

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年7月20日 (20.07.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/134560 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C12N 15/113* (2010.01) *A61P 27/02* (2006.01)

*C12N 15/63* (2006.01) *A61P 27/06* (2006.01)

*A61K 48/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/070867

(22) 国际申请日: 2023年1月6日 (06.01.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202210025336.8 2022年1月11日 (11.01.2022) CN

(71) 申请人: 广州瑞风生物科技有限公司(GUANGZHOU REFORGENE MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔区开源大道188号自编四栋801房, Guangdong 510700 (CN)。

(72) 发明人: 梁峻彬(LIANG, Junbin); 中国广东省广州市黄埔区开源大道188号自编四栋801房, Guangdong 510700 (CN)。 欧家裕(OU, Jiayu); 中国广东省广州市黄埔区开源大道188号自编四栋801房, Guangdong 510700 (CN)。 徐辉(XU, Hui); 中国广东省广州市黄埔区开源大道188号自编四栋801房, Guangdong 510700 (CN)。 林思妙(LIN, Simiao); 中国广东省广州市黄埔区开源大道188号自编四栋801房, Guangdong 510700 (CN)。

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

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: NUCLEOTIDE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种核苷酸及其应用

(57) Abstract: Provided are a nucleotide and a use thereof. Specifically provided is a nucleic acid molecule that specifically binds to exon 13 of USH2A pre-mRNA. Also provided is a preparation method for and use of the nucleic acid molecule. The nucleic acid molecule has the ability to specifically bind to sequence 3' of exon 13 of USH2A pre-mRNA or a fragment thereof, can perform targeted interference on Pre-mRNA splicing, and can increase the proportion of single skipping of exon 13 of USH2A pre-mRNA, so that safety can be ensured while efficiency is significantly improved.

(57) 摘要: 提供了一种核苷酸及其应用, 具体提供了一种特异性结合USH2A pre-mRNA第13号外显子的核酸分子, 还提供了所述核酸分子的制备方法和用途。核酸分子具有特异性结合USH2A pre-mRNA第13号外显子的3'段序列或其片段的能力, 可以靶向干扰pre-mRNA剪接, 并且可以增加USH2A pre-mRNA第13号外显子单跳读的比例, 在显著提升效率的同时, 可以保证安全性。



WO 2023/134560 A1

## 一种核苷酸及其应用

### 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种核苷酸及其应用。

### 背景技术

Usher 综合征(Usher Syndrome)是一类遗传性疾病，又称耳聋-色素性视网膜炎综合征，其特征是不同程度的先天性感音神经性耳聋，以及色素性视网膜炎（RP）引起的进行性视力丧失。其中，USH2A 基因突变是 II 型 Usher 综合征的最常见原因，涵盖超过 50% 的 Usher 综合征患者。同时，USH2A 基因的突变也是导致非综合征性视网膜色素变性（NSRP）的重要原因之一。USH2A 基因的第 13 号外显子、第 50 号外显子和第 40 号内含子的突变会引发 Usher 综合征。迄今为止已经鉴定出超过 1000 个分布在整个 USH2A 基因中的致病性突变，其中的第 13 号外显子是 USH2A 基因中突变最频繁的外显子，约占 35%。USH2A 编码区长度约为 15.6kb，目前的常规基因治疗递送方法（如重组慢病毒、重组腺相关病毒等）难以包装如此庞大的编码序列，导致难以通过直接递送 USH2A 进行治疗。

因此，本领域急需一种能够提高外显子跳读的效率，保证治疗安全性的 USH2A 基因突变相关疾病的治疗方法。

### 发明内容

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子具有特异性结合 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753。

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子具有特异性结合 SEQ ID NO: 1 所示序列或其片段的能力。

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子与 SEQ ID NO: 1 所示序列中的 16 个或更多的连续核苷酸互补。

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 1 所示序列、或其互补序列中的 16 个或更多的连续核苷酸。

一方面，本申请提供了一种基因表达盒，所述基因表达盒包含或编码如本申请所述的核酸分子的核苷酸序列，以及任意的表达调控元件。

一方面，本申请提供了一种载体，所述载体包含或编码本申请所述的核酸分子的核苷酸序列，和/或本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列。

一方面，本申请提供了一种病毒颗粒，所述病毒颗粒包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，和/或本申请所述的载体。

一方面，本申请提供了一种细胞，所述细胞包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，本申请所述的载体，和/或本申请所述的病毒颗粒。

一方面，本申请提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，本申请所述的载体，本申请所述的病毒颗粒，和/或本申请所述的细胞，以及任选的药学可接受的载剂。

一方面，本申请提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，本申请所述的载体，本申请所述的病毒颗粒，本申请所述的细胞，和/或本申请所述的药物组合物。

一方面，本申请提供了一种制备本申请所述的核酸分子的方法，包含表达和/或合成能够结合 USH2A 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段的所述核酸分子，所述 USH2A 第 13 号外显子的 3' 段序列的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753。

一方面，本申请提供了一种抑制 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子表达和/或功能的方法，包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种使 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的方法，包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种制备缺失第 13 号外显子的成熟 USH2A mRNA 的方法，包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种降低包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白水平的方法，包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种制备不包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白和/或增加不包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白数量的方法，包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物

和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种恢复突变 Usherin 蛋白的功能的方法，包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗 USH2A 基因突变引发的疾病。

本申请提供了一种具有特异性结合 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段的能力的核酸分子。目前有针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AONs, Antisense oligonucleotides)的技术。然而，现有的 AON 在促进第 13 号外显子跳读的同时，也促进第 12 号外显子与第 13 号外显子共同跳读，甚至有的 AON 处理导致的全是第 12 号外显子与第 13 号外显子双跳读，而没有单跳读。而第 12 号外显子全长 196bp，非 3 整数倍，缺失会导致移码突变以及 USH2A 蛋白失活。例如，本申请所述的 USH2A 的外显子 12 为人的 USH2A 外显子 12。例如，本申请所述的 USH2A 的外显子 13 为人的 USH2A 外显子 13。本申请提供的寡核苷酸可以靶向干扰 pre-mRNA 剪接，并且可以增加第 13 号外显子单跳读的比例，在显著提升效率的同时，可以保证安全性。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

## 附图说明

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

图 1 显示的是，本申请 U7-snRNA 的结构和作用示意图。

图 2 显示的是，不同靶位点的 AON 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效果。

图 3A-3B 显示的是，不同靶位点 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效果。

图 4A-4B 显示的是，不同靶位点的 U7 snRNA 组合诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效率。

图 5 显示的是，带有 hnRNP A1 的 snRNA 载体示意图。

图 6A-6B 显示的是，U7-hnRNP A1-snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效率。

图 7 显示的是，不同靶点的 snRNA 高效诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子单独剪接跳跃效率。

图 8A 显示的是，在 WERI 细胞中检测化学合成的 U7 snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的效率。泳道 1: 50pmol 化学合成和修饰的 U7-snRNA#30-#4; 泳道 2: 50pmol 化学合成和修饰的 U7-snRNA#26-#16; 泳道 3: 50pmol AON1; 泳道 4: 50pmol AON2; 泳道 5: EGFP; 泳道 6: GL DNA Marker 2000。图 8B 显示的是，RT-PCR 电泳条带定量分析柱状图。▲E12-E13 表示同时剪接跳过第 12 号外显子和第 13 号外显子的 USH2A mRNA，总▲表示剪接跳过第 13 号外显子或同时剪接跳过第 12 号外显子和第 13 号外显子的 USH2A mRNA 总和。

## 具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

## 术语定义

在本申请中，术语“分离”通常是指包括从天然来源中存在的其他物质中分离的分子。例如分离的核酸可以是指从天然来源中存在的其他物质中分离的核酸分子。例如，本申请中分离的分子可以是人工的分子，例如人工合成的分子。

在本申请中，术语“表达调控元件”通常是指针对基因的转录和翻译和/或控制蛋白质在例如期望的宿主细胞中体内表达而提供的序列。

在本申请中，术语“病毒颗粒”通常是指一种核酸载体。例如，病毒颗粒可以是病毒载体，可以用于充当核酸递送媒介物，包含包装在病毒颗粒内的载体基因组(例如 DNA 和/或 RNA)。

在本申请中，术语“反义寡核苷酸”通常是指具有允许与靶核酸的对应片段杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。

在本申请中，术语“核酸”通常是指单体核苷酸组成的分子。核酸包括但不限于核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、单链核酸、双链核酸、小干扰核糖核酸(siRNA)和微RNA(miRNA)。

在本申请中，术语“核小 RNA”通常是指一种小的核酸分子。例如，核小 RNA 可以参与真核生物细胞核中 RNA 的加工。例如，核小 RNA 可以与相关蛋白结合在一起成为小胞核核糖核蛋白 (snRNPs 即 small nuclear ribonucleoproteins)，参与信使 RNA 前体 (pre-mRNA) 的剪接。

在本申请中，术语“互补”或“碱基互补性”通常是指反义寡核苷酸的核酸碱基与靶核酸中的相应核酸碱基进行准确碱基配对(即杂交)的能力，且由相应核酸碱基之间的沃森-克里克 (Watson-Crick) 相互作用力结合介导。

在本申请中，术语“基因表达盒”通常是指可在特定限制性位点或通过同源重组插入核酸或多核苷酸中的 DNA 区段。例如，基因表达盒包含编码目标核酸的多核苷酸片段。

在本申请中，术语“基因组定位”通常是指描述目的 DNA 区域的染色体坐标。例如，染色体坐标可以与 2009 年 2 月发布的人类基因组数据库 Hg19 版(或称作“Hg19 坐标”)一致。例如，本申请的 DNA 区域可以是来源于由 Hg19 坐标限定的区域。

在本申请中，术语“剪接跳跃”通常是指 RNA 分子在加工过程中，被剪接跳跃的序列不被包含在加工后的 RNA 分子中。例如，通过剪接跳跃，一部分序列可以被跳读。例如，通过剪接跳跃，一部分序列可以不被包含在剪接后的 RNA 分子中。

在本申请中，术语“经修饰的寡核苷酸”通常是指包含至少一个修饰的核苷间键、修饰的糖和/或修饰的核碱基的寡核苷酸。在本申请中，术语“2'-O-甲氧基乙基”(又为 2'-MOE 和 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub> 以及 MOE)通常是指呋喃糖环的 2'位的 O-甲氧基-乙基修饰。2'-O-甲氧基乙基修饰的糖是修饰的糖。在本申请中，术语“2'-MOE 核苷”(又为 2'-O-甲氧基乙基核苷)通常是指包含 MOE 修饰的糖部分的核苷。在本申请中，术语“2'-取代的核苷”通常是指在呋喃糖环的 2'位处包含除 H 或 OH 以外的取代基的核苷。在某些实施方案中，2'-取代的核苷包括具有双环糖修饰的核苷。在本申请中，术语“5-甲基胞嘧啶”通常是指使用连接至 5'位置的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是修饰的核碱基。

在本申请中，术语“经修饰的磷酸键”通常是指相对于来自天然存在的核苷间键(即，磷酸二酯核苷间键)，经修饰的磷酸键存在的取代或任何变化。

在本申请中，术语“茎环结构域”通常是指核酸分子自身通过碱基配对而形成二级结构。例如，通过碱基配对形成的双链部分为“茎部”，配对碱基之间的序列则形成“环部”。

在本申请中，术语“连续”通常是指彼此紧邻的两个或更多个核碱基。

在本申请中，术语“外显子”通常是指存在于 mRNA 成熟形式中的基因的一部分。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够转运与它连接的另一核酸的核酸分子。

在本申请中，术语“Cas 酶”通常是指 CRISPR 相关核酸酶，一种 DNA 核酸内切酶。例如其可在特定的 DNA 序列处形成双链断裂。Cas 核酸酶通常可以与 CRISPR 序列互补，能够使用 CRISPR 序列作为指导（guide），从而识别和切割特定的 DNA 链。

在本申请中，术语“pre-mRNA”通常是指前体 mRNA。例如，初级转录物是通过 DNA 转录合成的单链核糖核酸产物，所述转录物可以未经修饰。例如，前体 mRNA 中外显子和内含子的基因组结构维持不变。

在本申请中，术语“sm 蛋白”通常是指能够结合 snRNAs 形成小核核糖核蛋白复合物 snRNP 的蛋白或其变体。

在本申请中，术语“USH2A”通常是指一种基因，其编码 Usherin 蛋白。例如，USH2A (Usher Syndrome Type-2A) 的 NCBI 基因登录号可以是 7399。本申请中，USH2A 可以涵盖其未加工形式、任何的加工形式、其变体或包含其功能活性片段的物质。

在本申请中，术语“施用”通常是指向动物提供药剂，且包括但不限于由医学专业人员施用及自行施用。

## 发明详述

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子可以具有特异性结合 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3' 段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753（对应于 NCBI 数据库 GRch38 版本）。例如，本申请的所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246626、Chr1: 216246563-216246621、Chr1: 216246563-216246624、Chr1: 216246563-216246617、Chr1: 216246563-216246591、Chr1: 216246563-216246596、Chr1: 216246563-216246593、Chr1: 216246563-216246590、和/或 Chr1: 216246563-216246586。例如，本申请所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246626、Chr1: 216246567-216246626、Chr1: 216246570-216246626、Chr1: 216246594-216246626、Chr1: 216246598-216246626、和/或 Chr1: 216246603-216246626。例如，本申请所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246621、Chr1: 216246567-216246621、Chr1: 216246570-216246621、Chr1: 216246594-216246621、Chr1: 216246598-216246621、和/或 Chr1: 216246603-216246621。例

如，本申请所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246624、Chr1: 216246567-216246624、Chr1: 216246570-216246624、Chr1: 216246594-216246624、Chr1: 216246598-216246624、和/或 Chr1: 216246603-216246624。例如，本申请所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246617、Chr1: 216246567-216246617、Chr1: 216246570-216246617、Chr1: 216246594-216246617、Chr1: 216246598-216246617、和/或 Chr1: 216246603-216246617。例如，本申请所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246593、Chr1: 216246567-216246593、和/或 Chr1: 216246570-216246593。例如，本申请所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246626，其序列可以如 SEQ ID NO: 39 所示。例如，可以是 70%、80%、90%、95%、98%或 99%以上的碱基配对的结合。例如，可以是对突变序列的结合。例如，所述结合可以包含 1bp、2bp、3bp、4bp 或 5bp 错配。

USH2A 基因第 13 号外显子可以包含突变，突变可以包括 c.2802T>G (p.Cys934Trp, 中国患者频率最高突变)、c.2299delG (p.E767SfsX21, 欧美患者频率最高突变)、c.2276G>T (氨基酸变化:p.C759F)、C.2522C>A(p.S841Y)、c.2242C>T(p.Gln748X)、c.2541C>A(C847X)、c.2761delC (Leu921fs)和 C.2776C>T(p.R926C)、C.2209C>T、C.2310delA、c.2391\_2392delITG、c.2431A>T、C.2431\_2432delAA、c.2440C>T、c.2525dup、C.2610C>A、C.2755C>T、C.2176T>C、C.2236C>G、c.2296T>C、和/或 C.2332G>T。

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子可以具有特异性结合 SEQ ID NO: 1 所示序列或其片段的能力。例如，可以是 70%、80%、90%、95%、98%或 99%以上的碱基配对的结合。例如，可以是对突变序列的结合。例如，所述结合可以包含 1bp、2bp、3bp、4bp 或 5bp 错配。

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子可以与 SEQ ID NO: 1 所示序列中的 16 个或更多的连续核苷酸互补。例如，可以是 70%、80%、90%、95%、98%或 99%以上碱基配对的互补。例如，可以是对突变序列的互补。例如，所述互补可以包含 1bp、2bp、3bp、4bp 或 5bp 错配。

一方面，本申请提供了一种核酸分子，所述核酸分子可以包含 SEQ ID NO: 1 所示序列、或其互补序列中的 16 个或更多的连续核苷酸。例如，可以是 70%、80%、90%、95%、98%或 99%以上碱基配对的互补。例如，可以是对突变序列的互补。例如，所述互补可以包含 1bp、2bp、3bp、4bp 或 5bp 错配。



例如，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸。例如，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段互补的 22 个至 27 个核苷酸。例如，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段互补的 15 个至 27 个、16 个至 27 个、18 个至 27 个、20 个至 27 个、22 个至 27 个、25 个至 27 个、15 个至 25 个、16 个至 25 个、18 个至 25 个、20 个至 25 个、22 个至 25 个、15 个至 22 个、16 个至 22 个、18 个至 22 个、20 个至 22 个、15 个至 20 个、16 个至 20 个、18 个至 20 个、15 个至 18 个、或 16 个至 18 个核苷酸。例如，识别结构域序列长度可以为 16bp 以上，进一步可以为 18bp-40bp，再进一步可以为 20bp-27bp。在一些化学合成和修饰的 U7 snRNA 实施例中，可沿着靶序列的 5' 端或/和 3' 端继续通过反向互补配对延伸识别结构域序列长度，优选延伸后的单个识别结构域序列长度小于或等于 40bp。

例如，所述核酸分子可以包含至少 16 个核苷酸。例如，所述核酸分子可以包含 22 至 27 个核苷酸。例如，所述核酸分子可以包含 15 个至 27 个、16 个至 27 个、18 个至 27 个、20 个至 27 个、22 个至 27 个、25 个至 27 个、15 个至 25 个、16 个至 25 个、18 个至 25 个、20 个至 25 个、22 个至 25 个、15 个至 22 个、16 个至 22 个、18 个至 22 个、20 个至 22 个、15 个至 20 个、16 个至 20 个、18 个至 20 个、15 个至 18 个、或 16 个至 18 个核苷酸。例如所述核酸分子是 AON 分子。

例如，所述核酸分子可以包含至少 60 个核苷酸。例如，所述核酸分子可以包含至少 65 个、至少 70 个、至少 80 个、至少 90 个、至少 100 个、至少 150 个、至少 200 个、或 500 个核苷酸。例如所述核酸分子是 snRNA 分子。例如，snRNA 分子可以包含更多的元件，而可以具有理论上无限长的长度。在一些实施例中，化学合成的 snRNA 序列总长度大于等于 96bp。在一些实施例中，化学合成的 snRNA 两侧的 3-40 个碱基为经过修饰并通过特殊磷酸酯键连接的。

例如，所述核酸分子可以包含互补于选自以下组基因组定位对应的序列：Chr1: 216246603-216246626、Chr1: 216246598-216246621、Chr1: 216246598-216246624、Chr1: 216246594-216246617、Chr1: 216246570-216246593、Chr1: 216246570-216246591、Chr1: 216246570-216246596、Chr1: 216246570-216246593、Chr1: 216246570-216246596、Chr1: 216246567-216246590、和 Chr1: 216246563-216246586。

例如，所述核酸分子可以包含互补于 SEQ ID NO: 10-21 中任一项所示的序列。例如，可以是 70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 以上碱基配对的互补。例如，可以是对突变序列

的互补。例如，所述互补可以包含 1bp、2bp、3bp、4bp 或 5bp 错配。在一些化学合成和修饰的 U7 snRNA 实施例中，识别结构域可以与靶位点反向互补配对中可存在 0-5 个错配核苷酸，例如可以为 0-1 个。

例如，所述核酸分子可以包含 SEQ ID NO: 10-21 中任一项所示的序列。

例如，所述核酸分子可以包含经修饰的核苷酸。

例如，所述经修饰的核苷酸可以包含选自以下组的修饰：2'-O-烷基、2'-O-甲氧基和/或 2'-O-甲氧基乙基。

例如，所述经修饰的核苷酸可以包含选自以下组的修饰：2'-O-甲基和/或 2'-O-乙基。

例如，所述核酸分子可以包含至少一个经修饰的核苷酸。在一些实施例中，仅 snRNA 两侧的 1-10、6-80 个或者全部的核苷酸都进行了修饰和特殊磷酸酯键连接，所述修饰是一种或两种以上的修饰组合，所述特殊磷酸酯键是一种或者两种以上磷酸酯键的组合。在一些实施例中，所述化学合成的 U7 snRNA 中所有的核苷酸均通过硫代磷酸酯键相互连接，且均进行了 2'-O-甲氧基修饰。在一些实施例中，仅 snRNA 两侧的 3 个核苷酸通过硫代磷酸酯键连接，并进行了 2'-O-甲氧基修饰。在一些化学合成和修饰的 U7 snRNA 优选实施例中，U7 snRNA 的 5'端首个核苷酸优选为腺苷酸（A），若识别结构域 5'端的首个核苷酸不是腺苷酸（A），则在 5'端连接腺苷酸（A）。

例如，所述核酸分子的 5'端可以包含至少一个经修饰的核苷酸。例如，所述核酸分子的 5'端可以包含 1 个至 3 个经修饰的核苷酸。例如，所述核酸分子的 5'端可以包含 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个经修饰的核苷酸。

例如，所述核酸分子的 3'端可以包含至少一个经修饰的核苷酸。例如，所述核酸分子的 3'端可以包含 1 个至 3 个经修饰的核苷酸。例如，所述核酸分子的 3'端可以包含 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个经修饰的核苷酸。

本申请所述的核酸分子，所述核酸分子中的核苷酸分子可以包含选自以下组：6'-修饰的双环核苷、5'-修饰的双环核苷、6'-双取代双环核苷、四氢吡喃核苷类似物和/或 2'-脱氧 2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷酸（2'-FANA 修饰的核苷酸）。

例如，所述核酸分子经修饰的磷酸键。

例如，所述核苷酸分子经过选自以下组的磷酸键连接：硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、磷酸三酯连接、烷基磷酸酯连接、氨基烷基磷酸三酯连接、亚烷基磷酸酯连接、次磷酸酯连接、氨基磷酸酯连接和氨基烷基氨基磷酸酯连接、硫代氨基磷酸酯连接、硫羰基烷基磷酸酯连接、硫羰基烷基磷酸三酯连接、硫代磷酸酯连接、硒代磷酸酯连接和/或硼烷基磷酸

酯连接。

例如，所述经修饰的磷酸键可以包含选自以下组：磷酸二酯键、磷酸三酯键、硫代磷酸酯键(5'O-P(S)O-3O-、5'S-P(O)O-3'-O-和 5'O-P(O)O-3'S-)、二硫代磷酸酯键、Rp-硫代磷酸酯键、Sp-硫代磷酸酯键、硼烷磷酸酯键、亚甲基键(甲基亚氨基)、酰胺键(3'-CH<sub>2</sub>-CO-NH-5'和 3'-CH<sub>2</sub>-NH-CO-5')、甲基膦酸酯键、3'-硫代甲缩醛键、(3'S-CH<sub>2</sub>-O5')、酰胺键(3'CH<sub>2</sub>-C(O)NH-5')、和/或氨基磷酸酯基团。

例如，所述经修饰的磷酸键可以包含选自以下组：硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、酰胺磷酸酯键和/或硼烷磷酸酯键。

例如，所述经修饰的磷酸键可以包含选自以下组：磷酸二酯键、磷酸三酯键、硫代磷酸酯键(5'O-P(S)O-3O-、5'S-P(O)O-3'-O-和 5'O-P(O)O-3'S-)、二硫代磷酸酯键、Rp-硫代磷酸酯键、Sp-硫代磷酸酯键、硼烷磷酸酯键、亚甲基键(甲基亚氨基)、酰胺键(3'-CH<sub>2</sub>-CO-NH-5'和 3'-CH<sub>2</sub>-NH-CO-5')、烷基磷酸酯键、酰胺磷酸酯键、甲基膦酸酯键、3'-硫代甲缩醛键、(3'S-CH<sub>2</sub>-O5')、酰胺键(3'CH<sub>2</sub>-C(O)NH-5')和/或氨基磷酸酯基团。

例如，所述核酸分子可以包含至少一个经修饰的磷酸键。

例如，所述核酸分子的 5'端可以包含至少一个经修饰的磷酸键。例如，所述核酸分子的 5'端可以包含 1 个至 3 个经修饰的磷酸键。例如，所述核酸分子的 5'端可以包含 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个经修饰的磷酸键。

例如，所述核酸分子的 3'端可以包含至少一个经修饰的磷酸键。例如，所述核酸分子的 3'端可以包含 1 个至 3 个经修饰的磷酸键。例如，所述核酸分子的 5'端可以包含 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个经修饰的磷酸键。

例如，所述核酸分子可以包含 DNA 和/或 RNA。

例如，所述核酸分子为单链的或双链的。

例如，所述核酸分子可以包含反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide)、shRNA、siRNA、miRNA 和/或适体(aptamer)。

例如，所述核酸分子可以包含核小 RNA (Small nuclear RNA)。

例如，所述核小 RNA 可以包含 U1 核小 RNA 和/或 U7 核小 RNA。例如，所述核小 RNA 可以包含 U1、U2、U3、U4、U5、U6 和/或 U7 核小 RNA。例如，所述核小 RNA 可以包含 U1 核小 RNA。例如，所述核小 RNA 可以包含 U7 核小 RNA。

例如，所述核酸分子不结合 Cas 酶。例如，所述核酸分子可以不包含能够结合 Cas 酶的结构。例如，所述 Cas 酶为 Cas13 酶。

例如，所述核酸分子可以包含茎环结构域或其衍生结构。例如，所述茎环结构域可以包含 SEQ ID NO: 6 所示的序列。

例如，所述核酸分子可以包含能够结合 sm 蛋白的结构域或其衍生结构。例如，所述能够结合 sm 蛋白的结构域可以包含 SEQ ID NO: 5 所示的序列。例如，所述能够结合 sm 蛋白的结构域可以包含优化后的 smOPT 序列。例如，所述结合 sm 蛋白的结构域可以包含人源的、鼠源的或猪源的。

例如，所述核酸分子可以包含能够募集剪接调控蛋白的结构域。例如，所述核酸分子可以包含能够结合选自以下组蛋白的结构域：SRSF1(Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1)、RBM4 (RNA Binding Motif Protein 4)、DAZAP1 (DAZ Associated Protein 1)、和 SR (Serine And Arginine-Rich Protein)。

例如，所述核酸分子可以包含能够结合 hnRNP A1 蛋白的结构域。例如，所述能够结合 hnRNP A1 蛋白的结构域可以包含 SEQ ID NO: 30 所示的序列。

例如，本申请的核酸分子有特异性结合 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸，所述核酸分子可以包含至少 16 个核苷酸。

例如，本申请的核酸分子有特异性结合 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸，所述核酸分子可以包含至少 60 个核苷酸。

例如，本申请的核酸分子有特异性结合 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸，所述核酸分子可以包含至少 60 个核苷酸，化学合成的 snRNA 两侧的 3-40 个碱基为经过修饰并通过特殊磷酸酯键连接的。

例如，本申请的核酸分子有特异性结合 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸，所述核酸分子可以包含至少 60 个核苷酸，化学合成的 snRNA 两侧的 3-40 个碱基为经过 2'-甲氧基修饰并通过硫代磷酸酯键连接的。

例如，本申请的核酸分子有特异性结合 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753，所述核酸分子包含可以与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸，所述核酸分子可以包含至少 60 个核苷酸，化学合成的 snRNA 两侧的 3 个碱基为经过 2'-甲氧基修饰并通过硫代磷酸酯键连接的，所述核酸分子可以包含能够结合 sm 蛋白的结构域或其衍生结构。任选地，所述核酸分子可以包含能够结合 hnRNP A1 蛋白的结构域。

一方面，本申请提供了一种基因表达盒，所述基因表达盒可以包含或编码本申请所述的核酸分子的核苷酸序列，以及任选的表达调控元件。

一方面，本申请提供了一种载体，所述载体可以包含或编码本申请所述的核酸分子的核苷酸序列，和/或本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列。一方面，本申请提供了一种病毒颗粒，所述病毒颗粒可以包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，和/或本申请所述的载体。例如本申请的载体可以是 pUC57，还可以选自 pAAV-CMV(TAKARA 公司，Code No. 6650)、慢病毒、转座子和本领域已知的核酸载体。例如，本申请可以通过 AAV 递送 U7 snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃，所述 AAV 的衣壳蛋白可以是天然来源的，也可以是基于天然来源衣壳蛋白的变体、或进行定向进化、或进行氨基酸/肽段合理改造（密码子优化、嵌合不同血清型功能肽段等）等，提升组织器官亲嗜性、免疫原性、提升转染效率等特性，如 AAV2.5、AAV2i8、AAV-TT、AAV9.HR、CAM130 等。所述天然来源的 AAV 衣壳蛋白可以是来源于动物体的，也可以是来源于植物的，所述来源于动物体的 AAV 衣壳蛋白可以是来源于人体的（如 AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 和 AAV9 等），也可以是来源于非人灵长类动物（如 AAVrh.8、AAVrh.10 和 AAVrh.43），也可以是来源于小鼠、猪等脊椎动物，也可以是来源于昆虫。本发明 AAV 质粒体系中，例如，AAV ITR 血清型应于 Rep 基因血清型一致，可以与 Cap 基因血清型可不一致。

一方面，本申请提供了一种细胞，所述细胞可以包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，本申请所述的载体，和/或本申请所述的病毒颗粒。

一方面，本申请提供了一种药物组合物，所述药物组合物可以包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，本申请所述的载体，本申请所述的病毒颗粒，和/或本申请所述的细胞，以及任选的药学可接受的载剂。

例如，所述药物组合物可以包含第一载体和第二载体，所述第一载体可以包含本申请所述的核酸分子，所述第二载体可以包含可以具有特异性结合 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显

子及其两侧区域或其片段的能力的核酸分子。例如，第二载体可以包含具有特异性结合选自 USH2A pre-mRNA 第 12 号内含子-第 13 号外显子-第 13 号内含子的能力的核酸分子，例如可以选自第 13 号外显子及两侧临近靶区域。例如可以选自 chr1: 216246563-216247246 对应的 pre-mRNA 区域。例如，可以是靶点序列不完全一样的两个或两个以上的 U7-snRNA 的组合使用。

例如，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的两侧区域可以包含 USH2A pre-mRNA 第 12 号内含子和/或第 13 号内含子。

一方面，本申请提供了一种试剂盒，所述试剂盒可以包含本申请所述的核酸分子，本申请所述的基因表达盒的核苷酸序列，本申请所述的载体，本申请所述的病毒颗粒，本申请所述的细胞，和/或本申请所述的药物组合物。

一方面，本申请提供了一种制备本申请所述的核酸分子的方法，可以包含表达和/或合成能够结合 USH2A 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段的所述核酸分子，所述 USH2A 第 13 号外显子的 3' 段序列的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753。

一方面，本申请提供了一种抑制 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子表达和/或功能的方法，可以包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。例如，抑制 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子表达和/或功能可以是指使得成熟的 USH2A mRNA 中可以不包含第 13 号外显子表达产物的区域。

一方面，本申请提供了一种使 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的方法，可以包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种制备缺失第 13 号外显子的成熟 USH2A mRNA 的方法，可以包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种降低可以包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白水平的方法，可以包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。

一方面，本申请提供了一种制备可以不包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白和/或增加不包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白数量的方法，可以包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的

药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。例如，本申请制备的 Usherin 蛋白中不包含第 13 号外显子表达的多肽或其突变体。

一方面，本申请提供了一种恢复突变 Usherin 蛋白的功能的方法，可以包含提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的病毒颗粒、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。例如，通过剪接跳跃第 13 号外显子，本申请制备的 Usherin 蛋白保持或基本保持与健康者体内野生型 Usherin 蛋白的功能。例如，表达突变 Usherin 蛋白的受试者的视网膜色素变性的症状、先天性退行性神经性耳聋、前庭功能障碍等疾病得到缓解。

一方面，本申请提供了本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗 USH2A 基因突变引发的疾病。例如，所述疾病可以包含眼病和/或耳病。例如，所述疾病可以包含 Usher 综合症。例如，所述疾病可以包含 II 型 Usher 综合症。

一方面，本申请提供了一种预防和/或治疗 USH2A 基因突变引发的疾病的方法，可以包含施用本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒。例如，所述疾病可以包含眼病和/或耳病。例如，所述疾病可以包含 Usher 综合症。例如，所述疾病可以包含 II 型 Usher 综合症。

一方面，本申请提供了本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物和/或本申请所述的试剂盒，其用于预防和/或治疗 USH2A 基因突变引发的疾病。例如，所述疾病可以包含眼病和/或耳病。例如，所述疾病可以包含 Usher 综合症。例如，所述疾病可以包含 II 型 Usher 综合症。

USH2A 通常是指编码 Usherin 的基因。USH2A 定位于 1q41，其在基因组中的跨度超过 800kb，编码一个大型跨膜蛋白 Usherin，其锚定在视网膜感光细胞和内耳毛细胞的质膜上，是纤毛发育和维持必不可少的组分。在视网膜中，Usherin 是 USH2 复合物的重要部分，被认为在稳定光感受器的外节段发挥作用。USH2A 具有 2 个亚型，在视网膜细胞中主要的亚型含有 72 个 Exon，编码区长度约为 15.6kb。Usherin 蛋白的胞外部分包含许多重复的结构域，包括 10 个 Laminin EGF-like (LE) 结构域和 35 个 Fibronectin type 3(FN3)结构域。人 USH2A 第 13 号外显子长度为 642bp，编码着第 723~936 位氨基酸，为 Usherin 蛋白中 10 个 LE 结构域中的 4 个。

USH2A 基因的第 13 号外显子、第 50 号外显子和第 40 号内含子的突变会引发 Usher 综合征。迄今为止已经鉴定出超过 1000 个分布在整个 USH2A 基因中的致病性突变，其中的第

13 号外显子是 USH2A 基因中突变最频繁的外显子, 约占 35%。USH2A 基因第 13 号外显子的突变, 包括 c.2802T>G(p.Cys934Trp, 中国患者频率最高突变)、c.2299delG(p.E767SfsX21, 欧美患者频率最高突变)、c.2276G>T(氨基酸变化:p.C759F)、C.2522C>A(p.S841Y)、c.2242C>T(p.Gln748X)、c.2541C>A(C847X)、c.2761delC(Leu921fs)和 C.2776C>T(p.R926C)、C.2209C>T、C.2310delA、c.2391\_2392delTG、c.2431A>T、C.2431\_2432delAA、c.2440C>T、c.2525dup、C.2610C>A、C.2755C>T、C.2176T>C、C.2236C>G、c.2296T>C、C.2332G>T。

USH2A 编码区长度约为 15.6kb, 常规的基因治疗递送方法(如重组慢病毒、重组腺相关病毒等)难以包装如此庞大的编码序列, 因此难以通过直接递送 USH2A 进行治疗。小鼠 USH2A 的第 12 号外显子与人 USH2A 第 13 号外显子同源, 长度均为 642bp, 移除该外显子并没有造成后续的移码突变。有研究显示, 在敲除了小鼠 USH2A 的第 12 号外显子后, Usherin 依然能够正确定位并且行使正常的功能。对于包含致病性突变的人 USH2A 第 13 号外显子, 可以利用一系列手段使其发生跳读进行治疗。

通过 CRISPR/Cas 系统进行基因组 DNA 的编辑直接删除第 13 号外显子, 或者破坏 RNA 剪接相关的位点。使用片段删除可能存在风险, 如染色体重排、病毒整合、反向重新整合, 以及长时间表达 CAS 系统或者基于相对庞大的基因组背景进行两个 gRNA 诱导的双切的脱靶概率可能较高。通过使用单碱基编辑器修改上述剪接相关位点的关键碱基, 亦可促进外显子跳读。但是现有的单碱基编辑器可能无法通过单个 AAV 载体装载, 并且受 PAM、编辑窗口以及碱基转换类型的限制, 可能在剪接相关位点附近没有合适的 gRNA。通过反义寡核苷酸(AONs, Antisense oligonucleotides)靶向干扰 pre-mRNA 剪接, 促进外显子跳读的效率较高。AON 在促进第 13 号外显子跳读的同时, 也可能促进第 12 号外显子与第 13 号外显子共同跳读, 有的 AON 处理可能导致的全是双跳读。而第 12 号外显子全长 196bp, 非 3 整数倍, 缺失会导致移码突变, USH2A 蛋白失活。通过 U7 snRNA 靶向干扰 pre-mRNA 剪接, 促进外显子跳读的效率比 AON 更高, 而且增加第 13 号外显子单跳读的比例, 在显著提升效率的同时, 保证了安全性。本申请发现的效果, 即靶向本申请区域的 snRNA 分子促进外显子跳读效率, 高于同靶点的 AON 分子, 该效果在已知的现有技术中是非显而易见的。例如, 本领域靶向 Chr1: 216247218-216247241 的 AON 分子, 其跳读促进外显子效率效果显著优于靶向该区域的 snRNA 分子。细胞内有核小 RNA(small nuclearRNA, snRNA), 它是真核生物转录后加工过程中 RNA 剪接体(spliceosome)的主要成分, 通过与 snRNP 蛋白结合参与 mRNA 前体的加工过程。其长度在哺乳动物中约为 100-215 个核苷酸, 共分为 7 类, 由于含 U 丰富, 故编号为 U1~U7。修饰后的 U7 SnRNA 是通过将 U7 snRNA 的非规范 Sm 结合位点替换为衍生自



主要剪接体 U snRNPs 的共有序列，将 U7 snRNA 的 5'区的组蛋白结合序列改变为待修饰基因的互补序列，可以通过靶向外显子来诱导外显子的剪接跳跃。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的核苷酸、制备方法和用途等，而不用于限制本申请发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1

#### 合成 snRNA

snRNA 的骨架合成。野生型 U7 snRNA 包括茎环结构(scaffold)、U7 特异性的 Sm 序列 (AAUUUGUCUAG, SEQ ID NO: 2)和识别结构域 (与组蛋白 pre-mRNA 互补)。本申请的 U7 snRNA 可以在 NCBI 上小鼠野生型 U7 snRNA 的基因序列 (NCBI Reference Sequence: NR\_024201.3) 的基础上，其中 U7 特异性 Sm 结合位点 (AATTGTCTAG, SEQ ID NO: 3) 被替换为优化的共有 Sm 序列，即 SmOPT (AATTTTGGAG, SEQ ID NO: 4; 或 AAUUUUUGGAG, SEQ ID NO: 5)，SmOPT 序列的 5'端的原识别结构域更换为与 USH2A pre-mRNA 特定靶位点反向互补配对的识别结构域，SmOPT 序列的 3'端保留 U7 原茎环结构序列 (CAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAAAACCCCU, SEQ ID NO: 6)。

图 1 显示的是，本申请 U7-snRNA 的结构和作用示意图。靶向诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 U7 snRNA 识别结构域序列与选自 USH2A pre-mRNA 第 12 号内含子-第 13 号外显子-第 13 号内含子的靶序列反向互补配对，靶序列可以选自 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3'段序列靶区域。snRNA 的识别结构域序列优选长度为 16bp 以上，进一步优选为 18bp-40bp，再进一步优选为 20bp-27bp。

具体操作过程：首先，通过全基因合成的方式，合成包含基因序列——U7-snRNA 基因表达盒骨架 (5'-小鼠 U7 启动子-smOPT 序列-U7 snRNA scaffold-snRNA 基因特异性 3'盒-3') 的 pUC57 载体。其中 U7 启动子与 smOPT 之间加入 2 个 Tpye IIs 型限制性内切酶识别位点 (如 BsaI、AarI、BsmBI 等)，以方便后续切除、替换以及插入其他识别结构域序列。snRNA 基因特异性 3'盒为小鼠基因组 (GenBank: X54748.1) U7 snRNA 基因 3'端后，包含 “GTCTACAATGAAA (SEQ ID NO: 7)” 的序列，参与 pre-snRNA 的加工，优选 U7 snRNA 基因 3'端后序列长度为 28-131bp 的基因片段，进一步优选序列长度为 106 bp。

#### 构建靶向靶区域的 U7 snRNA 载体

根据表 1A 中的 snRNA 识别结构域序列对应的转录前 DNA 序列，分别合成对应的 Oligo

DNA。Oligo DNA 正义链为识别结构域序列对应的 DNA 序列，并且 5' 加 CCGCA，反义链为识别结构域序列的反义互补序列 5' 加 AATT 并且 3' 加 T。例如，识别结构域序列为 5'-NNN-3'，则合成的 Oligo DNA 正义链为 5'-CCGCANNN-3'，反义链为 5'-AATTNNNT-3'。

将合成的 Oligo DNA 正义链和反义链按照退火反应体系（反应总体积 20  $\mu$ l: Oligo-F (100  $\mu$ M) 2  $\mu$ l+Oligo-R (100  $\mu$ M) 2  $\mu$ l+10 $\times$ NEB Cutter smart buffer 2  $\mu$ l+去离子水 16  $\mu$ l) 混合，95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟后放置在冰上冷却退火形成带粘性末端的双链 DNA。稀释 100 倍后取 1  $\mu$ l 与 10 ng BsaI 酶切回收的线性化 pUC57-U7 snRNA 骨架质粒进行 T4 连接酶连接。连接产物进一步通过转化大肠杆菌感受态细胞、挑单克隆、PCR 和测序验证，获得用于诱导 USH2A 第 13 号外显子剪接跳跃的 U7 snRNA 载体。提纯质粒，保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

#### 合成 AON

可以根据表 1B 中的 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的靶向区域，设计和合成可以与该区域的反义寡核苷酸 AON 的序列。

表 1A snRNA 的识别结构域序列

snRNA 编号#	识别结构域序列 (5'-3')	SEQ ID NO:	USH2A Pre-mRNA 靶位点对应的基因组定位
4	AUGAUCACACCUAAGCCCUAAAGAUAA	36	Chr1: 216247210-216247236
9	AGAAAUUUAAAUCCAAAUUGCAA	8	Chr1: 216247187-216247210
16	ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA	37	Chr1: 216247147-216247168
19	ACUGAGCCAUGGAGGUACACUGG	9	Chr1: 216247130-216247153
20	AUUGUACCUGUGAGGCUCACACUG	10	Chr1: 216246730-216246753
24	ACCUUCUCCUUGACGAUUAGGCA	11	Chr1: 216246603-216246626
25	AUUACACCUUCUCCUUGACGAUU	12	Chr1: 216246598-216246621
26	AUUACACCUUCUCCUUGACGAUUAGG	13	Chr1: 216246598-216246624
27	ACUGAUUACACCUUCUCCUUGAC	14	Chr1: 216246594-216246617
28	ACAUUUCUUCUUCUACCUUGGUUGAC	15	Chr1: 216246570-216246593
29	ACAUUUCUUCUUCUACCUUGGUUG	16	Chr1: 216246570-216246591

30	ACAUUUCUUUCUUACCUGGUUGACACU	17	Chr1: 216246570-216246596
31	ACAUUUCUUUCUUACCUGGUUGCC	18	Chr1: 216246570-216246593
32	ACAUUUCUUUCUUACCUGGUUGCCACU	19	Chr1: 216246570-216246596
33	AAUACAUUUCUUUCUUACCUGGUU	20	Chr1: 216246567-216246590
34	AUGUAAUACAUUUCUUUCUUACCU	21	Chr1: 216246563-216246586
Scramble	AGGUGUAGUCGACCAUCGUG	38	没有匹配靶序列，阴性对照

表 1B AON 的识别序列

AON 编号#	序列 (5'-3')	SEQ ID NO:	USH2A Pre-mRNA 靶位点对应的基因组定位
20	mA*mU*mU*mG*mU*mA*mC*mC*mU*mG*mU*mG*mA*mG*mG*mC*mU*mC*mA*mC*mA*mC*mU*mG*	10	Chr1: 216246730- 216246753
24	mA*mC*mC*mU*mU*mC*mU*mU*mC*mC*mU*mU*mG*mA*mC*mG*mA*mU*mU*mA*mG*mG*mC*mA*	11	Chr1: 216246603- 216246626
25	mA*mU*mU*mA*mC*mA*mC*mC*mU*mU*mC*mU*mU*mC*mC*mU*mU*mG*mA*mC*mG*mA*mU*mU*	12	Chr1: 216246598- 216246621
31	mA*mC*mA*mU*mU*mU*mC*mU*mU*mU*mC*mU*mU*mA*mC*mC*mU*mG*mG*mU*mU*mG*mC*mC*	18	Chr1: 216246570- 216246593

## U7-snrRNA 的化学合成和修饰

与寡核苷酸类似，U7 snRNA 也可以通过直接化学合成的方式，产生包含引导序列、smOPT 和 U7 snRNA scaffold 的 RNA。体外合成的 U7 snRNA 可以通过特定修饰使其耐受核酸酶降解，或者增加对靶序列的亲合力。

本实施例通过化学合成了 U7 snRNA，其 5'和 3'末端的 3 个碱基各进行 2'-甲氧基 (2'-OME) 修饰和硫代修饰，以增加核酸酶抗性。以 snRNA#25、snRNA#26 为例，化学合成的 snRNA 序列和修饰如下 (\*表示硫代磷酸化骨架，m 表示 2'-甲氧基修饰，下划线表示与靶序列反向互补配对的识别结构域，斜体表示 smOPT 序列)：

化学合成和修饰的 U7-snrRNA#25:

5'-

mA\*mU\*mU\*ACACCUUCUUCUUGACGAUUAAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUC

GGUCGGAAAACCMC\*mC\*mU\*-3' (SEQ ID NO: 22)

化学合成和修饰的 U7-snRNA#25 双向延长:

5'-

mA\*mC\*mU\*GAUUACACCUUCUUCUUGACGAUUAGGCAAUUUUUGGAGCAGGUUU  
UCUGACUUCGGUCGGAAAACCMC\*mC\*mU\*-3' (SEQ ID NO: 23)

化学合成和修饰的 U7-snRNA#26:

5'-

mA\*mU\*mU\*ACACCUUCUUCUUGACGAUUAGGAAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGAC  
UUCGGUCGGAAAACCMC\*mC\*mU\*-3' (SEQ ID NO: 24)

化学合成和修饰的 U7-snRNA#26 单向延长:

5'-

mA\*mU\*mU\*ACACCUUCUUCUUGACGAUUAGGCACACACAGGCACAUUUUUGGAG  
CAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAAAACCMC\*mC\*mU\*-3' (SEQ ID NO: 25)

本申请 U7 snRNA 中的一个或两个以上的核苷酸进行了 2'-O 烷基、2'-O-甲氧基、2'-O-甲氧基乙基中的一种或者两种以上修饰, 所述 2'-O 烷基优选为 2'-O-甲基修饰。snRNA 的核苷酸连接的磷酸键可以通过特殊磷酸酯键连接, 所述特殊磷酸酯键为硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、酰胺磷酸酯键(phosphoramidate)、硼烷磷酸酯(boranophosphate)键、手性连接磷(chiral linkage phosphorus)中的一种或者两种以上组成。在一些实施例中, 仅 snRNA 两侧的 1-10、6-80 个或者全部的核苷酸都进行了修饰和特殊磷酸酯键连接, 所述修饰是一种或两种以上的修饰组合, 所述特殊磷酸酯键是一种或者两种以上磷酸酯键的组合。在一些实施例中, 所述化学合成的 U7 snRNA 中所有的核苷酸均通过硫代磷酸酯键相互连接, 且均进行了 2'-O-甲氧基修饰。在一些实施例中, 仅 snRNA 两侧的 3 个核苷酸通过硫代磷酸酯键连接, 并进行了 2'-O-甲氧基修饰。在一些化学合成和修饰的 U7 snRNA 优选实施例中, U7 snRNA 的 5'端首个核苷酸优选为腺苷酸(A), 若识别结构域 5'端的首个核苷酸不是腺苷酸(A), 则在 5'端连接腺苷酸(A)。在一些化学合成和修饰的 U7 snRNA 实施例中, 识别结构域与靶位点反向互补配对中可存在 0-5 个错配核苷酸, 优选为 0-1 个。识别结构域序列长度优选长度为 16bp 以上, 进一步优选为 18bp-40bp, 再进一步优选为 20bp-27bp。在一些化学合成和修饰的 U7 snRNA 实施例中, 可沿着靶序列的 5'端或/和 3'端继续通过反向互补配对延伸识别结构域序列长度, 优选延伸后的单个识别结构域序列长度小于或等于 40bp。在一些实施例中, 优选化学合成的 snRNA 序列总长度大于等于 96bp。在一些实施例中, 优选化学合成的 snRNA

两侧的 3-40 个碱基为经过修饰并通过特殊磷酸酯键连接的。

## 实施例 2

用于定量评价 USH2A 第 13 号外显子剪接跳跃效率的报告载体

将  $RG_{left}$ -USH2A EXON13<sup>mut</sup>- $RG_{right}$  序列(5'端和 3'端分别加入 AgeI 和 EcoRI 酶切位点)通过全基因合成的方式获取,通过对合成序列、pX601 质粒(Addgene, 61591)进行限制性内切酶 AgeI 和 EcoRI 酶切、电泳、切胶回收和连接,将合成的序列插入 pX601 载体的 AgeI 和 EcoRI 酶切位点之间,替换原载体的 SaCas9 基因序列,获得报告载体。进一步通过转化大肠杆菌感受态细胞、挑单克隆、PCR 和测序验证,获得提纯报告载体质粒,保存于 -20°C 备用。

报告载体结构为: pCMV- $RG_{left}$ -USH2A EXON13<sup>mut</sup>- $RG_{right}$ ,  $RG$  表示报告功能基因(reporter gene),  $RG_{left}$  表示没有报告功能的报告基因 5'端前半部分,  $RG_{right}$  表示没有报告功能的报告基因 3'端后半部分,  $RG_{left}$  和  $RG_{right}$  串联表达可正常行使完整报告基因功能。本发明实施例中报告基因为绿色荧光基因 EGFP, 则载体结构为 pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>mut</sup>-EGFP<sub>right</sub>。EXON13<sup>mut</sup> 表示包含致病突变的 USH2A 第 13 号外显子,及其上下游内含子序列(上游内含子序列为人 USH2A 基因第 12 号内含子的 5'端 204bp 和 3'端 490bp 组合的基因序列;下游内含子序列为人 USH2A 第 13 号内含子的 5'端 703bp 和 3'端 216bp 组合的基因序列)。本发明实施例中所述的 USH2A 第 13 号外显子的致病突变可以为 c.2299delG 或 c.2802T>G 或任意突变, 则获得的载体结构分别为 pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>c.2299delG</sup>-EGFP<sub>right</sub>、pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>c.2802T>G</sup>-EGFP<sub>right</sub>。一些实施例中的突变还可以是或包括 c.2276G> T、C.2522C>A、c.2242C>T、c.2541C>A、c.2761delC 和 C.2776C>T 等。

$RG_{left}$ , 例如 EGFP<sub>left</sub> 序列为:

```
atggtgagcaagggcgaggagctgtcaccggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagc
gtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgcctggccca
ccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgcccagccg
aaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccccgccgag (SEQ ID NO: 26)
```

$RG_{right}$ , 例如 EGFP<sub>right</sub> 序列为:

```
gtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcgcacttcaaggaggacggcaacatcctggggcaca
gctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacat
cgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacct
gagcaccagtcgcccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccggccgggatcactctcg
gcatggacgagctgtacaagtaa (SEQ ID NO: 27)
```

### 实施例 3

293 T 细胞按一定量接种至 24 孔板，使得 24 小时后细胞汇合度达到约 80%。使用 Lipofectamine2000 将合成的 100pmol 反义寡核苷酸 AON#20、AON#24、AON#25、AON#31（合成的 AON 所有核苷单体都进行 2' -O-甲氧基修饰和硫代磷酸化修饰），分别与报告质粒 pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>mut</sup>-EGFP<sub>right</sub> 共转染 293 T 细胞。转染后的细胞继续培养 48-72 小时，使用胰酶消化成单细胞，随后使用流式细胞仪检测不同 AON 组的 GFP 阳性率（即 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子被诱导剪接跳跃的细胞比例）以及 GFP 阳性细胞的平均 FITC 强度（即 GFP 细胞中 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的平均水平），下表 2 和图 2 显示的是，靶向两个区域的 AON 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效果。从实验结果表明，靶向 3' 端区域的 AON 效果显著优于靶向其它区域，例如 #20 区域的 AON。

表 2 靶向两个区域的 AON 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效果

样品名称	GFP 阳性率 (%)			平均 FITC 强度		
	AON#20	15.77	14.77	18.33	14615.3	14648.4
AON#24	27.33	34.33	24.57	105370.5	108179.6	97134.6
AON#25	21.07	19.78	16.95	78504.9	56500.1	64549.6
AON#31	31.41	33.15	35.84	129221.5	132937.7	235885.3

### 实施例 4

293T 细胞按一定量接种至 24 孔板，使得 24 小时后细胞汇合度达到约 80%。选用 Lipofectamine2000 将 pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>mut</sup>-EGFP<sub>right</sub> 和靶向 USH2A pre-mRNA 的 pUC57-U7 snRNA 质粒共转染 293 T 细胞（载体质量比例为 100ng:400ng），使用单独转染报告质粒（Report，报告组）、共转染报告质粒和 pUC57-U7 Scramble（SC 组）的 293 T 细胞分别作为两种阴性对照，不转染任何质粒的 293 T 细胞作为空白对照。转染后的细胞继续培养 48-72 小时，使用胰酶消化成单细胞，随后使用流式细胞仪检测不同 U7 snRNA 组的 GFP 阳性率（即 USH2A 第 13 号外显子被诱导剪接跳跃的细胞比例）。本实施例检测了不同实验组的平均 FITC 强度，即 GFP 阳性细胞 FITC 荧光强度的平均值，以及 GFP 阳性率，阳性细胞的 GFP 蛋白表达量。

本实施例比对了不同靶位点的 U7-snRNA 诱导剪接跳跃的效率。下表 3 和图 3A-3B 显示的是，不同靶位点 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效果。结果显示所有靶向 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列的 U7-snRNA 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 第 13 号外显子的剪接跳跃，USH2A 诱导剪接跳跃的效率

高。

表 3 不同靶位点 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃细胞比例

样品名称	GFP 阳性率			平均 FITC 强度		
	第一轮	第二轮	第三轮	第一轮	第二轮	第三轮
293T	0.1%	0.1%	0.1%	6366	5100	8240
报告组	9.2%	12.8%	6.1%	23925	28917	17335
snRNA#20	18.20%	23.20%	16.50%	21260	18898	30766
snRNA#24	55.70%	59.10%	59.30%	204635	198488	239915
snRNA#25	52.10%	54.00%	50.80%	148755	110595	163122
snRNA#27	52.90%	61.00%	55.70%	222245	189021	243329
snRNA#28	55.90%	61.80%	55.90%	315629	283311	366659
snRNA#33	64.10%	75.20%	66.40%	819508	988642	918282
snRNA#34	65.40%	70.10%	64.10%	494047	473049	501321
SC 组	11.00%	13.30%	7.70%	58920	75279	66826

### 实施例 5

化学合成的 snRNA 高效诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子单独剪接跳跃

人源宿主细胞按  $6 \times 10^5$ /孔接种至 24 孔板, 本实施例选用的人源视网膜神经细胞为 WERI-Rb-1 细胞(视网膜神经细胞系)。用 Lipofectamine2000 将体外合成的 100pmol U7-snRNA#24、#25、#26、#27、#28、#29、#30、#33、#34 转染 WERI 细胞。转染后的细胞继续培养 72 小时, 随后提取每个实验组细胞的 RNA, 反转录获得 cDNA, 通过引物 AGCCTTTCCGCCAAGGTGATC(SEQ ID NO: 34)和 CACAACGTTGCCAGCAATGG(SEQ ID NO: 35)进行 RT-PCR 实验, 检测成熟的 USH2A mRNA 是否存在外显子的剪接跳跃, 电泳结果如图 7 所示。结果显示, U7-snRNA#24-34 均能高效诱导第 13 号外显子的剪接跳跃, 且几乎未见的第 13 号外显子和第 12 号外显子共同剪接跳跃, 可知靶向 3'端区域的 U7 snRNA 可高效诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的单独剪接跳跃, 具有较高的安全性。

### 实施例 6

不同靶位点的 U7-snRNA 组合介导的 USH2A 第 13 号外显子剪接跳跃效果

构建 U7-snRNA 多靶点组合载体。根据 Golden Gate Assembly 技术, 以不同 U7 snRNA 质粒为模板, PCR 扩增 U7 snRNA cassette (表达盒) 同时通过引物在扩增子的两端引入额外的 5'侧翼碱基和正确方向的 BsaI 酶切位点, 使得相邻的不同 U7 snRNA cassette 通过 BsaI 酶切后产生特异的互补粘性末端, 首尾 U7 snRNA cassette 则通过 BsaI 酶切后产生与 HindIII+NotI

酶切线性化骨架载体相同的粘性末端。最后使用 NEB® Golden Gate Assembly Kit (BsaI-HF®v2) (NEB#E1601)将上述 PCR 产物以及 HindIII+NotI 酶切回收的 pUC57-U7 snRNA Backbone 组装。组装方法如下所示: pUC57-U7 snRNA Backbone-HindIII+NotI、80ng; U7 snRNA#A cassette PCR product、20ng; U7 snRNA#B cassette PCR product、20ng; U7 snRNA#C cassette PCR product、20ng; T4 DNA Ligase Buffer (10X)、2 $\mu$ l; NEB Golden Gate Assembly Mix、1 $\mu$ l; 反应过程: (37°C, 5 min  $\rightarrow$  16°C, 5 min)  $\times$ 20  $\rightarrow$  60°C, 5 min。

Golden Gate Assembly 组装产物进一步通过转化大肠杆菌感受态细胞、挑选单克隆、PCR 和测序验证, 获得用于诱导 USH2A 第 13 号外显子剪接跳跃的 U7 snRNA 多靶点组合载体。提纯质粒, 保存于 -20°C 备用。构建的载体示例性命名为 pUC57-U7 snRNA#A+U7 snRNA#B+U7 snRNA#C。

不同靶位点的 U7-snRNA 组合更高效地诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃。293 T 细胞按一定量接种至 24 孔板, 使得 24 小时后细胞汇合度达到约 80%。使用 Lipofectamine2000 将 pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>mut</sup>-EGFP<sub>right</sub> 分别和不同靶点的 U7 snRNA 组合质粒或单靶点质粒共转染 293 T 细胞 (载体质量比例为 100ng: 400ng), 使用单独转染报告质粒 (Report, 报告组)、共转染报告质粒的和 pUC57-U7 Scramble (SC 组) 的 293 T 细胞作为两种阴性对照, 不转染任何质粒的 293 T 细胞作为空白对照。转染后的细胞继续培养 48-72 小时, 使用胰酶消化成单细胞, 随后使用流式细胞仪检测不同 snRNA 组的 GFP 阳性率。下表 4 和图 4A-4B 显示的是, 不同靶位点的 U7-snRNA 组合诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效率。

本实施例通过将靶向不同靶位点的 U7-snRNA 组合应用, 发现可以在报告基因细胞中提升诱导 USH2A 第 13 号外显子的剪接跳跃的效率。本实施例中的不同靶点组合的诱导的剪接跳跃效率可以高于单个靶点的效果, 而且可以优于已知的 USH2A 第 13 号外显子的剪接跳跃技术。

表 4 不同靶位点的 U7-snRNA 组合诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效率

样品名称	GFP 阳性率			平均 FITC 强度		
	第一轮	第二轮	第三轮	第一轮	第二轮	第三轮
293T	0.10%	0.10%	0.10%	5960	6100	11052
报告组	5.10%	11.00%	13.50%	19637	18264	25099
snRNA#24	54.80%	67.90%	61.30%	299833	495247	762459
snRNA#25	52.00%	66.60%	60.00%	200472	337127	656348
snRNA#29	49.30%	76.10%	61.20%	249725	969651	742796
snRNA#9+snRNA#24	69.40%	83.40%	74.30%	1122179	1355583	1590949
snRNA#9+snRNA#25	66.30%	88.30%	72.10%	908901	1954892	1307340



snRNA#9+snRNA#29	64.20%	79.50%	65.10%	972226	1256189	1011043
snRNA#19+snRNA#24	63.60%	80.40%	71.10%	873480	1148445	1297696
snRNA#19+snRNA#25	69.70%	79.20%	67.50%	1123782	1172973	1070130
snRNA#19+snRNA#29	61.40%	85.10%	66.60%	770099	1292896	1477626
SC 组	8.60%	14.40%	15.40%	37615	27557	41557

本申请不同靶位点的 U7-snRNA 组合中, 其中一个 snRNA 可以靶向本申请的 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段, 另一个或多个 snRNA 可以靶向 USH2A pre-mRNA 第 12 号内含子-第 13 号外显子-第 13 号内含子的序列或其片段, 例如 U7-snRNA 以其识别结构域序列与 USH2A pre-mRNA 第 12 号内含子、第 13 号外显子或第 13 号内含子靶点序列反向互补配对, 优选地选自第 13 号外显子及两侧临近靶区域(chr1: 216246563-216247246 对应的 pre-mRNA 区域)。不同靶位点的 U7-snRNA 组合则是靶点序列不完全一样的两个或两个以上的 U7-snRNA 的组合使用。

### 实施例 7

化学合成 U7 snRNA 组合在 WERI 细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃

人源宿主细胞按  $6 \times 10^5$ /孔接种至 24 孔板, 本实施例选用的是 WERI-Rb-1 细胞系。用 Lipofectamine2000 将体外合成的 50pmol snRNA 组合 1 (U7-snRNA#30 和 U7-snRNA#4)、组合 2 (U7-snRNA#26 和 U7-snRNA#16) 分别转染 WERI 细胞, 转染相同剂量 (50pmol) 的反义寡核苷酸 AON1 (5' - MA\*MG\*MC\*MU\*MU\*MC\*MG\*MG\*MA\*MG\*MA\*MA\*MA\*MU\*MU\*MU\*MA\*MA\*MA\* MU\*MC\*-3' , “M” 表示 2' -O-甲氧基修饰, “\*” 表示硫代磷酸化) 和 AON2 (5' - MU\*MG\*MA\*MU\*MC\*MA\*MC\*MA\*MC\*MC\*MC\*MU\*MA\*MA\*MG\*MC\*MC\*MC\*MU\*MA\* MA\*MA\*-3' , “M” 表示 2' -O-甲氧基修饰, “\*” 表示硫代磷酸化) 作为对照组, 转染 1  $\mu$ g EGFP 质粒作为阴性对照, 不转染任何质粒的 WERI 细胞作为空白对照。转染后的细胞继续培养 72 小时, 随后提取每个实验组细胞的 RNA, 反转录获得 cDNA, 通过引物 AGCCTTCCGCCAAGGTGATC (SEQ ID NO: 34) 和 CACAACGTTGCCAGCAATGG (SEQ ID NO: 35) 进行 RT-PCR 实验, 检测成熟的 USH2A mRNA 是否存在外显子剪接跳跃, 电泳结果如图 8A 所示。进一步通过 ImageJ 软件对 rt-PCR 电泳条带进行定量分析, 并针对剪接跳过第 13 号外显子或剪接跳过第 12 号外显子和 13 的成熟 USH2A mRNA 的比例进行统计和分析, 如图 8B。

在内源性表达 Usherin 蛋白的 WERI 细胞中, 将不同靶位点 U7 snRNA 组合诱导 USH2A

pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的效果与现有技术优选 AON 技术方案进行比较, 由 RT-PCR 试验数据和分析结果可知, snRNA 组合 1 和 snRNA 组合 2 诱导第 13 号外显子单剪接跳跃的效果显著优于现有技术最优技术方案 AON1 和 AON2, 且 snRNA 组合 1 和 snRNA 组合 2 诱导第 12 号外显子和 13 双剪接跳跃 mRNA 占总剪接跳跃 mRNA 的比例却比 AON1、AON2 低。因此, 可明确 U7 snRNA 在确保较低的双跳 USH2A mRNA 副产品的同时, 显著提升第 13 号外显子单剪接跳跃的效率。

此外, snRNA 组合 2 是靶向临近于现有技术第 12 号外显子和 13 双剪接跳跃概率极高的 AON 位点, 然而, snRNA 组合 2 的双外显子剪接跳跃的发生概率却非常低。

### 实施例 8

带有可募集剪接调控蛋白的基序的 U7 snRNA 的剪接跳跃效果

连接 hnRNP A1 结合基序的 U7 snRNA 的构建。根据表中的序列对应的转录前 DNA 序列, 分别合成对应的 Oligo DNA。Oligo DNA 正义链为靶序列的反向互补序列 (识别结构域序列对应的 DNA 序列), 并且 5' 加 CCGCAATATGATAGGGACTTAGGGTG (SEQ ID NO: 28), 反义链为靶序列 5' 加 AATT 并且 3' 加 CACCCTAAGTCCCTATCATATT (SEQ ID NO: 29)。例如, 识别结构域序列为 NNN (识别结构域长度优选大于 16 个核苷酸), 则合成的 Oligo DNA 正义链为 CCGCAATATGATAGGGACTTAGGGTGNNN, 反义链为 AATTNNNCACCCTAAGTCCCTATCATATT, (下划线表示识别结构域序列对应的 DNA 双链序列, 粗斜体表示 *hnRNP A1* 蛋白的结合基序“UAGGGU (SEQ ID NO: 30)”对应的 DNA 双链序列)。

将合成的 Oligo DNA 正义链和反义链按照退火反应体系 (反应总体积 20  $\mu$ l: Oligo-F (100  $\mu$ M) 2  $\mu$ l+Oligo-R (100  $\mu$ M) 2  $\mu$ l+10 $\times$ NEB Cutter smart buffer 2  $\mu$ l+去离子水 16  $\mu$ l) 混合, 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟后放置在冰上冷却退火形成带粘性末端的双链 DNA。稀释 100 倍后取 1  $\mu$ l 与 10 ng BsaI 酶切、回收的线性化 pUC57-U7 snRNA backbone 质粒连接。进一步通过转化大肠杆菌感受态细胞、挑选单克隆、PCR 和测序验证, 获得含有 hnRNP A1 结合基序的用于诱导 USH2A 第 13 号外显子剪接跳跃的 U7 snRNA 载体, 载体命名为 pUC57-U7-hnRNP A1-snRNA#A。提纯质粒, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。图 5 显示的是, 带有 hnRNP A1 的 snRNA 载体示意图。

U7-hnRNP A1-snRNA 还可以依据本申请实施例所述的方法进行化学合成和修饰。以 snRNA#25 为例, 化学合成的 U7-hnRNP A1-snRNA 序列和修饰如下 (\*表示硫代磷酸化骨架, m 表示 2'-甲氧基修饰, 下划线表示与靶序列反向互补配对的识别结构域, 斜体表示 *smOPT* 序列, 粗体表示 *hnRNP A1* 蛋白结合基序):

5'-

mA\*mC\*mC\*GCAAUAUGAUAGGGACUUAGGGUGAUUACACCUUCUCCUUGACGAU  
UAAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAAAACC\*mC\*mC\*mU-3' (SEQ ID  
 NO: 31)

连接 hnRNP A1 结合基序的 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A 第 13 号外显子剪接跳跃。293 T 按一定量接种至 24 孔板, 使得 24 小时后细胞汇合度达到约 80%。使用 Lipofectamine2000 将 pCMV-EGFP<sub>left</sub>-Exon13<sup>mut</sup>-EGFP<sub>right</sub> 分别和 pUC57-U7-hnRNP A1-snRNA 质粒、pUC57-U7 snRNA 质粒共转染 293 T 细胞 (载体质量比例为 100ng:400ng), 使用单独转染报告质粒 (报告组)、共转染报告质粒的和 pUC57-U7 Scramble (SC 组) 的 293 T 细胞作为两种阴性对照, 不转染任何质粒的 293 T 细胞作为空白对照。转染后的细胞继续培养 48-72 小时, 使用胰酶消化成单细胞, 随后使用流式细胞仪检测不同 snRNA 组诱导的剪接跳跃效率。下表 5 和图 6A-6B 显示的是, U7-hnRNP A1-snRNAUSH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效率。

数据显示, 在 U7 snRNA 的 5'端引入 hnRNP A1 结合基序可显著提升诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的效果, 不仅提升了第 13 号外显子剪接跳跃的细胞 (GFP+) 的比例, 而且提升了每个细胞中剪接跳过外显子的 mRNA 水平 (平均 FITC 强度)。同时, 在 U7 snRNA#25 中引入 hnRNP A1 结合基序平均 FITC 强度增加了 3.25 倍, 诱导的剪接跳跃效率显著提高。

表 5 U7-hnRNP A1-snRNAUSH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃效率

样品名称	GFP 阳性率			平均 FITC 强度		
	第一轮	第二轮	第三轮	第一轮	第二轮	第三轮
293T	0.1%	0.1%	0.1%	6366	5100	8240
报告组	9.2%	12.8%	6.1%	23925	28917	17335
snRNA#25	52.1%	54.0%	50.8%	148755	110595	163122
hnRNPA1-snRNA#25	67.9%	72.1%	66.3%	680169	513447	603841
SC 组	11.0%	13.3%	7.7%	58920	75279	66826

本实施例在 U7 snRNA 的 5'端引入游离尾部, 所述游离尾部序列包括 hnRNP A1 蛋白的结合基序“UAGGGU”, 所述游离尾部序列可以含有 1 个、2 个或者 2 个以上的 hnRNP A1 蛋白的结合基序, 优选为 2 个, 游离尾部序列优选为“UAUGAUAGGGACUUAGGGUG (SEQ ID NO: 32)”, 可募集 hnRNP A1 蛋白, 促进 USH2A 第 13 号外显子的剪接跳跃, 且不会增加第 12 号外显子和第 13 号外显子的双跳, 可以不影响其靶向特异性, 可以不造成或者增加脱靶效应。例如, 本申请所述的 USH2A 的第 12 号外显子为人的 USH2A 第 12 号外显子。例

如，本申请所述的 USH2A 的第 13 号外显子为人的 USH2A 第 13 号外显子。

在一些实施例中，所述 U7 snRNA 的 5'端引入游离尾部为可以募集剪接调控蛋白的基序，所述剪接调控蛋白为 hnRNP A1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1)、SRSF1(Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1)、RBM4 (RNA Binding Motif Protein 4)、DAZAP1 (DAZ Associated Protein 1)、SR (Serine And Arginine-Rich Protein)等。

### 实施例 9

靶向诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的 AAV-U7 snRNA 相关质粒载体构建和病毒包装

本实施例将靶向诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的 U7 snRNA 基因插入并替换 pAAV-CMV 载体中两个 ITR 结构域的中间基因序列，构建 pAAV-U7 snRNA 载体，与 AAV 包装质粒：血清型 pRC 质粒（包含 AAV2 的 Rep 基因和 每个血清型各自的 Cap 基因）、pHelper 质粒（包含腺病毒的 E2A、E4 和 VA 基因的载体质粒）共转染宿主细胞，包装获得靶向 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的 AAV-U7 snRNA 病毒。具体操作过程如下：

首先，通过全基因合成的方式，合成基因序列——U7-snRNA 基因表达盒骨架（未包含识别结构域）：5'-小鼠 U7 启动子-smOPT 序列-U7 snRNA scaffold-snRNA 基因特异性 3' 盒-3'。其中 U7 启动子与 smOPT 之间加入 2 个 Tpye IIs 型限制性内切酶识别位点（如 BsaI、AarI、BsmBI 等），以方便后续切除、替换以及插入其他识别结构域序列。将全基因合成的序列插入并替换 pAAV-CMV 质粒（AAVpro® Helper Free System（AAV5）试剂盒，TAKARA 公司，Code No. 6650）两个 AAV2-ITR 结构域之间的基因序列，获得 pAAV-U7 snRNA 骨架载体。

U7-snRNA 基因表达盒骨架（未包含识别结构域）（SEQ ID NO: 33）：

```
AAGCTTAACAACATAGGAGCTGTGATTGGCTGTTTTTCAGCCAATCAGCACTGACTC
ATTTGCATAGCCTTTACAAGCGGTCACAAACTCAAGAAACGAGCGGTTTTAATAGTCTTT
TAGAATATTGTTTATCGAACCGAATAAGGAACTGTGCTTTGTGATTCACATATCAGTGGA
GGGGTGTGGAAATGGCACCTTGATCTCACCTCATCGAAAGTGGAGTTGATGTCCTTCC
CTGGCTCGCTACAGACGCACTTCCGCAGagaccaatgtgggtctcgAATTTTTGGAGCAGGTTTTTC
TGACTTCGGTCGGAAAACCCCTCCCAATTTCACTGGTCTACAATGAAAGCAAACAGTT
CTCTTCCCCGCTCCCCGGTGTGTGAGAGGGGCTTTGATCCTTCTCTGGTTTTCTAGGAAA
CGCGTATGTGCGGCCGC
```

依照上述实施例所述方法，根据本申请的 snRNA 识别结构域序列或识别结构域序列的串

联组合对应的转录前 DNA 序列，分别合成对应的 Oligo DNA 正义链和反义链，两端加入类似于 Tpye IIs 型限制性内切酶识别位点切割后的粘性末端。退火形成带粘性末端的识别结构域（单独/串联）双链 DNA，T4 连接酶接入经过对应 Tpye IIs 型限制性内切酶酶切回收的线性化 pAAV-U7 snRNA 骨架质粒中，形成靶向 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子特定位点诱导剪接跳跃的 pAAV-U7 snRNA 质粒，依据识别结构域序列对应的 snRNA 编号对其进行命名，如 pAAV-U7 snRNA#25 等。

将目的基因（靶向诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的 U7-snRNA 基因表达盒子）插入并替换 pAAV-CMV 质粒 AAV2-ITR 结构域之间的基因序列后，获得 pAAV-U7 snRNA 质粒载体。依据 AAVpro® Helper Free System (AAV5) 试剂盒说明书和标准的细胞操作流程包装获取靶向诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的 AAV-U7 snRNA 病毒。

在转染之前 24 小时，将 HEK293/293T 细胞接种到 100 mm 细胞培养皿，培养基为 10% FBS 的 DMEM 培养基，汇合度达到 80%-90%时转染。转染前 3 小时，弃去旧培养基，更换新鲜培养基。转染时，同时将 pAAV-U7 snRNA 质粒、pRC 质粒、pHelper 质粒和 PEI（聚乙烯亚胺）转染试剂按照以下的体系配置好，逐滴加入培养皿中。PEI 转染混合物添加完毕后，轻轻晃动培养皿使转染试剂分布均匀，将培养基放置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

PEI 转染体系：pAAV 质粒（1 μg/μl）、6 μL；pRC1/2/5/6 质粒（1 μg/μl）；（pRC 质粒衣壳基因决定血清型）、6 μL；pHelper 质粒（1 μg/μl）、6 μL；无血清 DMEM 培养基、500 μL；PEI（1mg/mL）、110 μL 处理方式：涡旋混合数次，室温孵育 5 min。

转染后 24 小时，更换新鲜 2% FBS 的 DMEM 培养基。转染 48-72 小时后，收集含 AAV 病毒的细胞，清洗、离心，收集细胞沉淀，涡旋振荡使细胞沉淀松散。随后，依照 AAVpro® Helper Free System(AAV5)试剂盒说明书，在细胞沉淀中加入 0.5mL 的 AAV Extraction Solution A，涡旋振荡 15 秒使细胞沉淀充分悬浮。室温静置 5 分钟后，再涡旋振荡 15 秒。4°C，2000-14000g 离心 10 分钟，去除细胞碎片。收集上清液到新的无菌离心管中，加入 50μL AAV Extraction Solution B，使用移液枪吸打混匀，获得不同识别结构域的 AAV -U7 snRNA 病毒溶液，取部分以 qPCR 法检测病毒滴度，保存于 80 °C 备用。

由于插入 pAAV-U7 snRNA 质粒 AAV2-ITR 结构域之间插入的目的基因片段应小于 2.5kb，因此，可通过插入多个 U7-snRNA 基因表达盒子（5'-小鼠 U7 启动子-smOPT 序列、U7 snRNA scaffold-snRNA 基因特异性 3' 盒-3'），从而确保在相同 AAV 病毒颗粒数量的情况下，提升 U7 snRNA 的表达量，基因序列长度约为 450bp，则优选地 pAAV-U7 snRNA 质粒中携带 1-5

个 U7-snRNA 基因表达盒子，所述 pAAV-U7 snRNA 质粒中的多个 U7-snRNA 基因表达盒子可以是具有相同的识别结构域或识别结构域组合，也可以是具有不同或者不完全相同的识别结构域组合。

本申请通过 AAV 递送 U7 snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃，所述 AAV 的衣壳蛋白可以是天然来源的，也可以是基于天然来源衣壳蛋白的变体、或进行定向进化、或进行氨基酸/肽段合理改造（密码子优化、嵌合不同血清型功能肽段等）等，提升组织器官亲嗜性、免疫原性、提升转染效率等特性，如 AAV2.5、AAV2i8、AAV-TT、AAV9.HR、CAM130 等。所述天然来源的 AAV 衣壳蛋白可以是来源于动物体的，也可以是来源于植物的，所述来源于动物体的 AAV 衣壳蛋白可以是来源于人体的（如 AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 和 AAV9 等），也可以是来源于非人灵长类动物（如 AAVrh.8、AAVrh.10 和 AAVrh.43），也可以是来源于小鼠、猪等脊椎动物，也可以是来源于昆虫。本发明 AAV 质粒体系中，例如，AAV ITR 血清型应于 Rep 基因血清型一致，与 Cap 基因血清型可不一致。

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

## 权利要求书

1. 一种核酸分子，所述核酸分子具有特异性结合 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段的能力，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列对应的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753。
  2. 一种核酸分子，所述核酸分子具有特异性结合 SEQ ID NO: 1 所示序列或其片段的能力。
  3. 一种核酸分子，所述核酸分子与 SEQ ID NO: 1 所示序列中的 16 个或更多的连续核苷酸互补。
  4. 一种核酸分子，所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 1 所示序列、或其互补序列中的 16 个或更多的连续核苷酸。
  5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段互补的至少 16 个核苷酸。
  6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含与 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段互补的 22 个至 27 个核苷酸。
  7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含至少 16 个核苷酸。
  8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含 22 个至 27 个核苷酸。
  9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含至少 60 个核苷酸。
  10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含互补于选自以下组基因组定位对应的 pre-mRNA 序列：Chr1: 216246603-216246626、Chr1: 216246598-216246621、Chr1: 216246598-216246624、Chr1: 216246594-216246617、Chr1: 216246570-216246593、Chr1: 216246570-216246591、Chr1: 216246570-216246596、Chr1: 216246570-216246593、Chr1: 216246570-216246596、Chr1: 216246567-216246590、和 Chr1: 216246563-216246586。
  11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含互补于 SEQ ID NO: 10-21 中任一项所示的序列。
  12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 10-21 中任一项所示的序列。
  13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含经修饰的核苷酸。
  14. 如权利要求 13 所述的核酸分子，所述经修饰的核苷酸包含选自以下组的修饰：2'-O-烷基、2'-O-甲氧基和/或 2'-O-甲氧基乙基。
  15. 如权利要求 13-14 中任一项所述的核酸分子，所述经修饰的核苷酸包含选自以下组的修饰：2'-O-甲基和/或 2'-O-乙基。
-

16. 如权利要求 13-15 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子包含至少一个经修饰的核苷酸。
17. 如权利要求 13-16 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 5'端包含至少一个经修饰的核苷酸。
18. 如权利要求 13-17 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 5'端包含 1 个至 3 个经修饰的核苷酸。
19. 如权利要求 13-18 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 3'端包含至少一个经修饰的核苷酸。
20. 如权利要求 13-19 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 3'端包含 1 个至 3 个经修饰的核苷酸。
21. 如权利要求 1-20 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子中包含选自以下组的核苷酸或核苷酸类似物单体: 6'-修饰的双环核苷、5'-修饰的双环核苷、6'-双取代双环核苷、四氢吡喃核苷类似物和/或 2'-脱氧 2'-氟- $\beta$ -D-阿拉伯糖核苷酸(2'-FANA 修饰的核苷酸)。
22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子包含经修饰的磷酸键。
23. 如权利要求 1-22 中任一项所述的核酸分子, 所述核苷酸分子经过选自以下组的化学键连接: 硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、烷基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯、亚烷基磷酸酯、次磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷基磷酸酯、磷酸二酯键、Rp-硫代磷酸酯键、Sp-硫代磷酸酯键、硼烷磷酸酯键、亚甲基键(甲基亚氨基)、酰胺键(3'-CH<sub>2</sub>-CO-NH-5'和 3'-CH<sub>2</sub>-NH-CO-5')、甲基磷酸酯键和/或 3'-硫代甲缩醛键(3'S-CH<sub>2</sub>-O5')。
24. 如权利要求 22-23 中任一项所述的核酸分子, 所述经修饰的磷酸键包含选自以下组: 硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基磷酸酯键、酰胺磷酸酯键和/或硼烷磷酸酯键。
25. 如权利要求 22-24 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子包含至少一个经修饰的磷酸键。
26. 如权利要求 22-25 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 5'端包含至少一个经修饰的磷酸键。
27. 如权利要求 22-26 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 5'端包含 1 个至 3 个经修饰的磷酸键。
28. 如权利要求 22-27 中任一项所述的核酸分子, 所述核酸分子的 3'端包含至少一个经修饰的磷酸键。



29. 如权利要求 22-28 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子的 3'端包含 1 个至 3 个经修饰的磷酸键。
30. 如权利要求 1-29 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含 DNA 和/或 RNA。
31. 如权利要求 1-30 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子为单链的或双链的。
32. 如权利要求 1-31 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide）、shRNA、siRNA、miRNA 和/或适体（aptamer）。
33. 如权利要求 1-32 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含核小 RNA（Small nuclear RNA）。
34. 如权利要求 33 所述的核酸分子，所述核小 RNA 包含 U1 核小 RNA 和/或 U7 核小 RNA。
35. 如权利要求 1-34 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子不结合 Cas 酶。
36. 如权利要求 1-35 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子不包含能够结合 Cas 酶的结构。
37. 如权利要求 35-36 中任一项所述的核酸分子，所述 Cas 酶为 Cas13 酶。
38. 如权利要求 1-37 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含茎环结构域或其衍生结构。
39. 如权利要求 38 所述的核酸分子，所述茎环结构域包含 SEQ ID NO: 6 所示的序列。
40. 如权利要求 1-39 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含能够结合 sm 蛋白的结构域或其衍生结构。
41. 如权利要求 40 所述的核酸分子，所述能够结合 sm 蛋白的结构域包含 SEQ ID NO: 5 所示的序列。
42. 如权利要求 1-41 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含能够结合剪接调控蛋白的结构域。
43. 如权利要求 1-42 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含能够结合选自以下组的蛋白的结构域：SRSF1(Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1)、RBM4 (RNA Binding Motif Protein 4)、DAZAP1 (DAZ Associated Protein 1)、和 SR (Serine And Arginine-Rich Protein)。
44. 如权利要求 1-43 中任一项所述的核酸分子，所述核酸分子包含能够结合 hnRNP A1 蛋白的结构域。
45. 如权利要求 44 所述的核酸分子，所述能够结合 hnRNP A1 蛋白的结构域包含 SEQ ID NO: 30 所示的序列。

46. 一种基因表达盒，所述基因表达盒包含或编码如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子的核苷酸序列，以及任意的表达调控元件。
47. 一种载体，所述载体包含或编码如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子的核苷酸序列，和/或如权利要求 46 所述的基因表达盒的核苷酸序列。
48. 一种病毒颗粒，所述病毒颗粒包含如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子，如权利要求 46 所述的基因表达盒的核苷酸序列，和/或如权利要求 47 所述的载体。
49. 一种细胞，所述细胞包含如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子，如权利要求 46 所述的基因表达盒的核苷酸序列，如权利要求 47 所述的载体，和/或如权利要求 48 所述的病毒颗粒。
50. 一种药物组合物，所述药物组合物包含如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子，如权利要求 46 所述的基因表达盒的核苷酸序列，如权利要求 47 所述的载体，如权利要求 48 所述的病毒颗粒，和/或如权利要求 49 所述的细胞，以及任意的药学可接受的载剂。
51. 如权利要求 50 所述的药物组合物，所述药物组合物包含第一载体和第二载体，所述第一载体包含如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子，所述第二载体包含具有特异性结合 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子及其两侧区域或其片段的能力的核酸分子。
52. 如权利要求 50-51 中任一项所述的药物组合物，所述 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子的两侧区域包含 USH2A pre-mRNA 第 12 号内含子和/或第 13 号内含子。
53. 一种试剂盒，所述试剂盒包含如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子，如权利要求 46 所述的基因表达盒的核苷酸序列，如权利要求 47 所述的载体，如权利要求 48 所述的病毒颗粒，如权利要求 49 所述的细胞，和/或如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物。
54. 一种制备如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子的方法，包含表达和/或合成能够结合 USH2A 第 13 号外显子的 3' 段序列或其片段的所述核酸分子，所述 USH2A 第 13 号外显子的 3' 段序列的基因组定位为 Chr1: 216246563-216246753。
55. 一种抑制 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子表达和/或功能的方法，包含提供如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒。
56. 一种使 USH2A pre-mRNA 第 13 号外显子剪接跳跃的方法，包含提供如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒。
57. 一种制备缺失第 13 号外显子的成熟 USH2A mRNA 的方法，包含提供如权利要求 1-45 中

- 任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒。
58. 一种降低包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白水平的方法，包含提供如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒。
59. 一种制备不包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白和/或增加不包含第 13 号外显子表达产物的 Usherin 蛋白数量的方法，包含提供如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 48 所述的病毒颗粒、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒。
60. 一种恢复突变 Usherin 蛋白的功能的方法，包含提供如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 48 所述的病毒颗粒、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒。
61. 如权利要求 1-45 中任一项所述的核酸分子、如权利要求 47 所述的载体、如权利要求 48 所述的病毒颗粒、如权利要求 49 所述的细胞、如权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求 53 所述的试剂盒在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗 USH2A 基因突变引发的疾病。
62. 如权利要求 61 所述的用途，所述疾病包含眼病和/或耳病。

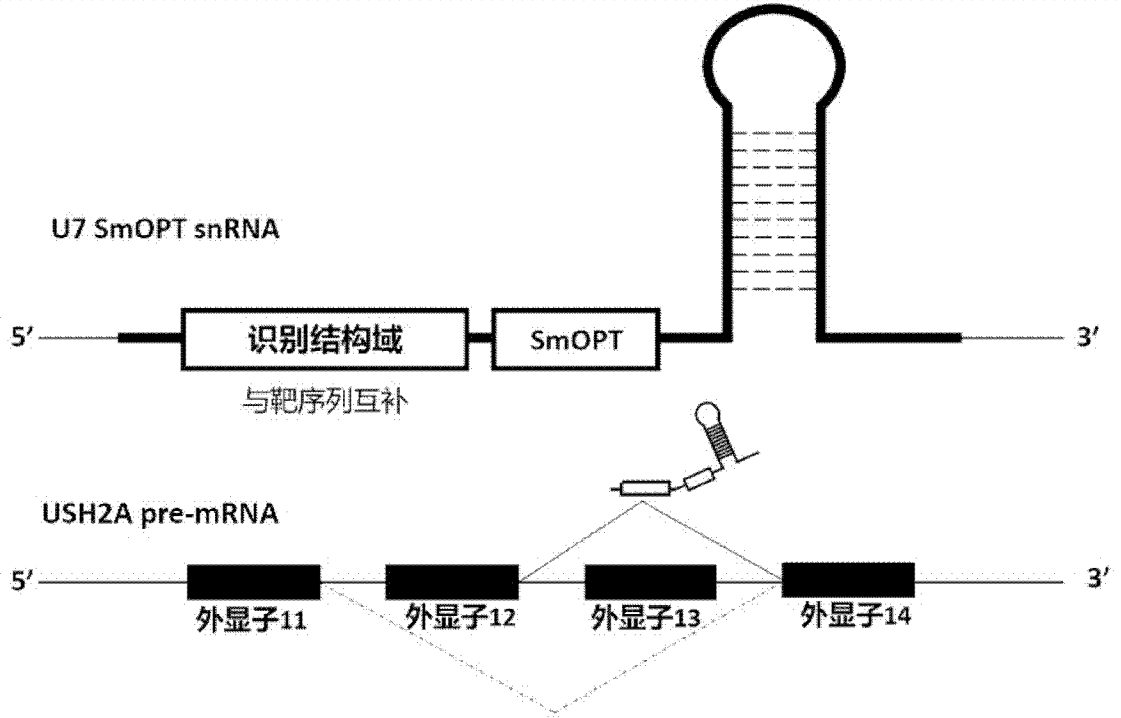


图 1

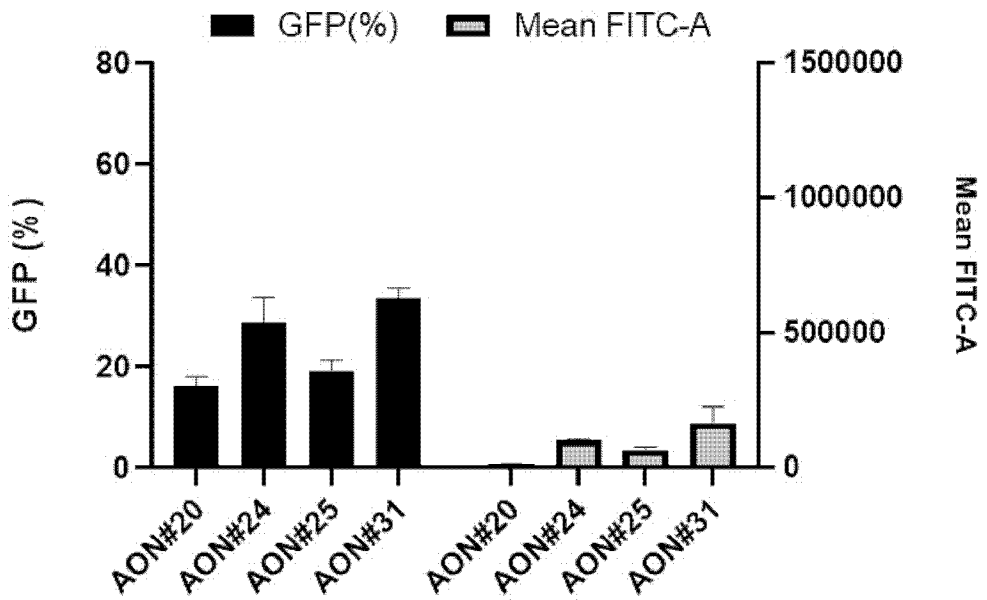


图 2

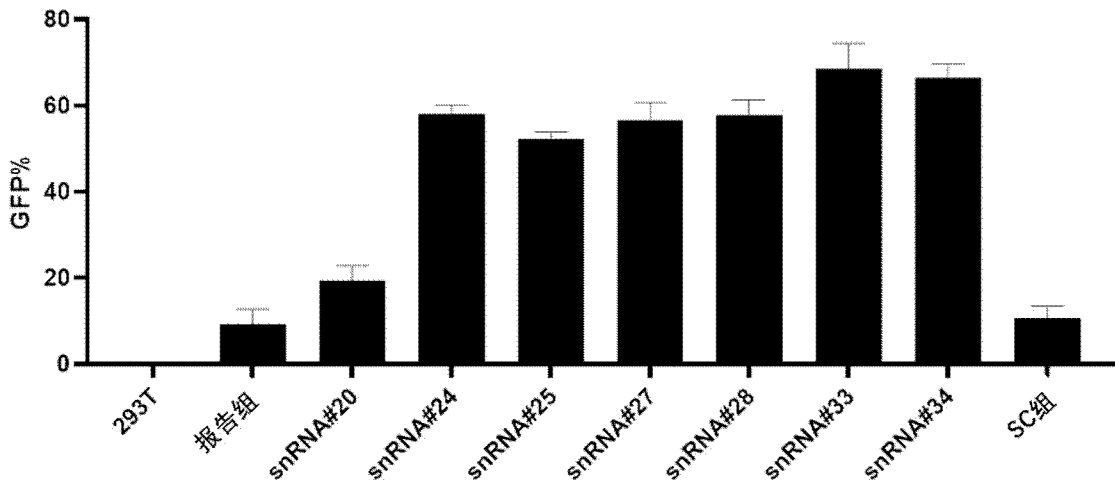


图 3A

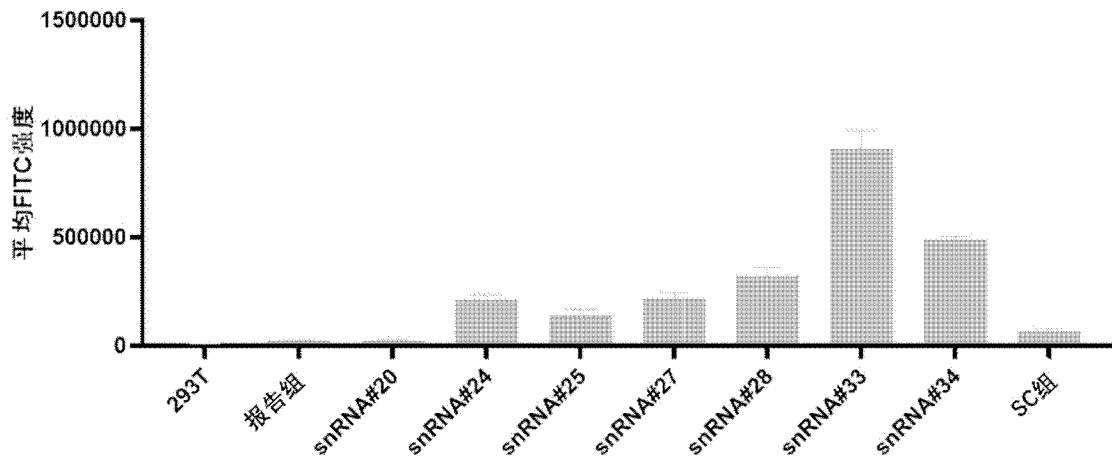


图 3B

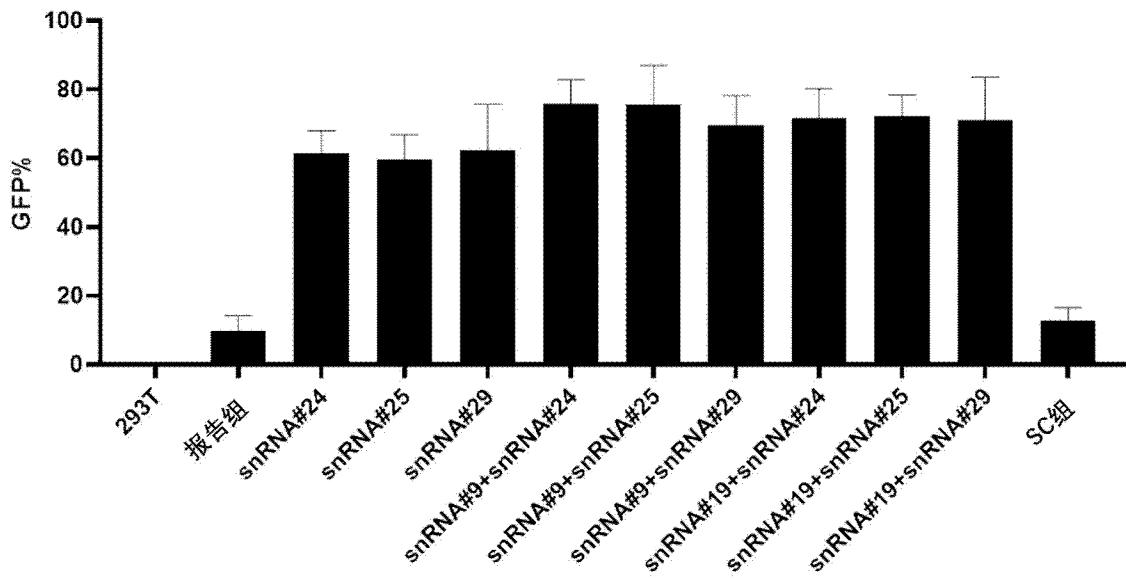


图 4A

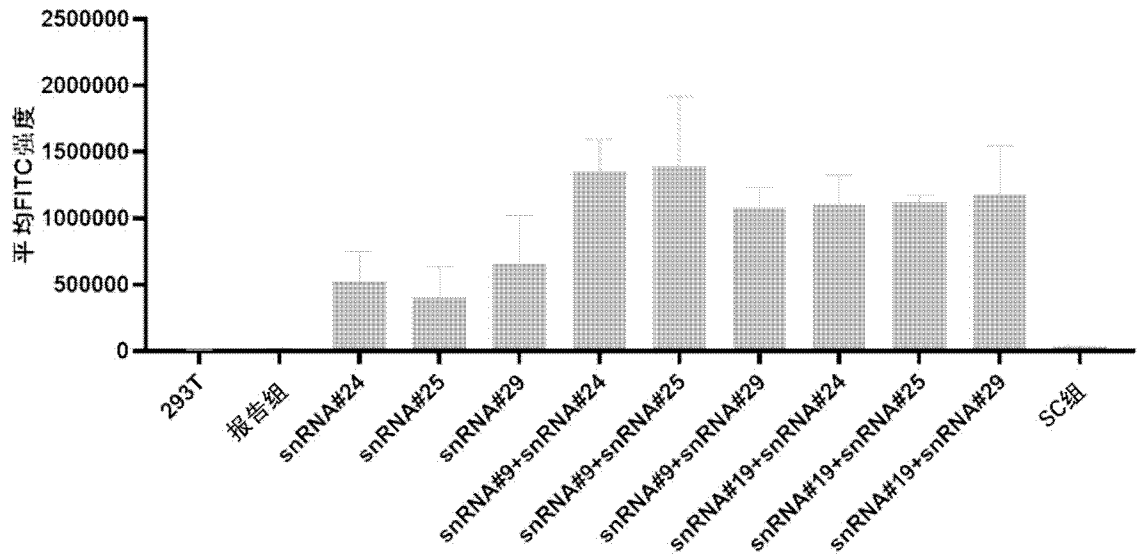


图 4B

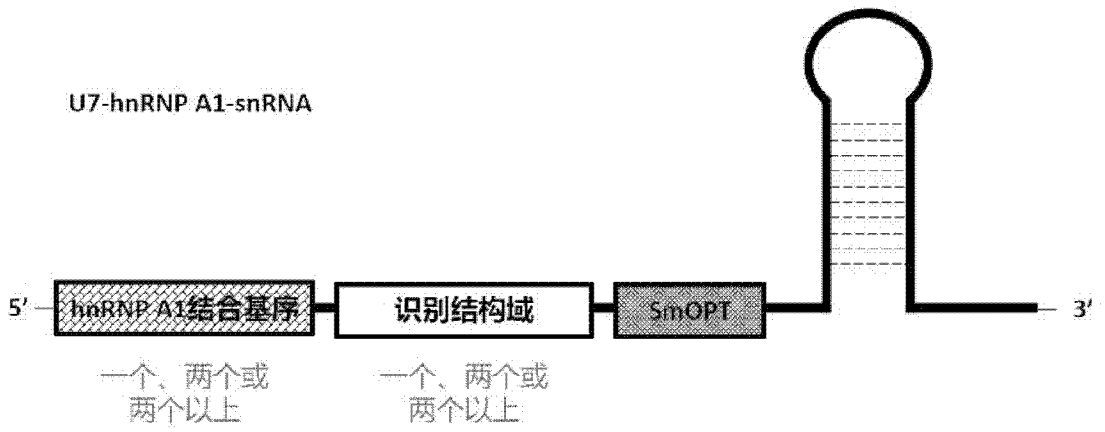


图 5

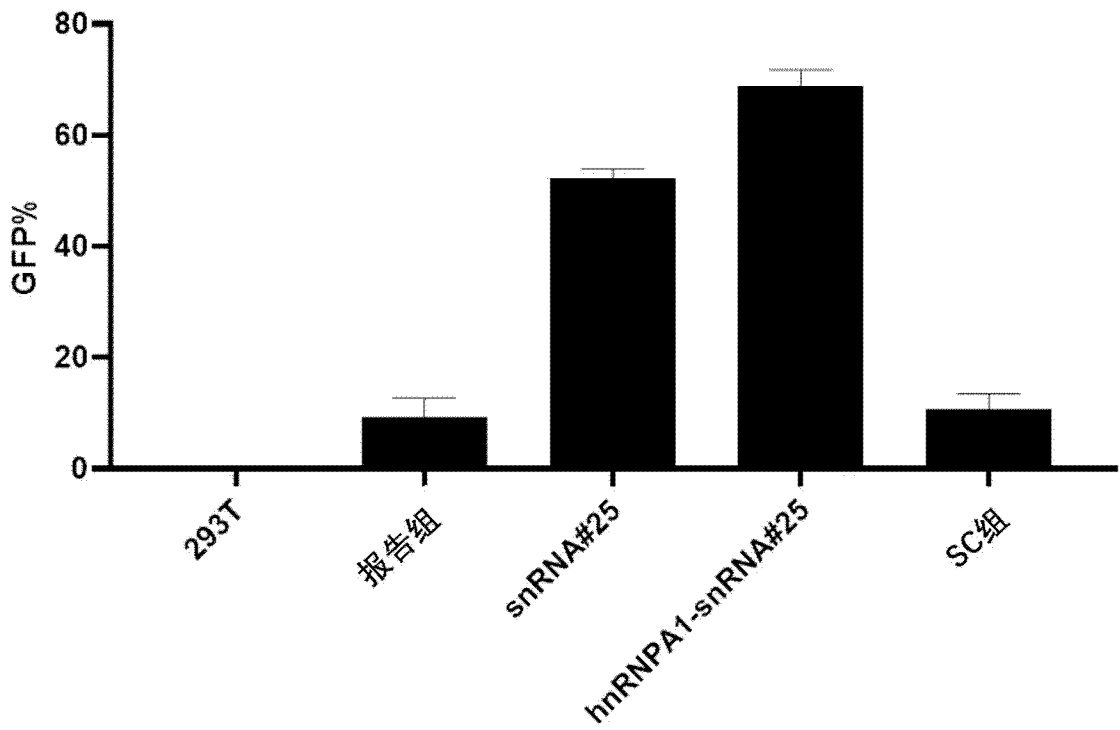


图 6A

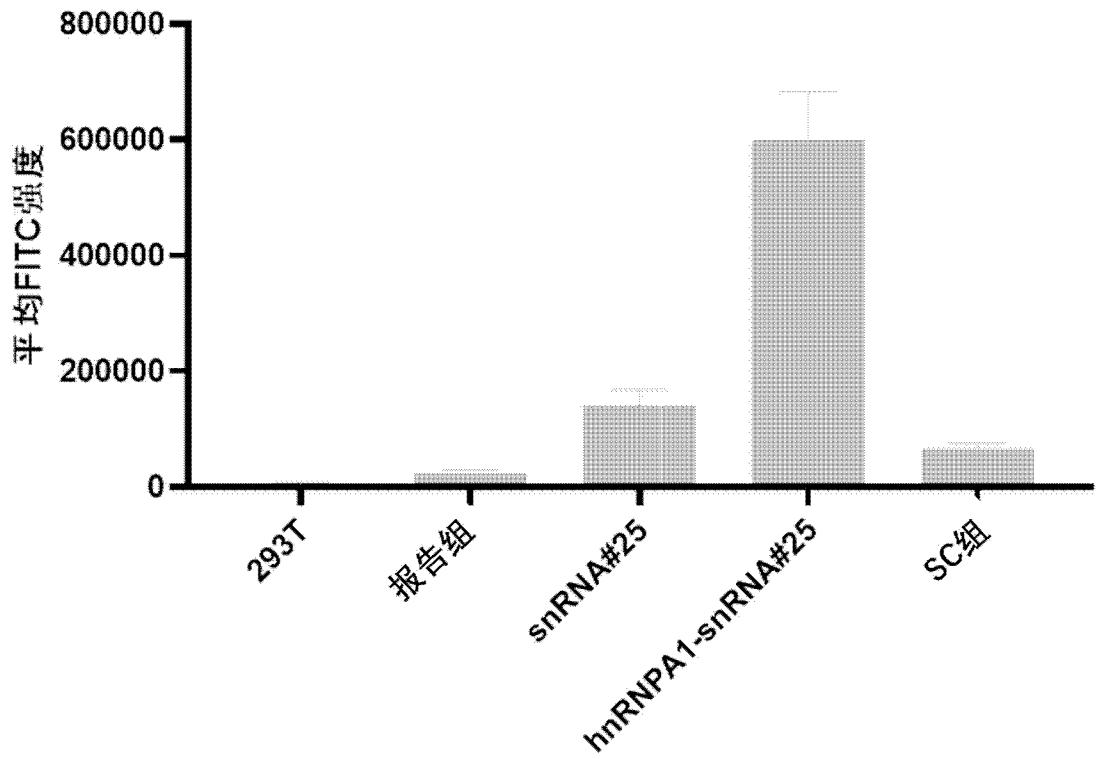


图 6B

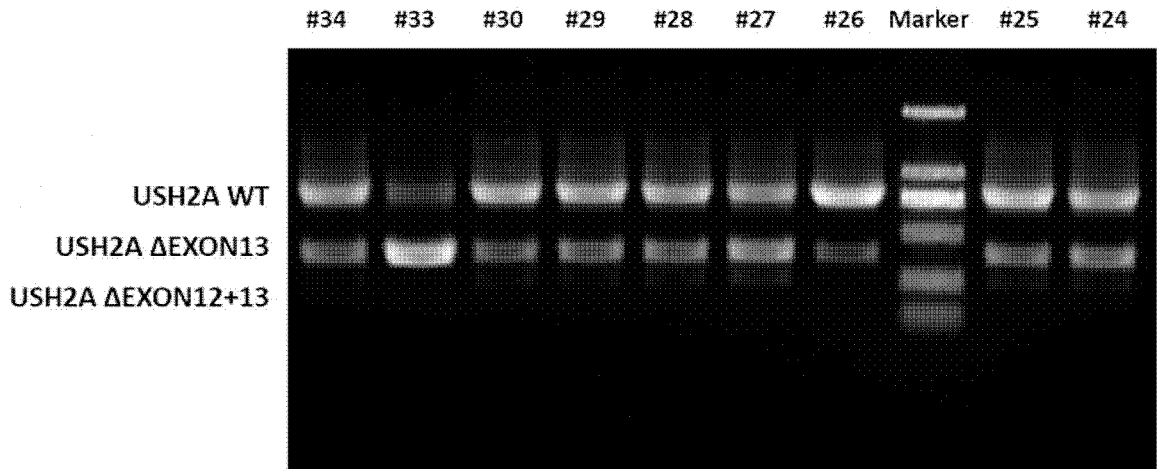


图 7



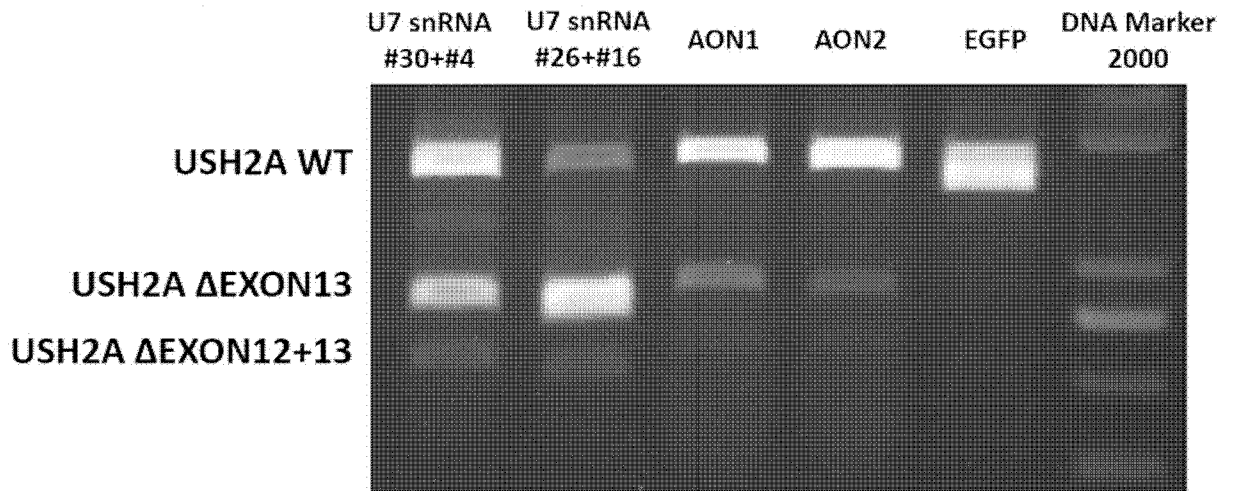


图 8A

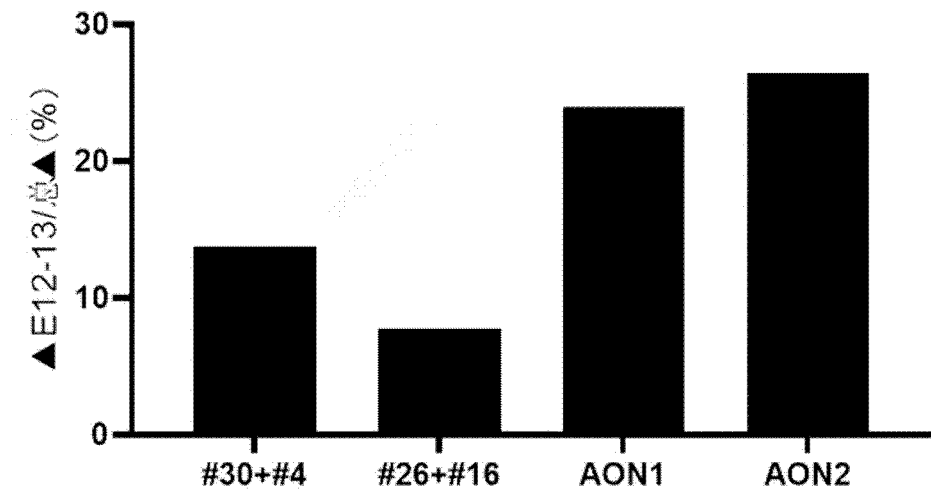


图 8B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070867

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N15/113(2010.01)i;C12N15/63(2006.01)i;A61K48/00(2006.01)i;A61P27/02(2006.01)i;A61P27/06(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12N,A61K,A61P

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

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

VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, ISI Web of Knowledge, CNKI, NCBI GENBANK: Usher综合征, USH2A, 13外显子, 突变, 核小RNA, 剪接跳跃, 外显子跳读, exon13, Usher Syndrome, Chr1: 216246563-216246753, mutation, snRNA, U7snRNA, SEQ ID NOS: 1-30

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109804069 A (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 24 May 2019 (2019-05-24) description, paragraphs 0008-0009, 0010, 0017, 0019, 0034, 0040, 0044, 0051, and 0071; and description, figure 1	1-62
A	WO 2016005514 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 14 January 2016 (2016-01-14) entire document	1-62
A	CN 110997916 A (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 10 April 2020 (2020-04-10) entire document	1-62
A	CN 113748206 A (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 03 December 2021 (2021-12-03) entire document	1-62
A	WO 2020212567 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 22 October 2020 (2020-10-22) entire document	1-62
A	WO 2021175904 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 10 September 2021 (2021-09-10) entire document	1-62

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

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2023

Date of mailing of the international search report

27 March 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,  
Beijing 100088

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070867

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XUE, K. M. et al. "Antisense oligonucleotide therapeutics in clinical trials for the treatment of inherited retinal diseases" <i>Expert Opinion on Investigational Drugs</i> , Vol. 29, No. 10, 01 September 2020 (2020-09-01), pp. 1163-1170	1-62
A	HAM, K. A. et al. "Induction of cryptic pre-mRNA splice-switching by antisense oligonucleotides" <i>Scientific Reports</i> , Vol. 11, 31 December 2021 (2021-12-31), article number 15137	1-62

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/070867**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109804069	A	24 May 2019	ES	2886118	T3	16 December 2021
				EP	3516060	A1	31 July 2019
				EP	3516060	B1	21 July 2021
				US	2020181616	A1	11 June 2020
				US	11479771	B2	25 October 2022
				IL	265206	A	30 May 2019
				ZA	201901247	B	28 October 2020
				KR	20190051020	A	14 May 2019
				KR	102450757	B1	04 October 2022
				PT	3516060	T	27 August 2021
				JP	2019528747	A	17 October 2019
				JP	7141123	B2	22 September 2022
				DK	3516060	T3	27 September 2021
				US	2019256847	A1	22 August 2019
				US	10612025	B2	07 April 2020
				EA	201990644	A1	30 August 2019
				EP	3985117	A1	20 April 2022
				MX	2019003361	A	18 July 2019
				AU	2017330062	A1	02 May 2019
				WO	2018055134	A1	29 March 2018
				BR	112019005586	A2	11 June 2019
GB	201616202	D0	09 November 2016				
PL	3516060	T3	13 December 2021				
CA	3035627	A1	29 March 2018				
WO	2016005514	A1	14 January 2016	US	2021123050	A1	29 April 2021
				US	11414662	B2	16 August 2022
				CA	2952289	A1	14 January 2016
				AU	2015286663	A1	12 January 2017
				AU	2015286663	B2	23 September 2021
				EP	3167064	A1	17 May 2017
				US	2019017048	A1	17 January 2019
				US	10745699	B2	18 August 2020
				IL	250016	A0	30 March 2017
				IL	250016	B	30 July 2020
				US	2017159052	A1	08 June 2017
				US	10131910	B2	20 November 2018
CN	110997916	A	10 April 2020	GB	201706009	D0	31 May 2017
				JP	2020512828	A	30 April 2020
				JP	7113532	B2	05 August 2022
				EP	3610014	A1	19 February 2020
				US	2021115439	A1	22 April 2021
				KR	20190139894	A	18 December 2019
				IL	269735	A	28 November 2019
				AU	2018252191	A1	28 November 2019
				WO	2018189376	A1	18 October 2018
				CA	3057572	A1	18 October 2018
CN	113748206	A	03 December 2021	AU	2020250895	A1	11 November 2021
				JP	2022527814	A	06 June 2022
				CA	3132180	A1	08 October 2020
				WO	2020201406	A1	08 October 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/CN2023/070867</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				EP 3947679 A1	09 February 2022
				IL 286395 A	31 October 2021
				US 2022340900 A1	27 October 2022
				GB 201904709 D0	15 May 2019
WO	2020212567	A1	22 October 2020	IL 286872 A	31 October 2021
				AU 2020259856 A1	18 November 2021
				CA 3136172 A1	22 October 2020
				US 2022213478 A1	07 July 2022
				EP 3956447 A1	23 February 2022
WO	2021175904	A1	10 September 2021	EP 4114945 A1	11 January 2023
				CA 3166720 A1	10 September 2021

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N15/113 (2010.01) i; C12N15/63 (2006.01) i; A61K48/00 (2006.01) i; A61P27/02 (2006.01) i; A61P27/06 (2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C12N, A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, ISI Web of Knowledge, CNKI, NCBI GENBANK: Usher综合征, USH2A, 13外显子, 突变, 核小RNA, 剪接跳跃, 外显子跳读, exon13, Usher Syndrome, Chr1:216246563-216246753, mutation, snRNA, U7snRNA, SEQ ID NOs:1-30</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 109804069 A (ProQR治疗上市公司II) 2019年5月24日 (2019 - 05 - 24) 说明书第0008-0009, 0010, 0017, 0019, 0034, 0040, 0044, 0051, 0071段; 说明书附图1</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016005514 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 2016年1月14日 (2016 - 01 - 14) 全文</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110997916 A (ProQR治疗上市公司II) 2020年4月10日 (2020 - 04 - 10) 全文</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113748206 A (ProQR治疗上市公司II) 2021年12月3日 (2021 - 12 - 03) 全文</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020212567 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 2020年10月22日 (2020 - 10 - 22) 全文</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021175904 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 2021年9月10日 (2021 - 09 - 10) 全文</td> <td>1-62</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 109804069 A (ProQR治疗上市公司II) 2019年5月24日 (2019 - 05 - 24) 说明书第0008-0009, 0010, 0017, 0019, 0034, 0040, 0044, 0051, 0071段; 说明书附图1	1-62	A	WO 2016005514 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 2016年1月14日 (2016 - 01 - 14) 全文	1-62	A	CN 110997916 A (ProQR治疗上市公司II) 2020年4月10日 (2020 - 04 - 10) 全文	1-62	A	CN 113748206 A (ProQR治疗上市公司II) 2021年12月3日 (2021 - 12 - 03) 全文	1-62	A	WO 2020212567 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 2020年10月22日 (2020 - 10 - 22) 全文	1-62	A	WO 2021175904 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 2021年9月10日 (2021 - 09 - 10) 全文	1-62
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 109804069 A (ProQR治疗上市公司II) 2019年5月24日 (2019 - 05 - 24) 说明书第0008-0009, 0010, 0017, 0019, 0034, 0040, 0044, 0051, 0071段; 说明书附图1	1-62																					
A	WO 2016005514 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 2016年1月14日 (2016 - 01 - 14) 全文	1-62																					
A	CN 110997916 A (ProQR治疗上市公司II) 2020年4月10日 (2020 - 04 - 10) 全文	1-62																					
A	CN 113748206 A (ProQR治疗上市公司II) 2021年12月3日 (2021 - 12 - 03) 全文	1-62																					
A	WO 2020212567 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 2020年10月22日 (2020 - 10 - 22) 全文	1-62																					
A	WO 2021175904 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 2021年9月10日 (2021 - 09 - 10) 全文	1-62																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年3月16日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年3月27日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>刘俊</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961940</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	XUE, K.M. 等. "Antisense oligonucleotide therapeutics in clinical trials for the treatment of inherited retinal diseases" Expert Opinion on Investigational Drugs, 第29卷, 第10期, 2020年9月1日 (2020 - 09 - 01), 第1163-1170页	1-62
A	HAM, K.A. 等. "Induction of cryptic pre-mRNA splice-switching by antisense oligonucleotides" Scientific Reports, 第11卷, 2021年12月31日 (2021 - 12 - 31), 文章编号15137	1-62



## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/070867

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109804069	A	2019年5月24日	ES	2886118	T3	2021年12月16日
				EP	3516060	A1	2019年7月31日
				EP	3516060	B1	2021年7月21日
				US	2020181616	A1	2020年6月11日
				US	11479771	B2	2022年10月25日
				IL	265206	A	2019年5月30日
				ZA	201901247	B	2020年10月28日
				KR	20190051020	A	2019年5月14日
				KR	102450757	B1	2022年10月4日
				PT	3516060	T	2021年8月27日
				JP	2019528747	A	2019年10月17日
				JP	7141123	B2	2022年9月22日
				DK	3516060	T3	2021年9月27日
				US	2019256847	A1	2019年8月22日
				US	10612025	B2	2020年4月7日
				EA	201990644	A1	2019年8月30日
				EP	3985117	A1	2022年4月20日
				MX	2019003361	A	2019年7月18日
				AU	2017330062	A1	2019年5月2日
				WO	2018055134	A1	2018年3月29日
				BR	112019005586	A2	2019年6月11日
GB	201616202	D0	2016年11月9日				
PL	3516060	T3	2021年12月13日				
CA	3035627	A1	2018年3月29日				
WO	2016005514	A1	2016年1月14日	US	2021123050	A1	2021年4月29日
				US	11414662	B2	2022年8月16日
				CA	2952289	A1	2016年1月14日
				AU	2015286663	A1	2017年1月12日
				AU	2015286663	B2	2021年9月23日
				EP	3167064	A1	2017年5月17日
				US	2019017048	A1	2019年1月17日
				US	10745699	B2	2020年8月18日
				IL	250016	A0	2017年3月30日
				IL	250016	B	2020年7月30日
				US	2017159052	A1	2017年6月8日
US	10131910	B2	2018年11月20日				
CN	110997916	A	2020年4月10日	GB	201706009	D0	2017年5月31日
				JP	2020512828	A	2020年4月30日
				JP	7113532	B2	2022年8月5日
				EP	3610014	A1	2020年2月19日
				US	2021115439	A1	2021年4月22日
				KR	20190139894	A	2019年12月18日
				IL	269735	A	2019年11月28日
				AU	2018252191	A1	2019年11月28日
				WO	2018189376	A1	2018年10月18日
CA	3057572	A1	2018年10月18日				
CN	113748206	A	2021年12月3日	AU	2020250895	A1	2021年11月11日
				JP	2022527814	A	2022年6月6日
				CA	3132180	A1	2020年10月8日
				WO	2020201406	A1	2020年10月8日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/070867

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				EP	3947679	A1	2022年2月9日
				IL	286395	A	2021年10月31日
				US	2022340900	A1	2022年10月27日
				GB	201904709	D0	2019年5月15日
WO	2020212567	A1	2020年10月22日	IL	286872	A	2021年10月31日
				AU	2020259856	A1	2021年11月18日
				CA	3136172	A1	2020年10月22日
				US	2022213478	A1	2022年7月7日
				EP	3956447	A1	2022年2月23日
WO	2021175904	A1	2021年9月10日	EP	4114945	A1	2023年1月11日
				CA	3166720	A1	2021年9月10日