

(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
2024年4月18日 (18.04.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/078345 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/122201

(22) 国际申请日: 2023年9月27日 (27.09.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211243389.3 2022年10月11日 (11.10.2022) 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瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。

(72) 发明人: 梁峻彬 (LIANG, Junbin); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。欧家裕 (OU, Jiayu); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。徐辉 (XU, Hui); 中国广东省广州市黄埔区瑞和路39号H6栋131-150、H6栋231-250、H7栋101-120、H7栋201-220, Guangdong 510535 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市徐汇

区小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (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, MU, 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, SC, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

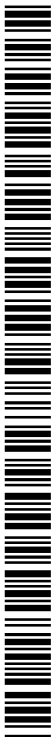
- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: SNRNA NUCLEIC ACID MOLECULE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: snRNA核酸分子及其应用

(57) Abstract: Provided are an snRNA nucleic acid molecule and an application thereof. The snRNA nucleic acid molecule comprises: a recognition domain, a stem-loop sequence, and an Sm sequence; wherein the number of recognition domains is at least two; wherein each recognition domain from the 5' end to the 3' end is reverse complementary to target sequence segments from the 3' end to the 5' end of pre-mRNA; the pre-mRNA being pre-mRNA corresponding to the USH2A gene. The snRNA nucleic acid molecule can efficiently induce USH2A exon 13 skipping, with a higher single-skip reading frequency. Especially regarding pathogenic or non-pathogenic USH2A exon 13, the present invention can safely and effectively read USH2A exon 13 single skips at low doses, and has important clinical value in the prevention and/or treatment of eye diseases and ear diseases related to abnormal expression of the Usherin protein.

(57) 摘要: 提供一种snRNA核酸分子及其应用。snRNA核酸分子包括: 识别结构域、茎环序列和Sm序列; 其中, 所述识别结构域的数量为至少两个; 其中, 各识别结构域自5'端至3'端与pre-mRNA的3'端至5'端的靶向序列片段反向互补; 所述pre-mRNA为USH2A基因对应的pre-mRNA。snRNA核酸分子能够高效诱导USH2A外显子13的剪接跳跃, 且单跳读的频率更高; 尤其对于发生致病或非致病变的USH2A外显子13, 本能够以低剂量安全、有效进行USH2A外显子13单跳读, 在预防和/或治疗Usherin蛋白表达异常相关的眼病和耳病中具有重要的临床价值。



WO 2024/078345 A1

snRNA 核酸分子及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种 snRNA 核酸分子及其应用。

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 (Retinitis Pigmentosa, RP) 引起的进行性视力丧失。在临床上 Usher 综合征可分为 3 种类型：(1) I 型 Usher 综合征：听力先天性重深度感音神经性耳聋，前庭反应消失，青春期前出现色素性视网膜炎，逐渐致盲，关联基因涉及 MYO7A、CDH23、USH1C、PCHD15 等；(2) II 型 Usher 综合征：听力先天性中重度感音神经性耳聋，前庭反应正常，青春期出现色素性视网膜炎，逐渐致盲，关联基因涉及 USH2A、GPR98、WHRN 等；(3) III 型 Usher 综合征：听力进行性感音神经性耳聋，前庭反应正常，青春期末出现色素性视网膜炎，逐渐致盲，关联基因涉及 CLRN1 等。

其中，II 型占 Usher 综合症的比例超过 50%。而 USH2A 基因突变是 Usher 综合征 II 型的最常见原因，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 15.6 kb。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 外显子 13 长度为 642 bp，编码 Usherin 第 723~936 位氨基酸，构成 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，其中的外显子 13 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)、c.2299delG (p.Glu767Serfs*21，欧美患者频率最高突变)、c.2276G>T (p.cys759phe，导致非综合征性 RP 中最常见的突变位点)、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、C.2332G>T、c.2339 G>T (PMID: 31904091)。

USH2A 编码区长度约为 15.6 kb，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 的外显子 12 与人 USH2A 外显子 13 同源，长度均为 642 bp，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 的外显子 12 后，Usherin 依然能够正确定位并且行使正常的功能。以此类推，对于包含致病性突变的人 USH2A 外显子 13，我们可以利用一系列手段使其发生跳读进行治疗。

现有技术通过 CRISPR/Cas 系统进行基因组 DNA 的编辑直接删除外显子 13，或者破坏 RNA 剪接相关的位点。使用片段删除存在风险，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高。

现有技术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。

现有技术显示通过反义寡核苷酸(AONs, Antisense oligonucleotides)靶向干扰 pre-mRNA 剪接，外显子跳读的效率较高。然而，AON 在促进人外显子 13 跳读的同时，也促进人外显子 12 与人外显子 13 共同跳读，甚至有的 AON 处理导致的全是双跳读，而没有单跳读。而人外显子 12 全长 196 bp，非 3 整数倍，缺失会导致移码突变，USH2A 蛋白失活。

天主教大学基金 US10131910B2 和 US10745699B2 公开了用于治疗 2 型 Usher 综合征的反义寡核苷酸。该等专利通过反义寡核苷酸(AON)靶向人 USH2A 外显子 13 (内含子 12)、PE40、外显子 50，诱导外显子跳跃和内含子 12 的保留。

该专利虽然利用靶向内含子 12 的 AON4a，有效保留了外显子 12，但是使用多个 AON，则脱靶风险增大，同时，AON4a 需求量大，则总体 AON 给药量则更大，大剂量 AON 存在细胞毒性风险。

RPOQR(CN109804069A)公开了治疗眼部疾病的反义寡核苷酸。该专利在 US10131910B2 和 US10745699B2 的基础上，发现了三个位点 Ex13-1、Ex13-2 和 Ex13-3 似乎给出更强的单(外显子 13)跳读的信号。

然而，AON 在促进人外显子 13 跳读的同时，也促进人外显子 12 与人外显子 13 共同跳读，甚至有的 AON 处理导致的大部分是双跳读，或者存在非正常/完整外显子 13 跳读（可能为外显子 12 单跳读）的杂条带。而人外显子 12 全长 196bp，非 3 整数倍，缺失会导致移码突变，剪接双跳后的 USH2A 蛋白失活。AON 效果持续性不长，用药频率高；诱导剪接跳跃效率不高；AON 给药剂量非常大。

细胞内有核小 RNA (small nuclear RNA, 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。但 U7 snRNP, 不参与剪接, 而是复制依赖型组蛋白 (RDH) pre-mRNA 独特 3'末端加工的关键因素。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 snRNP 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。

然而, 自 1998 年修饰的 U7 snRNA 研发以来, 其相关研究和应用并不广泛, 仅局限于少数几个靶点, 受限于 U7 snRNP 施用的载体数量, 如使用病毒如 AAV 递送的修饰 U7 snRNA 需要非常高的病毒剂量, 高剂量的病毒可能会存在毒性或引发免疫反应, 这限制了病毒递送 U7-snRNA 的应用。而其它基因整合的长期递送方式存在基因组安全风险, 瞬时递送的效果短暂。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是为了克服现有技术中 USH2A 外显子 13 剪接跳跃诱导效率不高的缺陷, 提供了一种 snRNA 核酸分子及其应用。本发明通过 snRNA 靶向干扰 USH2A 外显子 13 的 pre-mRNA 剪接, 促进外显子单跳读的效率, 在显著提升效率的同时保证了安全性。

本发明通过以下技术方案解决上述技术问题。

本发明的第一方面提供一种 snRNA 核酸分子, 所述 snRNA 核酸分子包括: 识别结构域、茎环序列和 Sm 序列; 其中, 所述识别结构域的数量为至少两个;

其中, 各识别结构域自 5'端至 3'端与 pre-mRNA 的 3'端至 5'端的靶向序列片段反向互补; 所述 pre-mRNA 为 USH2A 基因对应的 pre-mRNA。

本发明一些实施方案中, 各所述识别结构域自 5'端至 3'端依次与 pre-mRNA 的 3'端至 5'端的靶向序列片段反向互补, 即 snRNA 核酸分子的 5'端到 3'端的识别结构域排序为依据识别结构域对应的靶位点在 USH2A pre-mRNA 中的位置按 3'端到 5'端排序。

本发明一些实施方案中, 各所述识别结构域自 5'端至 3'端非依次与 pre-mRNA 的 3'端至 5'端的靶向序列片段反向互补, 即 snRNA 核酸分子的 5'端到 3'端的识别结构域排序并非依据识别结构域对应的靶位点在 USH2A pre-mRNA 中的位置按 3'端到 5'端排序。

本发明一些实施方案中, 所述识别结构域的长度为至少 16bp。

本发明另一些实施方案中, 所述识别结构域的长度为 18~40 bp。

本发明另一些实施方案中, 所述识别结构域的长度为 20~27 bp。

本发明另一些实施方案中，所述识别结构域的长度为 22~27 bp。

本发明一些实施方案中，所述识别结构域的数量为两个；优选地，所述两个识别结构域相邻分布。

本发明一些实施方案中，所述茎环序列可为 1-2 个。

本发明一些具体实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端至 3'端依次包括：两个相邻的识别结构域、Sm 序列和茎环序列。

本发明一些实施方案中，所述 pre-mRNA 为 USH2A 基因第 12 号内含子至第 13 号内含子对应的全部或部分 pre-mRNA。

本发明一些较佳实施方案中，所述 pre-mRNA 为 USH2A 基因第 13 号外显子对应的全部或部分 pre-mRNA。

本发明一些实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216247246；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明另一些实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216246753；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些较佳实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216246649；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216246626；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246616-216246649；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 34 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247130-216247246；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247142-216247185；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 32 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247130-216247161；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 33 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247210-216247246；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247204-216247232；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247187-216247220；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 38 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些具体实施方案中,所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247169-216247202; 所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 39 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明中,两个所述识别结构域自 5'端向 3'分别为第一识别结构域和第二识别结构域; 所述第一识别结构域和第二识别结构域可以是识别不同靶位点的 RNA 序列,也可以识别同一靶位点的 RNA 序列。

本发明一些具体实施方案中,识别不同靶位点的 RNA 序列中,与 USH2A pre-mRNA 3' 端结合的反向互补 RNA 序列作为 snRNA 的第二识别结构域,与 USH2A pre-mRNA 5' 端结合的反向互补 RNA 作为 snRNA 第一识别结构域。

本发明一些实施方案中,与所述第一识别结构域或第二识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 34 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列及其突变序列; 相应与所述第二识别结构域或第一识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 32 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 33 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 38 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 39 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明一些实施方案中,与所述第一识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 34 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列及其突变序列; 与所述第二识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 32 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 33 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 38 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 39 所示的核苷酸序列及其突变序列。

本发明中,所述突变序列为基于出发序列发生一个或多个核苷酸的替换、增加或缺失后得到的序列。

本发明一些具体实施方案中,所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12~22、59~61 任一项所示,所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 40~58 任一项所示。

本发明一些实施方案中,所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12、13、15 或 17 所示,所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48、54、56 或 58 所示。

本发明一些具体实施方案中,所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12、13 或 17 所示,所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48、54 或 58 所示。

本发明一些实施方案中,所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示,所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示。

本发明另一些实施方案中,所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示,

所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。

本发明另一些实施方案中，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示。

本发明中，所述突变序列为在所述核苷酸序列上存在一个或多个核苷酸的替换、增加或缺失，优选地为替换。

本发明中，所述突变选自天然致病突变和天然非致病突变。所述天然致病突变选自 c.2242C>T、c.2276G>T、c.2299delG、c.2522C>A、c.2541C>A、c.2761delC、c.2776C>T、c.2802T>G、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 c.2332G>T 中的一种或多种。

本发明一些具体实施方案中，所述天然致病突变选自 c.2802T>G、c.2299delG 和 c.2276G>T 中的一种或多种；例如，所述核苷酸突变为 c.2802T>G。

本发明一些实施方案中，所述 Sm 序列为共有序列，所述茎环序列可为 U1、U2、U3、U4、U5、U6 或 U7 的茎环序列。

本发明一些具体实施方案中，所述茎环序列为 U7 的茎环序列。

本发明一些具体实施方案中，所述茎环序列为 U1 的茎环序列。

本发明一些具体实施方案中，所述 Sm 序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

本发明一些具体实施方案中，所述茎环序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

本发明一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

本发明中，所述修饰选自：2'-O-烷基修饰、2'-O-甲氧基修饰和 2'-O-甲氧基乙基修饰。

本发明一些具体实施方案中，所述 2'-O 烷基修饰为 2'-O-甲基修饰。

本发明一些实施方案中，所述核苷酸类似物单体选自 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 2'-脱氧 2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷酸。

本发明一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子的核苷酸间通过化学键连接，所述化学键选自磷酸键、亚甲基键、酰胺键、甲基磷酸酯键和 3'-硫代甲缩醛键。

本发明一些实施方案中，所述磷酸键选自硫代磷酸酯键、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)。

本发明一些具体实施方案中，所述磷酸键为硫代磷酸酯键。

本发明一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起的第 1~80 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

本发明另一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起的第 3~40 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

本发明另一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起的第 6~10 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

本发明另一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起的第 20~27 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

本发明一些具体实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端或 3'端起包含至少一个磷酸键。

本发明一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子包括上述一种或多种修饰。

本发明中，当所述 snRNA 核酸分子为化学合成时，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。在一些实施方案中，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 实施方案中，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。在一些实施方案中，化学合成的 snRNA 两侧的 3-40 个碱基为经过修饰并通过磷酸键连接。

本发明一些具体实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 5'端起包含 1~3 个磷酸键。

本发明一些具体实施方案中，所述 snRNA 核酸分子自 3'端起包含 1~3 个磷酸键。

本发明一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子进一步在所述识别结构域的 5'端和/或 3'端的核苷酸上包括单向延长序列或双向延长序列。

所述单向延长序列为在所述 snRNA 核酸分子的靶向序列的 5'端或 3'端增加的 RNA 序列；所述双向延长序列为在所述 snRNA 核酸分子的靶向序列的 5'端和 3'端分别增加的 RNA 序列。

本发明一些实施方案中，所述 snRNA 核酸分子进一步包括游离的尾部序列，所述尾部序列包含剪接调控蛋白的基序，可结合剪接调控蛋白。

本发明一些具体实施方案中，所述剪接调控蛋白选自 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)和 SR (Serine And Arginine-Rich Protein)。

例如，所述剪接调控蛋白为 hnRNP A1 时，所述尾部序列如 SEQ ID NO: 35 所示。

本发明的第二方面提供一种 snRNA 核酸分子的组合，所述组合包括一种或多种如第一方面所述的 snRNA 核酸分子。

本发明一些实施方案中，至少两个识别结构域位于相同或不同的 snRNA 核酸分子上。

本发明的第三方面提供一种 DNA 分子，所述 DNA 分子编码如第一方面所述的 snRNA 核酸分子或者如第一方面所述的组合。

本发明的第四方面提供一种基因表达盒，所述基因表达盒包含启动子和如第三方面所述的 DNA 分子。

本发明一些实施方案中，所述启动子为 U7 启动子。

本发明一些具体实施方案中，所述启动子为小鼠来源的 U7 启动子。

本发明一些实施方案中，所述基因表达盒的 3'端包含加尾序列，所述加尾序列参与所述 snRNA 的加工。

本发明中，所述加尾序列的长度为 28~131bp，例如为 106bp。

本发明一些实施方案中，所述加尾序列为 U7 snRNA 基因 3'端后的基因序列，例如如 SEQ ID NO: 8 所示。

本发明一些实施方案中，所述基因表达盒包括识别结构域和骨架序列；所述骨架序列如 SEQ ID NO: 62 所示。

本发明的第五方面一种重组表达载体，所述重组表达载体包含如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合或者如第三方面所述的基因表达盒。

本发明一些实施方案中，所述重组表达载体的表达载体选自质粒、噬菌体、微环 DNA、线性 DNA 和病毒。

本发明一些具体实施方案中，所述表达载体为慢病毒或腺相关病毒。

本发明中，所述腺相关病毒的衣壳蛋白为天然来源的衣壳蛋白或其突变体，所述腺相关病毒的质粒为单链（ssAAV， single-stranded AAV）或与所述单链互补的双链（scAAV， Self-complementary AAV）。

本发明中，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、AAV4、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。优选对眼部视网膜组织具有亲嗜性的 AAV 血清型，如 AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10 或 AAV2.7m8。本发明 AAV 质粒体系中，例如，AAV ITR 血清型应与 Rep 基因血清型一致，与 Cap 基因血清型可不一致。所述 AAV 可以是单链 AAV（ssAAV， single-stranded AAV），也可以是自互补形成的双链 AAV（scAAV， Self-complementary AAV）。

本发明一些具体实施方案中，所述天然来源的衣壳蛋白选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10 和 AAVrh.43；

所述突变体选自 AAV2.5、AAV2i8、AAV-TT、AAV9.HR 和 CAM130。

本发明的第六方面提供一种病毒颗粒，包括衣壳蛋白和核酸，所述核酸包括如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合或者如第三方面所述的 DNA 分子。

本发明一些实施方案中，所述衣壳蛋白为来自腺相关病毒的衣壳蛋白。

本发明一些实施方案中，所述来自腺相关病毒的衣壳蛋白如第五方面所定义。

本发明的第七方面提供一种药物组合物，所述药物组合物包含如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体或者如第六方面所述的病毒颗粒。

本发明一些实施方案中，所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

本发明的第八方面提供一种诱导产生缺失外显子 13 的 Usherin 蛋白的方法，所述方法包括向宿主细胞中导入如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体、如第六方面所述的病毒颗粒或者如第七方面所述的药物组合物，使外显子 13 发生剪接跳跃。

本发明一些实施方案中，所述宿主细胞选自视网膜组织细胞，内耳细胞，具有分化为视网膜组织细胞和/或内耳细胞的潜能细胞，以及可行使包含具有与视网膜组织细胞和/或内耳细胞对应功能的细胞。

本发明一些具体实施方案中，所述视网膜组织细胞为视网膜感光细胞，所述内耳细胞为内耳毛细胞。

本发明中，所述干细胞选自诱导多能干细胞和胚胎干细胞。

本发明中，所述潜能细胞选自诱导多能干细胞、胚胎干细胞、神经前体细胞、视网膜祖细胞、视网膜前体细胞和间充质基质细胞。

本发明的第九方面提供一种抑制 USH2A pre-mRNA 外显子 13 表达和/或功能的方法，所述方法包括施用如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体、如第六方面所述的病毒颗粒或者如第七方面所述的药物组合物。

本发明的第十方面提供一种诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的方法，所述方法包括施用如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体、如第六方面所述的病毒颗粒或者如第七方面所述的药物组合物。

本发明的第十一方面提供一种降低异常 Usherin 蛋白表达的方法，所述方法包括向宿主细胞中导入如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体、如第六方面所述的病毒颗粒或者如第七方面所述的药物组合物。

本发明一些实施方案中，所述宿主细胞如第八方面所定义。

本发明的第十二方面提供一种制备如第一方面所述的 snRNA 核酸分子或者如第二方面所述的组合的方法，所述方法包括生物合成或化学合成如第一方面所述的 snRNA 核酸分子或者如第二方面所述的组合的步骤。

本发明的第十三方面提供一种如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体、如第六方面所述的病毒颗粒或者如第七方面所述的药物组合物在制备治疗 USH2A 外显子 13 突变相关的疾病的药物中的应用。

本发明一些实施方案中，所述 USH2A 外显子 13 突变为致病突变或非致病突变。

本发明一些实施方案中，所述疾病选自眼病和耳病。

本发明中，如第八方面、第九方面、第十方面和第十一方面所述的方法是非治疗目的的，例如用于药物研发的实验室研究、试剂盒开发。

本发明的第十四方面提供一种治疗 USH2A 外显子 13 突变相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的如第一方面所述的 snRNA 核酸分子、如第二方面所述的组合、如第三方面所述的 DNA 分子、如第四方面所述的基因表达盒、如第五方面所述的重组表达载体、如第六方面所述的病毒颗粒或者如第七方面所述的药物组合物。

本发明一些实施方案中，所述 USH2A 外显子 13 突变相关的疾病如第十三方面所述。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：

本发明提供的 snRNA 核酸分子靶向 USH2A 外显子 13 及其两侧靶区域，snRNA 核酸分子包括识别结构域、茎环序列和 Sm 序列，识别结构域的数量为至少两个，至少两个的识别结构域在 snRNA 中形成“串联”结构，不同靶位点的 U7-snRNA 串联能够高效诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃，且单跳读的频率更高；尤其对于发生致病或非致病变的 USH2A 外显子 13，本发明的 snRNA 能够以低剂量安全、有效进行 USH2A 外显子 13 单跳读，在预防和/或治疗 Usherin 蛋白表达异常相关的眼病和耳病中具有重要的临床价值。

附图说明

图 1 为以单个识别结构域为例靶向 USH2A 的外显子 13 的 U7-snRNA 的结构和作用效果示意图。

图 2 为靶向靶区域 8 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

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 外显子 13 剪接跳跃效果。

图 4 为不同靶点的 snRNA 高效诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 单独剪接跳跃效率示意图。

图 5 为靶向靶区域 1 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 6 为靶向靶区域 1 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 7 为靶向靶区域 1 的 U7-snRNA 诱导的（USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃）GFP 阳性细胞的平均 FITC 强度柱状图。

图 8 为靶向靶区域 2 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 9 为靶向靶区域 2 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 10 为靶向靶区域 2 的 U7-snRNA 诱导的（USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃）GFP 阳性细胞的平均 FITC 强度柱状图。

图 11 为靶向靶区域 3 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 12 为靶向靶区域 3 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 13 为靶向靶区域 3 的 U7-snRNA 诱导的（USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃）

GFP 阳性细胞的平均 FITC 强度柱状图。

图 14 为靶向靶区域 4 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 15 为靶向靶区域 4 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 16 为靶向靶区域 5 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 17 为靶向靶区域 5 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 18 为靶向靶区域 6 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 19 为靶向靶区域 6 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 20 为靶向靶区域 7 的 U7-snRNA 在基因组上的位置示意图。

图 21 为靶向靶区域 7 的 U7-snRNA 在报告载体细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的细胞比例结果图。

图 22 为靶向不同区域的 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞的平均 FITC 强度结果图。

图 23 为本发明串联 U7 snRNA 的结构示意图。

图 24A 为本发明串联 U7 snRNA 与 USH2A pre-mRNA 靶向方式示意图 1；

图 24B 为本发明串联 U7 snRNA 与 USH2A pre-mRNA 靶向方式示意图 2。

图 25 为实施例 8-1 识别结构域串联的 pUC57-U7-snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃效率。

图 26 为实施例 8-2 识别结构域串联的 pUC57-U7-snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃效率。

图 27 显示在 WERI 细胞中检测化学合成的 U7 snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率；

图中，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+#15；泳道 3：50pmol AON1；泳道 4：50pmol AON2；泳道 5：EGFP；泳道 6：GL DNA Marker 2000。

图 28 为实施例 9 的 RT-PCR 电泳条带定量分析柱状图；

图中，▲E12-E13 表示表示同时剪接跳过外显子 12 和外显子 13 的 USH2A mRNA，总▲表示剪接跳过外显子 13 或同时剪接跳过外显子 12 和外显子 13 的 USH2A mRNA 总和。

图 29A 显示串联 U7 snRNA 的结构示意图。

图 29B 对比 U7-hnRNP A1-snRNA 和 U7-snRNA 串联诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13

剪接跳跃效率。

图 30 显示通过体外梯度爬坡实验检验，3×U7 snRNA 串联诱导 USH2A 外显子 13 剪接。

图 31 显示通过体外剂量爬坡实验验证 AAV-U7 snRNA 串联诱导剪接跳跃效果显著优于 AON。

图 32 显示 snRNA 诱导人源化小鼠视网膜细胞 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃优于 AON。

图 33 显示不同血清型的 AAV-U7 snRNA 注射诱导兔子眼部细胞 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃优于 AON。

图 34 显示 22 周 AAV 递送的 U7 snRNA 仍能维持诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃。

图 35 显示 AAV-1×U7 snRNA 串联与 AAV-4×U7 snRNA 组合的诱导剪接跳跃效率的长期维持能力。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

实施例 1：合成 U7-snRNA

1、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: 5)和识别结构域（与复制依赖型组蛋白 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 结合位点被替换为优化的共有 Sm 序列，即 SmOPT (AAUUUUUGGAG, SEQ ID NO: 6)，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 (CAGGUUUUCUGACUUCGG UCGGAAAACCCCU, SEQ ID NO: 7)。

如图 1 所示，靶向 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的非串联 U7 snRNA 识别结构域序列与选自 USH2A pre-mRNA 内含子 12-外显子 13-内含子 13 的靶序列反向互补配对，靶序列可以选自 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段序列靶区域。

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 II 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: 8)”的序列，参与 pre-snRNA 的加工。

2、构建靶向靶区域的 U7 snRNA 载体

本申请 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段区域序列（SEQ ID NO: 1）对应的人基因组定位为 Chr1:216246563-216246753（对应于 NCBI 数据库 GRch38 版本），SEQ ID NO: 1 的序列如下：

UAAAUUAUUUUUAUCUUUAGGGCUUAGGUGUGAUCAUUGCAAUUUUGGAUUUA
AAUUUCUCCGAAGCUUUAUGAUGUUGGAUGUGAGCCCUGCCAGUGUAACCUCCA
GGCUCAGUGAACAAUUCUGCAAUCCUCACUCUGGGCAGUGUGAGUGCAAAAAAGA
AGCCAAAGGACUUCAGUGUGACACCUGCAGAGAAAACUUUUUAUGGGUUAGAUGUCA
CCAAUUGUAAGGCCUGUGACUGUGACACAGCUGGAUCCCUGGGACUGUCUGU
AAUGCUAAGACAGGGCAGUGCAUCUGCAAGCCCAAUGUUGAAGGGAGACAGUGCAA
UAAAUGUUUGGAGGGAAACUUCUACCUACGGCAAAAUAUUCUUUCCUCUGUCUGC
CUUGCAACUGUGAUAAAGACUGGGACAAUAAAUGGCUCUCUGCUGUGUAACAAAUCA
ACAGGACAAUGUCCUUGCAAUUAGGGGUAACAGGUCUUCGCUGUAAUCAGUGUGA
GCCUCACAGGUACAAUUUGACCAUUGACAAUUUUCACACUGCCAGAUGUGUGAGU
GUGAUUCCUUGGGGACAUUACCUUGGGACCAUUGUGACCCAAUCAGUGGCCAGUGC
CUGUGUGUGCCUAAUCGUCAAGGAAGAAGGUGUAAUCAGUGUCAACCAGGUAAGAA
AGAAAUGUAUUACAU。以上所述 USH2A pre-mRNA 外显子 13 及两侧临近靶区域（Chr1:
216246563-216247246 对应的 pre-mRNA 区域）除了以上列举的无突变序列外，还可以是含有
天然致病/非致病突变的靶区域，所述突变位点包括以下突变位点中至少 1 个的靶区域：
c.2242C>T、c.2276G> T、c.2299delG、c.2522C>A、c.2541C>A、c.2761delC、c.2776C>T、
c.2802T>G、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、c.2332G>T。

USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 5'段靶区域(chr1:216247130-216247246 对应的 pre-mRNA 区域）（SEQ ID NO: 2）序列如下：

UAAAUUAUUUUUAUCUUUAGGGCUUAGGUGUGAUCAUUGCAAUUUUGGAUUUA
AAUUUCUCCGAAGCUUUAUGAUGUUGGAUGUGAGCCCUGCCAGUGUAACCUCCA

GGCUCAGU

USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段靶区域(chr1:216246563-216246753 对应的 pre-mRNA 区域) (SEQ ID NO: 3) 序列如下:

CAGUGUGAGCCUCACAGGUACAAUUUGACCAUUGACAAUUUUCAACACUGCCA
GAUGUGUGAGUGUGAUUCCUUGGGGACAUAUACCUUGGGACCAUUGUGACCCAAUCA
GUGGCCAGUGCCUGUGUGUGCCUAAUCGUCAAGGAAGAAGGUGUAAUCAGUGUCA
CCAGGUAAGAAAGAAAUGUAUUACA

USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段优选靶区域 (chr1:216246563-216246649 对应的 pre-mRNA 区域) (SEQ ID NO: 4) 序列如下:

AAUCAGUGGCCAGUGCCUGUGUGUGCCUAAUCGUCAAGGAAGAAGGUGUAAUC
AGUGUCAACCAGGUAAGAAAGAAAUGUAUUACA

USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段区域 (Chr1:216246563-216246626 对应的 pre-mRNA 区域) (区域 8, SEQ ID NO: 9) 序列为: UGCCUAAUCGUCAAGGAA
GAAGGUGUAAUCAGUGTCAACCAGGUAAGAAAGAAAUGUAUUACA, 也可以是含有天然突变的 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段区域序列, 如 UGCCUAAUCGUCAAGGAAGAAGGUGUAAUCAGUGGCAACCAGGUAAGAAAGAAAUG
UAUUACA (下划线标注的为天然致病突变 c.2802T>G, SEQ ID NO: 10)。

根据表 1 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'-CCGCANN-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 μl: Oligo-F (100 μM) 2 μl+Oligo-R (100 μM) 2 μl+10×NEB Cutter smart buffer 2 μl+去离子水 16 μl) 混合, 95°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 μl 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 外显子 13 剪接跳跃的 U7 snRNA 载体。提纯质粒, 保存于-20°C备用。

表 1. snRNA 的识别结构域序列

| snRNA 编号 | 识别结构域序列 (5'-3') | SEQ ID | USH2A Pre-mRNA 靶位点对应的基因组定位 | 靶向区域 |
|----------|-------------------------------|--------|----------------------------|------|
| 23 | AUUGUACCUUGUGAGGCUCACA CUG | 11 | Chr1:216246730-216246753 | 区域 9 |

| | | | | |
|----------|---------------------------------|----|--------------------------|------|
| 24 | ACCUUCUCCUUGACGAUUAG GCA | 12 | Chr1:216246603-216246626 | 区域 8 |
| 25 | AUUACACCUUCUCCUUGACG AUU | 13 | Chr1:216246598-216246621 | 区域 8 |
| 26 | AUUACACCUUCUCCUUGACG AUUAGG | 14 | Chr1:216246598-216246624 | 区域 8 |
| 27 | ACUGAUUACACCUUCUCCU GAC | 15 | Chr1:216246594-216246617 | 区域 8 |
| 28 | ACAUUUCUUUCUUACCUGGUU GAC | 16 | Chr1:216246570-216246593 | 区域 8 |
| 29 | ACAUUUCUUUCUUACCUGGUU G | 17 | Chr1:216246570-216246591 | 区域 8 |
| 30 | ACAUUUCUUUCUUACCUGGUU GACACU | 18 | Chr1:216246570-216246596 | 区域 8 |
| 31 | ACAUUUCUUUCUUACCUGGUU GCC | 19 | Chr1:216246570-216246593 | 区域 8 |
| 32 | ACAUUUCUUUCUUACCUGGUU GCCACU | 20 | Chr1:216246570-216246596 | 区域 8 |
| 33 | AAUACAUUUCUUUCUUACCUG GUU | 21 | Chr1:216246567-216246590 | 区域 8 |
| 34 | AUGUAAUACAUUUCUUUCUUA CCU | 22 | Chr1:216246563-216246586 | 区域 8 |
| Scramble | AGGUGUAGUCGACCAUCGUG | 23 | 没有匹配靶序列，阴性对照 | |

其中，snRNA#24、snRNA#25、snRNA#27 和 snRNA#29 为人、猴同源。

3、U7-snRNA 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-snRNA#25 序列如下：

5'-

mA*mU*mU*ACACCUUCUUCCUUGACGAUUAAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUC
GGUCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 24)

化学合成和修饰的 U7-snRNA#25 双向延长序列如下：

5'-

mA*mC*mU*GAUUACACCUUCUUCCUUGACGAUUAGGCAAUUUUUGGAGCAGGUUU
UCUGACUUCGGUCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 25)

化学合成和修饰的 U7-snRNA#26 序列如下：

5'-

mA*mU*mU*ACACCUUCUUCCUUGACGAUUAGGAAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGAC
UUCGGUCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 26)

化学合成和修饰的 U7-snRNA#26 单向延长序列如下：

5'-

mA*mU*mU*ACACCUUCUUCCUUGACGAUUAGGCACACACAGGCACAUUUUUGGAG
CAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 27)

实施例 2：构建用于定量评价 USH2A 外显子 13 剪接跳跃效率的报告载体

将 RLeft-USH2A Exon13mut-RRight 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℃ 备用。

报告载体结构为：pCMV-RLeft-USH2A EXON13mut-RRight，RG 表示报告功能基因（reporter gene），RLeft 表示没有报告功能的报告基因 5'端前半部分，RRight 表示没有报告功能的报告基因 3'端后半部分，RLeft 和 RRight 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-EGFLeft-Exon13mut-EGFRight。Exon13mut 表示包含致病突变的 USH2A 外显子 13，及其上下游内含子序列（上游内含子序列为人 USH2A 基因内含子 12 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 内含子 13 的 5'端 703bp 和 3'端 216bp 组合的基因序列）。本申请实施例中所述的 USH2A 外显子 13 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-EGFPleft-Exon13c.2299delG-EGFPright、pCMV-EGFPleft-Exon13c.2802T>G-EGFPright。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。

RGleft, 例如 EGFPleft 序列为:

```
atggtgagcaagggcgaggagctgtcaccgggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagc
gtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccctggccca
ccctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtccgcatgccg
aaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgcccag (SEQ ID NO: 28)
```

RGright, 例如 EGFPright 序列为:

```
gtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgcatcgagctgaagggcactcgaaggaggacggcaacatctggggcaca
gtggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacat
cgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacct
gagcaccagtcggccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtctctggtgagttcgtgaccgcccgggatcactctcg
gcatggacgagctgtacaagtaa (SEQ ID NO: 29)
```

实施例 3: USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段区 (区域 8) 不同靶位点的 U7-snRNA 介导的 USH2A 外显子 13 剪接跳跃效果

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-EGFPleft-Exon13mut-EGFPright 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 (Reporter, 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 外显子 13 被诱导剪接跳跃的细胞比例)。本实施例检测了不同实验组 (如图 2 所示) 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 2 和图 3A-3B 显示了不同靶位点 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃效果。结果显示所有靶向 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的 3'段序列的 U7-snRNA (#24-#34) 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃, USH2A 诱导剪接跳跃的效率高。

表 2 不同靶位点 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 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#23 | 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 4：化学合成的 snRNA 高效诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 单独剪接跳跃

人源宿主细胞按 6×10^5 /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: 30)和 CACAACGTTGCCAGCAATGG (SEQ ID NO: 31)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 4 所示。结果显示，U7-snRNA#24-34 均能高效诱导外显子 13 的剪接跳跃，且几乎未见外显子 13 和外显子 12 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 外显子 13 的单独剪接跳跃，具有较高的安全性。

实施例 5：构建靶向 USH2A 外显子 13 及其附近不同位点的 U7-snRNA

本实施例分别针对 USH2A pre-mRNA 的 7 个靶区域设置了 21 个靶位点，USH2A Pre-mRNA 的 7 个靶区域如下所示。

外显子 13 区域 1 (SEQ ID NO: 32) (Chr1:216247142-216247185) :
CGAAGCUUUAUGAUGUUGGAUGUGAGCCCUGCCAGUGUAACCU;

外显子 13 区域 2 (SEQ ID NO: 33) (Chr1:216247130-216247161) :
GAGCCCUGCCAGUGUAACCUCCAUGGCUCAGU;

外显子 13 区域 3 (SEQ ID NO: 34) (Chr1:216246616-216246649) :

AAUCAGUGGCCAGUGCCUGUGUGUGCCUAAUCGU;

外显子 13 区域 4 (SEQ ID NO: 36) (Chr1:216247210-216247246) :
UAAAUAUAUUUAUCUUUAGGGCUUAGGUGUGAUCAU;

外显子 13 区域 5 (SEQ ID NO: 37) (Chr1:216247204-216247232) :
CUUUAGGGCUUAGGUGUGAUCAUUGCAAU;

外显子 13 区域 6 (SEQ ID NO: 38) (Chr1:216247187-216247220) :
GGUGUGAUCAUUGCAAUUUUGGAUUUAAAUUUCU;

外显子 13 区域 7 (SEQ ID NO: 39) (Chr1:216247169-216247202) :
UUGGAUUUAAAUUUCUCCGAAGCUUAAUGAUGU。

所述 21 个靶位点如下表所示。

表 3.snRNA 的识别结构域序列

| snRNA 编号 | 识别结构域序列 (5'-3') | SEQ ID | USH2A Pre-mRNA 靶位点 对应的基因组定位 | 靶向区 域 |
|-------------|-----------------------------|-----------|--------------------------------|----------|
| #1 | AGCCCUAAAGAUAAAUAUAUUUA | 40 | Chr1:216247223-216247246 | 区域 4 |
| #2 | ACCUAAGCCCUAAAGAUAAAUAU | 41 | Chr1:216247218-216247241 | 区域 4 |
| #3 | AUCACACCUAAGCCCUAAAGAUAA | 42 | Chr1:216247213-216247236 | 区域 4 |
| #4 | AUGAUCACACCUAAGCCCUAAAGAUAA | 43 | Chr1:216247210-216247236 | 区域 4 |
| #5 | AAUGAUCACACCUAAGCCCUAAAG | 44 | Chr1:216247209-216247232 | 区域 5 |
| #6 | AUUGCAAUGAUCACACCUAAGCCC | 45 | Chr1:216247204-216247227 | 区域 5 |
| #7 | AUCCAAAUAUGCAAUGAUCACACC | 46 | Chr1:216247197-216247220 | 区域 6 |
| #8 | AUUUAAAUCCAAAUAUGCAAUGAU | 47 | Chr1:216247191-216247214 | 区域 6 |
| #9 | AGAAAUUUAAAUCCAAAUAUGCAA | 48 | Chr1:216247187-216247210 | 区域 6 |
| #10 | AGCUUCGGAGAAAUUUAAAUCCAA | 49 | Chr1:216247179-216247202 | 区域 7 |
| #11 | AUUAAAAGCUUCGGAGAAAUUUAAA | 50 | Chr1:216247174-216247197 | 区域 7 |
| #12 | ACAUCAUUAAAGCUUCGGAGAAAU | 51 | Chr1:216247169-216247192 | 区域 7 |
| #13 | ACAUCCAACAUCAUUAAGCUUCG | 52 | Chr1:216247162-216247185 | 区域 1 |
| #14 | AGGGCUCACAUCCAACAUCAUUAA | 53 | Chr1:216247155-216247178 | 区域 1 |
| #15 | ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA | 54 | Chr1:216247147-216247168 | 区域 1 |
| #16 | ACACUGGCAGGGCUCACAUCCAACAUC | 55 | Chr1:216247147-216247173 | 区域 1 |
| #17 | AGGUUACACUGGCAGGGCUCACAU | 56 | Chr1:216247142-216247165 | 区域 1 |
| #18 | AUGGAGGUUACACUGGCAGGGCUC | 57 | Chr1:216247138-216247161 | 区域 2 |
| #19 | ACUGAGCCAUGGAGGUUACACUGG | 58 | Chr1:216247130-216247153 | 区域 2 |

| | | | | |
|-----|--------------------------|----|--------------------------|------|
| #20 | ACACACAGGCACUGGCCACUGAUU | 59 | Chr1:216246626-216246649 | 区域 3 |
| #21 | AGGCACACACAGGCACUGGCCACU | 60 | Chr1:216246622-216246645 | 区域 3 |
| #22 | ACGAUUAGGCACACACAGGCACUG | 61 | Chr1:216246616-216246639 | 区域 3 |

其中, snRNA#9、snRNA#15、snRNA#17 和 snRNA#19 为人、猴同源。

实施例 6: 检测靶向不同区域的 U7-snRNA 介导的 USH2A 外显子 13 剪接跳跃效果

根据实施例 3 所述方法, 在报告细胞体系中检测靶向不同区域的 U7 snRNA 组的 GFP 阳性率和平均 FITC 强度。

靶向靶区域 1 的 U7-snRNA 在基因组上的位置 (图片从左到右对应于基因组从 5'端到 3'端) 如图 5 所示。靶向靶区域 1 的 U7-snRNA 实验结果如图 6~7 和下表 4 所示, 靶向靶区域 1 的所有 U7-snRNA 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃。现有技术靶向该区域 1 的 AON 不能诱导外显子 13 剪接跳跃, 但靶向该区域 1 的 snRNA 却可高效诱导外显子 13 剪接跳跃。

表 4 靶向靶区域 1 的 U7-snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP 阳性率 | | |
|----------|---------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Reporter | 9.2% | 12.8% | 6.1% |
| snRNA#13 | 71.10% | 67.30% | 72.60% |
| snRNA#14 | 64.80% | 60.80% | 55.20% |
| snRNA#15 | 62.30% | 63.30% | 63.70% |
| snRNA#17 | 65.20% | 67.30% | 64.20% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

靶向靶区域 2 的 U7-snRNA 在基因组上的位置 (图片从左到右对应于基因组从 5'端到 3'端) 如图 8 所示。靶向靶区域 2 的 U7-snRNA 实验结果如图 9~10 和下表 5 所示, 靶向靶区域 2 的所有 U7-snRNA 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃。现有技术靶向该区域 2 的 AON 诱导外显子 13 剪接跳跃的效果较低, 但靶向该区域 2 的 snRNA 却可高效诱导外显子 13 剪接跳跃。

表 5 靶向区域 2 的 U7-snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP 阳性率 |
|------|---------|
|------|---------|

| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
|----------|--------|--------|--------|
| 293T | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Reporter | 9.2% | 12.8% | 6.1% |
| snRNA#18 | 43.50% | 47.90% | 40.90% |
| snRNA#19 | 58.50% | 67.80% | 63.80% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

靶向靶区域 3 的 U7-snRNA 在基因组上的位置（图片从左到右对应于基因组从 5'端到 3'端）如图 11 所示。靶向靶区域 3 的 U7-snRNA 的实验结果如图 12~13 和下表 6 所示，靶向靶区域 3 的所有 U7-snRNA 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃。现有技术靶向该区域 3 的 AON 诱导外显子 13 剪接跳跃的效果较低，但靶向该区域 3 的 snRNA 却可高效诱导外显子 13 剪接跳跃。

表 6 靶向区域 3 的 U7-snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP 阳性率 | | |
|----------|---------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Reporter | 9.2% | 12.8% | 6.1% |
| snRNA#20 | 44.70% | 47.40% | 45.80% |
| snRNA#21 | 43.10% | 36.40% | 37.80% |
| snRNA#22 | 50.40% | 56.50% | 59.10% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

结合靶区域 1、2、3 结果分析发现，尽管现有技术中显示靶区域 1、2、3 是 AON 靶向非敏感区，即靶向该区域无法/低效率诱导外显子 13 剪接跳跃，但是靶向该区域的 snRNA 却可显著外显子 13 剪接跳跃。因此，尽管 snRNA 与 AON 都可以诱导剪接跳跃，但两者的作用机制不同，靶位点敏感性（所适用的靶区域靶位点）也不相同。

同时，如图 6、9、12 和下表 7 所示，尽管靶向同一区域的（诱导剪接跳跃的细胞比例）GFP%接近，但是靶向同一区域的不同靶点 snRNA 在同一细胞中诱导获得剪接跳跃的 mRNA 及其蛋白水平（平均 FITC 强度）有所区别。且靶区域 1、靶区域 2 在同一细胞中诱导获得剪接跳跃的 mRNA 及其蛋白水平均优于靶区域 3。

表 7 靶向靶区域 1、2、3 的 U7-snRNA 诱导的（USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃）GFP 阳性细胞的平均 FITC 强度

| 样品名称 | 平均 FITC 强度 |
|------|------------|
| | |

| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
|----------|--------|--------|--------|
| 293T | 6366 | 5100 | 8240 |
| Reporter | 23925 | 28917 | 17335 |
| snRNA#13 | 486351 | 326693 | 437187 |
| snRNA#14 | 232257 | 158859 | 132083 |
| snRNA#15 | 574041 | 428688 | 521495 |
| snRNA#17 | 895368 | 656932 | 746482 |
| snRNA#18 | 141587 | 113914 | 118049 |
| snRNA#19 | 348154 | 321381 | 340581 |
| snRNA#20 | 127942 | 94695 | 139515 |
| snRNA#21 | 83206 | 57570 | 75303 |
| snRNA#22 | 191259 | 150479 | 188522 |
| Scramble | 58920 | 75279 | 66826 |

靶向区域4的U7-snRNA在基因组上的位置(图片从左到右对应于基因组从5'端到3'端)如图14所示。靶向区域4的U7-snRNA的实验结果如图15和下表8所示,靶向靶区域4的所有U7-snRNA均能在报告基因细胞中诱导USH2A外显子13的剪接跳跃。

表8 靶向区域4的U7-snRNA在报告基因细胞中诱导USH2A pre-mRNA外显子13剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP阳性率 | | |
|----------|--------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 0.10% | 0.10% | 0.10% |
| Reporter | 9.20% | 12.80% | 6.10% |
| snRNA#1 | 50.30% | 58.70% | 52.50% |
| snRNA#2 | 53.20% | 59.40% | 52.90% |
| snRNA#3 | 59.00% | 59.90% | 58.70% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

靶向靶区域5的U7-snRNA在基因组上的位置(图片从左到右对应于基因组从5'端到3'端)如图16所示。靶向靶区域5的U7-snRNA的实验结果如图17和下表9所示,靶向靶区域5的所有U7-snRNA均能在报告基因细胞中诱导USH2A外显子13的剪接跳跃。

表9 靶向区域5的U7-snRNA在报告基因细胞中诱导USH2A pre-mRNA外显子13剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP 阳性率 | | |
|----------|---------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Reporter | 9.2% | 12.8% | 6.1% |
| snRNA#5 | 67.70% | 74.30% | 72.10% |
| snRNA#6 | 67.90% | 67.80% | 74.60% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

靶向靶区域 6 的 U7-snRNA 在基因组上的位置（图片从左到右对应于基因组从 5'端到 3'端）如图 18 所示。靶向靶区域 6 的 U7-snRNA 实验结果如图 19 和下表 10 所示，靶向靶区域 6 的所有 U7-snRNA 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃。

表 10 靶向区域 6 的 U7-snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP 阳性率 | | |
|----------|---------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 0.10% | 0.10% | 0.10% |
| Reporter | 9.20% | 12.80% | 6.10% |
| snRNA#7 | 71.40% | 61.30% | 72.20% |
| snRNA#8 | 64.50% | 73.10% | 66.50% |
| snRNA#9 | 66.50% | 70.80% | 71.10% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

靶向靶区域 7 的 U7-snRNA 在基因组上的位置（图片从左到右对应于基因组从 5'端到 3'端）如图 20 所示。靶向靶区域 7 的 U7-snRNA 的实验结果如图 21 和下表 11 所示，靶向靶区域 7 的所有 U7-snRNA 均能在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃。

表 11 靶向区域 7 的 U7-snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞比例

| 样品名称 | GFP 阳性率 | | |
|----------|---------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 0.10% | 0.10% | 0.10% |
| Reporter | 9.20% | 12.80% | 6.10% |
| snRNA#10 | 62.50% | 69.80% | 70.30% |
| snRNA#11 | 62.90% | 64.70% | 69.30% |

| | | | |
|----------|--------|--------|--------|
| snRNA#12 | 65.80% | 67.00% | 72.40% |
| Scramble | 11.00% | 13.30% | 7.70% |

不同区域的 U7-snRNA 诱导的 GFP 阳性细胞的平均 FITC 强度如图 22 和下表 12 所示。尽管靶向同一区域的（诱导剪接跳跃的细胞比例）GFP%接近，但是靶向同一区域的不同靶点 snRNA 在同一细胞中诱导获得剪接跳跃的 mRNA 及其蛋白水平（平均 FITC 强度）不同。

靶向区域 2 不仅获得较高的诱导剪接跳跃的细胞比例（GFP%），而且在同一细胞中诱导获得剪接跳跃的 mRNA 及其蛋白水平（平均 FITC 强度）较高。

而现有技术 AON 诱导剪接跳跃效率较高的靶位点#2 以及其临近位点#1 和#3（区域 4），在 snRNA 体系中在同一细胞中诱导获得剪接跳跃的 mRNA 水平较低。现有技术靶向区域 7 的 AON 效率比区域 5 高，但在 snRNA 体系靶向区域 5 的效率比区域 7 更高。现有技术靶向区域 3 的 AON 效率比区域 2 更高，但是在 snRNA 体系靶向区域 2 的效率比区域 3 更高。因此，尽管 snRNA 与 AON 都可以诱导剪接跳跃，但两者的作用机制不同，靶位点敏感性也不相同。且结合实施例 8 结果分析，由于 snRNA#24 的效率与 snRNA#2、AON1（SEQ ID NO: 77）的效率近似，则可推知 snRNA#3-#11 效果均优于 snRNA#2、snRNA#24，优于 AON1。

表 12 靶向不同区域的 U7-snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃细胞的平均 FITC 强度

| 样品名称 | 平均 FITC 强度 | | |
|----------|------------|--------|--------|
| | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
| 293T | 6366 | 5100 | 8240 |
| Reporter | 23925 | 28917 | 17335 |
| snRNA#1 | 173453 | 155132 | 187790 |
| snRNA#2 | 206250 | 189836 | 202251 |
| snRNA#3 | 326133 | 290451 | 341559 |
| snRNA#5 | 597519 | 630198 | 554593 |
| snRNA#6 | 860189 | 533418 | 759756 |
| snRNA#7 | 635438 | 192090 | 573484 |
| snRNA#8 | 464705 | 437438 | 403231 |
| snRNA#9 | 506956 | 570141 | 504600 |
| snRNA#10 | 416595 | 374370 | 358388 |
| snRNA#11 | 485513 | 430752 | 384956 |
| snRNA#12 | 422896 | 346341 | 361230 |
| Scramble | 58920 | 75279 | 66826 |

本申请靶向诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的 U7-snRNA 并不限于实施例 3 和 4 所列举的 U7-snRNA。本申请 U7-snRNA 识别结构域识别的靶位点选自 USH2A pre-mRNA 内含子 12-外显子 13-内含子 13，优选地选自外显子 13 及两侧临近靶区域 (SEQ ID NO: 1)。

实施例 7：不同靶位点的 U7-snRNA 组合介导的 USH2A 外显子 13 剪接跳跃

1、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)、2μl；NEB Golden Gate Assembly Mix、1μl；反应过程：(37°C, 5 min → 16°C, 5 min) × 20 → 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 外显子 13 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。

实施例 8-1：识别结构域串联 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 剪接跳跃

1、识别结构域串联 U7 snRNA 的制备

识别结构域串联的 U7 snRNA 意为一个 U7 snRNA 茎环结构、一个 smOPT 序列，连接着两个或者两个以上的识别结构域，其结构为 5'-识别结构域 B-识别结构域 A-smOPT 序列-茎环结构-3'，如图 23 所示。所述串联 U7 snRNA 的识别结构域 A 和 B 识别不同靶位点的 RNA 序列。

根据表 1 和表 3 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，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，待串联的 snRNA#15 和 snRNA#25 的识别结构域序列分别为 ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA (SEQ ID NO:54) 和 AUUACACCUUCUUCUUGACGAUU (SEQ ID NO: 13)，则合成的 Oligo DNA 正义链为：

CCGCAATTACACCTTCTTCCTTGACGATT-ACACTGGCAGGGCTCACATCCAAC (SEQ ID NO: 75) , 反义链为 : AATTGTTGGATGTGAGCCCTGCCAGTGT-AATCGTCAAGGAAGAAGGTGTAAT7 (SEQ ID NO: 76) 。

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 μ l: Oligo-F (100 μ M) 2 μ l+Oligo-R (100 μ M) 2 μ l+10 \times NEB Cutter smart buffer 2 μ l+去离子水 16 μ 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 μ 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 外显子 13 剪接跳跃的 U7 snRNA 载体。提纯质粒, 保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。构建的载体命名为 pUC57-U7 snRNA#B-#A, A 和 B 分别表示识别结构域编号, 对应于表 1 和表 3 中的识别结构域列表和序列。例如, pUC57-snRNA#25-#15、pUC57-snRNA#24-#9、pUC57-snRNA#24-#19、pUC57-snRNA#25-#9、pUC57-snRNA#25-#19、pUC57-snRNA#29-#9、pUC57-snRNA#25-#15。

识别结构域串联 U7 snRNA 还可以依据实施例 2 所述的方法进行化学合成和修饰, 例如, 其具体序列和修饰如下 (*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 snRNA #28-#3:

5'-mA*mC*mA*UUUCUUUCUUACCUGGUUGAC-
AUCACACCUAAGCCCUAAAGAUAAA*UUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCG*
GAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 63)

化学合成和修饰的 U7 snRNA #30-#4:

5'-mA*mA*mC*AUUUCUUUCUUACCUGGUUGACACU-
AUGAUCACCUAAGCCCUAAAGAUAAA*UUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGG*
UCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 64)

化学合成和修饰的 U7 snRNA #25-#15:

5'-mA*mU*mU*ACACCUUCUUCUUGACGAUU-
ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA*UUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAA*
AACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 65)

化学合成和修饰的 U7 snRNA #26-#16:

5'-mA*mA*mU*UACACCUUCUUCUUGACGAUUAGG-
ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA*ACAUCA*UUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGU
CGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 66)

上述序列中, “-” 仅表示两段序列的连接顺序。

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。

2、识别结构域串联 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 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-EGFPleft-Exon13mut-EGFPright 分别和表达双识别结构域串联 U7 snRNA 质粒或表达单识别结构域 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 13 和图 25 显示的是不同靶位点串联的 U7-snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。

本实施例通过将靶向不同靶位点串联的 U7-snRNA 应用，发现可以在报告基因细胞中提升诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃的效率。本实施例中的不同靶点串联诱导的剪接跳跃效率高于单个靶点的效果，而且优于已知的 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃技术。同时，结合其它实施例的数据，让人意外的是，尽管单个 U7 snRNA#25 诱导外显子 13 剪接跳跃的效率不高，但是 U7 snRNA#25 串联其它 U7 snRNA 诱导外显子 13 剪接跳跃的效率却显著提升。此外，本发明构建了不同靶位点串联的 AON，尝试诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃，但发现几乎没有剪接跳跃效率，进一步验证了 AON 与 snRNA 诱导剪接跳跃的作用机制不相同。

表 13 不同靶位点的 U7-snRNA 串联诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 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#9 | 68.00% | 78.90% | 67.30% | 537794 | 705890 | 934080 |
| snRNA#19 | 56.00% | 71.50% | 64.80% | 330972 | 544705 | 1166147 |
| 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#24-#9 | 62.70% | 84.30% | 78.10% | 757993 | 1821081 | 1338597 |
| snRNA#25-#9 | 69.80% | 89.70% | 81.90% | 970879 | 2081647 | 1637319 |
| snRNA#29-#9 | 62.60% | 84.00% | 72.70% | 806176 | 1748126 | 900419 |

| | | | | | | |
|--------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| snRNA#24-#19 | 60.30% | 91.00% | 74.60% | 548209 | 2100852 | 961757 |
| snRNA#25-#19 | 66.70% | 78.80% | 79.10% | 793055 | 1522911 | 1431606 |
| snRNA#29-#19 | 64.60% | 81.10% | 69.30% | 764571 | 1665386 | 773731 |
| SnRNA#25-#15 | 76.2% | 89.0% | 74.1% | 1630576 | 2314443 | 1341442 |
| AON | 56.70% | 69.90% | 59.20% | 473261 | 708438 | 342562 |
| SC 组 | 8.60% | 14.40% | 15.40% | 37615 | 27557 | 41557 |

本实施例在 U7 snRNA 的识别区域中将识别不同靶位点的 RNA 序列串联，构建靶向不同靶位点的串联 U7 SnRNA。本实施例中的识别结构域串联的 snRNA，其包含两个或者两个以上的识别结构域，串联于 snRNA 的 5'端（如图 23）。在一些实施例中，两个串联的识别结构域可以识别同一个靶位点，在同一表达载体或者同一 snRNA 驱动的情况下，提升靶向识别结构域数量，提升诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的剪接跳跃效率。

当所述 U7 snRNA 是两个或者两个以上不同的识别结构域串联，则从 U7 snRNA 的 5'端到 3'端的识别结构域排序为依据识别结构域对应的靶位点在 USH2A pre-mRNA 中的位置，按 3'端到 5'端排序。

实施例 8-2：识别结构域串联 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 剪接跳跃

1、识别结构域串联 U7 snRNA 的制备

识别结构域串联的 U7 snRNA 意为一个 U7 snRNA 茎环结构、一个 smOPT 序列，连接着两个或者两个以上的识别结构域，其结构为 5'-识别结构域 B-识别结构域 A-smOPT 序列-茎环结构-3'，如图 23 所示。所述串联 U7 snRNA 的识别结构域 A 和 B 识别不同靶位点的 RNA 序列。进一步的，识别结构域串联的 U7 snRNA 与 USH2A pre-mRNA 靶向方式如图 24A 或图 24B。

根据表 1 和表 3 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，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。方法同实施例 8-1，例如，待串联的 snRNA#15 和 snRNA#25 的识别结构域序列分别为 ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA (SEQ ID NO:54) 和 AUUACACCUUCUCCUUGACGAUU (SEQ ID NO: 13)，则合成的 Oligo DNA 正义链为：CCGCAATTACACCTTCTTCCTTGACGATTACACTGGCAGGGCTCACATCCAAC (SEQ ID NO: 75)，反义链为：AATTGTTGGATGTGAGCCCTGCCAGTGT-AATCGTCAAGGAAGAAGGTGTAATT (SEQ ID NO: 76)。

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 μ l: Oligo-F (100

μM) 2 μl+Oligo-R (100 μM) 2 μl+10×NEB Cutter smart buffer 2 μl+去离子水 16 μl) 混合, 95°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 μl 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 外显子 13 剪接跳跃的 U7 snRNA 载体。提纯质粒, 保存于-20°C 备用。构建的载体命名为 pUC57-U7 snRNA#B-#A, A 和 B 分别表示识别结构域编号, 对应于表 1 和表 3 中的识别结构域列表和序列。例如, pUC57-snRNA#24-#9、pUC57-snRNA#25-#9、pUC57-snRNA#9-#24、pUC57-snRNA#9-#25。pUC57-snRNA#24-#9 和 pUC57-snRNA#25-#9 中, U7 snRNA 与 USH2A pre-mRNA 靶向方式如图 24A; pUC57-snRNA#9-#24 和 pUC57-snRNA#9-#25 中, U7 snRNA 与 USH2A pre-mRNA 靶向方式如图 24B。

识别结构域串联 U7 snRNA 还可以依据实施例 2 所述的方法进行化学合成和修饰, 同实施例 8-1, 例如, 其具体序列和修饰如下 (*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 snRNA #28-#3:

5'-mA*mC*mA*UUUCUUUCUUACCGGUUGAC-
AUCACACCUAAGCCCUAAAGAUA*AAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCG*
 GAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 63)

化学合成和修饰的 U7 snRNA #30-#4:

5'-mA*mA*mC*AUUUCUUUCUUACCGGUUGACACU-
AUGAUCACACCUAAGCCCUAAAGAUA*AAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGG*
 UCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 64)

化学合成和修饰的 U7 snRNA #25-#15:

5'-mA*mU*mU*ACACCUUCUUCUUGACGAUU-
ACACUGGCAGGGCUCACAUCCA*AAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAA*
 AACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 65)

化学合成和修饰的 U7 snRNA #26-#16:

5'-mA*mA*mU*UACACCUUCUUCUUGACGAUUAGG-
ACACUGGCAGGGCUCACAUCCAACAUC*AAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGU*
 CGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO: 66)

上述序列中, “-” 仅表示两段序列的连接顺序。

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。

2、识别结构域串联 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 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-EGFPleft-Exon13mut-EGFPright 分别和表达双识别结构域串联 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 14 和图 26 显示的是不同靶位点串联的 U7-snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。

本实施例通过将靶向不同靶位点串联的 U7-snRNA 应用，发现可以在报告基因细胞中提升诱导 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃的效率。本实施例中，U7 snRNA#24-#9 和 U7 snRNA#9-#24 诱导外显子 13 剪接跳跃的效率无明显区别，U7 snRNA#25-#9 和 U7 snRNA#9-#25 诱导外显子 13 剪接跳跃的效率无明显区别，表明识别结构域串联 U7 snRNA 中的两个以上识别结构域满足各自识别结构域与其在 USH2A pre-mRNA 中的靶位点反向互补即可，无需从 U7 snRNA 的 5'端到 3'端的识别结构域排序为依据识别结构域对应的靶位点在 USH2A pre-mRNA 中的位置按 3'端到 5'端排序。

表 14 不同靶位点的 U7-snRNA 串联诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 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 | 0.04% | 0.02% | 0.03% | 7148 | 4472 | 4737 |
| 报告组 | 17.69% | 19.12% | 17.33% | 42200 | 44866 | 37795 |
| SC 组 | 25.85% | 20.16% | 23.64% | 62897 | 51724 | 56124 |
| snRNA#24-#9 | 83.97% | 88.02% | 87.11% | 2074370 | 2122694 | 1889718 |
| snRNA#25-#9 | 88.59% | 90.99% | 90.08% | 2335041 | 1844870 | 1539905 |
| snRNA#9-#24 | 85.97% | 86.9% | 85.08% | 2040456 | 1671371 | 1395412 |
| snRNA#9-#25 | 81.85% | 87.81% | 83.82% | 2001521 | 1927175 | 1565802 |

实施例 9：化学合成的 U7 snRNA 在 WERI 细胞中诱导 USH2A 外显子 13 剪接跳跃

人源宿主细胞按 6×10^5 /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#15）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, SEQ ID NO: 77) 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, SEQ ID NO: 78) 作为对照组,
 转染 1 μ 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
 AGCCTTTCCGCCAAGGTGATC(SEQ ID NO: 30)和 CACAACGTTGCCAGCAATGG (SEQ ID
 NO: 31)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 27 所示。进一步通过 ImageJ 软件对 rt-PCR 电泳条带进行定量分析, 并针对剪接跳过外
 显子 13 或剪接跳过外显子 12 和 13 的成熟 USH2A mRNA 的比例进行统计和分析, 如图 28
 所示。

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 外显子 13 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 诱导外显子 13 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 诱导外
 显子 12 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, 显著提升外显子 13 单剪
 接跳跃的效率。

此外, snRNA 组合 2 是靶向临近于现有技术外显子 12 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 10 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: 67),
 反义链为靶序列 5'加 AATT 并且 3'加 CACCCTAAGTCCCTATCATATT (SEQ ID NO: 68)。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 (SEQ ID NO: 81), 反义链为
 AATTNNNCACCCTAAGTCCCTATCATATT (SEQ ID NO: 82), (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"或"UAGGGA"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 μ l: Oligo-F (100

μM) $2\ \mu\text{l}$ +Oligo-R ($100\ \mu\text{M}$) $2\ \mu\text{l}$ + $10\times\text{NEB Cutter smart buffer}$ $2\ \mu\text{l}$ +去离子水 $16\ \mu\text{l}$) 混合, 95°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 $1\ \mu\text{l}$ 与 $10\ \text{ng}$ 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 外显子 13 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°C 备用。图 29A 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#15、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):

U7-hnRNP A1-snRNA#15:

5'-

mA*mC*mC*GCAAUAUGAUAGGGACU**UAGGGUGACACUGGCAGGGCUCACA**UCCA4
AUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID NO:
79)

U7-hnRNP A1-snRNA#25:

5'-

mA*mC*mC*GCAAUAUGAUAGGGACU**UAGGGUGAUUACACCUUCU**UCCUUGACGAU
UAAUUUUUGGAGCAGGUUUUCUGACUUCGGUCGGAAAACCMC*mC*mU*-3' (SEQ ID
NO: 80)

连接 hnRNP A1 结合基序的 U7 snRNA 在报告基因细胞中诱导 USH2A 外显子 13 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-EGFPleft-Exon13mut-EGFPright 分别和 pUC57-U7-hnRNP A1-snRNA#15 质粒、pUC57-U7-hnRNP A1-snRNA#25 质粒、pUC57-U7 snRNA#15 质粒、pUC57-U7 snRNA#25 质粒、pUC57-U7 snRNA#25-#15 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 15 和图 29B 显示的是, U7-hnRNP A1-snRNAUSH2A pre-mRNA 外显子 13 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 外显子 13 剪接跳跃的效果, 不仅提升了外显子 13 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）。而串联 snRNA 诱导外显子 13 剪接跳跃效果特别是平均 FITC 强度，则显著优于 U7 snRNA 的 5'端引入 hnRNP A1 结合基序，提示 USH2A pre-mRNA 外显子 13 的剪接跳跃可能对串联结构的 snRNA 更为敏感。

表 15 U7-hnRNP A1-snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 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#15 | 62.3% | 63.3% | 63.7% | 574041 | 428688 | 521495 |
| hnRNPA1-snRNA#15 | 66.3% | 71.8% | 66.6% | 783382 | 715282 | 754269 |
| snRNA#25 | 52.1% | 54.0% | 50.8% | 148755 | 110595 | 163122 |
| hnRNPA1-snRNA#25 | 67.9% | 72.1% | 66.3% | 680169 | 513447 | 603841 |
| snRNA#25-#15 | 70.8% | 71.9% | - | 1176740 | 929514 | - |
| 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”或“UAGGGA”，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: 35)”，可募集 hnRNP A1 蛋白，促进 USH2A 外显子 13 的剪接跳跃。且该结构并不适用于识别结构域串联的 snRNA。

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 11：靶向诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 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 外显子 13 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 外显子 13 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。

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 连接酶连接入经过对应 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 外显子 13 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 外显子 13 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 外显子 13 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% CO₂ 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 外显子 13 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。

实施例 12：串联 U7 snRNA 诱导剪接跳跃效果显著优于组合 U7—体外剂量爬坡

依据实施例 11 所述，构建了 AAV2 血清型的 AAV2-3×U7 snRNA #9-#25（3×U7 snRNA 串联）、AAV2-2×U7 snRNA #9-2×U7 snRNA #25（4×U7 snRNA separate）以及 AAV2-2×U7-hnRNP A1-snRNA #9-2×U7-hnRNP A1-snRNA #25（4×U7 snRNA separate-motif）载体，转染 HEK293/293T 细胞包装病毒，收集、纯化等操作分别获得 AAV2 病毒 3×U7 snRNA 串联、4×U7 snRNA separate 和 4×U7 snRNA separate-motif。

检测病毒滴度，按照 MOI 值分别为 3×10^5 、 1×10^5 、 3×10^4 、 1×10^4 、 3×10^3 、 1×10^3 、 3×10^2 （公式 MOI 值=病毒滴度（TU/mL）×病毒体积（mL）/细胞个数），分别在 24 孔板的 WERI-Rb-1 细胞（ 6×10^5 /孔）中加入相应体积的病毒液，感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，并通过表 16 中的对应引物/探针进行 RT-PCR 和 qRT-PCR 实验，检测 AAV-U7 snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。

表 16 RT-PCR 引物和 qRT-PCR 探针列表

| 目的 | 引物/探针名称 | 引物/探针序列 | SEQ ID |
|---|-----------------|-----------------------------|--------|
| RT-PCR 检测野生型 /EXON13 剪接跳跃型 USHER mRNA | USH2A-RTPCR-F1 | AGCCTTTCCGCCAAGGTGATC | 30 |
| | USH2A-RTPCR-R1 | CACAACGTTGCCAGCAATGG | 31 |
| qRT-PCR 检测野生型 USH2A mRNA | WT-probe-QPCR-F | GGTTAGATGTCACCAATTGTAAGG | 69 |
| | WT-probe-QPCR-R | AACATTGGGCTTGCAGATGCAC | 70 |
| | WT-probe-QPCR-P | 5FAM-CTGTCTTAGCATTACAG-3MGB | 71 |

| | | | |
|---------------|--------------------|-----------------------------|----|
| qRT-PCR | dEX13-probe-QPCR-F | GATGGCTGCAGTCCCTGTAAC | 72 |
| 检测外显子 13 剪接跳 | dEX13-probe-QPCR-R | GCCTGGAGAAATATAAAAACCAATAAC | 73 |
| 跃型 USH2A mRNA | dEX13-probe-QPCR-P | 5FAM-CAATACCTCTGGGACA-3MGB | 74 |

如图 30 所示, 结果显示, AAV2 病毒转导 3×U7 串联和 4×U7-separate 的对比, RT-PCR 结果显示 4×U7 separate 效率较差, 但加了 hnRNPA1 结合基序后效率提升, 与 3×U7 串联效率可比。qRT-PCR 检测结果与 RT-PCR 结果一致。

SsAAV 载体的目的基因最大容量为 4.7 kb, ScAAV 载体的目的基因最大容量为 2.5 kb, U7 snRNA 表达盒大小约为 450bp, 则一个 scAAV 载体中最高能容纳 9 个 U7 snRNA 表达盒, 一个 scAAV 载体中最高能容纳 5 个 U7 snRNA 表达盒。从实施例 14 的结果看, 体外 3×U7 snRNA 串联效果与 2×U7 snRNA-hnRNP A1 组合的诱导剪接跳跃效果相似, 且优于 2×U7 snRNA 组合。从实施例 15 和实施例 16 的结果看, 体内 1×U7 snRNA 串联诱导剪接跳跃略优于 2×U7 snRNA 组合, 但 1×U7 snRNA 串联诱导剪接跳跃的长期持续更显著。在不引入 hnRNP A1 结合基序的情况下, 串联 U7 snRNA 的效果是优于 U7 snRNA 组合的。

实施例 13: AAV-U7 snRNA 诱导剪接跳跃效果显著优于 AON—体外剂量爬坡

依据实施例 11 所述, 构建了 AAV2 血清型的 AAV2-U7 snRNA #9-#25 (1×U7 snRNA 串联) 载体, 转染 HEK293/293T 细胞包装病毒, 收集、纯化等操作分别获得 AAV2 病毒 1×U7 snRNA 串联, 即 AAV2-RM-101, 检测病毒滴度备用。

WERI-Rb-1 细胞按 6×10^5 /孔接种至 24 孔板, AAV2-RM-101 病毒按照 MOI 值分别为 3×10^5 、 1×10^5 、 3×10^4 、 1×10^4 、 3×10^3 、 1×10^3 、 3×10^2 加入到 WERI-Rb-1 细胞中, 作为不同 MOI 的实验组。分别以 50nM、200nM 的 PROQR EX13-3 (实施例 9 中的 AON1) 作为阳性对照组, 分别以 MOI 为 3×10^5 的 AAV2-U7-SCR (Scramble)、AAV2-U7-LUC (识别 Luciferase) 作为阴性对照。不同处理后的 WERI-Rb-1 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, 并通过表 16 中的对应引物/探针进行 RT-PCR 和 qRT-PCR 实验, 检测 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。如图 31 所示, 结果显示, AAV2-U7 snRNA #9-#25 诱导的剪接跳跃效率显著优于 AON1。

实施例 14: snRNA 诱导人源化小鼠视网膜细胞 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃

通过基因编辑技术将 C57/BL6J 小鼠 USH2A 基因外显子 12+部分侧翼序列[第 12 外显子上游 (小鼠第 11 内含子 3'端) 约 1670 bp 至第 12 外显子下游 (小鼠第 12 内含子 5'端) 约 1600bp]替换为人类 USH2A 基因外显子 13+部分侧翼序列[第 13 外显子上游 (人第 12 内含子 3'端) 约 1611bp 至第 13 外显子下游 (人第 13 内含子 5'端) 约 1599bp]+插入序列, 而 c.2208T

to G 被引入到人 USH2A 外显子 13 中, 获得携带 c.2802T>G 突变的 USH2A 外显子 13 人源化小鼠 (USH2A EXON13^{c.2802T>G})。

通过视网膜下腔注射, 分别将 1 μ L 总量为 1E+10 vg/眼的 AAV2-U7 snRNA #9-#25 (AAV5-1 \times U7)、AAV5-2 \times U7 snRNA #9-2 \times U7 snRNA #25 (AAV5-4 \times U7 separate) 病毒注射到 hUSH2A EXON13^{c.2802T>G} 基因敲入人源化小鼠眼部, 以 AAV5-U7-scramble 病毒注射小鼠作为阴性对照组, 以玻璃体注射剂量为 15 μ g/眼 (1 μ L) 的 PROQR-AON (实施例 9 中的 AON1) 为阳性对照组, 以不做处理的小鼠作为空白组 (nontreated), 每只注射两边眼睛。注射三周后, 处死实验小鼠, 取小鼠视网膜组织, 提取 RNA, 并逆转录为 cDNA, 并通过表 16 中的对应引物/探针进行 RT-PCR 和 qRT-PCR 实验, 检测 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。如图 32 所示, 结果显示, 尽管是 1 \times U7 snRNA 串联, 其在眼部视网膜中诱导剪接跳跃的效果优于 2 \times U7 snRNA 组合, 且均优于 PROQR AON (实施例 9 中的 AON1) (根据 non-treated 组结果显示, 包含突变的人 USH2A 外显子 13 存在一定的自发跳跃, 与现有研究报道一致)。

实施例 15: 不同血清型的 AAV-U7 snRNA 注射诱导兔子眼部细胞 USH2A pre-mRNA 外显子 12 剪接跳跃

通过视网膜下腔注射, 分别按照 MOI 为 5 \times 10¹⁰、2 \times 10¹¹ 将 AAV5-U7 snRNA #9-#25 (AAV5-1 \times U7)、按照 MOI 为 5 \times 10¹⁰ 将 AAV8-U7 snRNA #9-#25 (AAV8-1 \times U7) 病毒注射到兔子眼部, 以 AAV5-CMV-GFP 病毒视网膜下腔注射兔子作为阴性对照组, 以玻璃体注射剂量为 50 μ g (50 μ L) 的 AON (实施例 9 中的 AON1) 为阳性对照组。注射两周后, 处死实验兔子, 取兔子视网膜组织, 提取 RNA, 并逆转录为 cDNA, 并通过表 16 中的对应引物/探针进行 RT-PCR 和 qRT-PCR 实验, 检测 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。

如图 33 所示, 结果显示, AAV5 递送的 U7 snRNA 诱导剪接跳跃的效果优于 AAV8, 且不同 AAV 血清型递送的 U7 snRNA 串联的效果均优于 AON。

兔子中的 USH2A 基因为野生型的兔 USH2A, 不含外显子 12 (相当于人 USH2A 外显子 13) 突变。相对而言, hUSH2A EXON13^{c.2802T>G} 基因敲入人源化小鼠中含有突变的人外显子 13 更容易被诱导剪接跳跃) AAV-U7 snRNA 和 AON 在兔子上诱导靶外显子剪接跳跃的效果显著低于其在人源化小鼠中的效率, 提示 AON 的效果更容易受到外显子序列和突变的影响。

实施例 16: AAV 递送的 U7 snRNA 诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的长期效果。

通过视网膜下腔注射, 分别将剂量为 1E+10 vg (1 μ l) 的 AAV5-3 \times U7 snRNA #9-#25 (AAV5-

3×U7)、AAV5-U7 snRNA #9-#25 (AAV5-1×U7)、AAV5-2×U7 snRNA #9-2×U7 snRNA #25 (AAV5-4×U7 seperate) 病毒注射到 hUSH2A EXON13^{c.2802T>G} 基因敲入人源化小鼠眼部, 以 AAV5-U7-scramble 病毒注射小鼠作为阴性对照组, 以玻璃体注射剂量为 15μg (1μL) 的 PROQR-ASO (实施例 9 中的 AON1) 为阳性对照组, 以不做处理的小鼠作为空白组 (NTC)。注射 22 周后, 处死实验小鼠, 取小鼠视网膜组织, 提取 RNA, 并逆转录为 cDNA, 并通过表 7 中的对应引物进行 RT-PCR 实验, 检测 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的效率。结果显示 (图 34~图 35), 22 周后, AAV 递送的 U7 snRNA 串联仍具有最优的剪接跳跃和长期维持效果。为了进一步对比 U7 snRNA 串联与 U7 snRNA 组合之间的长期维持情况, 本实施例进一步通过表 16 中的对应探针进行 qRT-PCR 实验, 检测并对比 AAV5-1×U7 和 AAV5-4×U7 seperate 在视网膜中长期维持 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃效率的差异。结果显示 (如图 34), 22 周后, AAV-1×U7 snRNA 串联仍具有最优的剪接跳跃效率, 且相对于 3 周效果有所提升, 可能存在疗效累计效应。而 AAV-1×U7 snRNA 串联的持续性显著优于 AAV-4×U7 seperate。

权利要求

1. 一种 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 snRNA 核酸分子包括：识别结构域、茎环序列和 Sm 序列；其中，所述识别结构域的数量为至少两个；
其中，各识别结构域自 5'端至 3'端与 pre-mRNA 的 3'端至 5'端的靶向序列片段反向互补；
所述 pre-mRNA 为 USH2A 基因对应的 pre-mRNA。
2. 如权利要求 1 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，各所述识别结构域自 5'端至 3'端依次与 pre-mRNA 的 3'端至 5'端的靶向序列片段反向互补。
3. 如权利要求 1 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，各所述识别结构域自 5'端至 3'端非依次与 pre-mRNA 的 3'端至 5'端的靶向序列片段反向互补。
4. 如权利要求 1~3 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述识别结构域的长度为至少 16bp。
5. 如权利要求 1~4 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述识别结构域的长度为 18~40 bp。
6. 如权利要求 1~5 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述识别结构域的长度为 20~27 bp。
7. 如权利要求 1~6 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述识别结构域的数量为两个。
8. 如权利要求 7 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 snRNA 核酸分子自 5' 端至 3' 端依次包括：两个相邻的识别结构域、Sm 序列和茎环序列。
9. 如权利要求 1~8 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 为 USH2A 基因第 12 号内含子至第 13 号内含子对应的全部或部分 pre-mRNA。
10. 如权利要求 9 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 为 USH2A 基因第 13 号外显子对应的全部或部分 pre-mRNA。
11. 如权利要求 9 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216247246；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列及其突变序列。
12. 如权利要求 11 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216246753；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列及其突变序列。
13. 如权利要求 12 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216246649；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列及其突变序列。

14. 如权利要求 13 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246563-216246626；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列及其突变序列；或者，

所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216246616-216246649；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 34 所示的核苷酸序列及其突变序列。

15. 如权利要求 11 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247130-216247246；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列及其突变序列。

16. 如权利要求 15 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247142-216247185；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 32 所示的核苷酸序列及其突变序列；或者，

所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247130-216247161；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 33 所示的核苷酸序列及其突变序列；或者，

所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247210-216247246；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列及其突变序列；或者，

所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247204-216247232；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列及其突变序列；或者，

所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247187-216247220；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 38 所示的核苷酸序列及其突变序列；或者，

所述 pre-mRNA 的基因组定位为 Chr1:216247169-216247202；所述靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 39 所示的核苷酸序列及其突变序列。

17. 如权利要求 1~16 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述识别结构域的数量为两个，两个识别结构域相邻分布。

18. 如权利要求 17 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，两个所述识别结构域自 5'端向 3'分别为第一识别结构域和第二识别结构域；

其中，与所述第一识别结构域或第二识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 34 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列及其突变序列；相应与所述第二识别结构域或第一识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 32 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 33 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 38 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 39 所示的核苷酸序列及其突变序列。

19. 如权利要求 18 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，与所述第一识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 34 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列及其突变序列；与所述第二识别结构域反向互补的靶向序列片段选自如 SEQ ID NO: 32 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 33 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列及其突变序列、如 SEQ ID NO: 38 所示的核苷酸序列及其突变序列和如 SEQ ID NO: 39 所示的核苷酸序列及其突变序列。

20. 如权利要求 19 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12~22、59~61 任一项所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 40~58 任一项所示。

21. 如权利要求 20 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12、13、15 或 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48、54、56 或 58 所示。

22. 如权利要求 21 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12、13 或 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48、54 或 58 所示。

23. 如权利要求 20 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸

酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示；或者，

所述第一识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，所述第二识别结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示。

24. 如权利要求 11~23 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述突变序列为在所述核苷酸序列上存在一个或多个核苷酸的替换、增加或缺失。

25. 如权利要求 24 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述突变序列为在所述核苷酸序列上存在一个或多个核苷酸的替换。

26. 如权利要求 24 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述突变选自天然致病突变和天然非致病突变；所述天然致病突变选自 c.2242C>T、c.2276G>T、c.2299delG、c.2522C>A、c.2541C>A、c.2761delC、c.2776C>T、c.2802T>G、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 和 c.2332G>T 中的一种或多种。

27. 如权利要求 26 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述天然致病突变选自 c.2802T>G、c.2299delG 和 c.2276G>T 中的一种或多种。

28. 如权利要求 27 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述天然致病突变为 c.2802T>G。

29. 如权利要求 1~28 任一项所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 Sm 序列为共有序列，所述茎环序列包括 U1、U2、U3、U4、U5、U6 或 U7 的茎环序列。

30. 如权利要求 29 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述茎环序列为 U7 的茎环序列。

31. 如权利要求 29 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述茎环序列为 U1 的茎环序列。

32. 如权利要求 29 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述茎环序列为 1-2 个。

33. 如权利要求 29 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述 Sm 序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

34. 如权利要求 29 所述的 snRNA 核酸分子，其特征在于，所述茎环序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

35. 如权利要求 1~34 任一项所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

36. 如权利要求 35 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 其进一步在所述识别结构域的 5'端和/或 3'端的核苷酸上包括单向延长序列或双向延长序列。

37. 如权利要求 35 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述修饰选自: 2'-O-烷基修饰、2'-O-甲氧基修饰和 2'-O-甲氧基乙基修饰; 所述 2'-O-烷基修饰优选为 2'-O-甲基修饰。

38. 如权利要求 37 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述类似物单体选自 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 2'-脱氧 2'-氟-β-D-阿拉伯糖核苷酸。

39. 如权利要求 1~38 任一项所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子的核苷酸间通过化学键连接, 所述化学键选自磷酸键、亚甲基键、酰胺键、甲基膦酸酯键和 3'-硫代甲缩醛键。

40. 如权利要求 39 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述磷酸键选自硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基膦酸酯键、酰胺磷酸酯键、硼烷磷酸酯键和手性连接磷。

41. 如权利要求 40 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述磷酸键选自硫代磷酸酯键。

42. 如权利要求 35~41 任一项所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起第 1~80 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

43. 如权利要求 42 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起第 3~40 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

44. 如权利要求 43 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子自 5'端和/或 3'端起第 6~10 位包含修饰的核苷酸或其类似物单体。

45. 如权利要求 35~44 任一项所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子自 5'端或 3'端起包含至少一个磷酸键。

46. 如权利要求 45 所述的 snRNA 核酸分子, 其特征在于, 所述 snRNA 核酸分子自 5'端起包含 1~3 个磷酸键; 或者,

所述 snRNA 核酸分子自 3'端起包含 1~3 个磷酸键。

47. 一种 snRNA 核酸分子的组合, 其特征在于, 所述组合包括一种或多种如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子。

48. 如权利要求 47 所述的组合, 其特征在于, 至少两个识别结构域位于相同或不同的 snRNA 核酸分子上。

49. 一种 DNA 分子, 其特征在于, 所述 DNA 分子编码如权利要求 1~46 任一项所述的

snRNA 核酸分子或者如权利要求 47 或 48 所述的组合。

50. 一种基因表达盒，其特征在于，所述基因表达盒包含启动子和如权利要求 49 所述的 DNA 分子。

51. 如权利要求 50 所述的基因表达盒，其特征在于，所述启动子与所述 DNA 分子的 Sm 序列间还包括可剪切位点例如 Tpye II 型限制性内切酶识别位点。

52. 如权利要求 50 或 51 所述的基因表达盒，其特征在于，所述启动子为 U7 启动子。

53. 如权利要求 52 所述的基因表达盒，其特征在于，所述启动子为小鼠来源的 U7 启动子。

54. 如权利要求 50~53 任一项所述的基因表达盒，其特征在于，所述基因表达盒包括识别结构域和骨架序列；所述骨架序列如 SEQ ID NO: 62 所示。

55. 一种重组表达载体，其特征在于，所述重组表达载体包含如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合或者如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒。

56. 如权利要求 55 所述的重组表达载体，其特征在于，所述重组表达载体的表达载体选自质粒、噬菌体、微环 DNA、线性 DNA 和病毒。

57. 如权利要求 56 所述的重组表达载体，其特征在于，所述表达载体为慢病毒或腺相关病毒。

58. 如权利要求 57 所述的重组表达载体，其特征在于，所述腺相关病毒的衣壳蛋白为天然来源的衣壳蛋白或其突变体，所述腺相关病毒的质粒为单链或与所述单链互补的双链。

59. 如权利要求 58 所述的重组表达载体，其特征在于，所述天然来源的衣壳蛋白选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10 和 AAVrh.43；

所述突变体选自 AAV2.5、AAV2i8、AAV-TT、AAV9.HR 和 CAM130。

60. 一种病毒颗粒，包括衣壳蛋白和核酸，其特征在于，所述核酸包括如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合或者如权利要求 49 所述的 DNA 分子。

61. 如权利要求 60 所述的病毒颗粒，其特征在于，所述衣壳蛋白为来自腺相关病毒的衣壳蛋白。

62. 如权利要求 61 所述的病毒颗粒，其特征在于，所述来自腺相关病毒的衣壳蛋白为天然来源的衣壳蛋白或其突变体。

63. 如权利要求 62 所述的病毒颗粒，其特征在于，所述天然来源的衣壳蛋白选自 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10 和 AAVrh.43；

所述突变体选自 AAV2.5、AAV2i8、AAV-TT、AAV9.HR 和 CAM130。

64. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合、如权利要求 49 所述的 DNA 分子、如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒、如权利要求 55~59 所述的重组表达载体或者如权利要求 60~63 任一项所述的病毒颗粒。

65. 如权利要求 64 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

66. 一种诱导产生缺失外显子 13 的 Usherin 蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括向宿主细胞中导入如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合、如权利要求 49 所述的 DNA 分子、如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒、如权利要求 55~59 所述的重组表达载体、如权利要求 60~63 任一项所述的病毒颗粒或者如权利要求 64 或 65 所述的药物组合物，使外显子 13 发生剪接跳跃。

67. 如权利要求 66 所述的方法，其特征在于，所述宿主细胞选自视网膜组织细胞，内耳细胞，具有分化为视网膜组织细胞和/或内耳细胞的潜能细胞，以及可行使包含具有与视网膜组织细胞和/或内耳细胞对应功能的细胞。

68. 如权利要求 67 所述的方法，其特征在于，所述视网膜组织细胞为视网膜感光细胞，所述内耳细胞为内耳毛细胞。

69. 如权利要求 67 所述的方法，其特征在于，所述潜能细胞选自诱导多能干细胞、胚胎干细胞、神经前体细胞、视网膜祖细胞、视网膜前体细胞和间充质基质细胞。

70. 一种抑制 USH2A pre-mRNA 外显子 13 表达和/或功能的方法，其特征在于，所述方法包括施用如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合、如权利要求 49 所述的 DNA 分子、如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒、如权利要求 55~59 所述的重组表达载体、如权利要求 58~61 任一项所述的病毒颗粒或者如权利要求 64 或 65 所述的药物组合物。

71. 一种诱导 USH2A pre-mRNA 外显子 13 剪接跳跃的方法，其特征在于，所述方法包括施用如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合、如权利要求 49 所述的 DNA 分子、如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒、如权利要求 55~59 所述的重组表达载体、如权利要求 60~63 任一项所述的病毒颗粒或者如权利要求 64 或 65 所述的药物组合物。

72. 一种降低异常 Usherin 蛋白表达的方法，其特征在于，所述方法包括向宿主细胞中导入如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合、如权利要求 49 所述的 DNA 分子、如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒、如权利要求 55~59

所述的重组表达载体、如权利要求 60~63 任一项所述的病毒颗粒或者如权利要求 64 或 65 所述的药物组合物。

73. 如权利要求 72 所述的方法，其特征在于，所述宿主细胞所述宿主细胞选自视网膜组织细胞，内耳细胞，具有分化为视网膜组织细胞和/或内耳细胞的潜能细胞，以及可行使包含具有与视网膜组织细胞和/或内耳细胞对应功能的细胞。

74. 如权利要求 73 所述的方法，其特征在于，所述视网膜组织细胞为视网膜感光细胞，所述内耳细胞为内耳毛细胞。

75. 如权利要求 74 所述的方法，其特征在于，所述潜能细胞选自诱导多能干细胞、胚胎干细胞、神经前体细胞、视网膜祖细胞、视网膜前体细胞和间充质基质细胞。

76. 一种制备如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子或者如权利要求 47 或 48 所述的组合的方法，所述方法包括生物合成或化学合成如权利要求 1~44 任一项所述的 snRNA 核酸分子或者如权利要求 47 或 48 所述的组合的步骤。

77. 一种如权利要求 1~46 任一项所述的 snRNA 核酸分子、如权利要求 47 或 48 所述的组合、如权利要求 49 所述的 DNA 分子、如权利要求 50~54 任一项所述的基因表达盒、如权利要求 55~59 所述的重组表达载体、如权利要求 60~63 任一项所述的病毒颗粒或者如权利要求 64 或 65 所述的药物组合物在制备治疗 USH2A 外显子 13 突变相关的疾病的药物中的应用。

78. 如权利要求 77 所述的应用，其特征在于，所述 USH2A 外显子 13 突变为致病突变或非致病突变。

79. 如权利要求 77 所述的应用，其特征在于，所述疾病选自眼病和耳病。

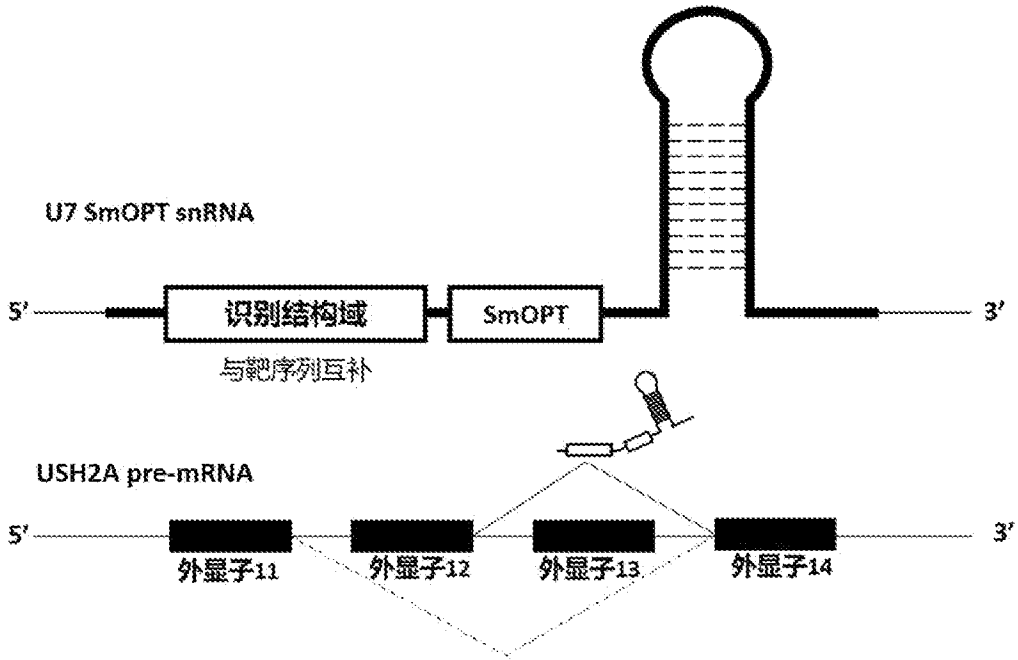


图 1

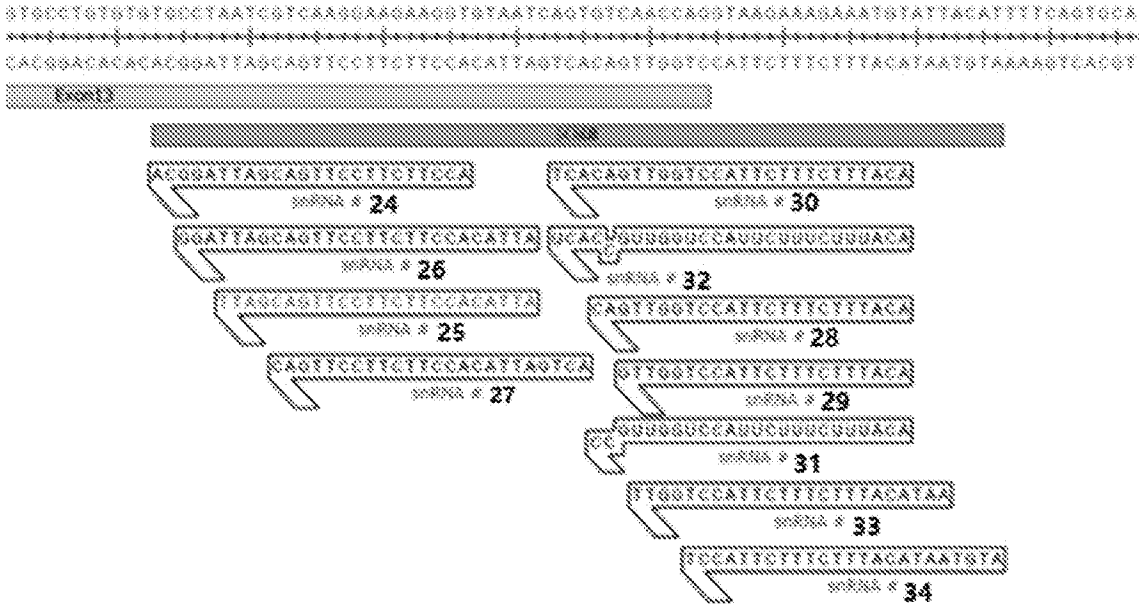


图 2

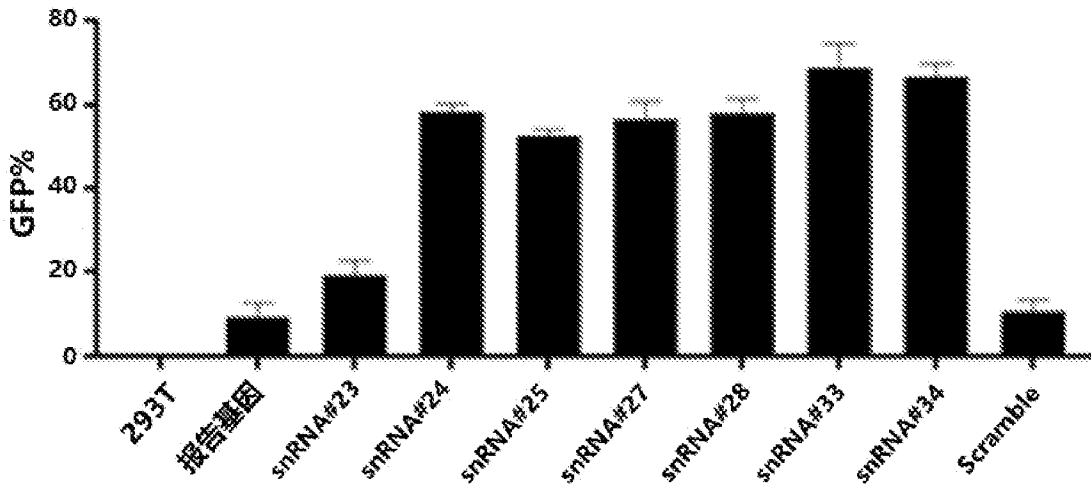


图 3A

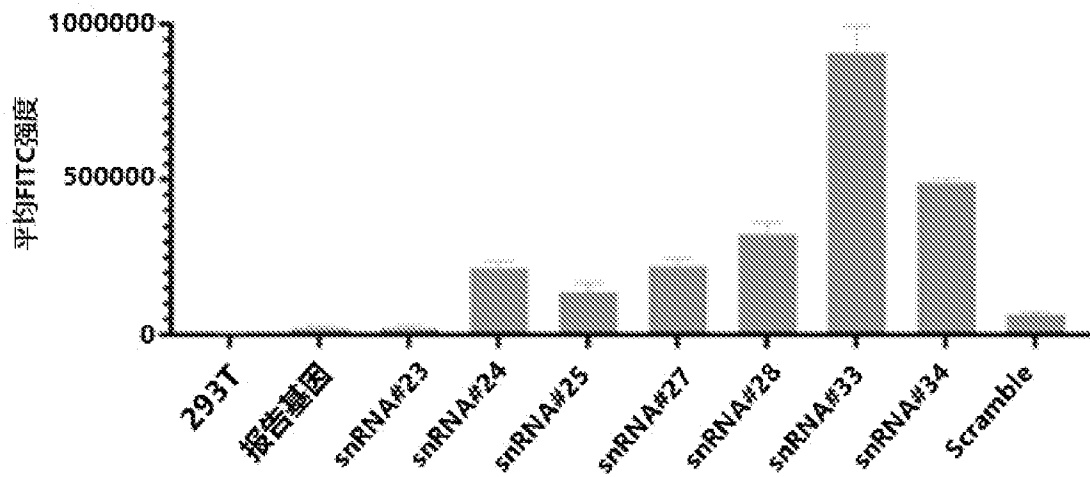


图 3B

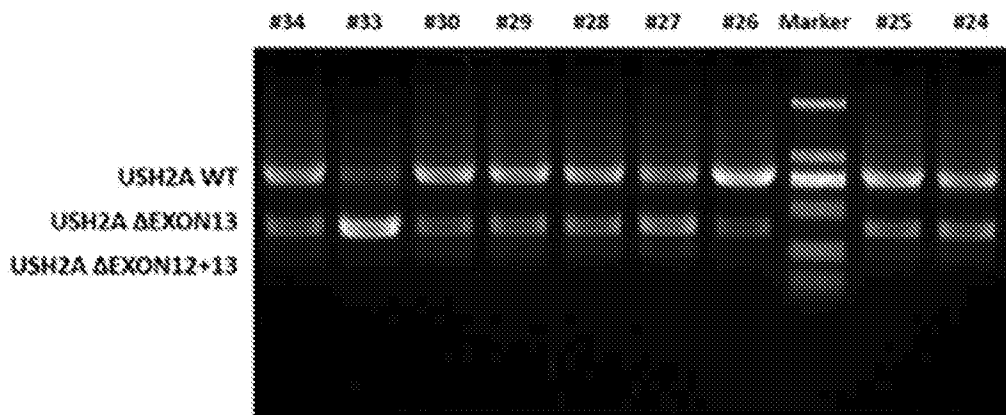


图 4

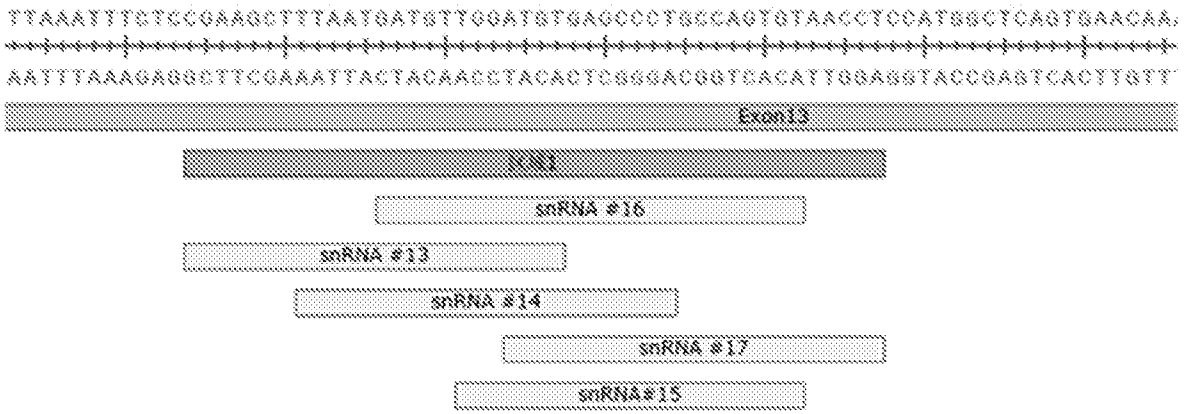


图 5

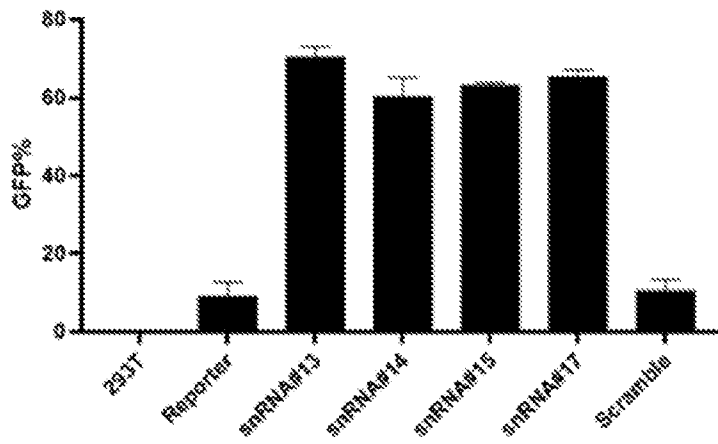


图 6

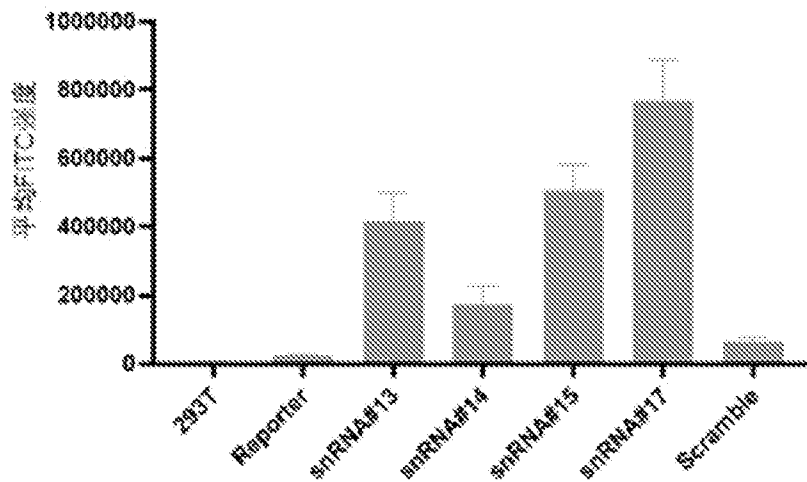


图 7

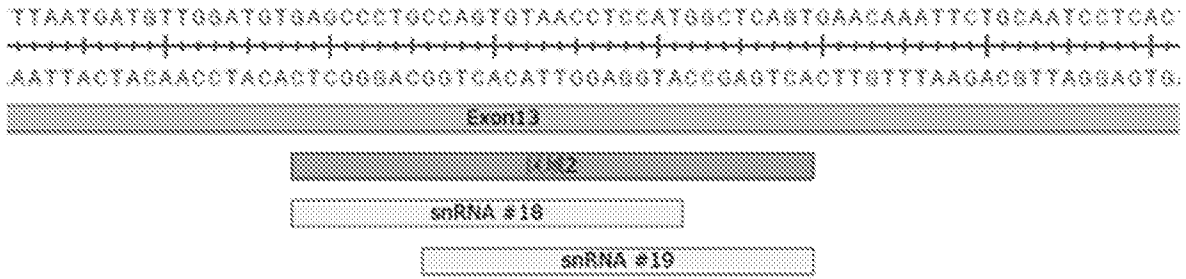


图 8

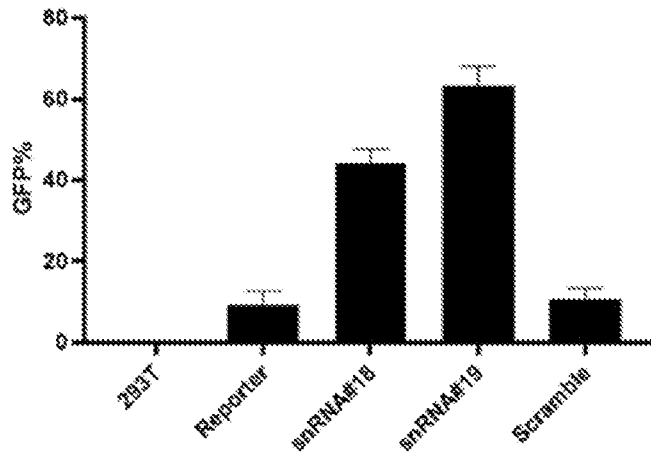


图 9

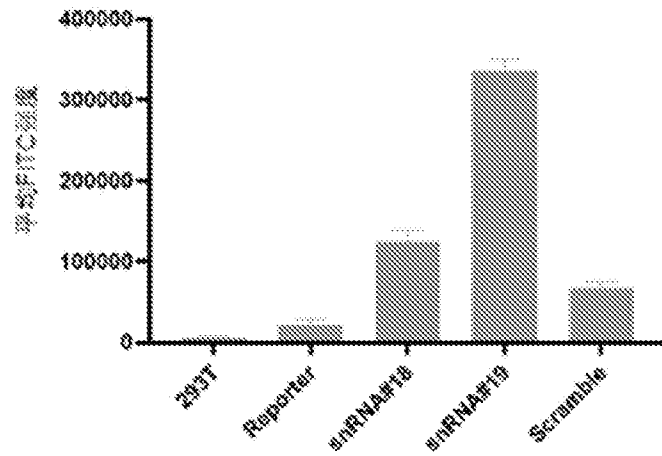


图 10

GGACCATTTGTGACCCAATCAGTGGCCAGTGCCTGTGTGTGCCTAATCGTCAAGGAAGAAGGT:
 CCTGGTAAACACTGGGTTAGTCACCGGTCACGGACACACACGGATTAGCAOTTCCCTTCTTCCA:
 Exon13

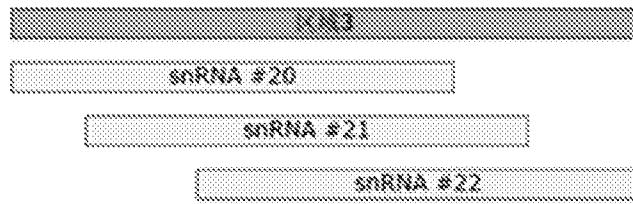


图 11

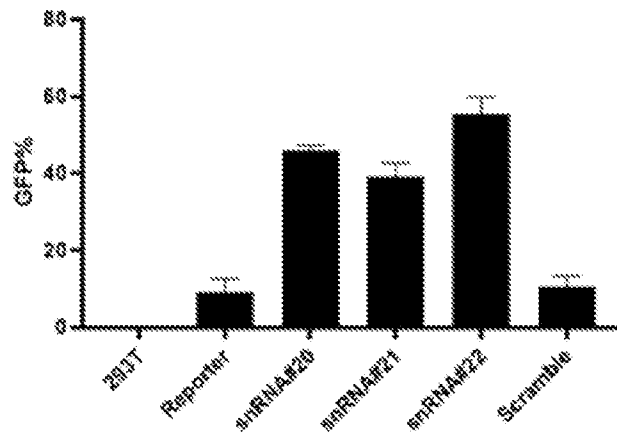


图 12

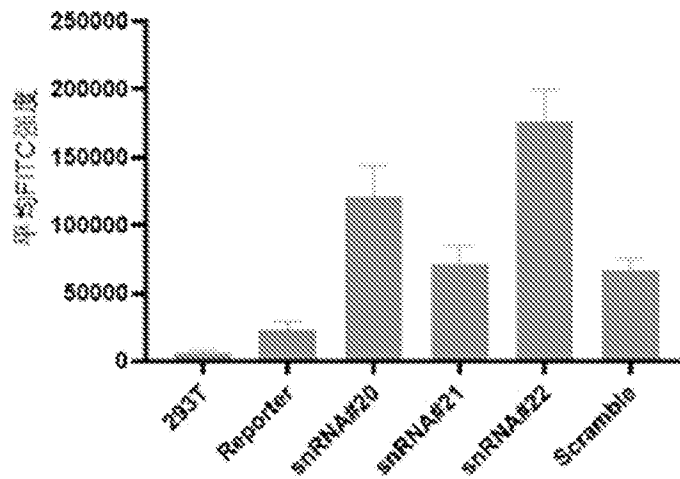


图 13

TTTAAATATATTTTATCTTTAGGGCTTAGGTGTGATCATTGCAATTTTGGAT
 AAATTTATATAAAATAGAAATCCCGAATCCACACTAGTAACGTTAAAACCTA.

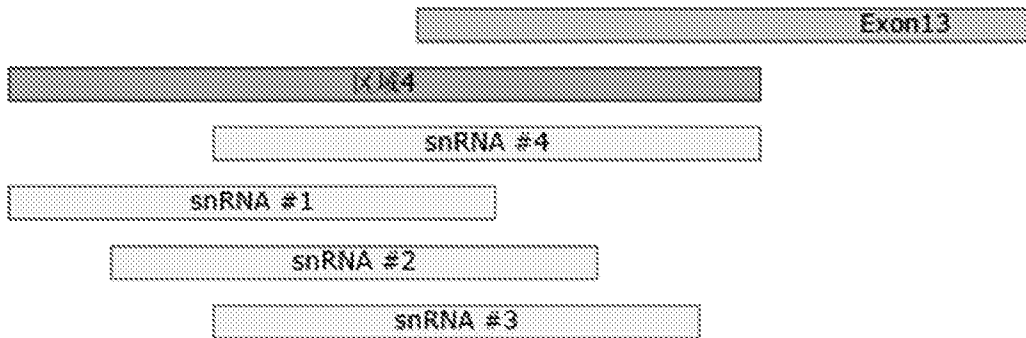


图 14

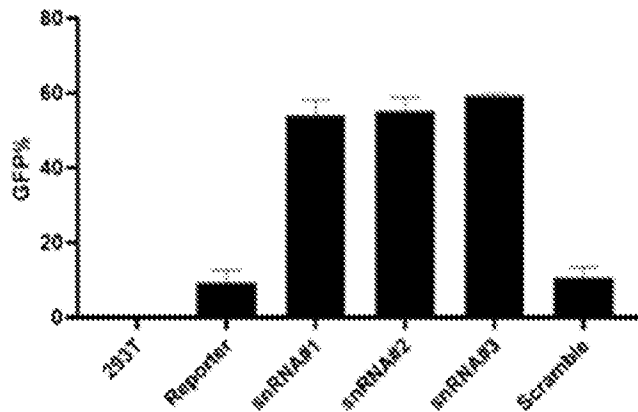


图 15

CACCTTTAAATATATTTTATCTTTAGGGCTTAGGTGTGATCATTGCAATTTTGGATTTAAATTTCT
 GTGGAAAATTTATATAAAATAGAAATCCCGAATCCACACTAGTAACGTTAAAACCTAAATTTAAAGA

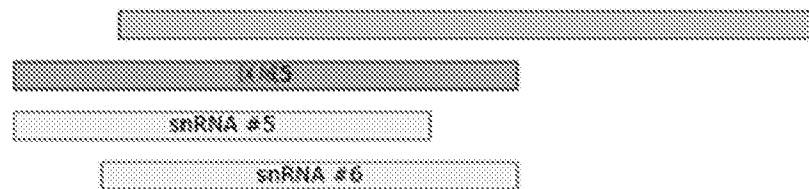


图 16

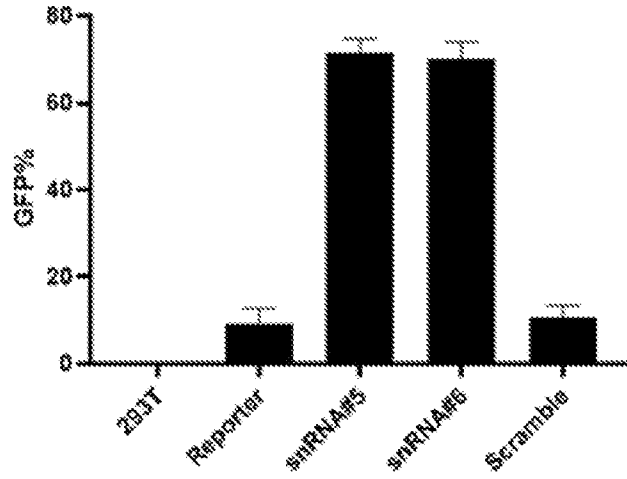


图 17

GCTTAGGTGTGATCATTGCAATTTTGGATTAAATTTCTCCGAAGCTTTA.
 CGAATCCACACTAGTAACGTTAAAACCTAAATTTAAAGAGGCTTCGAAAT

Exon13

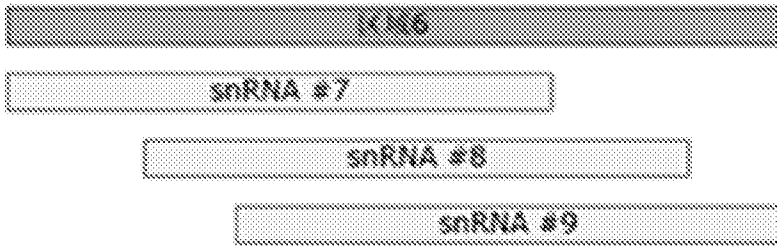


图 18

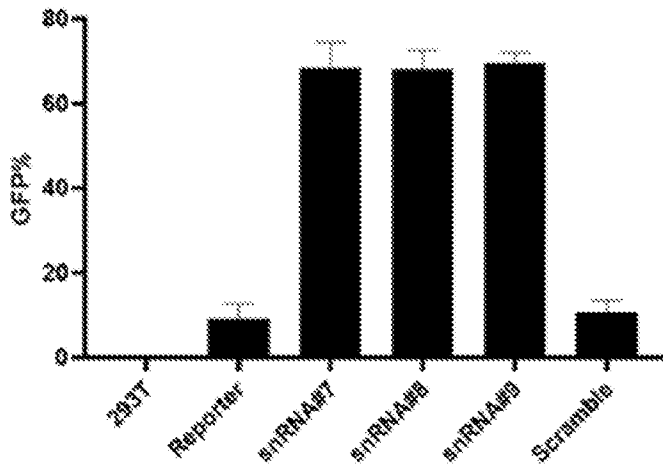


图 19

CATTGCAATTTTGGATTAAATTTCTCCGAAGCOTTAATGATGTTGGATGTGAGCCG
 GTAACGTTAAAACCTAAATTTAAAGAGGCTTCGAAATTACTACAACCTACACTCGG

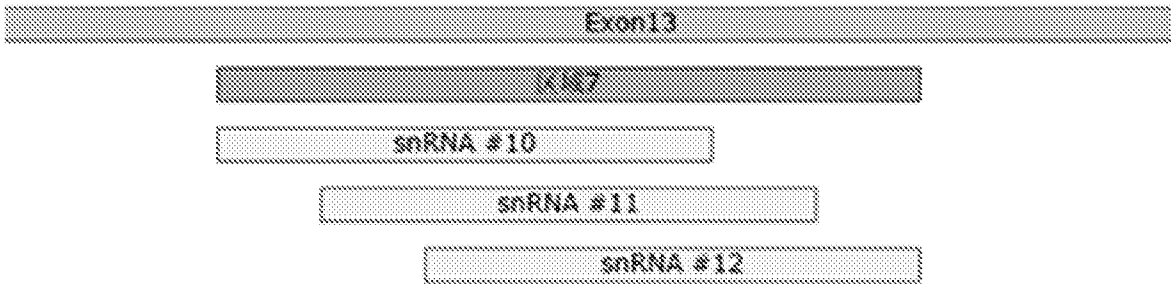


图 20

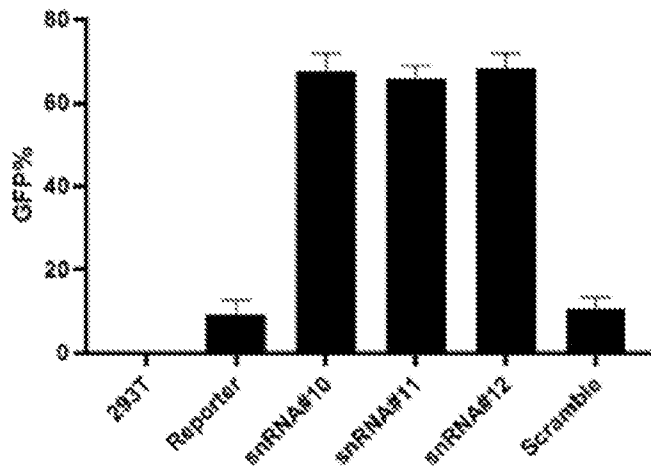


图 21

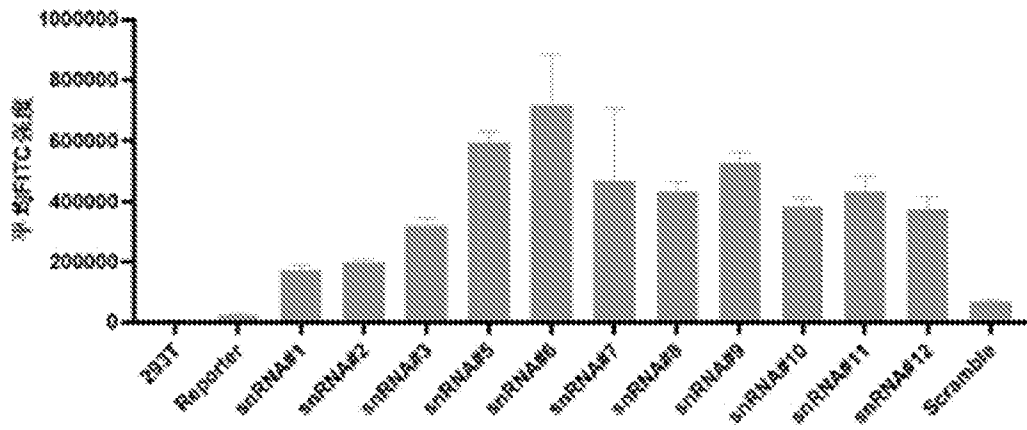


图 22

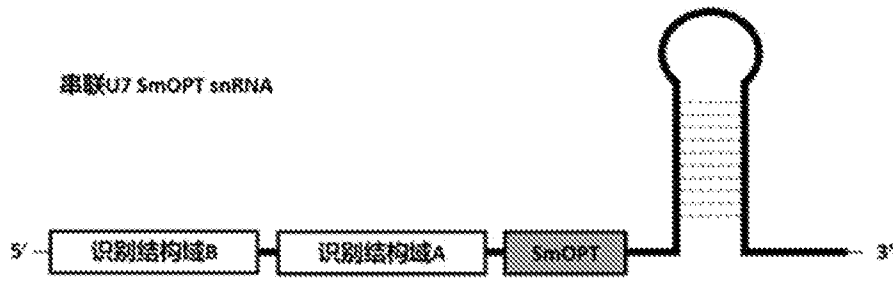


图 23

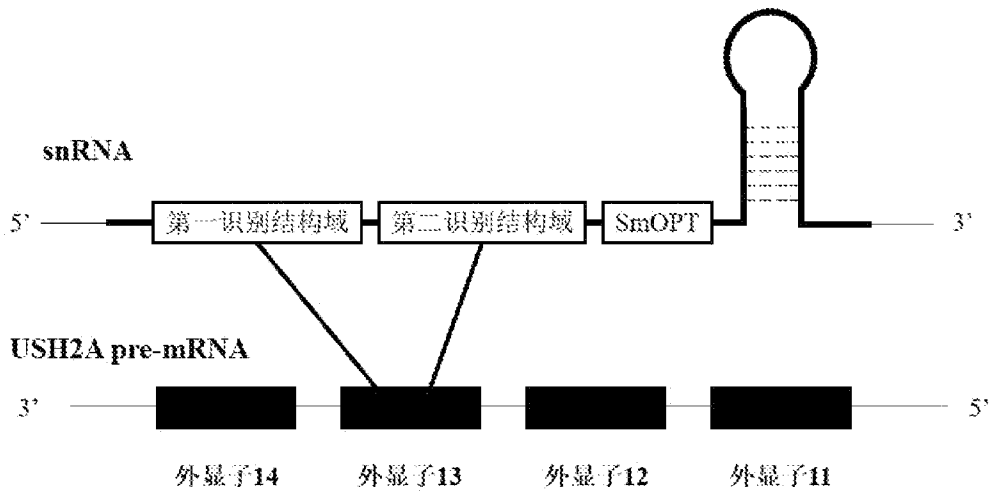


图 24A

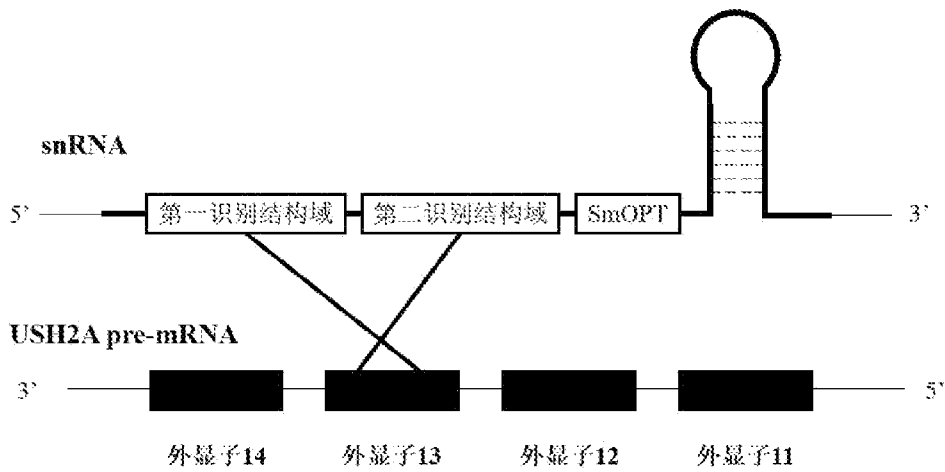


图 24B

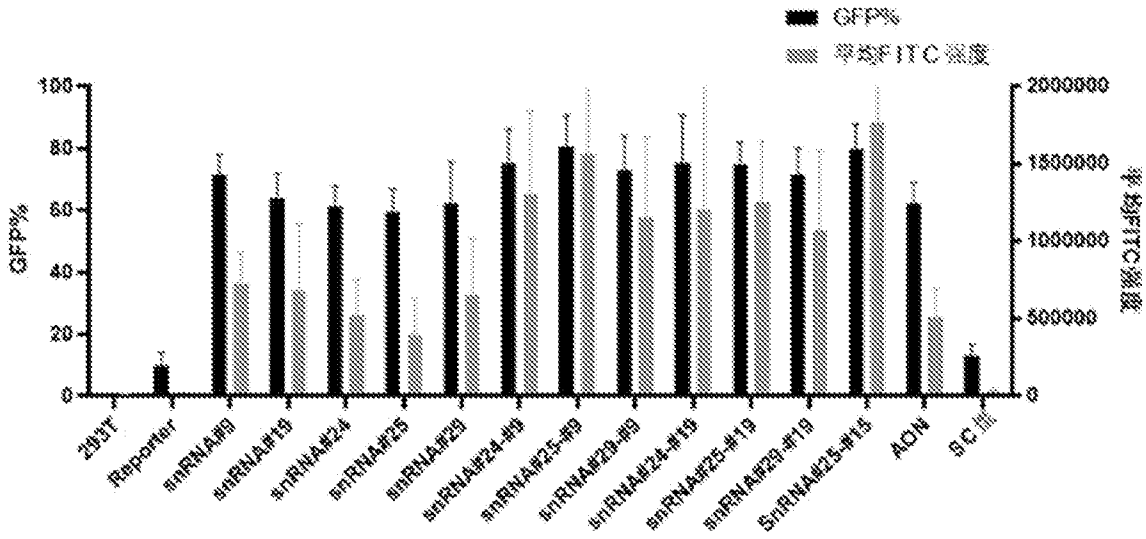


图 25

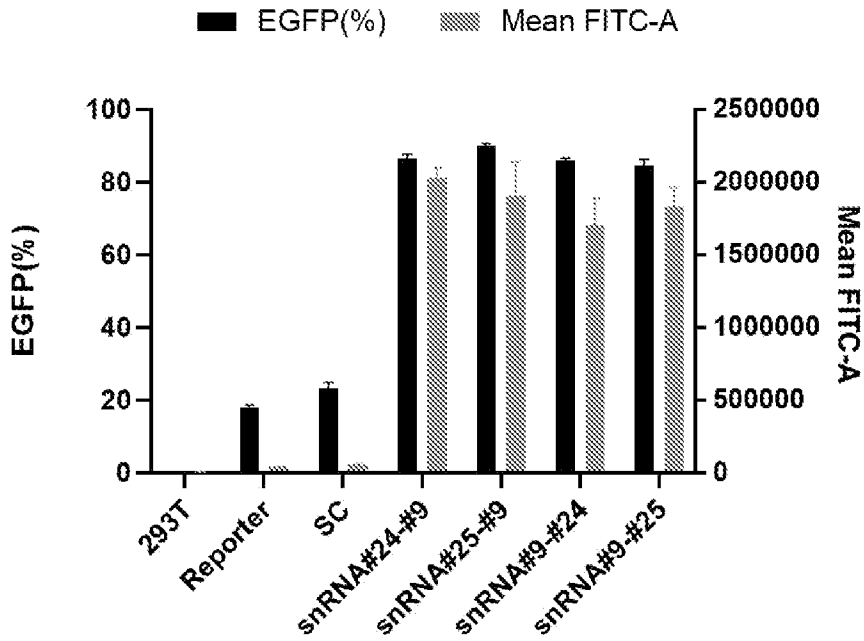


图 26

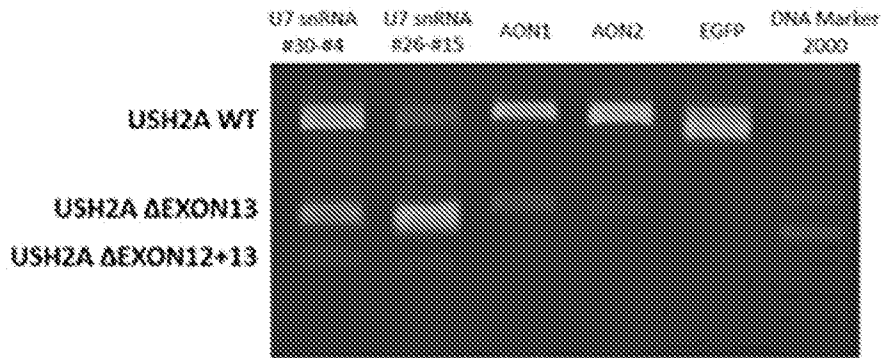


图 27

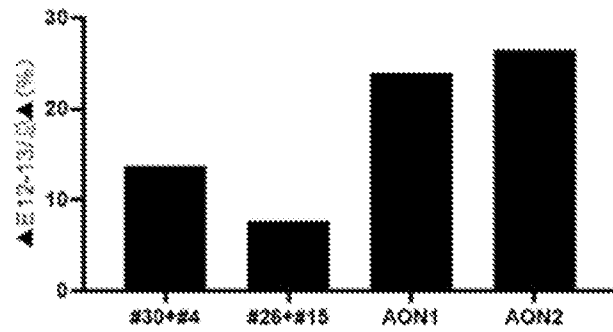


图 28

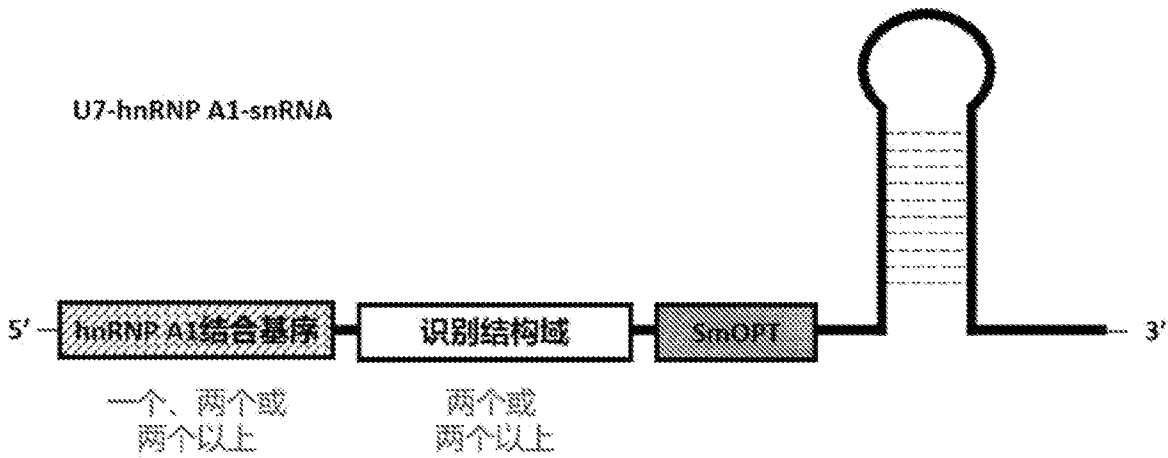


图 29A

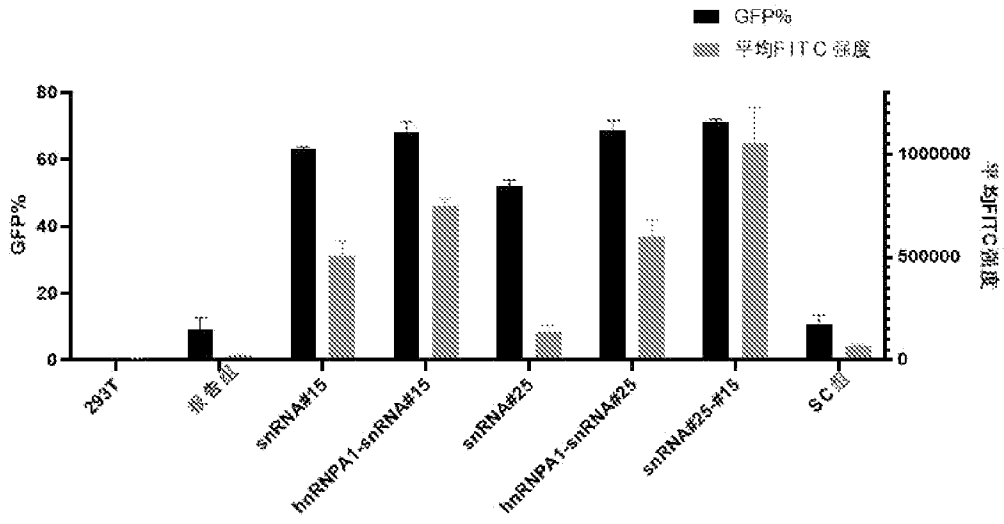


图 29B

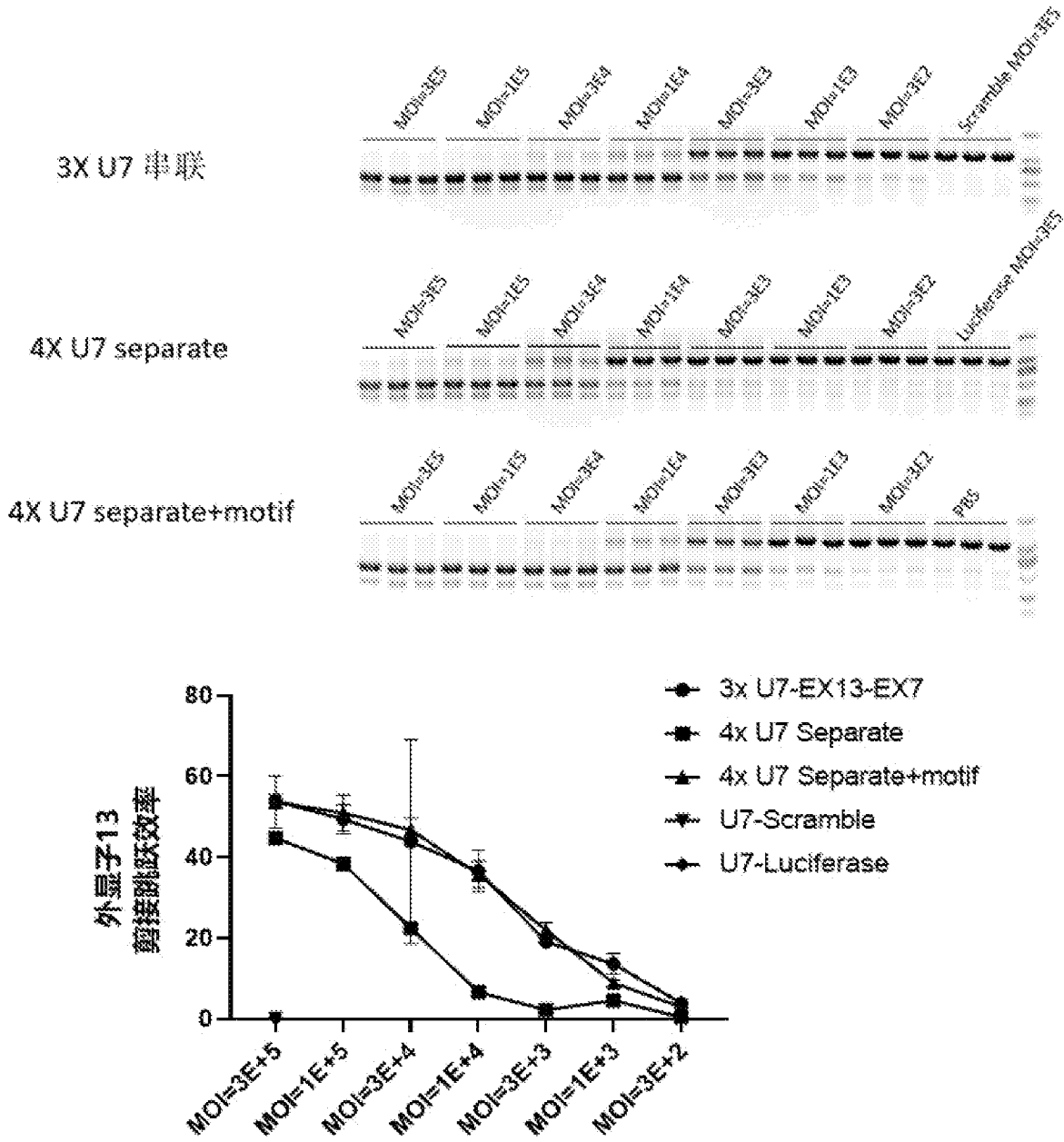
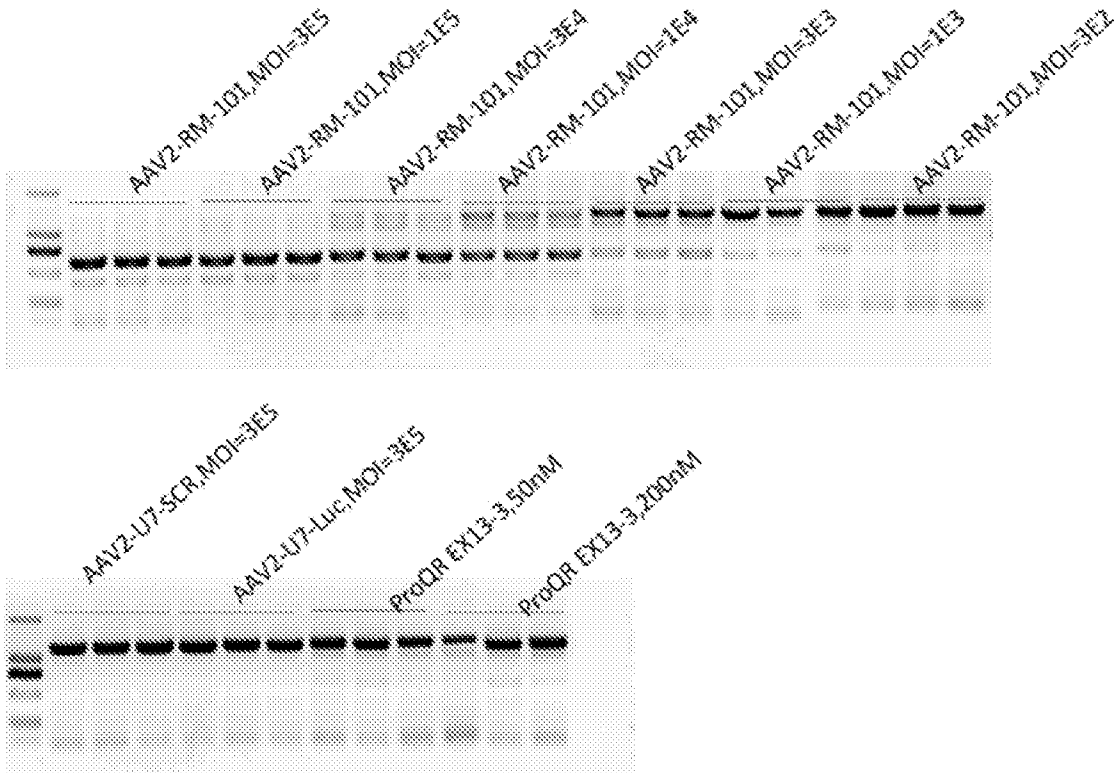


图 30



qRT-PCR定量

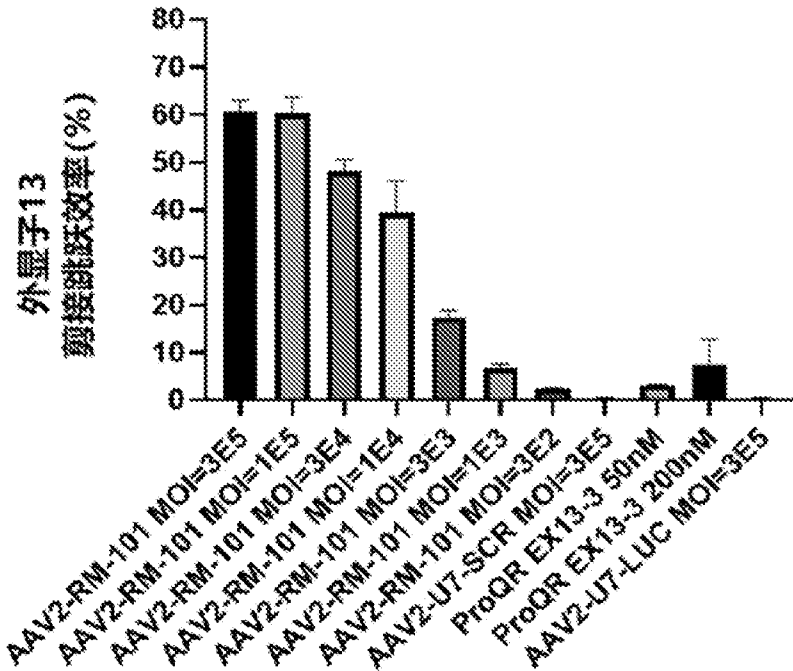


图 31

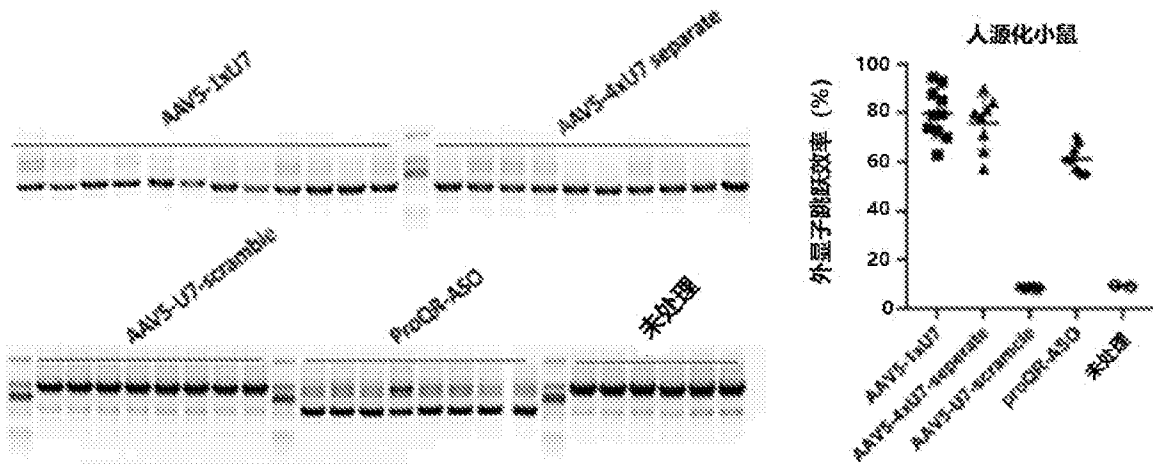


图 32

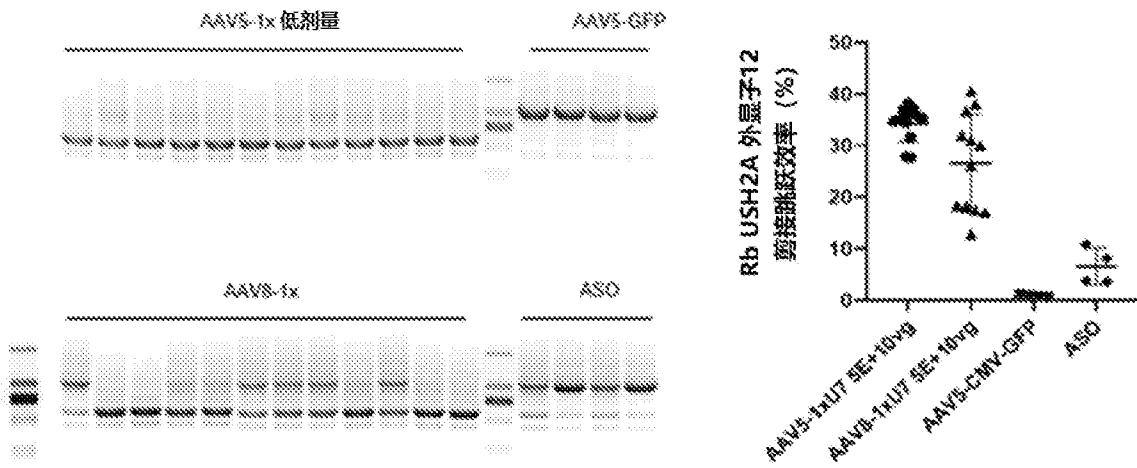


图 33

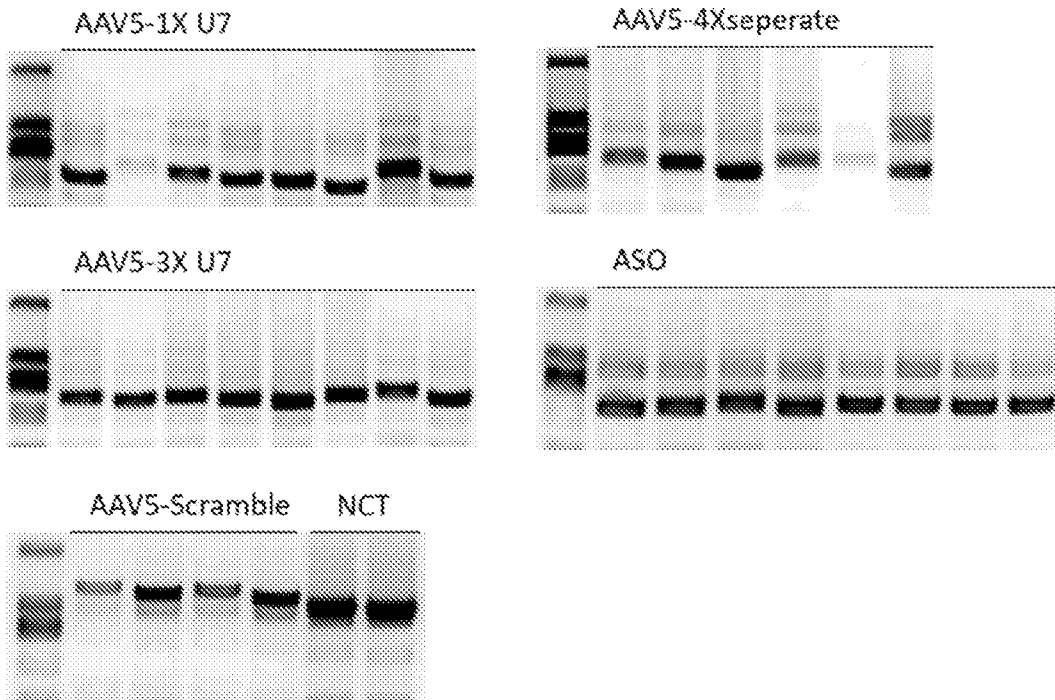


图 34

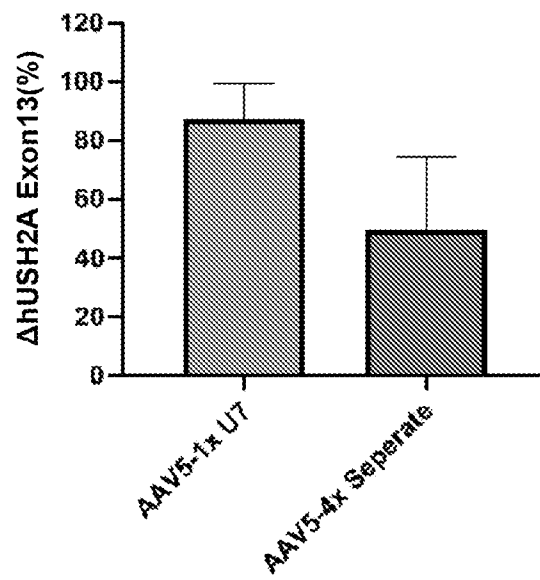


图 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/122201

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|--|--|
| C12N15/113(2010.01)i; A61K31/7088(2006.01)i; A61K48/00(2006.01)i | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC: C12N A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| CNTXT; ENTXT; ENTXTC; DWPI; CNKI; ISI WEB OF SCIENCES; PUBMED; bing; STN: 反义核酸, 核小RNA, 跳读, 外显子13, antisense oligonucleotide, AON, snRNA, skipping, exon13, usherin, USH2A, pre-mRNA, smOPT, SEQ ID NOs: 6-7, 9, 12-22, 32-33, 36-61 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | CN 109804069 A (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 24 May 2019 (2019-05-24) description, paragraphs 8-19, 34, 40-65 and 71, figure 1, and embodiment 3 | 1-79 |
| Y | US 2013045538 A1 (ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE) 21 February 2013 (2013-02-21) description, paragraphs 9-10, 23 and 28-35, and abstract | 1-79 |
| Y | WO 2021216853 A1 (SHAPE THERAPEUTICS INC.) 28 October 2021 (2021-10-28) description, paragraphs 4-20, 72-116, 144-164, 210-212, 232-238 and 259-274, and claims 1-51 | 1-79 |
| A | CN 114787357 A (ASTELLAS PHARMA INC.) 22 July 2022 (2022-07-22) claims 1-23 | 1-79 |
| A | CN 109072239 A (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 21 December 2018 (2018-12-21) claims 1-16 | 1-79 |
| A | US 2008194027 A1 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 14 August 2008 (2008-08-14) description, paragraphs 9-14, and claims 1-20 | 1-79 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 29 November 2023 | | 20 December 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/CN | | Authorized officer |
| China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/122201

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | HAM, K.A. et al. "Induction of Cryptic Pre-mRNA Splice-switching by Antisense Oligonucleotides" <i>Scientific Reports</i> , Vol. vol. 11, 23 July 2021 (2021-07-23), Article no. 15137 | 1-79 |
| ----- | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/122201

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

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

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **66-75**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 66-75 relate to a method for gene therapy by means of snRNA, wherein the in vivo administration falls within subject matter for which a search is not required (PCT Rule 39.1(iv)). A search is carried out by this authority on the basis of a corresponding pharmaceutical use solution.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/122201

| 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 |
| | | | | IL | 265206 | B1 | 01 April 2023 |
| | | | | IL | 265206 | B2 | 01 August 2023 |
| | | | | ZA | 201901247 | B | 28 October 2020 |
| | | | | PT | 3516060 | T | 27 August 2021 |
| | | | | JP | 2019528747 | A | 17 October 2019 |
| | | | | JP | 7141123 | B2 | 22 September 2022 |
| | | | | KR | 20190051020 | A | 14 May 2019 |
| | | | | KR | 102450757 | B1 | 04 October 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 |
| | | | | NZ | 752572 | A | 27 January 2023 |
| | | | | BR | 112019005586 | A2 | 11 June 2019 |
| | | | | GB | 201616202 | D0 | 09 November 2016 |
| | | | | PL | 3516060 | T3 | 13 December 2021 |
| | | | | CA | 3035627 | A1 | 29 March 2018 |
| US | 2013045538 | A1 | 21 February 2013 | JP | 2013521791 | A | 13 June 2013 |
| | | | | JP | 5894543 | B2 | 30 March 2016 |
| | | | | WO | 2011113889 | A1 | 22 September 2011 |
| | | | | US | 9080170 | B2 | 14 July 2015 |
| | | | | CA | 2792696 | A1 | 22 September 2011 |
| | | | | CA | 2792696 | C | 07 January 2020 |
| | | | | EP | 2547768 | A1 | 23 January 2013 |
| | | | | EP | 2547768 | B1 | 30 December 2015 |
| | | | | ES | 2566553 | T3 | 13 April 2016 |
| WO | 2021216853 | A1 | 28 October 2021 | US | 2023203483 | A1 | 29 June 2023 |
| | | | | JP | 2023523237 | A | 02 June 2023 |
| | | | | EP | 4139453 | A1 | 01 March 2023 |
| | | | | CA | 3173012 | A1 | 28 October 2021 |
| | | | | AU | 2021261374 | A1 | 13 October 2022 |
| CN | 114787357 | A | 22 July 2022 | EP | 4074825 | A1 | 19 October 2022 |
| | | | | TW | 202136508 | A | 01 October 2021 |
| | | | | WO | 2021117729 | A1 | 17 June 2021 |
| | | | | KR | 20220111322 | A | 09 August 2022 |
| | | | | CO | 2022009538 | A2 | 19 July 2022 |
| | | | | US | 2023059753 | A1 | 23 February 2023 |
| | | | | JPWO | 2021117729 | A1 | 17 June 2021 |
| | | | | AU | 2020399673 | A1 | 28 July 2022 |
| | | | | MX | 2022006991 | A | 25 August 2022 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/122201

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|------------|-------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | | | IL 293671 A | 01 August 2022 |
| | | | | CA 3161264 A1 | 17 June 2021 |
| | | | | BR 112022011277 A2 | 06 September 2022 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| CN | 109072239 | A | 21 December 2018 | US 2021401871 A1 | 30 December 2021 |
| | | | | CA 3021899 A1 | 02 November 2017 |
| | | | | AU 2017257292 A1 | 06 December 2018 |
| | | | | ES 2801823 T3 | 14 January 2021 |
| | | | | US 2019381089 A1 | 19 December 2019 |
| | | | | US 10617707 B2 | 14 April 2020 |
| | | | | EP 3448999 A1 | 06 March 2019 |
| | | | | EP 3448999 B1 | 13 May 2020 |
| | | | | EA 201892431 A1 | 30 April 2019 |
| | | | | MX 2018013003 A | 28 January 2019 |
| | | | | DK 3448999 T3 | 08 June 2020 |
| | | | | JP 2019515688 A | 13 June 2019 |
| | | | | JP 7043082 B2 | 29 March 2022 |
| | | | | ZA 201806628 B | 31 July 2019 |
| | | | | IL 262199 A | 31 December 2018 |
| | | | | IL 262199 B | 01 March 2022 |
| | | | | PL 3448999 T3 | 30 November 2020 |
| | | | | KR 20180134931 A | 19 December 2018 |
| | | | | KR 102368920 B1 | 28 February 2022 |
| | | | | WO 2017186739 A1 | 02 November 2017 |
| | | | | US 2020237802 A1 | 30 July 2020 |
| | | | | US 11123360 B2 | 21 September 2021 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| US | 2008194027 | A1 | 14 August 2008 | US 9040491 B2 | 26 May 2015 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：66-75
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求66-75涉及通过snRNA进行基因治疗的方法，其中体内施用的情况属于PCT细则39.1(iv)不要求检索的主题，本单位以相应制药用途方案为基础进行了检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

| <p>A. 主题的分类</p> <p>C12N15/113(2010.01)i; A61K31/7088(2006.01)i; A61K48/00(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. 检索领域</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</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>CNTEXT;ENTXT;ENTXTC;DWPI;CNKI;ISI WEB OF SCIENCES;PUBMED;bing;STN;反义核酸, 核小RNA, 跳读, 外显子13, antisense oligonucleotide, AON,snRNA, skipping, exon13, usherin,USH2A, pre-mRNA, smOPT, SEQ IDNOs: 6-7,9,12-22,32-33,36-61</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>C. 相关文件</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>Y</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8-19、34、40-65、71段, 图1, 实施例3</td> <td>1-79</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2013045538 A1 (ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE) 2013年2月21日 (2013 - 02 - 21) 说明书第9-10、23、28-35段, 摘要</td> <td>1-79</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2021216853 A1 (SHAPE THERAPEUTICS INC.) 2021年10月28日 (2021 - 10 - 28) 说明书第4-20、72-116、144-164、210-212、232-238、259-274段, 权利要求1-51</td> <td>1-79</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 114787357 A (安斯泰来制药株式会社) 2022年7月22日 (2022 - 07 - 22) 权利要求1-23</td> <td>1-79</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109072239 A (ProQR治疗上市公司II) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-16</td> <td>1-79</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2008194027 A1 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2008年8月14日 (2008 - 08 - 14) 说明书第9-14段, 权利要求1-20</td> <td>1-79</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 | Y | CN 109804069 A (ProQR治疗上市公司II) 2019年5月24日 (2019 - 05 - 24) 说明书第8-19、34、40-65、71段, 图1, 实施例3 | 1-79 | Y | US 2013045538 A1 (ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE) 2013年2月21日 (2013 - 02 - 21) 说明书第9-10、23、28-35段, 摘要 | 1-79 | Y | WO 2021216853 A1 (SHAPE THERAPEUTICS INC.) 2021年10月28日 (2021 - 10 - 28) 说明书第4-20、72-116、144-164、210-212、232-238、259-274段, 权利要求1-51 | 1-79 | A | CN 114787357 A (安斯泰来制药株式会社) 2022年7月22日 (2022 - 07 - 22) 权利要求1-23 | 1-79 | A | CN 109072239 A (ProQR治疗上市公司II) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-16 | 1-79 | A | US 2008194027 A1 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2008年8月14日 (2008 - 08 - 14) 说明书第9-14段, 权利要求1-20 | 1-79 |
| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | CN 109804069 A (ProQR治疗上市公司II) 2019年5月24日 (2019 - 05 - 24) 说明书第8-19、34、40-65、71段, 图1, 实施例3 | 1-79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | US 2013045538 A1 (ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE) 2013年2月21日 (2013 - 02 - 21) 说明书第9-10、23、28-35段, 摘要 | 1-79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | WO 2021216853 A1 (SHAPE THERAPEUTICS INC.) 2021年10月28日 (2021 - 10 - 28) 说明书第4-20、72-116、144-164、210-212、232-238、259-274段, 权利要求1-51 | 1-79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | CN 114787357 A (安斯泰来制药株式会社) 2022年7月22日 (2022 - 07 - 22) 权利要求1-23 | 1-79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | CN 109072239 A (ProQR治疗上市公司II) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-16 | 1-79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | US 2008194027 A1 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2008年8月14日 (2008 - 08 - 14) 说明书第9-14段, 权利要求1-20 | 1-79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</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>“&” 同族专利的文件</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年11月29日</p> | | <p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年12月20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>授权官员</p> <p>李影</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961973</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 | HAM,K.A.等. "Induction of cryptic pre-mRNA splice-switching by antisense oligonucleotides" Scientific Reports, 第11卷, 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23), 第15137号文章 | 1-79 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/122201

| 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 |
| | | | | IL | 265206 | B1 | 2023年4月1日 |
| | | | | IL | 265206 | B2 | 2023年8月1日 |
| | | | | ZA | 201901247 | B | 2020年10月28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 |
| | | | | KR | 20190051020 | A | 2019年5月14日 |
| | | | | KR | 102450757 | B1 | 2022年10月4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 |
| | | | | NZ | 752572 | A | 2023年1月27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 | | | | |
| US | 2013045538 | A1 | 2013年2月21日 | JP | 2013521791 | A | 2013年6月13日 |
| | | | | JP | 5894543 | B2 | 2016年3月30日 |
| | | | | WO | 2011113889 | A1 | 2011年9月22日 |
| | | | | US | 9080170 | B2 | 2015年7月14日 |
| | | | | CA | 2792696 | A1 | 2011年9月22日 |
| | | | | CA | 2792696 | C | 2020年1月7日 |
| | | | | EP | 2547768 | A1 | 2013年1月23日 |
| | | | | EP | 2547768 | B1 | 2015年12月30日 |
| | | | | ES | 2566553 | T3 | 2016年4月13日 |
| WO | 2021216853 | A1 | 2021年10月28日 | US | 2023203483 | A1 | 2023年6月29日 |
| | | | | JP | 2023523237 | A | 2023年6月2日 |
| | | | | EP | 4139453 | A1 | 2023年3月1日 |
| | | | | CA | 3173012 | A1 | 2021年10月28日 |
| | | | | AU | 2021261374 | A1 | 2022年10月13日 |
| CN | 114787357 | A | 2022年7月22日 | EP | 4074825 | A1 | 2022年10月19日 |
| | | | | TW | 202136508 | A | 2021年10月1日 |
| | | | | WO | 2021117729 | A1 | 2021年6月17日 |
| | | | | KR | 20220111322 | A | 2022年8月9日 |
| | | | | CO | 2022009538 | A2 | 2022年7月19日 |
| | | | | US | 2023059753 | A1 | 2023年2月23日 |
| | | | | JPWO | 2021117729 | A1 | 2021年6月17日 |
| | | | | AU | 2020399673 | A1 | 2022年7月28日 |
| | | | | MX | 2022006991 | A | 2022年8月25日 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/122201

| 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) |
|-------------|------------|----|----------------|------|--------------|----|----------------|
| | | | | IL | 293671 | A | 2022年8月1日 |
| | | | | CA | 3161264 | A1 | 2021年6月17日 |
| | | | | BR | 112022011277 | A2 | 2022年9月6日 |
| CN | 109072239 | A | 2018年12月21日 | US | 2021401871 | A1 | 2021年12月30日 |
| | | | | CA | 3021899 | A1 | 2017年11月2日 |
| | | | | AU | 2017257292 | A1 | 2018年12月6日 |
| | | | | ES | 2801823 | T3 | 2021年1月14日 |
| | | | | US | 2019381089 | A1 | 2019年12月19日 |
| | | | | US | 10617707 | B2 | 2020年4月14日 |
| | | | | EP | 3448999 | A1 | 2019年3月6日 |
| | | | | EP | 3448999 | B1 | 2020年5月13日 |
| | | | | EA | 201892431 | A1 | 2019年4月30日 |
| | | | | MX | 2018013003 | A | 2019年1月28日 |
| | | | | DK | 3448999 | T3 | 2020年6月8日 |
| | | | | JP | 2019515688 | A | 2019年6月13日 |
| | | | | JP | 7043082 | B2 | 2022年3月29日 |
| | | | | ZA | 201806628 | B | 2019年7月31日 |
| | | | | IL | 262199 | A | 2018年12月31日 |
| | | | | IL | 262199 | B | 2022年3月1日 |
| | | | | PL | 3448999 | T3 | 2020年11月30日 |
| | | | | KR | 20180134931 | A | 2018年12月19日 |
| | | | | KR | 102368920 | B1 | 2022年2月28日 |
| | | | | WO | 2017186739 | A1 | 2017年11月2日 |
| | | | | US | 2020237802 | A1 | 2020年7月30日 |
| | | | | US | 11123360 | B2 | 2021年9月21日 |
| US | 2008194027 | A1 | 2008年8月14日 | US | 9040491 | B2 | 2015年5月26日 |