见相比于缓冲体系组，缓冲体系+AAV9 组合物、缓冲体系+AAV2 组合物、缓冲体系+AAV5 组合物注射的小鼠神经元数量、形状和分布等均无异常，说明本申请的 AAV 病毒颗粒均无神经毒性，与缓冲体系的组合物也满足安全性要求。

10

虽然已经参考其特定实施方案描述本发明，本领域的技术人员应当理解可以进行各种改变且可以替换等同物而不脱离本发明的真正的精神和范围。另外，可作出许多修改以使特定的情况，材料，组合物，方法，方法步骤适于本发明的目的，精神和范围。所有这些修改都旨在本发明的范围内。

## 权利要求书

1. 腺相关病毒(AAV)载体, 其包含编码酪氨酸羟化酶(TH)、GTP-环化水解酶 1(GCH1)和芳香族氨基酸多巴脱羧酶(AADC)的核酸序列, 其中编码所述 TH、GCH1 和/或 AADC 的核酸序列通过编码接头的核酸序列符合读码框地连接, 其中, 所述 TH、GCH1 和 AADC 中的任意一种或多种是野生型或其功能性变体的截短形式且具有多巴胺合成通路中所需的催化活性。
2. 权利要求 1 的 AAV 载体, 其中所述 TH 是野生型 TH 或其功能性变体的截短形式且具有催化酪氨酸合成左旋多巴的活性; 优选地, 所述 TH 包含 330 至 390 个氨基酸残基。
3. 权利要求 1 或 2 的 AAV 载体, 其中所述 TH 包含与 SEQ ID NO: 11 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。
4. 权利要求 1-3 中任一项的 AAV 载体, 其中所述 GCH1 包含与 SEQ ID NO: 9 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。
5. 权利要求 1-4 中任一项的 AAV 载体, 其中所述 AADC 包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。
6. 权利要求 1-5 中任一项的 AAV 载体, 其中所述接头包括融合接头、2A 肽类接头和/或内部核糖体进入位点(IRES)。
7. 权利要求 6 中任一项的 AAV 载体, 其中所述融合接头为肽接头; 优选地, 所述肽接头选自(GGS)<sub>n</sub>, (GGGS)<sub>n</sub> 或(GGGGS)<sub>n</sub>, 其中 n 为 1 至 5 的整数。
8. 权利要求 7 的 AAV 载体, 其中所述融合接头为(G4S)<sub>3</sub>。
9. 权利要求 6 的 AAV 载体, 其中所述 2A 肽类接头包含选自以下的 2A 肽: 口蹄疫病毒 2A 肽(F2A)、猪捷申病毒 2A 肽(P2A)、Thosea asign 病毒 2A 肽(T2A)和/或马鼻炎病毒 2A 肽(E2A)。
10. 权利要求 9 的 AAV 载体, 其中所述 2A 肽类接头的 N 末端和/或 C 末端还包含 GSG 氨基酸序列, 优选 N 末端包含 GSG 氨基酸序列。
11. 权利要求 10 的 AAV 载体, 其中所述 2A 肽类接头包含与 SEQ ID

NO: 13 或 SEQ ID NO: 15 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

12. 权利要求 1-11 中任一项的 AAV 载体，其中编码所述 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列从上游至下游以选自以下任一项的顺序排列：

- 5           (1) TH、GCH1、AADC;  
            (2) AADC、GCH1、TH;  
            (3) AADC、TH、GCH1;  
            (4) GCH1、TH、AADC;  
            (5) GCH1、AADC、TH; 或  
10           (6) TH、AADC、GCH1。

13. 权利要求 12 的 AAV 载体，其中编码所述 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列从上游至下游以选自以下任一项的方式连接：

- 1) TH-F2A-GCH1-P2A-AADC;  
            2) GCH1-P2A-TH-P2A-AADC;  
15           3) GCH1-P2A-AADC-P2A-TH;  
            4) AADC-E2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
            5) GCH1-F2A-TH-F2A-AADC;  
            6) AADC-(G4S)3-TH-T2A-GCH1;  
            7) AADC-(G4S)4-TH-T2A-GCH1;  
20           8) AADC-P2A-GCH1-P2A-TH;  
            9) AADC-T2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
            10) GCH1-F2A-TH-P2A-AADC;  
            11) GCH1-F2A-AADC-F2A-TH;  
            12) AADC-(G4S)3-GCH1-F2A-TH;  
25           13) GCH1-E2A-TH-T2A-AADC;  
            14) GCH1-F2A-AADC-P2A-TH;  
            15) AADC-(G4S)3-GCH1-P2A-TH;  
            16) AADC-(G4S)5-GCH1-P2A-TH;  
            17) TH-(G4S)3-GCH1-P2A-AADC;  
30           18) GCH1-T2A-AADC-E2A-TH;  
            19) AADC-(G4S)3-GCH1-T2A-TH;

- 20) GCH1-E2A-TH-P2A-AADC;  
21) AADC-(G4S)3-GCH1-E2A-TH;  
22) GCH1-E2A-AADC-P2A-TH;  
23) AADC-(G4S)3-GCH1-(G4S)3-TH;  
5 24) GCH1-T2A-TH-E2A-AADC;  
25) GCH1-(G4S)3-TH-T2A-AADC;  
26) GCH1-(G4S)2-TH-T2A-AADC;  
27) GCH1-P2A-AADC-T2A-TH;  
28) TH-P2A-GCH1-P2A-AADC;  
10 29) TH-(G4S)3-GCH1-T2A-AADC;  
30) GCH1-(G4S)3-TH-E2A-AADC;  
31) GCH1-T2A-TH-(G4S)3-AADC;  
32) TH-P2A-GCH1-F2A-AADC;  
33) GCH1-F2A-TH-(G4S)3-AADC;  
15 34) TH-F2A-GCH1-F2A-AADC;  
35) TH-(G4S)3-GCH1-E2A-AADC;  
36) TH-G4S-GCH1-E2A-AADC;  
37) GCH1-P2A-TH-(G4S)3-AADC;  
38) AADC-F2A-GCH1-P2A-TH;  
20 39) TH-T2A-GCH1-(G4S)3-AADC;  
40) GCH1-E2A-TH-(G4S)3-AADC;  
41) TH-E2A-GCH1-(G4S)3-AADC;  
42) TH-T2A-GCH1-E2A-AADC;  
43) AADC-F2A-GCH1-F2A-TH;  
25 44) TH-F2A-GCH1-(G4S)3-AADC;  
45) GCH1-(G4S)3-TH-(G4S)3-AADC;  
46) TH-(G4S)3-GCH1-F2A-AADC;  
47) TH-E2A-GCH1-T2A-AADC;  
48) AADC-P2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
30 49) TH-(G4S)3-GCH1-(G4S)3-AADC;  
50) AADC-F2A-TH-(G4S)3-GCH1;

- 51) TH-F2A-AADC-F2A-GCH1;  
52) TH-(G4S)3-AADC-T2A-GCH1;  
53) TH-(G4S)3-AADC-E2A-GCH1;  
54) AADC-P2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
5 55) TH-F2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
56) AADC-F2A-GCH1-(G4S)3-TH;  
57) TH-P2A-AADC-F2A-GCH1;  
58) TH-P2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
59) GCH1-(G4S)3-TH-P2A-AADC;  
10 60) TH-T2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
61) TH-T2A-AADC-E2A-GCH1;  
62) GCH1-(G4S)3-TH-F2A-AADC;  
63) TH-E2A-AADC-(G4S)3-GCH1;  
64) AADC-E2A-GCH1-T2A-TH;  
15 65) GCH1-P2A-TH-F2A-AADC;  
66) TH-(G4S)3-AADC-(G4S)3-GCH1;  
67) TH-E2A-AADC-T2A-GCH1;  
68) GCH1-P2A-AADC-F2A-TH;  
69) AADC-T2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
20 70) AADC-T2A-GCH1-E2A-TH;  
71) TH-F2A-AADC-P2A-GCH1;  
72) AADC-E2A-TH-(G4S)3-GCH1;  
73) AADC-P2A-GCH1-F2A-TH;  
74) TH-(G4S)3-AADC-F2A-GCH1;  
25 75) AADC-P2A-TH-F2A-GCH1;  
76) AADC-(G4S)3-TH-P2A-GCH1;  
77) AADC-T2A-TH-E2A-GCH1;  
78) AADC-(G4S)3-TH-E2A-GCH1;  
79) AADC-E2A-TH-T2A-GCH1; 或  
30 80) AADC-(G4S)3-TH-F2A-GCH1。  
14. 权利要求 13 的 AAV 载体, 其中所述 AAV 载体包含 SEQ ID NO: 19-

21 中任一项所示的核酸序列。

15. 权利要求 1-14 中任一项的 AAV 载体，其还包含可操作地连接至所述编码 TH、GCH1 和 AADC 的核酸序列的启动子；优选地，其中所述启动子选自：CBH 启动子、嵌合型突触蛋白 I(Synapsin I)启动子、CMV 启动子、  
5 CAG 启动子、CAGG 启动子或 CASI 启动子。

16. 权利要求 15 的 AAV 载体，其中所述启动子包含与 SEQ ID NO: 1-6 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的核酸序列；优选地，所述启动子包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的核酸序列；更优选地，所述启动子包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。

- 10 17. 权利要求 1-16 中任一项的 AAV 载体，其中所述 AAV 载体还包含选自 KOZAK 序列、SV40 病毒的聚腺苷酸化信号(SV40 poly A)和反向末端重复(ITR)的一个或多个元件。

18. AAV 病毒颗粒，其包含权利要求 1-17 中任一项的 AAV 载体，以及衣壳蛋白。

- 15 19. 权利要求 18 的 AAV 病毒颗粒，其中所述衣壳蛋白来源于选自以下血清型的 AAV：AAV5、AAV9、AAVPHP.eB、AAVPHP.S 或 AAVPHP.B。

20. 权利要求 19 的 AAV 病毒颗粒，其中所述衣壳蛋白包含与 SEQ ID NO: 33-37 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列；优选地，所述衣壳蛋白包含选自  
20 SEQ ID NO: 34 或 37 所示的氨基酸序列；更优选地，所述衣壳蛋白包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

21. 组合物，其包含权利要求 1-17 中任一项的 AAV 载体和编码衣壳蛋白的包装质粒，以及任选的辅助质粒。

22. 权利要求 21 的组合物，其中所述包装质粒还包含编码 Rep 蛋白的  
25 核酸序列，所述 Rep 蛋白来源于具有 AAV2 或 AAVPHP.B 血清型的 AAV。

23. 权利要求 22 的组合物，其中所述 Rep 蛋白包含与 SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 46 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列。

24. 权利要求 21-23 中任一项的组合物，其中所述包装质粒包含与 SEQ  
30 ID NO: 24-28 和 48 中任一项具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的核酸序列；优选地，所述包装质粒包含选

自 SEQ ID NO:25 或 28 所示的核酸序列；更优选地，所述包装质粒包含 SEQ ID NO: 25 所示的核酸序列。

25. 权利要求 21-24 中任一项的组合物，其中所述辅助质粒包含与 SEQ ID NO:29 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的核酸序列。

26. 权利要求 21-25 中任一项的组合物，其还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

27. 组合物，其包含权利要求 18-20 中任一项的 AAV 病毒颗粒；任选地，所述组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

10 28. 权利要求 26 或 27 的组合物，其包含磷酸缓冲液、氯化钠和表面活性剂，所述表面活性剂优选泊洛沙姆 188。

29. 细胞，其包含权利要求 1-17 中任一项的 AAV 载体、权利要求 18-20 中任一项的 AAV 病毒颗粒或权利要求 21-28 中任一项的组合物。

15 30. 权利要求 29 的细胞，所述细胞为神经细胞，按功能区分，所述神经细胞选自：抑制性神经元（优选地，所述细胞为中棘神经元、中间神经元）、兴奋性神经元（优选地，所述细胞为多巴胺能神经元）、小神经胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞或施旺细胞；按脑区区分，所述细胞为中脑纹状体神经元和胶质细胞。

20 31. 权利要求 1-17 中任一项的 AAV 载体、权利要求 18-20 中任一项的 AAV 病毒颗粒、权利要求 21-28 中任一项的组合物、权利要求 29 或 30 的细胞在制备用于预防和/或治疗受试者多巴胺缺陷引起的疾病的药物中的用途。

32. 权利要求 31 的用途，其中所述疾病为帕金森病。