(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
2021 年 6 月 17 日 (17.06.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/114662 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/12 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/102292

(22) 国际申请日: 2020 年 7 月 16 日 (16.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911255192.X 2019年12月9日 (09.12.2019) CN

(71) 申请人: 北京大学第三医院（北京大学第三临床医学院）(**PEKING UNIVERSITY THIRD HOSPITAL (PKU THIRD CLINICAL MEDICAL COLLEGE)**) [CN/CN]; 中国北京市海淀区花园北路49号, Beijing 100191 (CN)。 **北京中因科技有限公司 (CHIGENOVO CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。

(72) 发明人: **杨丽萍 (YANG, Liping)**; 中国北京市海淀区花园北路49号, Beijing 100191 (CN)。 **陈邵宏 (CHEN, Shaohong)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **贾睿璇 (JIA, Ruixuan)**; 中国北京市海淀区花园北路49号, Beijing 100191 (CN)。 **张天赋 (ZHANG, Tianfu)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **张凡 (ZHANG, Fan)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **曾巧莉 (ZENG, Qiaoli)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **和赛超 (HE, Saichao)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **史天永 (SHI, Tianyong)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **郝丹丹 (HAO, Dandan)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **姜尚伟 (JIANG, Shangwei)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **裴红杰 (PEI, Hongjie)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **王旭东 (WANG, Xudong)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。 **曾露颖 (ZENG, Luying)**; 中国北京市昌平区科技园区生命园路9号院1号楼S-402室, Beijing 102206 (CN)。

(74) 代理人: **上海巅石知识产权代理事务所（普通合伙）(SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.)**; 中国上海市上海市浦东新区盛夏路608号2号楼103室/蒋舫玮, 张琤, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(54) **Title:** USES OF CYP4V2 AND RDCVF IN PREPARATION OF DRUGS

(54) **发明名称**: CYP4V2和RdCVF在制备药物中的用途

(57) **Abstract:** Uses of CYP4V2 and RdCVF in preparation of drugs. The drugs are used for treating, relieving and/or preventing diseases or symptoms associated with atrophy of retinal pigment epithelium (RPE). A separated nucleic acid molecule, comprising a polynucleotide encoding CYP4V2 and a polynucleotide encoding RdCVF. An amino acid sequence encoded by the separated nucleic acid molecule, a vector comprising the separated nucleic acid molecule, cells comprising the nucleic acid or the vector, and uses thereof in preparation of drugs for treating, relieving and/or preventing the diseases or symptoms associated with the atrophy of the RPE.

(57) **摘要**: CYP4V2和RdCVF在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮(RPE)萎缩相关的疾病或病症。一种分离的核酸分子，其包含编码CYP4V2的多核苷酸以及编码RdCVF的多核苷酸。所述分离的核酸分子编码的氨基酸序列、包含所述分离的核酸分子的载体、包含所述核酸或所述载体的细胞及其在制备用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮(RPE)萎缩相关的疾病或病症的药物中的用途。

[见续页]

WO 2021/114662 A1

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, 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:

— 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))。

CYP4V2 和 RdCVF 在制备药物中的用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及 CYP4V2 和 RdCVF 在制备药物中的用途。

背景技术

结晶样视网膜变性（Bietti's crystalline dystrophy，BCD）是一种视网膜变性罕见病，其症状主要包括角膜中的晶体（透明覆盖物），沉积在视网膜的光敏组织中的细小、黄色或白色晶体状的沉积物，以及视网膜、脉络膜毛细血管和脉络膜的进行性萎缩。沉积物会损伤视网膜，导致视力逐渐丧失。患有结晶样视网膜变性的人通常会在十几岁或二十几岁时开始察觉到视力问题，每只眼睛的视力问题可能以不同的速度恶化，即使在同一个家庭中症状的严重程度和进展在不同的个体中差异很大，然而大多数患者在四十或五十岁时就会失明。据估计，世界范围内每 67,000 人中有 1 人患有结晶样视网膜变性，在东亚人中更为常见，尤其是中国人和日本人。

现有研究表明 BCD 为常染色体隐性遗传疾病，并且是由 CYP4V2 基因突变引起的，目前国内外关于 BCD 患者的基因研究中已发现 CYP4V2 多个基因突变位点。CYP4V2 基因是细胞色素 P450 超家族中的蛋白质之一，CYP4V2 基因编码蛋白参与脂肪酸代谢的过程，一般认为结晶样视网膜变性中 CYP4V2 基因突变破坏了其参与脂肪酸代谢的酶功能，从而影响了脂质分解。然而 CYP4V2 如何导致了 BCD 的特定体征和症状尚不清楚。目前 BCD 的治疗主要参考视网膜色素变性(RP)的治疗方法，虽然 CYP4V2 基因突变的研究为未来的基因治疗提供了可能，但是目前还没有效的治疗方法。

发明内容

本申请提供了 CYP4V2 和 RdCVF 在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，所述疾病或病症包括结晶样视网膜变性。

在某些实施方式中，所述 CYP4V2 为人 CYP4V2。

在某些实施方式中，所述 CYP4V2 包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列。

在某些实施方式中，所述 RdCVF 为人 RdCVF。

在某些实施方式中，所述 RdCVF 包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述编码 RdCVF 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

在某些实施方式中，所述药物包含编码所述 CYP4V2 的多核苷酸以及编码所述 RdCVF 的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸和所述编码 RdCVF 的多核苷酸位于不同的载体上。

在某些实施方式中，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸和所述编码 RdCVF 的多核苷酸位于同一载体上。

在某些实施方式中，所述载体包括病毒载体。

在某些实施方式中，所述载体为病毒载体，其所述病毒载体包括 AAV 载体。

在某些实施方式中，所述载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

在某些实施方式中，所述载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

在某些实施方式中，所述启动子包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

在某些实施方式中，所述载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

在某些实施方式中，所述载体还包含编码自我剪切肽的多核苷酸，所述编码自我剪切肽的多核苷酸位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸与所述编码 RdCVF 的多核苷酸之间。

在某些实施方式中，所述自我剪切肽包含 P2A。

在某些实施方式中，所述编码自我剪切肽的多核苷酸包含 SEQ ID NO:22-25 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸和所述多聚腺苷酸信号位点。

在某些实施方式中，所述载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点；或者，所述载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

在某些实施方式中，所述载体还包含内含子。

在某些实施方式中，所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

在某些实施方式中，所述内含子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

在某些实施方式中，所述载体包含 SEQ ID NO: 90-116 中任一项所示的核苷酸序列。

本申请还提供了用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症的载体组合，其包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含编码 CYP4V2 的多核苷酸，所述第二载体包含编码 RdCVF 的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述疾病或病症包括结晶样视网膜变性。

在某些实施方式中，所述 CYP4V2 为人 CYP4V2。

在某些实施方式中，所述 CYP4V2 包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列。

在某些实施方式中，所述 RdCVF 为人 RdCVF。

在某些实施方式中，所述 RdCVF 包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 RdCVF 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

在某些实施方式中，所述载体包括病毒载体。

在某些实施方式中，所述载体为病毒载体，其所述病毒载体包括 AAV 载体。

在某些实施方式中，所述第一载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

在某些实施方式中，所述第二载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

在某些实施方式中，所述启动子包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述第一载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

在某些实施方式中，所述第二载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

在某些实施方式中，所述第一载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码

CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点；和/或，所述第二载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

在某些实施方式中，所述第一载体和/或所述第二载体还包含内含子。

在某些实施方式中，所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

在某些实施方式中，所述内含子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

在某些实施方式中，所述第一载体包含 SEQ ID NO: 90-95 中任一项所示的核苷酸序列；和/或，所述第二载体包含 SEQ ID NO: 96-100 中任一项所示的核苷酸序列。

本申请还提供一种或多种分离的核酸分子，其包含 a) 编码 CYP4V2 的多核苷酸以及 b) 编码 RdCVF 的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述 CYP4V2 为人 CYP4V2。

在某些实施方式中，所述 CYP4V2 包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列。

在某些实施方式中，所述 RdCVF 为人 RdCVF。

在某些实施方式中，所述 RdCVF 包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 RdCVF 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子还包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子还包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

在某些实施方式中，所述启动子包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子包含编码 CYP4V2 的多核苷酸和编码 RdCVF 的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子还包含编码自我剪切肽的多核苷酸，所述编码自我剪切肽的多核苷酸位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸与所述编码 RdCVF 的多核苷酸之间。

在某些实施方式中，所述自我剪切肽包含 P2A。

在某些实施方式中，所述编码自我剪切肽的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

在某些实施方式中，所述的分离的核酸分子，其以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸和所述多聚腺苷酸信号位点。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子，其还包含内含子。

在某些实施方式中，所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述其中内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

在某些实施方式中，所述分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 101-115 中任一项所示的核苷酸序列。

本申请还提供一种载体，其包含本申请所述的分离的核酸分子。

在某些实施方式中，所述载体为病毒载体。

在某些实施方式中，所述病毒载体包括 AAV 载体。

本申请还提供一种细胞，其包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。

本申请还提供一种药物组合物，其包含本申请所述的分离的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞。

本申请还提供本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的细胞在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，所述疾病或病症包括结晶样视网膜变性。

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

附图说明

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

图 1 显示了本申请中不同 CYP4V2 启动子的表达效果。

图 2 显示了本申请中 CAG、EF1a、OPEFS 及 EFS 启动子的表达效果。

图 3 和图 4 显示了本申请中启动子后连接内含子的表达增强作用。

图 5 显示了本申请中表达载体选择不同 PolyA 信号位点对目的基因表达的影响。

图 6 显示了本申请中含有 CYP4V2、RdCVF 基因的表达载体在 293T 细胞中的表达情况。

图 7 显示了本申请中含有 CYP4V2、RdCVF 基因的表达载体在 ARPE-19 细胞中的表达情况。

图 8 显示了本申请中不同血清型 AAV 病毒对小鼠视网膜的感染情况，双箭头表示 EGFP 报告基因的表达范围。

图 9 显示了本申请中 RPE 细胞的制备过程中荧光显微镜观察到的肾上皮细胞、IPSC 细胞、RPE 细胞形态。

图 10A 显示了本申请中病毒滴度对人 iPSC 分化的 RPE 细胞死亡的影响，10B、10C 分别显示了病毒滴度对人 iPSC 分化的 RPE 细胞中炎症因子 NLRP3、TNF-α 表达情况的影响，10D 显示了不同病毒滴度条件下目的基因在人 iPSC 分化的 RPE 细胞的表达情况。

图 11 显示了本申请中不同病毒感染人 iPSC 分化的 RPE 细胞后 CYP4V2、RdCVF 的表达情况。

图 12 显示了本申请中包含不同启动子和 CYP4V2 基因的病毒处理 BCD 小鼠后对眼底结晶沉积情况的影响。

图 13 显示了本申请中包含不同启动子和 CYP4V2 基因的病毒处理 BCD 小鼠对眼底结晶沉积情况的影响的统计结果。

图 14 显示了本申请中包含不同启动子和 CYP4V2 基因的病毒处理 BCD 小鼠后 CYP4V2 免疫荧光染色结果。

图 15 显示了本申请中不同剂量的包含 CYP4V2 基因的病毒处理 BCD 小鼠后对眼底结晶沉积情况的影响。

图 16 显示了本申请中不同剂量的包含 CYP4V2 基因的病毒处理 BCD 小鼠后对眼底结晶沉积情况的影响的统计结果。

图 17 显示了本申请中不同剂量的包含 CYP4V2 基因的病毒处理 BCD 小鼠后对炎症因子

TNF-α、IFN-γ、NLRP3 表达水平的影响。

图 18 显示了本申请中不同病毒处理 BCD 小鼠后对眼底结晶沉积情况的影响。

图 19 显示了本申请中不同病毒处理 BCD 小鼠后对眼底结晶沉积情况的影响的统计结果。

图 20 显示了本申请中不同病毒处理 BCD 小鼠后对视网膜功能（视网膜电图（ERG））的影响。

图 21 显示了本申请中不同病毒处理 BCD 小鼠后 CYP4V2、RdCVF 的免疫荧光染色结果。

图 22 显示了本申请中不同病毒处理 BCD 小鼠后对 RPE 细胞数量及形态的影响。

图 23 显示了本申请中不同病毒处理 BCD 小鼠后对 RPE 细胞数量影响的统计结果。

图 24 显示了本申请中启动子后不含有内含子的不同病毒处理 BCD 小鼠后对视网膜功能（视网膜电图（ERG））的影响。

图 25 显示了本申请中 p1 启动子不同病毒处理 BCD 小鼠后对视网膜功能（视网膜电图（ERG））的影响。

图 26 显示了本申请中 WPRE-SV40 poly A 信号位点不同病毒处理 BCD 小鼠后对视网膜功能（视网膜电图（ERG））的影响。

图 27 显示了本申请中不包含信号位点不同病毒处理 BCD 小鼠后对视网膜功能（视网膜电图（ERG））的影响。

具体实施方式

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

以下对本申请做进一步描述：在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

在本申请中，术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它

不纯物质。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常指任何长度的分离形式的核苷酸，脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或从其天然环境分离的或人工合成的类似物。

在本申请中，术语“CYP4V2”通常是指一种蛋白质，其为细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 成员 2。胞色素 P450，也称作 cytochromeP450 或 CYP450，通常是指一类亚铁血红素蛋白家族，属于单氧酶的一类，参与内源性物质或包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢。根据氨基酸序列的同源程度，其成员又依次分为家族、亚家族和酶个体三级。细胞色素 P450 酶系统可以缩写为 CYP，其中家族以阿拉伯数字表示，亚家族以大写英文字母表示，酶个体以阿拉伯数字表示，例如本申请中的 CYP4V2。人 CYP4V2 基因（HGNC：23198）全长 19.28kb，位于 4q35，具有 11 个外显子，在脂肪酸代谢中发挥重要作用（Kumar S., Bioinformation, 2011,7:360-365）。CYP4V2 几乎在所有组织中表达，但是在视网膜和视网膜色素上皮中以高水平表达，而角膜，组织中以稍低的水平表达，CYP4V2 基因的突变可能导致 BCD（Li 等，Am J Hum Genet。74:817-826, 2004)。

在本申请中，术语“RdCVF”也称作视杆细胞源性视锥细胞生长因子(Rod derived cone survival factor），通常是指一种截短的类硫氧还蛋白，其缺乏硫醇氧化还原酶活性。RdCVF 是类核氧化还原蛋白 1（nucleoredoxin-like 1, *Nxnl1*）基因的一种剪接变体，该基因另外的剪接产物是 RdCVFL，RdCVFL 是一种活性硫氧还蛋白，能够保护其结合配体即微管相关蛋白 TAU 免于氧化和聚集（Elachouri 等，2015 和 Fridlich 等，2009）。*Nxnl1* 基因缺失的小鼠可以表现出年龄依赖性视杆细胞和视锥细胞功能丧失和视锥细胞退行性变化，以及视杆细胞和视锥细胞对氧化应激的超敏反应（Cronin 等，2010）。*Nxnl1* 的表达可以是视杆细胞依赖性的，其在视网膜色素变性（RP）中的视杆细胞死亡后显著减少（Delyfer 等，2011; Reichman 等，2010）。RdCVF 可以在几种不同基因型的视网膜色素变性（RP）模型中保护视锥细胞功能（Byrne 等, 2015; Le´ veillard 等, 2004; Yang 等, 2009）。RdCVF 分子可作为信号肽分泌至细胞外，促进感光细胞对葡萄糖的吸收，有利于维持感光细胞的存活。*Nxnl1* 基因在人类、黑猩猩、恒河猴、狗、牛、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼和青蛙中都是保守的。在人类中 *Nxnl1* 也称作 *Txnl6*，*Nxnl1* 位于 19p13.11，包含两个外显子。*Nxnl1* 可以在人体组织中普遍表达，包括晶状体、视网膜、胃、肾、心脏、结肠和脾，在晶状体、视网膜中有相对更高的表达水平。

在本申请中，术语“启动子”通常指一段能使特定基因进行转录的脱氧核糖核酸（DNA）序列。启动子可以被 RNA 聚合酶辨认，并开始转录合成 RNA。在核糖核酸（RNA）合成中，启动子可以和调控基因转录的转录因子产生相互作用，控制基因表达（转录）的起始时间和表达的程度。启动子包含核心启动子区域和调控区域，位于控制基因表达的调控序列中、基

因转录起始位点的上游（DNA 反义链的 5’方向），本身并无编译功能。根据其作用方式及功能分为三类：组成型启动子（在多数或全部组织中保持持续的活性）、特异型启动子（组织特异性或者发育时期的特异性）和诱导型启动子（受外界化学或物理信号调控）。

在本申请中，术语“可操作连接”通常是指将编码序列表达所必需的调控序列置于相对于编码序列的适当位置，以便实现编码序列的表达。例如，当第一核酸序列处于与第二核酸序列的功能关系中时，第一核酸序列与第二核酸序列可操作连接。在某些实施方式中，可以表示表达载体中编码序列和转录控制元件的排列。所述控制元件可以包括启动子、增强子和终止元件。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子被可操作地连接至编码序列。在某些实施方式中，“可操作连接”还可以是指目的基因连接到载体中，使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节目的基因的转录和翻译的预期功能。

在本申请中，术语“自我剪切肽”，也称作 2A 肽（2A self-cleaving peptides），通常是指一类长 18-22 个氨基酸残基的肽片段，能诱导细胞内含有 2A 肽的重组蛋白自我剪切。2A 肽通常源自病毒基因组的 2A 区域。在基因工程操作中，2A 肽可以使一个开放读框（ORF）转译出的肽链分为数个独立的肽链。在某些实施方式下，如果需要两个蛋白分开表达（例如需要一个蛋白进入细胞核、另一个蛋白在细胞质中表达），又希望只在载体上构建一个开放读框，可以通过在它们的编码区中插入一段 2A 肽序列实现。在某些实施方式下，如果两个蛋白融合后的融合蛋白没有功能，可以在两个蛋白的编码区中间插入一段编码 2A 肽的序列，或将连结肽更换为 2A 肽，使转译完成后两个蛋白分开，独立进行折叠，从而提供使两个蛋白恢复功能的可能。2A 肽可以包括 P2A、E2A、F2A、T2A，它们都是以来源的病毒命名的。其中 P2A 源于猪捷申病毒（Porcine teschovirus）的 2A 肽。

在本申请中，术语“多聚腺苷酸序列”，也称作多聚腺苷酸尾，PolyA 尾，通常是指转录后的 mRNA 在 3’端加上的一段几十至几百个单一的腺苷酸链。多聚腺苷酸化通常发生在脱氧核糖核酸（DNA）在细胞核内转录成核糖核酸（RNA）的过程中及完成后，该反应通常是由多聚腺苷酸聚合酶完成的。在真核生物中，多聚腺苷酸化是一种机制，可以使 mRNA 分子于其 3’端中断，多聚腺苷酸序列可以保护 mRNA 免受核酸外切酶攻击，并且对 mRNA 的细胞核输出、翻译和稳定性都十分重要。

在本申请中，术语“多聚腺苷酸信号位点”通常是指一段位于信使 RNA（mRNA）的 3’端能够被多聚腺苷酸化相关裂解因子识别的碱基序列。通常也是 mRNA 上的一段顺式调节信号。一般情况下加尾的过程（即多聚腺苷酸化）开始于转录终止后，多聚腺苷酸化相关裂解因子在多聚腺苷酸信号位点的调控下，在 mRNA 的 3’UTR 的后面加上几十到几百个单一的腺苷酸。常见的加尾信号包括 SV40，BGH，HSV，TK 信号等。所述多聚腺苷酸化相关裂解因子

可以包括裂解/聚腺苷酸特异性因子（CPSF）、裂解刺激因子（CstF）、裂解因子 I（CFI）、裂解因子 II（CFII）。多聚腺苷酸信号位点通常可以包含 AAUAAA 序列，但是在真核生物组之间有所不同。例如，大多数人的多聚腺苷酸信号位点含有 AAUAAA 序列，但该序列在植物和真菌中较少见。

在本申请中，术语“内含子”可以包括经过转录的，但却从 RNA 转录本中通过将序列(外显子)两端的任一端拼接在一起而被去除的 DNA 片段。内含子通常被认为是基因的蛋白编码区内的干扰序列，且通常不含有由该基因产生的蛋白所代表的信息。

在本申请中，术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及病毒载体等。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

在本申请中，术语“病毒载体”通常使指充当基因递送载体且包含包装于病毒衣壳内的重组病毒基因组的非野生型重组病毒颗粒。用作载体的动物病毒种类可以包括逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒（AAV）、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（例如 SV40）。

在本申请中，术语“AAV 载体”也称作腺相关病毒载体，通常是指腺病毒本身或其衍生物。腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV)通常是指一类属于微小病毒科、依赖病毒属的单链 DNA 病毒。AAV 基因组可以包含 DNA 链两端的反向末端重复序列（ITR）和两个开放阅读框（ORF）。所述开放的阅读框可以包括 *rep* 和 *cap*。*rep* 由编码 AAV 生命周期所需的 Rep 蛋白的多个重叠基因组成，*cap* 包含编码衣壳蛋白的重叠核苷酸序列，所述核苷酸序列可以包括 VP1，VP2 和 VP3。所述衣壳蛋白相互作用形成衣壳。在缺少辅助病毒的情况下，AAV 可以整合其基因组到人类 19 号染色体的一个特别位点（AAVS 位点），直到有辅助病毒将其从潜伏状态下拯救出来(Kotin 等，1990)。通常认为 AAV 以不整合的形式为主。AAV 的位点特异性的整合能力、其自然缺陷及其免疫原性低使其成为理想的基因治疗载体。AAV 具有多种常见血清型,100 多种病毒变种。在本申请中，AAV 衣壳、ITR 和其它所选 AAV 组件选自任何 AAV，包括但不限于 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8 和 AAVAnc80、任何已知或提及的 AAV 的变体或尚待发现的 AAV 或其

变体或混合物。

在本申请中，术语“细胞”通常可以是或已经是核酸分子或载体的接受者的单个细胞、细胞系或细胞培养物。细胞可以包括本申请所述的核酸分子或本发明所述的载体。细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变，后代可以不一定与原始母细胞完全相同(在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上)。细胞可包括用本申请所述的载体在体外转染的细胞。细胞可以是细菌细胞(例如，大肠杆菌)、酵母细胞或其它真核细胞，例如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa 细胞、HEK293 细胞、COS-1 细胞、NS0 细胞或骨髓瘤细胞。在某些实施方案中，细胞为哺乳动物细胞。在某些实施方案中，哺乳动物细胞为 HEK293T 细胞。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指涉及适合施用于患者、例如人患者的组合物。例如，本申请所述的药物组合物，其可以包含本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。此外，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在本申请中，术语“预防”通常是指对健康受试者预防性地施用组合，以预防某种疾病或病症的发生。其也可以包含对处于待治疗变应性疾病前期的患者预防性地施用组合。“预防”不需要 100％消除疾病或病症发生的可能性，换句话说，“预防”通常指在所述施用组合的存在下疾病或病症发生的可能性降低了。

在本申请中，术语“缓解”指减少、缩减或迟滞某种病状、疾病、病症或表型。所述病状、疾病、病症或表型可以包括受试者主观感知例如疼痛、晕眩或其他生理性障碍，或者医学上可以检测的指征，例如通过医学检验手段检测到的病灶情况。

在本申请中，术语“治疗”通常指用于改变所处理的个体或细胞在临床病理过程中的自然过程的临床干预。可以包括改善病状态、消除病灶或改善的预后。

在本申请中，术语“视网膜色素上皮（RPE）”通常是指一层紧贴于视网膜感觉神经之外的色素细胞。视网膜色素上皮由单层六边形细胞组成，其内含有密集的色素颗粒。视网膜色素上皮（RPE）与其下的脉络膜和其上视网膜神经细胞紧密相连，其主要功能可以包括：控制视网膜下间隙的液体和营养，起到血-视网膜屏障的功能；合成生长因子调整局部的结构；吸收光，调节电平衡；视色素的再生和合成；吞噬和消化光感受器外节；维持视网膜的附着；损伤后的再生和修复。通常认为 RPE 是维持光感受器功能的重要组织，同时也受脉络膜和视网膜的很多病变影响。

在本申请中，术语“视网膜色素上皮（RPE）萎缩”通常是指视网膜色素上皮（RPE）表现为细胞死亡或功能障碍的退行性变化。年龄相关黄斑变性或视网膜色素变性（RP）通常伴有视网膜色素上皮萎缩。视网膜色素变性（Retinitis Pigmentosa，简称 RP）也称视网膜色素病变，通常是指一类遗传性眼科疾病。其遗传方式有常染色体隐性、显性与 X 性连锁三种，也存在双基因和线粒体遗传。初期普遍的病征可以是夜盲、视野变窄，能够看到正前方景物而无法看见略偏左右的视野，之后视力将会逐渐消失。RP 可以包括单眼性原发性视网膜色素变性、象限性原发性视网膜色素变性、中心性或旁中心性原发性视网膜色素变性、无色素性视网膜色素变性白点状视网膜变性、结晶样视网膜变性、静脉胖色素性视网膜色素变性、小动脉旁色素上皮保留型视网膜色素变性、Leber 先天黑蒙和其他综合征中的视网膜色素变性。

在本申请中，术语“结晶样视网膜变性”通常是指一类由意大利眼科医生 GB Bietti 博士于 1937 年首次描述的常染色体隐性遗传眼病。其主要症状包括角膜中的晶体（透明覆盖物），沉积在视网膜的光敏组织中的细小、黄色或白色晶体状的沉积物，以及视网膜、脉络膜毛细血管和脉络膜的进行性萎缩。结晶样视网膜变性可以包括由 CYP4V2 基因突变引起的疾病。

在本申请中，术语“包含”或“包括”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10%的范围内变动。

一方面，本申请提供了 CYP4V2 和 RdCVF 在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

在本申请中，所述药物可以包含编码所述 CYP4V2 的多核苷酸以及编码所述 RdCVF 的多核苷酸。例如，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸和所述编码 RdCVF 的多核苷酸位于不同的载体上。例如，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸和所述编码 RdCVF 的多核苷酸位于同一载体上。

另一方面，本申请还提供了用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症的载体组合，其包括第一载体和第二载体，所述第一载体可以包含编码 CYP4V2 的多核苷酸，所述第二载体可以包含编码 RdCVF 的多核苷酸。

另一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其可以包含编码 CYP4V2 的多核苷酸以及编码 RdCVF 的多核苷酸。

另一方面，本申请还提供了细胞，其可以包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体组合。

本申请还提供了药物组合物，其可以包含本申请所述的所述的核酸分子、本申请所述的

载体组合和/或本申请所述的细胞。

另一方面，本申请还提供了本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体组合、本申请所述的细胞和/或本申请所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物可以用于预防、缓解和/或治疗视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

CYP4V2

在本申请中，CYP4V2 可以包含一类其功能障碍或其编码基因突变可能导致结晶样视网膜变性的蛋白，包括但不限于人类、黑猩猩、大猩猩、恒河猴、狗、牛、小鼠、大鼠、鸡、果蝇、线虫或青蛙的 CYP4V2 或其功能性变体。

例如，所述 CYP4V2 可以包含人 CYP4V2。

例如，所述 CYP4V2 可以包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述 CYP4V2 可以包含 SEQ ID NO: 76 所示的氨基酸序列。

例如，所述 CYP4V2 可以包含与 SEQ ID NO: 76-82 所示的氨基酸序列至少 90%同源的氨基酸序列，例如至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同源的任意一种氨基酸序列，并且所述氨基酸序列与本申请所述的 RdCVF 联合施用能够改善与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

在本申请中，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:62 所示的核酸序列。

例如，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含与 SEQ ID NO: 62-68 所示的核酸序列至少 90%同源的氨基酸序列，例如至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同源的任意一种多核苷酸序列，并且所述核苷酸序列所编码的多肽与本申请所述的 RdCVF 联合施用能够改善与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

RdCVF

在本申请中，所述 RdCVF 可以包含一种由视杆细胞产生的并且有利于视锥细胞的蛋白。所述 RdCVF 包括但不限于人类、黑猩猩、大猩猩、恒河猴、狗、牛、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼和青蛙的 RdCVF 或其功能性变体。

例如，所述 RdCVF 可以包含人 RdCVF。

例如，所述 RdCVF 可以包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述 RdCVF 可以包含 SEQ ID NO: 83 所示的氨基酸序列。

例如，所述 RdCVF 可以包含与 SEQ ID NO:83-89 所示的氨基酸序列至少 90%同源的氨基酸序列，例如至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同源的任意一种氨基

酸序列，并且所述氨基酸序列与本申请所述的 CYP4V2 联合施用能够改善与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

在本申请中，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:69-75 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:69 所示的核酸序列。

例如，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含与 SEQ ID NO: 69-75 所示的核酸序列至少 90%同源的氨基酸序列，例如至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同源的任意一种多核苷酸序列，并且所述核苷酸序列所编码的多肽与本申请所述的 CYP4V2 联合施用能够改善与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

启动子

在本申请中，所述启动子可以包含 RPE 细胞特异性启动子、视网膜细胞特异性启动子、角膜细胞特异性启动子、眼细胞特异性启动子或组成型启动子。所述启动子还可以包含哺乳动物 β 肌动蛋白启动子或病毒启动子。所述启动子还可以包含 CAG 启动子（杂合 CMV 早期增强子/鸡 β 肌动蛋白启动子，也称为 CAGGS 启动子，CB 启动子或 CBA 启动子）、人 β 肌动蛋白启动子、小 CBA（smCBA）启动子、CBS 启动子或 CBh 启动子、延伸因子 1α 短（EFS）启动子、延伸因子 1α（EF-1α）启动子、CMV 启动子、PGK 启动子、UBC 启动子、GUSB 启动子、UCOE 启动子、VMD2（也称为 BEST1）启动子、OPEFS 启动子、CYP4V2 自身启动子、RPE65 启动子或其杂合体或衍生物。

例如，所述启动子可以包含 CYP4V2 自身启动子，所述 CYP4V2 自身启动子可以包含所述编码 CYP4V2 的多核苷酸上游 2000bp 核苷酸序列的全部或部分。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述 CYP4V2 自身启动子可以包括 CYP4V2-Pf 启动子、CYP4V2-P1 启动子、CYP4V2-P2 启动子、CYP4V2-P3 启动子、CYP4V2-P4 启动子、CYP4V2-P5 启动子、CYP4V2-P6 启动子；所述 CYP4V2-Pf 启动子可以包含 SEQ ID NO:6 所示的核酸序列，所述 CYP4V2-P1 启动子可以包含 SEQ ID NO:7 所示的核酸序列，所述 CYP4V2-P2 启动子可以包含 SEQ ID NO:8 所示的核酸序列，所述 CYP4V2-P3 启动子可以包含 SEQ ID NO:9 所示的核酸序列，CYP4V2-P4 启动子可以包含 SEQ ID NO:10 所示的核酸序列，所述 CYP4V2-P5 启动子可以包含 SEQ ID NO:11 所示的核酸序列，所述 CYP4V2-P6 启动子可以包含 SEQ ID NO:12 所示的核酸序列。

例如，所述启动子可以为 OPEFS，包含 SEQ ID NO:1 所示的核酸序列。

例如，所述启动子可以为 EFS，包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列。

例如，所述启动子可以为 EF1a，包含 SEQ ID NO:3 所示的核酸序列。

例如，所述启动子可以为 CAG，包含 SEQ ID NO:4 所示的核酸序列。

例如，所述启动子可以为 RPE65，包含 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列。

多聚腺苷酸信号位点

在本申请中，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 SV40 信号位点、BGH 信号位点、WPRE 信号位点、WPRE-SV40 信号位点、WPRE-BGH 信号位点或其衍生物。

例如，所述多聚腺苷酸信号位点可被多聚腺苷酸化相关裂解因子识别从而产生 SV40 多聚腺苷酸序列、BGH 信号多聚腺苷酸序列、HSV 信号多聚腺苷酸序列、TK 信号多聚腺苷酸序列、WPRE 信号多聚腺苷酸序列等。

例如，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 AAUAAA 序列。

例如，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 SEQ ID NO:17-21 所示的核酸序列。

自我剪切肽

在本申请中，所述编码自我剪切肽的多核苷酸位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸与所述编码 RdCVF 的多核苷酸之间。

例如，所述自我剪切肽可以包含 T2A、P2A、E2A 或 F2A。

例如，所述自我剪切肽可以包含 P2A。

例如，所述自我剪切肽可以包含 SEQ ID NO:26-29 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:22-25 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述剪切肽的 N 端还可以连接 GSG（Gly-Ser-Gly，甘氨酸、丝氨酸、甘氨酸）序列。

内含子

在本申请中，所述内含子可以位于目的基因的 5’端或者位于目的基因的核苷酸序列中。所述目的基因可以包括编码 CYP4V2 的多核苷酸或编码 RdCVF 的多核苷酸。所述内含子能够增强所述目的基因的表达。例如，所述内含子可以包含人 β-globin 内含子、SV40 内含子、杂合 CBA/MVM 内含子或其他人工合成内含子。

例如，所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

分离的核酸分子

在本申请中，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含编码 CYP4V2 的多核苷酸、编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、

所述编码 RdCVF 的多核苷酸，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:69-75 中任一项所示的核酸序列。

在本申请中，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含编码所述 RdCVF 的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含编码所述 RdCVF 的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列。

在本申请中，所述分离的核酸分子还可以包含所述启动子。

例如，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

例如，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:69-75 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF

的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列。

在本申请中，所述分离的核酸分子还可以包含编码所述自我剪切肽的多核苷酸。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含启动子、编码 CYP4V2 的多核苷酸、编码自我剪切肽的多核苷酸、编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述分离的核酸分子从 5’端到 3’端可以依次包含启动子、编码 RdCVF 的多核苷酸、编码自我剪切肽的多核苷酸、编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述分离的核酸分子可以包含 SEQ ID NO:101-105 中任一项所示的核酸序列。

在本申请中，所述分离的核酸分子还可以包含所述多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

在本申请中，所述分离的核酸分子还可以包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含可以包含如 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的核苷酸序列。

在本申请中，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述分离的核酸分子可以包含 SEQ ID NO:106-108 中任一项所示的核酸序列。

在本申请中，所述分离的核酸分子还可以包含所述内含子。

例如，所述内含子可以包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、所述内含子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、插入了所述内含子的编码所述 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述内含子可以包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、所述内含子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、插入了所述内含子的编码所述 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述内含子可以包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO:

69-75 中任一项所示的核酸序列，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述插入了所述内含子的编码所述 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 116 所述的核酸序列。

例如，所述内含子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸中，或者，所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、所述内含子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、插入了所述内含子的编码所述 RdCVF 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述内含子可以包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、所述内含子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述的分离的核酸分子从 5’至 3’方向可以依次包含所述启动子、插入了所述内含子的编码所述 RdCVF 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述内含子可以包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述编码自我剪切肽的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 22-25 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述分离的核酸分子可以包含如 SEQ ID NO: 109-115 中任一项所示的核苷酸序列。

载体

在本申请中，所述载体可以包括质粒、噬菌粒、柯斯质粒、人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）、噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及病毒载体。

例如，所述病毒载体可以包括逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒（AAV 载体）、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（例如 SV40）。

例如，所述腺相关病毒载体（AAV 载体）基因可以包含反向末端重复序列（ITR）、开放阅读框（ORF），所述开放阅读框可以包括编码 Rep 蛋白的多核苷酸，还可以包括编码衣壳的多核苷酸。

例如，所述腺相关病毒载体（AAV 载体）还可以包括重组腺相关病毒载体（rAAV 载体）。

例如，所述重组腺相关病毒载体中衣壳、ITR 和其它所选 AAV 组件可以选自任何 AAV，包括但不限于 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8 和 AAVAnc80、DJ、DJ/8、Rh10 任何已知或提及的 AAV 的变体或尚待发现的 AAV 或其变体或混合物。

例如，所述 AAV 载体可以是 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV8bp、AAV7M8、AAVAnc80、DJ、DJ/8、Rh10 中的任意一种。

例如，所述 AAV 载体为眼组织亲和性 AAV 载体，例如，AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV8、DJ/8 或任意 rAAV 载体。

例如，所述 AAV 载体可以是 AAV2/2、AAV2/5、AAV2/8 或 AAV2/9。

例如，所述病毒载体可以包含 pAAV-RC5-Amp、RC8-cap、AAV2/8、AAV-helper-Amp、AAV-helper。

例如，所述病毒载体可以包含 SEQ ID NO: 133-137 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述载体还可以包含如 SEQ ID NO: 90-115 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述载体还可以包含如 SEQ ID NO: 117-121 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述载体可以包含如 SEQ ID NO: 122-132 中任一项所示的核苷酸序列。

在本申请中，所述载体可以包含本申请所述的分离的核酸分子。

例如，所述载体可以包含如 SEQ ID NO: 101-115 中任一项所示的核苷酸序列。

在本申请中，所述载体可以包含编码所述 CYP4V2 的多核苷酸或者所述编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述载体还可以包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

例如，所述载体还可以包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

例如，所述载体还可以包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：如 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的启动子序列、如 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的编码 CYP4V2 的多核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的多聚腺苷酸信号位点序列。

例如，所述载体可以包含 SEQ ID NO: 90-92 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述载体还可以包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：如 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的启动子序列、如 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的编码 RdCVF 的多核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的多聚腺苷酸信号位点序列。

例如，所述载体可以包含如 SEQ ID NO: 96-98 中任一项所示的核酸序列。

例如，所述载体还可以包含内含子。

例如，所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

例如，所述内含子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、所述内含子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸或所述编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、插入了所述内含子的编码所述 CYP4V2 的多核苷酸或插入了所述内含子的编码所述 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、所述内含子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸或所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、插入了所述内含子的编码所述 CYP4V2 的多核苷酸或插入了所述内含子的编码所述 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷

酸信号位点。

例如，所述启动子可以包含 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的核酸序列，所述内含子可以包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核酸序列，所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的核酸序列，所述编码 RdCVF 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列，所述多聚腺苷酸信号位点可以包含 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述插入了所述内含子的编码所述 CYP4V2 的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 116 所述的核酸序列。

例如，所述载体可以包含 SEQ ID NO: 93-95 和 99-100 中任一项所示的核苷酸序列。

载体组合

本申请还提供了用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症的载体组合，其包括第一载体和第二载体，所述第一载体可以包含编码 CYP4V2 的多核苷酸，所述第二载体可以包含编码 RdCVF 的多核苷酸。

例如，所述第一载体还可以包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

例如，所述第一载体以 5’至 3’方向可以依次包含：如 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的启动子序列、如 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的编码 CYP4V2 的多核苷酸序列。

例如，所述第一载体可以包含 SEQ ID NO: 117 所示的多核苷酸序列。

例如，所述第二载体还可以包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

例如，所述第二载体可以包含 SEQ ID NO: 120 所示的多核苷酸序列。

例如，所述第一载体以 5’至 3’方向可以依次包含：如 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的启动子序列、如 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的编码 RdCVF 的多核苷酸序列。

例如，所述第一载体还可以包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

例如，所述第二载体还可以包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

例如，所述第一载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点；和/或，所述第二载体以 5’至 3’方向可以依次包含：所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

例如，所述第一载体以 5’至 3’方向可以依次包含：如 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的

启动子序列、如 SEQ ID NO: 62-68 中任一项所示的编码 CYP4V2 的多核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的多聚腺苷酸信号位点序列。

例如所述第一载体可以包含如 SEQ ID NO: 90-92 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述第二载体以 5’至 3’方向可以依次包含：如 SEQ ID NO: 1-12 中任一项所示的启动子序列、如 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的编码 RdCVF 的多核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 17-21 中任一项所示的多聚腺苷酸信号位点序列。

例如所述第二载体可以包含如 SEQ ID NO: 96-98 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述第一载体和/或所述第二载体还可以包含内含子。

例如，所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

例如，所述内含子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

例如，所述第一载体可以包含 SEQ ID NO: 93-95 中任一项所示的核苷酸序列；和/或，所述第二载体可以包含 SEQ ID NO: 99-100 中任一项所示的核苷酸序列。

例如，所述第一载体可以包含 SEQ ID NO: 118-119 中任一项所示的核苷酸序列；和/或，所述第二载体可以包含 SEQ ID NO: 121 中任一项所示的核苷酸序列。

细胞

本申请还提供了细胞，其可以包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体组合。

例如，所述细胞可以是使得所述核酸分子在其中表达的细胞。

例如，所述细胞可以包含单个细胞的后代。所述后代可以不一定与原始母细胞完全相同（在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上）。

例如，所述细胞还可以包含用本发明所述的载体在体外转染的细胞。

例如，所述细胞可以包含细菌细胞（例如，大肠杆菌）、酵母细胞或其它真核细胞，例如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、HeLa 细胞、HEK293 细胞、COS-1 细胞、NS0 细胞或骨髓瘤细胞、293T 细胞。

例如，所述细胞为来自结晶样视网膜变性患者的细胞。

例如，所述细胞可以包含体细胞或干细胞。

例如，所述细胞可以包含视网膜细胞、角膜细胞、脉络膜细胞、晶状体细胞、神经细胞、RPE 细胞、干细胞，所述干细胞可以包含诱导性多能干细胞（iPSC）、胚胎干细胞（ESC）、间充质干细胞（MSC）、成体干细胞或源自干细胞的任何细胞。

例如，所述视网膜细胞、角膜细胞、脉络膜细胞、晶状体细胞、神经细胞、RPE 细胞可

以是由所述干细胞诱导分化的。

例如，所述细胞可以包含 ARPE-19 细胞、人 iPSC 诱导的 RPE 细胞。

药物组合物

本申请还提供了药物组合物，其可以包含本申请所述的所述的核酸分子、本申请所述的载体组合和/或本申请所述的细胞。

例如，所述药物组合物还可以包含任选地药学上可接受的佐剂。

例如，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。

例如，所述组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下对接受者无毒。

例如，所述药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

例如，所述药学上可接受的佐剂可以包括与药物给药相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂，通常安全、无毒，且既不是生物学上也非其它方面不合需要的。

例如，所述药物组合物可以包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或眼内施用或直接注射到组织中。

例如，所述药物组合物可以通过滴注、输注或注射施用于患者或者受试者。

例如，所述药物组合物可以不间断（或连续）施用。

例如，所述不间断（或连续）施用可以通过患者佩戴的小泵系统来实现，以测量流入患者体内的治疗剂，如 WO2015/036583 所述。

在本申请中，所述受试者可以包括人类和非人类动物。例如，所述受试者可以包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症

在本申请中，所述视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症可以包括年龄相关黄斑变性或视网膜色素变性（RP）。

例如，所述视网膜色素变性可以包括单眼性原发性视网膜色素变性、象限性原发性视网膜色素变性、中心性或旁中心性原发性视网膜色素变性、无色素性视网膜色素变性白点状视网膜变性、结晶样视网膜变性、静脉胖色素性视网膜色素变性、小动脉旁色素上皮保留型视网膜色素变性、Leber 先天黑蒙和其他综合征中的视网膜色素变性。

例如，所述视网膜色素变性可以包括结晶样视网膜变性。

例如，所述结晶样视网膜变性可以包括由 CYP4V2 基因突变引起的疾病。

例如，所述 CYP4V2 基因突变可以包括但不限于错义突变、复制错误、剪接位点错误、

移码、碱基缺失或插入、无义突变、多态性（例如，单核苷酸多态性）、过早终止、CYP4V2部分或全基因缺失及尚未鉴定的与结晶样视网膜变性相关的 CYP4V2 基因变异。

例如，所述 CYP4V2 基因突变可以包括表 1 所示突变：

表 1 CYP4V2 基因突变部分类型

外显子或内含子位置	核酸改变	预测蛋白改变
1	c.31C>T	p.Q11X
1	c.64C>G	p.L22V
1	c.71T >C	p.L24P
1	c.77G >A	p.G26D
1	c.130T>A	p.W44R
1	c.134A>C	p.Q45P
1	c.181G>A	p.G61S
1	c. 197T>G	p.M66R
IVS1	c.214+1G>A	外显子 1 删除
IVS1	c.214+25delT	未知
IVS1	c.215-2A>G	外显子 2 删除
IVS1	c.215-1G>A	外显子 2 删除
2	c.219T>A	p.F73L
2	c.237G>T	p.E79D
2	c.253C>T	p.R85C
2	c.277T>C	p.W93R
2	c.283G>A	p.G95R
2	c.327G>A	未知
IVS2	c.327+1G>A	p.E72Gfs*5
IVS2	c.327+11G>C	未知
3	c.332T>C	p.I111T
3	c.335T>G	p.L112*
3	c.367A>G	p.M123V
3	c.400G>T	p.G134*
3	c.413+2T>G	剪切受体
4	c.518T>G	p.L173W
5	c.637_641delAGTAA	p.S213*
5	c.655T>C	p.Y219H
6	c.677T>A	p.M226K
6	c.694C>T	p.R232*
6	c.724delG	p.D242Ifs*35
6	c.732G>A	p.W244*
6	c.761A>G	p.H254R
6	c.772C>T	p.L258F
6	c.791delT	删除
7	c.802-8_806del13	外显子 7 删除

7	c.802-8_810del17insGC	外显子 7 删除
7	c.810delT	p.(N271Rfs*34)
7	c.838G>T	p.E280*
7	c.958C>T	p.R320*
7	c.971A>T	p.D324V
7	C.974C>T	p.T325I
IVS7	c.985+3A>G	未知
8	c.992A>C	p.H331P
8	C.998C >A	p.T333K
8	c.1020G>A	p.W340*
8	c. 1021T>C	p.S341P
8	c.1027 T>G	p.Y343D
8	c.1062dupA	p.V355Sfs*4
IVS8	c. 1091-2A>G	外显子 9 删除
9	c.1157A>C	p.K386T
9	c.1168C>T	p.R390C
9	c.1169G>A	p.R390H
9	c.11780T	p.P393L
9	c.11870T	p.P396L
9	c.1198C>T	p.R400C
9	c.11990A	p.R400H
9	c.1219G>T	p.E407*
9	c.1225+1 G>A	p.(G364_V408del)
10	c.1226-6_1235del16	外显子 10 删除
10	c.1328G>A	p.R443Q
10	c.13480T	p.Q450*
10	c. 1355G>A	p.R452H
10	c. 1372G>A	p.V458M
10	c. 1393A>G	p.R465G
10	c.1396 A>G	p.N466D
10	c. 1399T>C	p.C467R
10	c.1441delT	p.(S481Rfs*4)
10	c.1445C>T	p.S482*
11	c. 1523G>A	p.R508H
11	c.1526C>T	p.P509L

表 1 中所示的 CYP4V2 基因突变型可自数据库 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CYP4V2[gene]获得。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请中的核酸分子、制备方法和用途等，而不用于限制本申请发明的范围。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括 Sambrook, J., Fritsch, E．F． and Maniais， T.（1989） Molecular Cloning： A Laboratory Manual，2nd edition，Cold spring Harbor Laboratory Press。未注明的化

学试剂均可通过常规商业渠道购买获得。

实施例

实施例 1. 通过 CYP4V2 的表达验证启动子强度

（1）全长 CYP4V2 启动子序列为人源基因组 CYP4V2（HGNC:23198）编码区上游 2000bp，由苏州金唯智公司合成。

（2）设计不同长度启动子 CYP4V2-Pf、CYP4V2-P1、CYP4V2-P2、CYP4V2-P3、CYP4V2-P4、CYP4V2-P5、CYP4V2-P6 的引物序列，以步骤（1）所得核酸分子为模板进行 PCR 扩增，凝胶电泳回收扩增产物。引物序列如 SEQ ID NO: 30-37 所示。

PCR 反应体系（50μl）如下：

H_2O (Invitrogen, 10977015)	20μl
Primer F (10pmol/μl)	2μl
Primer R (10pmol/μl)	2μl
primeSTAR MAX (Takrara，R045R)	25μl
CYP4V2-pro-2000bp	5ng

表 2 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
95°C	5min	1
98°C	10s	30
55-60°C	15s	
72°C	20s	
72°C	10min	1
16°C	∞	1

（3）分别从 CAG 启动子两端扩增 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 载体（购自山东维真生物科技有限公司），凝胶电泳回收扩增产物。引物序列如 SEQ ID NO: 38-39 所示。PCR 反应体系（50μl）如下：

H_2O (Invitrogen, 10977015)	20μl
Primer F (10pmol/μl)	2μl
Primer R (10pmol/μl)	2μl
primeSTAR MAX (Takrara，R045R)	25μl
pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP	5ng

表 3 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
95℃	5min	1
98℃	10s	30
55-60℃	15s	
72℃	20s	
72℃	10min	1
16℃	∞	1

（4）将步骤（2）所得的不同 CYP4V2 启动子序列（如 SEQ ID NO: 6-12 所示）同源连接至由步骤（3）所得的线性化 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 载体，代替原载体中的 CAG 启动子。

连接体系（置于冰上操作）如下：

线性化 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 载体	1-2 μl
CYP4V2-Pf/P1/P2/P3/P4/P5/P6 启动子片段	2-4 μl
Lightening Cloning Master Mix（博奥龙，BDIT0014-20）	5 μl
ddH_2O	x μl
Total	10 μl

在 50℃水浴锅内放置 40min，取 5μl 反应液转化 transtb13 大肠杆菌感受态细胞，摇菌测序，使用中提试剂盒（Omega，D6915-04）提质粒。

（5）第一天分 293T 细胞（ATCC，CRL-3216）到 35mm 细胞培养皿，第二天至 70%左右，配制转染体系：100 μl 无血清 DMEM 分别加入 2μg 步骤（4）所得质粒，加入 3μl PEI，混匀，静止 20min；将所得转染体系加入细胞培养基中，晃匀，置于 CO_2 培养箱中，6h 后或过夜换液。

（6）48 小时后 RIPA 裂解液（北京普利莱 C1053-100）裂解细胞，跑蛋白胶。Western blot 检测 CYP4V2 的表达。所使用抗体：anti-CYP4V2（Atlas，HPA029122），anti- actin（Abclonal，AC026），goat-anti-rabbit（Abclonal，AS014）。

结果如图 1 所示，CYP4V2-PF 启动子、CYP4V2-P1 启动子、CYP4V2-P2 启动子、CYP4V2-P3 启动子、CYP4V2-P4 启动子、CYP4V2-P5 启动子、CYP4V2-P6 启动子均能够实现 CYP4V2 的表达，其中 CYP4V2-PF 启动子、CYP4V2-P3 启动子、CYP4V2-P4 启动子、CYP4V2-P5 启动子有较好的表达效果，而 CYP4V2-P5 序列更短更有优势。

实施例 2. 以 EGFP 为报告基因验证启动子强度

（1）PCR 扩增启动子 EF1a、EFS、OPEFS。EF1a 引物序列如 SEQ ID NO: 40-41 所示，EFS 引物序列如 SEQ ID NO: 42-43 所示。OPEFS 启动子以通用启动子 EFS 为基础，设计引物采用两轮 PCR 将 EFS 改造为 OPEFS。第一轮 PCR 反应所用引物为 EFS 正向引物（如 SEQ ID NO: 42 所示）和 OPEFS-overlapR1（如 SEQ ID NO: 44 所示），第二轮 PCR 反应所用引物为 EFS 正向引物（如 SEQ ID NO: 42 所示）和 OPEFS-overlapR2（如 SEQ ID NO: 45 所示）。凝胶电泳回收扩增产物。PCR 反应体系（50μl）如下：

H2O (Invitrogen, 10977015)	20μl
Primer F (10pmol/μl)	2μl
Primer R (10pmol/μl)	2μl
primeSTAR MAX (Takrara，R045R)	25μl
pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP	5ng

表 4 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
95℃	5min	1
98℃	10s	30
55-60℃	15s	
72℃	20s	
72℃	10min	1
16℃	∞	1

（2）将步骤（1）所得扩增产物（启动子 OPEFS、EFS、EF1a 核酸分子，序列如 SEQ ID NO: 1-3 所示）同源重组连接到按照实施例 1 步骤（3）所得线性化的 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 中，得到 pAV-EF1a-CYP4V2-P2A-EGFP，pAV-EFS-CYP4V2-P2A-EGFP 和 pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP。连接体系（置于冰上操作）如下：

线性化的 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 载体	1-2 μl
EF1a、EFS、OPEFS 片段	2-4 μl
Lightening Cloning Master Mix（博奥龙，BDIT0014-20）	5 μl
ddH_2O	x μl
Total	10 μl

在 50℃水浴锅内放置 40min，取 5μl 反应液转化 transtb13 大肠杆菌感受态细胞，摇菌测序，使用中提试剂盒（Omega，D6915-04）提质粒。

（3）按照实施例 1 步骤（5）的方法利用 PEI（Polysciences 24765-1）分别将 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP, pAV-EF1a-CYP4V2-P2A-EGFP，pAV-EFS-CYP4V2-P2A-EGFP 和 pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP 质粒转染提前铺于 6 孔板的 293T 细胞（ATCC，CRL-3216），细胞密度为 70%左右。

（4）24 小时后荧光显微镜（Life AMF4305）观察荧光信号。

结果如图 2 所示，CAG、EF1a、OPEFS 相对于 EFS 都具有较好的表达效果，其中 OPEFS 序列较短，更有优势。

实施例3. 验证内含子的增强效果

（一）将内含子克隆到基因 5’非编码区。

（1）P5-intron 的克隆。以 CYP4V2-P5 启动子序列和人 β-globin 内含子为基础，设计引物，采用 overlap PCR 改造得到 P5-intron。1）以 CYP4V2-P5 启动子序列为模板，利用 CYP4V2-P5 正向引物（CYP4V2-P5F，如 SEQ ID NO: 46 所示）和 CYP4V2-P5（in）反向引物（如 SEQ ID NO: 47 所示）进行 PCR 扩增；2）以人 β-globin 内含子为模板，利用 β-globin 内含子（c）（如 SEQ ID NO: 48 所示）和 β-globin 内含子反向引物（如 SEQ ID NO: 49 所示）进行 PCR 扩增；3）分别回收扩增产物，将 1）和 2）所得目的产物作为共同模板，利用 CYP4V2-P5 正向引物（CYP4V2-P5F，如 SEQ ID NO: 46 所示）和 β-globin 内含子反向引物，如 SEQ ID NO: 49 所示）进行 PCR 扩增，PCR 扩增按照实施例 2 步骤（1）的体系和条件进行。回收扩增所得 P5-intron 目的产物。

（2）将扩增得到的 P5-intron 序列进行测序，之后同源重组连接到按照实施例 1 步骤（3）所得线性化的 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 中，得到 pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-EGFP。连接体系（置于冰上操作）如下：

线性化 pAV-CAG-CYP4V2-P2A-EGFP 载体	1-2 μl
P5-intron 片段	2-4 μl
Lightening Cloning Master Mix（博奥龙，BDIT0014-20）	5 μl
ddH_2O	x μl
Total	10 μl

（3）在 50°C水浴锅内放置 40min，取 5μl 反应液转化 transtb13 大肠杆菌感受态细胞，摇菌测序，使用中提试剂盒（Omega，D6915-04）提质粒。

（二）将内含子克隆到基因编码区。

（1）CYP4V2-CDSintron 的克隆，在该片段中，内含子位于 CYP4V2 的第一个和第二个外显子之间。以 CYP4V2 的 CDS 序列和人 β-globin 内含子为基础，设计引物，采用 overlap

PCR 改造得到 CDSintron：

1）以 CYP4V2 的 CDS 序列为模板，利用引物对 CYP4V2-Fpr/CYP4V2-E1-R（序列分别如 SEQ ID NO: 50、51 所示）和 CYP4V2-E2-F/CYP4V2-R（序列分别如 SEQ ID NO: 52、53 所示）进行 PCR 扩增，分别得到 PCR 产物 CYP4V2-E1 和 CYP4V2-E2~11；

2）以 β-globin 内含子为模板，利用引物对 Intron-F/Intron-R（序列分别如 SEQ ID NO: 54、55 所示）进行 PCR 扩增；

3）分别回收扩增产物，将 1）所得目的产物 CYP4V2-E1 和 2）所得目的产物作为共同模板，利用 CYP4V2-CDS 正向引物 CYP4V2-Fpr（序列如 SEQ ID NO: 50 所示）和 β-globin 内含子反向引物 Intron-R（序列如 SEQ ID NO: 55 所示），进行 PCR 扩增，PCR 扩增按照实施例 2 步骤（1）的体系和条件进行。回收扩增所得 CYP4V2-E1-intron 目的产物。

4）将 3）所得目的产物 CYP4V2-E1-intron 和 1）所得目的产物 CYP4V2-E2~11 作为共同模板，利用 CYP4V2-CDS 正向引物 CYP4V2-Fpr 和 CYP4V2-CDS 反向引物 CYP4V2-R，进行 PCR 扩增，PCR 扩增按照实施例 2 步骤（1）的体系和条件进行。

（2）将扩增得到的 CDSintron 序列进行测序。

（3）37℃，2h 酶切 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP 得到线性化的载体，凝胶电泳回收。酶切体系如下：

pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP	2μg
EcoRI (NEB，R3101S)	2μl
MluI (NEB，R3198S)	2μl
Cutsmart Buffer (NEB)	4μl
H_2O (Invitrogen, 10977015)	to 40μl

（4）将 CYP4V2-CDSintron 同源重组连接到线性化的 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP 中，得到 pAV-p5-CDSintron-CYP4V2-P2A-EGFP。连接体系（置于冰上操作）如下：

线性化 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP 载体	1-2 μl
CYP4V2-CDSintron 片段	2-4 μl
Lightening Cloning Master Mix（博奥龙，BDIT0014-20）	5 μl
ddH_2O	x μl
Total	10 μl

（5）在 50℃水浴锅内放置 40min，取 5μl 反应液转化 transtb13 大肠杆菌感受态细胞，摇菌测序，使用中提试剂盒（Omega，D6915-04）提质粒。

（三）验证内含子位于基因 5’非编码区和编码区时的增强效果

（1）将 pAV-p5-CYP4V2-P2A-EGFP，pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-EGFP 和 pAV-p5-CDSintron-CYP4V2-P2A-EGFP 按照实施例 1 步骤（5）的方法利用 PEI（Polysciences 24765-1）转染提前铺于 6 孔板的 293T 细胞（ATCC，CRL-3216），细胞密度为 70%左右。

（2）24 小时后荧光显微镜（Life AMF4305）观察荧光信号。

（3）48 小时后 RIPA 裂解液（北京普利莱 C1053-100）裂解细胞，跑蛋白胶。Western blot 检测 CYP4V2 的表达。所使用抗体：anti-CYP4V2（Atlas，HPA029122），anti- actin（Abclonal，AC026），goat-anti-rabbit（Abclonal，AS014）。

结果如图 3 和图 4 所示，人 β-globin 内含子插入基因 5’非编码区和编码区时后表达效果增强。

实施例 4. PolyA 信号位点的选择

（1）将实施例 2 所得 pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP 载体中的 SV40 分别替换为 BGH，WPRE，WPRE-SV40 和 WPRE-BGH，序列如 SEQ ID NO: 19-21 所示，得到 pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-BGH，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-WPRE，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-WPRE-SV40，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-WPRE-BGH。该部分由北京擎科生物负责基因合成和亚克隆。

（2）将步骤（1）所得载体将测序验证后使用中提试剂盒（Omega，D6915-04）提取质粒。

（3）按照实施例 1 步骤（5）的方法利用 PEI（Polysciences 24765-1）分别将本实施例步骤（2）所得质粒转染提前铺于 6 孔板的 293T 细胞（ATCC，CRL- 3216），细胞密度为 70%左右。

（4）24 小时后荧光显微镜（Life AMF4305）观察荧光信号。

（5）48 小时后 RIPA 裂解液（北京普利莱 C1053-100）裂解细胞，跑蛋白胶。Western blot 检测 CYP4V2 的表达。所使用抗体：anti-CYP4V2（Atlas，HPA029122），anti- actin（Abclonal，AC026），goat-anti-rabbit（Abclonal，AS014）。

结果如图 5 所示，其中 M （mock）为空白对照，S 为 SV40，B 为 BGH，W 为 WPRE，WS 为 WPRE-SV40，WB 为 WPRE-BGH。各实验组相对于对照组均能够检测到 CYP4V2 的表达。

实施例 5. 表达载体构建

（1）pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH，pAV-OPEFS-RdCVF-BGH，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（卡纳抗性）的构建。pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-EGFP-BGH 中氨苄抗性基因替换为卡纳抗性基因，由苏州金唯智负责载体改造；pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ

ID NO:90 所示），pAV-OPEFS-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:96 所示），pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:106 所示）由苏州金唯智负责相关基因的合成和载体（卡纳抗性）改造。

（2）pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:93 所示），pAV-p5-intron-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:99 所示），pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:113 所示）(卡纳抗性)的构建。37℃酶切 pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH，pAV-OPEFS-RdCVF-BGH，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（卡纳抗性）2h 得到线性化的载体，凝胶电泳回收。酶切体系如下：

Vecter plasmid	2μg
EcoRI (Takara D1040A)	2μl
BamHI(Takara D1010A)	2μl
10×K Buffer(Takara)	4μl
H_2O (Invitrogen, 10977015)	to 40μl

（3）从 pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-EGFP 中 PCR 扩增得到 P5-intron 片段，凝胶电泳回收。所用正向引物如 SEQ ID NO: 46 所示，反向引物如如 SEQ ID NO: 55 所示。

（4）将酶切的回收载体和需要与其重组的线性片段连接，连接体系(置于冰上操作)如下：

步骤（2）所得酶切载体	1-2 μl
P5-intron 片段	2-4 μl
Lightening Cloning Master Mix（博奥龙，BDIT0014-20）	5 μl
ddH_2O	x μl
Total	10 μl

在 50℃水浴锅内放置 40min，取 5μl 反应液转化 transtb13 大肠杆菌感受态细胞，摇菌测序，使用中提试剂盒（Omega，D6915-04）提质粒。

实施例 6. 293T 细胞中的表达载体表达情况检测

（1）按照实施例 1 步骤（5）的方法利用 PEI（Polysciences 24765-1）将实施例 5 步骤（1）改造得到的 pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH，pAV-OPEFS-RdCVF-BGH，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH 质粒转染提前铺于 6 孔板的 293T 细胞（ATCC，CRL-3216），细胞密度为 70%左右。

（2）48 小时后收集细胞培养基上清（sup），细胞用 PBS 洗后使用 RIPA 裂解液（北京普利莱 C1053-100）裂解细胞（lys），Western blot 检测各组上清或细胞裂解液（lys）中 CYP4V2 和/或 RdCVF 的表达。所使用抗体：anti-CYP4V2 (Atlas，HPA029122)，anti-actin (Abclonal,

AC026), goat-anti-rabbit (Abclonal, AS014), RdCVF Antibody (TXNL6 Antibody，H00115861-D01P)。

结果如图 6 所示，其中 M （mock）为空白对照，C 表示 OPEFS-CYP4V2 组，C-R 表示 OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF 组，R 表示 OPEFS-RdCVF 组。空白对照组 M 组细胞的裂解液（lys）和细胞培养基上清（sup）中均没有 CYP4V2 或者 RdCVF 的表达；pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH 转染的细胞裂解液中有 CYP4V2 的表达；pAV-OPEFS-RdCVF-BGH 转染的细胞上清和裂解液中有 RdCVF 的表达；pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH 转染的细胞裂解液中有 CYP4V2 的表达，同时细胞裂解液和上清中有 RdCVF 的表达。

实施例 7. ARPE-19 细胞中的表达载体表达情况检测

（1）按照实施例 1 步骤（5）的方法利用 PEI（Polysciences 24765-1）将实施例 5 步骤（1)改造得到的 pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH，pAV-OPEFS-RdCVF-BGH，pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH 质粒转染提前铺于 6 孔板的 ARPE-19 细胞（ATCC，CRL-2302），细胞密度为 70%左右。

（2）48 小时后收集细胞培养基上清（sup），细胞用 PBS 洗后使用 RIPA 裂解液（北京普利莱 C1053-100）裂解细胞（lys），Western blot 检测各组上清或细胞裂解液（lys）中 CYP4V2 和/或 RdCVF 的表达。所使用抗体：anti-CYP4V2 (Atlas，HPA029122)，anti-actin (Abclonal, AC026), goat-anti-rabbit (Abclonal, AS014), TXNL6 Antibody (H00115861-D01P)。

结果如图 7 所示，其中 M（mock）为空白对照，C 表示 OPEFS-CYP4V2 组，C-R 表示 OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF 组，R 表示 OPEFS-RdCVF 组。空白对照组 mock 组细胞的裂解液和细胞培养基上清中均没有 CYP4V2 或者 RdCVF 的表达；pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH 转染的细胞裂解液中有 CYP4V2 的表达；pAV-OPEFS-RdCVF-BGH 转染的细胞上清和细胞裂解液中有 RdCVF 的表达；pAV-OPEFS-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH，转染的细胞裂解液中有 CYP4V2 的表达，同时上清和细胞裂解液中有 RdCVF 的表达。

实施例 8. 病毒载体

（一）AAV 血清型的选择：使用包装 GFP 报告基因的 AAV2/2, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 血清型病毒（购自山东维真生物科技有限公司），对野生型小鼠进行视网膜下腔注射。1 个月后切片进行视网膜组织形态学观察。结果如图 8 所示，双箭头表示 EGFP 报告基因的表达范围，选择对视网膜偏嗜性较好的 AAV2/8 血清型。

AAV2/8 载体的构建：

（1）在 pAAV-RC5-Amp（购自北京西美杰科技有限公司，载体序列如 SEQ ID NO: 133 所示）基础上改造。PCR 扩增除 Amp 以外的 pAAV-RC5 序列，所用引物为 RC5-F/RC5-R，

如 SEQ ID NO: 56-57 所示。

（2）Kana 部分采用 PCR 方法从 pEGFP-N1 上扩增得到，所用引物为 Kana-F/ Kana-R，如 SEQ ID NO: 58-59 所示。

（3）将以上 PCR 得到的两种 DNA 片段，采用同源重组的方法得到 pAAV-RC5-Kana.

（4）在 pAAV-RC5-Kana 的基础上改造，采用 PCR 方法扩增除 RC5-cap 以外的 pAAV-Kana 序列，所用引物为 RC5-Kana-F/ RC5-Kana-R，如 SEQ ID NO: 60-61 所示。

（5）将基因合成的 RC8-cap 序列（北京擎科生物，序列如 SEQ ID NO: 134 所示），与步骤（4）得到的 pAAV-Kana 线性化载体采用同源重组的方法得到 pAAV-RC8-Kana（即 AAV2/8），载体序列如 SEQ ID NO: 135 所示。

（二）AAV-helper 选择：选择通用型 AAV-helper 辅助质粒将抗性由氨苄改为卡纳。具体改造过程如下：

1）在 pAAV-helper-Amp（购自北京西美杰科技有限公司，载体序列如 SEQ ID NO: 136 所示）基础上改造。采用 PCR 方法扩增除 Amp 以外的 pAAV-helper 序列，所用引物为 RC5-F/RC5-R，如 SEQ ID NO: 56-57 所示。

2）Kana 部分采用 PCR 方法从 pEGFP-N1 上扩增得到，所用引物为 Kana-F/ Kana-R，如 SEQ ID NO: 58-59 所示。

3）将以上 PCR 得到的两种 DNA 片段，采用同源重组的方法得到 pAAV-helper-Kana，（即 AAV-helper），载体序列如 SEQ ID NO: 137 所示。

实施例 9. 病毒包装和纯化

（一）病毒包装

（1）第 0 天：细胞接种（接种数为 $1x10^7$），将 293T 细胞接种于 15 cm 培养皿中。

（2）第 1 天：293T 细胞量在 80%-90%时，换含 10%血清（上海吉泰依科赛，FSP500）的完全培养基（Gibco，C11965500BT）20ml，进行质粒转染，具体转染体系见表 5。

表 5 转染体系

体系组分	每 15cm 培养皿
表达载体	15μg
AAV-helper	15μg
AAV2/8	15μg
质粒 mix	45μg
无血清 DMEM(Gibco，	2000μl

C11965500BT)	
加入质粒后充分混匀，再加入 PEI	
PEI（Polysciences 24765-1）	135μl
加入 PEI 后，用手弹拨混匀（不能涡旋震荡），室温孵育 20min。	

表 5 中的表达载体为按照实施例 5 的方法构建得到的表达载体。（3）第 2 天：转染 12-18 小时后换新鲜完全培养基 30ml。

（4）第 3 天：转染 48 小时换新鲜完全培养基 30ml。

（5）第 4 天：转染 72h 后按照常规方法胰酶消化 293T 细胞，并收集至 50 ml 离心管中，用 PBS 洗两次，1200 rpm 离心 5 min，吸干 PBS，冻存于-80℃冰箱。

（二）病毒纯化

1）将本实施例步骤（5）所得的 AAV293T 细胞 15℃-25℃解冻。

2）每个 15cm 培养皿用 2 ml 细胞裂解液（150mM NaCl，50mM Tris，pH8.5）重悬细胞（每个 50ml 离心管收集了 3 个 15cm 培养皿的细胞，3 个即为 6ml 细胞裂解液）。

3）离心管内加入细胞裂解液半数体积（3ml）的氯仿，拧紧管口，水平放置于 37°C 摇床 250rpm 摇动 30min。

4）加入水相四分之一体积（1.5ml）5M 的氯化钠，混匀。转移至高速离心管，11000rpm 离心 25min。

5）取上层水相，将交界处不易吸取的部分转移至 1.5ml 离心管，12000rpm 离心 30s，合并上清，往上层水相中加入核酸酶（Benzonase）至终浓度 50 U/ml，加入脱氧胆酸纳至终浓度 0.4%，添加终浓度为 10mM 的 $MgCl_2$，0.5mM 的 $CaCl_2$，5 IU/ml 的 Turbo DNase I，25 ug/ml 的 RNaseA（储存液浓度 10mg/ml）。

6）37°C 水浴 30min。

7）加入水相四分之一（2ml）体积的 50% PEG8000，震荡混匀，冰上放置 1hr，11000rpm 离心 25min。

8）吸取并弃上清，再次离心 1min，去除残余上清。

9）按最终溶解体积需求加入 PBS，吹打悬浮，转移至 1.5ml 离心管，转移时小体积移液（<200μl），避免因沉淀粘附而损失病毒。

10）加入 500μl 氯仿，震荡，12000rpm 离心 20min。

11）无菌条件下吸取上清，分装-80℃保存。

实施例 10. 病毒滴度测定

（一）标品 pAAV-EGFP 的配制

1. 标品梯度：$1x10^8$ 拷贝/5μl，$1x10^7$ 拷贝/5μl，$1x10^6$ 拷贝/5μl，$1x10^5$ 拷贝/5μl，$1x10^4$ 拷贝/5μl，$1x10^3$ 拷贝/μl，$1x10^2$ 拷贝/5μl。

2. 稀释步骤：

a. 将原液十倍稀释后用 Nano 定量，以此定量结果为准做后续稀释。

b. 将定量后的样品逐级稀释质粒至 1ng/μl。

c. 将 1ng/μl 样品稀释至 $1x10^8$ 拷贝/μl。

d. 将 $1x10^8$ 拷贝/μl 稀释液五倍稀释至 $1x10^8$ 拷贝/5μl。

e. 依次十倍稀释至 $1x10^2$ 拷贝/5μl。

（二）样品的处理与稀释

1. 17μl DNase1+1ml 1×buffer（全式金 GD-201-01）配制成 50U/ml 的 buffer。

2. 吸取实施例 9 步骤 11）获得的待测样品 5μl 加入 95μl 步骤 1 配制的 buffer 中稀释样品（10 倍稀释）。

3. 混合均匀（涡旋振荡 5s），PCR 仪上 37℃放置 30min；75℃放置 15min。

4.震荡混匀步骤 3 的反应液，吸取其中 50μl，加入 450μl 去核酶水中，作为第一稀释梯度（200 倍稀释）。

5. 吸取步骤 4 混匀的第一梯度反应液 50μl，加入 450μl 去核酶水中，作为第二稀释梯度（2000 倍稀释）。

6. 吸取步骤 5 混匀的第一梯度反应液 50μl，加入 450μl 去核酶水中，作为第三稀释梯度（2000 倍稀释）。

（三）荧光定量 PCR

表 6 荧光定量 PCR 扩增体系：

SYBR Master Mix 2 ×（ABI, 4472908）	10 μl
10uM ITR-F（如 SEQ ID NO:154 所示）	1 μl
10 uM ITR-R（如 SEQ ID NO:155 所示）	1 μl
待测样品	5 μl
H2O	3 μl
Total	20μl

表 7 荧光定量 PCR 扩增条件（ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪）：

1 循环	1 循环	40 循环	
50℃	95℃	95℃	60℃
2 min	2 min	15 s	31s

表 8 病毒滴度定量结果

名称	Sample Name	Qty	Qty×稀释倍数	平均浓度 vg/ml
AAV-OPEFS-EGFP	E200	2.91E+08	1.16E+10	1.00E+13
	E2000	2.47E+07	9.89E+09	
	E20000	2.14E+06	8.56E+09	
AAV-OPEFS-CYP4V2	C200	8.75E+08	3.50E+10	3.06E+13
	C2000	1.35E+08	5.42E+10	
	C20000	6.51E+05	2.61E+09	

检测结果表 8 显示 AAV-OPEFS-EGFP、AAV-OPEFS-CYP4V2 病毒滴度分别为 1.00E+13vg/ml，3.06E+13vg/ml，可用于后续感染实验；本申请实施例中使用的其他病毒的滴度测定均以本实施例的方法进行。

实施例 11. 不同剂量病毒感染人 iPSC 分化的 RPE 细胞

（1）人诱导多潜能干细胞（IPSC）的制备。使用 Urineasy 尿液细胞分离试剂盒（北京赛贝，CA3102500）从尿液中提取肾上皮细胞，使用 Urineasy 尿液细胞扩增试剂盒（北京赛贝，CA3103200）培养扩增，选取 3-4 代汇合度达到 70-80%细胞进行重编程实验。重编程实验使用 hiPSC 重编程试剂盒（北京赛贝，CA5002002），按照试剂盒说明书中的操作方法进行操作，获得人 IPSC 用于下一步细胞分化实验。

（2）RPE 细胞的制备。按照文献(da Cruz, L., et al. (2018)，Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macµlar degeneration，Nat Biotechnol 36(4): 328-337.)中记载的方法制备 RPE 细胞。将 $3*10^4/cm^2$ 人 IPSC 培养于 T25 瓶的 TESR-E8 培养基 4ml（STEMCELL, CAT#05990,#05991）中，5 天后更换为含有 20%的血清替代物（Gibco，CAT#A3181502）6 ml 的培养基（Gibco，CAT#10829018），培养 2 天后换为 6 ml 无血清培养基（Gibco，CAT#10829018）继续培养约 20 周。得到椭圆形深色的可分裂细胞，即 RPE 细胞。图 9 显示了荧光显微镜（Life AMF4305）在白光下分别在 4、10、10 倍镜下观察到的肾上皮细胞、IPSC 细胞、RPE 细胞。

（3）采用剂量梯度（MOI=0，$1x10^3$，$1x10^4$，$1x10^5$）将含有 pAV-OPEFS-EGFP-BGH 或 pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH 的包装病毒感染等量人 iPSC 分化的 RPE 细胞。

（4）72h 后消化细胞，并将各组分为三份，一份用 cell titer glow（Promega，G9241）按照说明书分析细胞死亡情况。一份按照实施例 6 步骤（2）的方法 Western blot 检测 CYP4V2 的表达。一份用于提取 RNA，RT-qPCR 检测炎症因子 mRNA 水平：NLRP3,TNF-α, IFN-γ。其中，使用 RNA 提取试剂盒（天根，DP430）按照说明书提取 RNA；使用反转录试剂盒（Takara，RR407A）按照说明书反转录 cDNA。RT-qPCR 按照实施例 10 步骤（三）的方法进行，RT-qPCR 引物序列如 SEQ ID NO: 138-145 所示。

结果如图 10A-10D 显示，随着 pAV-OPEFS-EGFP-BGH 病毒滴度的增加，EGFP 表达量随之增加，炎症因子 TNF-α 和 NLRP3 表达水平随之增加，细胞死亡率随之增加；随着 pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH 病毒滴度的增加，CYP4V2 表达量随之增加，炎症因子 TNF-α 和 NLRP3 表达水平随之增加，细胞死亡率随之增加。说明对于人 iPSC 分化的 RPE 细胞，高滴度的 AAV 病毒存在细胞毒性，因此可以选择 $1x10^4$ 以下的剂量用于后续人 iPSC 分化的 RPE 细胞实验。

实施例 12. 不同病毒感染 BCD 病人 iPSC 分化的 RPE 细胞的效果

（1）按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:93 所示）；B: pAV-p5-intron-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:99 所示）；C: pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:113 所示）；D: pAV-p5-intron-EGFP-BGH。

（2）采用 MOI=$1x10^4$ 的病毒 A,B,C,D 以及 1/2 MOI 的病毒 A+1/2 MOI 的病毒 B（下文成为 E 组）感染等量 BCD 病人（基因型为 CYP4V2：c.802-8_810del17bpinsGC 纯合突变）iPSC 分化的 RPE 细胞，RPE 细胞的制备方法见实施例 11。BCD 病人为于 2018 年 11 月至 2018 年 12 月在北京大学第三医院眼科收治的患者。北京大学第三医院伦理委员会批准了本研究的所有方面，并从受试者（或其法定监护人）处获得了样品采集的知情同意书。患者尿液样本在收集后 1 小时内按照实施例 11 的方法进行操作。

（3）72h 后显微镜下观察脂质沉积情况。

（4）收细胞，收集细胞培养基上清（sup）；细胞用 PBS 洗后使用 RIPA 裂解液（北京普利莱 C1053-100）裂解细胞，得到细胞裂解液（lys），western 检测蛋白表达水平。所使用抗体：anti-CYP4V2（Atlas，HPA029122），anti-β-actin（Abclonal, AC026），goat-anti-rabbit（Abclonal, AS014），TXNL6 Antibody（H00115861-D01P）。

蛋白表达结果如图 11A 显示，无病毒感染的空白对照 M（Mock）组的 BCD 病人 iPSC 分化的 RPE 细胞无 CYP4V2 或 RdCVF 表达；感染病毒 D 组的 BCD 病人 iPSC 分化的 RPE 细胞无 CYP4V2 或 RdCVF 表达，有 EGFP 表达；感染病毒 A 组的 BCD 病人 iPSC 分化的 RPE 细胞裂解液中可检测到 CYP4V2 表达；感染病毒 B 组的 BCD 病人 iPSC 分化的 RPE 细胞上

清和细胞裂解液中可检测 RdCVF 表达；感染病毒 C 组及 E 组的 BCD 病人 iPSC 分化的 RPE 细胞裂解液中可检测到 CYP4V2 表达，同时细胞上清和细胞裂解液中可检测 RdCVF 表达。

脂质沉积观察结果如图 11B 显示，与 M 组相比，A 组、C 组和 E 组的脂质沉积情况都有改善。D 组由于 EGFP 表达与脂质染色的荧光互相感染，故不计入比较。

实施例 13. 病毒转染 BCD 小鼠的启动子选择

（1）按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:93 所示）；B: pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:90 所示）。启动子 A：p5-intron；启动子 B：OPEFS。BCD 小鼠（购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司，Cyp4v3-/-）1 月龄进行视网膜下腔注射，两种启动子病毒分别注射 10 只小鼠，双侧眼球注射治疗载体（pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:93 所示）/pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:90 所示）），注射后 3 个月观察。

视网膜下腔注射方法：

1）准备实验物品，将小鼠用 1%阿托品散瞳，后按 80 mg/kg 氯胺酮 ＋8 mg/kg 甲苯噻嗪安腹腔内注射麻醉。

2）麻醉后再次用 1%阿托品散瞳，然后将小鼠置于眼外科手术显微镜（Topcon，OMS800）的动物实验平台前方，在小鼠眼球上滴加 0.5%丙美卡因局麻。

3）以荧光素钠：病毒=100：1 的浓度在病毒里加入荧光素钠原液，用移液枪吸混。

4）用胰岛素针在小鼠眼球睫状体平坦部预扎一个小孔，用微量注射器的针头穿过该小孔后进入小鼠眼球玻璃体腔，这时在小鼠眼球上滴加适量 2%羟甲基纤维素使在镜下能见到小鼠眼底，再继续将针头避开晶状体插入对侧周边的视网膜下，缓慢推入带有荧光素钠的病毒，每只眼睛注射量为 1μl，病毒浓度为 $1x10^9$，以荧光素钠为指示剂判断是否注射入视网膜下腔。

术后用生理盐水清洗眼球表面，置于笼子里等小鼠苏醒。

（2）在体眼底照相观察结晶样沉积情况

1）取空白对照（KO）、注射启动子 A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:93 所示）、启动子 B: pAV-OPEFS -CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:90 所示）的小鼠，小鼠眼球用 1% 阿托品散瞳，后按 80 mg/kg 氯胺酮 ＋8 mg/kg 甲苯噻嗪安腹腔内注射麻醉。

2）使麻醉后的小鼠平躺于 Micro III 小动物视网膜影像系统（Phoenix Research Laboratory，Micro III）的实验台，在小鼠眼球上滴加适量 2%羟甲基纤维素以改善镜头及角膜的接触效果。

3）升降、旋转实验台调整小鼠眼睛的位置，调整焦距与光强得到小鼠眼底图像，用 Micro III 软件拍摄。

4）摄片完成后，利用 GraphPad Prism 软件进行结晶沉积定量分析。

眼底摄片结果如图 12 显示；图 13 为注射含小鼠有不同启动子的病毒后，小鼠的眼底结晶数量统计结果（n=5）。图 12 和 13 表明注射含有不同启动子的病毒后，眼底结晶沉积情况均有所改善。

（3）视网膜组织形态学观察：

1）固定脱水：颈椎脱臼处死小鼠，摘取眼球，将小鼠眼球放入 1.5ml EP 管内，加入 1ml 4% 多聚甲醛 4℃过夜。然后将眼球转入盛有 1ml 30% 蔗糖溶液的 1.5ml EP 管内脱水，眼球沉底即可。

2）将小鼠眼球放入装有冷冻包埋剂（OCT）的 1.5ml EP 管中，用镊子将小鼠眼睛摆成直视前方的方位，盖好 EP 管后放入液氮内，待完全冻上后可进行冰冻切片，切片厚度为 7μm。4℃丙酮固定 10 min 后，放入-80℃保存。

3）取出切片，待切片恢复至室温后，用 PBS 洗 3 次，每次 5min。

4）将玻片无组织处擦干，每张切片滴加 40μl 封闭液（5%驴血清），室温封闭 1h。

5）用 5%驴血清稀释一抗，滴加 40μl 左右抗体工作液，使完全覆盖小鼠眼球组织，4℃过夜。本实验所用一抗有：CYP4V2（1：50，购自 Sigma），

6）取出玻片，PBS 洗 3 次，每次 5min。

7）用 PBS 以 1:800 的比例稀释二抗（购自 Thermo Fisher Scientific），滴加 40μl 左右二抗工作液，使完全覆盖小鼠眼睛组织，室温孵育 1h。

8）PBS 洗 3 遍后，滴加 DAPI 稀释液（1：5000），室温孵育 15min。

9）在载玻片中滴加防荧光淬灭封片剂，盖上盖玻片，-20℃避光保存。

10）用配备有 NIS-Elements C 软件的尼康 A1 激光共聚焦显微镜观察，拍照。

图 14 的免疫荧光结果显示，注射启动子 A 病毒和启动子 B 病毒的 BCD 小鼠均可以表达 CYP4V2（图中双箭头指示范围）。

实施例 14. 病毒感染 BCD 小鼠的剂量选择

（1）按照实施例 13 的方法验证病毒剂量。BCD 小鼠（Cyp4v3-/-）1 月龄进行视网膜下腔注射，双侧眼球注射治疗载体 pAV-OPEFS-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:90 所示），每只眼分别注射 1E8vg，1E9vg，1E10vg 病毒。注射后 3 个月观察。

结晶样沉积情况如图 15 的摄片结果所示；图 16 为注射 1E8vg 和 1E9vg 病毒的 BCD 小鼠与未注射病毒的 BCD 小鼠相同面积眼底结晶数量的统计结果。与未注射病毒 BCD 小鼠相比，注射 1E8vg，1E9vg 病毒的 BCD 小鼠显示结晶沉积数量减少，注射 1E9vg 病毒的 BCD 小鼠结晶数量减少更明显。注射 1E10vg 病毒的 BCD 小鼠显示结晶沉积情况未见明显改善，

且损伤严重。

（2）剥离 RPE 细胞层，提 RNA，检测炎症因子 TNF-α、IFN-γ、NLRP3 的表达水平。提取 RNA 和反转录过程按照实施例 11 步骤（4）方法进行，RT-qPCR 按照实施例 10 步骤（三）的方法进行。qPCR 引物序列如 SEQ ID NO: 146-153 所示。

图 17 显示注射 1E10vg 病毒使得炎症因子 TNF-α、IFN-γ、NLRP3 表达升高，说明 1E10vg 的病毒剂量对于 BCD 小鼠有毒副反应，1E9vg 好于 1E8vg。因此，选择以 1E10vg 以下的病毒剂量病毒剂量进行后续实验。

实施例 15. 不同病毒转染 BCD 小鼠的效果

(一) p5-intron 启动子病毒感染 BCD 小鼠的效果

（1）按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p5-intron-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:93 所示）；B: pAV-p5-intron-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:99 所示）；C: pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:113 所示）。

（2）取 1 月龄 BCD 小鼠（Cyp4v3-/-）分为五组：KO 组，A 组，B 组，A+B 组，C 组，使用 1E9vg 的病毒 A,B,C 以及病毒 A+病毒 B（A、B 分别为 5E8vg），KO 组为空白对照，不做处理。按照实施例 13 的方法进行视网膜下腔注射。

（3）按照实施例 13 的方法体眼底照相观察结晶样沉积情况。图 18 显示使用不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后的 BCD 小鼠眼底摄片结果显示结晶沉积情况。图 19 为使用不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后的 BCD 小鼠眼底结晶数量统计结果（n=5）。结果表明病毒 A+B 组和病毒 C 组的小鼠结晶数量减少更显著。病毒 B 组小鼠眼底结晶情况未见明显改善。

（4）在体视网膜功能检查：视网膜电图（ERG）

1）小鼠暗适应：将小鼠暗适应至少 16 小时，之后所有操作在暗红光下进行。

2）小鼠麻醉：按 80 mg/kg 氯胺酮 + 8 mg/kg 甲苯噻嗪安腹腔内注射麻醉。

3）麻醉完成后，在暗红光照明下小鼠眼睛用 1% 阿托品散瞳，将小鼠用胶带固定放置在视觉电生理仪 Espion E2 的动物实验平台前方，双眼一致，充分暴露。将地电极针插入小鼠尾巴根部，参考电极针插入小鼠下颌，两个金环记录电极夹在动物实验平台的电极支架上，调整其角度，使其分别轻微的接触左右眼角膜的中心顶端，滴加适量 2% 羟甲基纤维素，改善金环电极及角膜的接触效果。

4）在计算机 Espion E2 系统内输入小鼠编号与月龄信息后运行程序。分别行暗适应闪光强度为 0.003，0.01，0.1，1，3，10，100 $cd \cdot s/m^2$（背景光强度为 0 $cd \cdot s/m^2$，刺激间隔为 15s，记录 3 个 ERG 信号的平均值）；明适应闪光强度为 3，10，30，100 $cd \cdot s/m^2$（明适应时间 5min，背景光强度为 30 $cd \cdot s/m^2$，刺激间隔为 15s，记录 5 个 ERG 信号的平均值）。程序运行结束后

自动保存运行结果，使用 GraphPad Prism 统计结果。

图 20 为使用不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后 BCD 小鼠的 ERG 记录结果，结果显示病毒 B 组小鼠 ERG 波幅没有明显改变，病毒 A 组，病毒 A+B 组，病毒 C 组小鼠的 ERG 波幅均有增高（$p<0.05$），且病毒 A+B 组和病毒 C 组好于病毒 A 组（$p<0.05$）。

（5）按照实施例 13 步骤（3）的方法检测 BCD 小鼠 CYP4V2、RdCVF 表达情况。RdCVF（1：50，H00115861-D01P）。

图 21 为使用不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后的 BCD 小鼠免疫荧光染色图。结果显示病毒 A 组小鼠表达 CYP4V2（双箭头指示范围），病毒 B 组小鼠表达 RdCVF（单箭头指示范围），病毒 A+B 组和病毒 C 组均可检测到 CYP4V2 和 RdCVF 的表达。

（6）小鼠眼球 RPE 铺片染色检查 RPE 细胞数量及形态

1）在 1.5mlEP 管中加入预冷的 PBS，处死小鼠后将小鼠眼球取下，浸入 PBS 中 15min。

2）将小鼠眼球转移到 1ml 4%多聚甲醛的 1.5mlEP 管中固定 1h。

3）在体视显微镜（Olympus，SZ61-SET）下去除小鼠眼球前节，将神经视网膜层与 RPE 层分离，并将 RPE 层剪成 4 瓣。

4）将 RPE 铺片放入预冷的 PBS 中清洗 3 次，每次 5min。

5）将 RPE 铺片放入 0.1% Triton 中通透 20min，后用 PBS 清洗 3 次，每次 5min。

6）将 RPE 铺片放入 96 孔板的一个孔内，加入按 1：200 比例 PBS 稀释后的 Phalloidin 工作液，室温孵育 1h。

7）PBS 清洗 3 次，每次 5min，将 RPE 铺片至于载玻片上展平，滴加少量封片剂后用盖玻片封片，在 Nikon 荧光显微镜下观察。

图 22 的 Phalloidin 标记的 F-actin 染色结果显示，注射启动子 A 病毒和启动子 B 病毒的 BCD 小鼠与未注射病毒的 BCD 小鼠相比，RPE 细胞的六边形形态更完整，排列紧密。

图 22 的 Phalloidin 标记的 F-actin 染色结果显示，B 组相对于 KO 组没有明显变化，病毒 A+B 组和 C 组相对于其他三组显示 RPE 细胞的六边形形态更完整，排列紧密，图 23 取同等面积计数 RPE 细胞数量统计结果显示，病毒 A+B 组和病毒 C 组的同等面积内 RPE 细胞数量多于病毒 A 组（$n=5$）。

综合结晶样沉积、视网膜电图（ERG）和 RPE 细胞数量及形态观察结果可知，单独表达 RdCVF（B 组）没有改善 BCD 小鼠的结晶样沉积、视网膜电图（ERG）和 RPE 细胞数量及形态的情况；RdCVF 与 CYP4V2 共表达（A+B 组和 C 组）则显著提高了单独表达 CYP4V2 对于 BCD 小鼠的结晶样沉积、视网膜电图（ERG）和 RPE 细胞数量及形态的改善情况，表明共表达 CYP4V2 和 RdCVF 相较于单独表达 CYP4V2 或 RdCVF 有明显的协同作用。

(二) 启动子后不含有内含子的病毒感染 BCD 小鼠的 ERG 效果

（1） 按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p5-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:91 所示）；B: pAV-p5-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:97 所示）；C: pAV-p5-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:107 所示）。

（2）取 1 月龄 BCD 小鼠（Cyp4v3-/-）分为五组：KO 组，A 组，B 组，A+B 组，C 组，使用 1E9vg 的病毒 A,B,C 以及病毒 A+病毒 B（A、B 分别为 5E8vg），KO 组为空白对照，不做处理。按照实施例 13 的方法进行视网膜下腔注射。

（3）按照本实施例（一）步骤（4）的方法进行在体视网膜功能检查：视网膜电图（ERG）。图 24 为使用上述不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后 BCD 小鼠的 ERG 记录结果，结果显示病毒 B 组小鼠 ERG 波幅没有明显改变，病毒 A 组，病毒 A+B 组，病毒 C 组小鼠的 ERG 波幅均有增高（$p<0.05$），且病毒 A+B 组和病毒 C 组好于病毒 A 组（$p<0.05$）。

(三) p1 启动子病毒感染 BCD 小鼠的 ERG 效果

（1） 按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p1-CYP4V2-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:92 所示）；B: pAV-p1-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:98 所示）；C: pAV-p1-CYP4V2-P2A-RdCVF-BGH（表达序列如 SEQ ID NO:108 所示）。

（2）取 1 月龄 BCD 小鼠（Cyp4v3-/-）分为五组：KO 组，A 组，B 组，A+B 组，C 组，使用 1E9vg 的病毒 A,B,C 以及病毒 A+病毒 B（A、B 分别为 5E8vg），KO 组为空白对照，不做处理。按照实施例 13 的方法进行视网膜下腔注射。

（3）按照本实施例（一）步骤（4）的方法进行在体视网膜功能检查：视网膜电图（ERG）。图 25 为使用上述不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后 BCD 小鼠的 ERG 记录结果，结果显示病毒 B 组小鼠 ERG 波幅没有明显改变，病毒 A 组，病毒 A+B 组，病毒 C 组小鼠的 ERG 波幅均有增高（$p<0.05$），且病毒 A+B 组和病毒 C 组好于病毒 A 组（$p<0.05$）。

(四) WPRE-SV40 poly A 信号位点病毒感染 BCD 小鼠的 ERG 效果

（1）按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p5-intron-CYP4V2-WPRE-SV40（表达序列如 SEQ ID NO:94 所示）；B: pAV-p5-intron-RdCVF-WPRE-SV40（表达序列如 SEQ ID NO:100 所示）；C: pAV-p5-intron-CYP4V2-P2A-RdCVF-WPRE-SV40（表达序列如 SEQ ID NO:114 所示）。

（2）取 1 月龄 BCD 小鼠（Cyp4v3-/-）分为五组：KO 组，A 组，B 组，A+B 组，C 组，使用 1E9vg 的病毒 A,B,C 以及病毒 A+病毒 B（A、B 分别为 5E8vg），KO 组为空白对照，不做处理。按照实施例 13 的方法进行视网膜下腔注射。

（3）按照本实施例（一）步骤（4）的方法进行在体视网膜功能检查：视网膜电图（ERG）。

图 26 为使用上述不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后 BCD 小鼠的 ERG 记录结果，结果显示病毒 B 组小鼠 ERG 波幅没有明显改变，病毒 A 组，病毒 A+B 组，病毒 C 组小鼠的 ERG 波幅均有增高（$p<0.05$），且病毒 A+B 组和病毒 C 组好于病毒 A 组（$p<0.05$）。

(五) 不包含信号位点病毒感染 BCD 小鼠的效果

（1）按照实施例 7 的方法包装病毒：A: pAV-p5-CYP4V2（如 SEQ ID NO:117 所示）；B: pAV-p5-RdCVF（如 SEQ ID NO:120 所示）；C: pAV-p5-CYP4V2-P2A-RdCV（如 SEQ ID NO:122 所示）。

（2）取 1 月龄 BCD 小鼠（Cyp4v3-/-）分为五组：KO 组，A 组，B 组，A+B 组，C 组，使用 1E9vg 的病毒 A,B,C 以及病毒 A+病毒 B（A、B 分别为 5E8vg），KO 组为空白对照，不做处理。按照实施例 13 的方法进行视网膜下腔注射。

（3）按照本实施例（一）步骤（4）的方法进行在体视网膜功能检查：视网膜电图（ERG）。

图 27 为使用上述不同病毒进行视网膜下腔注射治疗后 BCD 小鼠的 ERG 记录结果，结果显示，与对照相比，病毒 B 组小鼠 ERG 波幅没有明显改变，病毒 A 组，病毒 A+B 组，病毒 C 组小鼠的 ERG 波幅均有增高，且病毒 A+B 组和病毒 C 组好于病毒 A 组（$p<0.05$）。

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

权 利 要 求 书

1. CYP4V2 和 RdCVF 在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述疾病或病症包括结晶样视网膜变性。

3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的用途，其中所述 CYP4V2 为人 CYP4V2。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的用途，其中所述 CYP4V2 包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述编码 CYP4V2 的多核苷酸包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的用途，其中所述 RdCVF 为人 RdCVF。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的用途，其中所述 RdCVF 包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的用途，其中所述编码 RdCVF 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的用途，其中所述药物包含编码所述 CYP4V2 的多核苷酸以及编码所述 RdCVF 的多核苷酸。

10. 根据权利要求 1-9 所述的用途，其中所述编码 CYP4V2 的多核苷酸和所述编码 RdCVF 的多核苷酸位于不同的载体上。

11. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的用途，其中所述编码 CYP4V2 的多核苷酸和所述编码 RdCVF 的多核苷酸位于同一载体上。

12. 根据权利要求 10-11 中任一项所述的用途，其中所述载体包括病毒载体。

13. 根据权利要求 10-12 中任一项所述的用途，其中所述载体为病毒载体，其所述病毒载体包括 AAV 载体。

14. 根据权利要求 10-13 中任一项所述的用途，其中所述载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

15. 根据权利要求 10-14 中任一项所述的用途，其中所述载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

16. 根据权利要求 14-15 中任一项所述的用途，其中所述启动子包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

17. 根据权利要求 10-16 中任一项所述的用途，其中所述载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

18. 根据权利要求 10-16 中任一项所述的用途，其中所述载体还包含多聚腺苷酸信号位点，

所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

19. 根据权利要求 10-18 中任一项所述的用途，其中所述载体还包含编码自我剪切肽的多核苷酸，所述编码自我剪切肽的多核苷酸位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸与所述编码 RdCVF 的多核苷酸之间。

20. 根据权利要求 19 中任一项所述的用途，其中所述自我剪切肽包含 P2A。

21. 根据权利要求 19-20 中任一项所述的用途，其中所述编码自我剪切肽的多核苷酸包含 SEQ ID NO:22-25 中任一项所示的核苷酸序列。

22. 根据权利要求 10-21 中任一项所述的用途，其中所述载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸和所述多聚腺苷酸信号位点。

23. 根据权利要求 10-18 中任一项所述的用途，其中所述载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点；或者，所述载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

24. 根据权利要求 10-23 中任一项所述的用途，其中所述载体还包含内含子。

25. 根据权利要求 24 所述的用途，其中所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

26. 根据权利要求 24-25 中任一项所述的用途，其中所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

27. 根据权利要求 24-25 中任一项所述的用途，其中所述内含子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的用途，其中所述载体包含 SEQ ID NO: 90-116 中任一项所示的核苷酸序列。

29. 用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症的载体组合，其包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含编码 CYP4V2 的多核苷酸，所述第二载体包含编码 RdCVF 的多核苷酸。

30. 根据权利要求 29 所述的载体组合，其中所述疾病或病症包括结晶样视网膜变性。

31. 根据权利要求 29-30 中任一项所述的载体组合，其中所述 CYP4V2 为人 CYP4V2。

32. 根据权利要求 29-31 中任一项所述的载体组合，其中所述 CYP4V2 包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

33. 根据权利要求 29-32 中任一项所述的载体组合，其中所述编码 CYP4V2 的多核苷酸包含 SEQ ID NO:62-69 中任一项所示的核酸序列。

34. 根据权利要求 29-33 中任一项所述的载体组合，其中所述 RdCVF 为人 RdCVF。

35. 根据权利要求 29-34 中任一项所述的载体组合，其中所述 RdCVF 包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

36. 根据权利要求 29-35 中任一项所述的载体组合，其中所述编码 RdCVF 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

37. 根据权利要求 29-36 中任一项所述的载体组合，其中所述载体包括病毒载体。

38. 根据权利要求 29-37 中任一项所述的载体组合，其中所述载体为病毒载体，其所述病毒载体包括 AAV 载体。

39. 根据权利要求 29-38 中任一项所述的载体组合，其中所述第一载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

40. 根据权利要求 29-39 中任一项所述的载体组合，其中所述第二载体还包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

41. 根据权利要求 39-40 中任一项所述的载体组合，其中所述启动子包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

42. 根据权利要求 29-41 中任一项所述的载体组合，其中所述第一载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

43. 根据权利要求 29-42 中任一项所述的载体组合，其中所述第二载体还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

44. 根据权利要求 29-43 中任一项所述的载体组合，其中所述第一载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点；和/或，所述第二载体以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 RdCVF 的多核苷酸、所述多聚腺苷酸信号位点。

45. 根据权利要求 29-44 中任一项所述的载体组合，其中所述第一载体和/或所述第二载体还包含内含子。

46. 根据权利要求 45 所述的载体组合，其中所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

47. 根据权利要求 29-46 中任一项所述的载体组合，其中所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

48. 根据权利要求 29-47 中任一项所述的载体组合，其中所述内含子位于所述编码 RdCVF

的多核苷酸中，或者，位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端。

49. 根据权利要求 29-48 中任一项所述的载体组合，其中所述第一载体包含 SEQ ID NO: 90-95 中任一项所示的核苷酸序列；和/或，所述第二载体包含 SEQ ID NO: 96-100 中任一项所示的核苷酸序列。

50. 分离的一种或多种核酸分子，其包含 a) 编码 CYP4V2 的多核苷酸以及 b) 编码 RdCVF 的多核苷酸。

51. 根据权利要求 50 所述的分离的核酸分子，其中所述 CYP4V2 为人 CYP4V2。

52. 根据权利要求 50-51 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述 CYP4V2 包含 SEQ ID NO: 76-82 中任一项所示的氨基酸序列。

53. 根据权利要求 50-52 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述编码 CYP4V2 的多核苷酸包含 SEQ ID NO:62-68 中任一项所示的核酸序列。

54. 根据权利要求 50-53 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述 RdCVF 为人 RdCVF。

55. 根据权利要求 50-54 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述 RdCVF 包含 SEQ ID NO: 83-89 中任一项所示的氨基酸序列。

56. 根据权利要求 50-55 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述编码 RdCVF 的多核苷酸包含 SEQ ID NO: 69-75 中任一项所示的核酸序列。

57. 根据权利要求 50-56 中任一项所述的分离的核酸分子，其还包含启动子，所述启动子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 CYP4V2 的多核苷酸可操作连接。

58. 根据权利要求 50-57 中任一项所述的分离的核酸分子，其还包含启动子，所述启动子位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 5’端且与所述编码 RdCVF 的多核苷酸可操作连接。

59. 根据权利要求 57-58 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述启动子包含 SEQ ID NO:1-12 中任一项所示的核苷酸序列。

60. 根据权利要求 50-59 中任一项所述的分离的核酸分子，其包含编码 CYP4V2 的多核苷酸和编码 RdCVF 的多核苷酸。

61. 根据权利要求 50-60 所述的分离的核酸分子，其还包含编码自我剪切肽的多核苷酸，所述编码自我剪切肽的多核苷酸位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸与所述编码 RdCVF 的多核苷酸之间。

62. 根据权利要求 61 所述的分离的核酸分子，其中所述自我剪切肽包含 P2A。

63. 根据权利要求 61-62 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述编码自我剪切肽的多核苷酸包含 SEQ ID NO:22-25 中任一项所示的核苷酸序列。

64. 根据权利要求 50-63 中任一项所述的分离的核酸分子，其还包含多聚腺苷酸信号位点，

所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 3’端。

65. 根据权利要求 50-64 中任一项所述的分离的核酸分子，其还包含多聚腺苷酸信号位点，所述多聚腺苷酸信号位点位于所述编码 RdCVF 的多核苷酸的 3’端。

66. 根据权利要求 50-65 中任一项所述的分离的核酸分子，其以 5’至 3’方向依次包含：所述启动子、所述编码 CYP4V2 的多核苷酸、所述编码自我剪切肽的多核苷酸、所述编码 RdCVF 的多核苷酸和所述多聚腺苷酸信号位点。

67. 根据权利要求 50-66 中任一项所述的分离的核酸分子，其还包含内含子。

68. 根据权利要求 67 所述的分离的核酸分子，其中所述内含子包含 SEQ ID NO: 13-16 中任一项所示的核苷酸序列。

69. 根据权利要求 67-68 中任一项所述的分离的核酸分子，其中所述内含子位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸中，或者，位于所述编码 CYP4V2 的多核苷酸的 5’端。

70. 根据权利要求 50-69 中任一项所述的分离的核酸分子，其包含 SEQ ID NO: 101-115 中任一项所示的核苷酸序列。

71. 载体，其包含权利要求 50-70 中任一项所述的分离的核酸分子。

72. 根据权利要求 71 所述的载体，其为病毒载体。

73. 根据权利要求 71-72 中任一项所述的载体，其为病毒载体，且所述病毒载体包括 AAV 载体。

74. 细胞，其包含根据权利要求 50-70 中任一项所述的分离的核酸分子或根据权利要求 29-49 中任一项所述的载体组合。

75. 药物组合物，其包含权利要求 50-70 中任一项所述的分离的核酸分子，权利要求 29-49 中任一项所述的载体组合，或权利要求 74 所述的细胞。

76. 权利要求 50-70 中任一项所述的分离的核酸分子，权利要求 29-49 中任一项所述的载体组合，或权利要求 74 所述的细胞在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、缓解和/或预防与视网膜色素上皮（RPE）萎缩相关的疾病或病症。

77. 根据权利要求 76 所述的用途，其中所述疾病或病症包括结晶样视网膜变性。

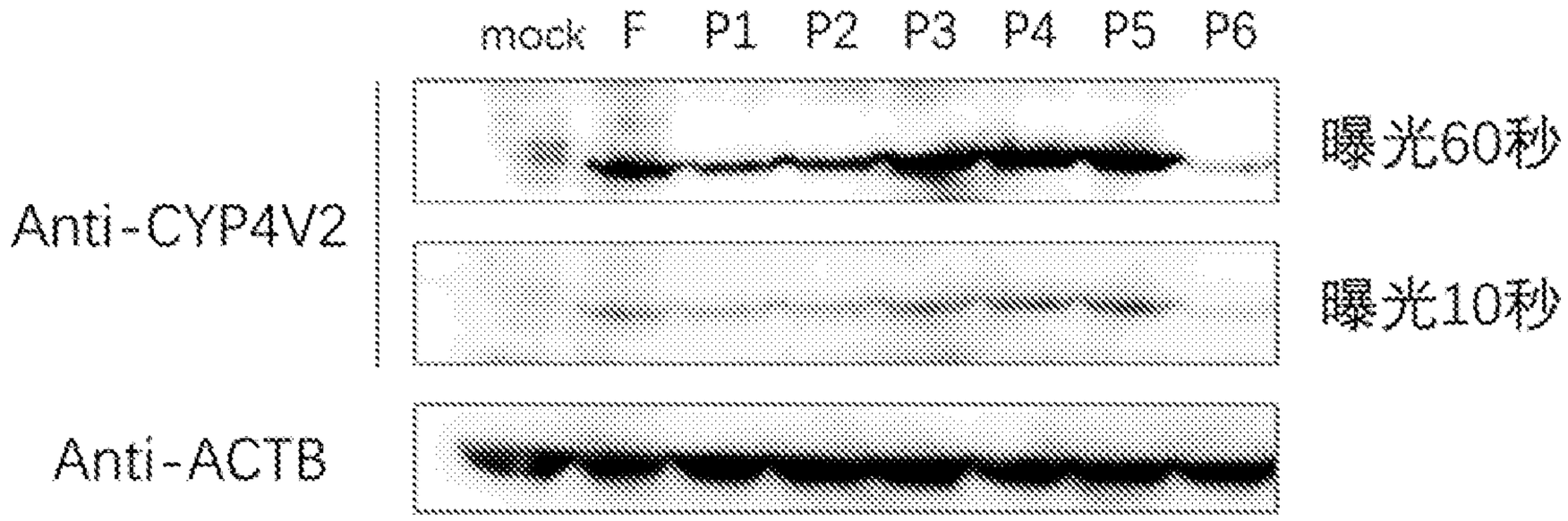

mock
F
P1
P2
P3
P4
P5
P6
Anti-CYP4V2
曝光60秒
曝光10秒
Anti-ACTB

图 1

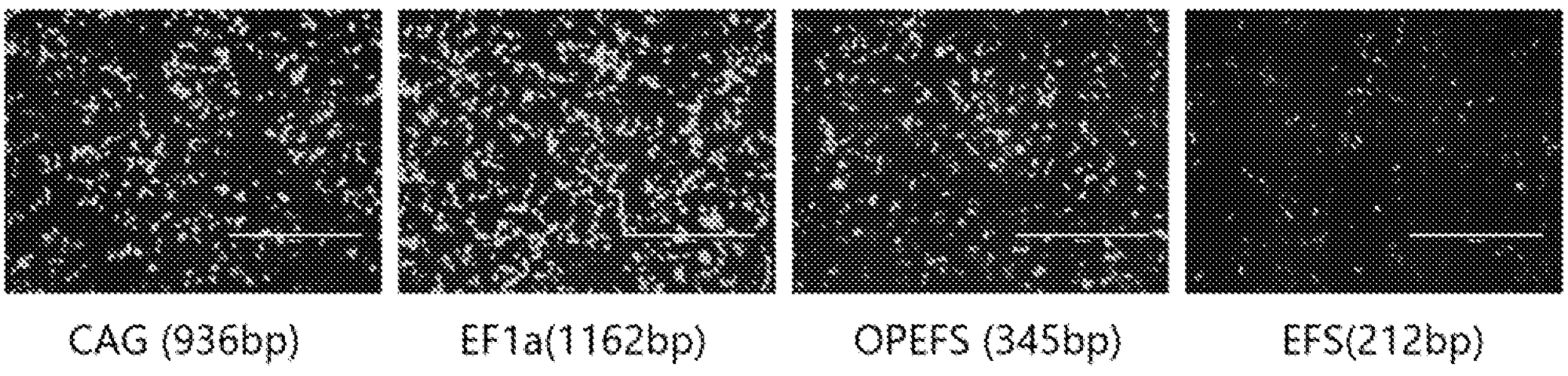

CAG (936bp)
EF1a(1162bp)
OPEFS (345bp)
EFS(212bp)

图 2

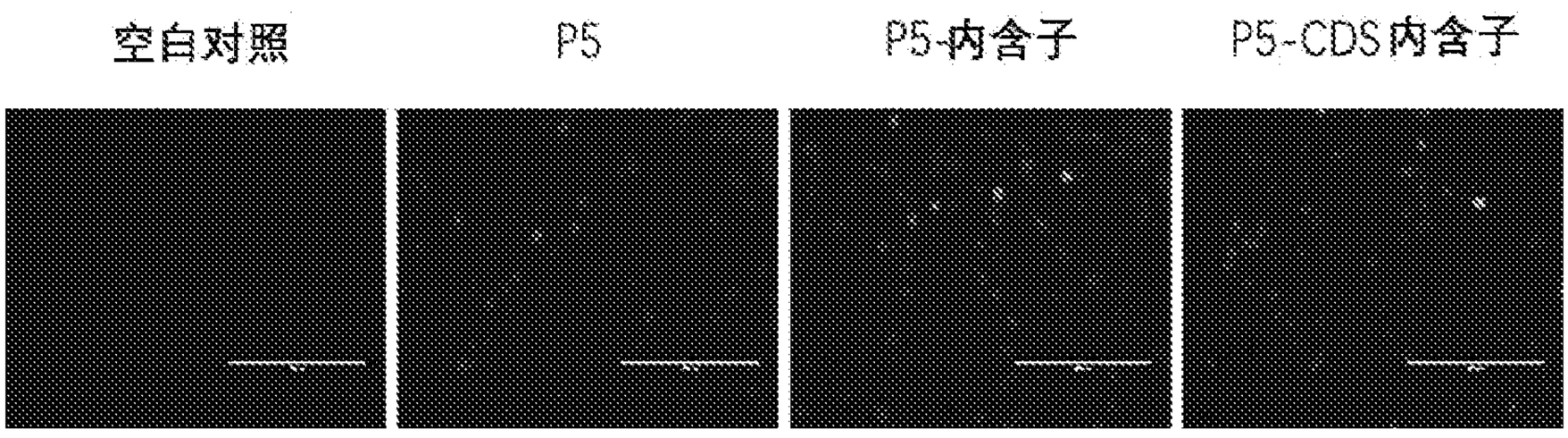

空白对照
P5
P5-内含子
P5-CDS内含子

图 3

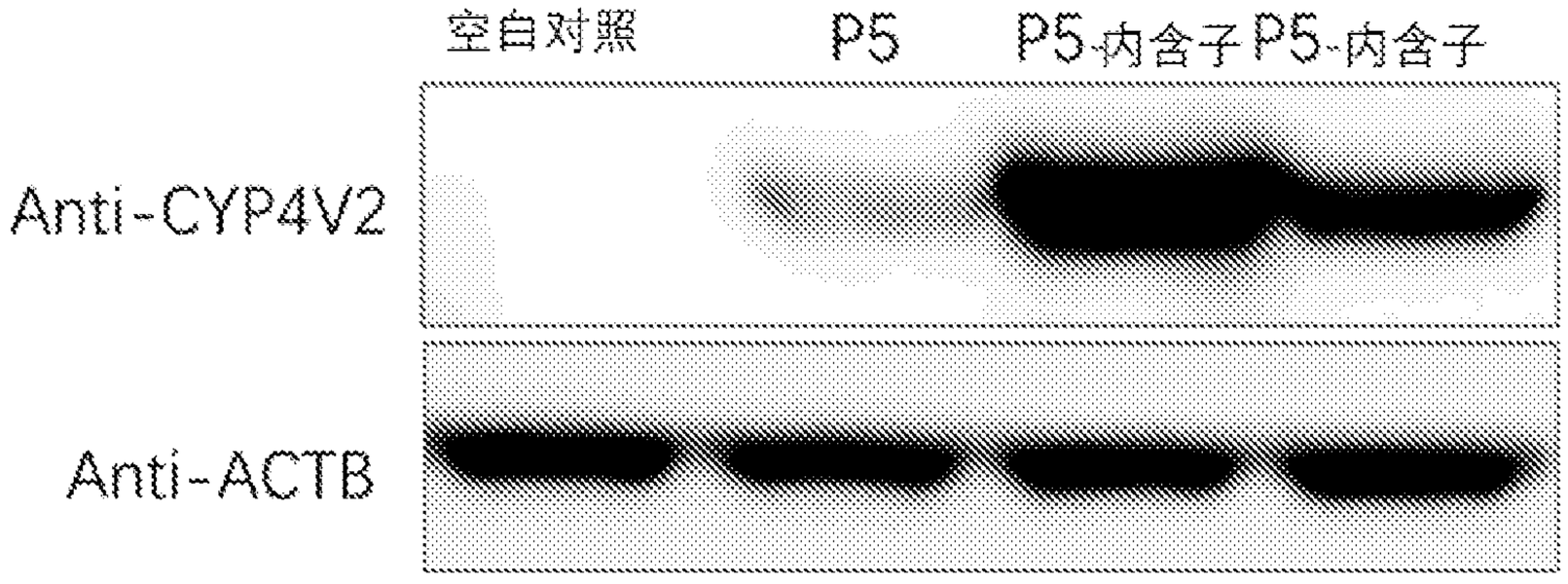

空白对照
P5
P5-内含子
P5-内含子
Anti-CYP4V2
Anti-ACTB

图 4

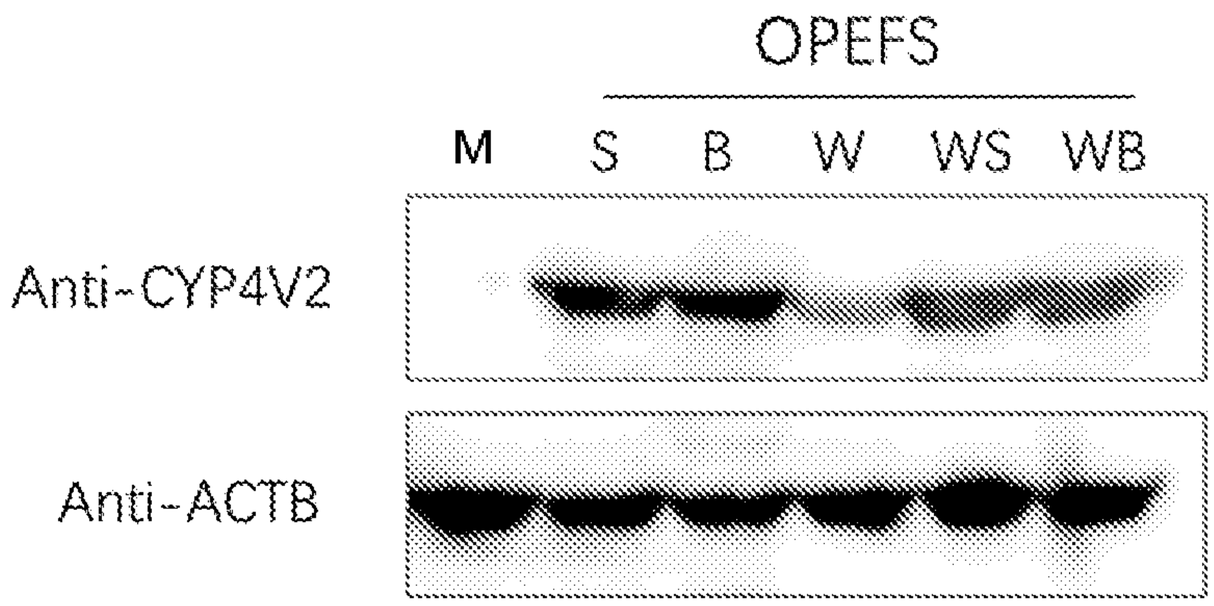

OPEFS
M
S
B
W
WS
WB
Anti-CYP4V2
Anti-ACTB

图 5

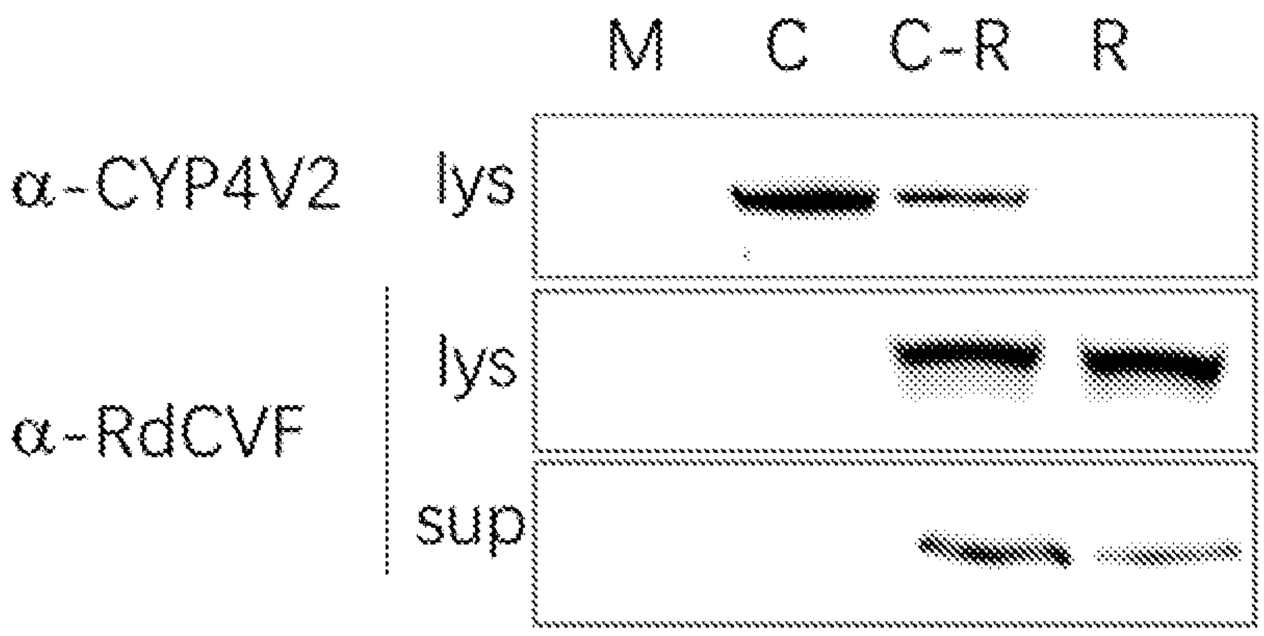

M
C
C-R
R
α-CYP4V2
lys
α-RdCVF
lys
sup

图 6

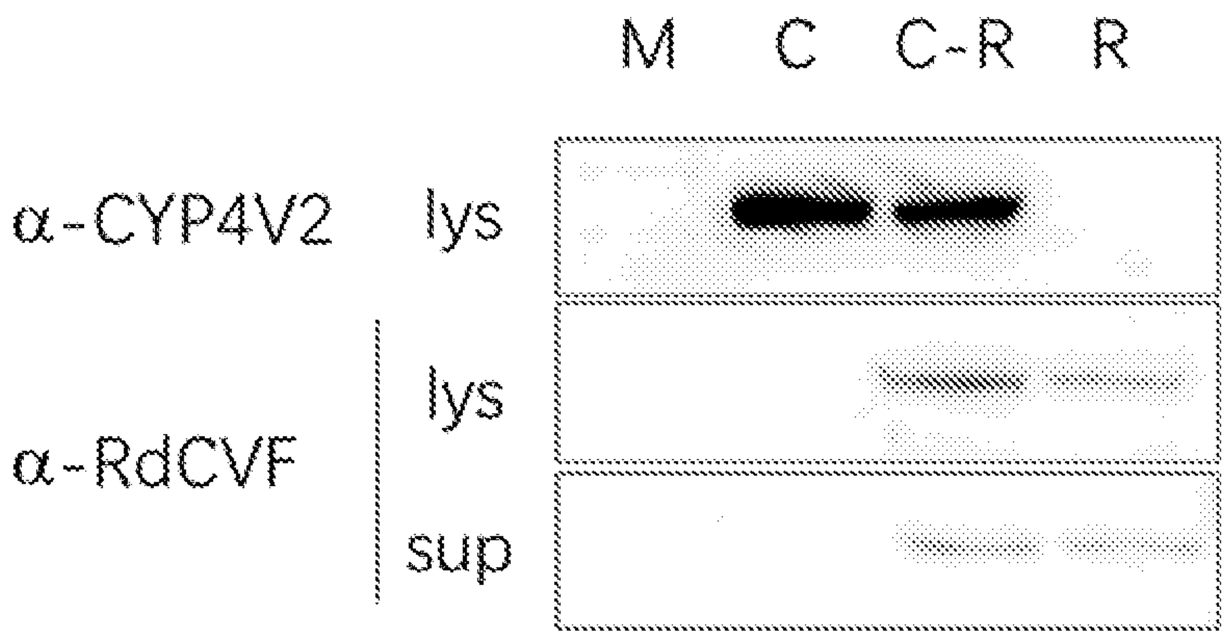

M
C
C-R
R
α-CYP4V2
lys
α-RdCVF
lys
sup

图 7

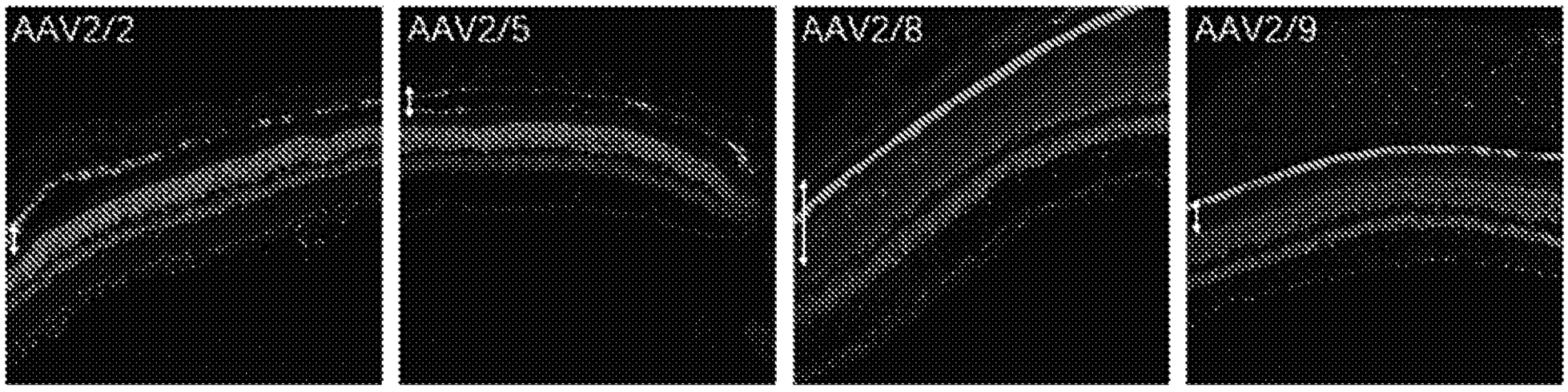

AAV2/2
AAV2/5
AAV2/8
AAV2/9

图 8

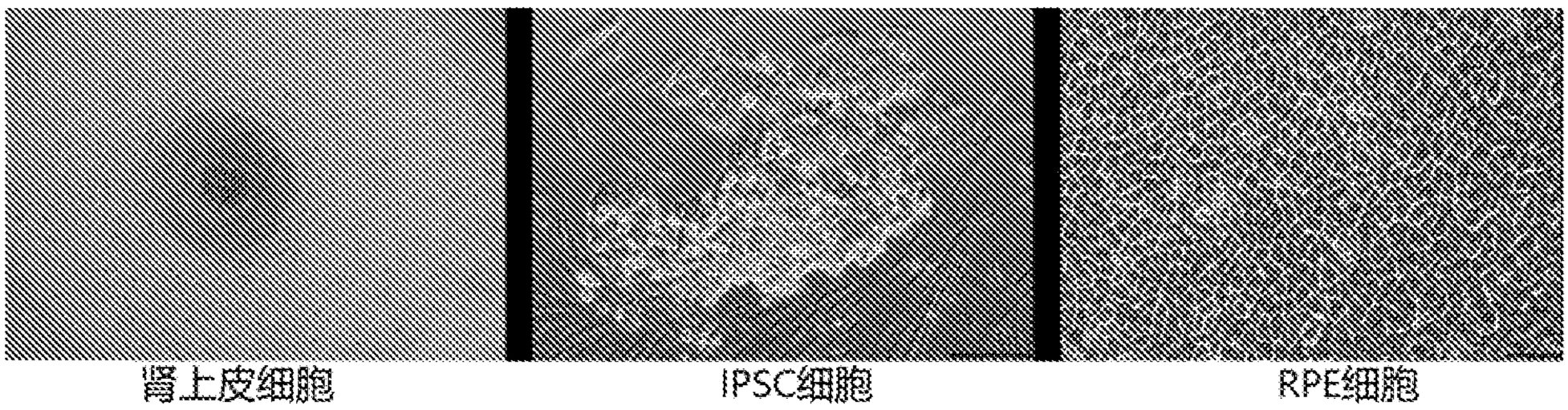

肾上皮细胞
IPSC细胞
RPE细胞

图 9

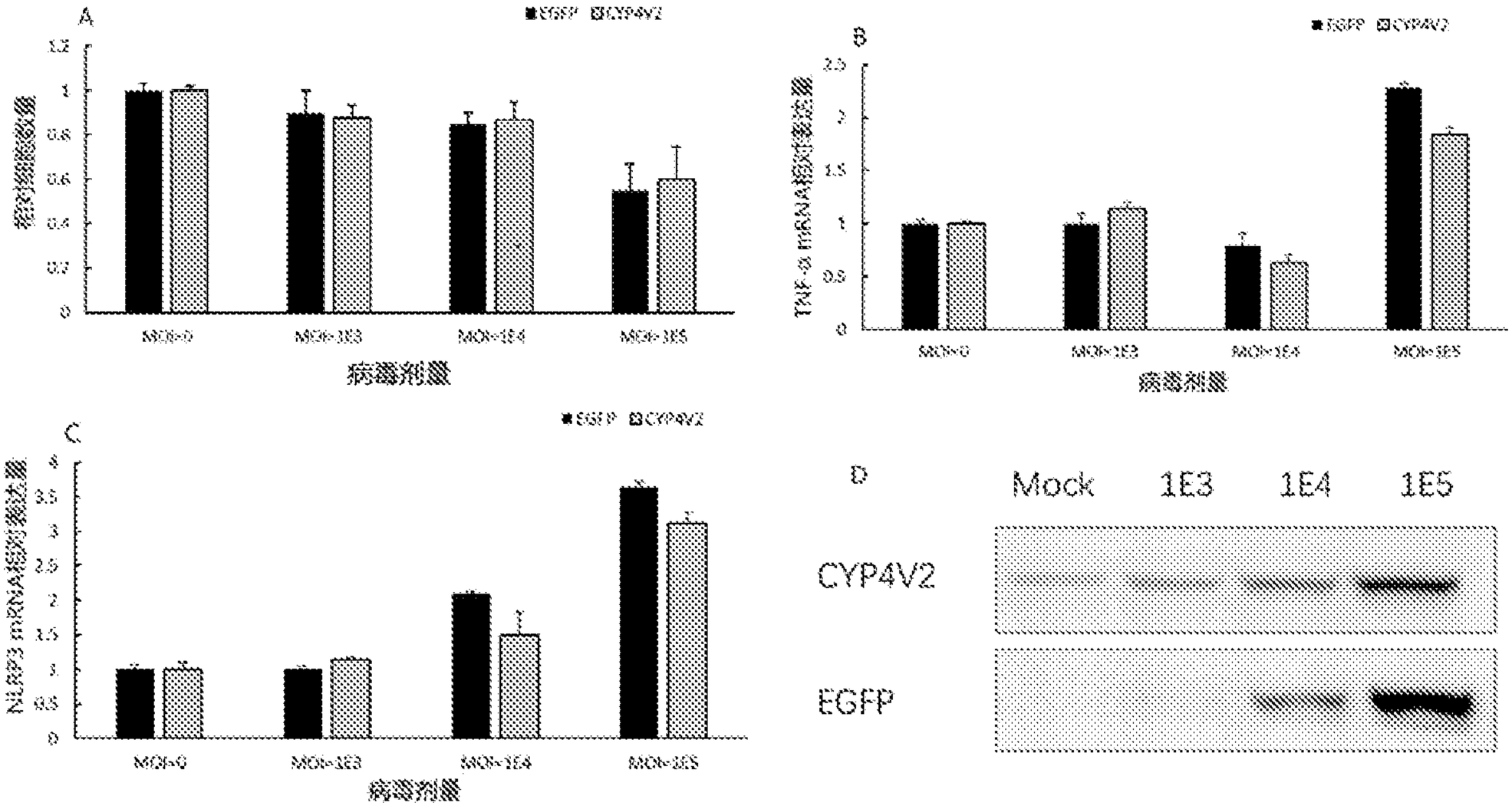

A
EGFP
CYP4V2
病毒剂量
B
TNF-α mRNA相对表达量
病毒剂量
C
NLRP3 mRNA相对表达量
病毒剂量
D
Mock
1E3
1E4
1E5
CYP4V2
EGFP

图 10

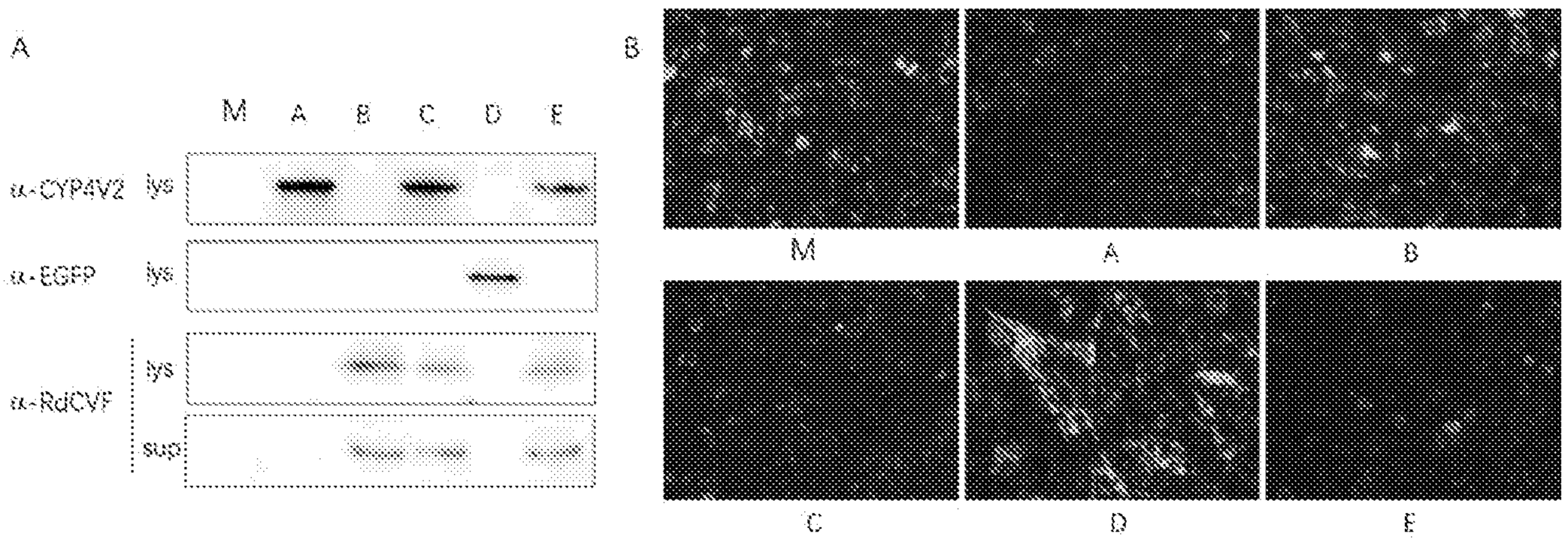

A
M
A
B
C
D
E
α-CYP4V2
lys
α-EGFP
lys
α-RdCVF
lys
sup
B
M
A
B
C
D
E

图 11

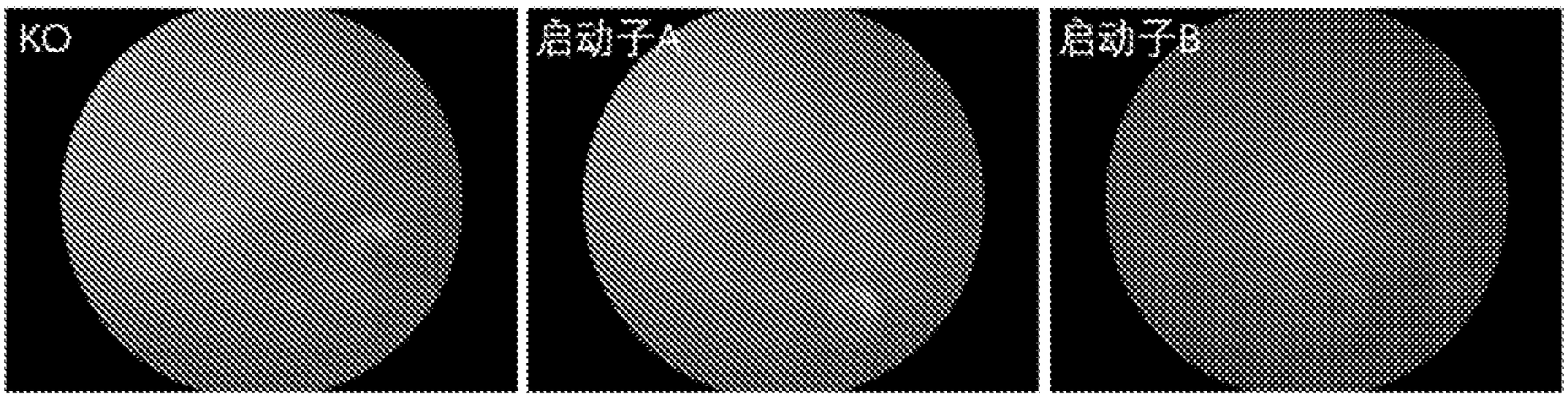


图 12

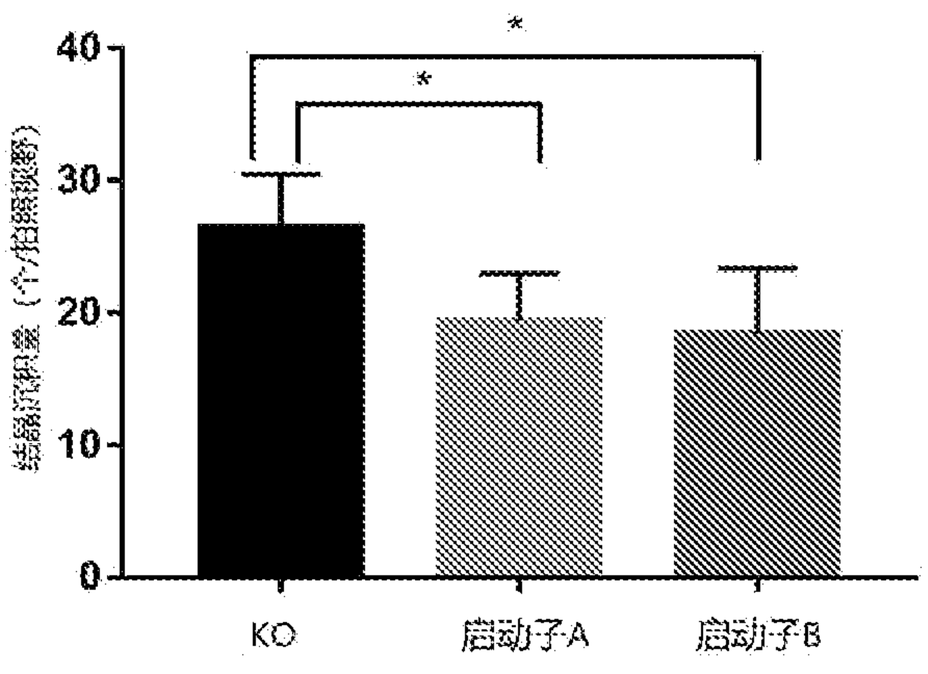


图 13

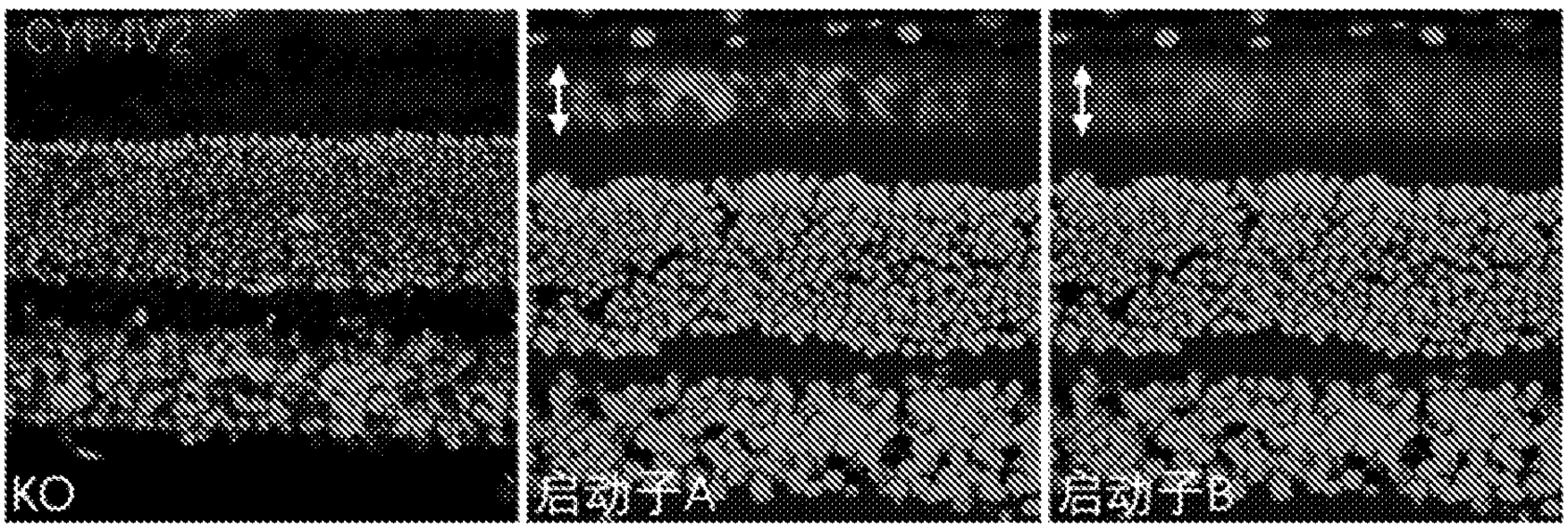


图 14

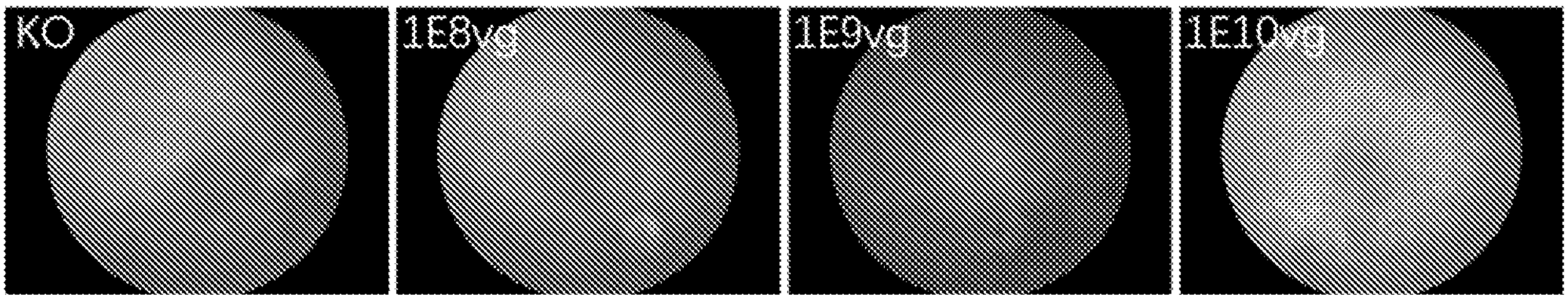


图 15

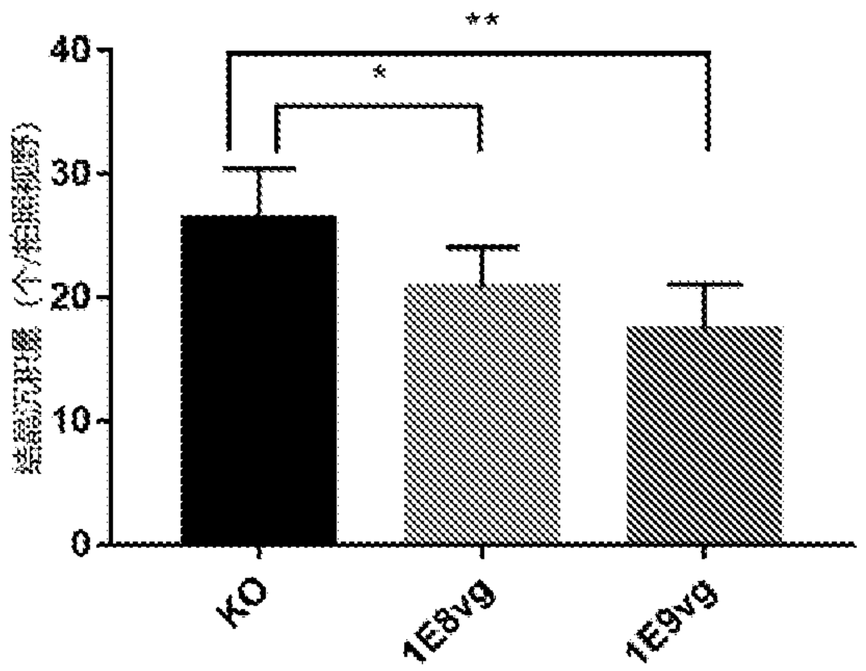

**
*
40
30
20
10
0
KO
1E8vg
1E9vg

图 16

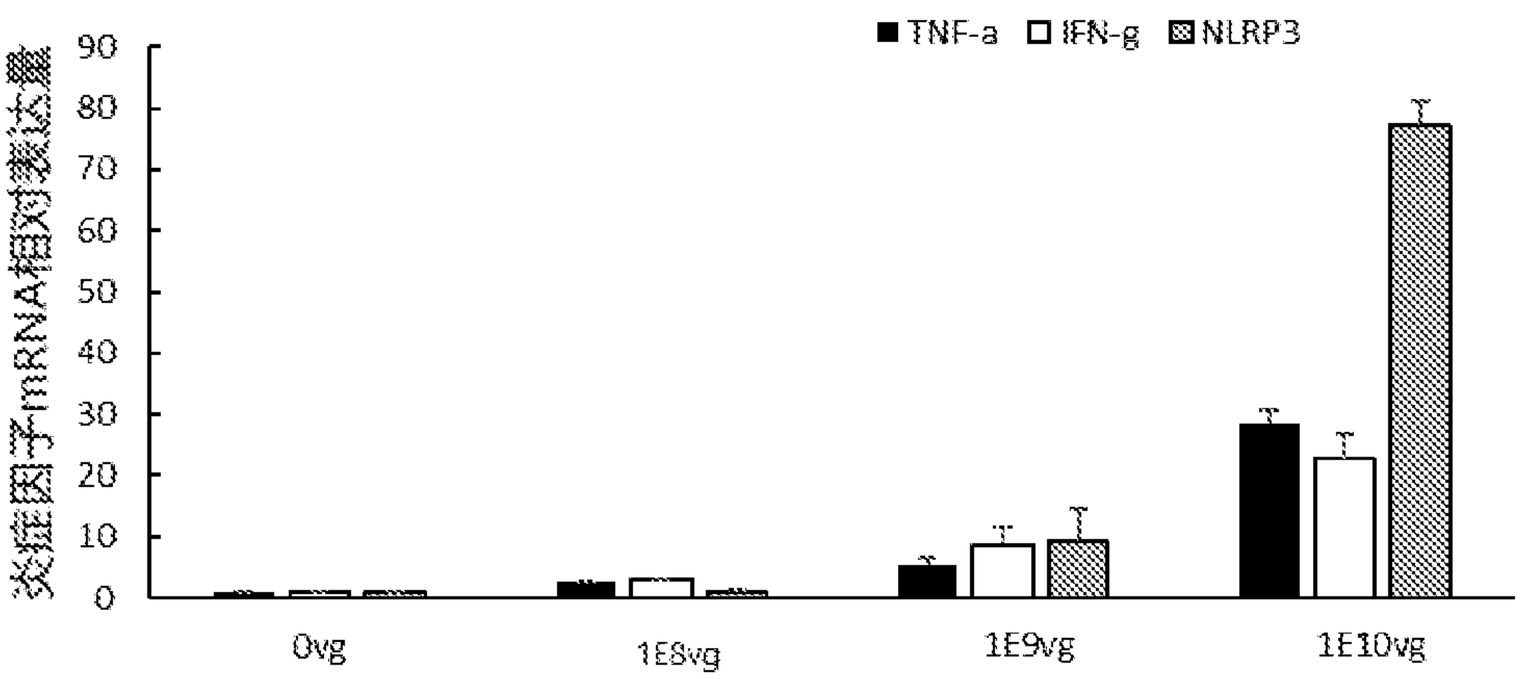

TNF-a
IFN-g
NLRP3
炎症因子mRNA相对表达量
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0vg
1E8vg
1E9vg
1E10vg

图 17

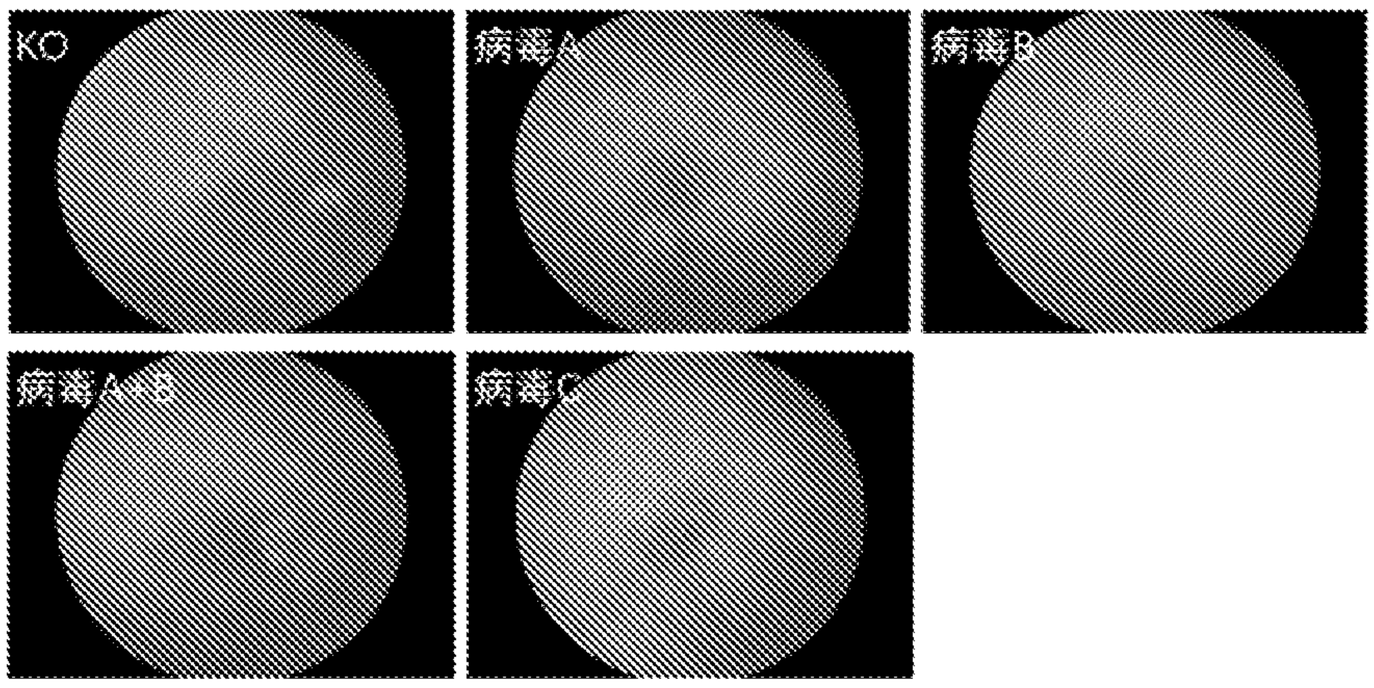

KO
病毒A
病毒B
病毒A+B
病毒C

图 18

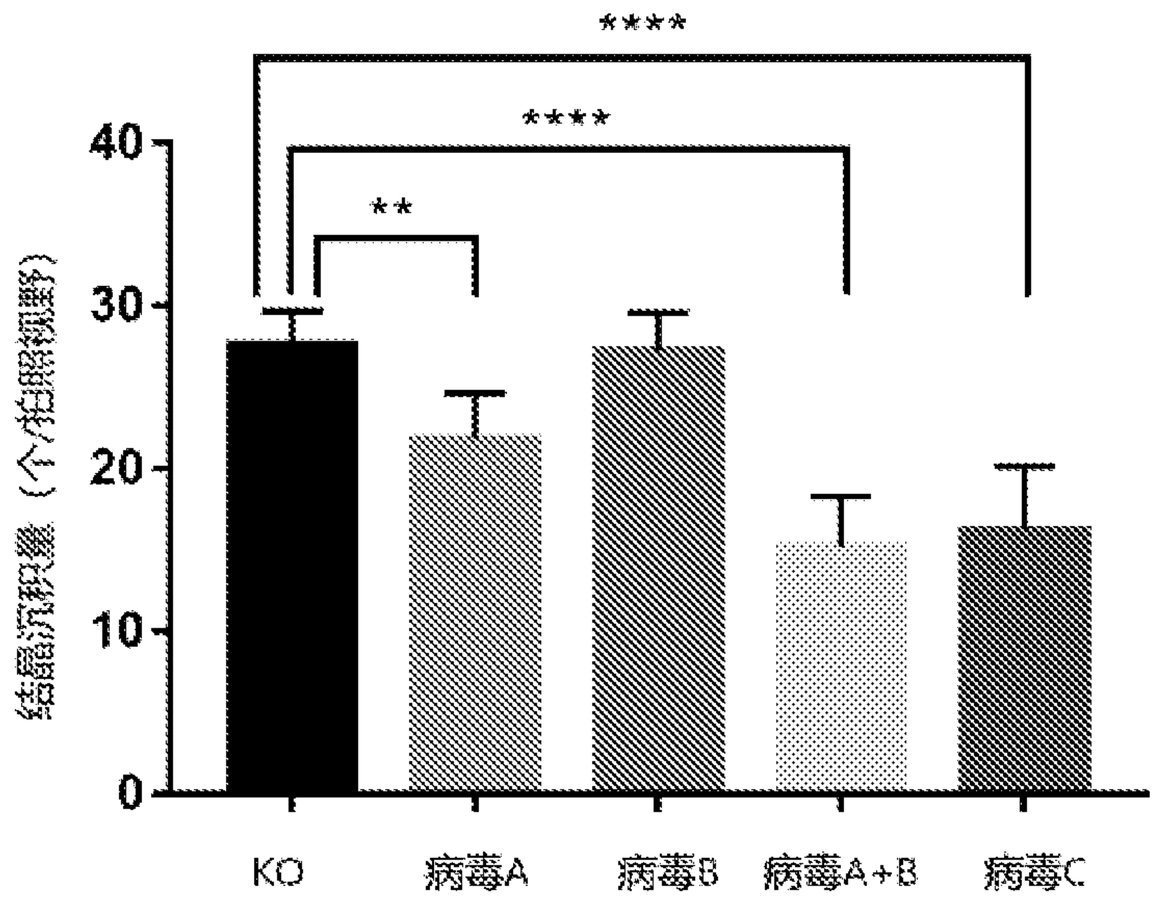

****
****
**
40
30
20
10
0
结晶沉积量（个/拍照视野）
KO
病毒A
病毒B
病毒A+B
病毒C

图 19

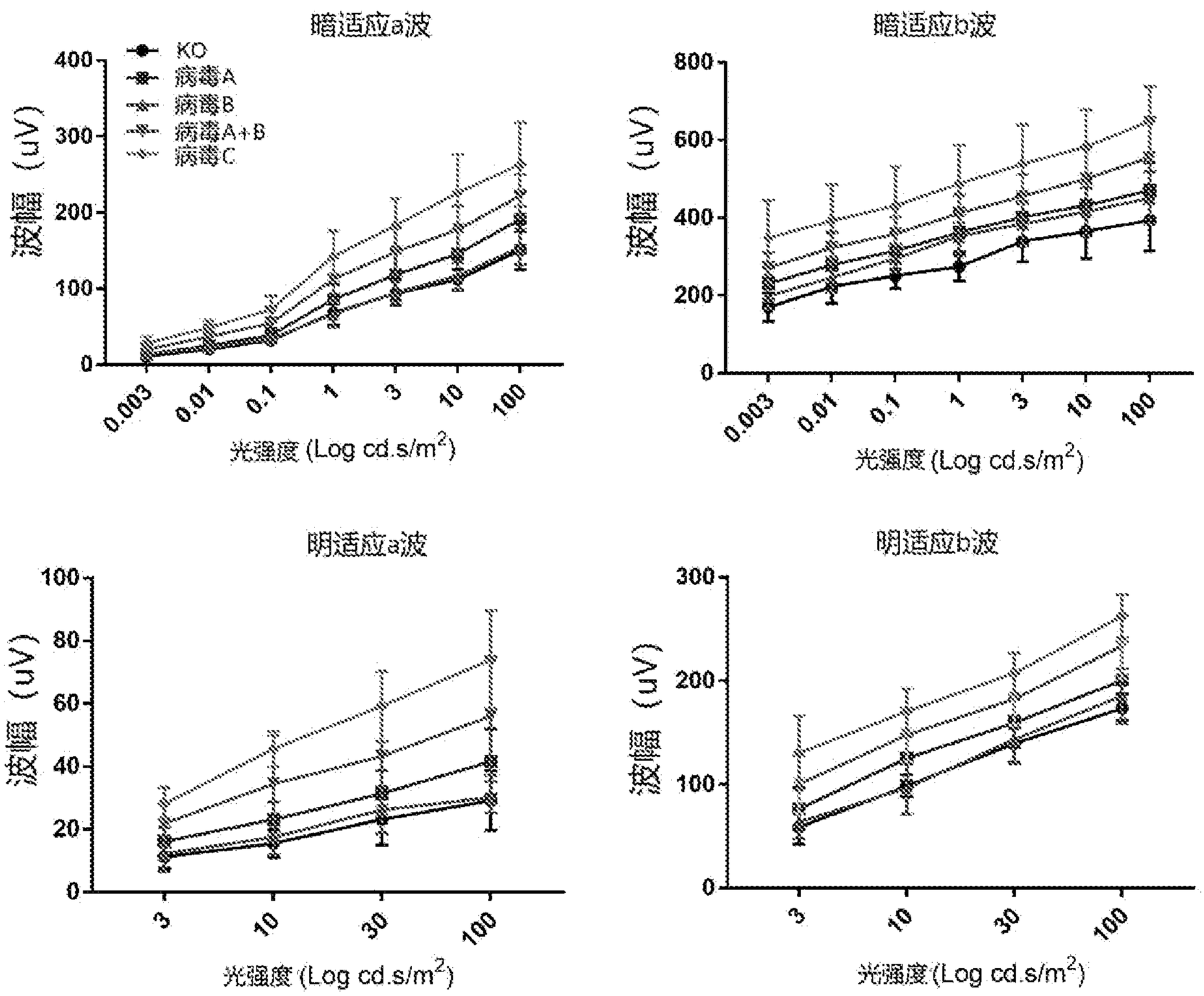

暗适应a波
暗适应b波
KO
病毒A
病毒B
病毒A+B
病毒C
波幅（uV）
光强度 (Log cd.s/m²)
明适应a波
明适应b波

图 20

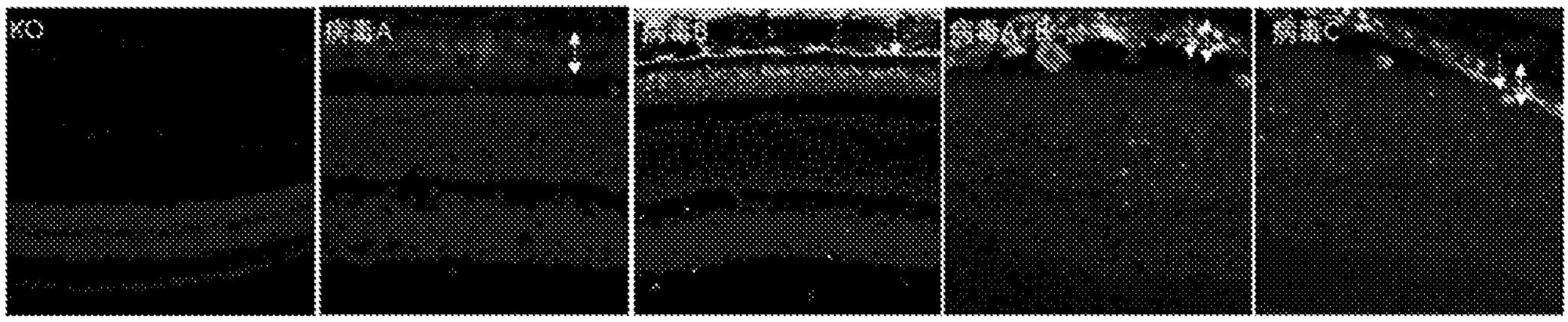

KO
病毒A
病毒B
病毒A+B
病毒C

图 21

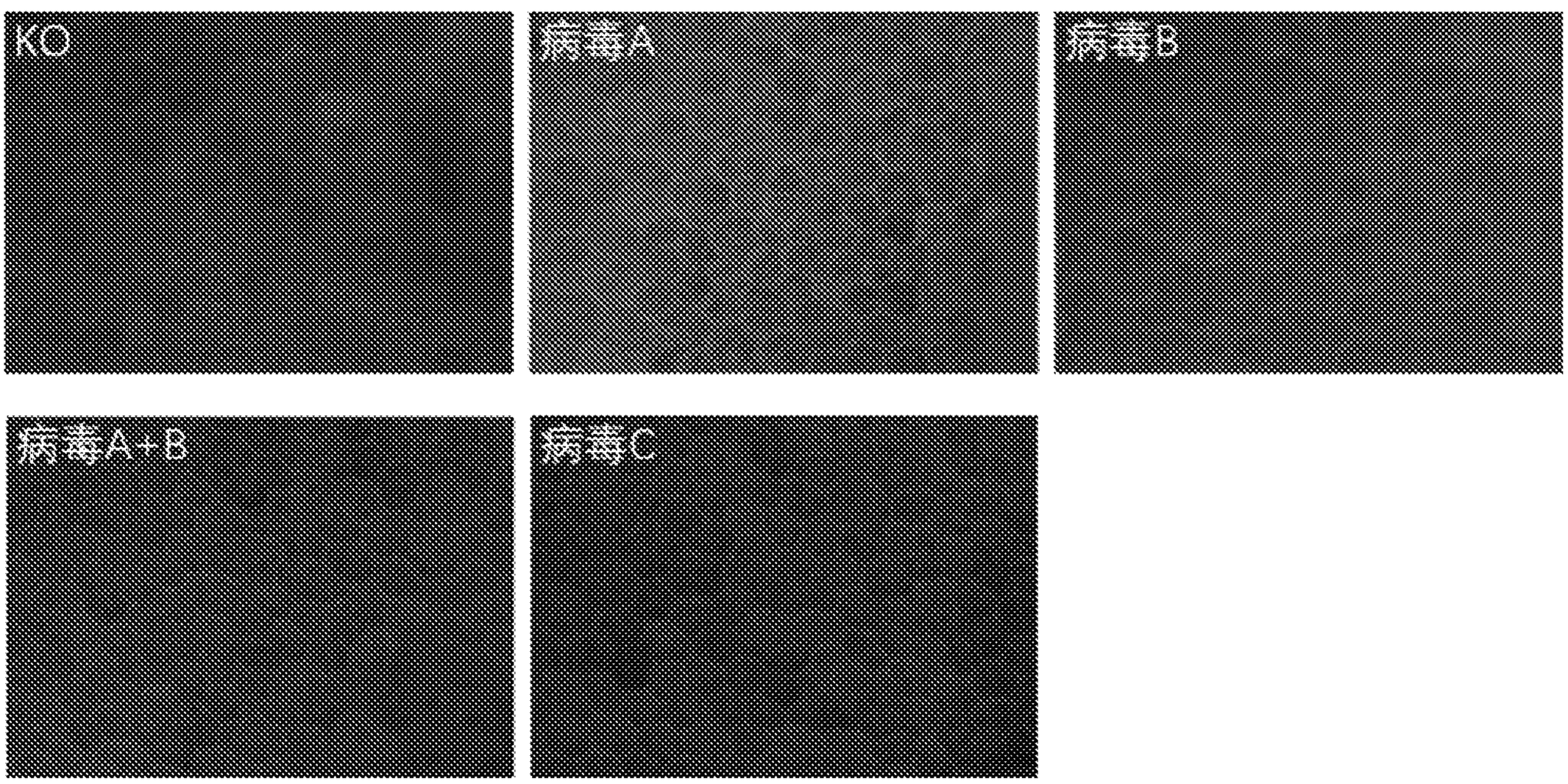

KO
病毒A
病毒B
病毒A+B
病毒C

图 22

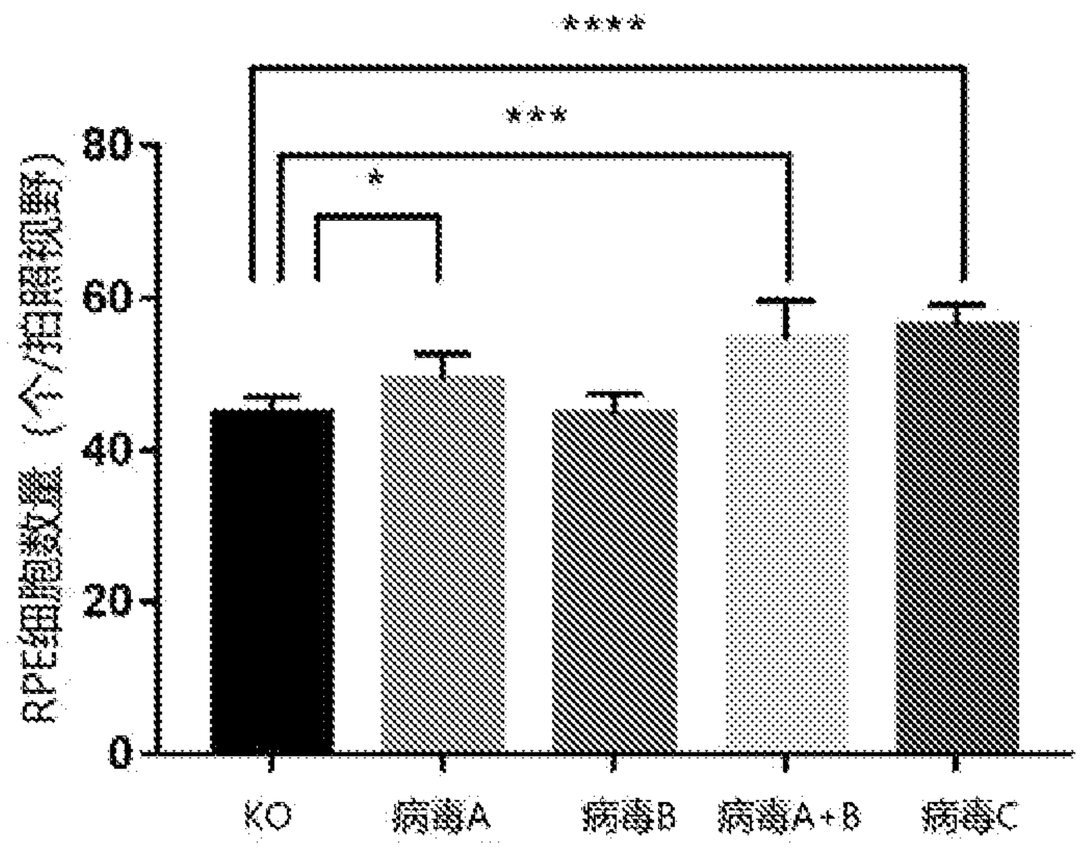

****
***
*
RPE细胞数量（个/拍照视野）
80
60
40
20
0
KO
病毒A
病毒B
病毒A+B
病毒C

图 23

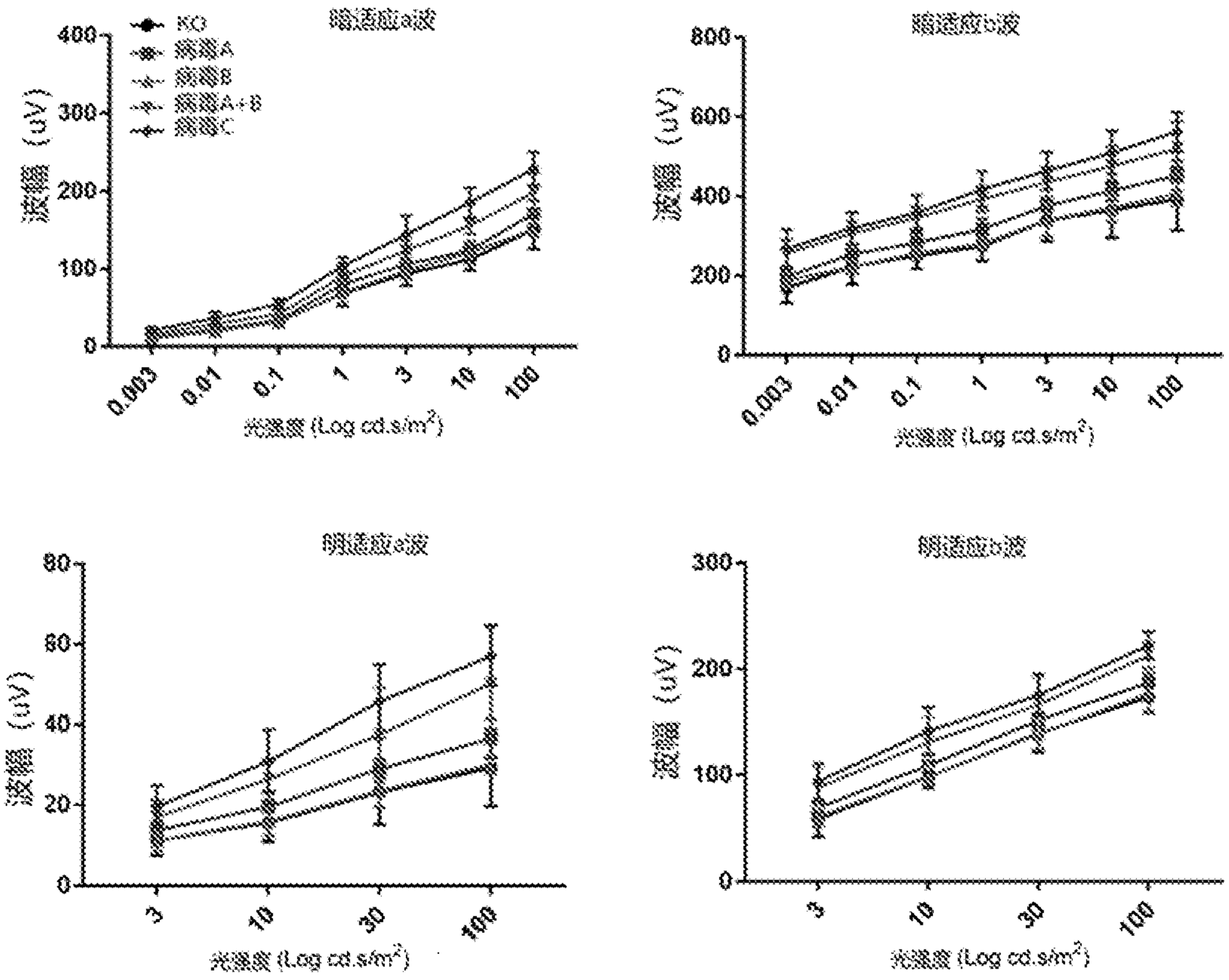

KO
400
300
200
100
0
0.003
0.01
0.1
1
3
10
100
80
60
40
20
30
光强度 (Log cd.s/m²)

图 24

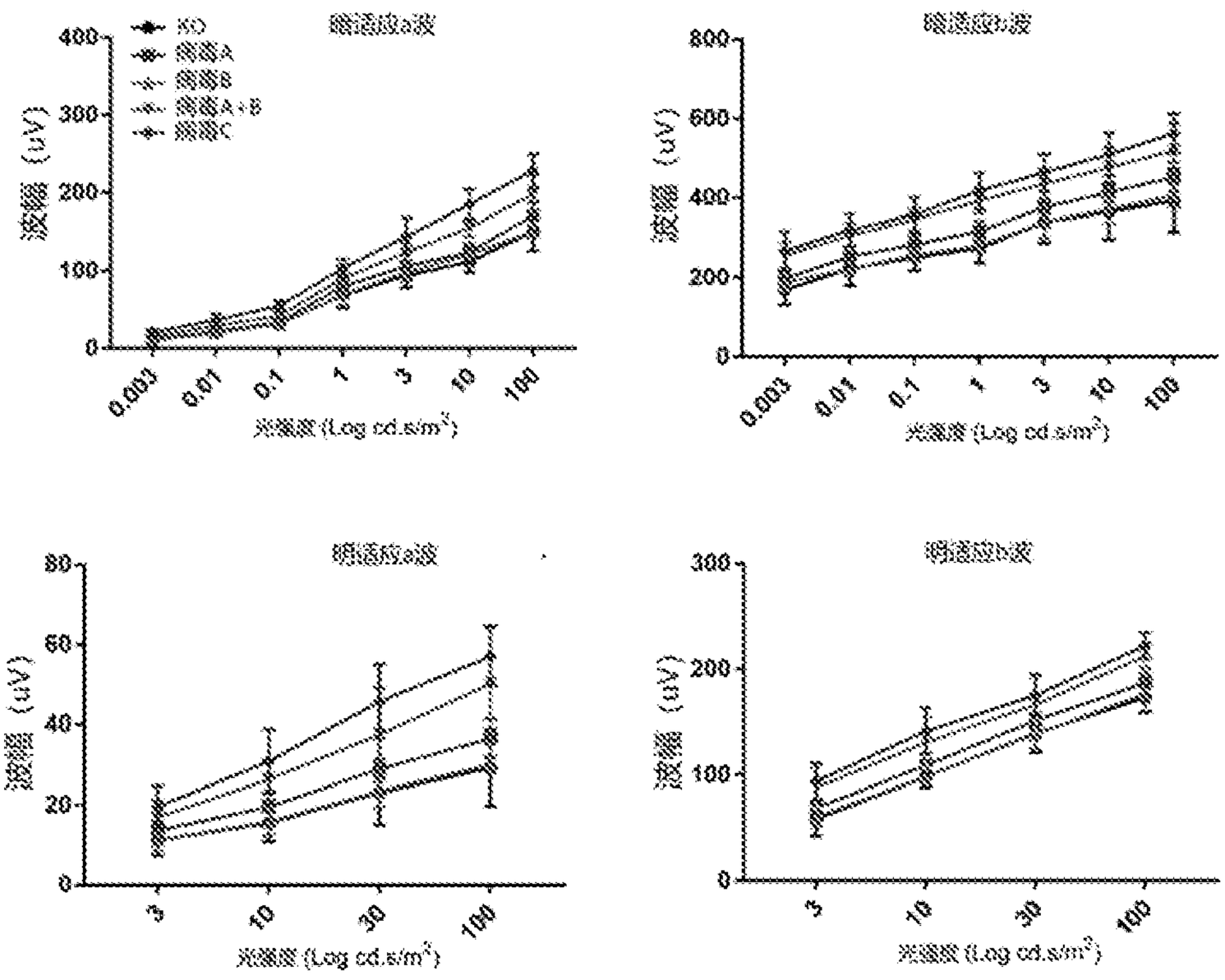

KO
800
600
400
200
300
光强度 (Log cd.s/m²)

图 25

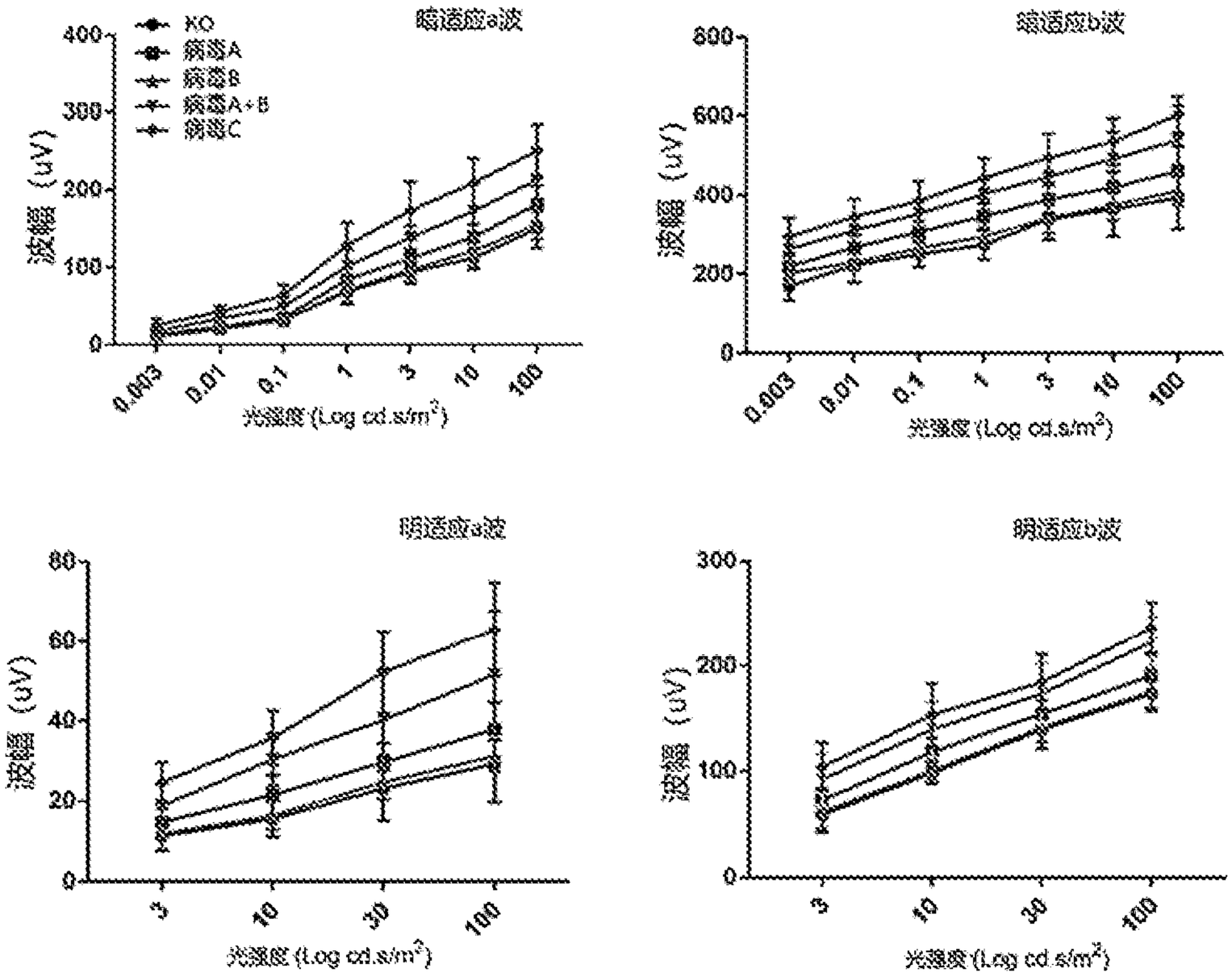

暗适应a波
暗适应b波
明适应a波
明适应b波
KO
病变A
病变B
病变A+B
病变C
波幅（uV）
光强度(Log cd.s/m²)

图 26

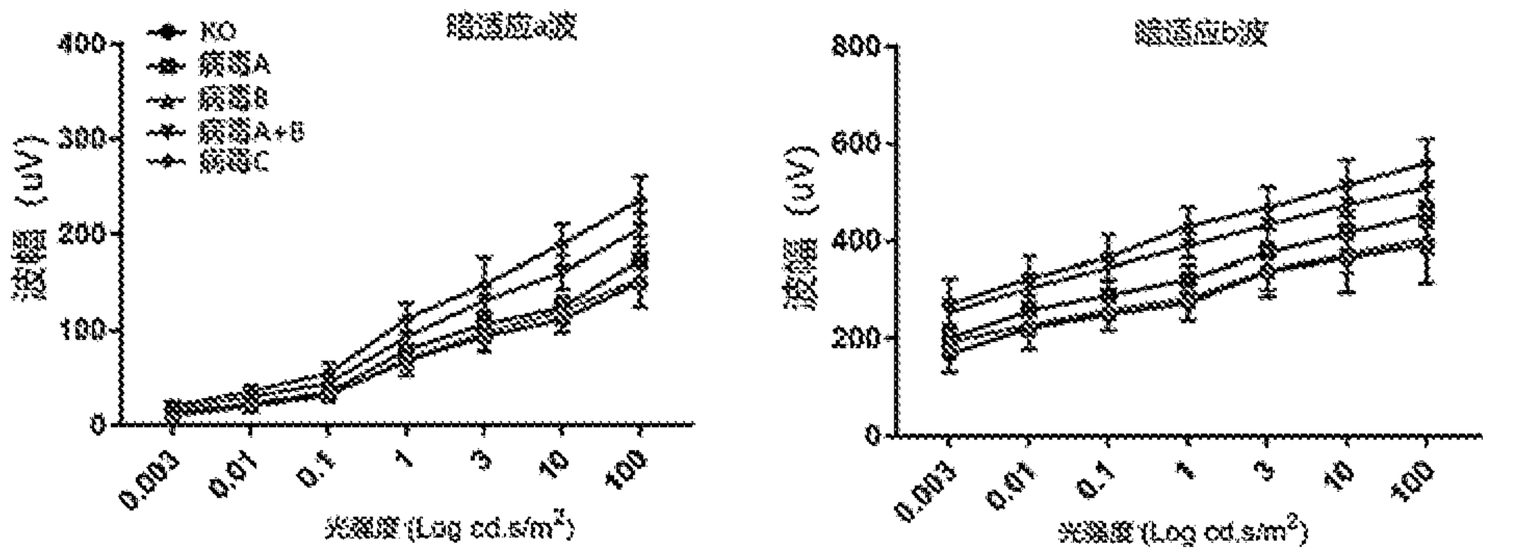

暗适应a波
暗适应b波
明适应a波
明适应b波
KO
病变A
病变B
病变A+B
病变C
波幅（uV）
光强度(Log cd.s/m²)

图 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/102292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; A61P 27/02(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)

C12N; C07K; A61P

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

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

TWTXT, VEN, CNABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方数据库, ISI, NCBI, pubmed, 百度学术: 视网膜色素上皮, RPE, RP, retinitis pigmentosa, retinal, bietti crystalline dystrophy, 视网膜变性, 结晶样视网膜变性, BCD, RdCVF, 视杆细胞源性视锥细胞生长因子, 视锥生长因子, rod derived cone survival factor, CYP4V2, 细胞色素P450, 杨丽萍, 陈邵宏, 贾睿璇, 张凡, 郝丹丹, 张天赋, 曾巧莉, 和赛超, 史天永, 裴红杰, 姜尚伟, 王旭东, 曾露颖, 序列检索

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019025984 A1 (REFLECTION BIOTECHNOLOGIES LTD.) 07 February 2019 (2019-02-07) claims 1-87, description, pages 1-2, page 63, paragraphs 3-5, SEQ ID NO:4	1-77
Y	CN 1529753 A (NOVARTIS AG et al.) 15 September 2004 (2004-09-15) claims 1-10, 20-28, description, pages 1-2, 21	1-77
Y	CN 109136266 A (SHENZHEN GOCUS BIO-TECH DEVELOPMENT CO., LTD.) 04 January 2019 (2019-01-04) claims 1-10	1-77
Y	YANG, Y. et al. "Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa" *Molecular Therapy,* Vol. 17, No. 5, 10 March 2009 (2009-03-10), pp. 787-795	1-77

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"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
21 September 2020	**19 October 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/102292

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	蔡莉 等 (Cai, li et al.). "视锥细胞生长因子（RdCVF）保护视锥细胞机制的研究 (non-official translation: Study of Protection of Cone Cells by Rod Derived Cone Survival Factor (RdCVF))" *第11次江西省中西医结合眼科年会 (non-official translation: The 11th Annual Convention of Jiangxi Provincial Integrated Chinese and Western Medicine Ophthalmology),* 31 December 2012 (2012-12-31), p. 62	1-77
A	HAMEL, C. "Retinitis pigmentosa" *Orhpanet Journal of Rare Diseases,* Vol. 1, 11 October 2006 (2006-10-11), 40 pages 1-12	1-77

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/102292

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/102292

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2019025984 A1	07 February 2019	SG 11202000840 Y A	27 February 2020
		TW 201920679 A	01 June 2019
		KR 20200036912 A	07 April 2020
		AU 2018311504 A1	12 March 2020
		EP 3662066 A1	10 June 2020
		CA 3071769 A1	07 February 2019
CN 1529753 A	15 September 2004	PL 213658 B1	30 April 2013
		US 2012108657 A1	03 May 2012
		US 2008004231 A1	03 January 2008
		JP 2005502319 A	27 January 2005
		US 2013287738 A1	31 October 2013
		FR 2823221 B1	02 April 2004
		SK 12232003 A3	02 March 2004
		BR 0208870 A	27 April 2004
		US 2012108523 A1	03 May 2012
		CZ 305800 B6	23 March 2016
		US 8114849 B2	14 February 2012
		AU 2002312794 B8	12 January 2006
		RU 2003130638 A	20 April 2005
		HU 226307 B1	28 August 2008
		EP 1379657 B1	17 August 2016
		JP 4370428 B2	25 November 2009
		EC SP024345 A	28 June 2004
		CA 2443345 A1	17 October 2002
		CZ 20032706 A3	17 December 2003
		MX PA03009114 A	22 November 2004
		PL 364681 A1	13 December 2004
		FR 2823221 A1	11 October 2002
		NZ 528376 A	30 September 2005
		BR PI0208870 B1	12 January 2016
		NO 331277 B1	14 November 2011
		SK 288465 B6	02 June 2017
		KR 20030094317 A	11 December 2003
		KR 100913258 B1	21 August 2009
		US 8518695 B2	27 August 2013
		US 8071745 B2	06 December 2011
		US 8394756 B2	12 March 2013
		US 2004204350 A1	14 October 2004
		US 7795387 B2	14 September 2010
		IL 158013 A	30 December 2010
		NO 20034452 L	04 December 2003
		IL 199316 A	31 January 2011
		ZA 200307403 A	21 April 2004
		JP 2009232843 A	15 October 2009
		HU 0303730 A2	28 February 2006
		RU 2384586 C2	20 March 2010
		ES 2597835 T3	23 January 2017
		US 2009062188 A1	05 March 2009
		WO 02081513 A3	01 May 2003
		US 8957043 B2	17 February 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/102292

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 1379657 A2	14 January 2004
		ZA 200307403 B	21 April 2004
		AU 2002312794 B2	01 December 2005
		CA 2443345 C	04 December 2012
		NO 20034452 A	04 December 2003
CN 109136266 A	04 January 2019	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/102292

A. 主题的分类

C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C07K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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））

TWTXT, VEN, CNABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方数据库, ISI, NCBI, pubmed, 百度学术:视网膜色素上皮, RPE, RP, retinitis pigmentosa, retinal, bietti crystalline dystrophy, 视网膜变性, 结晶样视网膜变性, BCD, RdCVF, 视杆细胞源性视锥细胞生长因子, 视锥生长因子, rod derived cone survival factor, CYP4V2, 细胞色素P450, 杨丽萍, 陈邵宏, 贾睿璇, 张凡, 郝丹丹, 张天赋, 曾巧莉, 和赛超, 史天永, 裴红杰, 姜尚伟, 王旭东, 曾露颖, 序列检索

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
Y	WO 2019025984 A1 (REFLECTION BIOTECHNOLOGIES LTD.) 2019年 2月 7日 (2019-02-07) 权利要求1-87、说明书第1-2页、第63页第3-5段、SEQ ID NO:4	1-77
Y	CN 1529753 A (诺瓦提斯公司 等) 2004年 9月 15日 (2004-09-15) 权利要求1-10、20-28、说明书第1-2、21页	1-77
Y	CN 109136266 A (深圳泓熙生物科技发展有限公司) 2019年 1月 4日 (2019-01-04) 权利要求1-10	1-77
Y	YANG, Y.等. "Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa" Molecular Therapy, 第17卷, 第5期, 2009年 3月 10日 (2009-03-10), 第787-795页	1-77
Y	蔡莉 等. "视锥细胞生长因子（RdCVF）保护视锥细胞机制的研究" 第11次江西省中西医结合眼科年会, 2012年 12月 31日 (2012-12-31), 第62页	1-77

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"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）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"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

"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

"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

"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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 9月 21日	2020年 10月 19日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 罗洋 电话号码 86-(10)-53961959

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/102292

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	HAMEL, C. "Retinitis pigmentosa" Orhpanet Journal of Rare Diseases, 第1卷, 2006年 10月 11日 (2006-10-11), 40第1-12页	1-77

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/102292

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/102292

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)
WO	2019025984	A1	2019年 2月 7日	SG	11202000840Y	A	2020年 2月 27日
				TW	201920679	A	2019年 6月 1日
				KR	20200036912	A	2020年 4月 7日
				AU	2018311504	A1	2020年 3月 12日
				EP	3662066	A1	2020年 6月 10日
				CA	3071769	A1	2019年 2月 7日
CN	1529753	A	2004年 9月 15日	PL	213658	B1	2013年 4月 30日
				US	2012108657	A1	2012年 5月 3日
				US	2008004231	A1	2008年 1月 3日
				JP	2005502319	A	2005年 1月 27日
				US	2013287738	A1	2013年 10月 31日
				FR	2823221	B1	2004年 4月 2日
				SK	12232003	A3	2004年 3月 2日
				BR	0208870	A	2004年 4月 27日
				US	2012108523	A1	2012年 5月 3日
				CZ	305800	B6	2016年 3月 23日
				US	8114849	B2	2012年 2月 14日
				AU	2002312794	B8	2006年 1月 12日
				RU	2003130638	A	2005年 4月 20日
				HU	226307	B1	2008年 8月 28日
				EP	1379657	B1	2016年 8月 17日
				JP	4370428	B2	2009年 11月 25日
				EC	SP024345	A	2004年 6月 28日
				CA	2443345	A1	2002年 10月 17日
				CZ	20032706	A3	2003年 12月 17日
				MX	PA03009114	A	2004年 11月 22日
				PL	364681	A1	2004年 12月 13日
				FR	2823221	A1	2002年 10月 11日
				NZ	528376	A	2005年 9月 30日
				BR	PI0208870	B1	2016年 1月 12日
				NO	331277	B1	2011年 11月 14日
				SK	288465	B6	2017年 6月 2日
				KR	20030094317	A	2003年 12月 11日
				KR	100913258	B1	2009年 8月 21日
				US	8518695	B2	2013年 8月 27日
				US	8071745	B2	2011年 12月 6日
				US	8394756	B2	2013年 3月 12日
				US	2004204350	A1	2004年 10月 14日
				US	7795387	B2	2010年 9月 14日
				IL	158013	A	2010年 12月 30日
				NO	20034452	L	2003年 12月 4日
				IL	199316	A	2011年 1月 31日
				ZA	200307403	A	2004年 4月 21日
				JP	2009232843	A	2009年 10月 15日
				HU	0303730	A2	2006年 2月 28日
				RU	2384586	C2	2010年 3月 20日
				ES	2597835	T3	2017年 1月 23日
				US	2009062188	A1	2009年 3月 5日
				WO	02081513	A3	2003年 5月 1日
				US	8957043	B2	2015年 2月 17日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/102292

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		EP	1379657	A2	2004年 1月 14日
		ZA	200307403	B	2004年 4月 21日
		AU	2002312794	B2	2005年 12月 1日
		CA	2443345	C	2012年 12月 4日
		NO	20034452	A	2003年 12月 4日
CN 109136266 A	2019年 1月 4日	无			