(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 5 月 7 日 (07.05.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/087641 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/90 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/118888

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 3 日 (03.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
2018112746406 2018年10月30日 (30.10.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 李华钟(LI, Huazhong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 金坚(JIN, Jian); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 周松涛(ZHOU, Songtao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 陈蕴(CHEN, Yun); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 段作营(DUAN, Zuoying); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 龚笑海(GONG, Xiaohai); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号生物工程学院B407, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 无锡华源专利商标事务所(普通合伙) (WUXI HUAYUAN PATENT AND TRADEMARK AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国江苏省无锡市梁溪区清扬路228号地铁大厦1108室(联系人: 聂启新), Jiangsu 214023 (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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

根据细则4.17的声明:
— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))

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:** APPLICATION OF NW_006882077-1 IN CHO CELL GENOME TO STABLE EXPRESSION OF PROTEIN

(54) 发明名称: 一种CHO细胞基因组内NW_006882077-1稳定表达蛋白质的应用

(57) **Abstract:** An application of NW_006882077-1 in a CHO cell genome to stable expression of protein. A site for stably expressing protein in the CHO cell genome is at a base 691045 of a CHO cell gene NW_006882077.1; 5'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG3' identifiable by the CRISPR/Cas9 technology within the range of 690980-691090 near the site is a target sequence. Different protein genes are introduced to a fixed position in the CHO cell genome and are stably expressed.

(57) 摘要: 一种CHO细胞基因组内NW_006882077-1稳定表达蛋白质的应用，所述CHO细胞基因组内用于稳定表达蛋白质的位点位于CHO细胞基因NW_006882077.1的第691045碱基处；所述位点附近690980-691090范围内可被CRISPR/Cas9技术识别的5'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG3'为靶序列。在CHO细胞基因组内的固定位置，导入不同蛋白质基因，并进行稳定表达。

WO 2020/087641 A1

一种 CHO 细胞基因组内 NW_006882077-1 稳定表达蛋白质的应用

技术领域

本发明涉及基因技术领域，尤其是涉及一种用于稳定表达蛋白质的 CHO 细胞重组基因。

背景技术

中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary cell, CHO)作为生物制药领域的主力细胞系，已经被开发出许多不同种类的 CHO 细胞系，包括可以用来扩大基因拷贝数的细胞系。然而，转基因拷贝数的增多与目的蛋白质产率提高并不是明确的正相关关系。且即使蛋白质表达增多，多数 CHO 细胞的表达水平不稳定。当前普遍使用的构建稳定转染细胞的方法耗时耗力，主要是因为需要重复大量的单克隆筛选过程，所以当前在细胞系构建领域普遍期待可以开发出一种能在短时间内，获得高表达及稳定表达的细胞的方法，并且能够确保构建出来的重组细胞系与传统方法相比，有相同的质量水平，以确保监管机构的批准。

传统构建外源蛋白质表达细胞系的方法是通过外源基因随机整合到细胞基因组上，再经过系列的高表达单克隆细胞筛选，获得外源蛋白质高表达细胞系。由于位点效应差异的多样性，随机整合产生的重组细胞表达水平各异，因此需要后期花费很长的时间和很多的步骤，用于挑选高表达单克隆细胞。通过随机整合获得的单克隆细胞无法保证多肽/蛋白质在细胞传代中稳定表达，每进行一次重组细胞构建均需要反复进行单克隆筛选，增加了生物制药的研发成本。

位点效应妨碍着传统随机整合构建重组细胞系的效率，反复的高表达单克隆筛选费时费力，且成本昂贵。如何克服位点效应，利用定点整合技术，快速高效地获得稳定表达单克隆细胞已经在学术界被讨论了多年，一直未有突破性进展。

发明内容

针对现有技术存在的上述问题，本发明申请人提供了一种 CHO 细胞基因组内 NW_006882077-1 稳定表达蛋白质的应用。本发明申请在 CHO 细胞基因组

内的固定位置，导入不同蛋白质基因，并进行稳定表达；此外在实现该定点整合的过程中，无需多次挑选单克隆以获得更高的表达细胞株，节省了大量的时间。

本发明的技术方案如下：

一种 CHO 细胞基因组内某位点稳定表达蛋白质的应用，所述 CHO 基因组内用于稳定表达蛋白质的位点位于 CHO 细胞基因 NW_006882077.1 的第 691045 碱基处；

所述位点附近 690980-691090 范围内可被 CRISPR/Cas9 技术识别的 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG3'为靶序列。

所述蛋白质为分子量小于 160KDa 的蛋白质。

所述蛋白质为红色荧光蛋白、多肽、功能性蛋白质、抗体、融合蛋白质中的一种。

所述靶序列为 CHO 细胞基因 NW_006882077.1 的第 691045 碱基处附近第 691068-691090 碱基处。

进一步所述靶序列为 5’-GATCTAACTTGGCTTGCCTGAGG-3’。

所述靶序列为 5’-TGCAACTCTCAGATCTAACTTGG-3’。

所述靶序列为 5’-GAGAGTTGCAGTAACGAAAGTGG-3’。

所述靶序列为 5’-GAGTTAACTAAAGTGACTGAAGG-3’。

所述靶序列为 5’-TCAAGAACAGATGCTGAAGAAGG-3’。

所述靶序列为 5’-GCTGAAGAAGGTAATAGCATTGG-3’。

一种含有所述用于表达蛋白质的重组供体载体。

所述的重组供体载体为 CHO 细胞表达的载体。

所述的重组供体载体的制作方法为：将蛋白基因插入到质粒 5’arm 和 3’arm 中间的区域，使该核苷酸序列位于启动子的下游并受其调控，得到重组 CHO 细胞表达质粒。

所述启动子为：CMV（人类巨细胞病毒来源的强哺乳动物表达启动子）、EF-1a（人延长因子 1α 来源的强哺乳动物表达启动子）、SV40（猿猴空泡病毒 40 来源的哺乳动物表达启动子 ）、PGK1（磷酸甘油酸酯激酶基因来源的哺乳动物启动子）、UBC（人类泛素 C 基因来源的哺乳动物启动子 ）、human beta actin（β-肌动蛋白基因来源的哺乳动物启动子）、CAG（强杂交哺乳动物启动子 ）中的一种。

一种用于表达蛋白质的 CHO 重组细胞系。

一种 CHO 细胞基因表达蛋白质的方法，其特征在于，包括以下步骤：

（1）用所述的重组供体载体转化 CHO 细胞，得重组 CHO 细胞；

（2）重组 CHO 细胞在平板上培养，收集上清检测表达水平，以及对贴壁重组 CHO 细胞进行悬浮驯化；

（3）悬浮驯化的重组 CHO 细胞在小摇瓶内进行培养，并检测蛋白质的表达水平。

本发明申请还提供一种 CHO 细胞基因组中稳定表达位点的选择：

1)构建带荧光标签的慢病毒，并推算其滴度。将 igk-luc 基因整合到 pLVX-CMV-MCS-T2A-Zsgreen 载体的多克隆位点后，再同时利用 pSPAX2、pMD2G 两个质粒进行三质粒转染至 HEK-293T 细胞，于 48 小时及 72 小时两次取细胞上清液，收集后超速离心上清液获取慢病毒。

2)将 CHO 细胞铺在 6 孔板上培养过夜，第二天将慢病毒稀释并以较低的 MOI（MOI<1）（每个细胞对应病毒颗粒）来感染 CHO 细胞。感染 96 小时后，通过流式细胞分选仪分选，将荧光强度最亮的部分细胞直接接种到 96 孔板内。一周后等细胞长成单克隆集落时，荧光显微镜下观察细胞，选择形态和生长正常，且最亮的集落细胞，转移到 24 孔板内扩大培养。培养细胞达汇合度近 90%时再转移到 6 孔板内培养，最后再扩大至 10cm 的培养皿中培养，冻存一部分细胞，剩余细胞继续扩大培养。

3) 利用染色体步移技术 Lenti-X Integration Site Analysis Kit (Clontech: 631263) 寻找到慢病毒所有的 CHO 细胞基因整合位点。

以荧光强度最亮、细胞形态和生长速度正常的若干个细胞系为材料，采用 ADraI, SspI, HpaI 三个限制性内切酶对基因组 DNA 进行过夜酶切。其中基因组 DNA 有 2.5 μg，限制性内切酶有 80U，配成 100 μL 反应体系。置于 37℃下过夜酶切（16-18 小时）。

利用 DNA 回收试剂盒将酶切产物纯化回收。将酶切后的基因组 DNA4.8 μL，加上 1.9 μL 染色体步移接头 GenomeWalker Adaptor (25 μM)和 0.5 μL T4 连接酶，配成 8 μL 体系进行连接实验。置于 16℃环境下，进行过夜连接。将连接体系 70℃下加热 5 分钟，使连接酶失活。各个体系内加入 32μL TE buffer 配置成相应的文库。

对文库进行 2 轮巢式 PCR，将 LTR 区域同临近的基因组区域扩增出来。相

关的 PCR 反应操作步骤可以参照 Lenti-X Integration Site Analysis Kit (Clontech: 631263)试剂盒说明书进行。

最后将 PCR 产物进行电泳，将主要条带切胶回收后送测序。在获得每个细胞系所有慢病毒整合信息后，选择只有单拷贝慢病毒整合的 CHO 细胞系的相关信息，并将其序列信息在 BLAST 上同 CHO-K1 基因组信息加以比对，找出高表达的整合位点。

本发明有益的技术效果在于：

本发明采用定点整合方法，通过把目的基因定点整合到稳定表达区域，能很好的克服随机整合带来的整合位点不确定性的问题，有效的规避了反复多轮的高表达单克隆筛选，能有效的减少生物制药构建稳定表达细胞系的研发时间，降低成本。

本发明在 CHO 细胞基因的定点位置，导入蛋白质基因，并进行稳定表达。

附图说明

图 1 为本发明示意图。

具体实施方式

下面结合附图和实施例，对本发明进行具体描述。

图 1 为用于整合到该位点的供体质粒示意图和如何通过同源重组定点整合到该位点的模拟示意图。其中 GOI 为我们的目的基因，其通过 5'arm 和 3'arm 两个同源重组臂，在 4μg/mL 的 puromycin 筛选压力下，定点整合到靶点位置。此外 5'arm 上游的序列为负筛选标签，可以用来去除掉随机整合的单克隆细胞，确保最终获得的为定点整合的重组 CHO 细胞系。

实施例 1

高表达位点的选择；

NW_006882077.1，691045 碱基处整合，Zsgreen1 基因被整合在了该处。对于这个荧光细胞，进行了不少于 50 代的传代培养，通过流式细胞仪检测其荧光的表达水平。第 50 代荧光细胞仍有较好的绿色荧光蛋白表达水平，荧光信号在细胞的传代过程中能稳定的保留。

此外对于这个荧光细胞还进行了悬浮驯化，并对其悬浮驯化后的荧光蛋白表达水平利用流式细胞仪再次进行了检测。检测结果显示，悬浮达到 50 代的

重组 CHO 细胞中，超过 95%以上的细胞在悬浮后依然保持了绿色荧光蛋白的表达，可以认为该位点是极其稳定，不会因细胞传代丢失定点整合的荧光蛋白基因。

实施例 2

具体靶点的选择；

根据就近原则，将序列:

5’CCAATGCTATTACCTTCTTCAGCATCTGTTCTTGAAGACCTTCAGTCACTTTAGTTAACTCTTCCACTTTCGTTACTGCAACTCTCAGATC-TAACTTGGCTTG 3’

输入 CRISRPRater 系统中，预测并挑选出脱靶效率较低的靶序列。其中参数设置如下所示：1）NGG 后开头 15bp 的最大错配碱基数为 0；2）NGG 后全部 21bp 的错配碱基数为 2。

根据如上操作后，根据其评分选择分数为 0.87 的如下序列作为靶序列：

5’-GATCTAACTTGGCTTGCCTGAGG-3’；

根据 CRISPRater 系统，LOW efficacy (score<0.56); MEDIUM efficacy (0.56<=score<=0.74); HIGH efficacy (score>0.74)。

根据 CRISPRater 评定系统，位点 NW_006880285.1 附近 690980-691090 范围内所有靶序列均获得了 0.56 以上的分数，均处于中等有效或高效范围，可作为 CRISPR/Cas9 技术识别的 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG3'靶序列。

实施例 3 启动子的选择

将不同的启动子替换上述 CMV（人类巨细胞病毒来源的强哺乳动物表达启动子）启动子位置处，包含了 EF-1a（人延长因子 1α 来源的强哺乳动物表达启动子）、SV40（猿猴空泡病毒 40 来源的哺乳动物表达启动子 ）、PGK1（磷酸甘油酸酯激酶基因来源的哺乳动物启动子）、UBC（人类泛素 C 基因来源的哺乳动物启动子 ）、human beta actin（β-肌动蛋白基因来源的哺乳动物启动子）或 CAG（强杂交哺乳动物启动子 ）等常见启动子。经检测，以上启动子均能调控下游的红色荧光蛋白基因序列，并表达出相应红色荧光蛋白。

实施例 4

将红色荧光蛋白基因(DsRed，26KDa)定点整合在特定位点：为了后期进行构建 CRISPR/Cas9 介导的同源重组，需要构建 sgRNA 和 Donor Plasmid，方法如下：

1、SgRNA 的构建，首先合成如下序列

sgRNA-1fwd 5’ TTTGGATCTAACTTGGCTTGCCTGGT 3’

sgRNA-1rev 5’ TAAAACCAGGCAAGCCAAGTTAGATC 3’

1）将 PSK-u6-gRNA 质粒进行 BBsI 酶切，将切后的载体回收；

2）合成的片段退火成带有粘性末端的双链

sgRNA-1fwd（100μM） 4μL

sgRNA-1rev（100μM） 4μL

10×NEB buffer2 2μL

H_2O 10μL

20μL

水浴 95℃ 5min，水浴锅中自然降至室温；

3）片段连接，重组质粒的构建

回收的线性化载体 50ng

退火片段 1μL

10×T4 ligase buffer 1μL

T4 ligase 1μL

H_2O

至 10μL；

室温连接 1h 以上，
或者 4℃连接过夜

4）连接，转化；

5）挑取克隆，PCR 鉴定，使用的鉴定引物为：

M13- 合成的 R 的引物，可以扩增出条带的为阳性克隆。

2、Donorplasmid 构建

donor plsmid 具体信息如图 1 所示：除 GOI 之外，其余部分均为合成；靶点上下游 600bp 序列为 donor plasmid 的左右同源臂序列信息，GOI 为 HSA 基因

通过已有的诺维赞公司 C115 试剂盒完成 HSA 整合到 donor plasmid 上这个过程。

3、将 Cas9（丹麦科技大学 Dr. Helene F Kildegaard 捐赠）、SgRNA 及 Donor plasmid 3 个质粒共同转染 37℃、5% CO_2 条件下培养的 CHO 细胞，三种质粒摩尔比为 1:1:1，转染试剂为 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)，具体转染方法参考说明书，之后细胞添加 4 μg/mL puromycin 进行筛选，过程共计 10 天；再用 MoFloXDP FACS machine (Beckman Coulter）进行单克隆细胞分选，选择含红色荧光不含绿色荧光的细胞，接种到 96 孔板内。

4、细胞生长 2 周后，取一部分进行鉴定，通过做 PCR 鉴定，做 5'junction PCR，3'Junction PCR 及 out-out PCR 进行鉴定。将阳性细胞保留。

实施例 5

将胰高血糖素样肽-1-人血清白蛋白融合蛋白基因(NGGH，75KDa)定点整合在特定位点：为了后期进行构建 CRISPR/Cas9 介导的同源重组，需要构建 sgRNA 和 Donor Plasmid，方法如下：

1、构建 sgRNA 同实施例 4。

2、Donor plasmid 构建。

donor plsmid 具体信息如图 1 所示：除 GOI 之外，其余部分均为合成；靶点上下游 600bp 序列为 donor plasmid 的左右同源臂序列信息，GOI 为 NGGH 基因通过已有的诺维赞公司 C115 试剂盒完成 NGGH 整合到 donor plasmid 上这个过程。

3、将 Cas9、 SgRNA 及 Donor plasmid 3 个质粒共同转染 37℃、5%、CO_2 条件下培养的 CHO 细胞，三种质粒摩尔比为 1:1:1，转染试剂为 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)，具体转染方法参考说明书。之后细胞添加 4 μg/mL puromycin 进行筛选，过程共计 10 天。再用 MoFloXDP FACS machine (Beckman Coulter）进行单克隆细胞分选，选择不含任何荧光的细胞，接种到 96 孔板内。

4、细胞生长 2 周后，取一部分进行鉴定。通过做 PCR 鉴定，做 5'junction PCR，3'Junction PCR 及 out-out PCR 进行鉴定。将阳性细胞保留。

实施例 6

将抗体基因(Avastin, 160KDa)定点整合在特定位点：为了后期进行构建CRISPR/Cas9 介导的同源重组，需要构建 sgRNA 和 Donor Plasmid，方法如下：

1、sgRNA 构建同实施例 4。

2、Donor plasmid 构建。

donor plsmid 具体信息如图 1 所示：除 GOI 之外，其余部分均为合成；靶点上下游 600bp 序列为 donor plasmid 的左右同源臂序列信息，GOI 为 Avastin 基因通过已有的诺维赞公司 C115 试剂盒完成抗体基因整合到 donor plasmid 上这个过程。

3、将 Cas9（丹麦科技大学 Dr. Helene F Kildegaard 捐赠）、 SgRNA 及 Donor plasmid 3 个质粒共同转染 37℃、5%、CO_2 条件下培养的 CHO 细胞，三种质粒摩尔比为 1:1:1，转染试剂为 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)，具体转染方法参考说明书。之后细胞添加 4 μg/mL puromycin 进行筛选，过程共计 10 天。再用 MoFloXDP FACS machine (Beckman Coulter）进行单克隆细胞分选，选择不含任何荧光的细胞，接种到 96 孔板内。

4、细胞生长 2 周后，取一部分进行鉴定。通过做 PCR 鉴定，做 5'junction PCR，3'Junction PCR 及 out-out PCR 进行鉴定。将阳性细胞保留。

实施例 7

将人血清白蛋白基因(HSA, 68KDa)定点整合在特定位点：为了后期进行构建 CRISPR/Cas9 介导的同源重组，需要构建 sgRNA 和 Donor Plasmid，方法如下：

1、sgRNA 构建同实施例 4。

2、Donor plasmid 构建。

donor plsmid 具体信息如图 1 所示：除 GOI 之外，其余部分均为合成；靶点上下游 600bp 序列为 donor plasmid 的左右同源臂序列信息，GOI 为 Avastin 基因通过已有的诺维赞公司 C115 试剂盒完成抗体基因整合到 donor plasmid 上这个过程。

3、将 Cas9（丹麦科技大学 Dr. Helene F Kildegaard 捐赠）、 SgRNA 及 Donor plasmid 3 个质粒共同转染 37℃、5%、CO_2 条件下培养的 CHO 细胞，三种质粒摩尔比为 1:1:1，转染试剂为 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientif-

ic)，具体转染方法参考说明书。之后细胞添加 4 μg/mL puromycin 进行筛选，过程共计 10 天。再用 MoFloXDP FACS machine (Beckman Coulter）进行单克隆细胞分选，选择不含任何荧光的细胞，接种到 96 孔板内。

4、细胞生长 2 周后，取一部分进行鉴定。通过做 PCR 鉴定，做 5'junction PCR，3'Junction PCR 及 out-out PCR 进行鉴定。将阳性细胞保留

测试例：

在对实施例 4-7 制得的这四个细胞系进行 ELISA 检测，观察是否有目的蛋白质表达，且是否为稳定的长期表达。

检测的方法：四者的检测均通过 ELISA 方法进行，在 6 孔板内培养挑选到的所有阳性细胞，检验其是否有目的蛋白质的长期稳定表达，使用的试剂盒为 Abclonal 公司的 Human Albumin ELISA Kit (RK00157)和 Human IgG(Total) ELISA Kit(RK00393)进行实验。

对实施例 4 制得的红色荧光蛋白表达细胞系利用流式细胞仪检测，观察到有红色荧光的表达，且在 50 代传代内所有细胞均能稳定地表达红色荧光蛋白。

检测的方法：将传代次数不同的细胞收集后，直接利用流式细胞仪进行检测有红色荧光的表达，并检测到不同传代的重组 CHO 细胞表达红色荧光蛋白的百分比为大于 95%。

在选取了 5'-GATCTAACTTGGCTTGCCTGAGG-3'序列进行如上测试后，取得了良好结果，因此提出权利要求 5-9 所述靶序列皆能成功构建出定点整合稳定表达细胞系，且均能稳定表达出目的蛋白。

权利要求书

1、一种 CHO 细胞基因组内某位点稳定表达蛋白质的应用，其特征在于，所述 CHO 细胞基因组内用于稳定表达蛋白质的位点位于 CHO 细胞基因 NW_006882077.1 的第 691045 碱基处；

所述位点附近 690980-691090 范围内可被 CRISPR/Cas9 技术识别的 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG3'为靶序列。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述蛋白质为分子量小于 160KDa 的蛋白质。

3、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述蛋白质为多肽、功能性蛋白质、抗体、融合蛋白质中的一种。

4、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述靶序列为 CHO 细胞基因 NW_006882077.1 的第 691045 碱基处附近第 691068-691090 碱基处；所述靶序列为 5’-GATCTAACTTGGCTTGCCTGAGG-3’。

5、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述靶序列为 5’-TGCAACTCTCAGATCTAACTTGG-3’。

6、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述靶序列为 5’-GAGAGTTGCAGTAACGAAAGTGG-3’。

7、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述靶序列为 5’-GAGTTAACTAAAGTGACTGAAGG-3’。

8、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述靶序列为 5’-TCAAGAACAGATGCTGAAGAAGG-3’。

9、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述靶序列为 5’-GCTGAAGAAGGTAATAGCATTGG-3’。

10、一种含有所述用于表达蛋白质的重组供体载体。

11、根据权利要求 10 所述的重组供体载体，其特征在于，所述载体为 CHO 细胞表达的载体。

12、根据权利要求 11 所述的重组供体载体，其特征在于，所述载体的制作方法为：将蛋白质基因插入到质粒 5’arm 和 3’arm 中间的区域，使该核苷酸序列位于启动子的下游并受其调控，得到重组 CHO 细胞表达质粒。

13、一种用于稳定表达蛋白质的 CHO 重组细胞系。

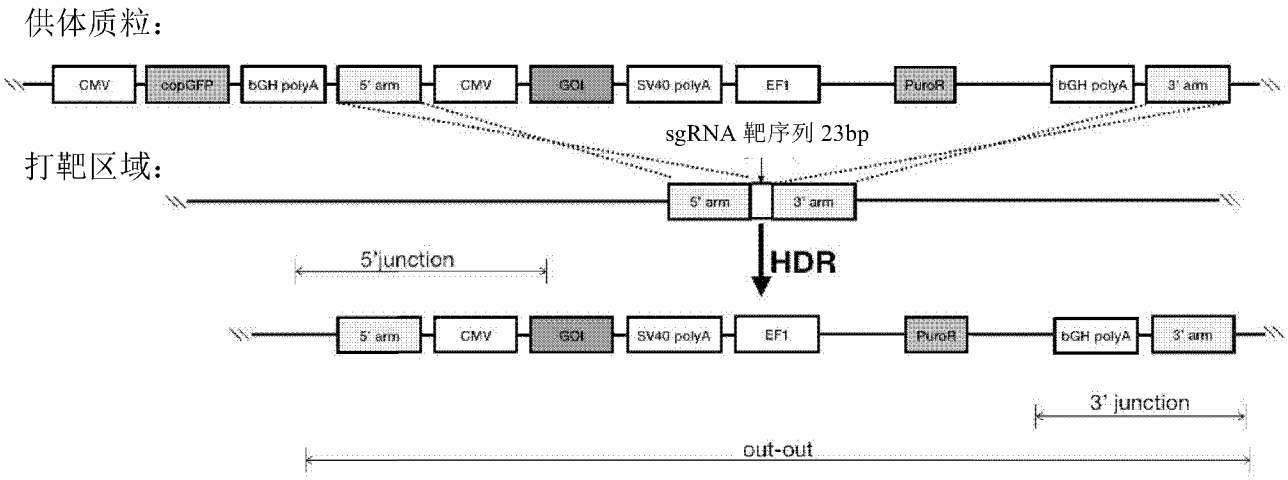

供体质粒：
CMV
copGFP
bGH polyA
5' arm
CMV
GOI
SV40 polyA
EF1
PuroR
bGH polyA
3' arm
sgRNA 靶序列 23bp
打靶区域：
5' arm
3' arm
5'junction
HDR
5' arm
CMV
GOI
SV40 polyA
EF1
PuroR
bGH polyA
3' arm
3' junction
out-out

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/118888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(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

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG DATA, 百度, BAIDU, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 谷歌镜像, GOOGLE MIRROR, 谷歌学术镜像, GOOGLE SCHOLAR MIRROR, GenBank, PubMed, ISI Web of Knowledge: 申请人/发明人, 中国仓鼠卵巢细胞, CHO, Chinese hamster ovary, 外源蛋白, heterorlogous/exogenous protein, 位置/位点效应, position/site effect, 定点, 位点特异, site-specific, 基因编辑, CRISPR, Cas, 稳定性, stability, NW_006882077, SEQ ID Nos 1-6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107557390 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 09 January 2018 (2018-01-09) description, paragraph 0005 and embodiment 1	1-13
X	CN 107723276 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY ET AL.) 23 February 2018 (2018-02-23) claims 1-9, and abstract	10-13
X	WO 2018148196 A1 (SIGMA-ALDRICH CO. LLC) 16 August 2018 (2018-08-16) embodiments 1-2, and claims 1-29	10-13
X	LEE, J.S. et al. "Accelerated Homology-Directed Targeted Integration of Transgenes in Chinese Hamster Ovary Cells Via CRISPR/Cas9 and Fluorescent Enrichment," *Biotechnology and Bioengineering,* Vol. 113, No. (11), 03 June 2016 (2016-06-03), pp. 2518-2523	10-13

☑ 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
09 July 2019	**25 July 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **State Intellectual Property Office of the P. R. China** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	王佳贤等 (WANG, Jiaxian et al.). "Crispr/Cas9技术在CHO细胞中进行基因定点敲入的应用 (Application of Crispr/Cas9 Technology in Targeted Gene Integration in CHO cells)" *中国医药工业杂志 (Chinese Journal of Pharmaceuticals),* Vol. 48, No. (1), 31 December 2017 (2017-12-31), pp. 33-37	10-13
X	ZHAO, M.L. et al. "Rapid Development of Stable Transgene CHO Cell Lines by CRISPR/Cas9-Mediated Site-Specific Integration into C12orf35," *Applied Microbiology and Biotechnology,* Vol. vol. 102, 22 May 2018 (2018-05-22), pp. 6105-6117	10-13
X	LEE, J.S. et al. "Site-Specific Integration in CHO Cells Mediated by CRISPR/Cas9 and Homology-Directed DNA Repair Pathway," *Scientific Reports,* Vol. no. 5, 25 February 2015 (2015-02-25), pp. 1-11	10-13
A	HACKER, D.L. et al. "Recombinant Protein Production from Stable Mammalian Cell Lines and Pools" *Current Opinion in Structural Biology,* Vol. no. 38, 17 June 2016 (2016-06-17), pp. 129-136	1-13
A	周宏等 (ZHOU, Hong et al.),. "生物技术通讯 (Letters in Biotechnology)," *克服位置效应提高外源基因在CHO细胞中稳定高效表达的策略 (Strategies to Improve the Stability of Protein Production from High Level Expression Recombinant CHO Cells),* Vol. 17, No. (6), 30 November 2006 (2006-11-30), pp. 945-949	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/118888

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 107557390 A	09 January 2018	WO 2019052274 A1	21 March 2019
CN 107723276 A	23 February 2018	None	
WO 2018148196 A1	16 August 2018	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/118888

A. 主题的分类

C12N 15/90(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(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

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, 万方数据资源系统, 百度, 百度学术, 谷歌镜像, 谷歌学术镜像, GenBank, PubMed, ISI Web of Knowledge: 申请人/发明人, 中国仓鼠卵巢细胞, CHO, Chinese hamster ovary, 外源蛋白, heterorlogous/exogenous protein, 位置/位点效应, position/site effect, 定点, 位点特异, site-specific, 基因编辑, CRISPR, Cas, 稳定性, stability, NW_006882077, SEQ ID Nos 1-6

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 107557390 A (江南大学) 2018年 1月 9日 (2018-01-09) 说明书第0005段、实施例1	1-13
X	CN 107723276 A (上海交通大学等) 2018年 2月 23日 (2018-02-23) 权利要求1-9，摘要	10-13
X	WO 2018148196 A1 (SIGMA-ALDRICH CO. LLC) 2018年 8月 16日 (2018-08-16) 实施例1-2，权利要求1-29	10-13
X	LEE, J.S.等, . "Accelerated Homology-Directed Targeted Integration of Transgenes in Chinese Hamster Ovary Cells Via CRISPR/Cas9 and Fluorescent Enrichment, " BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, , 第113卷，第11期，2016年 6月 3日 (2016-06-03)， 第2518-2523页	10-13
X	王佳贤等. "Crispr/Cas9技术在CHO细胞中进行基因定点敲入的应用，" 中国医药工业杂志, , 第48卷，第1期，2017年 12月 31日 (2017-12-31)， 第33-37页	10-13

☑ 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
2019年 7月 9日	2019年 7月 25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 杨佳倩 电话号码 86-(10)-53961939

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/118888

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	ZHAO, M.L.等, . "Rapid development of stable transgene CHO cell lines by CRISPR/Cas9-mediated site-specific integration into C12orf35, " Applied Microbiology and Biotechnology, , 第102卷, 2018年 5月 22日 (2018-05-22), 第6105-6117页	10-13
X	LEE, J.S.等. "Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway, " SCIENTIFIC REPORTS, , 第5卷, 2015年 2月 25日 (2015-02-25), 第1-11页	10-13
A	HACKER, D.L.等. "Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools" Current Opinion in Structural Biology, , 第38卷, 2016年 6月 17日 (2016-06-17), 第129-136页	1-13
A	周宏等, . "生物技术通讯, " 克服位置效应提高外源基因在CHO细胞中稳定高效表达的策略, , 第17卷, 第6期, 2006年 11月 30日 (2006-11-30), 第945-949页	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/118888

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 107557390 A	2018年 1月 9日	WO 2019052274 A1	2019年 3月 21日
CN 107723276 A	2018年 2月 23日	无	
WO 2018148196 A1	2018年 8月 16日	无	