

(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
2022 年 4 月 21 日 (21.04.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/077233 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/12 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

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

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/120692

(22) 国际申请日: 2020 年 10 月 13 日 (13.10.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 北京中因科技有限公司 (**CHIGENOV 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)。 孟祥 (**MENG, Xiang**); 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)。 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)。 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)。 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)。 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)。 卢化 (**LU, Hua**); 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: 上海巔石知识产权代理事务所 (普通合伙) (**SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.**); 中国上海市浦东新区盛夏路 608 号 2 号楼 103 室/张琤、蒋舫玮, 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, 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)。

本国际公布:

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

(54) **Title:** NUCLEIC ACID MOLECULE FOR TREATING BIETTI CRYSTALLINE DYSTROPHY, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 用于治疗结晶样视网膜变性的核酸分子及其用途

(57) **Abstract:** A gRNA of a targeting cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2 (CYP4V2), a donor nucleic acid molecule containing a human CYP4V2 nucleotide sequence, and an application of the gRNA and the donor nucleic acid molecule in treating Bietti crystalline dystrophy.

(57) 摘要: 一种靶向细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 多肽 2 (CYP4V2) 的 gRNA, 含有人 CYP4V2 核苷酸序列的供体核酸分子, 以及所述 gRNA 和所述供体核酸分子在治疗结晶样视网膜变性中的应用。



WO 2022/077233 A1

用于治疗结晶样视网膜变性的核酸分子及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种用于基因编辑治疗结晶样视网膜变性的 gRNA 和供体核酸分子。

背景技术

结晶样视网膜变性 ((Bietti crystalline dystrophy, BCD)，又称为结晶样视网膜色素变性、结晶样角膜视网膜变性 (Bietti Crystalline Corneoretinal Dystrophy)、结晶样视网膜病变 (Bietti Crystalline Retinopathy)、Bietti 视网膜变性 (Bietti's Retinal Dystrophy)) 是一种致盲性的常染色体隐性遗传性视网膜变性疾病。CYP4V2 基因是目前发现的 BCD 致病基因之一 (Li 等, Am J Hum Genet. 74:817-826, 200)。CYP4V2 属于细胞色素 P450 超家族，是亚铁血红素—硫醇盐蛋白细胞色素 P450 亚家族 4 (CYP4) 的成员。

目前，有多种治疗该病的方法，例如基因替代治疗方案，即使用病毒转染系统或者其他转染系统 (如 AAV、慢病毒、逆转录病毒)，将 CYP4V2 野生型基因转染到基因突变的细胞中，使基因突变细胞可以表达野生型 CYP4V2。这种做法仅可以部分恢复突变细胞功能，并且疗效有限。原因为突变型的基因产物仍然存在于细胞中，这些突变蛋白会与正常基因产物存在竞争性抑制作用。因此，更加安全有效的治疗方法亟待被发现。

公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本申请的总体背景的理解，而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

发明内容

本申请提供了特异性靶向细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 多肽 2 (CYP4V2) 的 gRNA，其特异性靶向 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点，所述 gRNA 对所述突变位点具有好的切割效果，使得原先突变的 CYP4V2 基因产物不存在于细胞中。本申请还提供了一种供体核酸分子，其包含了不含 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点的正确的 CYP4V2 的核苷酸序列，所述供体核酸分子可以在内源性 CYP4V2 被所述 gRNA 剪切后，在基因突变细胞中修复 CYP4V2 的突变位点，产生了具有正常功能的 CYP4V2 蛋白，具有很好修复效果。本申请提供了一种

包含所述 gRNA 和/或所述供体核酸分子的载体,能够使 CYP4V2 突变的细胞表达正确的细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 多肽 2, 具有良好的基因编辑修复效率。

一方面,本申请提供了一种特异性靶向细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 多肽 2(CYP4V2) 基因的 gRNA,其特异性结合 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 200bp 内的核苷酸序列。

在某些实施方式中,所述的 gRNA 包含 SEQ ID NO: 74、78-80、82-84 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中,所述的 gRNA 包含 5' -(X)_n- SEQ ID NO: 74、78-80、82-84 -骨架序列-3', 其中 X 为选自 A、U、C 和 G 中任一个的碱基,且 n 为 0-15 中的任一整数。

在某些实施方式中,所述 gRNA 为单链向导 RNA (sgRNA)。

另一方面,本申请提供了一种或多种分离的核酸分子,其编码所述的特异性靶向 CYP4V2 基因的 gRNA。

另一方面,本申请提供了供体核酸分子,其包含 CYP4V2 基因 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 800bp 内正常野生型的核苷酸序列。

在某些实施方式中,所述的核酸分子包含 SEQ ID NO: 64-66 中任一项所示的核苷酸序列。

另一方面,本申请提供了一种载体,其包含所述的分离的核酸分子和/或所述的供体核酸分子。

在某些实施方式中,所述分离的核酸分子和所述供体核酸分子位于同一载体中。

在某些实施方式中,所述的载体为病毒载体。

另一方面,本申请提供了细胞,其包含所述的分离的核酸分子、所述的供体核酸分子和/或所述的载体。

在某些实施方式中,所述的细胞包括 HEK293 细胞、肾上皮细胞和/或诱导性多能干细胞。

在某些实施方式中,所述的细胞经修饰后具备分化能力。

在某些实施方式中,所述的细胞可分化为 3D-视网膜类器官。

另一方面,本申请提供了药物组合物,其包含所述的 gRNA,所述的一种或多种分离的核酸分子,所述的供体核酸分子,和/或所述的载体,以及药学上可接受的载剂。

另一方面,本申请提供了所述的 gRNA,所述的一种或多种分离的核酸分子,所述的供体核酸分子,和/或所述的载体在制备治疗疾病的药物中的应用,其中所述疾病包括 CYP4V2 基因中 c.802-8_810del17bpinsGC 突变所导致的疾病。

在某些实施方式中,所述疾病包括结晶样视网膜变性。

另一方面,本申请提供了一种治疗结晶样视网膜变性的方法,所述方法包括以下的步骤:

向有需要的受试者导入所述 gRNA，所述的一种或多种分离的核酸分子，所述的供体核酸分子，和/或所述的载体。

在某些实施方式中，所述导入获得了正常功能的 CYP4V2 蛋白。

在某些实施方式中，所述导入包括注射。

在某些实施方式中，其中所述导入包括视网膜下腔注射。

另一方面，本申请提供了一种调节细胞中 CYP4V2 基因表达的方法，其包括向细胞导入所述的 gRNA，所述的一种或多种分离的核酸分子，和/或所述的载体。

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。对附图简要说明如下：

图 1A 显示的是本申请所述 sgRNA1-2 对所述突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1B 显示的是本申请所述 sgRNA3-5 对所述突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1C 显示的是本申请所述 sgRNA6-8 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1D 显示的是本申请所述 sgRNA9-11 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1E 显示的是本申请所述 sgRNA12-14 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1F 显示的是本申请所述 sgRNA15 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1G 显示的是本申请所述 sgRNA16-19 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1H 显示的是本申请所述 sgRNA20-22 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果；图 1I 显示的是本申请所述 sgRNA23 对所述的突变基因的 dsDNA 剪切结果。

图 2 显示的是本申请所述 AAV-saCas9-puro 载体的质粒图谱。

图 3 显示的是经 sgRNA8、sgRNA12、sgRNA13、sgRNA14、sgRNA16、sgRNA17、sgRNA18 切割后片段 T7E1 酶切实验的结果。

图 4A 显示的是 sgRNA13 切割后基因组 DNA 包含切割位点的 PCR 片段基因测序结果，图 4B 显示的是 sgRNA17 切割后基因组 DNA 包含切割位点的 PCR 片段基因测序结果，图 4C

显示的是 sgRNA18 切割后基因组 DNA 包含切割位点的 PCR 片段基因测序结果。

图 5 显示的是 sgRNA13、sgRNA17、sgRNA18、sgRNA13+17、sgRNA13+18 在 293T 细胞中的切割效率的柱形图。

图 6 显示的是 Donor 序列的设计图。

具体实施方式

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

术语定义

在本申请中，术语“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。术语“细胞色素 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; NCBI ID: 285440）全长通常为 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）。本申请所述的 CYP4V2 还可包括其功能性变体、片段、同源物等。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，而在角膜组织中以稍低的水平表达。CYP4V2 基因的突变可能与结晶样视网膜变性和/或视网膜色素变性有关。

在本申请中，术语“c.802-8_810del17bpinsGC”是比较常见的一种 CYP4V2 基因突变，属于内含子 6 的 3' 末端和外显子 7 的 5' 末端 17 对碱基对的移除，从而导致外显子 7 的缺失，导致转录蛋白的结构和活性变化。示例性的野生型 CYP4V2 的内含子 6 与外显子 7 之间的序列可以如下：

caaacagaagcatgtgattatcattcaaaTCATACAGGTCATCGCTgaacgggccaatgaaatgaacgccaatga (SEQ ID NO:90)。示例性的 c.802-8_810del17insGC 突变序列可以如下所示，内含子 6 序列与外显子 7 之间的序列缺失了 17 个 bp 缺失（在野生型中用大写字母表示的序列），而插入了 GC（用大写字母表示）：caaacagaagcatgtgattatcattcaaaGCgaacgggccaatgaaatgaacgccaatga (SEQ ID NO:91)。（Xiao 等，Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011； Meng 等，2014, Mol. Vis., 20:1806-14； Wada 等，Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005； Jiao 等，European Journal

of Human Genetics (2017) 25, 461-471。)。在本申请中，所述“c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点”可以在 SEQ ID NO:91 所示的核苷酸序列中缺失的部分，或增加 CG 的位置处。

“c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 800bp 内”可以包括在 caaacagaagcatgtgattatcattcaaaTCATACAGGTCATCGCTgaacgggccaatgaaatgaacgccaatga (SEQ ID NO:90)中，与大写字母标识的核苷酸序列的 N 端相连的碱基（即“a”）处，往 5'端方向约 800bp 内的核苷酸，或者，也可以包括与大写字母标识的核苷酸序列的 C 端相连的碱基（即“g”）处，往 3'端方向约 800bp 内的核苷酸。

在本申请中，术语“突变”通常是指特定蛋白质或核酸（基因，RNA）分别相对于野生型蛋白质或核酸的氨基酸或核酸序列的差异。突变的蛋白质或核酸可以由基因的一个等位基因（杂合的）或两个等位基因（纯合的）表达或者在其中找到。突变包括缺失突变、截短、失活、破坏、置换突变或易位。这些类型的突变是本领域众所周知的。在本申请中，与 CYP4V2 突变相关的，包括但不限于错义（missense）、重复、剪接位、框移、删除、插入、插入或缺失（indel）、无义、多态性（例如单核苷酸多态性）及提前终止（premature termination）以及 CYP4V2 基因整体缺失。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”是其与存在于所述核酸的天然来源中的其他核酸分子相分离。这种分离的核酸分子从其通常的或天然的环境中移出的或分离的，或者生产所述分子的方式使其不存在于其通常的或天然的环境中，其与通常的或天然的环境中的多肽、肽、脂质、糖类、其他的多核苷酸或其它材料分离。本申请中的分离的核酸分子可编码 RNA，例如，可编码特异性靶向 CYP4V2 基因的 gRNA。

在本申请中，术语“供体核酸分子”通常是指向受体（例如，接收核酸分子）提供异源核酸序列的核酸分子。

在本申请中，术语“骨架序列”通常是指 gRNA 中，除识别或杂交靶序列的部分的其他部分，可包括 sgRNA 中 gRNA 配对序列与转录终止子之间的序列。骨架序列一般不会因为靶序列的变化而变化，也不影响 gRNA 对靶序列的识别。因此，骨架序列可以是现有技术中任何可行的序列。骨架序列的结构可参见如文献 Nowak et al. Nucleic Acids Research 2016. 44:9555-9564 中的 Figure 1（图 1）中 A 和 B，Figure 3（图 3）中 A、B、C，以及 Figure 4（图 4）中 A、B、C、D、E 中所记载的除 spacer 序列之外的部分。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其能够将插入的核酸分子（例如，外源性序列）转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及

主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。本申请所述的载体可以包括，例如，表达载体，可包括病毒载体（慢病毒载体和/或逆转录病毒载体），噬菌体载体，噬菌粒，粘粒，cosmid，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），和/或质粒。

在本申请中，术语“gRNA”通常是指向导 RNA（guide RNA），一种 RNA 分子。在自然界中，crRNA 和 tracrRNA 通常作为两个独立的 RNA 分子存在，组成 gRNA。术语“crRNA”也称为 CRISPR RNA，通常是指与所靶向的目标 DNA 互补的一段核苷酸序列，术语“tracrRNA”通常是指可与 Cas 核酸酶结合的支架型 RNA。crRNA 和 tracrRNA 也可以融合成为单链，此时 gRNA 也可称为单链向导 RNA（single guide RNA，sgRNA），sgRNA 已成为本领域技术人员在 CRISPR 技术中使用的 gRNA 的最常见的形式，因此术语“sgRNA”和“gRNA”在本文中可具有相同的含义。sgRNA 可以人工合成，也可以在体外或体内由 DNA 模板制备。sgRNA 可以结合 Cas 核酸酶，也可以靶向目标 DNA，其可引导 Cas 核酸酶切割与 gRNA 互补的 DNA 位点。

在本申请中，术语“特异性靶向”通常是指两种分子（例如，分子 A 和分子 B）之间的相互作用（例如，分子 A 特异性识别和/或结合分子 B（如，靶标））。同与其他非 B 分子的相互作用相比，分子 A 以统计学显著的程度与分子 B 相互作用。所述相互作用可以是共价的或非共价的。当涉及多核苷酸时，特异性靶向可以指分子 A（或其一条链）与分子 B（或其一条链）具有碱基互补配对的关系。在本申请中，“特异性靶向”可以指 gRNA 识别和/或结合至靶序列的过程。

在本申请中，术语“靶核酸”、“靶核酸”、“靶序列”和“靶区域”可以互换的使用，通常是指可以被 gRNA 识别的核酸序列，所述靶核酸可以指双链核酸，也可以指单链核酸。

在本申请中，术语“3D-视网膜类器官”通常是指一种具有三维结构、能够自我更新、自我组织并显示视网膜基本功能（例如，感受光）的人工培育的视网膜。3D-视网膜类器官可以由原代组织或干细胞（例如，多功能干细胞）分化而成，具有视网膜中所有接收光线并向大脑发出信号所必需的细胞。

在本申请中，术语“结晶样视网膜变性”通常是指一类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“视网膜下腔注射”通常是指将需要导入的物质导入到感光细胞和视网膜色素上皮（RPE）层之间。在视网膜下腔注射期间，将注射的材料（例如，本申请所述的 gRNA，本申请所述的一种或多种分离的核酸分子，本申请所述的供体核酸分子，本申请所述的载体，以及药学上可接受的的载剂）并在其间创建空间。

在本申请中，术语“细胞”指其如本领域一般公认的意义。该术语以其通常的生物学含义使用，并且不指完整多细胞生物，例如具体地不指人类。细胞可以存在于生物内，例如鸟类、植物和哺乳动物，例如人、牛、羊、猿、猴、猪、狗和猫。细胞可以是原核的（例如，细菌细胞）或真核的（例如，哺乳动物或植物细胞）。细胞可以具有体细胞或种系起源、全能或多能、分裂或非分裂。细胞还可以衍生自或可以包含配子或胚胎、干细胞、或完全分化的细胞。

在本申请中，术语“诱导性多能干细胞”通常是指体细胞在某些条件下恢复到全能性的状态的细胞。所述全能性是指具有的分化成机体所有类型细胞和形成完全胚胎或进一步发育成新个体的能力。例如，在本申请中，所述的诱导多能干细胞包含由肾上皮细胞经培养后获得的、具有分化为视网膜细胞的能力的细胞。

在本申请中，术语“HEK293 细胞”通常是指“人胚胎肾细胞 293”，是衍生自人胚胎肾细胞的细胞系，具有易培养，转染效率高的特点，在本领域，是很常用的研究外源基因的细胞株。在本申请中，术语“293T 细胞”或“HEK293T 细胞”是源于“HEK293 细胞”的一种细胞，也是本领域常用的细胞株。

在本申请中，术语“肾上皮细胞”通常是指在人尿液中收集到的肾脏的上皮细胞。在本申请中，其可以是诱导多能干细胞的一个来源。在本领域，利用尿液中的肾上皮细胞诱导多能干细胞符合成本效益，通用，适合于应用各个年龄、性别和种族。这项技术使得获取大量病人样本相较于其它现有方式容易和经济得多。

在本申请中，术语“药物组合物”通常是指合适于向有需要的受试者施用的组合物。例如，本申请所述的药物组合物，其可以包含本申请所述的 gRNA、本申请所述一种或多种分离的核酸分子、本申请所述的供体核酸分子和/或本申请所述的载体，以及药学上可接受的的载剂。术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”在本申请中可互换用于指施用本申请的药物组合物需要的受试者，例如哺乳动物受试者。动物受试者包括人类、非人类灵长类、狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、黄牛、乳牛等等，例如小鼠。在某些实施方式中，药

物组合物可以包含用于视网膜下、非肠道、透皮、内腔内、动脉内、膜内和/或鼻内给药或直接注射入组织的组合物。例如，所述药物组合物通过视网膜下腔注射向受试者给药。

除了本文提到的特定蛋白质和核苷酸之外，本申请还可包括变体、衍生物、类似物、同源物及其片段的用途。

在本申请的上下文中，任何给定序列的变体是指其中残基的特定序列（无论是氨基酸或核苷酸残基）已经经过修饰而使得所述多肽或多核苷酸基本上保留至少一种内源功能的序列。可以通过天然存在的蛋白质和/或多核苷酸中存在的至少一个氨基酸残基和/或核苷酸残基的添加、缺失、取代、修饰、替换和/或变异来获得变体序列。

在本申请中，术语“衍生物”通常是指本申请的多肽或多核苷酸而言包括自/对序列的一个（或多个）氨基酸残基的任何取代、变异、修饰、替换、缺失和/或添加，只要所得的多肽或多核苷酸基本上保留其至少一种内源功能。

在本申请中，术语“类似物”通常对多肽或多核苷酸而言，包括多肽或多核苷酸的任何模拟物，即拥有该模拟物模拟的多肽或多核苷酸的至少一种内源功能的化学化合物。

通常，可以进行氨基酸取代，例如至少 1 个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 20 个以上）氨基酸取代，只要经修饰的序列基本上保持需要的活性或能力。氨基酸取代可包括使用非天然存在的类似物。

用于本申请的蛋白质或多肽也可以具有氨基酸残基的缺失、插入或取代，所述氨基酸残基产生沉默的变化并导致功能上等同的蛋白质。可以根据残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性进行有意的氨基酸取代，只要保留内源性功能即可。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；并且含有具有相似亲水性值的不带电极性头基的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

在本申请中，术语“同源物”通常是指与野生型氨基酸序列和野生型核苷酸序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于“同一性”。同源序列可以包括可以与主题序列是至少 70%、75%、80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9% 相同的氨基酸序列。通常，同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性（即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基）来考虑，也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中，提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。

为了确定序列同一性,可进行序列比对,其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行,例如,使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign (DNASTAR) 软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数,包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

在本申请中,术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

在本申请中,术语“包含”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。

发明详述

gRNA

一方面,本申请提供一种特异性靶向细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 多肽 2 的基因 (CYP4V2 基因) 的 gRNA,其特异性靶向 CYP4V2 基因的突变位点。

在某些情形中,CYP4V2 的一个或多个内含子和外显子会出现了不同数量 (例如 1 对,2 对,3 对,4 对,10 对,20 对,50 对,100 对) 的碱基对的移除或增加,核苷酸的突变或替代,从而导致 CYP4V2 蛋白结构的变化和功能的损失。例如,所述 CYP4V2 基因的突变位点可以包括表 1 所示的突变位点。

表 1 CYP4V2 基因的突变位点

外显子或者内含子	突变位点	突变结果
E1	c.31C>T	p.QHX
	c.64C>G	p.L22V
	c.71T>C	p.L24P
	c.77G>A	p.G26D
	c.130T>A	p.W44R
	c.134A>C	p.Q45P
	c.181G>A	p.G61S
	c.197T>G	p.M66R
IVS1	c.214+1G>A	外显子 1 缺失
	c.214+25delT	不可用
	c.215-2A>G	外显子 2 缺失
	c.215-1G>A	外显子 2 缺失
E2	c.219T>A	p.F73L
	c.237G>T	p.E79D

	c.253C>T	p.R85C
	c.277T>C	p.W93R
	c.283G>A	p.G95R
	c.327G>A	不可用
IVS2	c.327+1G>A	p.E72Gfs*5
	c.327+1HG>C	不可用
E3	c.332T>C	p.IIIIT
	c.335T>G	p.L112*
	c.367A>G	P.M123V
	c.400G>T	p.G134*
	c.413+2T>G	剪切变异
	c.283G>A	p.G95R
E4	c.518T>G	p.L173W
E5	c.637_641delAGTAA	p.S213*
	c.655T>C	p.Y219H
E7	c.802-8_806del13	外显子 7 缺失
	c.802-8_810del17insGC	外显子 7 缺失
	c.802-8_810del17bpinsGT	剪切变异
	c.810delT	p.(Glu271Argfs*34)
	c.838G>T	p.E280*
	c.958C>T	p.R320*
	c.971A>T	p.D324V
	c.974C>T	p.T325I
	c.965_7delAAG	p.321delE
IVS7	c.985+3A>G	不可用
E8	c.992A>C	p.H331P
	c.998C>A	p.T333K
	c.1020G>A	p.W340*
	c.1021T>C	p.S341P
	c.1027T>G	p.Y343D
	c.1062dupA	p.V355Sfs*4
	c.992A>G	p.H331P
	c.994G>A	p.D332N
	c.1062insA	p.V355Sfs*3
	c.1062-1063insA	p.V355Sfs*2
IVS8	c.1091-2A>G	外显子 9 缺失
E9	c.H57A>C	p.K386T
	c.H68C>T	p.R390C
	c.H69G>A	p.R390H
	c.H78C>T	p.P393L
	c.H87C>T	p.P396L
	c.H98C>T	p.R400C
	c.H99G>A	p.R400H
	c.1219G>T	p.E407*

E10	c.1225+1 G>A	p.(G364_V408del)
	c.1091-2A>G	剪切变异
	c.1226-6_1235del16	外显子 10 缺失
	c.1328G>A	p.R443Q
	c.1348C>T	p.Q450*
	c.1355G>A	p.R452H
	c.1372G>A	p.V458M
	c.1393A>G	p.R465G
	c.1396A>G	p.N466D
	c.1399T>C	p.C467R
	c.l441delT	p.(Ser481Argfs*4)
	c.1445C>T	p.S482*
E11	c.1523G>A	p.R508H
	c.1526C>T	p.P509L
	c.604G>A	p.(Glu202Lys)
	c.242C>G	p.(Thr81Arg)
	c.604+4A>G	p.(?)
	c.l249dup	p.(Thr417Asnfs*2)
	整个 CYP4V2 缺失	*
	c.1544T>G	p.I515S

在某些情形中，所述 CYP4V2 基因的突变位点包含 c.802-8_810del17bpinsGC。在本申请中，术语“c.802-8_810del17bpinsGC”是比较常见的一种 CYP4V2 基因突变，属于内含子 6 的 3' 末端和外显子 7 的 5' 末端 17 对碱基对的移除，从而导致外显子 7 的缺失，导致转录蛋白的结构和活性变化。在某些情形中，所述 c.802-8_810del17bpinsGC 还可合并其他类别的突变，例如 c.992A>C (p.H331P)、c.1091-2A>G (Exon 9del)。

在某些情形中，所述 gRNA 可特异性结合 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 100bp、120bp、140bp、160bp、180bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp 或 500bp 的核苷酸序列。在某些情形中，所述 gRNA 可特异性结合 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 200bp 的核苷酸序列。在某些情形中，所述 gRNA 可特异性结合与 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 200bp 的核苷酸序列具有至少 70%（例如，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在某些情形中，所述 gRNA 可特异性结合 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 100bp、120bp、140bp、160bp、180bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、500bp 的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在某些情形中，所述 gRNA 可特异性结合 c.802-8_810del17bpinsGC 突变

位点上下 200bp 序列互补的核苷酸序列。在某些情形下，所述 gRNA 可特异性结合与 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 200bp 序列互补的氨基酸序列具有至少 70%（例如，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

本申请所述的 gRNA 可以与目标靶核酸（例如，CYP4V2 基因的突变位点）中的序列结合。gRNA 可以通过杂交（即碱基配对）以序列特异性的方式与靶核酸相互作用。gRNA 的核苷酸序列可以根据目标靶核酸的序列而变化。

在本申请中，所述 gRNA 可包括 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84 中任一项所示的核苷酸序列。本申请中，所述 gRNA 可包括与 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 70%（例如，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 gRNA 可包括 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84 中任一项所示的核苷酸序列。本申请中，所述 gRNA 可包括与 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 70%（例如，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 gRNA 可包括 SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84 中任一项所示的核苷酸序列。本申请中，所述 gRNA 可包括与 SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 70%（例如，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 gRNA 自 5' 端至 3' 端可包含(X)_n、SEQ ID NO: 74、78-80、82-84 中任一项所示的核苷酸序列和骨架序列，其中 X 为选自 A、U、C 和 G 中任一个的碱基，且 n 为 0-15 中的任一整数。在本申请中，所述 gRNA 可包含 5' -(X)_n- SEQ ID NO: 74、78-80、82-84 任一项所示的核苷酸序列-骨架序列-3'，其中 X 为选自 A、U、C 和 G 中任一个的碱基，

且 n 为 0-15 中的任一整数。例如，本申请所述的骨架序列可以包括来自 AAV-saCas9-puro 的骨架序列。

在某些情形中，所述 gRNA 可以为单链向导 RNA (sgRNA)。

本申请还提供了 sgRNA 组合，所述 sgRNA 组合可包含本申请所述的 sgRNA。例如，所述 sgRNA 可包含两个或两个以上本申请所示的 sgRNA。例如，所述 sgRNA 组合可包括 sgRNA13 和 sgRNA17；又例如，所述 sgRNA 组合可包括 sgRNA13 和 sgRNA18；又例如，所述 sgRNA 组合可包括 sgRNA17 和 sgRNA18；又例如，所述 sgRNA 组合可包括 sgRNA13、sgRNA17 和 sgRNA18。

本申请提供了一种或多种分离的核酸分子，所述分离的核酸分子可编码上文所述的特异性靶向 CYP4V2 突变基因的 gRNA。例如，所述分离的核酸分子可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 中任一项所示的核苷酸序列。

在本申请中，所述 gRNA 序列可以设计成与 Cas 核酸酶可识别的 PAM 序列临近处的靶核酸杂交。所述 gRNA 可以与靶序列完全互补或不完全互补。gRNA 与其相应的靶序列之间的互补程度至少为 50% (例如，至少为约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 98%、或更多)。所述“Cas 核酸酶”通常是指能够使用 CRISPR 序列 (例如，gRNA) 作为向导，从而识别和切割特定的 DNA 链。例如，Cas9 核酸酶，Csn1 或 Csx12。Cas9 核酸酶通常包括 RuvC 核酸酶结构域和 HNH 核酸酶结构域，分别切割双链 DNA 分子的两条不同的链。已经在不同的细菌物种如嗜热链球菌 (*S.thermophiles*)、无害利斯特氏菌 (*Listeria innocua*) (Gasiunas, Barrangou et al.2012; Jinek, Chylinski et al.2012) 和化脓性链球菌 (*S.Pyogenes*) (Deltcheva, Chylinski et al.2011) 中描述了 Cas9 核酸酶。例如，化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 蛋白，其氨基酸序列参见 SwissProt 数据库登录号 Q99ZW2；脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitides*) Cas9 蛋白，其氨基酸序列见 UniProt 数据库编号 A1IQ68；嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9 蛋白，其氨基酸序列见 UniProt 数据库编号 Q03LF7；金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9 蛋白 (例如，本申请所述载体中的 SaCas)，其氨基酸序列见 UniProt 数据库编号 J7RUA5。Cas 核酸酶通常可以在 DNA 中识别特定的 PAM 序列。所述“PAM”指原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif)，其被 CRISPR 核酸酶 识别为切割位点，PAM 随核酸酶 (例如，Cas9、Cpf1 等) 而变。原间隔区元件序列通常直接位于 PAM 位点上游。例如，所述 PAM 可包含 SEQ ID NO: 24-38 中任一项所述的核苷酸序列。

本申请所述的 gRNA 和/或分离的核酸分子可以使用载体递送。在本申请中,所述载体(例如 pX601)可以包含或者不包含编码 Cas 核酸酶的核酸。在本申请中,Cas 核酸酶可以作为一种或多种多肽单独地递送。或者,编码所述 Cas 核酸酶的核酸分子,与一种或多种引导 RNA,或一种或多种 crRNA 以及 tracrRNA,单独地递送,或者一起预复合地递送。例如,所述本申请的核酸分子(例如,编码所述特异性靶向 CYP4V2 基因的 sgRNA 的分离的核酸分子)和编码 Cas9 核酸酶的核酸分子可以位于同一载体(例如,质粒)中。所述载体可包括本领域已知的病毒或非病毒载体。

非病毒递送载体可以包括但不限于纳米颗粒、脂质体、核糖核蛋白、带正电荷的肽、小分子 RNA 缀合物、适体-RNA 嵌合体 and RNA 融合蛋白复合物。

在本申请中,所述分离的核酸分子和/或所述编码 DNA 核酸内切酶的核酸分子可以通过质粒递送。

在某些情形中,所述载体可以是病毒载体,例如,AAV、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒和肝炎病毒。用于产生包含核酸分子(例如,本申请所述分离的核酸分子)作为载体基因组一部分的病毒载体的方法是本领域公知的,并且本领域技术人员可无需进行过多的实验进行。在另一些情形中,所述载体可以是包装了本申请所述核酸分子的重组 AAV 病毒粒子。产生所述重组 AAV 的方法,可包括将本申请所述核酸分子引入包装细胞系,将表达 AAV 的 rep 和 cap 基因的包装质粒引入细胞系中,以及从包装细胞系上清中收集重组的 AAV。包装的细胞系可以有各种类型的细胞。例如,可以使用的包装细胞系包括但不限于 HEK 293 细胞,HeLa 细胞和 Vero 细胞。

在某些情形中,所述载体可以为腺病毒相关载体(AAV)。在本申请中,术语“腺病毒相关载体”通常指来源于天然存在且可用的腺相关病毒以及人工 AAV 的载体。所述 AAV 可包括不同的血清型 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12 或 AAV13,以及任何 AAV 变体或混合物。AAV 基因组两端通常有末端反向重复序列(ITR),术语“ITR”或“末端反向重复”是指存在于 AAV 和/或重组 AAV 中的核酸序列段,其可形成完成 AAV 溶解和潜伏生命周期所需的 T 形回文结构。产生 AAV 载体的技术是本领域的标准技术,其中包括将要递送的多核苷酸、rep 和 cap 基因以及辅助病毒功能的待包装 AAV 基因组提供给细胞。生产 AAV 载体通常需要在单个细胞(此处称为包装细胞)内存在以下成分:rAAV 基因组,与 rAAV 基因组分离(例如不在其中)的 AAV rep 和 cap 基因以及辅助病毒。AAV rep 和 cap 基因可以来自任何 AAV 血清型,也可以来自与 AAV 基因组 ITR 不同的 AAV 血清型,包括但不限于本文所述的 AAV 血清型。

供体核酸分子和载体

另一方面，本申请还提供了供体核酸分子。在本申请中，术语“供体核酸分子”通常是指向受体（例如，接收核酸分子）提供异源核酸序列的核酸分子。在某些情形下，所述供体核酸分子被导入到受体细胞中，可以修复被所述分离的核酸分子切割后的 DNA 片段（例如，断裂后的双链 DNA）。在另外一些情形下，DNA 断裂后可以通过供体核酸分子来修复。修复的方式包括但不限于依赖于 DNA 同源性的同源重组（Homologous recombination, HR）修复和非同源末端连接（Non-homologous end joining, NHEJ）的修复方式。

在某些情况下，可以使用 HDR 将外源多核苷酸序列插入靶核酸切割位点。外源多核苷酸序列可以被称作供体多核苷酸（或供体，或供体序列，或多核苷酸供体模板）。可将供体多核苷酸，供体多核苷酸的一部分，供体多核苷酸的拷贝或供体多核苷酸的拷贝的一部分插入靶核酸切割位点。供体多核苷酸可以是外源多核苷酸序列，即不是天然存在于靶核酸切割位点的序列。HDR 利用同源序列或供体序列（例如，所述供体核酸分子）作为模板，在断点处插入特定的 DNA 序列。同源序列可以在内源基因组中，例如姐妹染色单体（sister chromatid）。或者，所述供体可以是外源核酸，例如质粒、单链寡核苷酸、双链寡核苷酸、双链寡核苷酸或病毒。这些外源核酸可以包含与 DNA 核酸酶切割的基因座具有高度同源性的区域，此外还可包含额外的序列或序列变化（包括可掺入切割的靶基因座的缺失）。例如，本申请利用同源臂，可以将连接在此同源臂上的外源基因片段（例如，本申请所述供体核酸分子）整合到靶位点（例如，本申请所述 gRNA 靶向的位点）。本申请所述“同源臂”通常指与 DNA 断裂处的核苷酸序列具有同源性的一段核苷酸序列。

利用外源供体模板，可以在同源的侧翼区域之间引入另外的核酸序列（例如，所述靶向载体）或修饰（例如单碱基或多碱基改变或缺失），从而也可以将另外的或改变的核酸序列纳入目标基因座，外源供体可以由质粒载体递送，例如，AAV 载体和/或 TA 克隆载体（例如，ZT4 载体）。

本申请所述供体核酸分子，供体核酸分子可以是野生型的人 CYP4V2 的核苷酸序列、基因片段、同源物。例如，所述的供体核酸分子包含 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 500bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、1000bp、2000bp、3000bp、5000bp 内的核苷酸序列。在某些情形中，所述供体核酸可以包含 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 800bp。在某些情形中，所述供体核酸可以包含与 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 800bp 具有至少 50%（例如，至少 55%，至少 60%，至少 65%，至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少

97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。本申请所述可包含 CYP4V2 核苷酸序列的“核酸分子”与本申请所述特异性靶向 CYP4V2 的 gRNA 或“分离的核酸分子”不同。

例如，在本申请中，所述的供体核酸分子可以包含 SEQ ID NO:64-66 中任一项所示的核苷酸序列。又例如，所述供体核酸分子可包括与 SEQ ID NO: 64-66 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 50%（例如，至少 55%，至少 60%，至少 65%，至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

另一方面，本申请提供了载体，其包含所述的分离的核酸分子（例如，编码所述特异性靶向 CYP4V2 基因的 sgRNA 的分离的核酸分子）和/或所述的供体核酸分子（例如，编码所述人 CYP4V2 基因的核苷酸分子）。

在某些情形中，所述分离的核酸分子和所述供体核酸分子可以位于不同的载体上。在另外一些情形中，所述分离的核酸分子和所述供体核酸分子可以位于同一载体中。在本申请中，包含所述分离的核酸分子的载体和包含所述供体核酸分子的载体同时导入细胞后，Cas 核酸酶可以切割供体核酸分子和细胞基因组 DNA，将供体核酸分子整合到细胞基因组的准确位置上（例如，CYP4V2 基因片段）。

在本申请中，所述载体可以包含一个或多个所述 sgRNA。例如，可以包含 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个或 7 个以上本申请所述的 sgRNA。在某些情形中，当使用多个 sgRNA 时，所述多个 sgRNA 可以存在一个或多个载体中，也可以同时或先后施用。例如，所述 sgRNA 可以分别存在不同的载体中施用，也可以存在同一个载体中施用。例如，所述 sgRNA 可以存在于同一个 AAV 载体中施用。例如，所述 sgRNA 可以位于不同的载体中，同时施用。例如，所述 sgRNA 可以位于同一个载体中，先后施用。

在某些实施方式中，所述的载体为病毒载体。例如，AAV、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒和肝炎病毒。用于产生包含核酸分子（例如，本申请所述分离的核酸分子）作为载体基因组一部分的病毒载体的方法是本领域公知的，并且本领域技术人员可无需进行过多的实验。

细胞、药物组合物、用途和方法

本申请提供了细胞，所述细胞可包含所述分离的核酸分子和/或所述供体核酸分子。本申请所述的细胞可表达 sgRNA 和 Cas 核酸酶，具有很好的 DNA 切割效果。本申请所述细胞还可以表达具备正常功能的 CYP4V2 蛋白。所述细胞可以包括哺乳动物细胞，例如，来自人的

细胞。例如，所述细胞可包括 COS 细胞、COS-1 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、HeLa 细胞、HEK293 细胞、NS0 细胞或骨髓瘤细胞、干细胞（例如，多能干细胞和/或全能干细胞）、和/或上皮细胞（例如，肾上皮细胞和/或视网膜上皮细胞）。在本申请中，所述的细胞可包括 HEK293 细胞和/或尿液肾上皮细胞。本申请中，所述的细胞可以经修饰后具备分化能力。所述修饰可包括所述分化能力可包括分化成身体任何细胞类型的能力：神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、视网膜上皮细胞、表皮、毛发和角质形成细胞、肝细胞、胰岛 β 细胞、肠上皮细胞、肺泡细胞、造血细胞、内皮细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、肾细胞、脂肪细胞、软骨细胞和/或骨细胞。例如，所述细胞可被重编程为具有关键重编程基因（例如，OCT4、KLF4、SOX2、cMYC、NANOG 和/或 LIN28）过表达的诱导多能干细胞（iPSC）。

本申请所述细胞可用于评价基因编辑治疗所需物质（例如，sgRNA 和供体核酸分子）的有效性和安全性。本申请还提供了组织模型，所述组织模型可包括包含正确的人 CYP4V2 cDNA 的 3D-视网膜类器官。所述细胞和所述组织模型可用于评价基因编辑治疗所需物质（例如，sgRNA 和供体核酸分子）的有效性和安全性。例如，将编码所述 gRNA 的多核苷酸、所述供体核酸分子和/或载体导入到所述细胞和/或所述组织模型后，所述能检测到 gRNA、正确的 CYP4V2 蛋白的表达，例如，使用 PCR 测序或凝胶电泳；或者，该细胞和/或组织模型不产生免疫排斥反应、毒性，和/或，导入的物质不影响所述细胞和/或所述组织模型的其他功能。例如，可使用修复效率检测作为评价基因编辑有效性的指标，示例性的方法如实施例 4 所示。例如，可检测脱靶效率作为评价基因编辑安全性的指标，例如，可使用全基因组测序法检测脱靶效率。

本申请提供了所述的 gRNA，所述的一种或者多种分离的核酸分子，所述供体核酸分子，和/或所述的载体在制备治疗疾病的药物中的应用，其中所述疾病包括 CYP4V2 基因突变所导致的疾病。例如，CYP4V2 基因中 c.802-8_810del17bpinsGC 突变所导致的疾病。例如，所述疾病可包括视网膜色素变性。例如，所述疾病可包括结晶性视网膜色素变性。

本申请提供了药物组合物，所述药物组合物包含所述的 gRNA，所述的一种或多种分离的核酸分子，所述的供体核酸分子，所述的载体，以及药学上可接受的载剂。所述载剂应当是无毒的，并且不应干扰活性成分的功效。

本申请所述的药物组合物可通过各种方法导入，例如，包括但不限于，玻璃体内注射（例如，前部、中间或后部玻璃体注射）、结膜下注射、前房内注射、经由颞侧注射到前房中、基质内注射、注射到脉络膜下间隙中、角膜内注射、视网膜下腔注射和眼内注射局部地授予眼睛。所述导入可包括视网膜下腔注射，视网膜下腔注射为注射到视网膜下空间，即感觉神经

性视网膜下面。在视网膜下注射期间，将注射的材料（例如，所述的靶向载体，所述的 gRNA，和/或所述的质粒）直接导入感光细胞和视网膜色素上皮（RPE）层之间，并在其间创建空间。

本申请提供了一种治疗结晶样视网膜变性的方法，所述方法包括以下的步骤：向有需要的受试者导入所述的 gRNA（例如，特异性靶向 CYP4V2 基因的 sgRNA），所述的一种或多种分离的核酸分子（编码所述特异性靶向 CYP4V2 基因的 sgRNA 的分离的核酸分子），所述的供体核酸分子（编码所述人 CYP4V2 基因的核苷酸分子），和/或所述的载体。其中，所述导入使受试者获得了正常功能的 CYP4V2 蛋白。

本申请所述方法可包括离体的方法。在某些情形中，可以获得受试者特异性的诱导多能干细胞（iPSC）。然后，可以使用本申请所述的方法编辑这些 iPSC 细胞的基因组 DNA。例如，该方法可以包括在 iPSC 的 CYP4V2 基因的突变位点内或附近进行编辑，使得其不编码具有突变的 CYP4V2 蛋白。接下来，可以将经基因编辑的 iPSC 分化为其他细胞，例如感光细胞或视网膜祖细胞。最后，可以将分化的细胞（例如感光细胞或视网膜祖细胞）植入受试者体内。

在某些情形中，可以获得受试者特异性的诱导多能干细胞（iPSC）。然后，可以将诱导多能干细胞分化为任何类型的细胞，例如感光细胞或者视网膜祖细胞。在本申请中，可以是 3D 视网膜类器官。接下来，可以使用本申请所述的方法编辑这些 3D 视网膜类器官细胞的基因组 DNA。例如，该方法可以包括在 3D 视网膜类器官细胞的 CYP4V2 基因的突变位点内或附近进行编辑，使得其不编码具有突变的 CYP4V2 蛋白。最后，可以将 3D 视网膜类器官细胞植入受试者体内。

在另一些情形中，可以从受试者中分离出感光细胞或视网膜祖细胞。接下来，可以使用本申请所述的方法编辑这些感光细胞或视网膜祖细胞的基因组 DNA。例如，该方法可以包括在感光细胞或视网膜祖细胞的 CYP4V2 基因的突变位点内或附近进行编辑，使得其不具有突变的 CYP4V2。最后，可以将经基因编辑的感光细胞或视网膜祖细胞植入受试者体内。

所述方法可包括在给药前对治疗剂进行全面分析。例如，对校正细胞的整个基因组进行测序，以确保没有脱靶效应（如果有的话）可以处于与对受试者的最小风险相关的基因组位置。此外，可以在植入之前分离特定细胞的群，包括克隆细胞群。

本申请所述的方法可包括使用定点核酸酶在基因组中精确的靶标位置切割 DNA，从而在基因组内特定位置产生单链或双链 DNA 断裂的方法。此类断裂可以通过内源性细胞过程进行定期修复，例如同源重组、非同源末端连接。

本申请所述的方法可包括在目标基因座中靠近靶序列的位置创建一个或两个 DNA 断裂，两个 DNA 断裂可以为双链断裂或两个单链断裂。所述断裂可通过定点（site-directed）多肽来

实现。定点多肽（例如 DNA 核酸内切酶）可以在核酸（例如基因组 DNA）中引入双链断裂或单链断裂。双链断裂可以刺激细胞的内源性 DNA 修复途径，例如，HR、NHEJ。

利用外源供体模板，可以在同源的侧翼区域之间引入另外的核酸序列（例如，所述靶向载体）或修饰（例如单碱基或多碱基改变或缺失），从而也可以将另外的或改变的核酸序列纳入目标基因座，外源供体可以由质粒载体递送，例如，AAV 载体和/或 TA 克隆载体（例如，ZT4 载体）。

本申请提供了一种调节细胞中 CYP4V2 基因表达的方法，其包括向细胞导入所述的 gRNA，所述的一种或多种分离的核酸分子，和/或中任一项所述的载体。

本申请中所述方法可以是将所述 gRNA 导入到所述细胞中。例如，所述 gRNA 靶向受体细胞基因组的 CYP4V2 基因片段，在核酸酶的帮助下将其剪切，从而产生 CYP4V2 基因翻译为蛋白的机会变少、翻译的蛋白不能执行正常功能的效果。

本申请中所述方法可以是将所述的一种或多种分离的核酸分子导入到所述细胞中。例如，编码所述特异性靶向 CYP4V2 基因的 sgRNA 的分离的核酸分子，使得所述的 CYP4V2 基因片段被破坏，从而产生 CYP4V2 基因翻译为蛋白的机会变少、翻译的蛋白不能执行正常功能的效果。

本申请中所述方法可以是将所述载体导入到所述细胞中。所述载体包含所述的分离的核酸分子和/或所述的供体核酸分子。在某些情形下，所述载体含有所述分离的核酸分子和所述的供体核酸分子，使得所述细胞中 CYP4V2 基因为所述供体核酸分子替代，从而产生了 CYP4V2 基因翻译为蛋白的机会的变化（例如，由不存在 CYP4V2 蛋白的表达转变为达到正常表达量）、翻译的蛋白功能由异常转为正常的效果。在某些情形下，所述载体含有所述分离的核酸分子，使得所述的 CYP4V2 基因片段被破坏，从而产生 CYP4V2 基因翻译为蛋白的机会变少、翻译的蛋白不能执行正常功能的效果。在另一些情形下，所述载体含有所述供体核酸分子，使得所述细胞内含有更多的 CYP4V2 基因片段，可以转录并翻译出更多的 CYP4V2 蛋白。

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

实施例

实施例 1 sgRNA 的合成

1.sgRNA 的靶点

针对 CYP4V2 突变基因突变位点 c.802-8_810del17bpinsGC 设计 sgRNA。使用 CRISPR-Cas9 系统将其中 1 条染色体中的 CYP4V2 突变基因从突变细胞中敲除, 如果 2 条染色体中的突变相同, 可以同时敲除 2 条染色体中的突变。

2.sgRNA 设计

在 CYP4V2 的突变位点区域设计 PAM 序列为 NNGRRT 和 NNGRR (Staphylococcus aureus (金黄色葡萄球菌), SA; SaCas9), 长度为 21bp 的 sgRNA 序列; 设计的 23 条 sgRNA 序列分别如 SEQ ID NO: 67-89。编码所述 sgRNA 的核酸序列见表 2。

表 2 编码 sgRNA 的核酸序列

	正义/ 反义链	序列	PAM
sgRNA1	-1	CATTCATTGGCCCGTTC GCT (SEQ ID NO: 1)	TTGAA (SEQ ID NO: 24)
sgRNA2	-1	ATCACATGCTTCTGTTTG GAC (SEQ ID NO: 2)	TTGGA (SEQ ID NO: 25)
sgRNA3	1	AGCATGTGATTATCATTC AAA (SEQ ID NO: 3)	GCGAA (SEQ ID NO: 26)
sgRNA4	1	TGTGATTATCATTCAAAG CGA (SEQ ID NO: 4)	ACGGG (SEQ ID NO: 27)
sgRNA5	1	TCATTCAAAGCGAACGG GCCA (SEQ ID NO: 5)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA6	1	CAAAGCGAACGGGCCA ATGAA (SEQ ID NO: 6)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA7	1	TAGGGTGCATCCAAGTC CAA (SEQ ID NO: 7)	CAGAA (SEQ ID NO: 29)
sgRNA8	1	GGGCCAATGAAATGAAC GCCA (SEQ ID NO: 8)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA9	1	GAAGACTGTAGAGGTGA TGGC (SEQ ID NO: 9)	AGGGG (SEQ ID NO: 30)
sgRNA10	-1	GGCCCTGCGTTTATTTTT GGA (SEQ ID NO: 10)	GGGGG (SEQ ID NO: 31)
sgRNA11	1	TGCCCCCTCCAAAATA AACG (SEQ ID NO: 11)	CAGGG (SEQ ID NO: 32)
sgRNA12	1	GAAATAGGCTTAGAAAA ATAA (SEQ ID NO: 12)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA13	1	TAGGCTTAGAAAAATAA ATGA (SEQ ID NO: 13)	AAGAA (SEQ ID NO: 33)
sgRNA14	1	AAAGAACTAGCATATT TTAT (SEQ ID NO: 14)	AAGAA (SEQ ID NO: 33)
sgRNA15	1	TTTATAAGAAAATGTGTT AAC (SEQ ID NO: 15)	TAGGG (SEQ ID NO: 34)
sgRNA16	-1	ATGATAATCACATGCTTC	TTGGA (SEQ ID

		TGT (SEQ ID NO: 16)	NO: 25)
sgRNA17	1	AATGAACGCCAATGAAG ACTG (SEQ ID NO: 17)	TAGAG (SEQ ID NO: 35)
sgRNA18	1	TGAAGACTGTAGAGGTG ATGG (SEQ ID NO: 18)	CAGGG (SEQ ID NO: 32)
sgRNA19	-1	TGCGTTTATTTTGGAGG GGG (SEQ ID NO: 19)	CAGAG (SEQ ID NO: 36)
sgRNA20	-1	AGGCCCTGCGTTTATTT TGG (SEQ ID NO: 20)	AGGGG (SEQ ID NO: 30)
sgRNA21	-1	AAGGCCCTGCGTTTATTT TTG (SEQ ID NO: 21)	GAGGG (SEQ ID NO: 37)
sgRNA22	-1	GAAAGGCCCTGCGTTTA TTTT (SEQ ID NO: 22)	TGGAG (SEQ ID NO: 38)
sgRNA23	-1	AGAAAGGCCCTGCGTTT ATTT (SEQ ID NO: 23)	TTGGA (SEQ ID NO: 25)

3.sgRNA 体外编辑有效性检测

(1) sgRNA 的体外转录:

1) sgRNA 体外转录的引物设计见表 3

表 3 sgRNA 体外转录的引物

引物名称	引物序列
F-CYP-sgRNA	TAATACGACTCACTATAGGTTTTAGTACTCTGGAAACAG (SEQ ID NO: 39)
R-CYP-sgRNA	ATCTCGCCAACAAGTTGACGAG (SEQ ID NO: 40)

注: F:Forward 正义链 R:Reverse 反义链

2) sgRNA 体外转录模板的构建

PCR 反应体系如下:

试剂	体积 (μL)
2×KOD-FX 缓冲液	25
2 mM dNTP 混合物	10
正义链引物	1.5
反义链引物	1.5
pX601 质粒	0.5
KOD-FX DNA 聚合酶	2
无酶 H ₂ O	至 50

PCR 反应程序如下:

94°C	2 min
98°C	10 s
58°C	30 s
68°C	30 s

40 个循环
68°C 5 min

3) 使用 2.0% DNA 凝胶跑胶, 使用 OMEGA 胶回收试剂盒回收 gRNA 体外转录模板胶回收的步骤如下:

a) 将 PCR 反应产物中加入等体积的膜结合液, 切胶回收的需要每 1 mg 加入 1 μ L 的膜结合液, 50-60 °C 加热 7 min, 直至所有的凝胶溶解完全, 涡旋混匀, 过柱回收。

b) 将上述液体降入到回收柱中, 10000 $\times$ g 离心 1 min, 去滤液。

c) 加入 700 μ L 的清洗缓冲液, >13000 $\times$ g 离心 1 min, 去滤液。

d) 重复步骤 c)。

e) 空管 >13000 $\times$ g 离心 10 min。

f) 将离心柱转移到新的 1.5 mL 的 Ep 管中, 做好标记, 加入 20-30 μ L 的洗脱缓冲液或 ddH₂O, 室温放置 2 min。

g) >13000 $\times$ g 离心 1 min, 弃掉吸附柱, 将 DNA 保存于 2-8 °C, 测浓度并记录, 长期保存需放置于 -20 °C。

4) sgRNA 的体外转录 (20 μ L 体系):

试剂	体积 (μ L)
10 $\times$ 转录缓冲液	2
rNTP 混合物	2
T7 RNA 聚合酶混合物	2
gRNA 胶回收模板	1 μ g ($\leq$ 14 μ L)
DEPC (焦碳酸二乙酯) H ₂ O	至 20

注意: T7 RNA 聚合酶混合物最后放, 混合后置于 37°C 恒温孵箱, 反应; 反应结束, 加入 2 μ L DNA 酶 I, 37°C 反应 30 min 后跑胶。

5) OMEGA 胶回收试剂盒说明书回收 gRNA, 步骤同上。

(2) CYP4V2 sgRNA 切割模板的制备

提取 CYP4V2 c.802-8_810del17bpinsGC 纯合的患者来源的 iPSCs 的 DNA, 以此为模板制备 CYP4V2 sgRNA 切割模板 dsDNA。

1) 基因组 DNA 提取:

a) 400 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞, 弃上清液。加入 220 μ L PBS (磷酸盐缓冲液)、10 mL RNA 酶溶液和 20 μ L PK 工作液至样品中, 重悬细胞。室温静置 15 min 以上。

b) 加入 250 μ L GB 缓冲液至细胞重悬液中, 涡旋混匀, 65°C 水浴 15-30 min, 过柱纯化;

c) 加入 250 μ L 无水乙醇至消化液中, 涡旋混匀 15-20 s。

d) 将 gDNA 吸附柱置于 2 mL 收集管中。将上一步所得混合液 (包括沉淀) 转移至吸附

柱中。12000 × g 离心 1 min。若出现堵柱现象，再 14000 × g 离心 3-5 min。若混合液超过 750 μL 需分次过柱。

e) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。加入 500 μL 清洗缓冲液 A 至吸附柱中。12000 × g 离心 1 min。

f) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。加入 650 μL 清洗缓冲液 B 至吸附柱中。12000 × g 离心 1 min。

g) 重复步骤 4。

h) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。12000 × g 空管离心 2 min。

i) 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管。加入 30-100 μL 预热至 70°C 的洗脱缓冲液至吸附柱的膜中央，室温放置 3 min。12000 × g 离心 1 min。

注意：对于 DNA 含量丰富的组织，可再加入 30-100 μL 洗脱缓冲液重复洗脱。

弃掉吸附柱，将 DNA 保存于 2-8°C，测浓度并记录，长期保存需放置于 -20°C。

2) PCR 过程使用引物见表 4:

表 4 sgRNA 体外切割实验 dsDNA 片段 PCR 引物

引物名称	引物序列	PCR 产物 长度	适用 sgRNA
F1-S-CYP4V2- dsDNA	TTAGCGCAATCCAATCTCTAGG (SEQ ID NO: 41)	449bp	sgRNA1~12
R1-S-CYP4V2- dsDNA	CTTCATGACTTAGCCTGTTCCCT (SEQ ID NO: 42)		
F2-S-CYP4V2- dsDNA	TTAGCGCAATCCAATCTCTAGG (SEQ ID NO: 41)	791bp	sgRNA13~23
R2-S-CYP4V2- dsDNA	CCACATGGGAGAACTGAGAGCA (SEQ ID NO: 43)		

3) PCR 反应体系如下:

试剂	体积 (μL)
DNA	0.4
5× PrimeSTAR 缓冲液	10
dNTP 混合物	4
正链引物	3
反链引物	3
PrimeSTAR HS DNA 聚合酶	0.5
DEPC 处理水	29.1

PCR 反应程序如下:

95°C	2 min
95°C	10 s
56°C	30 s
72°C	30 s
72°C	5 min
16°C	10 min

30 个循环

4)使用 1.5 % DNA 凝胶跑胶,使用 OMEGA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物,步骤同前。

(3) SaCas9-SgRNA 体外酶切反应:

反应体系如下:

试剂	体积 (μL)
SaCas9	1
10×SaCas9 缓冲液	2
gRNA (体外转录)	50 ng
RHO sgRNA 切割模板	50 ng
DEPC H ₂ O	至 20

充分混匀, 37°C反应 30 min, 加入 3 μL DNA 上样缓冲液混合后 65°C煮 5 min, 2%的琼脂糖凝胶分析酶切结果。

理论切割片段长度见表 5, 实验结果如图 1A-1I 所示, 结果显示, sgRNA8、sgRNA12、sgRNA13、sgRNA14、sgRNA16、sgRNA17、sgRNA18 均对目标片段具有好的切割效果, 可以将 dsDNA 切割为相应的长度的片段。而其他 sgRNA 不能将 dsDNA 切割为相应的片段。

表 5 sgRNA 体外切割实验 dsDNA 片段理论切割长度

	dsDNA 长度	切割后片段长度	
sgRNA1	449bp	154bp	295bp
sgRNA2	449bp	185bp	264bp
sgRNA3	449bp	147bp	302bp
sgRNA4	449bp	143bp	306bp
sgRNA5	449bp	135bp	314bp
sgRNA6	449bp	150bp	299bp
sgRNA7	449bp	172bp	277bp
sgRNA8	449bp	120bp	329bp
sgRNA9	449bp	96bp	353bp
sgRNA10	449bp	76bp	373bp
sgRNA11	449bp	68bp	381bp
sgRNA12	791bp	216bp	575bp
sgRNA13	791bp	220bp	571bp
sgRNA14	791bp	240bp	551bp
sgRNA15	791bp	256bp	535bp
sgRNA16	791bp	282bp	509bp
sgRNA17	791bp	339bp	452bp

sgRNA18	791bp	351bp	440bp
sgRNA19	791bp	368bp	423bp
sgRNA20	791bp	374bp	417bp
sgRNA21	791bp	375bp	416bp
sgRNA22	791bp	377bp	414bp
sgRNA23	791bp	378bp	413bp

实施例 2 细胞水平 sgRNA 靶点验证

1.sgRNA 合成

根据体外切割实验，选择有效的 sgRNA：sgRNA8; sgRNA12; sgRNA13; sgRNA14; sgRNA16; sgRNA17; sgRNA18。酶切位点 Bbs1 序列，在设计 sgRNA 上下游添加 Bbs1 酶切位点（大写字母），编码所述 sgRNA 的核酸分子见表 6：

表 6 编码所述 sgRNA 的核酸序列

编号	序列
CYP4V2-sgRNA8-F	ACACGgggccaatgaaatgaacgccG (SEQ ID NO: 44)
CYP4V2-sgRNA8-R	AAAACtggcggttcatttcattggcccC (SEQ ID NO: 45)
CYP4V2-sgRNA12-F	ACACGgaaataggcttagaaaaataaG (SEQ ID NO: 46)
CYP4V2-sgRNA12-R	AAAACttatttttctaagcctatttcC (SEQ ID NO: 47)
CYP4V2-sgRNA13-F	ACACGtaggcttagaaaaataaatgaG (SEQ ID NO: 48)
CYP4V2-sgRNA13-R	AAAACtcatttattttctaagcctaC (SEQ ID NO: 49)
CYP4V2-sgRNA14-F	ACACGaaagaaactagcatattttatG (SEQ ID NO: 50)
CYP4V2-sgRNA14-R	AAAACataaaatatgctagttttttC (SEQ ID NO: 51)
CYP4V2-sgRNA16-F	ACACGAtgataatcacatgcttctgtG (SEQ ID NO: 52)
CYP4V2-sgRNA16-R	AAAACatgataatcacatgcttctgtC (SEQ ID NO: 53)
CYP4V2-sgRNA17-F	ACACGaatgaacgccaatgaagactgG (SEQ ID NO: 54)
CYP4V2-sgRNA17-R	AAAACcagtcttcattggcggttcattC (SEQ ID NO: 55)
CYP4V2-sgRNA18-F	ACACGtgaagactgtagaggatgatggG (SEQ ID NO: 56)
CYP4V2-sgRNA18-R	AAAACccatcacctctacagtcttcaC (SEQ ID NO: 57)

2. sgRNA 载体构建与质粒提取

(1) sgRNA 退火

将上述合成的各 sgRNA（F、R）分别稀释成 50 μmol，取 sgRNA F.R 各 5 μL 配成 sgRNA Mix1~7。

将 T4 PNK 及 10× T4 连接缓冲液于冰上融化备用。配制如下反应体系：

试剂	体积（μL）
sgRNA 混合物	7
10× T4 连接缓冲液	1

T4 PNK	2
总体积	10

将第 5 步配制的反应体系置于 PCR 仪上, 运行如下反应程序

37 °C	30 min
95 °C	5 min
以 5 °C/min 缓慢降至 25°C	
25 °C	永久

回收反应产物。

(2) 载体酶切

构建 sgRNA 载体, 所用质粒为 AAV-saCas9-puro 载体。质粒图谱如图 2 所示。

使用 BbsI 酶切释放 sgRNA 结合位点, 在 1.5 mL PCR 管中配制如下酶切反应体系:

质粒	15 µg
2× Cutsmart 缓冲液	30 µL
酶	12 µL
H ₂ O	至 258 µL
总体积	300 µL

酶切 1-2 h/ (或者 4°C 过夜酶切), 回收纯化, 测定浓度, 稀释到 50 ng/µL。

(3) 连接

使用上一步的回收载体和退火的 sgRNA 配制如下连接体系 (200 µL PCR 管):

试剂	体积 (µL)
酶切载体	1
退火 sgRNA	1
2× T4 连接缓冲液	5
T4 连接酶	1
H ₂ O	3
总体积	11

将上一步的连接反应体系置于 37°C 连接约 1-2 h, 完成 sgRNA 载体构建。

(4) 质粒转化

1) 取出 TransStbl3 化学感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司 CD-521-02) 置于冰上解冻。

2) 取 1 µL 连接产物至于 50 µL 感受态细胞中, 冰上孵育半小时, 42 °C 热激 90 s, 冰上 2 min。

3) 加入无抗培养基 500 µL 于 37 °C, 200 rpm 摇 1 h。

4) 800 rpm/min 离心 5 min, 弃上清剩约 100 µL, 使用含氨苄抗生素的 LB 琼脂培养基筛选阳性克隆。

5) 第二天挑筛选出的阳性克隆菌 (培养基 500 µL) 摇 3-4 小时, 取 200 µL 送测序。

(5) 质粒提取 (按照 Omega 去内毒素质粒大提试剂盒进行)

1) 将测序正确的质粒进行过夜大摇 (50-200 mL), 37°C 摇床培养 12-16 h, 以扩增质粒, 第二天进行提取 (摇菌时间小于 16 h)。

2) 取 50-200 mL 的菌液, 于室温下 4000×g 离心 10 min, 收集菌体。

3) 弃去培养基。往沉淀中加入 10 mL 溶液 I/RNA 酶 混合液, 通过移液枪吹打或者漩涡振荡使细胞完全重新悬浮。

4) 加入 10 mL 溶液 II, 盖上盖子, 轻轻上下颠倒离心管 8-10 次以获得澄清裂解物。

5) 加入 5 mL 预冷的 N3 缓冲液, 盖好盖子, 并温和地上下颠倒离心管 10 次, 直至形成白色絮状沉淀, 可在室温下静置孵育 2 min。

6) 准备一个针筒过滤器, 拉出针筒中的活塞, 将针筒竖直放在一个合适的试管架上, 在注射器下端出口处放置一个收集管, 针筒开口朝上。立即将裂解液倒入过滤器的针筒中。细胞裂解液在针筒中停留 5 min。此时白色絮状物会漂浮于裂解液表面。细胞裂解液可能已从过滤注射器口流出。用新的 50 mL 试管收集细胞裂解液。小心轻轻地将注射器活塞插入针筒中, 慢慢推动活塞以使裂解液流入到收集试管中。

7) 加入 0.1 倍体积的 ETR 溶液 (蓝色) 至已流出的过滤裂解液中, 颠倒试管 10 次, 然后于冰浴中静置 10 min。

8) 将上述裂解液于 42 °C 下水浴 5 min。裂解液又将再次出现浑浊。此时于 25 °C, 4000 × g 离心 5 min, ETR 缓冲液将在试管底部形成蓝色分层。

9) 将上清液移至另一新的 50 mL 试管中, 加入 0.5 倍体积室温的无水乙醇, 轻轻颠倒试管 6-7 次, 室温放置 1-2 min。

10) 将一个 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入 50 mL 收集试管中, 加入 20 mL 过滤液至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中。室温下, 4000 × g 离心 3 min。弃滤液。

11) 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中, 重复步骤 10 直至剩余的过滤液全部结合到 HiBind® DNA Maxi 结合柱中, 按同样条件离心。

12) 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中, 加入 10 mL HBC 缓冲液至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中, 室温下 4000 × g 离心 3 min, 弃滤液。

13) 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中, 加入 15 mL DNA 清洗液 (用无水乙醇稀释的) 至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中, 室温下 4000 × g 离心 3 min, 弃去滤液。

14) 将 HiBind® DNA Maxi 结合柱套入同一个收集管中, 加入 10 mL DNA 清洗液 (用

无水乙醇稀释的)至 HiBind® DNA Maxi 结合柱中, 室温下 $4000 \times g$ 离心 3 min, 弃去滤液。

15) 最高速(不超过 $6000 \times g$)空甩以干燥 HiBind® DNA Maxi 结合柱的基质 10 min。

16) (选做) 进一步风干 HiBind® DNA Maxi 结合柱(可选) 选择下面任一种方法来进一步干燥 HiBind® DNA Maxi 结合柱, 再进行洗脱 DNA (有必要的話):

a) 把 HiBind® DNA Maxi 结合柱放在真空容器中 15 min 来干燥乙醇: 在室温下把柱子移到真空室, 连接好所有真空室的装置。密封真空室, 真空 15 min。移走 HiBind® DNA Maxi 结合柱进行下一步操作。b) 在真空烘箱烘干柱子或 65°C 干燥 10-15 min。移走 HiBind® DNA Maxi 结合柱, 进行下一步骤操作。

17) 把 HiBind® DNA Maxi 结合柱置于一干净的 50 mL 离心管上, 直接加入 1-3mL 无内毒素洗脱缓冲液到 HiBind® DNA Maxi 结合柱基质上(所加的量取决于预期终产物浓度), 室温静置 5 min。

18) $4000 \times g$, 离心 5 min 以洗脱出 DNA。

19) 弃除柱子, 把 DNA 产物保存于 -20°C 。

20) 再次将提取的质粒送测序以确保构建的质粒正确。

3. 293T 细胞验证 sgRNA 有效性

(1) 293T 细胞培养

1) 冻存细胞的复苏

a) 将恒温水浴锅温度调至 37°C , 将冻存细胞从液氮中取出, 用镊子夹住盖子, 在水中快速晃动。

b) 将冻存液转移到 15 mL 刻度离心管中, 缓慢地加入 10 mL 的细胞培养液, 并轻轻的晃动混匀液体。拧紧盖子, 过火, 1000 rpm/min, 离心 3 min。

c) 过火, 加入适量培养液, 轻轻吹打底部的细胞沉淀, 然后将细胞转移至培养瓶中放到培养箱中培养。293T 细胞使用的培养基为添加 10% 胎牛血清和 100 U/mL 双抗的高糖 DMEM, 5% CO_2 于 37°C 培养。

2) 细胞传代

a) 倒置显微镜下观察细胞的形态和密度, 当细胞在培养瓶中的汇合度到达 80%-90% 时, 开始对细胞进行传代。

b) 将细胞培养瓶中的旧培养液洗出来, 用 PBS 清洗 3 次。向培养瓶中加入 500 μl 的含 EDTA 的胰蛋白酶, 放入培养箱中孵育 1 分钟左右, 带细胞间隙变大, 细胞变圆时, 立即向

培养瓶中加入 1 mL 的培养液终止消化,并用吸管轻轻吹打细胞,待细胞全部从瓶底飘起后,将培养瓶中的液体转移到离心管中,1000 rpm/min 离心 2 min。

c) 弃掉上清,再向离心管中加入 2 mL 培养基使沉淀的细胞重新悬浮。将细胞悬浮液分装到 4 个新培养瓶中,每个加入 4 mL 的培养液,轻摇培养瓶,使细胞混合均匀铺满培养瓶,放入细胞培养箱中进行培养。

d) 转染之前 1 d,每孔中分别加入密度为 80%、细胞舒展、细胞间隙均匀的 293T 细胞 100 万,次日细胞长到 80-90%汇合度时进行质粒转染。

(2) 采用 PEI (聚乙烯亚胺) 法转染 293T 细胞

1) 取 1.5 mL 的 EP 管,按以上顺序进行编号,每管中加入 250 μ L 的 DMEM 培养基(无血清),分别加入 1.5 μ g AAV-CYP4V2-sgRNA8、sgRNA 12、sgRNA 13、sgRNA 14、sgRNA 16、sgRNA 17、sgRNA 18 质粒和空载质粒,充分涡旋混匀后,每管加入 7.5 μ L 的 PEI 转染试剂,涡旋混匀,室温放置 20 min 后进行转染。另设置阴性对照。

2) 逐滴加入培养基中(六孔板培养基加无血清 DMEM=2 mL/孔),孵箱培养,12-18 h 之内半量换液。次日,荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,以评估转染效率,转染效率良好的情况下继续培养转染后的质粒。

3) 抗性细胞筛选

a) 配液: 10 mg/mL (母液) 稀释为 1 μ g/mL 的嘌呤霉素,筛选细胞。

b) 换液: 转染后两日,在每个空中(包括阴性对照组)加入 3 mL 含嘌呤霉素的 293T 细胞培养基,开始筛选转染阳性的细胞,以后每日观察细胞的存活情况,每 2 日换液,换液时加上相应量的嘌呤霉素。待到阴性对照的孔的细胞完全死亡,而实验组和对照组的细胞有存活的(说明转染成功),停止抗生素筛选,改用正常培养基。

(3) 293T 细胞基因组 DNA 的提取

1) 待 6 孔板细胞长到 80-90%汇合度后,传代到 6 cm 培养皿培养。

2) 待细胞长到 80-90%汇合度后,收细胞,准备提取基因组 DNA,整个过程在 7-10 d 左右。基因组的提取使用南京诺唯赞细胞提取试剂盒,实验步骤如下:

a) 400 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞,弃上清液。加入 220 μ L PBS、10 mL RNA 酶缓冲液和 20 μ L PK 工作液至样品中,重悬细胞。室温静置 15 min 以上。

b) 加入 250 μ L GB 缓冲液至细胞重悬液中,涡旋混匀,65°C 水浴 15-30 min,过柱纯化。

c) 加入 250 μ L 无水乙醇至消化液中,涡旋混匀 15-20 s。

d) 将 gDNA 吸附柱置于 2 mL 收集管中。将上一步所得混合液（包括沉淀）转移至吸附柱中。12000 × g 离心 1 min。若出现堵柱现象，再 14000 × g 离心 3-5 min。若混合液超过 750 μL 需分次过柱。

e) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。加入 500 μL 清洗缓冲液 A 至吸附柱中。12000 × g 离心 1 min。

f) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。加入 650 μL 清洗缓冲液 B 至吸附柱中。12000 × g 离心 1 min。

g) 重复步骤 4。

h) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。12000 × g 空管离心 2 min。

i) 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管。加入 30-100 μL 预热至 70°C 的洗脱缓冲液至吸附柱的膜中央，室温放置 3 min。12000 × g 离心 1 min。

注意：对于 DNA 含量丰富的组织，可再加入 30-100 μL 洗脱缓冲液重复洗脱。

j) 弃掉吸附柱，将 DNA 保存于 2-8°C，测浓度并记录，长期保存需放置于 -20°C。

(4) T7E1 酶切实验

1) 用提取上述转染了 AAV-CYP4V2- sgRNA8、sgRNA12、sgRNA13、sgRNA14、sgRNA16、sgRNA17、sgRNA18 质粒的 293T 细胞的基因组 DNA 为模板，围绕靶点附近，利用上下游引物对提取的基因组 DNA 进行扩增，进行 DNA 片段 PCR，引物序列见表 7。

表 7 T7E1 酶切实验的引物

引物名称	序列	PCR 产物长度
T7E1-F	CTCATTAGCGCAATCCAATCTC (SEQ ID NO: 58)	793bp
T7E1-R	AGCAATCTCTGGCTGCTCTT (SEQ ID NO: 59)	

2) 使用液体回收试剂盒（OMEGA Gel Extraction Kit(200) D2500-02）对上述 PCR 产物进行液体 DNA 回收；DNA 回收步骤如下：

a) 将 PCR 反应产物中加入等体积的膜结合液，切胶回收的需要每 1 mg 加入 1 μL 的膜结合液，50-60°C 加热 7 min，直至所有的凝胶溶解完全，涡旋混匀，过柱回收；

b) 将上述液体降入到回收柱中，10000 × g 离心 1 min，去滤液；

c) 加入 700 μL 的清洗缓冲液，>13000 × g 离心 1 min，去滤液；

d) 重复步骤 c)；

e) 空管 >13000 × g 离心 10 min；

f) 将离心柱转移到新的 1.5 mL 的 Ep 管中，做好标记，加入 20-30 μL 的洗脱缓冲液或

ddH₂O，室温放置 2min；

g) >13000 × g 离心 1 min，弃掉吸附柱，将 DNA 保存于 2-8℃，测浓度并记录，长期保存需放置于-20℃。

3) T7E1 酶切实验进行 sgRNA 效率验证

将上述获得的 PCR 回收或切胶回收产物进行 T7E1 酶切反应。

a) T7E1 酶切退火体系（19.5 μL）：

试剂	体积（μL）
NEB 缓冲液 2	2
PCR 或切胶回收产物	X（500 ng 或 1000 ng）
去离子 H ₂ O	至 19.5

b) T7E1 酶切退火程序：

95℃	2 min	
95℃	至 85℃	温度以 2℃/s 的速度下降
85℃	至 25℃	温度以 0.1℃/s 的速度下降
16℃	∞	

c) T7E1 酶切反应体系

试剂	体积（μL）
退火产物	9.75 或 9.5
T7E1 酶	0.25 或 0.5

37℃孵育 20 min

d) 酶切产物跑胶

配胶：2.5%凝胶，加双倍染料

跑胶程序：140 V，20 min 到 30 min

e) 查看跑胶结果

酶切结果见图 3；各片段切割后片段长度见表 8。

表 8 sgRNA 切割后片段长度表

模板序号	PCR 片段长度	酶切后片段长度	
CYP4V2-sgRNA8	793bp	348bp	445bp
CYP4V2-sgRNA13		224bp	569bp
CYP4V2-sgRNA17		358bp	435bp
CYP4V2-sgRNA18		370bp	423bp

结果显示，sgRNA8、sgRNA13、sgRNA17、sgRNA18 皆对靶点有切割效果，并且切割后的片段与表 8 所示是一致的。

（5）基因组 DNA 包含切割位点 PCR 片段基因测序，套峰检验

将上述 DNA 扩增片段测序，测序峰图如图 4A-C 所示。结果显示，sgRNA13、sgRNA17、sgRNA18 切割效率高，sgRNA 切割位点附近有套峰出现。

4. 双 sgRNA 切割效率有效性验证

(1) 双 sgRNA-AAV-saCas9-puro 质粒构建、提取

根据上述实验结果，sgRNA13.17.18 切割效率高。在上述实验构建的 AAV-saCas9-sgRNA13 质粒中，sa-gRNA Scaffold 与 AAV ITR 区之间用 NotI 酶切处理后，分别插入 U6 promoter(启动子)-sgRNA17-saScaffold (sa 支架)片段与 U6 promoter -sgRNA18-sa-gRNA Scaffold，构建 AAV-saCas9-sgRNA13-sgRNA17、AAV-saCas9-sgRNA13-sgRNA18 质粒。

1) U6 promoter-sgRNA17-saScaffold 片段与 U6 promoter-sgRNA18-sa-gRNA Scaffold 片段 PCR 引物序列见表 9。

表 9 U6-SACFFOLD 引物序列

引物名称	序列
U6-SACFFOLD-F:	CTTGTTGGCGAGATTTTTCGCGCC gagggcctatttcccatgattc (SEQ ID NO: 60)
U6-SACFFOLD-R:	CCATCACTAGGGGTTCCTGC (SEQ ID NO: 61)

其中，大写字母部分为同源臂序列

PCR 反应体系如下：

试剂	体积 (μL)
2×KOD-FX 缓冲液	25
2 mM dNTP 混合物	10
正义链引物	1.5
反义链引物	1.5
AAV-saCas9-puro 质粒	0.5
KOD-FX DNA 聚合酶	2
无酶 H ₂ O	至 50

PCR 反应程序如下：

94°C	2 min
98°C	10 s
58°C	30 s
68°C	30 s
68°C	5 min

40 个循环

2) 使用 2.0% DNA 凝胶跑胶，使用 OMEGA 胶回收试剂盒回收 gRNA 体外转录模板胶回收的步骤如下：

a) 将 PCR 反应产物中加入等体积的膜结合液，切胶回收的需要每 1 mg 加入 1 μL 的膜

结合液，50-60 °C加热 7 min，直至所有的凝胶溶解完全，涡旋混匀，过柱回收；

b) 将上述液体降入到回收柱中， $10000 \times g$ 离心 1 min，去滤液；

c) 加入 700 μ L 的清洗缓冲液， $>13000 \times g$ 离心 1 min，去滤液；

d) 重复步骤 c)；

e) 空管 $>13000 \times g$ 离心 10 min；

f) 将离心柱转移到新的 1.5 mL 的 Ep 管中，做好标记，加入 20-30 μ L 的洗脱缓冲液或 ddH₂O，室温放置 2 min；

g) $>13000 \times g$ 离心 1 min，弃掉吸附柱，将 DNA 保存于 2-8°C，测浓度并记录，长期保存需放置于-20°C。

3) 酶切载体

使用 NotI 酶切释放位点，在 1.5 mL PCR 管中配制如下酶切反应体系：

质粒	15 μ g
2 $\times$ Cutsmart 缓冲液	30 μ L
酶	12 μ L
H ₂ O	至 258 μ L
总体积	300 μ L

酶切 1-2h/ (K 过夜酶切)，回收纯化，测定浓度，稀释到 50 ng/ μ L。

4) 连接

使用上一步的回收载体和退火的 sgRNA 配制如下连接体系 (200 μ L PCR 管)：

试剂	体积 (μ L)
酶切载体	1
退火 sgRNA	1
2 $\times$ T4 连接缓冲液	5
T4 连接酶	1
H ₂ O	3
总体积	11

将上一步的连接反应体系置于 37°C 连接约 1-2 h，完成 sgRNA 载体构建。

5) 质粒转化

a) 取出 TransStbl3 化学感受态细胞置于冰上解冻。

b) 取 1 μ L 连接产物至于 50 μ L 感受态细胞中，冰上孵育半小时，42 度热激 90 s，冰上 2 min。

c) 加入无抗培养基 500 μ L 于 37 摄氏度，200 rpm 摇 1 h。

d) 800 rpm/min 离心 5 min，弃上清剩约 100 μ L，使用含氨苄抗生素的 LB 琼脂培养基筛选阳性克隆。

e) 第二天挑筛选出的阳性克隆菌(培养基 500 μ L)摇 3-4 小时,取 200 μ L 送测序。

6) 质粒提取(按照 Omega 去内毒素质粒大提试剂盒进行)步骤同前。

(2) 293T 细胞验证双 sgRNA 与单 sgRNA 有效性

1) 293T 细胞培养

a) 冻存细胞的复苏

i) 将恒温水浴锅温度调至 37°C,将冻存细胞从液氮中取出,用镊子夹住盖子,在水中快速晃动。

ii) 将冻存液转移到 15 mL 刻度离心管中,缓慢地加入 10 mL 的细胞培养液,并轻轻的晃动混匀液体。拧紧盖子,过火,1000 rpm/min,离心 3 min。

iii) 过火,加入适量培养液,轻轻吹打底部的细胞沉淀,然后将细胞转移至培养瓶中放到培养箱中培养。293T 细胞使用的培养基为添加 10%胎牛血清和 100 U/mL 双抗的高糖 DMEM,5% CO₂ 于 37°C 培养。

b) 细胞传代

i) 倒置显微镜下观察细胞的形态和密度,当细胞在培养瓶中的汇合度到达 80%-90%时,开始对细胞进行传代。

ii) 将细胞培养瓶中的旧培养液洗出来,用 PBS 清洗 3 次。向培养瓶中加入 500 μ L 的含 EDTA 的胰蛋白酶,放入培养箱中孵育 1 min 左右,带细胞间隙变大,细胞变圆时,立即向培养瓶中加入 1 mL 的培养液终止消化,并用吸管轻轻吹打细胞,待细胞全部从瓶底飘起后,将培养瓶中的液体转移到离心管中,1000 rpm/min 离心 2 min。

iii) 弃掉上清,再向离心管中加入 2 mL 培养基使沉淀的细胞重新悬浮。将细胞悬浮液分装到 4 个新培养瓶中,每个加入 4 mL 的培养液,轻摇培养瓶,使细胞混合均匀铺满培养瓶,放入细胞培养箱中进行培养。

iv) 转染之前 1 d,每孔中分别加入密度为 80%、细胞舒展、细胞间隙均匀的 293T 细胞 100 万,次日细胞长到 80-90%汇合度时进行质粒转染。

(2) 采用 PEI(聚乙烯亚胺)法转染 293T 细胞

a) 取 1.5 mL 的 EP 管,按以上顺序进行编号,每管中加入 250 μ L 的 DMEM 培养基(无血清),依次加入 1.5 mg AAV-CYP4V2-sgRNA 13 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA 17 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA 18 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA 13-sgRNA 17 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA 13-sgRNA 18 质粒和空载质粒,充分涡旋混匀后,每管加入 7.5 μ L 的 PEI 转染试剂,涡旋混匀,室温放置 20 min 后进行转染。另设置阴性对照。

b) 逐滴加入培养基中(六孔板培养基加无血清 DMEM=2 mL/孔), 孵箱培养, 12-18 h 之内半量换液。次日, 荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况, 以评估转染效率, 转染效率良好的情况下继续培养转染后的质粒。

c) 抗性细胞筛选

i) 配液: 10 mg/mL (母液) 稀释为 1 μ g/mL 的嘌呤霉素, 筛选细胞

ii) 换液: 转染后两日, 在每个空中(包括阴性对照组)加入 3 mL 含嘌呤霉素的 293T 细胞培养基, 开始筛选转染阳性的细胞, 以后每日观察细胞的存活情况, 每 2 日换液, 换液时加上相应量的嘌呤霉素。待到阴性对照的孔的细胞完全死亡, 而实验组和对照组的细胞有存活的(说明转染成功), 停止抗生素筛选, 改用正常培养基。

3) 293T 细胞基因组 DNA 的提取

a) 待 6 孔板细胞长到 80-90%汇合度后, 传代到 6 cm 培养皿培养。

b) 待细胞长到 80-90%汇合度后, 收细胞, 准备提取基因组 DNA, 整个过程在 7-10 d 左右。基因组的提取使用南京诺唯赞细胞提取试剂盒, 实验步骤如下:

i) 400 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞, 弃上清液。加入 220 μ L PBS、10 mL RNA 酶溶液和 20 μ L PK 工作液至样品中, 重悬细胞。室温静置 15 min 以上;

ii) 加入 250 μ L GB 缓冲液至细胞重悬液中, 涡旋混匀, 65°C 水浴 15-30 min, 过柱纯化;

iii) 加入 250 μ L 无水乙醇至消化液中, 涡旋混匀 15-20 s;

iv) 将 gDNA 吸附柱置于 2 mL 收集管中。将上一步所得混合液(包括沉淀)转移至吸附柱中。12000 $\times$ g 离心 1 min。若出现堵柱现象, 再 14000 $\times$ g 离心 3-5 min。若混合液超过 750 μ L 需分次过柱。

v) 弃滤液, 将吸附柱置于收集管中。加入 500 μ L 清洗缓冲液 A 至吸附柱中。12000 $\times$ g 离心 1 min。

vi) 弃滤液, 将吸附柱置于收集管中。加入 650 μ L 清洗缓冲液 B 至吸附柱中。12000 $\times$ g 离心 1 min。

vii) 重复步骤 4。

viii) 弃滤液, 将吸附柱置于收集管中。12000 $\times$ g 空管离心 2 min。

ix) 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管。加入 30-100 μ L 预热至 70°C 的洗脱缓冲液至吸附柱的膜中央, 室温放置 3 min。12000 $\times$ g 离心 1 min。

注意: 对于 DNA 含量丰富的组织, 可再加入 30-100 μ L 洗脱缓冲液重复洗脱。

x) 弃掉吸附柱, 将 DNA 保存于 2-8°C, 测浓度并记录, 长期保存需放置于 -20°C。

4) 基因组 DNA 包含切割位点 PCR 片段基因测序, 套峰检验。

a) 将上述 DNA 跨切割靶点设计引物, 扩增片段。引物序列见表 10。

表 10 基因组 DNA 包含切割位点序列的扩增引物

引物名称	序列	PCR 产物长度
F	AGAGATTTTAATTAAGGTACctcattagcgcaatccaatctc (SEQ ID NO: 62)	833bp
R	GAAACATGTATTAATACGCGagcaatctctggctgctctt (SEQ ID NO: 63)	

大写字母部分为同源臂序列 (PMD-19T-MCS 载体 MluI 与 KpnI 酶切后同源臂)。

b) 载体线性化及连接

质粒载体为 PMD-19T-MCS 载体, 载体线性化方法同前, 所用酶为 MluI 酶与 KpnI 酶, 此处不再赘述。将 PCR 产物回收纯化, 测序, 连接 PMD-19T-MCS 线性化载体。方法同前, 此处不再赘述。

c) 质粒转化

i) 取出 TransStbl3 化学感受态细胞置于冰上解冻。

ii) 取 1 μ L 连接产物至于 50 μ L 感受态细胞中, 冰上孵育半小时, 42 度热激 90 s, 冰上 2 min。

iii) 加入无抗培养基 500 μ L 于 37 摄氏度, 200 rpm 摇 1 h。

iv) 800 rpm/min 离心 5 min, 弃上清剩约 100 μ L, 使用含氨苄抗生素的 LB 琼脂培养基筛选阳性克隆。

v) 第二天挑筛选出的阳性克隆菌, 各挑取 80 个送测序。

d) 阳性率分析

经过计算测序峰图, 阳性率如下:

sgRNA13 阳性率 54%, sgRNA17 阳性率 48.5%, sgRNA18 阳性率 62.5%, sgRNA13+17 阳性率 64% , sgRNA13+18 阳性率 51.2%。

可以发现一定程度上, 双 sgRNA 阳性率升高。

实验结果如图 5 所示。

实施例 3 Donor (供体核酸分子) 筛选

1. Donor 设计

Donor 设计采用 HDR 方法。考虑到 sgRNA13 切割位点在 intron6, sgRNA17、sgRNA18 切割位点在 exon7, 因此, 我们在 sgRNA17 与 sgRNA18 切割位点之间选取插入 (具体为 exon7:

c.802+42 位点) EGFP 基因, 同时在 EGFP 基因左右各加 800bp 同源臂。

Donor 设计图如图 6 所示。

Donor 序列如:SEQ ID NO: 64-66 中任一项所示。

2. PMD19-T-donor 质粒构建、提取

步骤同前, 此处不再赘述。

3. 293T 细胞验证 donor 有效性

(1) 293T 细胞培养

步骤同前, 此处不再赘述。

(2) 采用 PEI (聚乙烯亚胺) 法 293T 细胞共转染

1) 取 1.5mL 的 EP 管, 按以上顺序进行编号, 每管中加入 250 μ L 的 DMEM 培养基 (无血清), 依次加入 1.5 μ g AAV-CYP4V2-sgRNA13 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA17 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA18 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA17 质粒; AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA18 质粒和空载质粒, 充分涡旋混匀后, 每管加入各自对应的 1.5 μ g PMD19-T-donor 质粒 (对应关系见下表), 混匀后各加 7.5 μ L 的 PEI 转染试剂, 涡旋混匀, 室温放置 20 min 后进行转染。另设置阴性对照。

表 11 sgRNA 和 donor 序列对应表

sgRNA	对应 donor
AAV-CYP4V2-sgRNA13	PMD19-T-dono13
AAV-CYP4V2-sgRNA17	PMD19-T-dono17
AAV-CYP4V2-sgRNA18	PMD19-T-dono18
AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA17	PMD19-T-dono13
	PMD19-T-dono17
AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA18	PMD19-T-dono13
	PMD19-T-dono18

2) 逐滴加入培养基中 (六孔板培养基加无血清 DMEM=2 mL/孔), 孵箱培养, 12-18 h 之内半量换液。次日, 荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况, 以评估转染效率, 转染效率良好的情况下继续培养转染后的质粒。

3) 抗性细胞筛选

a) 配液: 10 mg/mL (母液) 稀释为 1 μ g/mL 的嘌呤霉素, 筛选细胞。

b) 换液: 转染后两日, 在每个空中 (包括阴性对照组) 加入 3 mL 含嘌呤霉素的 293T 细胞培养基, 开始筛选转染阳性的细胞, 以后每日观察细胞的存活情况, 每 2 日换液, 换液时加上相应量的嘌呤霉素。待到阴性对照的孔的细胞完全死亡, 而实验组和对照组的细胞有存活的 (说明转染成功), 停止抗生素筛选, 改用正常培养基。

4) 流式细胞筛选

将抗生素筛选后细胞 (约 7 天) 进行流式细胞筛选, 步骤如下:

a) 吸去六孔板里的培养基, 用 DPBS (DuLbecco's 磷酸盐缓冲液) 洗 2 次;

b) 加入 500 μ L 的 0.05% 胰酶, 37 $^{\circ}$ C 孵育消化 4 min;

c) 加入 3-5 倍体积的 DMEM 中和胰酶, 800 r/min, 2 min 离心;

d) 吸去上清, 加入 PBS 重悬细胞, 800 r/min, 2 min 离心, 重复一次;

e) 吸去上清, 加入 200 μ L 含 2% 的 FBS 的 PBS 重悬细胞;

f) 将上一步所得液体加入过滤管, 使其全部通过滤网;

g) 上机, 将筛选后阳性细胞转至 12 孔板或者 6 孔板培养。

5) 293T 细胞基因组 DNA 的提取

a) 待 6 孔板细胞长到 80-90% 汇合度后, 传代到 6 cm 培养皿培养。

b) 待细胞长到 80-90% 汇合度后, 收细胞, 准备提取基因组 DNA, 整个过程在 7-10 d 左右。基因组的提取使用南京诺唯赞细胞提取试剂盒, 实验步骤如上, 此处不再赘述。

6) 目的片段测序

a) 围绕 donor 上下游设计引物, 同时在引物上下游添加酶切位点。

b) 载体线性化及连接

质粒载体为 PMD-19T-MCS 载体, 载体线性化方法同前, 所用酶为 MluI 酶与 KpnI 酶, 此处不再赘述。将 PCR 产物回收纯化, 测序, 连接 PMD-19T-MCS 线性化载体, 方法同前, 此处不再赘述。

c) 质粒转化

方法同前。

d) 测序

各挑取各个质粒送测序, 统计测序结果。

实施例 4 使用患者 3D 视网膜组织体外验证 sgRNA 的基因编辑效率

1. 患者肾上皮细胞的提取和培养

使用北京赛贝公司提供的肾上皮细胞分离和培养试剂盒进行，实验步骤如下：

- 1) 将 UrinEasy 分离完全培养基、添加剂、Gelatin（明胶）、洗涤液带到细胞间。
- 2) 照上紫外灯及 12 孔板、50 mL 离心管、15 mL 离心管、电动移液器、移液管、吸管、5 mL 枪及枪头、1 mL 枪及枪头；打开 37 °C 水浴锅。
- 3) 取尿：戴手套、消毒、最好中段尿、并用封口膜封口。
- 4) Gelatin 750 μ L/孔，包被皿底（3 个孔）不少于半小时，置于 37°C。
- 5) 75%酒精消毒尿瓶外表面，分装至 50 mL 锥形底离心管中，封口后 400 $\times$ g 离心 10 min。
- 6) 取出 UrinEasy 分离完全培养基+添加剂并配置（每 0.5 mL 添加剂与 5 mL 基础培养基混合）。
- 7) 最小速度移液管，沿上液面，缓慢吸取上清至 1 mL。
- 8) 重悬至 15 mL 离心管中，加入 10 mL 洗涤液，混匀，200 $\times$ g 离心 10 min。
- 9) 取出 12 孔板，吸去 Gelatin，用洗涤液清洗一次（500 μ L），每孔加入 750 μ L UrinEasy 分离完全培养基，置于 37°C。
- 10) 取出 15 mL 离心管，剩余 0.2 mL 细胞团。
- 11) UrinEasy 分离完全培养基重悬细胞团：男性一孔，女性两孔，记为 D0（第 0 天）。
- 12) 观察：
第 1 天：观察有无污染；
第 2 天：补充分离培养基——女性：500 μ L/孔；男性：250 μ L/孔；
第 4 天：若无贴壁：半量换液，每两天换液，缓慢沿壁加入 1 mL 分离完全培养基。
- 13) 直到出现贴壁：细胞出现贴壁（3~7 天或 9~10 天）后，UrinEasy 扩增完全培养基培养两天，500 μ L，全量换液。贴壁后大概 9~12 天（不超过 14 天）80~90%汇合度时传代，依次传代至 6 孔板，6 cm 培养皿和 10 cm 培养皿后冻存，备用。

（2）iPSCs 的诱导

将患者来源的（c.802-8_810del17bpinsGC）肾上皮细胞诱导成 iPSCs，步骤如下：

- 1) 体细胞汇合度达到 70-90%即可进行消化传代，将细胞接种于 96 孔板中；接种密度控制在 5000—15000 个/孔，可根据细胞情况设置 3 个密度梯度，每个梯度设置 3 个复孔。细胞接种当天记为第-1 天。
- 2) 第 0 天：镜下观察细胞的汇合度以及状态，选择不同梯度的复孔进行消化计数，选择细胞量达到 10000-20000 个的孔进行重编程。重编程培养基 A 配方如下：

重编程培养基 A	体积
体细胞培养基	10 mL
重编程添加剂I	10 μ L

3) 先将重编程添加剂II离心, 再将 97 μ L 重编程培养基 A 加入到重编程添加剂II管中, 混匀配成重编程培养基 B, 将 100 μ L 重编程培养基 B 加入选定的符合条件的一个 96 孔中, 将培养板放回培养箱。

4) 第 1-2 天: 镜下观察, 并拍照记录细胞的形态变化。若细胞形态变化明显即可撤去重编程培养基 B, 换为重编程培养基 A 继续培养; 若形态变化不明显, 可不换液。

5) 第 3 天: 若细胞形态在前两天就已经发生了明显的形变, 且细胞生长速度较快, 可以进行胰酶消化传代。根据细胞状态和细胞量将细胞传至六孔板的 2-6 个孔, 加入重编程培养基 C, 尽量形成单细胞贴壁。重编程培养基 C 配方如下:

重编程培养基 C	体积
重编程培养基 A	9.8 mL (上述剩余)
重编程添加剂III	5 μ L

6) 第 4 天: 观察细胞的贴壁情况, 若大部分细胞贴壁良好, 则更换新鲜的体细胞培养基继续培养。

7) 第 5 天: 镜下观察, 若有小簇克隆 (4 个细胞以上的克隆团块) 形成, 可将体细胞培养基换为 Reproeasy 人体细胞重编程培养基。若暂无小簇克隆形成, 可继续观察一到两天, 再更换 Reproeasy 人体细胞重编程培养基。

8) 第 6-8 天: 镜下观察, 若小簇克隆变大, 一个克隆团块有 10 个以上的细胞, 可直接将 Reproeasy 人体细胞重编程培养基换为 PSCeasy 人多潜能干细胞培养基 (或 PGM1 人多潜能干细胞培养基)。若换液前观察到死细胞较多, 可用室温平衡后的 PBS 清洗后, 再进行换液。

9) 第 9-20 天: 镜下观察, 并拍照记录细胞形态变化。每天更换经过室温平衡的新鲜 PSCeasy 人多潜能干细胞培养基。

10) 第 21 天: 镜下观察, 若单个细胞克隆能填满整个 10 倍镜视野, 可用 1 mL 注射器针头 (或其他器具如玻璃针) 切割克隆, 并将其挑取至提前包被 Matrigel (基质胶) 的 48 孔板中 (若克隆状态好, 细胞厚实且生长较快, 可直接挑取到 24 孔板中)。

11) 克隆挑出后用 PSCeasy 人多潜能干细胞复苏培养基接种, 细胞贴壁后可以更换为 PSCeasy 人多潜能干细胞培养基继续培养至所需的代数。

(3) 患者来源的 3D 视网膜细胞的诱导

具体步骤见表 12。

表 12 患者来源的 3D 视网膜细胞诱导步骤

阶段 1	第 0 天	将 iPSCs 以 3 万/cm ² 的密度铺种于 T25 瓶中，培养至细胞密度达到 70% 左右。	E8 培养基
阶段 2	第 1 天	Dispase (分散酶)(2 mg/mL) 消化，加 3:1 的 E8:NIM+rock inhibitor (rock 抑制剂)(Y27632) 培养基悬浮培养细胞于 10 cm 皿中。(EB (拟胚体) 第二天形成并单独存在。)	E8 +NIM
	第 2 天	换液 E8:NIM=1:1。	
	第 3 天	换液 E8:NIM=1:3。	
	第 4-5 天	换液 Complete NIM(完全 NIM 培养基)。	NIM
	第 6 天	换液 NIM + 50 ng/mL BMP4。	
	第 7 天	挑选形态良好的 EBs (单腔、清晰)，吸取 1 mL (约 200 个左右 EBs) 培养基滴加到贴壁型 6 孔板，再加入 (1 mL NIM+250 μ L FBS)/孔。	
	第 8 天	换液 (4 mL NIM + 25 ng/mL BMP4) /孔。	
	第 9-15 天	每隔一天半量换液，选用 NIM。	
阶段 3	第 16 天	用 10 μ L 枪头 将聚集的细胞团转入到 15 mL 离心管，使其自然沉入底部，去上清，加入 5 mL RDM 重悬，铺种于 6 cm 皿中，2—3 天换一次液。	RDM
	第 18-20 天	在 4 $\times$ 镜下观察，将表面有光亮外环的视网膜神经球(团)非常轻柔缓慢地收集起来，转入到含 5 mL RDM 的 15 mL 离心管中。将收集到的视网膜神经球(团)转移到 6 cm 皿中。	
	第 20-30 天	2—3 天换一次液，根据其外观是否有光亮外环持续挑选视网膜类器官，在此期间，有些类器官可能会逐步地向非视网膜神经球转变。30 天后，剩余的视网膜神经球可以自此保持其形态。	

(4) AAV8 病毒的构建和包被

1) 质粒扩增。构建好的 AAV 载体 (sgRNA 和 donor 均改造自质粒 pX601-AAV-CMV-SaCas9 (Addgene Plasmid #61591)，为方便描述，下文将 sgRNA 的质粒命名为 AAV-CYP4V2-sgRNA，donor 质粒命名为 AAV-CYP4V2-donor，其中 AAV-CYP4V2-donor 含有部分 EGFP 序列，同上述 PMD-19T-donor 序列)、包装质粒和辅助质粒需经过大量去内毒素抽提，使用 Qiagen 大抽试剂盒进行质粒的大量抽提，步骤同前。

2) AAV8-293T 细胞转染。转染当天观察细胞密度，80-90% 满即可将载体质粒、包装质粒和辅助质粒进行转染。

3) AAV8 病毒收毒：病毒颗粒同时存在于包装细胞和培养上清中。可以将细胞和培养上清都收集下来以获得最好的收率。

4) AAV 的纯化、-80 $^{\circ}$ C 长期保存。

(5) 3D 视网膜组织体外验证 sgRNA 基因编辑效率

1) 使用 AAV8 感染 3D Retina (视网膜) 组织。

2) 验证基因编辑效率。

1) T7E1 酶切实验

步骤同前。

2) TOPO PCR 克隆

为了将 AAV-CYP4V2-sgRNA, AAV-CYP4V2-donor 的编辑效率量化并将实验组和对照组的切割效率进行统计学分析, 我们使用 invitrogen 的 Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit 进行实验, 挑菌, Sanger (桑格) 测序。

a) 使用 3D 视网膜组织感染 AAV 病毒后获得的 DNA 作为扩增模板, 使用 invitrogen 的 Platinum SuperFi™ 系列的 DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 反应体系如下 (50 μ L 体系):

5 $\times$ SuperFi™ 缓冲液	10 μ L
10 mM dNTP 混合物	1 μ L
正义链引物	1.25 μ L
反义链引物	1.25 μ L
gDNA	50 ng
Platinum™ SuperFi™ DNA 聚合酶	0.5 μ L
DEPC H ₂ O	至 50 μ L

b) Touch down PCR 程序:

步骤同前。

c) TOPO PCR 克隆反应如下

试剂	体积 (μ L)
新鲜的 PCR 产物	0.5-4
盐溶液	1
ddH ₂ O	至 5
pCR™-Blunt II-TOPO®	1
总体积	6

配好上述体系, 轻轻混匀, 室温放置 5min;

置于冰上, 去除感受态细胞, 准备转化。

d) TOPO PCR 克隆反应转化感受态细胞

取 50 或 100 μ L 的感受态细胞, 加入 2 μ L 的上述 TOPO PCR 克隆反应液体, 冰上放置 5-30 min;

42 °C 热激 30 s, 不要晃动;

立刻将反应转至冰上, 加入 250 μ L 的 S.O.C. 培养基;

37 °C, 200 rpm, 摇晃复苏 1 h;

取出相应数量的 LB 培养板（加入 25 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin（博来霉素），取 100 μL 上述菌液进行涂板，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱过夜培养。

e) 挑菌送 Sanger 测序。

次日早上，取出菌板，每个板子上挑出 80 个菌；37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，摇菌 3-4 h；每个菌样取 200 μL 送 Sanger 测序。

实施例 5 在人源化小鼠模型上验证基因编辑效率

1. 在人源化小鼠模型上验证基因编辑效率

1) 人源化小鼠的构建

人源化小鼠的构建工作由北京百奥赛图公司完成。

针对人的突变位点，我们委托北京百奥赛图基因生物技术有限公司构建了 CYP4V2 人源化的小鼠模型。

2) 技术内容：

a) 设计构建识别靶序列的 sgRNA；

b) 构建致靶基因切割的 CRISPR/Cas9 载体；

c) sgRNA/Cas9 的活性检测；

d) 设计构建基因敲进的打靶载体，按照方案中设计的替换 6-8 号外显子（包括内含子序列）；

体外转录 sgRNA/Cas9 mRNA ；

e) 小鼠受精卵注射 sgRNA/Cas9 mRNA 和打靶载体；

f) CYP4V2 基因敲进 F0 代小鼠检测及扩繁；

g) CYP4V2 基因敲进 F1 代杂合子小鼠的获得及基因型鉴定（southern blotting（DNA 杂交）验证，包含外源及内源探针各一个）。

3) 技术方法：

a) 小鼠基因组靶序列的扩增和测序，设计并构建针对靶序列的 CRISPR/Cas9 载体质粒，并进行活性检测；

b) 小鼠基因组 DNA 提取，扩增识别靶序列的 sgRNA；

c) 设计并构建致目的序列切割的 CRISPR/Cas9 载体质粒；

d) 利用百奥赛图自主开发的检测试剂盒对 sgRNA/Cas9 进行活性检测。

e) 选择高活性的 sgRNA/Cas9 靶位点序列信息设计并构建 CYP4V2 基因敲进的打靶载体；

f) 小鼠受精卵原核注射 sgRNA/Cas9 mRNA 和打靶载体，F0/F1 代阳性小鼠的获得，该

项实验过程主要包括如下内容：

sgRNA/Cas9 mRNA 的体外转录；

收集小鼠受精卵；

小鼠受精卵注射 RNA 和打靶载体；

受精卵移植代孕小鼠输卵管；

CYP4V2 基因人源化点突变的 F0 代小鼠基因型鉴定及扩繁；

CYP4V2 基因人源化点突变的 F1 代小鼠的获得及基因型鉴定（包含 PCR 检测和 southern blotting 杂交验证）。

（2）饲养和繁育

获得两种人源化小鼠之后，让 F1 代杂合的小鼠进行内交，尽快获得足够数量的 F2 代或 F3 代人源化纯合的小鼠，用作 AAV 病毒注射。

（3）小鼠视网膜下腔注射 AAV 病毒

将 AAV-CYP4V2-sgRNA（提供 SaCas9）和 AAV-CYP4V2-donor 载体包装成腺相关病毒，注射 CYP4V2 突变模型小鼠的视网膜，以验证所设计的 sgRNA 和 Donor 在体内的编辑和修复效率。以 AAV-CYP4V2-sgRNA13+AAV-CYP4V2-donor13 为例（sgRNA17-18 组实验方法同此。）具体步骤如下：

1) 实验设计

a) 空白对照组：生理盐水。

b) 实验组：AAV-CYP4V2-sgRNA 13（提供 SaCas9）和 AAV-CYP4V2-donor13。

2) AAV（腺相关病毒）血清型选择

选择对视网膜嗜性好的 AAV2/8 血清型。

3) 病毒包装

将 AAV-CYP4V2-donor13，AAV-CYP4V2-sgRNA13 载体分别和 AAV2/8 及 AAV-helper 包装成腺相关病毒（AAV）。

4) 小鼠注射实验

取 20 只 CYP4V2 突变模型小鼠，每组 5 只分 4 组进行实验。

实验计划如下：

a) 空白对照组：小鼠每只眼睛注射 2 μ L 生理盐水。

b) 实验组：将包装的 AAV-CYP4V2-sgRNA 13 和 AAV-CYP4V2-donor13 病毒分别按照 1: 1 的比例等量混合，小鼠每只眼睛注射 2 μ L（1E10vg）。

c) 一个月后检测治疗效果。

实验步骤如下：

a) 注射前 30 分钟用 1%阿托品散瞳；麻醉前再次散瞳。

b) 按 80 mg/kg 氯胺酮+8 mg/kg 甲苯噻嗪安腹腔内注射小鼠，麻醉后将小鼠放置在眼外科手术显微镜的动物实验平台前方，在小鼠眼睛上滴一滴 0.5%的丙美卡因局麻。以 100: 1 的浓度在 AAV 病毒里加入荧光素钠原液，低速离心混匀。

c) 用胰岛素针在小鼠眼睛睫状体平坦部位预扎一个小孔，用微量注射器的针头穿过该小孔后进入小鼠眼睛玻璃体腔，这时在小鼠眼睛上滴加适量 2%羟甲基纤维素使在镜下能清晰见到小鼠眼底，再继续将针头避开玻璃体插入对侧周边的视网膜下，缓慢推入带有荧光素钠的 AAV 病毒，每只眼睛注射量为 1 μ l，以荧光素钠为指示剂判断是否注射入视网膜下腔。

d) 术后观察小鼠有无异常，给予新霉素眼膏预防感染。

5) 评价基因编辑治疗的效果：

实验结果发现各实验组治疗效果基本一致，因此选取 AAV-CYP4V2-sgRNA13 和 AAV-CYP4V2-donor13 病毒组为代表来说明基因编辑治疗效果。

(4) 评估 AAV8- AAV-CYP4V2-sgRNA 在人源化小鼠中的编辑效率

验证方法见“实施例 4 中(5) 3D 视网膜组织体外验证 sgRNA 基因编辑效率”。

实验结果发现各实验组治疗效果基本一致，因此选取 AAV-CYP4V2-sgRNA13 和 AAV-CYP4V2-donor13 病毒组为代表来说明基因编辑治疗效果。

通过 ERG（视网膜电生理）评价治疗后小鼠功能改变，在治疗后，突变小鼠模型的视网膜功能有改善；

取材切片后，通过 HE 染色观察小鼠视网膜形态学变化，形态接近野生型小鼠的视网膜状态；

通过免疫荧光染色观察基因编辑治疗载体是否在视网膜相应位置表达，基因编辑治疗载体在视网膜相应位置表达；

通过一系列视网膜特殊 Marker 的染色标记观察视网膜组织形态变化，发现治疗后，小鼠的视网膜组织形态有改善。

最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本申请的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述实施例对本申请进行了详细的说明，领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本申请各实施例技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

1. 特异性靶向细胞色素 P450 家族 4 亚家族 V 多肽 2 (CYP4V2) 基因的 gRNA, 其特异性结合 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 200bp 内的核苷酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的 gRNA, 其包含 SEQ ID NO: 74、78-80、82-84 中任一项所示的核苷酸序列。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 gRNA, 其包含 5'-(X)_n- SEQ ID NO: 74、78-80、82-84-骨架序列-3', 其中 X 为选自 A、U、C 和 G 中任一个的碱基, 且 n 为 0-15 中的任一整数。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述 gRNA, 其中所述 gRNA 为单链向导 RNA (sgRNA)。
5. 一种或多种分离的核酸分子, 其编码权利要求 1-4 中任一项所述的特异性靶向 CYP4V2 基因的 gRNA。
6. 供体核酸分子, 其包含 CYP4V2 基因 c.802-8_810del17bpinsGC 突变位点上下 800bp 内正常野生型的核苷酸序列。
7. 根据权利要求 6 所述的核酸分子, 其包含 SEQ ID NO: 64-66 中任一项所示的核苷酸序列。
8. 载体, 其包含权利要求 5 所述的分离的核酸分子和/或权利要求 6-7 中任一项所述的供体核酸分子。
9. 根据权利要求 8 所述的载体, 所述分离的核酸分子和所述供体核酸分子位于同一载体中。
10. 根据权利要求 8-9 中任一项所述的载体, 其为病毒载体。
11. 细胞, 其包含权利要求 5 所述的分离的核酸分子、权利要求 6-7 中任一项所述的供体核酸分子和/或权利要求 8-10 中任一项所述的载体。
12. 根据权利要求 11 所述的细胞, 其包括 HEK293 细胞、肾上皮细胞和/或诱导性多能干细胞。
13. 根据权利要求 11-12 中任一项所述的细胞, 其经修饰后具备分化能力。
14. 根据权利要求 11-13 中任一项所述的细胞, 其可分化为 3D-视网膜类器官。
15. 药物组合物, 其包含权利要求 1-4 中任一项所述的 gRNA, 权利要求 5 所述的一种或多种分离的核酸分子, 权利要求 6-7 中任一项所述的供体核酸分子, 和/或权利要求 8-10 中任一项所述的载体, 以及药学上可接受的载剂。
16. 权利要求 1-4 中任一项所述的 gRNA, 权利要求 5 所述的一种或多种分离的核酸分子, 权利要求 6-7 中任一项所述的供体核酸分子, 和/或权利要求 8-10 中任一项所述的载体在制备治疗疾病的药物中的应用, 其中所述疾病包括 CYP4V2 基因中 c.802-8_810del17bpinsGC 突变所导致的疾病。
17. 根据权利要求 16 所述的应用, 其中所述疾病包括结晶样视网膜变性。
18. 一种治疗结晶样视网膜变性的方法, 所述方法包括以下的步骤: 向有需要的受试者导入权利要求 1-4 中任一项所述的 gRNA, 权利要求 5 所述的一种或多种分离的核酸分子, 权利

要求 6-7 中任一项所述的供体核酸分子，和/或权利要求 8-10 中任一项所述的载体。

19. 根据权利要求 18 中任一项所述的方法，其中所述导入获得了正常功能的 CYP4V2 蛋白。
20. 根据权利要求 18-19 中任一项所述的方法，其中所述导入包括注射。
21. 根据权利要求 18-20 中任一项所述的方法，其中所述导入包括视网膜下腔注射。
22. 一种调节细胞中 CYP4V2 基因表达的方法，其包括向细胞导入权利要求 1-4 中任一项所述的 gRNA，权利要求 5 所述的一种或多种分离的核酸分子，和/或权利要求 8-10 中任一项所述的载体。

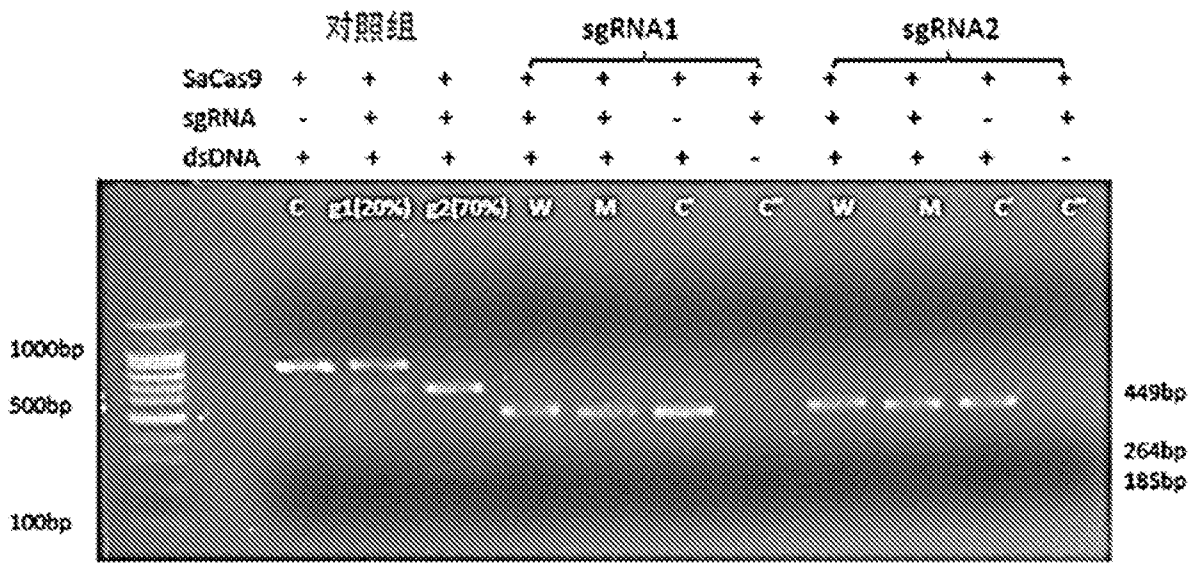


图 1A

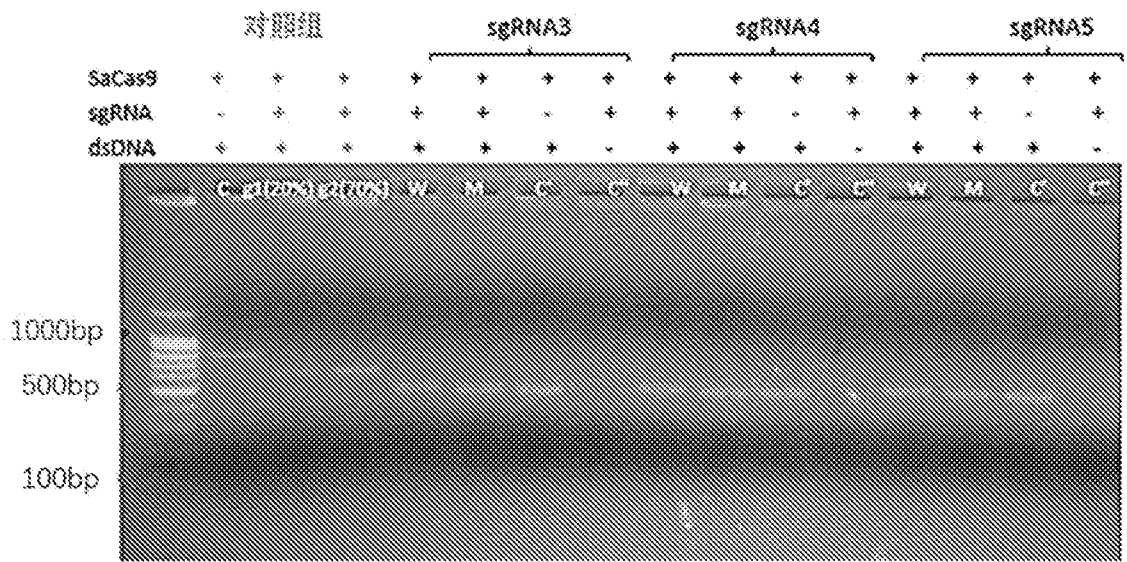


图 1B

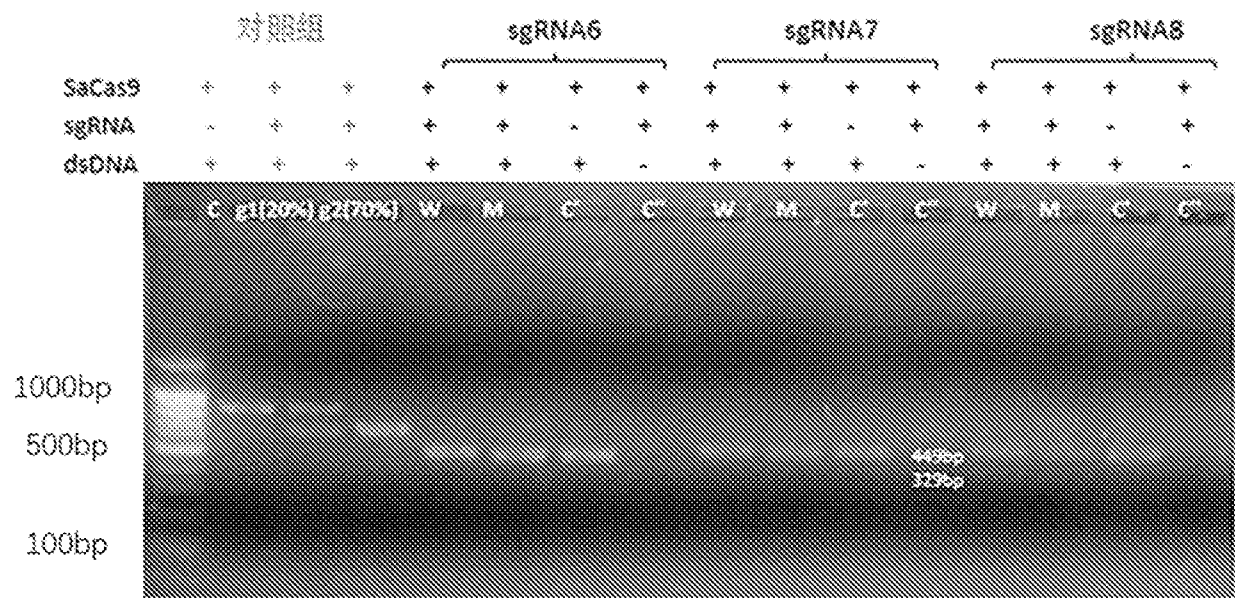


图 1C

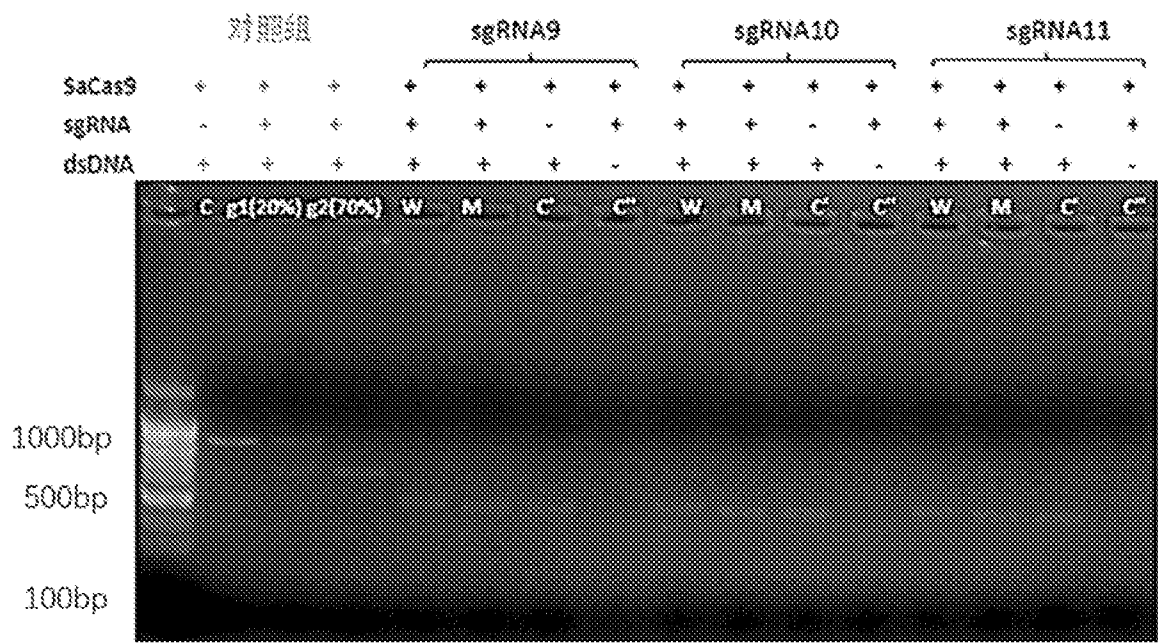


图 1D

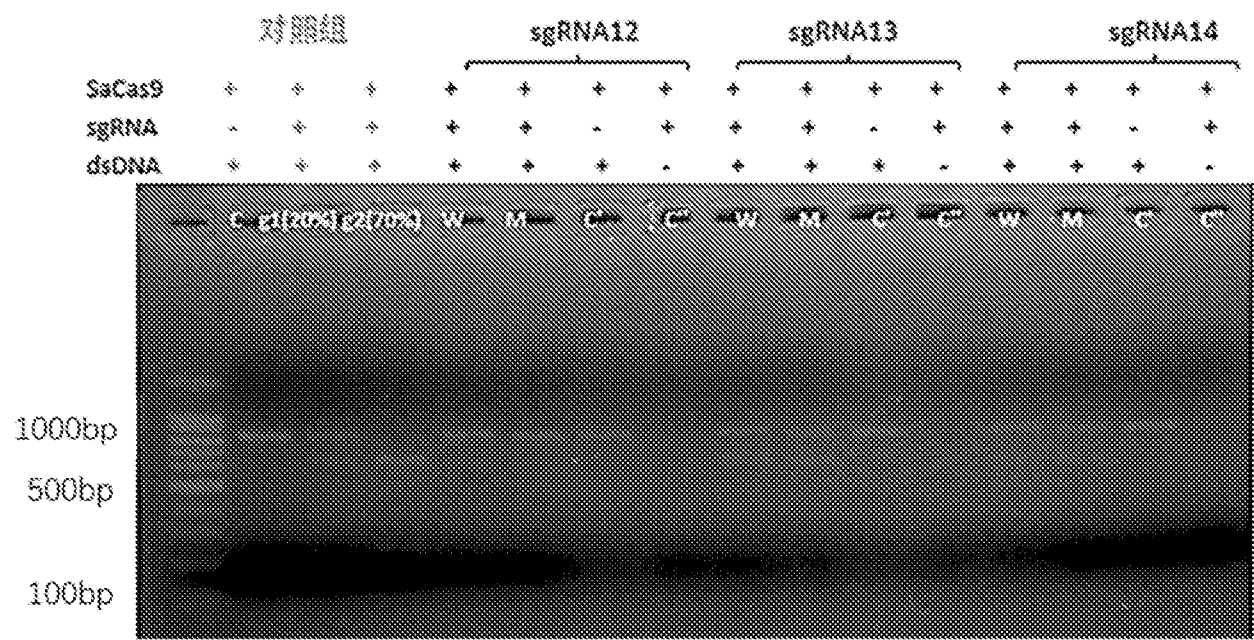


图 1E

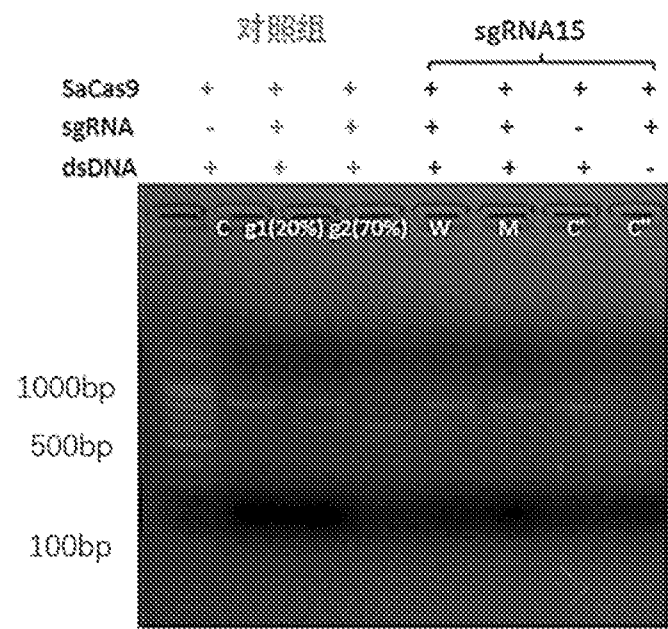


图 1F

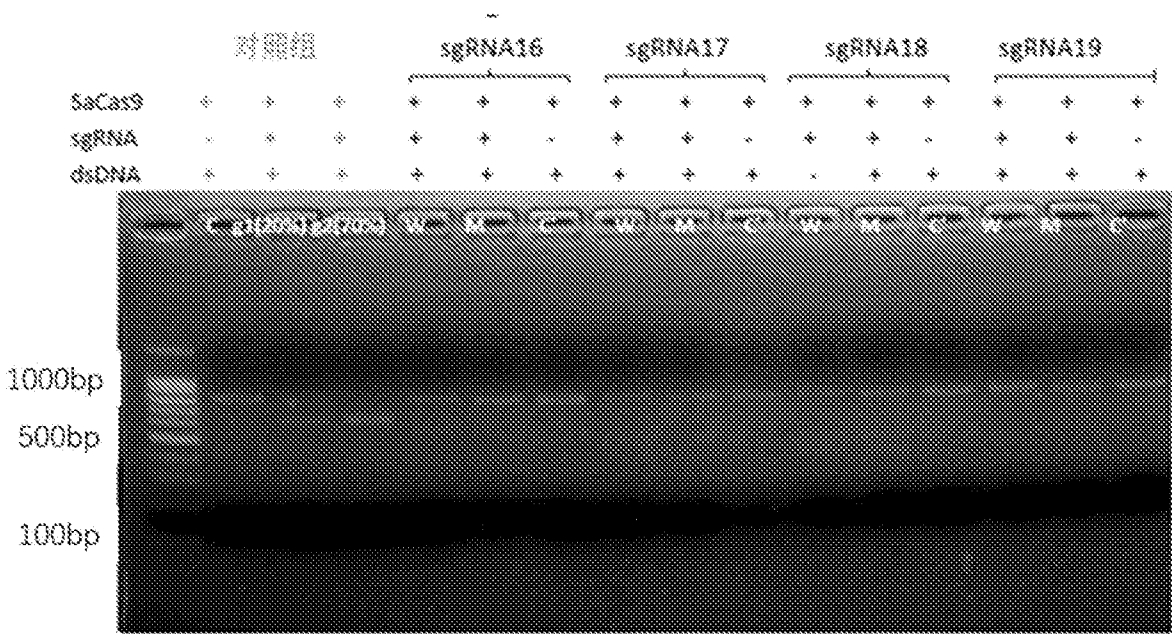


图 1G

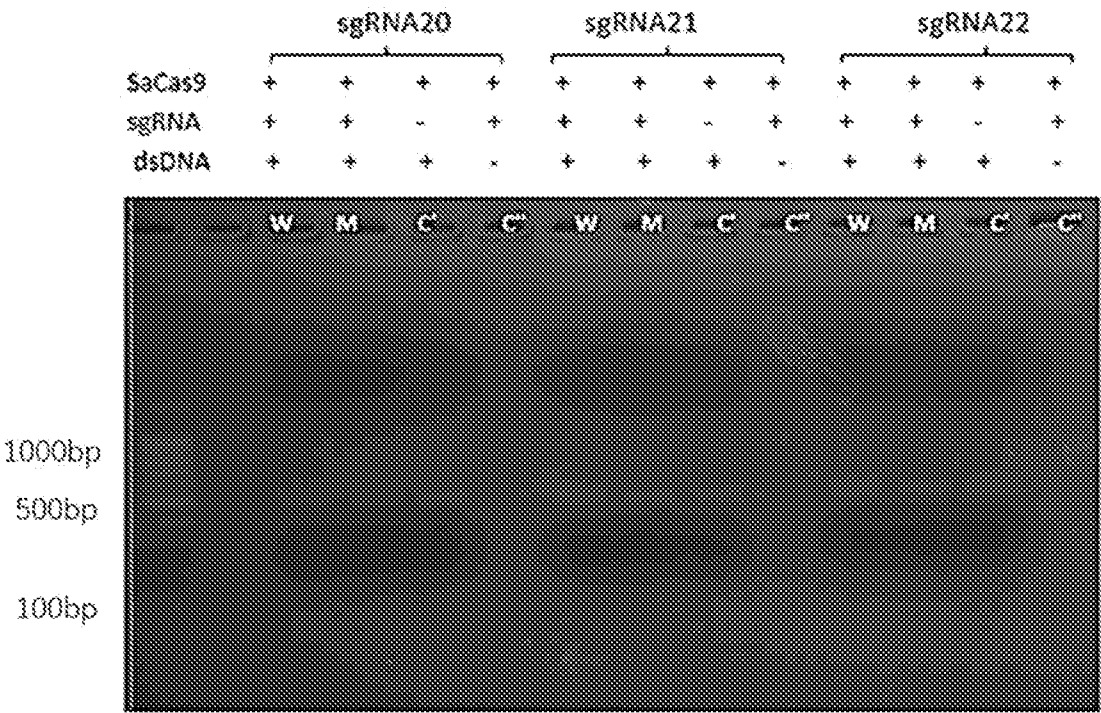


图 1H

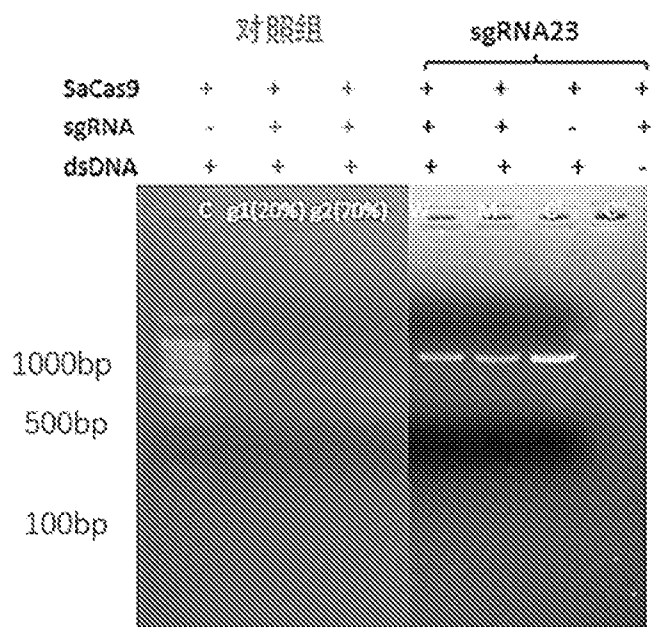


图 11

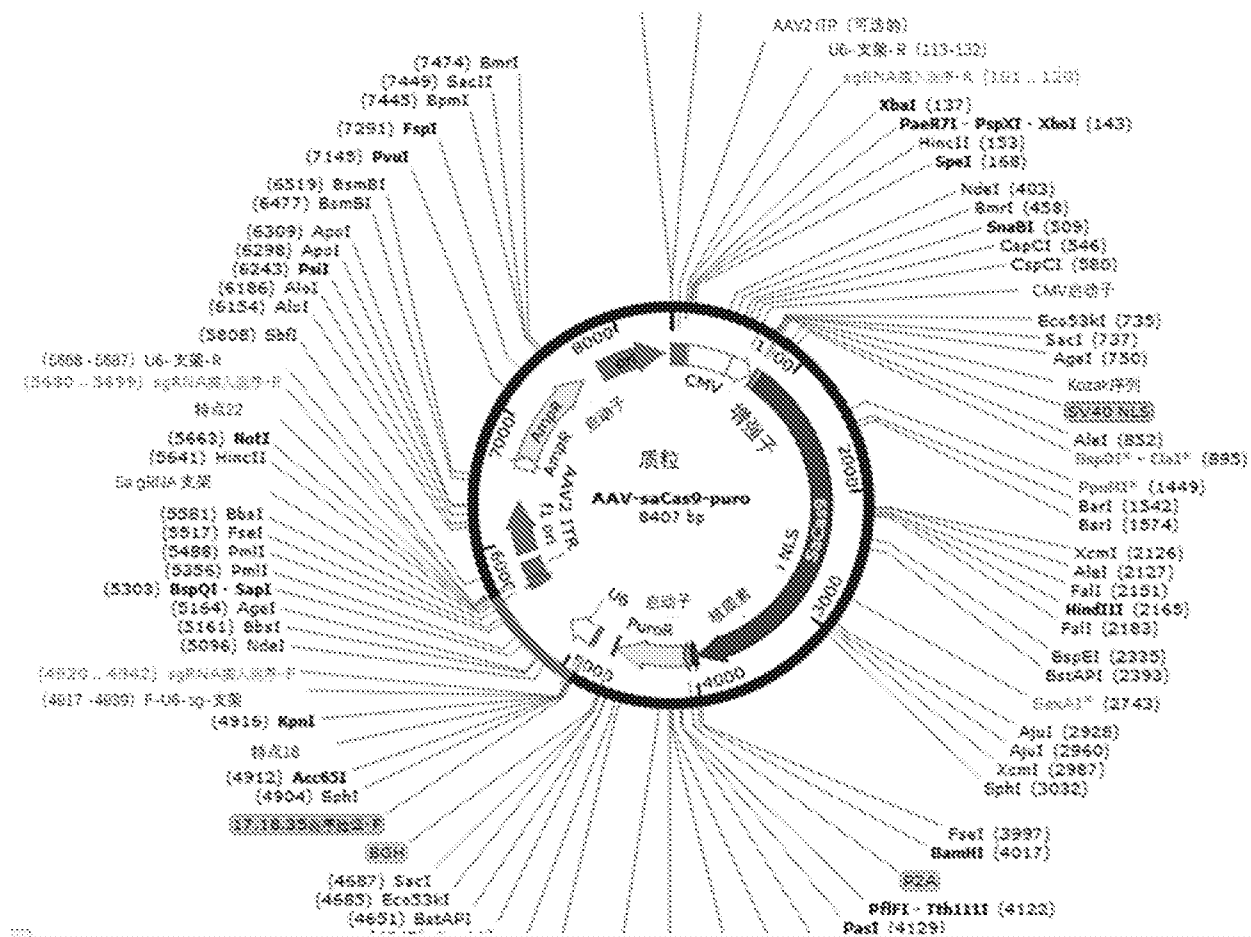


图 2

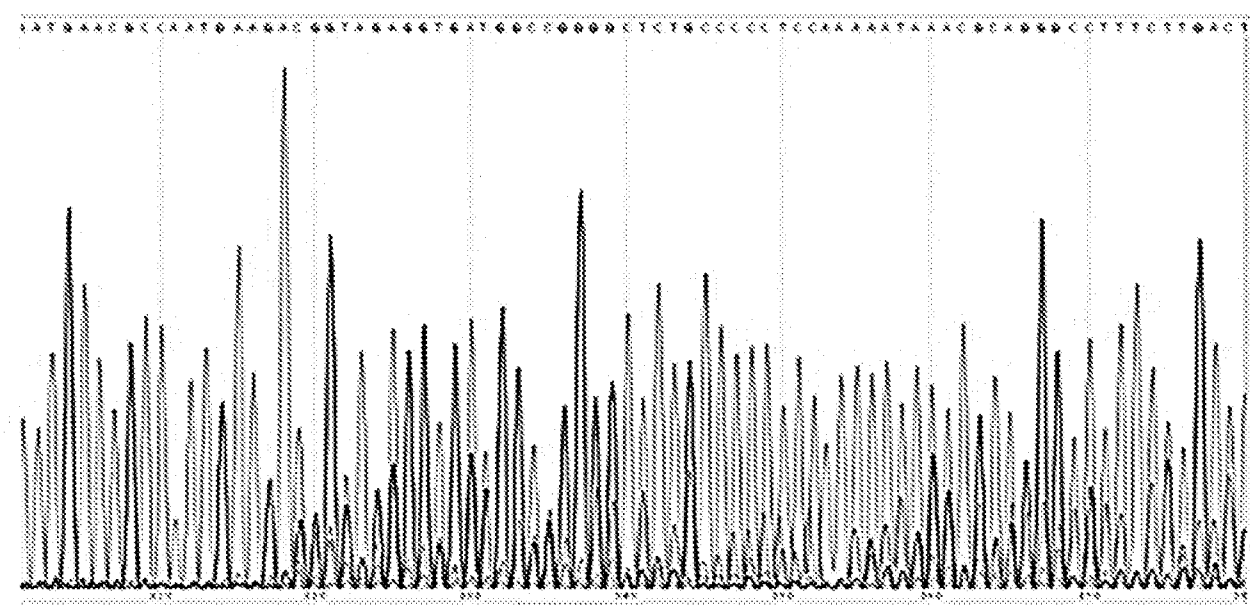


图 4B

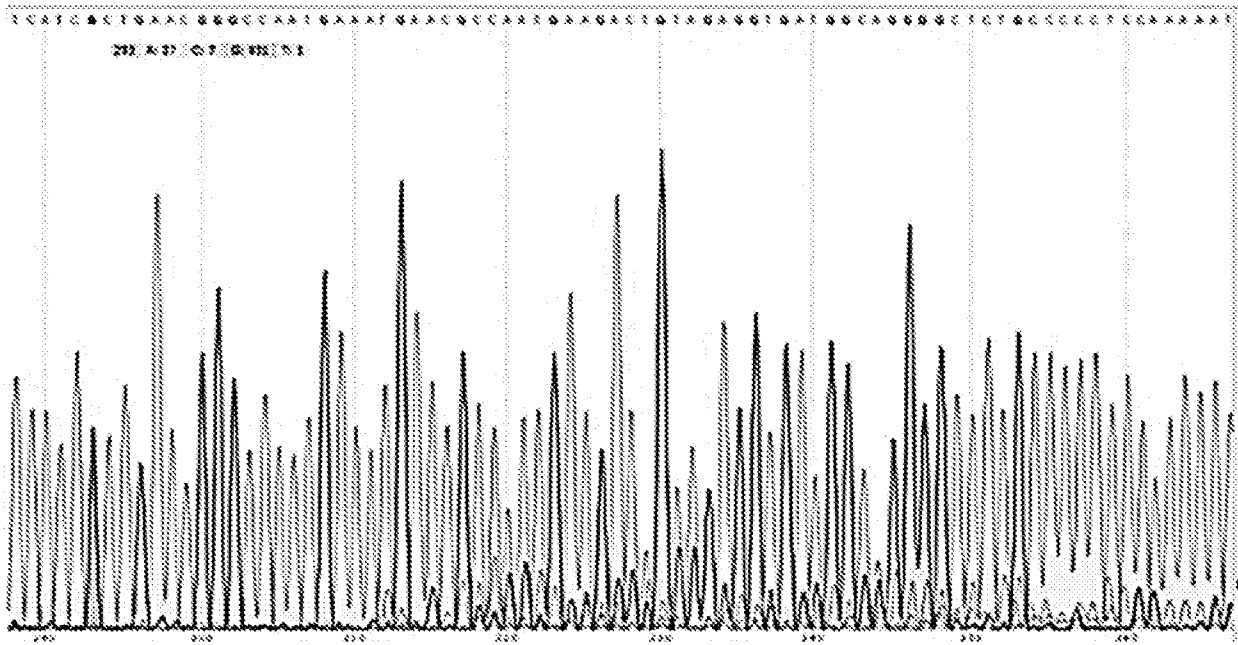


图 4C

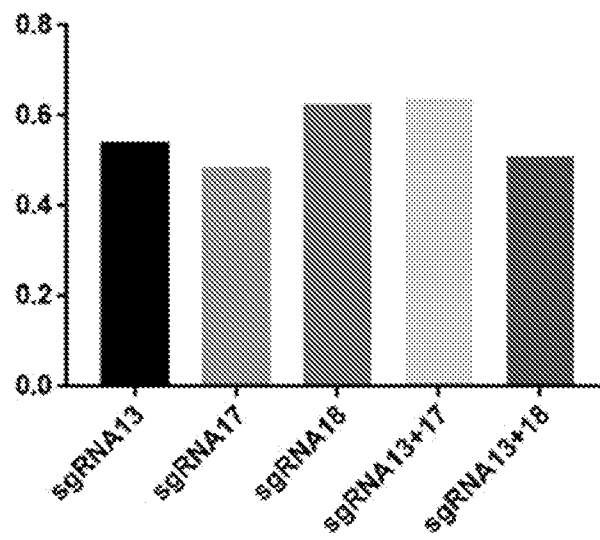


图 5

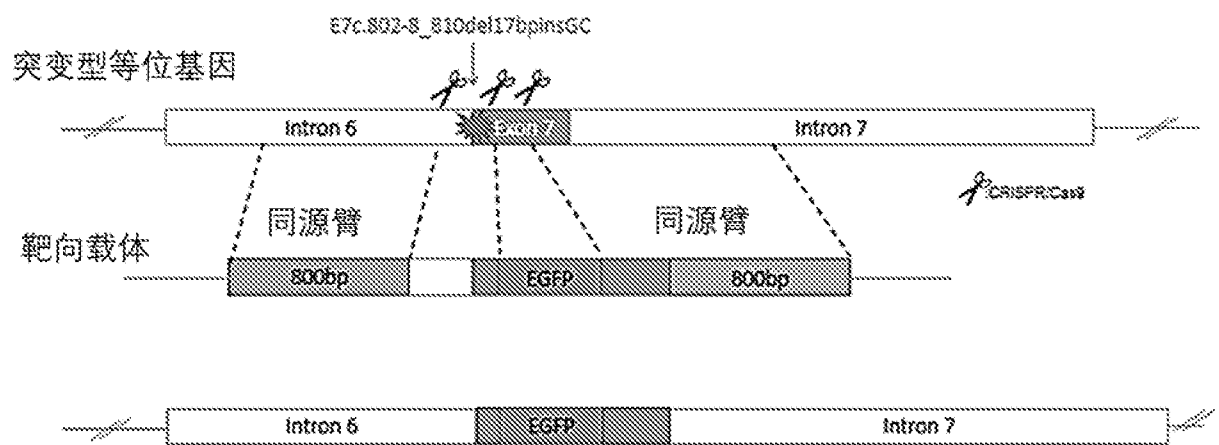


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/120692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 48/00(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, A61K, A61P

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

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

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, NCBI, baidu, blast, genbank, pubmed, China Patent Biological Sequence Search System, 北京中因科技有限公司, 杨丽萍, 细胞色素P450家族4亚家族V多肽2, CYP4V2, gRNA, 向导RNA, c.802-8_810del17bpinsGC, 810del, CRISPR, SEQ ID NOs: 64-66, 74, 78-80, 82-84

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 111630170 A (REFLECTION BIOTECHNOLOGIES LTD.) 04 September 2020 (2020-09-04) claims 160-164, 183-191, 230, 242, description paragraphs 161, 426	1-22
A	CN 111500635 A (PEKING UNIVERSITY THIRD HOSPITAL (PEKING UNIVERSITY THIRD CLINICAL MEDICAL COLLEGE) et al.) 07 August 2020 (2020-08-07) entire document	1-22
A	CN 111733174 A (PEKING UNIVERSITY THIRD HOSPITAL (PEKING UNIVERSITY THIRD CLINICAL MEDICAL COLLEGE) et al.) 02 October 2020 (2020-10-02) entire document	1-22
A	CN 103468820 A (THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF THE P.L.A.) 25 December 2013 (2013-12-25) entire document	1-22
A	CN 102994507 A (WEST CHINA HOSPITAL, SICHUAN UNIVERSITY et al.) 27 March 2013 (2013-03-27) entire document	1-22

☒ 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

04 June 2021

Date of mailing of the international search report

09 July 2021

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/120692

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YIN, X.B. et al. "Identification of CYP4V2 mutation in 36 Chinese families with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy." <i>Experimental Eye Research</i> , Vol. 146, 10 March 2016 (2016-03-10), pp. 154-162	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/120692

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

International application No.

PCT/CN2020/120692**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: **18-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 18-21 relate to a method for treating Bietti Crystalline (Corneoretinal) Dystrophy, which pertains to a method for treating a disease according to PCT Rule 39.1(iv). However, the search opinion is still provided based on the pharmaceutical use thereof, that is, the applications of a gRNA described in any one of claims 1-4, a donor nucleic acid molecule described in any one of claims 6-7, and/or a vector according to any one of claims 8-10, in preparing drugs for treating Bietti Crystalline (Corneoretinal) Dystrophy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/120692

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111630170	A	04 September 2020	US	2020255859	A1	13 August 2020
				SG	11202000840 Y	A	27 February 2020
				IL	272339	D0	31 March 2020
				BR	112020001940	A2	18 August 2020
				TW	201920679	A	01 June 2019
				JP	2021500917	A	14 January 2021
				KR	20200036912	A	07 April 2020
				AU	2018311504	A1	12 March 2020
				WO	2019025984	A1	07 February 2019
				EP	3662066	A1	10 June 2020
				CA	3071769	A1	07 February 2019
CN	111500635	A	07 August 2020	CN	111500635	B	09 October 2020
CN	111733174	A	02 October 2020	CN	111733174	B	09 February 2021
CN	103468820	A	25 December 2013	CN	103468820	B	10 June 2015
CN	102994507	A	27 March 2013	CN	102994507	B	20 May 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/120692

A. 主题的分类

C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 48/00(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, A61K, 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))

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, NCBI, baidu, blast, genbank, pubmed, 中国专利生物序列检索系统, 北京中因科技有限公司, 杨丽萍, 细胞色素P450家族4亚家族V多肽2, CYP4V2, gRNA, 向导RNA, c.802-8_810del117bpinsGC, 810del, CRISPR, SEQ ID N0s: 64-66, 74, 78-80, 82-84

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
X	CN 111630170 A (映像生物有限公司) 2020年 9月 4日 (2020 - 09 - 04) 权利要求160-164, 183-191, 230, 242, 说明书第161, 426段	1-22
A	CN 111500635 A (北京大学第三医院北京大学第三临床医学院等) 2020年 8月 7日 (2020 - 08 - 07) 全文	1-22
A	CN 111733174 A (北京大学第三医院北京大学第三临床医学院等) 2020年 10月 2日 (2020 - 10 - 02) 全文	1-22
A	CN 103468820 A (中国人民解放军第三军医大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 全文	1-22
A	CN 102994507 A (四川大学华西医院 等) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 全文	1-22
A	YIN, X.B.等. "Identification of CYP4V2 mutation in 36 Chinese families with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy." Experimental Eye Research., 第146卷, 2016年 3月 10日 (2016 - 03 - 10), 第154-162页	1-22

☐ 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

2021年 6月 4日

国际检索报告邮寄日期

2021年 7月 9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

授权官员

陈皓

电话号码 86-(10)-53962068

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:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 18-21
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求18-21涉及一种治疗结晶样视网膜变性的方法，其属于PCT 细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，但仍然基于其制药用途，即，一种权利要求1-4中任一项所述的gRNA，权利要求5所述一种或多种分离的核酸分子，权利要求6-7任一项所述的供体核酸分子，和/或权利要求8-10中任一项所述的载体，在制备治疗结晶样视网膜变性的药物中的应用，做出检索意见。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/120692

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111630170	A	2020年 9月 4日	US	2020255859	A1	2020年 8月 13日
				SG	11202000840Y	A	2020年 2月 27日
				IL	272339	D0	2020年 3月 31日
				BR	112020001940	A2	2020年 8月 18日
				TW	201920679	A	2019年 6月 1日
				JP	2021500917	A	2021年 1月 14日
				KR	20200036912	A	2020年 4月 7日
				AU	2018311504	A1	2020年 3月 12日
				WO	2019025984	A1	2019年 2月 7日
				EP	3662066	A1	2020年 6月 10日
				CA	3071769	A1	2019年 2月 7日
CN	111500635	A	2020年 8月 7日	CN	111500635	B	2020年 10月 9日
CN	111733174	A	2020年 10月 2日	CN	111733174	B	2021年 2月 9日
CN	103468820	A	2013年 12月 25日	CN	103468820	B	2015年 6月 10日
CN	102994507	A	2013年 3月 27日	CN	102994507	B	2015年 5月 20日