附件1

南通大学横向科研项目研究（技术）报告

项目编号：20ZH499

项目名称：RAG-06小核酸候选药物的临床前评估

结项时间：2022年3月30日

南通大学

二○二三年十一月

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目负责人 | 刘春 | 电话 | | 13912286209 | | 所在二级单位 | 实验动物中心 |
| 项目类别 | √自然科学  □人文社科 | | 申请认定级别 | | □国家级重大项目□国家级重点项目  □国家级一般项目√省部级项目  □市厅级项目 | | |
| 申请认定类别 | √单项到账认定到账总经费 70 万元 | | | | | | |
| □自然年度到账认定到账总经费 万元 | | | | | | |
| 委托单位 | 中美瑞康核酸技术（南通）研究院有限公司 | | | 完成时间 | | 2022年03月30日 | |
| **1.主要研究内容**  **机制研究**  **1实验动物**  SMA Ⅰ型小鼠（基因型*Smn-/-SMN22tg/0*）、SMA Ⅰ型对照小鼠（基因型*Smn+/-SMN22tg/0*），1d龄、4d龄、7d龄，雌雄不拘，共计38只，小鼠背景品系均为FVB近交系小鼠。  **2实验方法**  包括RNA提取，逆转录反应，RT-PCR反应，琼脂糖凝胶电泳，蛋白提取，Western blot，尼氏染色，免疫荧光染色  **3实验结果**  **3.1 SMA Ⅰ型小鼠不同组织中*SMN2*外显子7列入差异**  通过调控*SMN*2剪接促进SMN蛋白表达成为现阶段治疗SMA疾病的有效措施，但在病变累及多系统的SMA疾病中，*SMN*2外显子7列入是否有差异及其是否影响SMA不同组织病变是未知的，进行相关研究解决这一问题将为治疗SMA疾病提供更多方法。台湾Hung Li实验室最早建立的与人类I型SMA症状极为相似的严重型SMA小鼠，携带两个拷贝（基因型为*Smn*-/-, *SMN*22tg/0），有运动障碍，出生4天时即出现典型髓性肌萎缩症症状，寿命10天左右，是现代研究应用较为普遍的SMA小鼠模型。因此，针对这一严重型SMA小鼠即SMA Ⅰ型小鼠，我们对其*SMN*2外显子7列入的组织间差异进行研究。  我们选取出生4天的SMA Ⅰ型小鼠神经组织即脑、脊髓，非神经组织即肝、肾、肌肉，提取RNA后进行逆转录反应，通过RT-PCR和非变性PAGE凝胶电泳分析*SMN*2剪接水平。实验结果表明，SMA Ⅰ型小鼠不同组织中*SMN*2剪接具有组织间差异（图1），并且神经组织即脑和脊髓中，*SMN*2外显子7列入显著高于非神经组织（与肝相比，\**P*< 0.05，\*\**P*< 0.01）  SMN2外显子7不同组织列入统计图-200205  图1. SMA Ⅰ型小鼠不同组织中*SMN*2外显子7列入差异  A：*SMN*2在神经与非神经组织中外显子7列入非变性PAGE电泳图；B：*SMN*2外显子7列入的灰度值统计学结果柱状图。  **3.2 SMA Ⅰ型小鼠不同组织中剪接因子表达差异**  为了获取携带正确遗传信息并能够翻译出正确的蛋白质序列的mRNA，DNA直接转录出的产物需要经过一系列的加工处理，将内含子去除，并连接外显子，才能成为成熟的mRNA，并被运出细胞核合成蛋白质。这一过程中，外显子的列入对于合成功能性蛋白至关重要。而外显子是否列入是由剪接来调控的，如何剪接则是由剪接因子来调控的，因此，对于SMA Ⅰ型小鼠中*SMN*2外显子7列入的组织间差异，我们猜测存在某些剪接因子，其在不同组织中表达具有差异，从而引起*SMN*2外显子7列入差异。研究显示，三类经典的剪接因子，即HNNRP、SR及NOVA家族是相关疾病研究的热点。基于此，我们对HNNRP、SR及NOVA家族部分成员在SMA Ⅰ型小鼠中的表达情况进行研究   * + 1. SMA Ⅰ型小鼠不同组织中HNRNP表达差异   核内不均一核糖核蛋白（ heterogenous nuclear ribnucleoprotein，HNRNP）是主要存在于细胞核中的由多个蛋白组成的复合体，其主要功能是结合RNA参与转录后修饰，在新合成的RNA（pre-mRNA）过程中不可缺少，是成熟mRNA形成的重要剪接因子。而其成员之一，HNRNPA1，已被证实能够调控SMA疾病中*SMN*2剪接。  为了进一步研究剪接因子HNRNP家族与*SMN*2剪接及SMA疾病之间的联系，我们运用QPCR技术对出生后第4 天SMA Ⅰ型小鼠和Ⅰ型对照小鼠的神经与非神经组织中，HNRNP家族中的*Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd*、*Hnrnph*3、*Hnrnpm*、*Hnrnpf*以及*Hnrnph*2共9个成员的mRNA水平进行检测。实验结果表明，HNRNP剪接因子家族成员的mRNA水平具有组织间差异（图2），同时，与心脏比较，这些剪接因子的mRNA水平在心、肝及肌肉组织中表达相对较低，在脾、肺和肾中表达最高，在神经组织即脑和脊髓中表达相对较高（与心脏相比，\**P*< 0.05，\*\**P*< 0.01）。  HNRNP-3组间距-ps  图2. SMA Ⅰ型及对照小鼠不同组织中剪接因子HNRNP表达差异  A、B、C：SMA Ⅰ型对照小鼠不同组织中*Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd、Hnrnph*3、*Hnrnpm*、*Hnrnpf*、*Hnrnph*2表达的QPCR分析结果；D、E、F：SMA Ⅰ型小鼠不同组织中*Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd*、*Hnrnph*3、*Hnrnpm*、*Hnrnpf*、*Hnrnph*2表达的QPCR分析结果。   * + 1. SMA Ⅰ型小鼠不同组织中SR表达差异   富含丝氨酸和精氨酸的SR蛋白（Serine/arginine-rich protein），是一种涉及RNA剪接的保守蛋白家族，广泛参与RNA加工过程,包括剪接、出核、稳定性及翻译[32]。同样采用QPCR方法，对出生后第4天SMA Ⅰ型小鼠和对照小鼠的神经与非神经组织中SR家族10个成员的mRNA水平进行检测。本实验检测了SR家族中的*Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6、*Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7以及*Srsf*9。实验结果表明，SR家族成员mRNA的表达具有组织间差异（图3），同时，以心脏作为对照，这些剪接因子基因在心、肝及肌肉中表达相对较低，在脾、肺和肾中表达最高，在神经组织即脑和脊髓中表达相对较高（与心脏相比，\**P*< 0.05，\*\**P*< 0.01）。  SR4-3组间距-ps  图3. SMA Ⅰ型及对照小鼠不同组织中剪接因子SR表达差异  A、B、C、D：SMA Ⅰ型对照小鼠不同组织中*Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6、*Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7、*Srsf*9表达的QPCR分析结果；E、F、G、H：SMA Ⅰ型小鼠不同组织中*Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6、*Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7、*Srsf*9表达的QPCR分析结果。   * + 1. SMA Ⅰ型小鼠不同组织中NOVA表达差异   神经肿瘤腹侧抗原（neuro-oncological ventral antigen, NOVA）家族，有NOVA1和NOVA2两个成员，其作为神经元特异性剪接因子，在运动神经元中表达丰富，但在神经肌肉疾病SMA中其表达变化是未知的，因此，运用QPCR技术检测了NOVA家族中的NOVA1和NOVA2在出生后第4 天的SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的mRNA水平。实验结果显示，SMA Ⅰ型小鼠中，NOVA1及NOVA2 mRNA水平同样具有组织间差异（图4），并且具有神经特异性表达的特点，以心脏作为对照，*Nova*1、*Nova*2在心、肝、脾、肾及肌肉中表达相对较低，在大脑和脊髓中表达最高，在肺中表达相对较高（与心脏相比，\**P*< 0.05，\*\**P*< 0.01）。  NOVA1-3组间距-ps  图4. SMA Ⅰ型及对照小鼠不同组织中剪接因子NOVA表达差异  A：SMA Ⅰ型对照小鼠不同组织中*Nova*1、*Nova*2基因表达的QPCR分析结果；B：SMA Ⅰ型小鼠不同组织中*Nova*1、*Nova*2基因表达的QPCR分析结果。  以上结果显示，SMA Ⅰ型小鼠中，*SMN*2外显子7列入具有组织间差异，并且无论是在SMA Ⅰ型小鼠还是对照小鼠中，剪接因子HNRNP、SR及NOVA的表达均具有组织间差异，其中，SMA Ⅰ型小鼠中，剪接因子NOVA在神经组织中高表达，与*SMN*2外显子7在神经组织中高列入呈正相关，提示NOVA家族可能参与SMA相关基因*SMN*2剪接即*SMN*2外显子7列入。  **3.3 SMAⅠ型小鼠脊髓发育各阶段NOVA表达变化**  上述研究显示剪接因子NOVA表达与*SMN*2外显子7列入均在神经组织中最高，而作为神经特异性表达的剪接因子，NOVA能够调控GABAA受体γ2、Dcc内含子16以及Sept8外显子10b的列入，从而影响运动系统的发育、运动神经元的存活以及功能的维持。同时，基因编辑所产生的NOVA缺陷小鼠，因不断增加的脑干与脊髓中运动神经元异常从而引起运动功能障碍，于出生后10天内死亡，与SMA Ⅰ型小鼠症状相似。  为了进一步研究神经特异性表达的剪接因子NOVA与SMA疾病之间的联系，我们选取疾病症状出现前即出生后1天（P1）、疾病症状出现早期即4天（P4）及疾病症状出现晚期即7天（P7）这三个关键时间点的SMA Ⅰ型小鼠，对其脊髓组织中NOVA1及NOVA2的基因及蛋白表达水平表达变化进行检测，以期发现NOVA家族与SMA Ⅰ型小鼠脊髓发育或疾病发展之间的关系。   * + 1. 脊髓发育各阶段NOVA1表达变化   取P1、P4及P7阶段SMA Ⅰ型小鼠，提取RNA及蛋白后，采用QPCR及western blot方法分别检测NOVA1及NOVA2基因及蛋白水平表达变化。结果显示，与P1相比，NOVA1 mRNA水平于P4期显著下调（与P1相比，\**P*< 0.05），并随着疾病继续发展，在疾病后期（P7）仍显著下调（与P1相比，\**P*< 0.05），但与P4相比，P7时期表达差异无统计学意义（图5A）。同时，与P1相比，P4及P7时期，NOVA1蛋白水平与基因水平表达趋势相一致，均显著下调（与P1相比，\**P*< 0.05，\*\*\**P*< 0.001），而与P4相比，P7时期NOVA1仍显著下调（图5BC，与P4相比，#*P*< 0.05），表明在SMA Ⅰ型小鼠发育过程中，随着SMA疾病病程不断推进，NOVA1基因及蛋白水平均显著下调，提示NOVA1在严重型SMA疾病发展中具有重要作用。  组织NOVA1表达200205  图5. SMA Ⅰ型小鼠脊髓发育各阶段NOVA1表达水平变化  A：发育各阶段NOVA1在脊髓组织中mRNA水平变化统计图；B：发育各阶段NOVA1在脊髓组织中蛋白水平变化电泳图；C：发育各阶段NOVA1在脊髓组织中蛋白水平变化统计图。   * + 1. 脊髓发育各阶段NOVA2表达变化   采用同样的方法，检测了SMA Ⅰ型小鼠疾病发生发展的三个时间段即P1、P4、P7，脊髓组织中NOVA家族另一个成员—NOVA2的表达情况。结果显示，随着SMA疾病不断发展，NOVA2 mRNA及蛋白水平在P4时期表达变化与P1时期相比无明显差异（图6），但与P4时期相比，NOVA2在P7时期显著下调（与P4相比，#*P*< 0.05，##*P*< 0.01），表明NOVA2在SMA Ⅰ型小鼠疾病早期表达无明显变化，但在疾病后期，其表达显著下调，提示NOVA2在严重型SMA疾病后期中发挥重要作用。  组织NOVA2表达200205  图6. SMA Ⅰ型小鼠脊髓发育各阶段NOVA2表达水平变化  A：发育各阶段NOVA2在脊髓组织中mRNA水平变化统计图；B：发育各阶段NOVA2在脊髓组织中蛋白水平变化电泳图；C：发育各阶段NOVA2在脊髓组织中蛋白水平变化统计图。   * + 1. 脊髓发育各阶段SMN蛋白表达变化   为了更好地研究SMN蛋白在SMA Ⅰ型小鼠发育及疾病发展中的重要作用，对P1、P4及P7这三个关键点内SMN蛋白的表达变化进行了检测。结果显示，与P1相比，脊髓组织中SMN蛋白在疾病早期即P4时，其蛋白表达水平显著下降（与P1相比，\**P*< 0.05），在疾病后期P7时，表达同样显著下调（图7），再次表明SMN蛋白对SMA疾病的重要性，且再次证实在SMA Ⅰ型小鼠症状明显的P4这一关键时期，SMN蛋白显著下调是引起SMA Ⅰ型小鼠症状明显的关键原因。  组织SMN表达200205  图7. SMA Ⅰ型小鼠脊髓发育各阶段SMN表达水平变化  A：发育各阶段SMN在脊髓组织中的蛋白水平变化电泳图；B：发育各阶段SMN在脊髓组织中的蛋白水平变化统计图。   * + 1. 脊髓发育各阶段SMN2外显子7列入变化   作为唯一一个与*SMN*1平行同源的基因，*SMN*2特有的选择性剪接模式能够被调控，并翻译出更多功能性SMN蛋白，成为现代SMA治疗研究的热点。用QPCR技术，我们检测了SMA Ⅰ型小鼠在P1、P4、P7阶段脊髓组织中*SMN*2 FL表达即外显子7列入水平情况。结果显示，与P1相比，脊髓组织中*SMN*2外显子7在疾病早期即P4时，其列入差异无统计学意义（图8），而在疾病后期即P7时期其显著下调（与P1相比，\*\**P*< 0.01；与P4相比，#*P*< 0.05），表明*SMN*2外显子7在疾病早期正常列入，而在疾病后期，*SMN*2外显子7列入显著减少。尽管SMA发病是因为*SMN*1突变无法合成功能性SMN蛋白，但后期*SMN*2外显子7列入减少，合成的功能性SMN蛋白更少可能是后期SMA疾病不断加重的原因之一。  FL hSMN1-mRNA-P147  图8. SMA Ⅰ型小鼠脊髓发育各阶段*SMN*2外显子7列入变化   * + 1. 脊髓发育各阶段脊髓前角运动神经元变化   尼氏体作为判断神经元功能状态的标志，其可被Cresyl violet染成斑驳的蓝紫色，当神经元受到损伤时，其数量减少甚至消失。而在SMA疾病中，其以脊髓前角运动神经元变性为主要特征。因此，为了了解SMA Ⅰ型小鼠疾病发生发展过程中脊髓前角运动神经元变化，我们对出生1天、4天及7天的小鼠脊髓组织进行冰冻切片的制作，并用尼氏染色试剂盒进行染色。实验结果表明，与出生1天相比，出生4天的SMA Ⅰ型小鼠脊髓组织中，前角运动神经元显著减少，并随着疾病发展，P7时期运动神经元减少更多，说明脊髓前角运动神经元随着SMA疾病的发展逐渐较少（图9）。  **P147-191115-0304**  图9. SMA Ⅰ型小鼠脊髓发育各阶段脊髓前角运动神经元变化  A、B、C：出生1天的SMA Ⅰ型小鼠脊髓前角运动神经元尼氏染色图；D、E、F：出生4天的SMA Ⅰ型小鼠脊髓前角运动神经元尼氏染色图；G、H、I：出生4天的SMA Ⅰ型小鼠脊髓前角运动神经元尼氏染色图。其中A、G为200倍镜下结果，B、C、E、F、H、I为400倍镜下结果，D为100倍镜下结果，箭头指示部位为被染成蓝紫色的脊髓前角运动神经元。   * + 1. NOVA1与ChAT免疫荧光共定位   NOVA的两个成员，NOVA1主要定位于间脑、脑干及脊髓前角运动神经元，NOVA2主要位于大脑皮质、海马和脊髓后角神经元。上述研究发现，SMA Ⅰ型小鼠出生后不同时间点，随着疾病不断发展，脊髓组织中NOVA1表达水平显著降低，脊髓前角运动神经元逐渐减少，我们猜测SMA Ⅰ型小鼠中两者之间存在某种联系。因此，在脊髓组织中，通过免疫荧光共定位，我们发现，NOVA1与脊髓前角运动神经元标记物ChAT均在脊髓组织中表达，NOVA1可能调控ChAT的表达，其减少，导致脊髓前角运动神经元逐渐变性、减少，从而影响SMA疾病的严重程度（图10）。  **SP7-NOVA1+CHAT-40X-191017-2**  图10. SMA Ⅰ型小鼠脊髓组织中NOVA1与ChAT免疫荧光共定位（×400）  以上结果显示，SMA Ⅰ型小鼠从SMA症状出现前P1至疾病早期P4再至疾病后期P7，随着SMA疾病不断加重，脊髓组织中NOVA，尤其是NOVA1表达水平逐渐下调，同时，脊髓前角α运动神经元逐渐减少，SMN蛋白水平及*SMN*2外显子7列入水平降低，而NOVA1又与脊髓前角α运动神经元共定位，提示NOVA家族尤其是NOVA1在SMA疾病发展中具有重要作用。  **应用研究**  **1实验动物**  **1.1动物来源**  FVB.Cg-Smn1tm1Hung Tg(SMN2)2Hung/J小鼠来源于JAX实验室（Stock Number：005058），SMA type3小鼠（Smn1-/-Smn22tg/2tg）含有4个Smn2基因拷贝数，小鼠有短而粗的尾巴和坏死的耳朵，可以生育并存活至少一年。  **1.2 Smn-KO与SMA type1小鼠**  Smn-KO小鼠获取：SMA type3小鼠（Smn1-/-Smn22tg/2tg）与wild type小鼠（FVB）杂交获得Het小鼠（Smn1+/-Smn22tg/-），Het小鼠与wild type小鼠回交，通过qPCR方法鉴定出Smn-KO小鼠（Smn+/-）。  SMA type1小鼠获取：Smn-KO公鼠（Smn+/-）与SMA type3小鼠（Smn1-/-Smn22tg/2tg）杂交，后代50%为Het小鼠（Smn1+/-Smn22tg/-），50%为SMA type1小鼠（Smn1-/-Smn22tg/-）。  SMA type1小鼠含有2个Smn2基因拷贝数，中位生存时间为10天，常用于生存期研究。  **2实验方法**  Smn-KO公鼠（Smn+/-）与SMA type3小鼠（Smn1-/-Smn22tg/2tg）交配，新生鼠出生当天（PND0）通过基因型鉴定（S1,5´–ATAACACCACCACTCTTACTC–3´，S2, 5´–GTAGCCGTGATGCCATTGTCA–3´，H1, 5´–AGCCTGAAGAACGAGATCAGC–3´），挑选SMA type1小鼠PND1天进行侧脑室给药，通过小鼠翻身、体重、生存期等指标评估供试品药效。  **供试品：saRNA**  DS06-0002B-H: 用HKP修饰的saRNA，浓度2 mg/mL  DS06-0013B-J, 用JetPEI修饰的saRNA, 浓度1 mg/mL    **3实验结果**  **3.1用HKP和JetPEI递送saRNA的初步药效研究**  DS06-002B-H治疗组小鼠翻身时间与Het组小鼠接近，能够显著改善动物运动能力。与SMA type1组相比，DS06-0013B-J组小鼠翻身时间明细缩短，改善动物运动能力。综合比较DS06-002B-H组更优。  与SMA type1组相比，DS06-0013B-J组能延长小鼠存活时间。  积极的数据有力地保证了saRNA在SMA小鼠模型中使用优化的API和递送系统的进一步测试。  C:\Users\user\Desktop\1.png  **3.2用SCAD实现saRNA在中枢神经系统的递送**  FVB新生鼠PND1天ICV注射saRNA，给药后7天，通过IVIS活体成像、免疫组化检测药物分布，发现saRNA主要分布在大脑和脊髓中，且SCAD可以实现saRNA在中枢神经系统的递送。  C:\Users\user\Desktop\2.png  **3.3 ICV注射给药后SCAD-saRNA在III型SMA小鼠对SMN蛋白的激活作用**  SMA type3新生鼠PND1天ICV注射saRNA，给药后7天，取脑、肝脏、心脏、肌肉，通过western blot检测SMN2蛋白的表达。发现SCAD-saRNA可以增加SMN2蛋白的表达。  C:\Users\user\Desktop\3.png  **3.4 SCAD-saRNA在小鼠的初步PK及PD研究**  Het小鼠ICV注射saRNA，根据时间点取大脑和血浆，stem-loop检测组织中药物浓度，saRNA主要分布在脑组织中，药物浓度维持至少20天。Western blot结果显示随着时间增加，脑组织中SMN2蛋白表达增加，PK与PD结果存在一定关联性。  C:\Users\user\Desktop\4.png  **3.5 SCAD-saRNA在I型SMA鼠的初步药效学研究**  3.5.1对动物体重及生存时间的影响  RD11342(CM54)组SMA type1小鼠体重增加，延长动物存活时间。  RD11342(CM54)对SMA type1小鼠有较好的治疗效果。  C:\Users\user\Desktop\5.png  3.5.2对小鼠翻身时间的影响  PND14天小鼠翻身实验表明：11342(CM-54)能够缩短动物翻身时间，治疗效果与Spinraza组相当，显著改善SMA type1小鼠运动功能。  C:\Users\user\Desktop\6.png  3.5.3对动物生存的影响  与Control组相比，RD11342(CM54)组延长SMA type1小鼠中位生存时间。  C:\Users\user\Desktop\7.png | | | | | | | |
| 2.获得成果形式及简介：专利、国（境）外专利（专利名称、专利号、申请或授权时间、主要完成人等）；软件著作权（著作权名称、著作权号、申请或授权时间、主要完成人等）；新(农、兽）药证书、药物临床批件、医疗器械注册证、动植物新品种；集成电路布图设计专有权（授权名称、编号、申请授或授权时间、主要完成人等）；论文等（论文名称、主要完成人、发表刊物名称、发表时间、影响因子等）；科技专著（专著名称、出版单位、时间、主要完成人等）；技术标准（标准名称、编号、发布部门、发布时间、主要完成人等）；新产品、新工艺、新装置等（名称、认定部门、认定时间、主要完成人等）；咨询报告、政策建议和调研报告等（名称、采纳单位部门、采纳时间、主要完成人等）。  1．促成小核酸系列药物的临床前研究（35万元、22ZH463）成功立项，入选2023年江苏省科技副总项目。  2. Lili Du. Junjie Sun. Zhiheng Chen. Yixiang Shao\*. Liucheng Wu\*. NOVA1 promotes SMN2 exon 7 splicing by binding the UCAC motif and increases SMN protein expression. Neural Regeneration Research. 2022.17(11):2530-2536.  3.Liucheng Wu. Yi Wang. Lili Du. Guiqing Ji. Rui Zhou. Zeyi Zhao. Jun Chen. Shunxing Zhu\*. Targeted editing of intronic-splicing silencer enhancement of SMN2 Exon 7 inclusion by CRISPR/Case 9. Biocell. 2021.45(6):1501-1507.  4. NOVA1促SMN2外显子7列入的验证方法及其应用，申请号：202011535839.7，在审。  5.指导2020届研究生杜利莉同学的毕业论文，题为《NOVA1组织特异性调控SMA相关基因SMN2剪接机制研究》，该同学被评为南通大学优秀毕业研究生。  3.主要解决的关键问题与创新点  在人类体内表达SMN蛋白有两个基因，SMN1和SMN2，而在人类脊髓性肌萎缩症（SMA）患者中，起主要作用的SMN1基因突变失去功能后，由于外显子7上C6T导致SMN2表达的基因在剪接过程中外显子7跳跃，大部分被剪切而仅有少量SMN全长基因，少量SMN有功能蛋白，从而造成运动神经元退行性病变坏死，引起肌肉萎缩，如何促进SMN2基因中外显子7的列入，或者促进SMN2基因的过表达，增加SMN全长基因的表达是国内外面临的关键问题和难点，本项目从这两个方面进行了研究。  脊髓性肌萎缩症（SMA），目前最有效的方法是ASO反义寡核苷酸，比如已经商业化的Spinraza，但是ASO半衰期较短，必须持续性给药，通过大量筛选发现NOVA1和SMN2外显子7列入有相关的组织特异性。通过构建SMN2外显子7中NOVA1靶向结合位点突变以及RNApulldown实验，证实NOVA1是通过结合外显子7靶向序列促进SMN2外显子7列入，并显著提升SMN蛋白的表达，而且该重组质粒可以在细胞内持续性表达，不用持续性给药。  小激活RNA(saRNA)由包含17至30个核苷酸的第一寡核苷酸链和包含17至30核苷酸的第二寡核苷酸链组成，能够以序列特异性的方式靶向蛋白编码基因的调控序列如启动子序列而在转录和表观遗传水平正向调控基因的表达水平，RAG-06的临床前数据展现了出色促进内源性SMN2基因的过表达和安全性，SMA小鼠侧脑室注射SCAD递送saRNA在初步药效显著，SMA小鼠生存期显著延长，小鼠诸多行为学指标得到有效改善，并有望成为具有全球创新性的脊髓性肌萎缩症靶向治疗新药。 | | | | | | | |
| 4.项目实施的科学价值、技术价值、经济价值、社会价值、文化价值（新技术、新工艺、新产品、新材料、新设备，以及关键部件、实验装置/系统、应用解决方案、新诊疗方案、临床指南/规范、科学数据、科技报告、咨询报告、政策建议、调研报告、软件等成果的质量、价值或效益，在成果转化、服务国家地方经济建设和社会发展的能力、支撑产业发展、服务企业发展等方面的贡献和影响。）  脊髓性肌萎缩症（SMA），目前最有效的方法是ASO反义寡核苷酸，比如已经商业化的Spinraza，靶向封闭内含子7剪接沉默子ISS序列，促进外显子7列入比例，但是ASO半衰期较短，必须持续性给药，而本实验在SMA小鼠大脑脊髓神经组织和外周非神经组织发现SMN2外显子7在大脑和脊髓中列入比例显著高于其他组织，通过大量筛选剪接因子发现NOVA1在中枢表达显著高于外周组织，NOVA1和SMN2外显子7列入有相关的组织特异性。体外细胞实验证明敲降和过表达NOVA1显著抑制和促进SMN2外显子7列入，构建SMN2外显子7中NOVA1靶向结合位点突变以及RNApulldown实验，证实NOVA1是通过结合外显子7靶向序列促进SMN2外显子7列入，并显著提升SMN蛋白的表达，这对于SMA小鼠无疑是救命的，而且该重组质粒可以在细胞内持续性表达，不用持续性给药。同时为脊髓性肌萎缩等罕见病的治疗提供新的方法和思路。  中美瑞康核酸技术（南通）研究院有限公司基于RNA激活（RNAa）这一原创平台技术，RAG-06的临床前数据展现了出色促进内源性SMN2基因的过表达和安全性，我们期待RAG-06的临床表现，并期望它成为具有全球创新性的脊髓性肌萎缩症靶向治疗新药。本项目在临床前动物实验研究方面打下了坚实的基础，构建或引进相关动物模型，对动物模型进行机制研究、小核酸候选药物进行初步的药效及安全性评价，为临床应用提供动物实验依据。有望助力中美瑞康核酸技术（南通）研究院有限公司推动更多有潜力的saRNA产品进入临床阶段，为诸多目前难以治疗的疾病提供创新疗法；为南通市生物医药产业的发展贡献动物实验公共服务平台力量。  总之，本项目的顺利开展，打通了生物医药领域高新技术企业和地方高校优势相结合的脉络，弥补了高新技术企业平台不足和高校科学技术研究资金短缺的痛点，为生物医药领域新药研发提供了新的出路和方法，为尽早解决患者痛苦和减轻社会负担贡献一份力量，同时还有很大可能产生一定的经济效应和社会效应，并将进一步促进生物医药产业高质量发展。 | | | | | | | |
| 5.合同主要任务，完成情况，存在问题，是否达到预期目的等  已完成合同约定的全部实验内容，构建或引进相关动物模型，对动物模型进行机制研究、小核酸候选药物进行初步的药效及安全性评价，为临床应用提供动物实验依据，达到了预期目的。  项目负责人（签字）：　　　　　　　　　　　　2023年11月28日 | | | | | | | |
| 委托单位意见：  负责人（签字）：　　 （公章）　　　 年 月 日 | | | | | | | |
| 所在二级单位意见：  负责人（签字）：　　　　　　　　　　　　　　　（公章）　　　 年 月 日 | | | | | | | |