

一种治疗 Usher 综合征的方法和其组合物

技术领域

本申请属于基因编辑治疗领域，具体地，涉及一种基于 LEAPER
5 (Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing on RNA)技术靶向编辑 Usher 综合征II型(Usher Syndrome Type II)相关基因突变的方法。

背景技术

Usher 综合征，又称遗传性耳聋-色素性视网膜炎综合征，是 1914 年由
10 Charles Howard Usher 描述并命名的¹²，是一种由基因突变引起、导致病患先天或逐渐丧失视觉和听觉能力的常染色体隐性遗传性罕见病。Usher 综合征发病率在德国约为 1/12500⁸，在挪威中为 1/28000⁴，在美国为 1/23000，据估计在美国 16000 盲聋人中，一半以上患有 Usher 综合征¹。全球有数万甚至数十万病人亟待治疗。

15 1977 年，Davenport 等人研究了 Usher 综合征，并根据其严重程度将其分为I、II、III、IV型³。其中，I型为重度先天性耳聋，10 岁左右出现严重视觉障碍，II型为中度至重度先天性耳聋，约在 10~50 岁之间逐渐丧失视力。III、IV型相对罕见，并且病情较轻，听觉表现为进行性感音神经性聋，而视觉丧失时间不确定。由于I型发病早，介入窗口较小，而III、IV型相对病情
20 较轻。II型病人的视觉丧失会从 10~20 岁起逐渐开始，发病初期为夜盲症，并最终丧失视力(图 1)，这使得我们有较长的治疗介入窗口，并有希望终止病人视力的逐渐丧失。

Neuhaus 等人 2017 年通过高通量测序对 138 例 Usher 综合征病人进行了研究，其结果显示在这 138 例中有 82 例为 USH2A 基因突变，而这 82 例中，
25 又有 80 例为 Usher 综合征II型(图 2)⁷。由此，当只考虑 Usher 综合征II型病人时，USH2A 基因突变的占比超过了 90%(图 2)⁷，而针对 USH2A 基因的治疗方案，很有可能使得这些病人受益。

USH2A 基因编码一种被称为 Usherin 的蛋白，该蛋白在视觉中发挥了重要的功能，主要是在感光的视锥细胞和视杆细胞中，起到连接内节(Inner
30 Segment)与外节(Outer Segment)的重要作用。当 USH2A 突变后，会导致视锥

细胞和视杆细胞的退行性死亡⁵。Neuhaus 等人 2017 年的研究表明,在其测序的 USH2A 基因突变案例中,有 13%为 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter),而这一种突变类型为所有突变类型中占比最多的单一突变类型(图 3)⁷。

5 由于 USH2A 基因突变而失去 Usherin 正常功能是导致 USHER 综合征 II 型的重要原因,针对 USH2A 基因的治疗成为了目前 Usher II 型治疗的主要研发方向。

 目前通过基因疗法治疗 USHER 综合征 II 型的研发方向主要有两个,一是通过病毒等方式,介导完整的 USH2A 基因在眼部重新表达。但是,USH2A
10 基因的蛋白序列非常长,大于 6000 个氨基酸,这使得其对应的编码区序列大于 18000 个碱基对。而通常的病毒载体的递送长度有限。通常情况下,慢病毒递送不超过 10000 个碱基对,而腺相关病毒递送不超过 4500 个碱基对。这使得通过病毒载体递送全长 USH2A 基因较难实现。因此,医疗和科研工作者们只能选择递送截短的 USH2A 基因。这样的方式,虽然可以一定程度
15 缓解病情的恶化,但由于患者依然缺乏正常的全长 Usherin,其无法完全实现 Usherin 原有的正常生理功能。

 另外一种常见的针对 USH2A 基因的治疗研发方向是通过外显子跨越 (Exon Skipping)实现。由于一部分 USH2A 基因的突变方式是某个外显子的移码 (Frame Shift)或者无义突变 (Nonsense Mutation)导致的,因此只要能在
20 RNA 剪接的过程中,特异性地跳过该外显子,就能使得该外显子之后的序列正常翻译。常见的做法,是导入一小段反义核苷酸 (Anti-Sense Oligo, ASO),从而在剪接过程中特异性地跳过所述翻译核苷酸靶向的外显子。这种方法与上一种方法类似,由于跳过了出现突变的外显子,最终仍然不能得到全长的 Usherin。

25 近年来,以 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)为首的基因组编辑技术正在飞速发展,并对生物以及医学诸多领域产生了深远的影响。许多科研工作者和生物技术公司也在致力于将该技术推上临床。2019 年 9 月,北京大学邓宏魁教授与其合作者发表文章¹¹次报道了利用 CRISPR 技术编辑干细胞并将其回输至患者,以治疗其艾滋病和白血病的
30 临床试验结果,为 CRISPR 技术在基因治疗方向的转化做出了巨大的贡献。

尽管 CRISPR 技术存在极大的应用前景，但该技术也存在一系列缺陷，导致该技术从科研阶段向临床治疗应用的转化步履维艰。问题之一便是 CRISPR 技术用到的核心作用酶：Cas9。基于 CRISPR 的 DNA 编辑技术，必须外源表达 Cas9 或拥有相似功能的其它核酸酶，从而造成了以下几个问题。首先，需要外源表达的核酸酶通常具有较大的分子量，这使得通过病毒载体将其递送至体内的效率急剧下降。其次，由于核酸酶的外源表达，使这种方法存在潜在的核酸酶脱靶可能，这将导致其应用中的潜在致癌风险。最后，外源表达的 Cas9 等类似核酸酶是从细菌中发现的，而非人类或哺乳动物天然存在的，这使其可能引起患者体内的免疫反应，这一方面可能会对患者自身造成损伤，另一方面也可能使外源表达的核酸酶被中和，从而失去应有的活性，影响治疗效果。

2017 年，麻省理工学院张锋教授及其课题组报道了一种名为 REPAIR (RNA Editing for Programmable A to I Replacement) 的 RNA 编辑技术，通过外源表达 Cas13-ADAR 融合蛋白及单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 可以实现靶向目标 RNA 的 A 到 I 的编辑，但是该方法同 CRISPR 技术一样，仍需要外源蛋白的表达。无法解决外源蛋白表达造成的问题。

2019 年 1 月，Thorsten Stafforst 课题组报道了名为 RESTORE (recruiting endogenous ADAR to specific trans for oligonucleotide-mediated RNA editing, Merkle et al., 2019) 的 RNA 单碱基编辑技术。RESTORE 能够摆脱对外源蛋白的依赖，但 RESTORE 技术需要在 IFN- γ 存在的前提下才能有较高的编辑效率，而 IFN- γ 是决定自体免疫发展和严重程度的关键因子，这使得该技术在医学领域的应用大打折扣。另一方面，RESTORE 技术中同样也用到一段向导 RNA，而其使用的向导 RNA 是化学合成的寡核苷酸，并且其合成的寡核苷酸需要人为引入大量的化学修饰以保证其稳定性。在这些化学修饰中，有一部分是非天然的修饰，使得该寡核苷酸可能存在毒性或免疫原性；还有一部分修饰会导致相同碱基链的不同构象，使得对于相同的 RNA 序列，可能有数十种不同的构象组合，这增加了其向细胞内递送的难度。

由于上述三种技术均存在一定的缺陷，并且鉴于 USH2A 基因本身的特殊性，因此上述三种技术均难以用于治疗 USHER 综合征 II 型。

2019 年 7 月，北京大学生命科学学院教授魏文胜课题组在 Nature Biotechnology 上发表文章，“Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs”，首次报道了新的核酸编辑技术：LEAPER (Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing of RNA, Qu et al., 2019)。一方面与 CRISPR 技术相比，该技术从原理上摆脱了对外源核酸酶过表达的依赖，而仅需要一段 RNA 作为向导，以将内源的核酸酶招募至所需编辑的位点，使得该技术在向医学领域转化的过程中，有更大的优势；另一方面该技术只在转录水平上实现了腺苷 A 到肌酐 I 的编辑（肌酐 I 在蛋白质翻译过程中会被识别为鸟酐 G），而不改变基因组中的序列，因此更加安全方便。LEAPER 技术不仅可以通过化学合成 RNA 完成，也可以通过腺相关病毒(AAV)、慢病毒等载体递送至患者发挥功能，这使得其递送手段的选择上更加灵活多变。

发明内容

本申请涉及基于 LEAPER 技术靶向编辑 USH2A 基因转录本中含有 G 到 A 突变的靶标 RNA 的方法，通过将用于编辑靶标 RNA 的腺苷脱氨酶招募 RNA(arRNA)或编码所述 arRNA 的构建体导入含有靶标 RNA 的细胞中，使所述 arRNA 能够招募作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 (ADAR) 以使靶标 RNA 中的靶标腺苷脱氨基。本申请通过对 LEAPER 技术的优化和改进，创造性地将其应用于 USH2A 基因转录本中含有 G 到 A 突变的靶标 RNA，例如具有 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变的 USHER 综合征II 相关靶标 RAN，通过对所述突变位点进行逆转修复，达到治疗 USHER 综合征II的目的。

本申请的目的是针对 Usher 综合征II型致病基因，例如针对人 USH2A 中占比最高的突变型 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)致病基因，提供一种全新的技术方案，无需导入过大的核酸或外源蛋白分子，便能使其精准地在靶标RNA上编辑突变位点,恢复 Usherin 蛋白的完整功能。

具体地，本申请涉及：

1. 一种基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中靶标 RNA 的方法,其中所述靶标 RNA 为 USH2A 基因 (例如人 USH2A 基因) 转录本中含有 G 到 A 突变的 RNA, 该方法包括:

5 将包含用于编辑靶标 RNA 的腺苷脱氨酶招募 RNA(arRNA)的构建体或编码所述 arRNA 的构建体导入所述细胞中, 其中所述 arRNA 包含与所述靶标 RNA 杂交的互补 RNA 序列, 并且其中所述 arRNA 能够招募作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 (ADAR) 以使靶标 RNA 中的靶标腺苷脱氨基。

2. 如项 1 中所述的方法, 其中所述靶标 RNA 为成熟 mRNA 或 mRNA 前体 (Pre-mRNA)。在一些实施方案中, 所述靶标 RNA 为 mRNA 前体
10 (Pre-mRNA)。

3. 如项 1 或 2 中所述的方法, 其中所述 arRNA 长约 151-61 nt、131-66 nt、121-66 nt、111-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt。本申请涵盖该数据范围内的任何自然数。

4. 如项 3 中所述的方法, 其中所述 arRNA 长度选自 66nt-131nt 中的任
15 意自然数。

5. 如项 1-4 中任一项所述的方法, 其中所述 arRNA 中靶向碱基距离 3' 端的长度 ≥ 7 nt, ≥ 10 nt、 ≥ 15 nt, 优选 16-55nt、20-50nt、25-45nt、25-35nt 或 25-30nt。本申请涵盖该数据范围内的任何自然数。

6. 如项 1-5 中任一项所述的方法, 其中所述 arRNA 中靶向碱基距离 3' 20 端的长度 ≥ 25 nt, ≥ 30 、 ≥ 35 、 ≥ 45 , 优选 46-90nt、50-85nt、55-80nt、60-75nt 或 65-70nt。本申请涵盖该数据范围内的任何自然数。

7. 项 1-6 中任一项的方法, 其中向所述 arRNA 引入与靶标序列中的靶标 A 配对的靶向碱基, 该靶向碱基的优选次序从高到低依次为 C、A、U 或 G。

25 在一些实施方案中, 向所述 arRNA 引入与靶标序列中的靶标 A 配对的靶向碱基为 C。在一些实施方案中, 向所述 arRNA 引入与靶标序列中的靶标 A 配对的靶向碱基为 A。在一些实施方案中, 向所述 arRNA 引入与靶标序列中的靶标 A 配对的靶向碱基为 U。

8. 如项 1-7 中任一项的方法, 其中所述靶标 RNA 为包含转录有 NM_206933.2(USH2A)_c.11864 G>A (p.Trp3955Ter) 突变位点的人 USH2A 基因 RNA。

5 9. 如项 1-8 中任一项所述的方法, 其中所述 arRNA 选自: SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4。

10 10. 如项 1-9 中任一项所述的方法, 其中所述 arRNA 选自: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9。

11. 如项 1-10 中任一项所述的方法, 其中所述构建体为线性核酸、病毒载体、或质粒。

15 12. 如项 11 中所述的方法, 其中所述病毒为腺相关病毒 (AAV) 或慢病毒。

13. 如项 12 中所述的方法, 其中所述 AAV 载体包装入 AAV2、AAV5 或 AAV8 衣壳后通过侵染导入所述细胞中。

14. 如项 13 中所述的方法, 所述 AAV 载体包装入 AAV8 衣壳后通过侵染导入所述细胞中。

20 15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的方法, 其中所述细胞为哺乳动物视神经细胞或听神经细胞。

16. 一种用于靶向编辑 USH2A 基因转录本中含有 G 到 A 突变的靶标 RNA 的 arRNA 或其编码序列, 所述 arRNA 包含选自如下的序列或由选自如下的序列组成: SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、或 SEQ ID NO: 4。

17. 包含项 16 的 arRNA 的构建体或递送体。

18. 如项 17 的构建体或递送体，其为质粒、病毒、脂质体、或脂质纳米颗粒。

19. 如项 18 的构建体或递送体，其为腺相关病毒（AAV）或慢病毒。

20. 如项 19 的构建体或递送体，其所述病毒为 AAV2、AAV5 或 AAV8。

5 在一些实施方案中，本申请提供了包含上述 arRNA、或包含上述构建体或递送体的组合物、制剂、试剂盒或生物制品。

21. 通过项 1-15 中任一项的方法编辑获得的细胞。

22. 一种治疗个体中 Usher II 型综合征的方法，包括使用项 1-15 中任一项所述的方法校正所述个体的细胞中与 Usher II 型综合征有关的 G 到 A 的突
10 变。

23. 如项 22 中所述的方法，其包括将如项 16 中所述的 arRNA 或如项 17-20 中任一项所述的构建体或递送体导入受试者。

24. 项 23 的方法，其中将如项 16 中所述的 arRNA 或如项 17-20 中任一项所述的构建体或递送体导入受试者视网膜下腔中。

15 本申请提供的基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中转录有包含 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的靶标 RNA 的方法，在治疗 USHER 综合征II型方面具有明显的优势：

首先，LEAPER 技术只需要导入短 RNA，可以限制在 151、131、121、111 核苷酸以内，这使得其对导入片段长度的要求远远小于腺相关病毒的递
20 送长度上限。因此，与直接通过导入 USH2A 基因相比，该技术非常适合应用腺相关病毒载体。而由于眼部为免疫豁免区域，对腺相关病毒的清除能力很差，这使得腺相关病毒可以在眼部停留很长时间。此外，发挥功能的细胞均为神经细胞，正常情况下这些细胞也不会分裂，这使得腺相关病毒可以长期停留在这些细胞中，即不被免疫清除，也不会因为细胞分裂导致病毒被稀
25 释。更关键的是，相比于此前的常用手段，本申请的技术方案既不需要人为截短 Usherin，也不需要跨过突变的外显子，从而可以得到全长的正常的 Usherin。因此，理论上，病患通过该技术治疗后，可以得到与常人无异的正常 Usherin。由于 USHER 综合征II型是隐性遗传病，这说明，通常只要有部分正常蛋白可以发挥功能，即可获得正常的功能。本申请通过实验数据证明，
30 本申请的技术方案可以校正 USHER 综合征II型相关基因转录本（例如含有

NM_206933.2(USH2A)_c.11864 G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的人USH2A基因转录本)中的G>A突变,实现对USHER综合征II型的治疗目的。

附图说明

- 5 图1显示了Usher综合征II型病人夜盲症病情进展示意图¹³。
图2显示了138例Usher病人致病基因突变分布图⁷。
图3显示了USH2A基因突变类型分析图⁷。
图4显示了反映USH2A基因突变位点的编辑效率的报告体系设计示意图。
- 10 图5显示了USH2A基因突变位点的编辑效率的评判指标示意图。
图6显示了不同长度的arRNA编辑效率的测试结果。
图7显示了报告体系中假阳性细胞的FITC通道强度。
图8显示了LEAPER技术中arRNA长度与编辑效率的关系¹⁰。
图9显示了arRNA从5'以及3'向中间截短后的编辑效率测试结果。
- 15 图10显示了固定arRNA 3'长度为25nt并从5'逐渐截短后的编辑效率测试结果。
图11显示了靶向碱基位置对编辑效率的影响。
图12显示了同批次arRNA编辑效率的重复测试结果的比较。图中293T表示未侵染报告体系的293T;仅报告子体系为侵染有报告体系的293T;
20 Opti-DMEM为在转染中不加入RNAi MAX的培养基空白对照;仅递送载体对照为仅有RNAi MAX的对照,对应此前测试中的对照(NC)孔;随机序列RNA为不与人类基因组匹配的91nt随机RNA序列
(uaauccugaauaucgcgcaauucccagcagagaacaucgcggugugaacgucuuuuauaccgggcag
guauagcugaaaucagcguggc (SEQ ID NO: 35))。
- 25 图13显示了同批次arRNA通过二代测序获得的编辑效率重复测试结果的比较。
图14显示采用玻璃体内注射时,通过AAV2和AAV5递送的arRNA在体内的编辑效率。
图15显示采用视网膜下腔注射时,通过AAV5和AAV8递送的arRNA
30 在体内随时间变化的编辑效率。

发明详述

本申请针对 Usher 综合征II型致病基因 USH2A 中占比最高的突变型 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter), 以创造一种全新的技术方案, 在不导入过大的核酸或外源蛋白分子条件下, 通过 AAV 精准地在靶标 RNA 上编辑突变位点, 恢复 Usherin 蛋白的完整功能, 并在相当长的一段时间内持续保持 Usherin 蛋白的功能。

为满足上述目的, 本申请提供了一种基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中转录有包含 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的靶标 RNA 的方法 (下文简称突变编辑方法)、一种靶向 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的 arRNA、包含所述 arRNA 的构建体、一种经过所述突变编辑方法制备的细胞、一种用于编辑细胞中的靶标 RNA 的试剂盒、一种治疗个体中由于 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变导致的疾病的方法 (下文简称治疗方法)、以及一种用于所述突变编辑方法或所述治疗方法的制剂。

定义

RNA 编辑是指存在于真核细胞中的一种天然过程, RNA 编辑是在 DNA 转录之后, 蛋白质翻译之前在 RNA 水平上发生的由碱基 A(腺嘌呤)到 I(次黄嘌呤)的编辑, 次黄嘌呤在翻译的过程中被识别为 G, RNA 中 A 到 I 的编辑使转录组多样化。通过位点特异和精确改变 RNA 分子的方式将 RNA 的全部数量增加几倍。这种编辑是被 ADAR(Adenosine Deaminase Acting on RNA)蛋白酶催化产生的, 被称为位点定向 RNA 编辑。编辑可以发生的编码区包括内含子和外显子序列, 也可以发生在非编码区序列, 编码区的编辑可以重新定义蛋白质编码序列。

如本文所用, “LEAPER 技术”即通过使用工程化 RNA 募集内源性 ADAR 进行 RNA 编辑的技术, 是指如 WO2020074001A1 中所报道的 RNA 编辑技术。所述工程化 RNA 即腺苷脱氨酶募集 RNA (arRNA), 如本文所用, 是指能通过招募 ADAR 或某些包含 ADAR 结构域的复合物在 RNA 中使靶标腺苷脱氨酶的 RNA。arRNA 是向导 RNA 的一种, 在本申请中“向导 RNA”

是指可通过与靶标 RNA 互补杂交，招募可修饰靶标碱基的酶对靶标碱基进行修饰。所述向导 RNA 包含 arRNA 以及用于 CRISPR 等其他编辑系统的 gRNA。

如本文所用，术语“腺苷脱氨酶 (ADAR)”是指是一类在真核生物（包括人等哺乳动物）各组织中广泛表达的腺苷脱氨酶，能够催化 RNA 分子中腺苷 A 到肌苷 I 的转换。而 I 在真核生物蛋白质合成过程中，通常被当做 G 进行翻译。

如本文所用，核酸的“互补”是指一条核酸通过传统的 Watson-Crick 碱基配对与另一条核酸形成氢键的能力。百分比互补性表示核酸分子中可与另一核酸分子形成氢键(即，Watson-Crick 碱基配对)的残基的百分比(例如，10 个中的约 5、6、7、8、9、10 个分别为约 50%，60%，70%，80%，90%和 100%互补)。“完全互补”是指核酸序列的所有连续残基与第二核酸序列中相同数量的连续残基形成氢键。如本文所用，“基本上互补”是指在约 40、50、60、70、80、100、150、200、250 或更多个核苷酸的区域内，至少约 70%，75%，80%，85%，90%，95%，97%，98%，99%或 100%中的任何一个的互补程度，或指在严格条件下杂交的两条核酸。对于单个碱基或单个核苷酸，按照 Watson-Crick 碱基配对原则，A 与 T 或 U、C 与 G 或 I 配对时，被称为互补或匹配，反之亦然；而除此以外的碱基配对都称为不互补或不匹配。

“杂交”是指其中一种或多种多核苷酸反应形成复合物的反应，所述复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键稳定。所述氢键可以通过 Watson Crick 碱基配对，Hoogsteen 结合或以任何其他序列特异性的方式发生。能够与给定序列杂交的序列称为给定序列的“互补序列”。

如本文所用，术语“导入”是指将核酸、蛋白等生物大分子通过某些途径从细胞膜外引入细胞膜内。所述“导入”包括点转染、脂质体转染、脂质-纳米颗粒递送等方式。

如本文所用，术语“电转染”即电穿孔转染技术，其通过电场作用于细胞几微秒到几毫秒之后，在细胞膜上暂时形成小孔或开口，把大分子如 DNA 等递送至细胞并最终进入细胞核的技术。

如本文所用，术语“脂质体转染 (Lipo)”是指以脂质体作为体内和体外输送载体的转染技术。脂质体包括中性脂质体和阳离子脂质体，其中中性脂

质体是利用脂质膜包裹大分子，例如核酸，借助脂质膜将所述大分子递送至细胞膜内；阳离子脂质体带正电荷，其转载的大分子并没有预先包埋其中，而是由于所述大分子本身带负电荷而自动结合到带正电的脂质体上，形成大分子-阳离子脂质体复合物，从而吸附到带负电的细胞膜表面，经过内吞被递送入细胞。

如本文所用，术语“脂质-纳米颗粒 (LNP) 递送”是指将大分子，例如核酸、蛋白质等物质通过脂质纳米颗粒向细胞内进行跨膜递送。其中，脂质纳米颗粒是指由两相混合合成的颗粒包括含有可电离脂质、辅助磷脂、胆固醇和 PEG 脂的乙醇相和含有核酸、蛋白质等大分子的酸性水相。例如，包裹有 RNA 的 LNP 可通过内吞进入细胞质内。

在本文中，NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变是指人USH2A 基因中对应于 NM_206933.2(USH2A)基因转录本 11864 位的 G 至 A 的突变，所述突变导致所述转录本翻译的肽链的 3955 位色氨酸 (Trp) 编码序列转变为终止密码子，使得最终翻译的氨基酸缺失了 3955 位之后的全部氨基酸，从而丧失 Usherin 的蛋白活性。发生这一突变的患者会出现视锥细胞和视杆细胞的退行性死亡，最终导致失明。而本申请中的方案可通过在转录水平逆转这一突变，恢复 Usherin 蛋白的活性。在本申请的一些实施方案中 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点又被称为 USH2A 致病位点。

如本文所用，术语“靶标 RNA”是指是指待编辑的目标 RNA，其由 USH2A 基因转录而成，并包含 G 至 A 的突变。靶标 RNA 可以是成熟 mRNA 或 mRNA 前体，在本申请中，更优选 mRNA 前体。在一些实施方案中，所述“靶标 RNA”为转录有包含 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的 RNA。所述“靶标 RNA”中由 G 至 A 的突变位点转录形成的 A 碱基被称为“靶标腺苷”或“靶标 A”。arRNA 中与“靶标 A”相对的碱基称为“靶向碱基”。

如本文所使用，术语“AAV”是指“腺相关病毒”或“腺相关病毒载体”，在本文中，如非特别说明，“AAV”、“腺相关病毒”及“腺相关病毒载体”可以互换使用。AAV 属于微小病毒科，为无包膜的单链线状 DNA 病毒，利用腺相关病毒可以将外源基因转入动物组织和细胞中。所述转入的外源基因可以游

离核酸的状态较为稳定地存在于宿主的基因组基因之外并进行表达。腺相关病毒血清型众多(12种),包括例如:AAV1、AAV2、AAV5、AAV8和AAV9等。如本文所用,“患者”或“受试者”可互换使用,在本文中如非特别指出,本文所述“患者”或“受试者”均指基因组中带有
5 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A(p.Trp3955Ter)突变的人类患者。

如本文所用,术语“递送”是指将核酸、蛋白等生物大分子通过某些途径从细胞膜外引入细胞膜内。所述“递送”例如电转染、脂质体转染、脂质-纳米颗粒递送、病毒递送、外泌体递送等方式。本文中,将所述生物大分子及包裹所述生物大分子或与所述生物大分子连接以促进所述生物大分子通过
10 细胞膜进入细胞内的物质的结合体称为“递送体”。例如包装了核酸分子的脂质体、LNP、外泌体、病毒颗粒等。

如本文所用,术语“构建体”是指包含某一核酸序列的核酸载体,所述核酸载体可以是线性核酸分子、质粒或病毒载体等。所述核酸分子可以是单链也可以是双链分子。所述特定的核酸序列可以是DNA序列也可以是RNA序列。
15 在一些实施方案中,所述核酸序列不经过转录、翻译或表达而直接发挥其功能。在一些实施方案中,所述核酸序列为DNA序列,其经过转录形成RNA后以RNA分子形式发挥功能。在一些实施方案中,所述核酸序列为RNA,其经过翻译后以多肽或蛋白质的形式发挥作用。在一些实施方案中,所述核酸序列为DNA,其经过转录和翻译步骤形成蛋白质后以蛋白质的形式
20 发挥功能。所述构建体可以通过包装为病毒、脂质纳米颗粒或外泌体等形式进入靶标细胞,亦可以通过电转化、显微注射、化学转化等方式进入靶标细胞。

本申请所用术语“修饰”是指通过化学或生物学方法,例如基因工程方法改变核酸或蛋白的组成或结构,从而使所述核酸或蛋白的一项或多项特性或
25 功能发生改变。在本申请的一些实施方案中,通过对arRNA的修饰,使其在导入细胞后更稳定。在本文中,靶向碱基距离3'端的长度是指靶向碱基的3'最近邻碱基至3'最末端碱基的所有碱基个数;所述靶向碱基距离5'端的长度是指靶向碱基的5'最近邻碱基至5'最末端碱基的所有碱基个数。

除非本文另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明
30 所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。

突变编辑方法

本申请提供了一种基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中靶标 RNA 的方法，其中所述靶标 RNA 为 USH2A 基因转录本中含有 G 到 A 突变的 RNA，该方法包括：

- 5 将包含用于编辑靶标 RNA 的腺苷脱氨酶招募 RNA(arRNA)的构建体或编码所述 arRNA 的构建体导入所述细胞中，其中所述 arRNA 包含与所述靶标 RNA 杂交的互补 RNA 序列，并且其中所述 arRNA 能够招募作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 (ADAR) 以使靶标 RNA 中的靶标腺苷脱氨基。

10 在一些实施方案中，所述靶标 RNA 为 mRNA 或 mRNA 前体 (Pre-mRNA)，优选地，为 Pre-mRNA。

在一些实施方案中，其中所述 arRNA 长度 > 51nt，优选地 > 61nt，更优选地 ≥ 65nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 长约 151-61 nt、131-66 nt、121-66 nt、111-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 长度选自 66nt-131nt 中的任意自然数，例如 66nt、67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、
15 72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、78nt、79nt、80nt、83nt、85nt、88nt、91nt、96nt、98nt、100nt、105nt、108nt、100nt、105nt、110nt、115nt、120nt、125nt、130nt 等。在可保持转染效率相同的情况下，优选地，所述 arRNA 的长度为约 71nt，例如：66nt-76nt 中的任一自然数个 nt。

20 在一些实施方案中，所述 arRNA 中靶向碱基距离 3' 端的长度 > 5nt，例如 ≥ 7nt、≥ 10nt、≥ 15nt，例如 16-55nt、20-50nt、25-45nt、25-35nt 或 25-30nt 中的任意自然数个 nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 中靶向碱基距离 5' 端的长度 ≥ 25nt，例如 ≥ 30、≥ 35、≥ 45，例如 46-90nt、50-85nt、55-80nt、60-75nt 或 65-70nt 中的任意自然数个 nt。

25 在一些实施方案中，当所述 arRNA 与靶标 RNA 互补杂交时，所述 arRNA 与靶标 RNA 上的靶标碱基相对的靶向碱基优选次序从高到低依次为 C、A、U 或 G。即在通常情况下，对于长度及靶向碱基以外的序列均相同，而靶向碱基分别为 C、A、U、G 的 arRNA，其编辑效率依次降低，因此最优选地，所述 arRNA 的靶向碱基为 C，其次为 A，再其次为 U，最次为 G。

30 在一些实施方案中，所述靶标 RNA 为包含转录有 NM_206933.2(USH2A)_c.11864 G>A (p.Trp3955Ter) 突变位点的 RNA。在一

些实施方案中，所述 arRNA 选自：SEQ ID NO：23、SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：9、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：4。优选地，在一些实施方案中，所述 arRNA 选自：SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8 或 SEQ ID NO：9，更优选地为 SEQ ID NO：8 或 SEQ ID NO：9。

在一些实施方案中，所述构建体选自线性核酸、病毒载体、或质粒。所述线性核酸包括单链核酸，例如单链 RNA、单链 DNA；以及双链核酸，例如双链 DNA、双链 RNA。在一些实施方案中，所述线性核酸可以经过化学修饰，例如 2'-O-Me 修饰和/或硫代磷酸酯键修饰。在一些特定的实施方案中，所述线性核酸由体外化学合成。在一些特定的实施方案中，所述线性核酸由细胞或机体合成后经分离提取获得。在一些实施方案中，所述构建体为腺相关病毒（AAV）载体或慢病毒载体。在一些实施方案中，所述其中所述 AAV 载体包装入 AAV2、AAV5 或 AAV8 衣壳后通过侵染导入所述细胞中。在一些实施方案中，所述 AAV 载体包装入 AAV8 衣壳后通过侵染导入所述细胞中。在一些实施方案中，所述构建体将所述 arRNA 编码序列插入细胞基因组中长期表达。在一些实施方案中，所述构建体使所述 arRNA 编码序列作为游离核酸存在于细胞基因组外并进行表达。

在一些实施方案中，所述细胞为真核细胞。在一些实施方案中，所述细胞为哺乳动物细胞。在一些实施方案中，所述细胞为神经细胞。在一些实施方案中，所述神经细胞为感觉神经细胞。在一些实施方案中，所述感觉神经细胞选自视神经细胞及听神经细胞。在一些实施方案中，所述视神经细胞为视锥细胞和/或视杆细胞。

在一些实施方案中，所述导入为电转染、脂质体转染、脂质-纳米颗粒递送或病毒侵染。在本申请的实施方案中，优选地为病毒侵染。例如通过将编码 arRNA 的病毒构建体包裹入病毒衣壳形成具有感染性的病毒颗粒，例如 AAV 或慢病毒颗粒，并通过所述病毒颗粒对细胞的侵染将所述 arRNA 的编码序列导入细胞中。

功能 arRNA

本申请同时还提供了一种 arRNA(下文简称为功能 arRNA),所述 arRNA 可用于如前所述的基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中靶标 RNA 的方法。在一些实施方案中,所述方法为基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中转录有包含 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的靶标 RNA 的方法。所述 arRNA 包含与所述靶标 RNA 杂交的互补 RNA 序列,并且其中所述 arRNA 能够招募作用于 RNA 的腺苷脱氨酶(ADAR)以使靶标 RNA 中的靶标腺苷脱氨基。在一些实施方案中,所述 arRNA 靶向的靶标 RNA 选自 mRNA 或 Pre-mRNA,优选地为 Pre-mRNA。

在一些实施方案中,所述 arRNA 长度>51nt,优选地>61nt,更优选地>65nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 长约 151-61 nt、131-66 nt、121-66 nt、111-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 长度选自 66nt-131nt 中的任意自然数,例如 66nt、67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、78nt、79nt、80nt、83nt、85nt、88nt、91nt、96nt、98nt、100nt、105nt、108nt、100nt、105nt、110nt、115nt、120nt、125nt、130nt 等。在可保持转染效率相同的情况下,优选地,所述 arRNA 的长度为约 71nt,例如: 66nt-76nt 中的任一自然数个 nt。

在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度>5nt,例如≥7nt、≥10nt、≥15nt,例如 16-55nt、20-50nt、25-45nt、25-35nt 或 25-30nt 中的任意自然数个 nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度≥25nt,例如≥30、≥35、≥45,例如 46-90nt、50-85nt、55-80nt、60-75nt 或 65-70nt 中的任意自然数个 nt。

在一些实施方案中,当所述 arRNA 与靶标 RNA 互补杂交时,所述 arRNA 与靶标 RNA 上的靶标碱基相对的靶向碱基优选次序从高到低依次为 C、A、U 或 G。即在通常情况下,对于长度及靶向碱基以外的序列均相同,而靶向碱基分别为 C、A、U、G 的 arRNA,其编辑效率依次降低,因此最优选地,所述 arRNA 的靶向碱基为 C,其次为 A,再其次为 U,最次为 G。

在一些实施方案中,所述 arRNA 选自: SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO:

8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4。优选地，在一些实施方案中，所述 arRNA 选自：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9，更优选地为 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9。在一些实施方案中，所述 arRNA 引入与靶标序列中的靶标 A 配对的靶向碱基编辑效率从大到小依次为 C、A、U、G，即：对于长度及靶向碱基以外的序列均相同，而靶向碱基分别为 C、A、U、G 的 arRNA，其编辑效率依次降低，因此最优选地，所述 arRNA 的靶向碱基为 C，其次为 A，再其次为 U，最后为 G。

功能构建体

10 本申请还提供了一种编码 arRNA 的构建体（下文简称为功能构建体），其中所述功能构建体可以用于如前所述的基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中靶标 RNA 的方法。在一些实施方案中，所述方法为基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中转录有包含 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter) 突变位点的靶标 RNA 的方法。其中，所述 arRNA 包含如前所述的功能
15 arRNA。

在一些实施方案中，所述构建体选自线性核酸、病毒载体、或质粒。所述线性核酸包括单链核酸，例如单链 RNA、单链 DNA；以及双链核酸，例如双链 DNA、双链 RNA。在一些实施方案中，所述线性核酸可以经过化学修饰，例如 2'-O-Me 修饰和/或硫代磷酸酯键修饰。在一些特定的实施方案
20 中，所述线性核酸由体外化学合成。在一些特定的实施方案中，所述线性核酸由细胞或机体合成后经分离提取获得。在一些实施方案中，所述构建体为腺相关病毒（AAV）载体或慢病毒载体。在一些实施方案中，所述 AAV 载体包装入 AAV2、AAV5 或 AAV8 以形成可感染细胞的病毒颗粒，所述病毒颗粒通过感染细胞将所述 AAV 载体导入细胞中。优选地，在一些实施方案
25 中，所述构建体包装入 AAV8。在一些实施方案中，所述构建体将所述 arRNA 编码序列插入细胞基因组中长期表达。在一些实施方案中，所述构建体使所述 arRNA 编码序列作为游离核酸存在于细胞基因组外并进行表达。

本申请提供了包含如前所述的功能 arRNA 的构建体，选自线性核酸、质粒、病毒载体。本申请还提供了包含所述构建体的递送体，所述递送体选
30 自病毒颗粒、脂质体、脂质纳米颗粒和外泌体。

细胞

本申请还提供了一种细胞，其可通过如前所述的基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中靶标 RNA 的方法进行编辑和制备。在一些实施方案中，所述细胞为源自具有 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的患者的细胞，通过如前所述的突变编辑方法可将所述突变位点转录的靶标 RNA 中的靶标 A 脱氨基形成 I，在后续的翻译过程中将被识别为 G 而恢复 Usherin 蛋白完整的功能。在一些实施方案中，所述患者的细胞为干细胞或诱导多能干细胞，所述干细胞或其诱导分化的细胞可以移植至患者特定位置。在一些实施方案中，所述干细胞在体外通过诱导分化为健康的视锥和/或视杆细胞后再移植回患者眼部特定位置发挥功能。

试剂盒

本申请还提供了一种用于编辑细胞中的靶标 RNA 的试剂盒，其包含如前所述的功能 arRNA 或如前所述所述的编码 arRNA 的功能构建体。在一些实施方案中，所述试剂盒包含可以用于编辑 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变的核酸、质粒、基因组、细胞等。在一些实施方案中，所述试剂盒还进一步包含适于溶解所述功能 arRNA 或所述功能构建体的溶剂。在一些实施方案中，所述试剂盒还进一步包含使用说明，以告知使用者所述试剂盒中包含的各种成分及其含量，和/或所述试剂盒的使用方法。

治疗方法

本申请同时还提供了一种治疗个体中由于 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变导致的疾病的方法（下文简称治疗方法），包括使用如前所述的基于 LEAPER 技术靶向编辑细胞中转录有包含 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的靶标 RNA 的方法校正个体细胞中与 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点相关的靶标 RNA 突变。在一些实施方案中，所述疾病包括 Usher II 型综合征。

在一些实施方案中，所述治疗方法包含将用于编辑靶标 RNA 的 arRNA 或编码所述 arRNA 的构建体注射入受试者视网膜下腔或玻璃体。在一些优选的实施方案中，所述治疗方法包含将用于编辑靶标 RNA 的 arRNA 或编码

所述 arRNA 的构建体注射入受试者视网膜下腔。在一些实施方案中，所述治疗仅需对受试者进行一次注射。在一些实施方案中，所述治疗需要每隔一段时间对受试者进行一次注射。在一些特定的实施方案中，所述治疗需要每隔 ≥ 2 个月对受试者进行一次注射，例如每隔1年、10年、20年、30年等对受试者进行一次注射。

制剂

本申请还进一步提供了一种制剂，其包含如前所述的功能 arRNA 或如前所述所述的编码所述 arRNA 的功能构建体或其递送体。在一些实施方案中，所述制剂包含所述功能 arRNA 或功能构建体或其递送体以及转染试剂。在一些特定的实施方案中，所述功能 arRNA 或功能构建体包裹在脂质体中。在一些特定的实施方案中，所述功能 arRNA 或功能构建体经制备形成脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，所述制剂包含的功能构建体为病毒载体，例如 AAV 或慢病毒载体，所述制剂包含活体病毒或病毒冻干粉，因此所述制剂还进一步包括适宜的稳定剂，例如人血白蛋白、明胶、蔗糖等。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容，均属于本发明的保护范围。下面结合具体实施例，对本发明的技术方案作进一步的详述，但本发明并不限于以下实施例。如未特别指出，以下所涉及的试剂均可通过商业途径购得。为简便起见，部分操作未详述操作的参数、步骤及所使用的仪器，应当理解，这些都是本领域技术人员所熟知并可重复再现的。

实施例

实施例 1：报告体系的构建

本申请主要研究 LEAPER 技术对 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)突变位点的修复。因此，需要一个简单可用的，可以反应该位点编辑效率高低的报告体系。由于 USH2A 基因致病突变位点 NM_206933.2(USH2A)_c.11864G>A (p.Trp3955Ter)导致的原 TGG 密码子至 TAG 密码子的突变为无义突变，突变后的 mRNA 序列在翻译时，会停止在

新形成的 TAG 终止密码子处，导致其后序列无法继续翻译成蛋白。利用以上特点，本申请设计了如图 4 所示的报告体系。所述报告体系使用慢病毒载体，由 CMV 启动子驱动如图 4 所示的 mRNA。该段 mRNA 主要包含以下部分：1) mCherry 红色荧光蛋白序列，该蛋白将稳定表达，无论是否经过编辑均会正常翻译，因此红色荧光强度可以作为内部参照；2) USH2A 基因突变位点以及其两侧相邻的各 100 个碱基对，该区域为疾病相关序列；(2) 中的序列取自 NM_206933.2 序列的第 12203 到 12403 位，共 201 个碱基对，经过对 USH2A c.11864 位点进行 G 到 A 的点突变，使得该序列中存在阅读框 (In-frame) 内的 TAG 终止密码子，从而在翻译过程中会在此停止翻译)；3) GFP 绿色荧光蛋白序列，该蛋白可以发绿色荧光，并在流式细胞仪中可以经 FITC 通道检测荧光强度（由于 GFP 序列与 USH2A 相关序列位于同一阅读框且位于其下游，若 USH2A 相关序列中的 TAG 终止密码子未通过 LEAPER 技术进行编辑，则其中的 TAG 终止密码子会导致后续 GFP 无法被正常翻译，而不会出现绿色荧光；若 USH2A 相关序列中的 TAG 成功通过 LEAPER 技术进行编辑，形成 TIG 密码子，则该终止密码子消失，后续 GFP 翻译继续，从而出现绿色荧光；4) 在 mCherry 下游以及 GFP 上游插入 P2A、T2A 序列，在翻译时，这两个序列会由于空间位阻导致其中的一个肽键无法正常形成，因而会在翻译过程中将 mCherry、中间的 USH2A 相关序列的 201 个碱基对以及 GFP 三个部分分开，从而使得中间插入的 USH2A 相关序列不会对 mCherry 以及 GFP 功能产生影响。

以上序列全序列通过本领域常规技术进行体外合成，具体序列为如 SEQ ID NO:1 所示。该序列通过 CMV 启动子后的多克隆位点克隆至 pCDH-CMV 载体载体。pCDH-CMV 载体质粒由 Kazuhiro Oka 惠赠 (Addgene plasmid # 72265; <http://n2t.net/addgene:72265>; RRID: Addgene_72265)。构建好的质粒通过二代慢病毒包装体系(pCAG-VSVG 由 Arthur Nienhuis & Patrick Salmon 惠赠，Addgene plasmid # 35616；<http://n2t.net/addgene:35616>；RRID: Addgene_35616; pCMVR8.74 由 Didier Trono 惠赠，Addgene plasmid # 22036；<http://n2t.net/addgene:22036>；RRID: Addgene_22036)包装成慢病毒并侵染 293T 细胞。细胞侵染 48h 后使用流式细胞仪分选 mCherry 阳性的细胞群，该细胞群为最终的报告体系细胞。其中，调节荧光阈值直至未侵染的 293T

细胞或未处理的对照报告体系中荧光强度高于阈值的细胞数刚好小于 1% (尽量接近 1%) 时为止, 此时荧光强度高于荧光阈值的细胞即被认为是阳性细胞。对于报告体系的测试, 如图 5 所示通常有两个评价指标: 1. GFP 阳性细胞比例 (缩写为 %GFP); 2. GFP+ 细胞平均荧光强度 (MFI, Mean Fluorescent Intensity)。其中, GFP 阳性细胞比例, 即: GFP 强度超过本申请所定义的 GFP 阳性阈值的细胞的比例。%GFP 的高低表示发生编辑的细胞数量。而在 GFP 阳性的细胞中, 由于不同细胞的荧光强度不同, 因此对报告体系编辑效率的测试还进一步包括了 MFI。由于每孔细胞均有近似的作为内参的红色荧光强度, 因此认为 GFP% 越高以及 MFI 越高, 则代表该孔细胞的

10 USH2A 致病突变位点在测试条件中被编辑的程度越高。

SEQ ID NO: 1: 其中, 小写字母序列表示疾病相关序列, 同一种碱基的大小写字母不代表碱基类型的差异。

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAA
GGTGACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCC
15 GCCCTACGAGGGCAGCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCG
CCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGA
CATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTC
GAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTAC
AAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATG
20 GGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAG
CAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGC
CAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCA
CAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCGCCACTCCACGGCGG
CATGGACGAGCTGTACAAGGCCACGAACCTTCTCTGTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGA
25 AAACCCCGGTCCTGCTAGCgcccctgaatttatggatgaaggagacacccctgaggcctttcacactctacgaatatcgggtcagagcctgta
actccaagggttcagtgagagctgtgtggtcattaacacaaactctggaagctccacctcaagattttccagctccttggtcgaagccacgagtgctcattcag
ttctgtgaattggacaaagccaGCGGCCGCTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGG
AGAATCCCCGGCCCTTCCGGAATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCTGCCCCCATGGAGATCGAGT
GCCGCATCACCGGCACCCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGGAGAGGGCACCC
30 CCAAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTACGCCCT

ACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGCTACGA
GAACCCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAACACCCGCATCGAGAAGTACGA
GGACGGCGGCGTGCTGCACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAGGCCGGCCGCGTGATCGGCGA
CTTCAAGGTGGTGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCGACAAGATCATCCGC
5 AGCAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGGGCAGCTTCGCC
CGCACCTTCAGCCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTTCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTCA
AGAGCGCCATCCACCCCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCCATGTTTCGCCTTCCGCCGCGTG
AGGAGCTGCACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCCA
TCGCCTTCGCC

10 **实施例 2：针对致病突变位点的 arRNA 优化**

由于 LEAPER 技术无需向细胞内导入任何外源蛋白，本实施例在测试
LEAPER 对致病位点的编辑时，只需向报告体系细胞中导入 arRNA。本实
例中的 arRNA 由体外合成，其序列见下表 1。序列以两种方式命名，其中“名
称”根据序列的长短或截短长度进行命名，“统一化名称”以 X-C-Y 进行命名，
15 其中 X 代表 5'端的长度，Y 代表 3'端的长度，C 为靶向碱基 C。例如 111nt
命名为 55-C-55 则表示其 5'及 3'短的长度均为 55nt。

表 1. 实施例 2 所用 arRNA 序列汇总

名称	统一化名称	RNA 序列
111nt	55-C-55	SEQ ID NO: 2: agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguuuaugaccacagacucuccacugaac ccuuggaguuacaggcucugacccgauauucguagag
91nt	45-C-45	SEQ ID NO: 3: gcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguuuaugaccacagacucuccacugaacccuuggaguu acaggcucugacccgau
71nt	35-C-35	SEQ ID NO: 4: cuuagguggagcuuccagaguuuuguuuaugaccacagacucuccacugaacccuuggaguuacaggcu
51nt	25-C-25	SEQ ID NO: 5: agcuuccagaguuuuguuuaugaccacagacucuccacugaacccuugga
3-10	55-C-45	SEQ ID NO: 6: agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguuuaugaccacagacucuccacugaac

		ccuuggaguuacaggcucugacccgau
3-20	55-C-35	SEQ ID NO: 7: agcccaaggagcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaac ccuuggaguuacaggcu
3-30	55-C-25	SEQ ID NO: 8: agcccaaggagcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaac ccuugga
3-40	55-C-15	SEQ ID NO: 9: agcccaaggagcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacug
3-50	55-C-5	SEQ ID NO: 10: agcccaaggagcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacaga
5-10	45-C-55	SEQ ID NO: 11: gcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaacccuuggaguu acaggcucugacccgauauucguagag
5-20	35-C-55	SEQ ID NO: 12: cuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaacccuuggaguuacaggcucug acccgauauucguagag
5-30	25-C-55	SEQ ID NO: 13: agcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgauauu cguagag
5-40	15-C-55	SEQ ID NO: 14: guuuguuuaugaccacagacuccacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgauauucguagag
5-50	5-C-55	SEQ ID NO: 15: augaccacagacuccacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgauauucguagag
50-C-25	50-C-25	SEQ ID NO: 17: aaggagcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaacccuug ga
45-C-25	45-C-25	SEQ ID NO: 18: gcugggaaaucuuagguggagcuuccagaguuuguuuaugaccacagacuccacugaacccuugga
40-C-25	40-C-25	SEQ ID NO: 19:

		aaaauuugagguggagcuuccagaguuuuguuuauugaccacagacucuccacugaacccuugga
35-C-25	35-C-25	SEQ ID NO: 20:
		cuugagguggagcuuccagaguuuuguuuauugaccacagacucuccacugaacccuugga
30-C-25	30-C-25	SEQ ID NO: 21: gguggagcuuccagaguuuuguuuauugaccacagacucuccacugaacccuugga
50-C-40	50-C-40	SEQ ID NO: 23:
		aaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuuuguuuauugacCacagacucuccacugaacccuug
		gaguucaggcucugac
60-C-30	60-C-30	SEQ ID NO: 25:
		gcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuuuguuuauugacCacagacucuccac
		ugaacccuuggaguuc
65-C-25	65-C-25	SEQ ID NO: 26:
		ucguggcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuuuguuuauugacCacagacu
		cuccacugaacccuugga
70-C-20	70-C-20	SEQ ID NO: 27:
		agcacucguggcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuuuguuuauugacCac
		agacucuccacugaaccc
75-C-15	75-C-15	SEQ ID NO: 28:
		gaaugagcacucguggcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuuuguuuauuga
		cCacagacucuccacug
80-C-10	80-C-10	SEQ ID NO: 29:
		gaacugaauugagcacucguggcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuuuguuu
		auugacCacagacucuc
85-C-5	85-C-5	SEQ ID NO: 30:
		caacagaacugaauugagcacucguggcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccagaguuu
		uguuuauugacCacaga
90-C-0	90-C-0	SEQ ID NO: 31:
		caauucaacagaacugaauugagcacucguggcuugagcccaaggagcuggaaaauugagguggagcuuccag
		aguuuuguuuauugacC

注：RNA 序列中大写字母仅用于区分靶向碱基，同一种碱基的大小写字母不代表碱基类型的差异。

本实施例中所有测试均使用 RNAi MAX 试剂(Invitrogen 13778150)将 arRNA 转染入细胞, 具体步骤如下:

1. 细胞培养使用含有 10%FBS (Vistech SE100-011)的 DMEM (Hyclone SH30243.01)。使用 12 孔板培养细胞, 报告体系细胞为 15000 个细胞/孔。铺入细胞的时间记为 0 小时。

2. 细胞传代后 24 小时, 用 RNAi MAX 试剂将 12.5pmol 的 arRNA 转入各孔。转染步骤参照供应商说明书。

3. 细胞传代后 72 小时, 用胰酶 (Invitrogen 25300054)消化整孔细胞, 并用流式细胞仪在 FITC 通道分析细胞荧光强度。

首先, 参照 LEAPER 参考文献中的 arRNA 的设计原则(Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing of RNA, Qu et al., 2019, 该文献中体外合成的 arRNA 仅采用了 111nt 长度的 arRNA 进行测试)设计 arRNA, 即将致病突变位点的 A (靶标 A) 的对位靶向碱基确定为 C, 使所述靶向碱基的 5'端以及 3'端的序列长度一致。从总长 111nt (55-C-55) 的 arRNA (与参考文献一致) 为基础, 同时对 5'及 3'端进行截短, 以形成本申请所使用的各测试 arRNA。由于体外合成 RNA 的限制, 目前阶段更长的 RNA 长度难以在体外合成, 因此本实施例仅测试了 111nt、91nt、71nt 和 51nt 这四种长度的 arRNA, 编辑效率的结果见图 6。

其中, “对照”表示不转入任何 arRNA 的对照孔。从图 6 中可以看出, 对照孔本底的 GFP 阳性细胞很少 (约 0.6%), 相比之下 111nt、91nt 和 71nt 的三条 arRNA 导致的 %GFP 均超过 90%, 而 51nt 只有很低的 GFP 阳性比例。从平均荧光强度的图中可以看出, 对照孔本底有少量假阳性细胞, 且虽然这些细胞占比很少, 但其荧光强度较高, 如图 7 所示。

令人意外的是, 与上述 LEAPER 参考文献报道不同, 本申请发现 51nt~111nt 的 arRNA 可以取得较好的编辑效果, 然而并非越长的 arRNA 编辑效率越高。如图 8 所示, 根据上述 LEAPER 参考文献(同 Qu et al., 2019 图 2d)中的报道, 在其报告体系中, 比较了 51nt~111nt 的 arRNA。其中, 可见 71nt 的 GFP+细胞比例比 111nt 要低, 其长度与编辑效率的关系从 51nt~111nt 的范围内基本呈现逐渐增高的趋势。而在实施例 1 的报告体系测试中, 与

111nt 相比, 71nt 导致的 GFP 阳性细胞比例差异不大, 而平均荧光强度却更高。

其次, 由于越长的 arRNA 合成成本越高, 并且较长的 arRNA 可能会导致更大的脱靶可能性, 因此, 本申请中测试了通过各种方式截短的 arRNA 的编辑效率。如图 9 所示, 以靶向碱基 C 为中点, 以 111nt 的 arRNA 序列 (SEQ ID NO: 2) 为基础, 从 5' 端上游或 3' 端下游以 10nt 为步长, 逐步向中间截短, 以获得用于测试的 arRNA。

从图 9 中不难看出, 从 5' 端截短时, 与 LEAPER 参考文献中的报道相符, 即相对更长的 RNA 编辑效率更高, 然而不同的是, 从 3' 端截短时, 编辑效率并非逐渐下降, 反而在 3' 端截短 30nt 时表现出最高的编辑效率。由于从 3' 端截短 30nt 时编辑效率最高, 而此时的 arRNA 长度为: 55-C-25, 因此, 在后续试验中, 我们将 3' 端的长度为 25nt, 从 5' 端继续进行截短以获得测试 arRNA, 结果如图 10 所示。

图 10 中的“3'-截短 30”以及“55-C-25”与图 9 中“3' 截短”的“-30”为相同的 arRNA 序列 (SEQ ID NO: 8), 其中, 图 10 中的“3'-截短 30”与图 9 中“3' 截短”的“-30”为同批次合成, 与“55-C-25”为不同批次合成。从图 10 中, 不难看出, 当 3' 端固定为 25nt 而从 5' 端截短时, 编辑效率基本呈现随 5' 长度下降而下降的趋势, 其中 40-C-25 虽然不符合以上趋势, 但无论其 MFI 还是 %GFP 均未超过 55-C-25。

最后, 除了长度以外, 靶向碱基的位置也对编辑效率有影响。因此随后我们将 arRNA 长度固定为 91nt, 通过对靶向碱基位置的移动获得测试 arRNA, 结果如图 11 所示。

从图 11 中可以看出, 并非靶向碱基在 arRNA 中间位置时效率最高, 且在 3' 端长度减少到 0 之前 (如 85-C-5 及其左侧柱子所示), arRNA 均有较高编辑效率。

最后, 我们在同一批次中合成了以上所有 arRNA, 并对其进行了再次测试, 以便排除不同批次导致的测试误差。结果如图 12 所示。从图 12 中不难看出, 效率最高的 3 条 arRNA 为 55-C-35 (SEQ ID NO: 7)、55-C-25 (SEQ ID NO: 8)、55-C-15 (SEQ ID NO: 9)。重复测试中, 可能由于所用的 arRNA 经过冻融, 整体编辑效率相比第一次测试略有下降。对于两端对称的 arRNA,

71nt (35-C-35)与 111nt (55-C-55)相当。此外，本批次中最长的 111nt arRNA 编辑效率并非最高，相比之下，55-C-15、55-C-25、55-C-35 这 3 条长度分别为 71nt、81nt、91nt 的 arRNA 拥有相对更高的编辑效率。

并且，相较于现有技术中优选的 111nt arRNA，本实施例中 55-C-15 等长度仅 71nt 的 arRNA 不仅有更高的编辑效率，而且合成成本更低（参考价格见表 2）。此外，可以预期，更短的 arRNA 可能会有更低的脱靶风险。

表 2. arRNA 合成长度及价格

arRNA 长度	arRNA 名称	合成量	合成参考价格
111nt	55-C-55	3nmol	\$750
71nt	55-C-15	5nmol	\$314

通过对 GFP 信号的读取，我们可以快速粗略地判断不同 arRNA 的编辑效率，但如果更准确地确认编辑效率，则需通过二代测序（Next Generation Sequencing, NGS），来最终确认 mRNA 中有多少比例的 A 被编辑成 I(G)。

按照本实施例中上述相同步骤 1、2 进行细胞铺板和转染，并于细胞传代后 72h 用 800μL TRIzol (Invitrogen, 15596018)收样，采用 Direct-zol RNA Miniprep 试剂盒(Zymo Resaerch, R2052)进行 RNA 提取。每个样品取 1000ng 提取的 RNA，用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(全式金, AT311)进行反转录，以合成 cDNA。之后，取 1μL 反转录产物，用序列为 ggagtgtacggtgtgcGGAAGAAAACCCCGGTCCTGCTA (SEQ ID NO: 33) 和 gagttggatgctggatggAACAGAACTGAATGAGCACTCGTGG (SEQ ID NO: 34) 两个引物以及 Q5 热启动酶(NEB, M0494L)进行 PCR。PCR 产物用 Hi-TOM 试剂盒(诺禾致源, REF PT045)进行建库并按照以下步骤完成二代测序和数据分析。

i. Illumina 测序

将构建好的测序文库，通过 NovaSeq6000 平台以 PE150 方式进行高通量测序。

ii. 测序数据处理

将高通量测序得到的原始数据用 fastp (v0.19.6)进行质控, 过滤掉低质量、带有接头的序列、以及含有 polyG 等的序列。将得到的高质量测序数据按照相应的 barcode 序列拆分到每个样本, 使用 BWA (v0.7.17-r1188)软件与扩增的目标区域的序列进行比对, 通过 SAMtools (v1.9)进行格式转换以生成 BAM 文件。统计比对信息并重新排序和建立索引。

iii. 编辑效率分析

使用 JACUSA (v1.3.0)软件检测所有潜在的 RNA 突变位点, 所用参数为: call-1 -a B,R,D,I,Y,M:4 -C ACGT -c 2 -p 1 -P UNSTRANDED -R -u DirMult-CE。过滤掉同时在对照和处理样本中出现的高频点突变之后, 以 A->G 突变位点之外的平均突变频率的三倍作为阈值, 将靶标碱基 A->G 突变频率在阈值之上的部分作为真实的靶标 A 突变为 G 的频率。

采用如上步骤, 我们最终对图 12 中全部样品进行了二代测序, 以靶标碱基为 G 的 Reads 数占其为 ATCG 的全部 Reads 数的百分比作为编辑效率, 并以此作图, 结果如图 13 所示。

对比图 12 与图 13, 不难看出, 通过不同方法测试得到的编辑效率呈现基本相同的趋势。即按照 LEAPER 文献(Qu et al., 2019)中设计的 111nt 的 arRNA 并非编辑效率最高的 arRNA, 而经过我们对靶向碱基 3'端的截短、5'端的截短以及对靶向碱基在序列中位置的调整, 最终发现 55-C-15 (SEQ ID NO: 9) 的序列不仅在 GFP 的读值上体现出较高的编辑效率, 并且通过二代测序也可以进一步证实, 其 A 到 G 的编辑效率可达到 50%左右, 这意味着经 55-C-15 的 arRNA 编辑后的细胞中有 50%的 mRNA 上的靶标碱基位点发生了从 A 到 G 的编辑。

通过以上试验, 我们证实, 按照本申请所述技术方案设计的 arRNA 相较于现有技术可以达到更高的编辑效率, 并且成本更低。同时, 可以预知, 由于本申请的 arRNA 所需长度更短, 因此在转染拷贝数相同的情况下, 本申请中的 arRNA 转染入细胞的质量更低, 这将有益于降低过量 RNA 的转入对细胞造成的毒性, 同时也减少了 arRNA 与非靶标 RNA 序列的结合, 从而提高了体内编辑的安全性。

实施例 3: 小鼠眼部 Ush2A 基因位点的体内编辑

实施例 2 中, 通过体外试验对 USH2A 致病位点进行了编辑。虽然体外

试验可以取得好的编辑效率,但体外细胞培养的环境无法模拟人体内循环、免疫系统以及眼球内注射等多方面因素,这些仍需更多体内试验验证。考虑到后续与实际治疗对接,而目前对于眼部的小 RNA 递送,通常选用腺病毒相关病毒(Adeno-Associated Virus, AAV),我们最终选择了使用 AAV 载体作为 arRNA 的递送方式进行小鼠眼部 Ush2A 基因位点的体内编辑。我们采取了 151nt arRNA(SEQ ID NO: 32)进行本试验。即本实施例所使用的测试 arRNA 中包含了与靶标 A 对位靶向碱基 C,当该 arRNA 与靶标 RNA 杂交时,即可在靶标 A 处形成 A-C 不匹配(错配)。同时,该 arRNA 靶向碱基 C 的 5' 端和 3' 端则分别为与靶标序列完全互补的 75nt 碱基序列。由于小鼠 Ush2A 基因与人 USH2A 基因序列不同,且测试小鼠并不携带 Usher 综合征相关突变,本实施例中使用的 151nt arRNA 是靶向小鼠 Ush2A 相关位点的 arRNA,而非靶向人 USH2A 基因序列的 arRNA。我们将该 arRNA 编码序列插入至 AAV 载体 U6 启动子起始位点之后,并将插入 arRNA 序列的 AAV 载体包装成 1×10^{13} GC/mL 的 AAV2 和 AAV5。其中,AAV 载体的构建(构建后的载体见 SEQ ID NO: 16,其中 arRNA 编码序列以大写表示,同一字母的大小不代表碱基差异)和 AAV 病毒的包装均由广州派真生物技术有限公司完成。

本实施例采用的是 6~8 周龄的 SPF 级别 C57 雄性小鼠,试验组(AAV2 及 AAV5 组)与对照组(PBS)每组各 8 只小鼠,一共 24 只。通过玻璃体向试验组及对照组小鼠右眼分别注入 2 μ L AAV 或 PBS。在注射后第 7 天(后标记为第 1 周)、第 14 天(后标记为第 2 周),将每组小鼠各处死 4 只,并取出其右眼,用剪刀剪碎至 50~100mg 的小块。加液氮研磨后用 800 μ L TRIzol (Invitrogen, 15596018)收样。采用 Direct-zol RNA Miniprep 试剂盒(Zymo Research, R2052)进行 RNA 提取。每个样品取 1000ng 提取的 RNA 用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(全式金, AT311)进行反转录以合成 cDNA。每只小鼠各取 1 μ L 反转录产物,用序列为 ggagtgagtacggtgtgcCCCATCTCTTTGGCTTGGAACCAT (SEQ ID NO: 22) 和 gagttggatgctgatggCTTTTCTCTCTGCTCCACTGTGAAGTT (SEQ ID NO: 24) 的两个引物以及 Q5 热启动酶(NEB, M0494L)进行 PCR。PCR 产物用 Hi-TOM 试剂盒(诺禾致源, REF PT045)进行建库并完成二代测序和数据分析(测序和数据分析方法同实施例 2)。

结果如图 14 所示。从图中可以看出，在小鼠体内试验中，通过小鼠玻璃体注射时，小鼠眼球细胞中的 AA5 编辑效率较 AAV2 更高。但是从图中可以明显的看出，无论是 AAV2 还是 AAV5，编辑效率均较低。例如，在第 7 天，AAV2 的平均编辑效率为 0.5%，与 PBS 组无明显差异。而 AAV5 的平均效率虽然为 1% 左右，但 4 个平行试验呈现明显不一致的编辑效率，其中一个编辑效率为 2% 以上，另外 3 个为约 0.5%。而到了第 14 天，AAV2 组也有了将近 1% 的编辑效率，而 AAV5 组有平均 2% 的编辑效率，并且其中有一个样品有接近 5% 的编辑效率。通过该试验，我们发现如下几个问题：首先，在小鼠眼球中似乎 AAV5 比 AAV2 的编辑效率更高；其次，不同小鼠间数据差异较大，这可能预示着我们玻璃体注射的条件并不稳定，导致每次注射的差异较大；最后，从第 7 天到第 14 天编辑效率有上升的趋势，这意味着如果延后检测时间，可能会检测到更高的编辑效率。

因此，我们重新进行了小鼠眼球注射的试验，并对试验体系进行了如下的优化：1) 由于 AAV5 比 AAV2 的编辑效率高，此次试验我们保留了 AAV5，并且测试了另一血清型的 AAV 病毒：AAV8；2) 针对玻璃体注射编辑效果不稳定的问题，我们将注射条件改为视网膜下腔注射，并在注射后通过光学相干断层扫描(Optical Coherence Tomography, OCT)确认小鼠视网膜下腔注射成功；3) 检测时间修改为第 14(第 2 周)、28(第 4 周)、42(第 6 周)、56(第 8 周)；4) 由于 Usher 综合征是由于视网膜中视锥细胞和视杆细胞的退行性病变导致的，因此本次试验仅检测了视网膜中 Ush2A 的编辑效率，相较于检测整个眼球的编辑效率，仅检测视网膜中 Ush2A 的编辑效率对未来治疗更具指导意义。

在本次试验中，采用的小鼠为 6~8 周龄的 SPF 级别 C57 雄性小鼠，试验组(AAV5、AAV8 组)每组各 20 只，对照组(NaCl)12 只。

视网膜下腔注射方法如下：向动物双眼各滴复方托吡卡胺滴眼液 1~2 滴散瞳，用舒泰 50 进行肌肉注射 (50 mg/kg, 50 mg/mL) 以对动物进行全身麻醉。使麻醉后的小鼠侧卧于操作台上。使用聚维酮碘棉球对小鼠眶周皮肤进行消毒。用有齿显微镊夹住眼球一侧的结膜，用显微剪剪开球结膜下筋膜，暴露部分巩膜。保持显微镊不动，将盖玻片覆盖在角膜上，用卡波姆滴眼液排除其间空气，后用一次性胰岛素针与巩膜成一个小角度，行巩膜、脉

络膜穿刺，直达视网膜上皮与视网膜交界处，形成通道。继续保持显微镊不动，退出胰岛素针，并将其更换为 33G 显微注射器。将 33G 显微注射器从通道口扎至视网膜下，缓慢给药 1 μ L 后，停针至少 3-5 s。在动物麻醉状况良好的状态下继续将显微注射器保持在通道内 30s 左右(以尽量减少退针时的漏液体积)。在每只小鼠给药后需清洗针头，以确保无交叉污染。双眼注射结束后，使用 OCT 扫描确认注射位置为视网膜下腔。若双眼均成功注射至视网膜下腔则判定该动物注射成功。注射后于第 14、28、42、56 天分别安乐死 5 只(试验组)或 3 只(对照组)小鼠。取出小鼠左眼，用手术刀沿角膜缘 360°切开角膜。去掉虹膜和晶状体，取视网膜-脉络膜-巩膜复合体，将最外侧巩膜剔除后，剪碎并放入装有经预冷的 400 μ L TRIzol (Thermo, 15596018) 的无菌 EP 管中。然后用组织匀浆机混匀。用 Direct-zol RNA Microprep 试剂盒(Zymo Research, R2062)提取 RNA。每个样品取 1000ng 提取的总 RNA 用全式金反转录试剂盒(全式金, AH341-01)反转录, 并取 5 μ L 反转录后的 cDNA 用序列为

ggagtgagtacgtgtgcCCCATCTCTTTGGCTTGGAACCAT (SEQ ID NO: 22)

和 gaggttggatgctggatggCTTTTCTCTCTGCTCCACTGTGAAGTT (SEQ ID NO: 2) 的两个引物以及 Q5 热启动酶(NEB, M0494L)进行 PCR。PCR 产物用 Hi-TOM 试剂盒(诺禾致源, REF PT045)进行建库并完成二代测序和数据分析(测序和数据分析方法同实施例 2)。

结果如图 15 所示。从图中可以明显的看出，相比于首次试验最高平均 2%的编辑效率(图 14)，本次试验最高可达超过 5%的编辑效率。另外，由于本次试验剥离了小鼠视网膜进行收样测序，而非将小鼠整个眼球剪碎研磨，因此更能反应实际治疗时产生的实际治疗效应。通过本试验可以证明，LEAPER 技术可以在小鼠体内试验中编辑视网膜细胞中 Ush2A 内源基因位点，并且这种编辑可以在小鼠体内持续至少 2 个月。

综合以上实施例结果，本申请充分证明了使用本申请公开的技术方案治疗 Usher 综合征的可行性。

SEQ ID NO: 32:

CCACUGCAGCAGCAAAGCCCGGCCCUUUUCUCUCUGCUCCACUGUGAAGUUCAUCAGUCCGC

UUGGGGCAGAUUCCAAAGUCUUAUAUCAGGGUCCAGGGGCUCGACACCUUCCUGCACUGUU

UACAGCCACCACACCAAUGUGGUAUGUU

SEQ ID NO: 16;

5 cctgcaggcagctgcgcgctcgtcactgaggccgccggcgctggcgaccttggcgcgcgcctcagtgagcgcgcgcgcgcagaga
gggagtgggccaactccatcactaggggttctcgcggccattcgggtacaattcacgcgtgagggcctatttcccatgattcctcatattgcatatacgatacaag
tctgttagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagtttcagttttaa
10 tatgttttaaatggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggctttatatcttggtaaaggacgaaacaccgCCACTGCAGC
AGCAAAGCCCCGGCCCTTTTCTCTCTGCTCCACTGTGAAGTTCATCAGTCCGCTTGGGGCAGATT
CCAAAGTCTTAATCAGGGTCCAGGGGCTCGACACCTTTCCTGCACTGTTTACAGCCACCACACC
AATGTGGTATGTTTtttttttgggtaccaggtcttgaaggagtgggcgctgcacattgattgactagctctggctgtacataacttacgta
aatggcccgctgctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaataggagctttccattgacgtcaat
15 ggggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctgg
cattatgccagtagatgacctatgggactttcctacttggcagttacatctactcagggccacgttctgcttactctccccatctccccccctccccacccca
atttgtatttttttttttaatttttggcagcgatggggcgggggggggggggggggggggcgcgccaggcgggcgggggcgaggggc
ggggcgggggcgaggcgagaggtgcggcgccagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtcttctttatggcgaggcgggcgggcgggcgcccta
20 taaaaagcgaagcgcgcgggcggggagcgggatcagccaccgcggtggcgccctagagtcgacgaggaactgaaaaaccagaaagtaactggt
aagttagtctttttgtcttttttattcaggtcccggtggtggtgcaaatcaagaactgctcctcagtggtatgttgcctttactcttaggcctgtacggaagt
gttactctgctctaaaagctgcggaattgtacccgcggccgatccaccggtcgcaccatggtgagcaaggcgaggagctgttaccggggtgtgccc
atcctggtcagctggacggcgacgtaaacggccaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttc
atctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggccaccctcgtgaccacctgacctacggcggtcagtgcttcagccgctaccccaccacatgaagca
25 gcacgacttctcaagtccgcatgcccgaaggtacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagt
tcgaggcgacacctgtgtgaaccgcatcgagctgaaggcagtcacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaaca
gccacaagctctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcaggagggcagcggtgcagctcgccga
ccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcgcgcctgagcaaaagacccaacga
gaagcgcgatcacatggctcgtggtgagttcgtgaccgccggcgatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaaatgaattccgctcgagataatc
30 aacctctggattacaaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttc
ccgtatggtttcattttctcctctgtataaatcctggttagttcttgcacggcggaactcagccgcctgcttgcctgctggacaggggctcggtgt
tgggcactgacaattccgtggtgtttttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccatctagctttatttgaatttgtgatgctattgctttatttgaacca
ttataagctgcaataaacaagtaacaacaacaattgattcattttatgtttcaggttcagggggagatggggaggttttttaagcgccgcaggaaaccccta
gtgatggagttggccactccctctctcgcgctcgtcgtcactgagggcgggcgaccaaaaggtcggcgacggcggggttggcgggcgccctcag
tgagcgagcgagcgcgagctgcctgcaggggcgccctgatcggtattttctccttacgcatctgtcgggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaacatag

tacgccccctgtagcggcgacgagcgcgcgggtgtgtgtgtacgagcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcgcgcctctcttctgctttct
 tccctctcttctcgcacgttcgcccgttccccgtcaagctctaaatcggggctcccttaggggtccgatttagtcttacggcacctcgacccccaaaaa
 cttgattgggtgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttgagtcacgttcttaatagtgactcttgtccaaactg
 gaacaacactcaaccctatctcgggctattctttgattataagggttttccgatttcggcctattgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaa
 5 ttttaacaaaaattaacgtttacaaatttatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgac
 gcgccccgacgggctgtctgtcccgcacccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgacagaggtttaccgctcatcaccgaaac
 gcgcgagacgaaaggccctgtgatacgcctattttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcgg
 aaccctctttgtttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataattgaaaaaggaagagtatgagtattc
 aacatttcggtgtgccttattcccttttttgcggcattttgcttctgcttttctcaccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc
 10 acgagtggtgtacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgt
 ggcgcgggtattatcccgattgacggcgggcaagagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactaccagtcacagaaaagc
 atcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtccataaccatgagtgataaactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaa
 ggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacac
 cagcatcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggagcgggata
 15 aagttgcaggaccacttctgcgtcggccctccggctggtgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcgggtatcattgcagcactg
 gggccagatggtgaagccctcccgatcgtattatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctca
 ctgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaattaaaaggatctagtgaaagatccttttgataatc
 catgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaagatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgtg
 cttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagatac
 20 caaataactgtccttctagttagccgttagtgccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactcctgttaccagtggctgctgc
 cagtgccgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggttcgtgcacacagccca
 gcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggcaccgcttccgaaggagaaaaggcgacaggtatccgg
 taagcggcagggctcggaacaggagagcgacgaggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttccacactctgacttgag
 25 cgtcgattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatgaaaaacgccagcaacgcgcctttttacggtcctggccttttctgctgcttctgctcacatgt

参考文献:

1. Boughman, J. A., Vernon, M., & Shaver, K. A. (1983). Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *Journal of chronic diseases*, 36(8), 595-603.
- 30 2. Cox, D. B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358(6366), 1019-1027.

3. Davenport, S. L. H., & Omenn, G. S. (1977). The heterogeneity of Usher syndrome. Vth Int. Conf. *Birth Defects, Montreal*.
4. Grøndahl, J. (1987). Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clinical genetics*, 31(4), 255-264.
- 5 5. Liu, X., Bulgakov, O. V., Darrow, K. N., Pawlyk, B., Adamian, M., Liberman, M. C., & Li, T. (2007). Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4413-4418.
6. Merkle, T., Merz, S., Reautschnig, P., Blaha, A., Li, Q., Vogel, P., ... & Stafforst, T. (2019). Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides. *Nature biotechnology*, 37(2), 133.
- 10 7. Neuhaus, C., Eisenberger, T., Decker, C., Nagl, S., Blank, C., Pfister, M., ... & Beck, B. (2017). Next-generation sequencing reveals the mutational landscape of clinically diagnosed Usher syndrome: copy number variations, phenocopies, a predominant target for translational read-through, and PEX 26 mutated in Heimler syndrome. *Molecular genetics & genomic medicine*, 5(5), 531-552.
- 15 8. Otterstedde, C. R., Spandau, U., Blankenagel, A., Kimberling, W. J., & Reisser, C. (2001). A new clinical classification for Usher's syndrome based on a new subtype of Usher's syndrome type I. *The Laryngoscope*, 111(1), 84-86.
- 20 9. Pollard, K. M., Cauvi, D. M., Toomey, C. B., Morris, K. V., & Kono, D. H. (2013). Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discovery medicine*, 16(87), 123.
10. Qu, L., Yi, Z., Zhu, S., Wang, C., Cao, Z., Zhou, Z., ... & Bao, Y. (2019). Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nature biotechnology*, 37(9), 1059-1069.
- 25 11. Xu, L., Wang, J., Liu, Y., Xie, L., Su, B., Mou, D., ... & Zhao, L. (2019). CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 381(13), 1240-1247.
12. Usher, C. H. (1914). On the inheritance of retinitis pigmentosa; with note of cases. *Royal London Ophthalmol Hosp Rep*, 19, 130-236.
- 30 13. <https://en.wikipedia.org/wiki/Nyctalopia>