(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
2020 年 11 月 19 日 (19.11.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/228612 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/90 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/089238

(22) 国际申请日: 2020 年 5 月 8 日 (08.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910399416.8 2019年5月14日 (14.05.2019) CN

(71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 项鹏(XIANG, Peng); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 柯琼 (KE, Qiong); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 赖兴强 (LAI, Xingqiang); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 陈洪 (CHEN, Hong); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 李伟强 (LI, Weiqiang); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 毛富祥 (MAO, Fuxiang); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司(YOGO PATENT AND TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路中石化大厦B塔4416室, Guangdong 510620 (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, 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,

(54) **Title:** TYROSINEMIA TYPE I MONKEY MODEL, ESTABLISHMENT METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) **发明名称:** 酪氨酸血症I型猴模型及其建立方法和应用



图 6

(57) **Abstract:** Provided is a tyrosinemia type I monkey model, an establishment method therefor and the use thereof. The method comprises: designing a TALEN target of an FAH gene, constructing an FAH gene-knockout TALEN plasmid, obtaining and screening gene targeting RNA fragments and preparing an FAH gene-knockout monkey model. Establishment of the model can provide a reliable standard animal model for the subsequent development of the study and clinical transformation of gene therapy and cell therapy for hereditary metabolic deficiency diseases, and also provides an animal model which is closer to patients for screening of traditional drugs and evaluation of efficacy and safety, etc.

(57) **摘要:** 提供了一种酪氨酸血症I型猴模型及其建立方法和应用，该方法包括FAH基因TALEN靶点的设计，FAH基因敲除TALEN质粒的构建，基因打靶RNA片段的获取、筛选及FAH基因敲除猴模型的制备。该模型的建立可为后续开展基因治疗、细胞治疗此类遗传性代谢缺陷疾病的研究和临床转化带来可靠的标准动物模型，也为传统药物的筛选及有效性安全性评价等提供更接近于患者的动物模型。

WO 2020/228612 A1

[见续页]

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))。

酪氨酸血症 I 型猴模型及其建立方法和应用

技术领域

本发明涉及医学动物疾病模型技术领域，特别是涉及一种酪氨酸血症 I 型猴模型及其建立方法和应用。

背景技术

酪氨酸血症 I 型（hereditary tyrosinemia type 1，HT1）（OMIM276700）是一种典型的遗传性代谢缺陷（Inborn errors of metabolism，IEM）疾病。HT1 是由延胡索酰乙酰乙酸水解酶（Fumarylacetoacetate hydrolase，FAH）基因突变造成的，属于常染色体隐性遗传病，编码该基因的序列位于 15q23-q25, 含有 14 个外显子，迄今为止共发现 96 种 FAH 基因突变，其中将近 84 种为致病基因型。该基因是酪氨酸代谢通路的最后一个代谢酶，其缺失导致体内酪氨酸及琥珀酰丙酮等大量蓄积，引起高酪氨酸血症表型，对机体造成严重损伤并危及生命。血或尿琥珀酰丙酮增高是诊断 HT1 的必要条件。急性 HT1 多发于出生后 6 个月内，病情可迅速进展为肝衰竭并导致死亡；慢性型病情相对稳定，但长期的慢性肝、肾功能损害通常导致患者在 10 岁左右因肝衰竭或肝细胞瘤而死亡。

HT1 在临床上尚无有效的根治方式，主要依赖减少酪氨酸及苯丙酮酸的摄入。Nitisinone（2-(2-硝基-4-三氟甲基苯甲酰基)-1,3-环己烷二酮，2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)- 1,3- cyclohexanedione, NTBC）是近年来开发的用于减轻该疾病症状的药物，为 4-羟基苯丙酮酸二氧化酶抑制剂，相当于将 HT1 转变为酪氨酸血症III型患者，可减轻患者的疾苦，其 4 年存活率可达 88%，但也有研究表明该药物在缓解症状的同时会增加罹患肝癌的风险。同时此类药物价格相当高昂，按 1 岁幼儿平均 10kg 体重计算，每天服用 1mg/kg，一年仅药物费用就高达 17 万美元。除此之外，还存在部分患者对药物无反应或者服药后仍导致肝癌，最终需要选择肝移植进行治疗。然而供体器官的严重短缺已成为一个世界性的难题，且术后仍摆脱不了终身进行免疫抑制治疗。

基因治疗技术的出现给 HT1 的治疗带来了希望，HT1 患者不存在不可逆的发育损伤，有可能通过修复肝细胞而得到有效的根治。研究表明，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术修复 FAH 基因敲除小鼠不足 1%的肝细胞，这些正常

细胞就能逐渐再生富集、恢复肝脏功能并达到治愈疾病的目的，这在威尔逊氏病、B 型血友病等 IEM 疾病小鼠模型的研究中也都得到证实，因此发展基因治疗这一新的疗法对延长 IEM 患者的生命有着非常重要的意义。

尽管啮齿类动物模型为人类疾病研究做出了重要的贡献，但一些遗传性疾病小鼠模型并不能完全重现患者的表型。啮齿类动物不仅难以模拟与人类认知及大脑发育相关的疾病类型，对部分其他组织器官疾病的模拟也存在局限性，例如携带与人类 Fanconi 贫血相同基因缺陷的转基因小鼠没有表现出人类骨髓发育缺陷的典型症状。FAH 基因敲除小鼠、大鼠、兔子及猪等模型已有报道，但这些模型在个体及发病进程等方面与 HT1 患者存在较多差异，仅能初步评价基因治疗的有效性，不是最佳的基因治疗临床前评价动物模型。因此迫切需要寻求更接近人的动物模型来建立全面的评价体系。

灵长类动物其平均寿命较长，在解剖、生理机能及生化代谢等方面与人类十分相似，因此可能更适于评价基因治疗的有效性及长期的安全性，有望建立基因治疗临床前的评价体系。传统的基因敲除技术繁琐耗时，在生殖周期长的灵长类动物中几乎无法实现。而新型的基因编辑技术的出现得以通过对受精卵的直接基因改造快速获得基因敲除猴模型。TALEN 基因编辑技术具有靶向特异、脱靶效应低等特点，是制备基因缺陷动物的良好工具。

然而，目前 FAH 基因敲除食蟹猴模型尚未见报道。

发明内容

基于此，有必要针对上述问题，提供一种酪氨酸血症 I 型猴模型及其建立方法和应用，本申请中应用 TALEN 基因编辑技术建立了定向 FAH 基因敲除的方法，建立了 HT1 猴模型，为后续开展基因治疗、细胞治疗此类遗传性代谢缺陷疾病的研究和临床转化带来可靠的标准动物模型，也为传统药物的筛选及有效性安全性评价等提供更接近于患者的动物模型。

一种酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，包括以下步骤：

（1）针对 FAH 基因进行分析设计，以外显子 EXON1 和/或 EXON2 作为切割位点，构建 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，合成 TALEN mRNA；

（2）将上述得到的 TALEN mRNA 以原核显微注射方式注入猴受精卵；

（3）将上述经显微注射的受精卵进行体外培养，植入代孕母猴，孕育至生殖；

（4）取上述新生猴组织，进行验证，通过即得酪氨酸血症 I 型猴模型。

上述验证可通过获取新生猴组织获取基因组 DNA，通过基因型检测、蛋白表达检测、血液学检测及组织病理学检测等手段进行验证，并且该具体验证手段可以根据情况调整。

在其中一个实施例中，所述步骤（1）中，所述 TALEN 靶向修饰基因载体中，靶点识别的碱基序列为 16-17bp，spacer 间隔序列为 14-16bp 之间。由于靶点针对的外显子在病人中存在有效的功能失活突变，并容易造成后续的移码突变，通过上述设计容易获得具有明显的表型的疾病模型；同时该序列设计在兼顾有效性的同时能有效减少脱靶效应的产生。

在其中一个实施例中，所述步骤（1）中，所述 TALEN 靶向修饰基因载体质粒中，靶向 FAH 基因的 TALEN 左臂和右臂序列如下：

TALEN-T1 左臂：GCTCGCCAGCATGTCCT（SEQ ID NO.1）；

TALEN-T1 右臂：GGGGAAGTCGGAATCCT（SEQ ID NO.2）；

TALEN-T2 左臂：CCACAACCTGCCCTAC（SEQ ID NO.3）；

TALEN-T2 右臂：GCTCACGTCGCCTCTG（SEQ ID NO.4）；

TALEN-T3 左臂：CCTAGCCAAGACTGAGG（SEQ ID NO.5）；

TALEN-T3 右臂：CCAGGATCTGGTCGCC（SEQ ID NO.6）。

以上述 TALEN 左臂和右臂序列进行切割敲除，具有较高的切割活性。

在其中一个实施例中，所述步骤（1）中，通过以下方法将 TALEN 靶向修饰基因载体质粒线性化并进行体外转录，得到 TALEN mRNA：

a）线性化：先通过酶切上述得到的 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，使其线性化，再使用 QIAquick PCR Purification Kit 回收、纯化线性化的 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，得线性化产物；

b）体外转录：取上述线性化产物，以 mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription Kit 进行体外转录，得到 TALEN mRNA。

在其中一个实施例中，所述步骤（2）中，所述猴受精卵通过以下方法得到：

通过向母猴连续注射重组人促卵泡激素和重组人促性腺激素，超数排卵获得卵母细胞，利用电刺激采精法获得食蟹猴精子，通过胞质内精子注射，进行人工授精，即得猴受精卵。

在其中一个实施例中，所述步骤（2）中，向所述猴受精卵注射 10-50pl TALEN

mRNA 左右臂混合液，所述混合液中左臂序列浓度为 10-50ng/μl，右臂序列浓度为 10-50ng/μl。

在其中一个实施例中，所述步骤（3）中，将上述经显微注射的受精卵置于培养箱中，继续培养至囊胚或移植入代孕母猴体内。

在其中一个实施例中，所述步骤（4）中，所述验证包括：

a）基因型鉴定：提取食蟹猴胚胎基因组 DNA，以下述引物组进行 PCR 扩增目的基因序列，随后进行测序鉴定；

上游引物 Fah T3F：GGGAACACAGATTCTTTTCCGTT（SEQ ID NO.7）；

下游引物 Fah T3R：TTGTCTGTCTCAAAACAACCCCAA（SEQ ID NO.8）；

b）蛋白表达检测：通过细胞 Western blot 及组织免疫化学检测蛋白表达；

c）血液学检测：通过分离血清检测肝功能及全血检测凝血功能及氨基酸浓度；

d）组织病理学检测：通过穿刺取得肝脏样品，进行组织固定及切片处理，获得电镜、组织切片 HE 染色检测结果。

可以理解的，上述进行 PCR 扩增方法按照常规条件即可，如可利用 DNA 提取试剂盒（TIANGEN，DP304）获得基因组 DNA，通过加入上述特定 PCR 引物及 DNA 聚合酶（Thermo Scientific™，EP0041）在 Bio-Rad PCR 仪上运行相应程序。再通过将 PCR 产物进行 T7en1 酶切电泳检测及制备 TA 克隆测序。且上述试剂厂家型号也并非是唯一指定的，常规的试剂同样可以达到类似的目的。

本发明还公开了上述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法得到的酪氨酸血症 I 型猴模型。

本发明还公开了上述的酪氨酸血症 I 型猴模型在用于酪氨酸血症 I 型疾病的研究和药物的筛选及有效性、安全性评价研究中的应用。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明是一种酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，通过对 FAH 基因进行 TALEN 靶点设计，FAH 基因敲除 TALEN 质粒的构建，基因打靶 RNA 片段的获取、筛选及 FAH 基因敲除猴模型的制备，对所得到的新生猴进行基因型鉴定分析，以及生理、病理表型分析，明确其具有人类酪氨酸血症 I 型患者的疾病表现，经检测鉴定最终获得 FAH 基因敲除猴模型，并该模型的建立有望为后续开展基因治疗、细胞治疗此类遗传性代谢缺陷疾病的研究和临床转化带来可靠的标

准动物模型，也为传统药物的筛选及有效性安全性评价等提供更接近于患者的动物模型。

且该方法所优选构建的 HT1 猴模型的靶点，具有高效、低脱靶及表型清楚的特点。

附图说明

图 1 为实施例 1 中 TALEN 质粒载体的图谱。

图 2 为实施例 1 中 Luciferase SSA 检测 TALEN 活性示意图。

其中：A 为 TALEN 活性检测示意图；B 为 FAH 各靶点活性检测结果。

图 3 为实施例 1 中 TALEN mRNA 注射后受精卵正常发育示意图。

其中：A，B 和 C 分别代表 2 细胞，4 细胞和囊胚阶段。

图 4 为实施例 1 中 FAH-T3 mRNA 在食蟹猴受精卵的靶向效率。

其中：A: T7en1 酶切验证 FAH-T3 mRNA 在食蟹猴受精卵基因组的打靶情况；

B: FAH-T3 mRNA 在食蟹猴受精卵基因组的靶向效率的 TA 克隆测序结果；1-11 代表 11 个受精卵；WT 代表对照的野生型受精卵；M 为 marker；下划线字母为 TALEN 切割的靶点序列；斜体字母小写字母代表插入/替换的碱基；---代表缺失的碱基。

图 5 为实施例 1 中 FAH 突变食蟹猴各组织和细胞基因组的 TA 克隆测序示意图。

其中：A 为两种基因突变类型在各组织中的比例；B 为两种突变类型的测序结果；下划线字母为 TALEN 切割的靶点序列；斜体字母代表插入的碱基；---代表缺失的碱基；WT 代表野生型基因序列；MT1、MT2 代表 FAH 突变食蟹猴基因组的两种突变形式。

图 6 为实施例 1 中 FAH 突变食蟹猴 FAH 蛋白表达检测 Western blot 结果示意图。

其中，WT 为对照组，FAH-/-代表纯合子，FAH+/-代表杂合子；Dfs 为皮肤成纤维细胞；PBMCs 为外周血细胞。

图 7 为实施例 2 中 FAH 突变食蟹猴肝脏组织病理检测。

其中：A 为 FAH 免疫组化染色；B 为 HE 染色；（Bar=50μm）。

图 8 为实施例 2 中透射电镜观察对照组与 FAH 突变食蟹猴肝脏组织的亚细

胞结构。

其中：放大倍数分别为 2400x 和 13500x。

图 9 为实施例 2 中 FAH 突变食蟹猴体重变化和血液氨基酸代谢检测结果。

图 10 为实施例 2 中 FAH 突变食蟹猴血液生化指标和凝血功能检测结果。

具体实施方式

为了便于理解本发明，下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是，本发明可以以许多不同的形式来实现，并不限于本文所描述的实施例。相反地，提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

以下实施例中所用原料，除非特别说明外，均为市售购得。

实施例 1

一种酪氨酸血症 I 型猴模型，通过以下方法建立得到：

1、针对 FAH 基因进行分析设计，以外显子 EXON1 和/或 EXON2 作为切割位点，构建 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，合成 TALEN mRNA；具体如下：

（1）靶点选择。

通过对 FAH 基因序列进行分析，设计了 3 对 TALEN 靶向载体，靶点识别的碱基序列为 16-17bp，spacer 间隔序列为 14-16bp 之间；靶向切割位点均选择在靠前的外显子 EXON1 和 EXON2 上，以期形成 DNA 编码序列移码或突变，达成基因敲除目的。

设计的靶向 Fah 基因的 TALEN 左臂和右臂序列：

TALEN-T1 左臂：GCTCGCCAGCATGTCCT（SEQ ID NO.1）；

TALEN-T1 右臂：GGGGAAGTCGGAATCCT（SEQ ID NO.2）；

TALEN-T2 左臂：CCACAACCTGCCCTAC（SEQ ID NO.3）；

TALEN-T2 右臂：GCTCACGTCGCCTCTG（SEQ ID NO.4）；

TALEN-T3 左臂：CCTAGCCAAGACTGAGG（SEQ ID NO.5）；

TALEN-T3 右臂：CCAGGATCTGGTCGCC（SEQ ID NO.6）。

（2）构建 TALEN 靶向修饰基因载体质粒。

参考维尚立德公司的 TALEN 载体构建试剂盒操作说明，通过酶切连接的方式构建 TALEN 质粒载体。

载体的基本结构如图 1 所示，构建成功的载体用下表 1 所示引物作双向测序。

表 1. TALE repeat 序列测序引物

引物	序列（5’-3’）
TALE-FP	cttgtgaagattgcaaaacgtggc
TALE-RP	ggacgtccgccgaggcaggccaag

（3）TALEN 靶点活性评估。

体外检 TALEN 活性采用的是单链复性（Single-strand annealing，SSA）方法，SSA 报告载体中报告基因为荧光素（Luciferase）基因。

将 TALEN 质粒、SSA 报告质粒、Renilla plasmid 共转染 293 细胞（购自 ATCC），1-2 天后裂解收集细胞，检测荧光素酶活性，评估 TALEN 的切割活性，结果如图 2 所示。

图 2 中 A 为 TALEN 活性检测示意图；B 为 FAH 各靶点活性检测结果；A 中方块 1 代表终止密码子序列，方块 2 代表 TALEN 靶点序列。

从上述结果中可以看出，三对打靶序列均具有切割活性，且 FAH-T1 具有最佳的切割活性，利用成纤维细胞进一步验证证实 FAH-T3 效率最高最稳定，后续实验采用该打靶序列进行。

（4）合成 TALEN mRNA。

a）线性化：

先通过酶切上述得到的 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，使其线性化，线性化 TALEN 质粒酶切体系如下表所示，在 37℃恒温水浴 3h。

表 2. 线性化 TALEN 质粒酶切体系

试剂名称	用量
TALEN 质粒	10μg
10X NEB Cutsmart buffer	5μl
NEB Not Ⅰ-HF 酶	2μl
ddH_2O	补至 50μl

再使用 QIAquick PCR Purification Kit 回收、纯化线性化的 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，得线性化产物，具体步骤如下：

I.酶切体系中加入 250μl Buffer PB，充分混匀，颜色为淡黄色；

II.将 QIAquick 柱子放入 2ml 收集管内，将混合液加入到柱子里，13000rpm 离心 1 分钟；

III.丢弃废液，加入 0.75ml Buffer PE，13000rpm 离心 1 分钟；

IV.再次丢弃废液，13000rpm 离心 2 分钟；将柱子放入干净的 1.5ml EP 管，室温晾干 5 分钟；

V.加入 30μl RNase-Free H_2O，室温放置 5 分钟，13000rpm 离心 1 分钟；

VI.取 2 μl 回收产物用 Nanodrop 测量线性质粒的浓度及纯度，产物在-20℃保存。

b）体外转录：

取上述线性化产物，以 mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription Kit，参照其说明书操作，进行体外转录，操作过程中使用 RNase-Free EP 管和 RNase-Free 枪头，反应体系如下表，得到 TALEN mRNA。

表 3. TALEN mRNA 体外转录反应体系

试剂名称	用量
10x SP6 Reaction Buffer	2μl
2x NTP/ARCA	10μl
Linear TALEN plasmid	1μg
SP6 Enzyme Mix	2μl
RNase-Free H_2O	补至 20μl

具体操作为：放入 PCR 仪，37℃恒温反应 6h；反应结束后，加入 1μl TURBO Dnase，混匀离心，37℃恒温反应 15min。

（5）利用 MEGAclear™ Kit 纯化。

回收 TALEN mRNA 体外转录产物，操作如下：

a）向上一步的祥品中加入 Elution Solution 至总体积为 100μl，充分混匀后，转移至 RNase-Free EP 管中；

b）加入 350μl Binding Solution，充分混匀；再加入 250μl 无水乙醇，充分混

匀；

c）将混合液全部加入到吸附柱中，10000×g 离心 30s；

d）丢弃收集管中的废液，向吸附柱中加入 0.75ml Wash Solution，10000×g 离心 30s，重复操作一次；

e）再次丢弃废液，10000×g 离心 2 分钟；

f）将吸附柱转移至新的 1.5ml RNase-Free EP 管中；室温晾干 5min；

g）往吸附柱中加入 50μl 预热的 Elution Solution，室温放置 5min，10000×g 离心 1min；取 2μl 回收的 mRNA 产物用 Nanodrop 测量浓度及纯度，mRNA 产物分装后在-80℃保存。

2、将上述得到的 TALEN mRNA 以原核显微注射方式注入猴受精卵；具体如下：

（1）食蟹猴受精卵获取。

通过连续注射重组人促卵泡激素和重组人促性腺激素超数排卵获得卵母细胞，利用电刺激采精法获得食蟹猴的精子，进行胞质内精子注射，进行人工授精，获得猴受精卵。

（2）TALEN mRNA 注射。

在进行胞质内精子注射（ICSI）8-12h 后，往受精卵显微注射 TALEN mRNA 左右臂混合液（每种浓度为 10-50ng/μl），置于培养箱中继续培养至囊胚或移植入代孕母猴体内。

将体外转录的 TALEN mRNA 载体注射入食蟹猴受精卵细胞后，早期胚胎的发育时间和生长状态均无明显的改变，说明注射 TALEN mRNA 无毒副作用，不影响胚胎的正常发育，结果如图 3 所示，图中：A，B 和 C 分别代表 2 细胞，4 细胞和囊胚阶段。

3、将上述经显微注射的受精卵进行体外培养，植入代孕母猴，孕育至生殖，得酪氨酸血症 I 型猴模型。

（1）食蟹猴胚胎基因组 DNA 提取和基因敲除效率检测。

利用玻璃毛细吸管将食蟹猴胚胎细胞收集到 PCR 管，5000rpm 离心 1min，吸弃培养液，管底留大约 2-5μl 液体；用单细胞基因组提取试剂盒提取胚胎细胞的 DNA：蛋白酶 K 和 Lysis Buffer 以体积比 1:17 配置成 10x Lysis Buffer；稀释成 1x Lysis Buffer，加入到装有食蟹猴胚胎的 PCR 管中，轻轻混匀，50℃反应 1h，

99℃反应 5min；收集产物在-20℃保存。

通过 PCR 扩增目的基因序列后进行 TA 克隆测序鉴定。加入特定 PCR 引物（上游引物 Fah T3F：GGGAACACAGATTCTTTTCCGTT （SEQ ID NO.7）及下游引物 Fah T3R：TTGTCTGTCTCAAAACA ACCCCAA（SEQ ID NO.7））及 DNA 聚合酶（Thermo Scientific™，EP0041），充分混匀，在 Bio-Rad PCR 仪上运行程序为 1：95℃，5min；2：95℃，20 s；3：55~65 ℃，30 s；4：72℃，1-2min；重复第 2 步到第 4 步，30-32 个循环；5：72℃，10min；6：12℃保存。

结果如图 4 所示，图中，A 为 T7en1 酶切验证 FAH-T3 mRNA 在食蟹猴受精卵基因组的靶向效率；B 为 FAH-T3 mRNA 在食蟹猴受精卵基因组的靶向效率的 TA 克隆测序结果；1-11 代表 11 个受精卵；WT 代表野生型的对照；M 为 marker；下划线字母为 TALEN 切割的靶点；斜体字母代表插入碱基；---代表缺失的碱基序列。

从上述 T7en1 酶切结果表明，73%的胚胎（11 个受精卵中的 8 个）DNA 能被错配酶识别并切割，进一步 DNA 测序结果显示除 E2、E7、E11 外其他胚胎均含有突变基因，其中 E4、E5、E6、E10 未检测到野生型基因序列，可能是类似纯合子的双等位基因突变类型或者嵌合体。

（2）FAH 突变食蟹猴 DNA 测序分析。

总共从各组织细胞 PCR 产物中挑选约 200 个 TA 克隆菌落进行 sanger 测序，结果显示，FAH 突变食蟹猴属于双等位基因突变，各组织细胞基因组的两种突变形式接近 1:1，未检测到野生型 FAH 基因序列（图 5A）；其中一条染色体在敲除位点缺少了 12 个碱基（MT1）；另一条染色体则缺少了 92 个碱基，随机插入 1 个碱基（MT2），结果见图 5B。

（3）蛋白免疫印迹（Western blot）。

a) 收集食蟹猴 DFs 和 PBMCs 细胞，加入蛋白酶抑制剂和 RIPA 溶液，混匀放置于冰上 30min 后再超声充分裂解细胞，12000rpm，4℃离心 1min，取上清蛋白质溶液测定浓度。取等量的蛋白加入 loading buffer，100℃变性 10min，取样进行 SDS-PAGE 垂直电泳分离；

b) 将分离的蛋白条带恒流 200mA，2h 转膜到硝酸纤维素膜上，用 5% BSA 室温封闭 1h，加入一抗过夜孵育，用 TBST 洗 3 次，5min/次；加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h，用 TBST 洗 3 次，5min/次；于暗房中显影、定影。

结果如图 6 所示，提取了食蟹猴皮肤成纤维细胞和外周血细胞的总蛋白分析 FAH 蛋白的表达情况：与对照组相比，FAH+/-杂合子食蟹猴的皮肤成纤维细胞中 FAH 蛋白的表达量明显减少，FAH-/-纯合子突变中几乎不表达 FAH 蛋白；在 PBMCs 细胞中 FAH+/-杂合子的 FAH 蛋白表达与 WT 组差别不大，FAH-/-纯合子突变则没有检测到 FAH 蛋白的表达。

以上结果显示，通过本实施例的方法成功建立了酪氨酸血症 I 型猴模型。

实施例 2

FAH 基因敲除食蟹猴肝脏组织病理和生理指标检测。

（1）免疫组织化学：

a) 石蜡切片放置于 60℃烘箱 2h，立即放入二甲苯中洗脱三次，10min/次；依次放入梯度酒精：100%，5min；95%，5min；80%，5min；70%，5min；再两次放入蒸馏水中，10min/次。

b) 抗原修复：加入柠檬酸盐缓冲液，加热至 96℃维持 15min，室温冷却。

c) 加入过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，避光室温 10min，PBS 洗 2 次，5min/次；

d) 滴加山羊血清封闭 10min；加入适当浓度的一抗孵育过夜；

e) PBS 洗 2 次，5min/次；依照迈新免疫组化和 DAB 显色试剂盒操作说明，依次加入 B 液、C 液、D 液，显色后用苏木素复染细胞核。

f) 使用 70%-100%酒精梯度脱水，二甲苯透明 15min 后用中性树脂封片，显微镜下观察及拍照。

结果如图 7A 所示，与对照组相比，FAH 突变猴肝脏细胞中几乎不表达 FAH 蛋白。

（2）HE 染色：

a) 肝脏组织切片脱蜡至蒸馏水，苏木素染色 5min,自来水冲洗；

b) 0.5%盐酸乙醇（0.5mlHCl+100ml70%乙醇）分化 30s；

c) 自来水浸泡 15min 或温水（约 50℃）5min；

d) 置伊红液 2min；

e) 常规脱水，透明，封片：95％乙醇（I）1min→95％乙醇（Ⅱ）5min→100％乙醇（I）5min→100％乙醇（Ⅱ）5min→二甲苯乙醇（1:1）5min→二甲苯（I）5min→二甲苯（Ⅱ）5min→二甲苯（Ⅲ）5min→中性树脂封固片。

结果如图 7B 所示，FAH-/-纯合子突变食蟹猴部分肝脏细胞发生肿胀，细胞间隙缩小，肝血窦减少。

（3）肝脏活检：

将食蟹猴用氯胺酮麻醉后，采用侧卧姿势，在 B 超引导下，用规格 12G 的活检针取样约 1-1.5cm 长度的肝脏组织。

将上述肝脏组织进行透射电镜检测，具体方法为：肝脏活检的样品取出后，截取 1/3 立即放入含 2.5%戊二醛的固定液中，制片并拍照观察肝脏亚细胞结构。

结果如图 8 所示，FAH-/-纯合子突变食蟹猴出现细胞肿胀，细胞间隙减小，细胞器特别是内质网数量减少，糖原堆积，部分细胞出现核固缩，核膜不整，线粒体有轻度肿胀等肝脏细胞损伤的表型。

（4）血液氨基酸检测：

取静脉血滴在专用的检测卡片上，待完全浸透晾干后送达安基因公司检测。

结果如图 9 所示，在 NTBC 撤药（NTBC off）后，FAH-/-纯合子突变猴体重增长缓慢至平台期（图 9A），继续给药后，体重开始恢复增长；血清中酪氨酸（Tyr）和琥珀酰丙酮（SA）都显著高于对照组（图 9B）。

（5）血清肝功能指标：

静脉抽取 1.5-2ml 血液，取部分 10000rpm/min 室温离心 5min 分离血清用于检测其中的甲胎蛋白（AFP）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）等肝功能指标，另外通过全血检测凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血活酶时间（APTT）。

结果如图 10 所示，FAH 突变猴谷草转氨酶（AST）升高了近 1 倍，甲胎蛋白（AFP）远高于对照组，提示可能存在肝细胞损伤；活化部分凝血活酶时间（APTT）延长，提示可能存在凝血功能障碍。

从上述结果可以看出，实施例 1 建立的酪氨酸血症 I 型猴模型，明确具有人类酪氨酸血症 I 型患者的疾病表现，确认模型构建成功。

并且该模型的建立可为后续开展基因治疗、细胞治疗此类遗传性代谢缺陷疾病的研究和临床转化带来可靠的标准动物模型，也为传统药物的筛选及有效性安全性评价等提供更接近于患者的动物模型。

以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权 利 要 求 书

1、一种酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，包括以下步骤：

（1）针对 FAH 基因进行分析设计，以外显子 EXON1 和/或 EXON2 作为切割位点，构建 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，合成 TALEN mRNA；

（2）将上述得到的 TALEN mRNA 以原核显微注射方式注入猴受精卵；

（3）将上述经显微注射的受精卵进行体外培养，植入代孕母猴，孕育至生殖；

（4）取上述新生猴组织，进行验证，通过即得酪氨酸血症 I 型猴模型。

2、根据权利要求 1 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤（1）中，所述 TALEN 靶向修饰基因载体中，靶点识别的碱基序列为 16-17bp，spacer 间隔序列为 14-16bp 之间。

3、根据权利要求 2 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤(1)中，所述 TALEN 靶向修饰基因载体质粒中，靶向 FAH 基因的 TALEN 左臂和右臂序列如下：

TALEN-T1 左臂：GCTCGCCAGCATGTCCT（SEQ ID NO.1）；

TALEN-T1 右臂：GGGGAAGTCGGAATCCT（SEQ ID NO.2）；

TALEN-T2 左臂：CCACAACCTGCCCTAC（SEQ ID NO.3）；

TALEN-T2 右臂：GCTCACGTCGCCTCTG（SEQ ID NO.4）；

TALEN-T3 左臂：CCTAGCCAAGACTGAGG（SEQ ID NO.5）；

TALEN-T3 右臂：CCAGGATCTGGTCGCC（SEQ ID NO.6）。

4、根据权利要求 1 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤（1）中，通过以下方法将 TALEN 靶向修饰基因载体质粒线性化并进行体外转录，得到 TALEN mRNA：

a）线性化：先通过酶切上述得到的 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，使其线性化，再使用 QIAquick PCR Purification Kit 回收、纯化线性化的 TALEN 靶向修饰基因载体质粒，得线性化产物；

b）体外转录：取上述线性化产物，以 mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription Kit 进行体外转录，得到 TALEN mRNA。

5、根据权利要求 1 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤（2）中，所述猴受精卵通过以下方法得到：

通过向母猴连续注射重组人促卵泡激素和重组人促性腺激素，超数排卵获得卵母细胞，利用电刺激采精法获得食蟹猴精子，通过胞质内精子注射，进行人工授精，即得猴受精卵。

6、根据权利要求 1 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤（2）中，向所述猴受精卵注射 10-50pl TALEN mRNA 左右臂混合液，所述混合液中左臂序列浓度为 10-50ng/μl，右臂序列浓度为 10-50ng/μl。

7、根据权利要求 1 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤（3）中，将上述经显微注射的受精卵置于培养箱中，继续培养至囊胚或移植入代孕母猴体内。

8、根据权利要求 1 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法，其特征在于，所述步骤（4）中，所述验证包括：

a）基因型鉴定：提取食蟹猴胚胎基因组 DNA，以下述引物组进行 PCR 扩增目的基因序列，随后进行测序鉴定；

上游引物 Fah T3F：GGGAACACAGATTCTTTTCCGTT（SEQ ID NO.7）；

下游引物 Fah T3R：TTGTCTGTCTCAAAACAACCCCAA（SEQ ID NO.8）；

b）蛋白表达检测：通过细胞 Western blot 及组织免疫化学检测蛋白表达；

c）血液学检测：通过分离血清检测肝功能及全血检测凝血功能及氨基酸浓度；

d）组织病理学检测：通过穿刺取得肝脏样品，进行组织固定及切片处理，获得电镜、组织切片 HE 染色检测结果。

9、权利要求 1-8 任一项所述的酪氨酸血症 I 型猴模型的建立方法得到的酪氨酸血症 I 型猴模型。

10、权利要求 9 所述的酪氨酸血症 I 型猴模型在用于酪氨酸血症 I 型疾病的研究和药物的筛选及有效性、安全性评价研究中的应用。

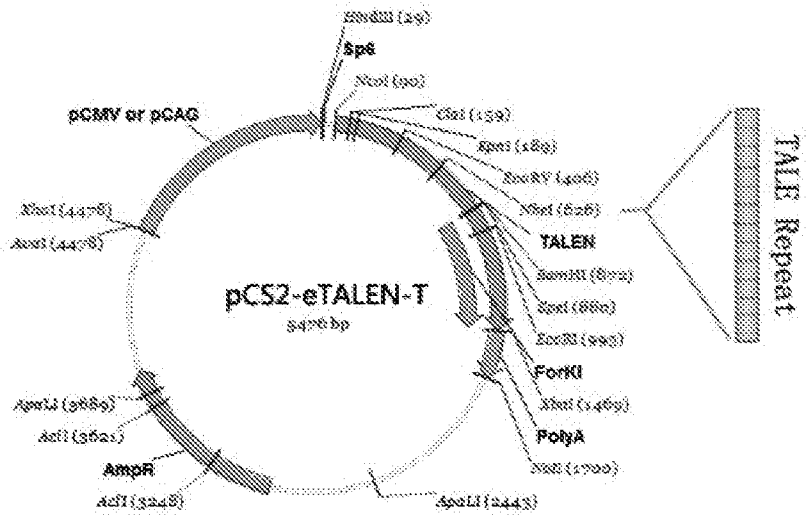

Sp6
pCMV or pCAG
TALEN
pCS2-eTALEN-T
9476 bp
FonKI
PolyA
AmpR
TALE Repeat

图 1

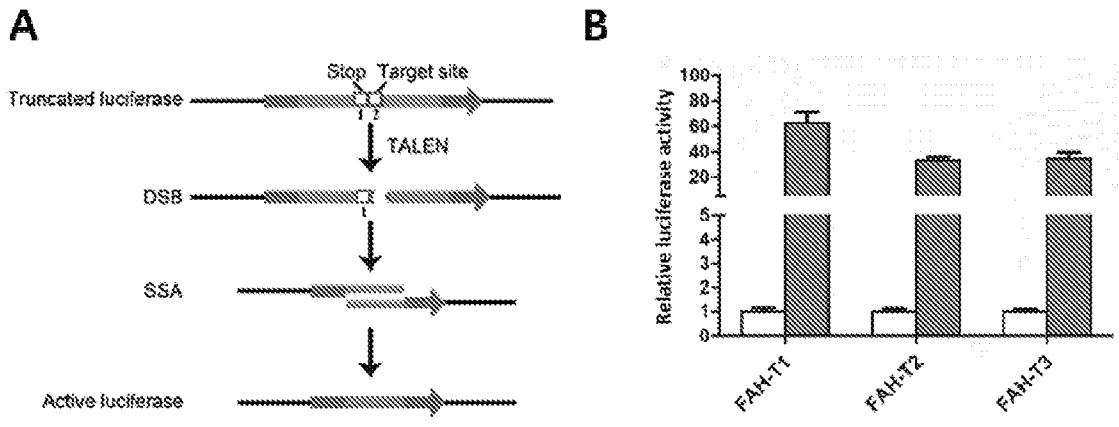

A
Truncated luciferase
Stop
Target site
TALEN
DSB
SSA
Active luciferase
B
Relative luciferase activity
100
80
60
40
20
5
4
3
2
1
0
FAH-T1
FAH-T2
FAH-T3

图 2

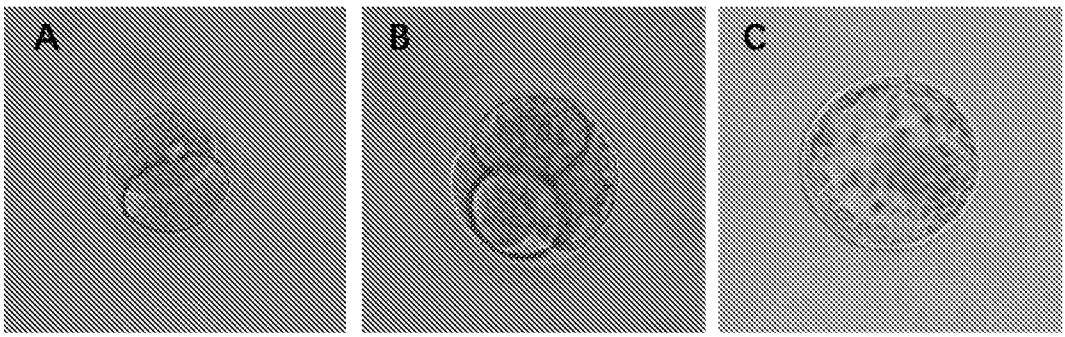
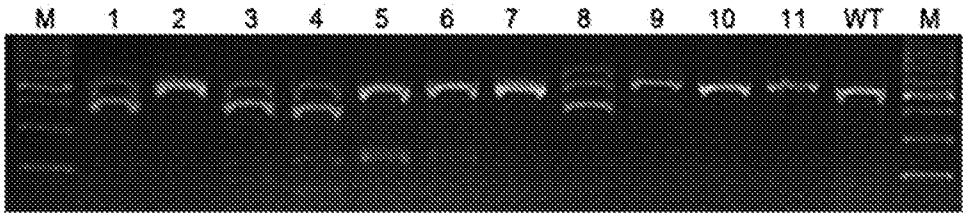

A
B
C

图 3

A



B

```
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT

1#
TCCTAGCCAAGACTGAGGA----------CCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ19bp)   1/5
TCCTAGCCAAGACTGAGGA----------T------A------      (Δ53bp)   1/5
TCCTAGCCAAGACTGAGGA----------C-A--TCCTGC---T---   (Δ102bp)  3/5

2#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT        5/5

3#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT        3/5
TCCTAGCCAAGACTGAGGAT---CG---CC-------------------------   (Δ79bp)   2/5

4#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATA------GGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ5bp)    2/5
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGC---GCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ3bp)    2/5
TCCTAGCCAAGACTG-------------------------------------------   (Δ70bp)   1/5

5#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAG---TcGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ3bp,G<C) 3/5
TCCTAGCCAAGACTGA----TC-----TGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ7bp)    2/5

6#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGC------CATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ5bp)    3/5
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGC----------GACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ12bp)   2/5

7#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT        5/5

8#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT        2/5
TCCTAGCCAAG-----CCCA----------GCCAGGGAC----------------   (Δ56bp)   1/5
TCCTAGCCAAGACTG-------------------------------------------   (Δ84bp)   2/5

9#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT        3/5
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTTGaCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (G<A)     1/5
TCCTAGCCAAGA-------------------------------------------   (-70bp)   2/5

10#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGC-----CaATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   (Δ4bp,C>A)5/5

11#
TCCTAGCCAAGACTGAGGATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAG   WT        5/5
```

图 4

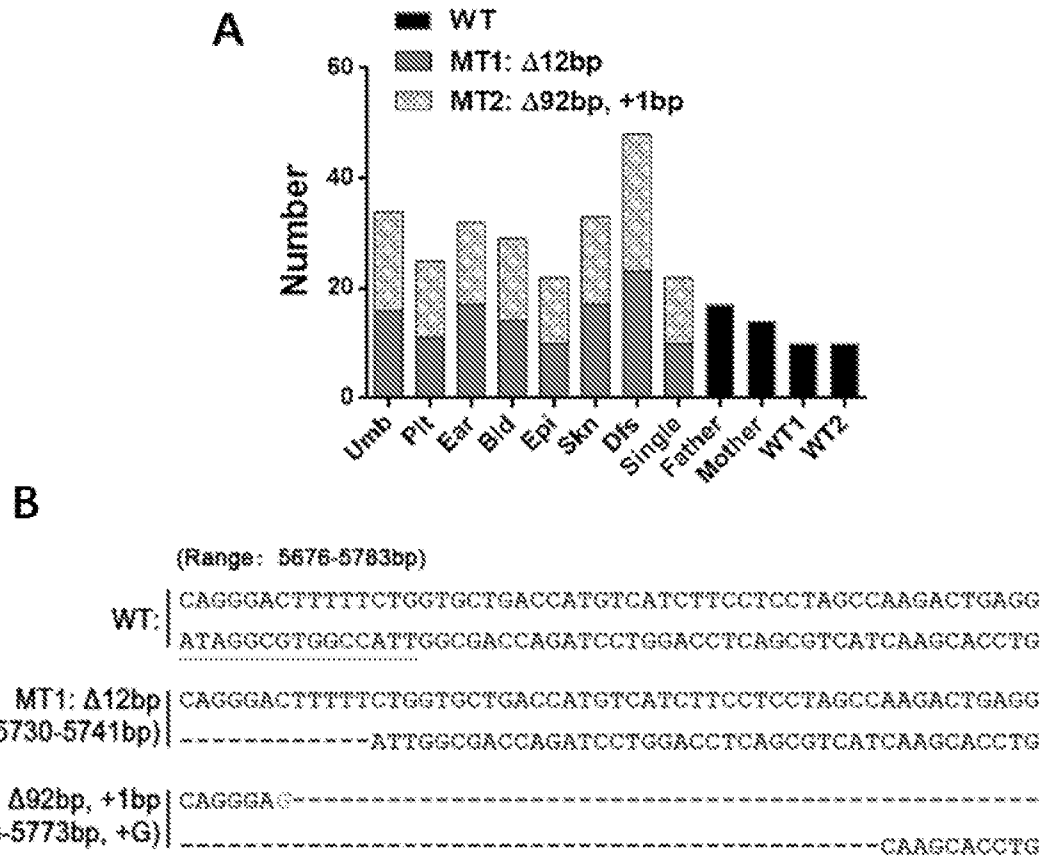

A
WT
MT1: Δ12bp
MT2: Δ92bp, +1bp
Number
60
40
20
0
Umb
Plt
Ear
Bld
Epi
Skn
Dfs
Single
Father
Mother
WT1
WT2
B
(Range: 5676-5783bp)
WT:
CAGGGACTTTTTCTGGTGCTGACCATGTCATCTTCCTCCTAGCCAAGACTGAGG
ATAGGCGTGGCCATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAGCGTCATCAAGCACCTG
MT1: Δ12bp
(del 5730-5741bp)
CAGGGACTTTTTCTGGTGCTGACCATGTCATCTTCCTCCTAGCCAAGACTGAGG
----------ATTGGCGACCAGATCCTGGACCTCAGCGTCATCAAGCACCTG
MT2: Δ92bp, +1bp
(del 5683-5773bp, +G)
CAGGGAG----------
----------CAAGCACCTG

图 5

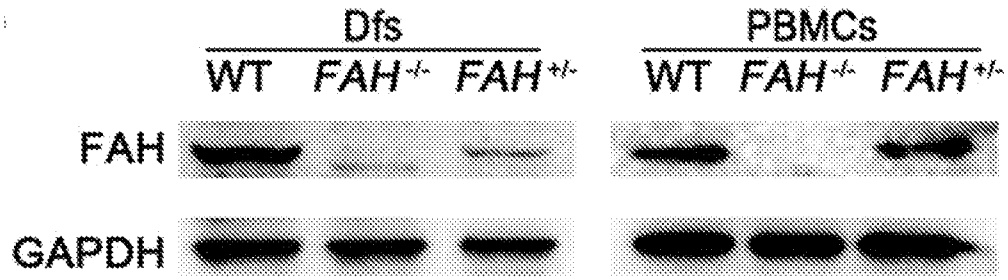

Dfs
PBMCs
WT
FAH-/-
FAH+/-
WT
FAH-/-
FAH+/-
FAH
GAPDH

图 6

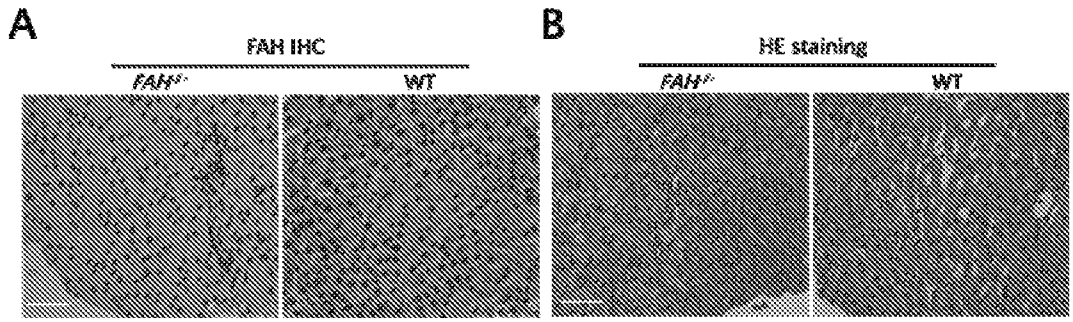


图 7

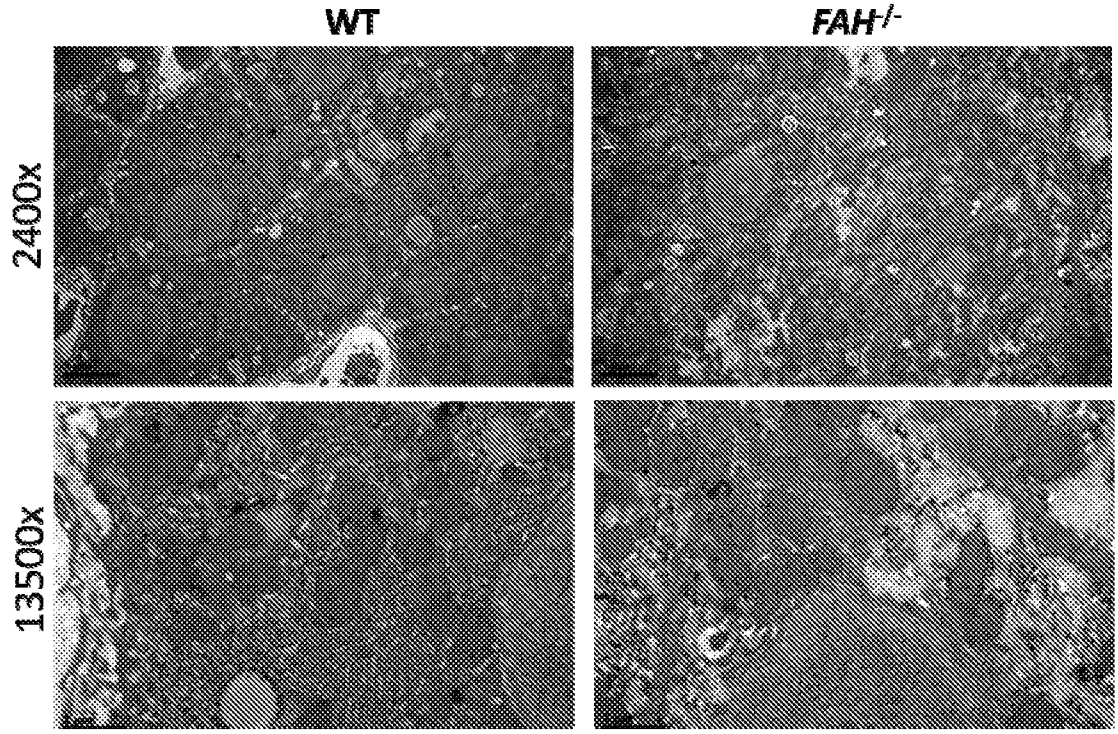


图 8

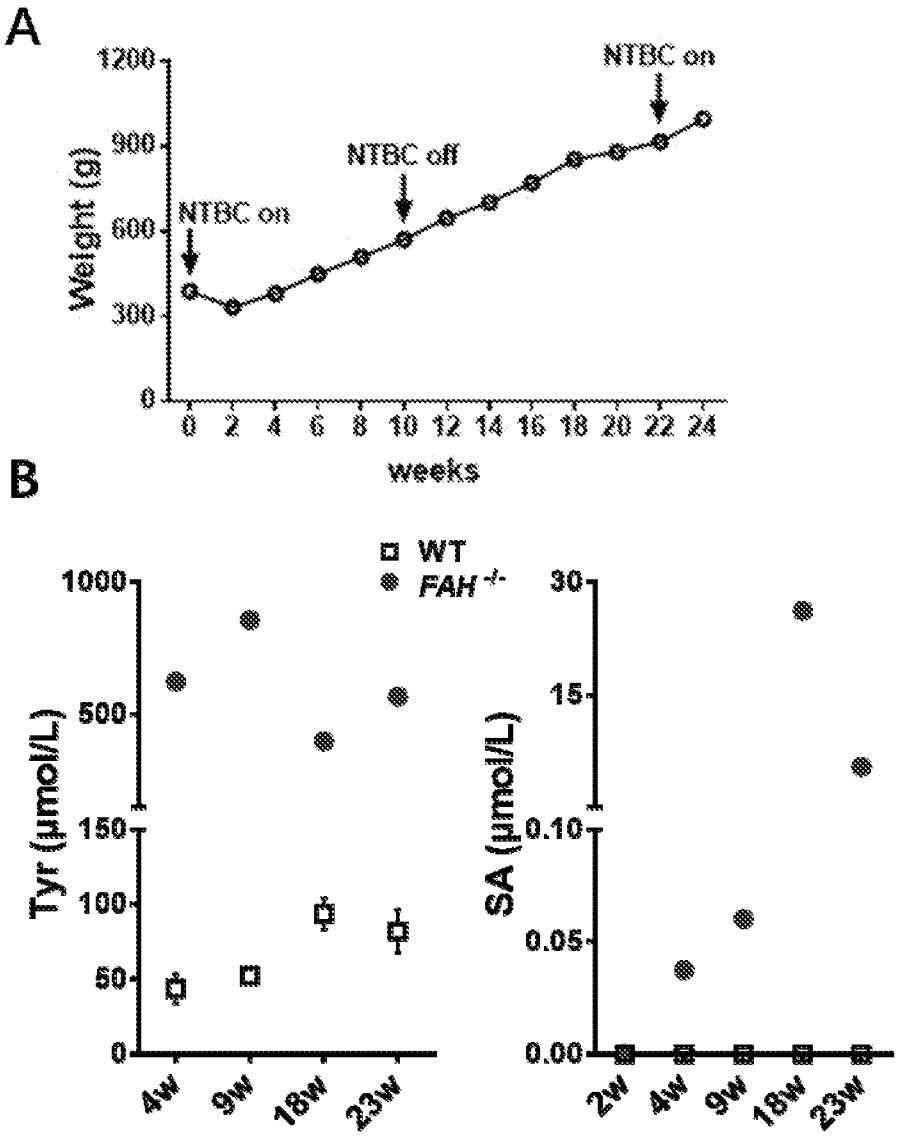

A
1200
900
600
300
0
Weight (g)
NTBC on
NTBC off
NTBC on
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
weeks
B
WT
FAH -/-
1000
500
150
100
50
0
Tyr (μmol/L)
4w 9w 18w 23w
30
15
0.10
0.05
0.00
SA (μmol/L)
2w 4w 9w 18w 23w

图 9

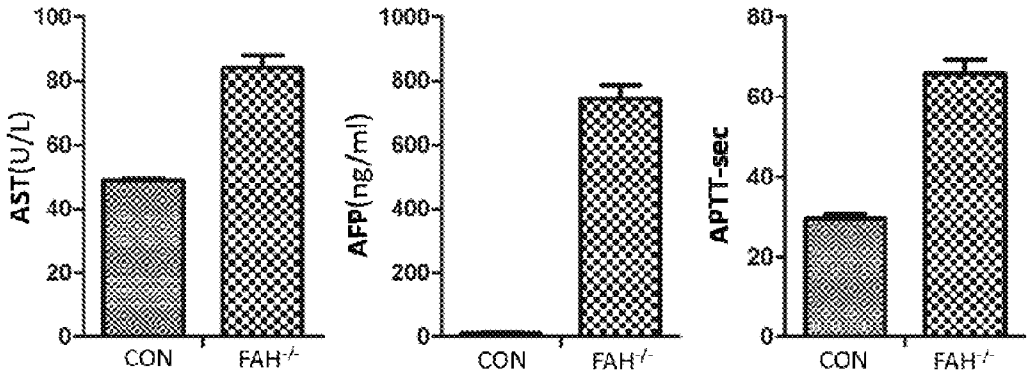

100
80
60
40
20
0
AST(U/L)
CON
FAH-/-
1000
800
600
400
200
0
AFP(ng/ml)
CON
FAH-/-
80
60
40
20
0
APTT-sec
CON
FAH-/-

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/089238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A01K; A61K

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

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

CNABS; HKABS; TWABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方数据库; ISI WEB OF SCIENCE; PUBMED: 1型酪氨酸血症, 酪氨酸血症, 猴, 模型, hereditary tyrosinemia type 1 , hereditary tyrosinemia, tyrosinemia type 1, tyrosinemia, monkey, model, monkey; 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL: Sequence search based on SEQ ID NOs: 1-8.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110257433 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 20 September 2019 (2019-09-20) see claims 1-10	1-10
A	CN 108524485 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 14 September 2018 (2018-09-14) see entire document	1-10
Y	Miles, C.W. et al. "The rhesus monkey as an experimental model of severe neonatal tyrosinemia" *Pediatric Research,* Vol. 13, No. 4,, 31 December 1979 (1979-12-31), ISSN: 0031-3998, Page 479, see title	1-10
Y	崔益强 (CUI, Yiqiang). "利用CRISPR/Cas9系统构建基因编辑猴及CRISPR/Cas9系统应用优化" *中国博士论文全文数据库 医药卫生科技辑 (Chinese Doctoral Thesis Full-text Database Medicine and Health Technology),* No. 8, 15 August 2017 (2017-08-15), ISSN: 1674-022X, page E059-1, see abstract	1-10

☑ 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
31 July 2020	**14 August 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/089238

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	顾鹏等 (GU, Peng et al.). "I型遗传性酪氨酸血症动物模型研究进展 (Research progress of animal models of hereditary tyrosinemia type 1)" *中国比较医学杂志 (Chinese Journal of Comparative Medicine),* Vol. 28, No. 12, 31 December 2018 (2018-12-31), ISSN: 1671-7856, pp. 119-123, see entire document	1-10
A	Faysal Elgilani et al. "Chronic Phenotype Characterization of a Large-Animal Model of Hereditary Tyrosinemia Type 1" *The American Journal of Pathology,* Vol. vol. 187, No. 1,, 31 January 2017 (2017-01-31), ISSN: 0002-9440, pp. 33-41, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/089238

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/CN2020/089238

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 110257433 A	20 September 2019	None	
CN 108524485 A	14 September 2018	WO 2019161707 A1	29 August 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/089238

A. 主题的分类

C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i; A61K 49/00(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; A01K; A61K

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;HKABS;TWABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;万方数据库;ISI WEB OF SCIENCE;PUBMED：1型酪氨酸血症，酪氨酸血症，猴，模型， hereditary tyrosinemia type 1 , hereditary tyrosinemia, tyrosinemia type 1, tyrosinemia, monkey, model, monkey； 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL:关于SEQ ID NOs：1-8的序列检索。

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
PX	CN 110257433 A (中山大学) 2019年 9月 20日 (2019-09-20) 参见权利要求1-10	1-10
A	CN 108524485 A (中山大学) 2018年 9月 14日 (2018-09-14) 参见全文	1-10
Y	Miles, C.W.等. "The rhesus monkey as an experimental model of severe neonatal tyrosinemia" Pediatric Research, 第13卷，第4期，1979年 12月 31日 (1979-12-31), ISSN：0031-3998, 第479页，参见标题	1-10
Y	崔益强. "利用CRISPR/Cas9系统构建基因编辑猴及CRISPR/Cas9系统应用优化" 中国博士论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第8期，2017年 8月 15日 (2017-08-15), ISSN：1674-022X, 第E059-1页，参见摘要	1-10

☑ 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 7月 31日	2020年 8月 14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 王慧梅 电话号码 62411090

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	顾鹏等. "I型遗传性酪氨酸血症动物模型研究进展" 中国比较医学杂志, 第28卷, 第12期, 2018年 12月 31日 (2018-12-31), ISSN: 1671-7856, 第119-123页, 参见全文	1-10
A	Faysal Elgilani等. "Chronic Phenotype Characterization of a Large-Animal Model of Hereditary Tyrosinemia Type 1" The American Journal of Pathology, 第187卷, 第1期, 2017年 1月 31日 (2017-01-31), ISSN: 0002-9440, 第33-41页, 参见全文	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/089238

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/CN2020/089238

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 110257433 A	2019年 9月 20日	无	
CN 108524485 A	2018年 9月 14日	WO 2019161707 A1	2019年 8月 29日