(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 2 月 27 日 (27.02.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/037882 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/864 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/119844

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 7 日 (07.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810955908.6 2018年8月21日 (21.08.2018) CN

(71) 申请人: 杭州观梓健康科技有限公司(HANGZHOU GRAND BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市余杭区余杭塘路2636号2幢401室, Zhejiang 311100 (CN)。

(72) 发明人: 李程 (LI, Cheng); 中国浙江省杭州市余杭区余杭塘路2636号2幢401室, Zhejiang 311100 (CN)。 丁秋蓉 (DING, Qiurong); 中国浙江省杭州市余杭区余杭塘路2636号2幢401室, Zhejiang 311100 (CN)。

(74) 代理人: 北京英创嘉友知识产权代理事务所（普通合伙）(INNOTRACK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 中国北京市朝阳区德胜门外北沙滩1号院31号楼A1108室, Beijing 100083 (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)。

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:** STEM CELL CAPABLE OF SIMULTANEOUSLY LOWERING EFFECT OF TRIGLYCERIDE AND CHOLESTEROL AS WELL AS PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞及其制备方法和用途

(57) **Abstract:** Provided is a method for preparing a stem cell capable of simultaneously lowering the effects of triglyceride and cholesterol. The method is characterized by comprising the following steps: S1. packaging a knock-out vector into an AAV virus, so as to form an AAV virus particle to be transfected, wherein the sequence of the knock-out vector is represented by SEQ ID NO.3; S2. carrying out transfection on suspension liquid of the stem cell and suspension liquid of the AAV virus particle to be transfected, so as to obtain a transfected culture; S3. carrying out monoclonal culture on the transfected culture following a limiting dilution assay, and screening out a monoclonal cell strain in which a PCSK9 gene and an APOC3 gene are knocked out. Further provided are the stem cell prepared by the preparation method and the use thereof in the preparation of drugs for treating cardiovascular diseases. According to the technical solution, provided is a new scheme for preventing and treating cardiovascular diseases, which effectively decreases the morbidity of cardiovascular diseases.

(57) 摘要: 本公开提供了一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞的制备方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：S1、将敲除载体包装到AAV病毒中，形成待转染AAV病毒颗粒；所述敲除载体的序列如SEQ ID NO.3所示；S2、将干细胞的悬液与所述待转染的AAV病毒颗粒的悬液以进行转染，得到转染后的培养物；S3、将所述转染后的培养物极限稀释后进行单克隆化培养，并筛选出敲除了PCSK9基因和APOC3基因的单克隆细胞株。本公开还提供了如上所述的制备方法制备得到的干细胞及其在制备用于治疗心血管疾病的药物中的用途。通过上述技术方案，本公开提供了一种新的防治心血管疾病的方案，有效地降低了心血管疾病的发病率。

WO 2020/037882 A1

一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞及其制备方法和用途

技术领域

本公开涉及医药生物技术领域，具体地，涉及一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞及其制备方法和用途。

背景技术

心血管疾病根据世界卫生组织的报道是全球的头号死因。2008 年有约 1730 万人死于心血管疾病，预计到 2030 年，死于心血管疾病的人数将增至 2330 万人。目前被证明防治心血管疾病发病的最有效的方法是降低血脂含量，尤其是降低低密度胆固醇(LDL-C)含量。他汀类药物 (statins)被有效的应用在心血管疾病的防治中，尽管如此，服用他汀类药物并不能完全防治心血管疾病：病人只会降低 30~40％的发病率，并且有部分病人群体对他汀类药物治疗方案没有疗效反应。因此，亟需寻找新的治疗心血管疾病方案。

发明内容

本公开的目的是克服心血管疾病防治效果较差的缺陷，进一步降低心血管疾病的发病率。

为了实现上述目的，本公开提供了一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞的制备方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：S1、将敲除载体包装到 AAV 病毒中，形成待转染 AAV 病毒颗粒；所述敲除载体的序列如 SEQ ID NO. 3 所示；S2、将干细胞的悬液与所述待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液以进行 4-30 小时的转染，得到转染后的培养物；S3、将所述转染后的培养物极限稀释后进行单克隆化培养，并通过 PCR 及测序筛选出敲除了 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因的单克隆细胞株。

另一方面，本公开还提供了一种干细胞，该干细胞为如上所述的制备方法制备得到的干细胞。

另一方面，本公开还提供了一种干细胞，该干细胞中的 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因被定向敲除。

再一方面，本公开还提供了一种干细胞在制备用于治疗心血管疾病的药物中的用途，所述干细胞为如上所述的制备方法制备得到的干细胞或如上所述的干细胞。

通过上述技术方案，本发明在干细胞中将 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因进行了双敲除，双敲除之后得到的干细胞通过注射的方式进入受试者后能够定植在肝脏中，并且有效地降低血液中甘油三酯和胆固醇水平，由此可以产生对心血管疾病的防治效果，从而提供了一种新的防治心血管疾病的方案，有效地降低了心血管疾病的发病率。

本公开的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

具体实施方式

以下对本公开的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开，并不用于限制本公开。

本公开提供了一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞的制备方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：S1、将敲除载体包装到 AAV 病毒中，形成待转染 AAV 病毒颗粒；所述敲除载体的序列如 SEQ ID NO. 3 所示；S2、将干细胞的悬液与所述待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液以进行 4-30 小时的转染，得到转染后的培养物；S3、将所述转染后的培养物极限稀释后进行单克隆化培养，并通过 PCR 及测序筛选出敲除了 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因的单克隆细胞株。

本发明通过选择 AAV 病毒来将敲除载体转染入细胞中，最终使得

sgRNA、Cas9 蛋白和敲除载体共同通过 CRISPR 基因编辑来使得 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因得以共敲除。

其中，*PCSK9* 基因是指 NCBI GENE ID 为 255738 的基因；*APOC3* 基因是指 NCBI GENE ID 为 345 的基因。

其中，优选地，步骤 S2 中，将干细胞的悬液与所述待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液以进行 8-24 小时的转染，得到转染后的培养物。在该优选情况下，能够进一步增加在干细胞中进行基因敲除的效率。

其中，优选

地，步骤 S2 中，待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液的加入量使得待转染的 AAV 病毒颗粒的 MOI 值为 10^4-10^6。在该优选情况下，能够进一步增加在干细胞中进行基因敲除的效率。MOI 值是感染时病毒与细胞数量的比值。

其中，所述干细胞可以为间充质干细胞或诱导多能干细胞。

优选地，所述间充质干细胞为骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、脐带间充质干细胞、宫血间充质干细胞及牙髓间充质干细胞。

所述 AAV 病毒的血清型可以为 AAV-1 病毒、AAV-2 病毒、AAV-3 病毒、AAV-4 病毒、AAV-5 病毒、AAV-6 病毒、AAV-7 病毒、AAV-8 病毒、AAV-9 病毒、AAV-DJ 病毒及 AAV-DJ/8 病毒，优选为 AAV-8 病毒、AAV-6 病毒、AAV-1 病毒或 AAV9 病毒，更优选所述 AAV 病毒的血清型为 AAV9 病毒，在该优选情况下，能够进一步增加在干细胞中进行基因敲除的效率。

另一方面，本公开还提供了一种干细胞，该干细胞为如上所述的制备方法制备得到的干细胞。

另一方面，本公开还提供了一种干细胞，该干细胞中的 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因被定向敲除。

其中，在 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因二者都被定向敲除的情况下，干细胞能够获得同时降低甘油三酯和胆固醇的功能。

再一方面，本公开还提供了一种干细胞在制备用于治疗心血管疾病的药物中的用途，所述干细胞为如上所述的制备方法制备得到的干细胞或如上所述的干细胞。

其中，所述心血管疾病可以包括高脂血症、脑卒中、心肌梗死、冠心病、心绞痛和血栓中的至少一种。

以下通过实施例进一步详细说明本发明：

实施例 1

试剂来源：常规引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成；DMEM/F12 培养基、DMEM 培养基、Opti-MEM、Hyclone 胎牛血清、胰酶购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司；*Spe*I 和 H*ind*III 限制性内切酶购于 NEB（北京）有限公司；PrimerStar 高保真 DNA 聚合酶购于宝生物工程（大连）有限公司；Benzonase、碘克沙醇购于默克化工技术（上海）有限公司；2× SYBR PCR mix 购于东洋纺（上海）生物科技有限公司；Matrigel 购于 BD Biosciences（货号 354277）。

1、sgRNA 设计以及合成

（1）通过在线 sgRNA 设计工具（http://crispr.mit.edu/）在 *APOC3* 基因 ENST00000375345.3 转录本 3 号外显子上设计靶向识别的 *APOC3* sgRNA，优选结果如下：APOC3 sgRNA: 5’-cagtgcatccttggcggtct**tgg**-3’（SEQ ID NO. 1）。同时，针对 *PCSK9* 基因 ENST00000302118.5 转录本 1 号外显子上设计靶向识别的 *PCSK9* sgRNA。优选结果如下：*PCSK9*sgRNA: 5’-ggtgctagccttgcgttccg**agg**-3’（SEQ ID NO. 2）。其中 1-20 位的序列为识别基序，其余的序列为 tracrRNA。

（2）该 sgRNA 由苏州吉玛基因股份有限公司合成并在该 sgRNA 序列的 5’端和 3’端末尾分的三个碱基的二号位和三号位上别添加 O-Me、

phosphorothioate 的修饰。

2、体外法检测 sgRNA 的活性

（1）分别针对 *APOC3* 和 *PCSK9* 基因，从基因组扩增识别靶序列片段（*APOC3*: 622 bp; *PCSK9*: 1027 bp），引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

APOC3-Test-FW: 5'- tactccttctggcagacccagc-3'，（SEQ ID NO. 4）；

APOC3-Test-REV: 5'-ctgtcatctctcccgcagcag -3'，（SEQ ID NO. 5）；

PCSK9-Test-FW: 5'- gtctgagcctggaggagtgag-3'，（SEQ ID NO. 6）；

PCSK9-Test-REV: 5'- ctagagcatgagttctgtgtc-3'，（SEQ ID NO. 7）。

（2）将 PCR 扩增产物 200ng，sgRNA 100ng，SpCas9 200ng（购于上海近岸科技有限公司），10×缓冲液 2μL 配置成 20μL 反应体系。反应体系在 37 度保温一小时，在 70 度保温一小时。

（3）使用 TAE 配置 1%的 BioWest 琼脂糖胶，在 90V 的电压下电泳 30min，使用凝胶成像仪观察结果。

3、AAV 包装系统选择及质粒构建

（1）待编辑细胞为脐带间充质干细胞细胞株，根据 AAV 组织亲和性对照表，优选血清型为 AAV-9 的包装系统。

（2）AAV-9 的总包装容量为 4.7Kb。pAAV-Cassette 载体序列为：

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggt
cgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcctgcggcc
gctagcccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgcctgctgaccttgga
gctggggcagaggtcagagacctctctgggcccatgccacctccaacatccactcgacccccttggaatttcggtgg
agaggagcagaggttgtcctggcgtggtttaggtagtgtgagaggggaatgactcctttcggtaagtgcagtggaa
gctgtacactgcccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtggacttagccc
ctgtttgctcctccgataactggggtgaccttggttaatattcaccagcagcctcccccgttgcccctctggatccactg
cttaaatacggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagtgaatccgga

ctctaaggtaaatataaaatttttaagtgtataatgtgttaaactactgattctaattgtttctctcttttagattccaacctttg
gaactgaattcgccgccaccatggactataaggaccacgacggagactacaaggatcatgatattgattacaaaga
cgatgacgataagatggccccgaagaaaaagcgcaaggtcgaagcgtccatgaaaaggaactacattctggggct
ggacatcgggattacaagcgtggggtatgggattattgactatgaaacaagggacgtgatcgacgcaggcgtcaga
ctgttcaaggaggccaacgtggaaaacaatgagggacggagaagcaagaggggagccaggcgcctgaaacga
cggagaaggcacagaatccagagggtgaagaaactgctgttcgattacaacctgctgaccgaccattctgagctga
gtggaattaatccttatgaagccagggtgaaaggcctgagtcagaagctgtcagaggaagagttttccgcagctctg
ctgcacctggctaagcgccgaggagtgcataacgtcaatgaggtggaagaggacaccggcaacgagctgtctac
aaaggaacagatctcacgcaatagcaaagctctggaagagaagtatgtcgcagagctacagctggaacggctgaa
gaaagatggcgaggtgagagggtcaattaataggttcaagacaagcgactacgtcaaagaagccaagcagctgct
gaaagtgcagaaggcttaccaccagctggatcagagcttcatcgatacttatatcgacctgctggagactcggagaa
cctactatgagggaccaggagaagggagccccttcggatggaaagacatcaaggaatggtacgagatgctgatgg
gacattgcacctattttccagaagagctgagaagcgtcaagtacgcttataacgcagatctgtacaacgccctgaatg
acctgaacaacctggtcatcaccagggatgaaaacgagaaactggaatactatgagaagttccagatcatcgaaaa
cgtgtttaagcagaagaaaaagcctacactgaaacagattgctaaggagatcctggtcaacgaagaggacatcaag
ggctaccgggtgacaagcactggaaaaccagagttcaccaatctgaaagtgtatcacgatattaaggacatcacag
cacggaaagaaatcattgagaacgccgaactgctggatcagattgctaagatcctgactatctaccagagttccgag
gacatccaggaagagctgactaacctgaacagcgagctgacccaggaagagatcgaacagattagtaatctgaag
gggtacaccggaacacacaacctgtccctgaaagctatcaatctgattctggatgagctgtggcatacaaacgacaa
tcagattgcaatctttaaccggctgaagctggtaccaaaaaaggtggacctgagtcagcagaaagagatcccaacc
acactggtggacgatttcattctgtcacccgtggtcaagcggagcttcatccagagcatcaaagtgatcaacgccatc
atcaagaagtacggcctgcccaatgatatcattatcgagctggctagggagaagaacagcaaggacgcacagaag
atgatcaatgagatgcagaaacgaaaccggcagaccaatgaacgcattgaagagattatccgaactaccgggaaa
gagaacgcaaagtacctgattgaaaaaatcaagctgcacgatatgcaggagggaaagtgtctgtattctctggaggc
catccccctggaggacctgctgaacaatccattcaactacgaggtcgatcatattatccccagaagcgtgtccttcga
caattcctttaacaacaaggtgctggtcaagcaggaagagaactctaaaaagggcaataggactcctttccagtacct
gtctagttcagattccaagatctcttacgaaacctttaaaaagcacattctgaatctggccaaaggaaagggccgcatc
agcaagaccaaaaaggagtacctgctggaagagcgggacatcaacagattctccgtccagaaggattttattaacc

ggaatctggtggacacaagatacgctactcgcggcctgatgaatctgctgcgatcctatttccgggtgaacaatctgg
atgtgaaagtcaagtccatcaacggcgggttcacatcttttctgaggcgcaaatggaagtttaaaaaggagcgcaac
aaagggtacaagcaccatgccgaagatgctctgattatcgcaaatgccgacttcatctttaaggagtggaaaaagct
ggacaaagccaagaaagtgatggagaaccagatgttcgaagagaagcaggccgaatctatgcccgaaatcgaga
cagaacaggagtacaaggagattttcatcactcctcaccagatcaagcatatcaaggatttcaaggactacaagtact
ctcaccgggtggataaaaagcccaacagagagctgatcaatgacaccctgtatagtacaagaaaagacgataagg
ggaataccctgattgtgaacaatctgaacggactgtacgacaaagataatgacaagctgaaaaagctgatcaacaaa
agtcccgagaagctgctgatgtaccaccatgatcctcagacatatcagaaactgaagctgattatggagcagtacgg
cgacgagaagaacccactgtataagtactatgaagagactgggaactacctgaccaagtatagcaaaaaggataat
ggccccgtgatcaagaagatcaagtactatgggaacaagctgaatgcccatctggacatcacagacgattaccta
acagtcgcaacaaggtggtcaagctgtcactgaagccatacagattcgatgtctatctggacaacggcgtgtataaat
ttgtgactgtcaagaatctggatgtcatcaaaaaggagaactactatgaagtgaatagcaagtgctacgaagaggcta
aaaagctgaaaaagattagcaaccaggcagagttcatcgcctccttttacaacaacgacctgattaagatcaatggc
gaactgtatagggtcatcggggtgaacaatgatctgctgaaccgcattgaagtgaatatgattgacatcacttaccga
gagtatctggaaaacatgaatgataagcgcccccctcgaattatcaaaacaatcgcctctaagactcagagtatcaaa
aagtactcaaccgacattctgggaaacctgtatgaggtgaagagcaaaaagcaccctcagattatcaaaaagggct
gactcgagatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaa
caacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggggaggtgtgggaggttttttaaactagtgagggcctatttcccat
gattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaagatatta
gtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatat
gcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacacccagtgcatccttgg
cggtctgttttagtactctggaaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgtgtttatctcgtcaacttgttggcga
gatttttttctagacccagctttcttgtacaaagttggcattagagctcgagggcctatttcccatgattccttcatatttgc
atatacgatacaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtga
cgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttga
aagtatttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccggtgctagccttgcgttccggttttagtact
ctggaaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgtgtttatctcgtcaacttgttggcgagatttttttctagaccc
agctttcttgtacaaagttggcattaaagcttaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgct

cgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcg
agcgcgcagctgcctgcaggggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatacg
tcaaagcaaccatagtacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgacc
gctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgt
caagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgatttgg
gtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtg
gactcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggc
ctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaattttatggtgca
ctctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctg
acgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttc
accgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatg
gtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatat
gtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcc
gtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgc
tgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccc
cgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaa
gagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacg
gatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgaca
acgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttggga
accggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcg
caaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgc
aggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcg
cggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggca
actatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtt
tactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgac
caaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctt
tttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagct
accaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagtta

ggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagt ggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacg gggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatga gaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagag cgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgt cgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggc cttttgctggccttttgctcacatgt，（SEQ ID NO. 3）。

该载体包含了肝脏特异性启动子 LP1 驱动的 saCas9 表达元件，并且插入有插入片段，所述插入片段为两个串联表达的人源 U6 启动子-APOC3 sgRNA-gRNA Scaffold-人源U6启动子-PCSK9 sgRNA- gRNA Scaffold的完整的 Cassette, 共 778 bp。序列为：

gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacacccagtgcatccttggcggtctgttttagtactctggaaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgtgttatctcgtcaacttgttggcgagatttttttctagacccagctttcttgtacaaagttggcattagagctcgagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccggtgctagccttgcgttccggttttagtactctggaaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgtgtttatctcgtcaacttgttggcgagatttttttctagacccagctttcttgtacaaagttggcatta，（SEQ ID NO. 8）。

使用 S*pe*I 和 H*ind*III 限制性内切酶（购于 NEB（北京）有限公司）将 SEQ ID NO. 8 的 Cassette 插入到 pAAV 载体上。

4、AAV 病毒包装及纯化

（1）在病毒包装前一天将 HEK293T 细胞按照每皿 5×10^6 的数量种植到直径 10cm 的含有 10mL 完全培养基 (DMEM+10%FBS+1%P/S 双抗)的 CORNING 培养皿中，共种植 30 皿。在 37 度、5% CO_2 的细胞培养箱中培养

24 小时。

（2）病毒包装当天检查 HEK293T 细胞汇合度是否达到 80%。每皿按照以下步骤单独配置转染体系：将 10μg 的 pAAV-Cassette，10μg 的 pHelper，10μg 的 pAAV9-RC 混合后使用无血清的 DMEM 调整体积到 910μL 后经漩涡振荡器混匀，加入 90μL 的 PEI（购于 Polysciences Asia Pacific, Inc.）后再次使用漩涡振荡器混匀，静置 15 分钟。将 CORNING 培养皿中的完全培养基替换成 9mL 无血清培养基，再将之前经过静置的 DNA-PEI 复合物均匀滴加到培养皿中，轻柔晃匀后置于 37 度、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 6 小时。转染 6h 后将 CORNING 培养皿中的无血清培养基替换成完全培养基，于 37 度、5% CO_2 的细胞培养箱中继续培养。

（3）在转染 60 小时之后，分别收获上清和细胞。

将收集得到的上清经 4000rpm 4 度离心 10 分钟后弃去杂质。将去除杂质的上清加入 Amicon Ultra-15 超离柱中（购于默克化工技术（上海）有限公司），经过若干次 4000rpm、4 度离心 30 分钟将体积浓缩至 10 到 15mL。将用细胞刮刀刮下的 HEK293T 细胞用适量培养基吹匀并转移至 50mL 离心管中，经 1500rpm、4 度离心 10min 后弃上清，所有沉淀总共加 3mL 细胞裂解缓冲液（150mM NaCl, 20mM tris pH8.0)使其重悬。将重悬细胞在-80℃酒精浴和 37℃水浴中反复冻融三次。将浓缩的上清和冻融的细胞悬液混匀，添加 1M $MgCl_2$ 至终浓度为 1mM。添加 Benzonase（购于默克化工技术（上海）有限公司）至终浓度为 25U/mL，混匀后 37℃反应 40min。取出 50mL 离心管，4℃，4000rpm 离心 20min，取上清。

（4）采用碘克沙醇密度梯度离心法纯化病毒（购于默克化工技术（上海）有限公司）。配置碘克沙醇梯度 17%：5mL 10× PBS, 0.05mL 1M $MgCl_2$, 0.125mL 1M KCl, 10mL 5M NaCl, 12.5mL Optiprep，加水补足到 50mL。25%：5mL 10× PBS, 0.05mL 1M $MgCl_2$, 0.125mL 1M KCl, 20mL Optiprep, 0.1mL

0.5% phenol red，加水补足到 50mL。40%：5mL 10× PBS, 0.05mL 1M $MgCl_2$, 0.125mL 1M KCl, 33.3mL Optiprep，加水补足到 50mL。60%：0.05mL 1M $MgCl_2$, 0.125mL 1M KCl, 50mL Optiprep, 0.025mL 0.5% phenol red。向超速离心管中由下至上依次缓慢加入 3.5mL 60%、3.5mL 40%、4mL 25%、4mL 17%的碘克沙醇。将浓缩的上清和细胞裂解液缓慢加在离心管最上层，用细胞裂解缓冲液补满离心管。使用贝克曼 L-80XP 落地超速离心机、70Ti 定角转子，加速 6，减速 9，60000rpm 4 度离心 2 小时。用平头注射器吸取 40% 浓度层碘克沙醇，转移至 Amicon Ultra-15 超离柱中，加入 10mL PBS 4000rpm 4℃离心 20 分钟，重复 3 次。将病毒离心浓缩至 1mL。

（5）利用 qPCR 对 AAV9 进行滴度检测。根据 saCas9 序列设计引物，使 qPCR 产物的长度为 191bp。qPCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

AAV-saCas9-F: 5’- cagattcgatgtctatctgg -3’（SEQ ID NO. 9）

AAV- saCas9-R: 5’- cattgatcttaatcaggtcg -3’（SEQ ID NO. 10）。

制备 7 个 AAV9 敲除载体标准品，以 1：10 的比例进行梯度稀释。从 10ng/μL 以下的浓度开始稀释，分别为 10ng/μL、1ng/μL、0.1ng/μL、0.01ng/μL、0.001 ng/μL、0.0001 ng/μL 和 0.00001 ng/μL。

根据以下公式计算稀释的 DNA 拷贝数：

$$Vp/mL=\frac{6.02\times10^{23}\times2}{Length\ of\ the\ vector(bp)\times6.6\times10^{8}\mu g/(mol\cdot bp)}\times Concentration(\mu g/mL)$$

使用 DNase 对病毒样本进行预处理（购于宝生物工程（大连）有限公司）。使用 2×SYBR PCR mix（购于东洋纺（上海）生物科技有限公司）配置 qPCR 反应体系。使用 Roche LightCycler® 480II 实时荧光定量 PCR 系统进行定量 PCR。根据 Ct 值，绘制标准曲线，并计算 AAV9 的滴度。

5、待编辑细胞的预处理

（1）观察人脐带间充质干细胞细胞株汇合率达到 80%后移除含 10%

FBS 的 DMEM/F12 培养基(购于 ThermoFisher Scientific, Inc.)，用 PBS 漂洗一次。加入 0.05%胰酶（购于 ThermoFisher Scientific, Inc.）使之完全覆盖皿底。37℃孵育 3-5 分钟后停止消化，吸去胰酶。即刻加入新鲜的 DMEM/F12 完全培养基，用 1mL 枪扇形吹打培养皿底，使皿/瓶底贴附的干细胞集落脱落，轻柔缓慢吹吸混匀，制成干细胞悬液。使用血球计数板对细胞密度进行计数。使用 Opti-MEM（14.5mM 的 ATP、23.6mM 的氯化镁）调整细胞密度到 5×10^7/mL。

（2）将 20μL 经过计数并使用 Opti-MEM 重悬的人脐带间充质干细胞悬液（其中细胞数量为 5×10^5 个）转移到添加了 500ul 含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基的 24 孔板中于 37 度、5% CO_2 的细胞培养箱中继续培养。

（4）电转完第 5 到 20 分钟内开始按照 1×10^5 的 MOI 值轻柔得滴加 AAV9，并于电转完 20 分钟内滴加完毕。

（5）电转完 24 小时后将旧培养基移除，更换为 DMEM/F12 完全培养基。

6、单克隆细胞株的培养：

（1）电转完第 48 小时使用 PBS 漂洗一次培养皿。加入胰酶使之完全覆盖皿底。37℃孵育 3-5 分钟后停止消化，吸去胰酶。即刻加入新鲜的 DMEM/F12 完全培养基，用 1mL 枪扇形吹打培养皿/瓶底，使皿底贴附的干细胞集落脱落，轻柔缓慢吹吸混匀，保证细胞间没有粘连，制成干细胞悬液。使用血球计数板对细胞密度进行计数。按每个 10cm 培养皿 15000 个细胞的比例把细胞种植到含 DMEM/F12 完全培养基的 10cm CORNING 培养皿中于 37 度、5% CO_2 的细胞培养箱中继续培养。

（2）每 24 小时进行观察并移除旧的培养基，更换为新的 DMEM/F12 完全培养基。72 小时后可以在镜下观察到克隆的形成。

（3）电转后 12 到 14 天在十倍的物镜下可以看到克隆的大小已经相当

于一个硬币。不能让克隆继续变大或者相交。在 96 孔板上的每个孔中加入 120μL DMEM/F12 完全培养基，标记板 O。在超净台中通过显微镜进行观察，将 P200 移液器调节至 45μL 使用带有滤芯的枪头刮碎克隆，用移液器收集细胞并转移到 96 孔板的小孔中。

（4）克隆挑取之后每 24 小时后将旧的培养基移除，更换为新的 DMEM/F12 完全培养基，四天后细胞汇合率达到 80%。

（5）在两块 96 孔板上的每个孔中加入 133μL 含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基，分别标记为板 A、板 B。将板 O 的每孔使用 150μL 的 PBS 漂洗。每孔中加入 35μL 的胰酶，消化 5 到 10 分钟后每孔中添加 165μL 的 DMEM/F12 完全培养基。从孔中分别移取 66μL 的细胞悬液转移到板 A 和板 B 的对应小孔中。板 A 用于基因组提取，板 B 备用。在板 O 的每个孔中直接添加 165μL 的细胞冻存液后至于深低温冰箱存储。

7、*APOC3* 和 *PCSK9* 基因双敲纯合克隆检测

（1）选取 96 个克隆以及未编辑人脐带间充质干细胞细胞株作为对照，将 A 板或 B 板 96 孔板中的克隆所获得的基因组用 SEQ ID NO.4-7 所述的两对引物进行 PCR 扩增。

（2）将 PCR 产物进行电泳并测序分析。测序结果显示 *APOC3* 和 *PCSK9* 基因同时发生移码突变且两个突变位点纯合的克隆为成功进行了双基因敲除编辑的克隆。

对比例 1

按照实施例 1 的方法进行，不同的是 pAAV-Cassette 载体的 Cassette 中不包括人源 U6 启动子-APOC3 sgRNA-gRNA Scaffold 的片段，即只敲除 *PCSK9* 基因，不敲除 *APOC3* 基因。

对比例 2

按照实施例 1 的方法进行，不同的是 pAAV-Cassette 载体的 Cassette 中不包括人源 U6 启动子-PCSK9 sgRNA-gRNA Scaffold 的片段，即只敲除 *APOC3* 基因，不敲除 *PCSK9* 基因。

测试实施例 1

测试实施例 1 和对比例 1 和 2 得到的脐带间充质干细胞对肝脏人源小鼠血液总胆固醇水平和甘油三酯的水平的影响（相对于未进行敲除的脐带间充质干细胞）

通过肝脏细胞移植构建人源小鼠，并用实施例 1 和对比例 1 和 2 得到的脐带间充质干细胞和未进行敲除的脐带间充质干细胞对肝脏人源化小鼠分别进行尾静脉注射（注射剂量为 1×10^6cell/0.1mL），查看对血液中总胆固醇水平和甘油三酯水平的影响，结果如表 1 所示，其表明实施例得到的脐带间充质干细胞相对于未进行敲除的脐带间充质干细胞能够同时显著降低肝脏人源化小鼠血液中的总胆固醇水平（下降了 43.5%）和甘油三酯水平(下降了 37.3%)，而单独敲除 *APOC3* 基因或 *PCSK9* 基因均不能达到同时降低的效果。

表 1：

组别	总胆固醇含量（mg/dL）	甘油三酯含量（mg/dL）
实施例 1	95	101
对比例 1（只敲除 *PCSK9* 基因，不敲除 *APOC3* 基因）	91	156
对比例 2（只敲除 *APOC3* 基因，不敲除 *PCSK9* 基因）	162	97
未敲除脐带间充质干细胞	168	161
未注射对照组	172	167

以上详细描述了本公开的优选实施方式，但是，本公开并不限于上述实施方式中的具体细节，在本公开的技术构思范围内，可以对本公开的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本公开的保护范围。

另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

此外，本公开的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合，只要其不违背本公开的思想，其同样应当视为本公开所公开的内容。

权利要求书

1．一种具有同时降低甘油三酯和胆固醇作用的干细胞的制备方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：

S1、将敲除载体包装到 AAV 病毒中，形成待转染 AAV 病毒颗粒；所述敲除载体的序列如 SEQ ID NO. 3 所示；

S2、将干细胞的悬液与所述待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液以进行 4-30 小时的转染，得到转染后的培养物；

S3、将所述转染后的培养物极限稀释后进行单克隆化培养，并通过 PCR 及测序筛选出敲除了 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因的单克隆细胞株。

2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其中，步骤 S2 中，将干细胞的悬液与所述待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液以进行 8-24 小时的转染，得到转染后的培养物。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法，其中，步骤 S4 中，待转染的 AAV 病毒颗粒的悬液的加入量使得待转染的 AAV 病毒颗粒的 MOI 值为 10^4-10^6。

4、根据权利要求 1 所述的制备方法，其中，所述干细胞为间充质干细胞或诱导多能干细胞。

5、根据权利要求 4 所述的制备方法，其中，所述间充质干细胞为骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、脐带间充质干细胞、宫血间充质干细胞及牙髓间充质干细胞。

6、根据权利要求 1 或 5 所述的制备方法，其中，所述 AAV 病毒的血清

型为 AAV-8 病毒、AAV-6 病毒、AAV-1 病毒或 AAV9 病毒。

7、一种干细胞，其特征在于，该干细胞为权利要求 1-6 中任意一项所述的制备方法制备得到的干细胞。

8、一种干细胞，其特征在于，该干细胞中的 *PCSK9* 基因和 *APOC3* 基因被定向敲除。

9、一种干细胞在制备用于治疗心血管疾病的药物中的用途，其特征在于，所述干细胞为权利要求 7 或 8 所述的干细胞。

10、根据权利要求 9 所述的用途，其中，所述心血管疾病包括高脂血症、脑卒中、心肌梗死、冠心病、心绞痛和血栓中的至少一种。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/119844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/864(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 9/00(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; 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)

VEN, CNABS, google, PubMed, ISI Web of Knowledge, CNKI, GenBank, 申请人/发明人, 甘油三酯, stem cell, 干细胞, tracrRNA, 胆固醇, crispr, APOC3, PCSK9, cas9, genome edit???, 基因编辑, SEQ ID NO:3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DING, Q. et al. "Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing." *Circulation Research,* Vol. 115, No. 5, 15 August 2014 (2014-08-15), pp. 488-492	1-10
Y	丁秋蓉 等 (DING, Qiurong et al.). "心血管疾病的基因治疗. (Gene Therapy for Cardiovascular Disease)" *上海大学学报 (Journal of Shanghai Ocean University),* Vol. 22, No. 3, 30 June 2016 (2016-06-30), pp. 270-279	1-10
Y	CHADWICK, A. C. et al. "In Vivo Base Editing of PCSK9 as a Therapeutic Alternative to Genome Editing." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.,* Vol. 37, No. 9, 30 September 2017 (2017-09-30), pp. 1741-1747	1-10
Y	WO 2014204726 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. ET AL.) 24 December 2014 (2014-12-24) entire document	1-10
A	CN 108342387 A (TAN, XU) 31 July 2018 (2018-07-31) entire document	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
06 May 2019	**20 May 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/119844

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105886498 A (SHEN, ZHIRONG) 24 August 2016 (2016-08-24) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/119844

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/CN2018/119844

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2014204726	A1	24 December 2014	MX	2015017312	A	10 April 2017
				SG	10201710486X	A	30 January 2018
				CA	2915842	A1	24 December 2014
				JP	2016524472	A	18 August 2016
				WO	2014204726	A9	06 October 2016
				CN	107995927	A	04 May 2018
				KR	20160030187	A	16 March 2016
				AU	2014281028	A1	28 January 2016
				IL	243196	D0	31 March 2016
				US	2016153005	A1	02 June 2016
				EP	3011031	A1	27 April 2016
				SG	11201510284X	A	28 January 2016
CN	108342387	A	31 July 2018	None			
CN	105886498	A	24 August 2016	None			

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/119844

A. 主题的分类

C12N 15/864(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 9/00(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; 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））

VEN, CNABS, google,PubMed, ISI Web of Knowledge, CNKI, GenBank, 申请人/发明人，甘油三酯，stem cell，干细胞，tracrRNA，胆固醇，crispr，APOC3，PCSK9，cas9，genome edit???，基因编辑,SEQ ID NO:3

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	DING, Q.等. "Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing." Circulation Research, 第115卷，第5期，2014年 8月 15日 (2014-08-15)，第488-492页	1-10
Y	丁秋蓉 等. "心血管疾病的基因治疗." 上海大学学报, 第22卷，第3期，2016年 6月 30日 (2016-06-30)，第270-279页	1-10
Y	CHADWICK, A.C.等. "In Vivo Base Editing of PCSK9 as a Therapeutic Alternative to Genome Editing." Arterioscler Thromb Vasc Biol., 第37卷，第9期，2017年 9月 30日 (2017-09-30)，第1741-1747页	1-10
Y	WO 2014204726 A1 (THE BROAD INST. INC.等) 2014年 12月 24日 (2014-12-24) 全文	1-10
A	CN 108342387 A (谭旭) 2018年 7月 31日 (2018-07-31) 全文	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
2019年 5月 6日	2019年 5月 20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 陈皓 电话号码 86-(10)-53962068

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/119844

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105886498 A (沈志荣) 2016年 8月 24日 (2016 - 08 - 24) 全文	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/119844

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/CN2018/119844

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2014204726	A1	2014年 12月 24日	MX	2015017312	A	2017年 4月 10日
				SG	10201710486X	A	2018年 1月 30日
				CA	2915842	A1	2014年 12月 24日
				JP	2016524472	A	2016年 8月 18日
				WO	2014204726	A9	2016年 10月 6日
				CN	107995927	A	2018年 5月 4日
				KR	20160030187	A	2016年 3月 16日
				AU	2014281028	A1	2016年 1月 28日
				IL	243196	D0	2016年 3月 31日
				US	2016153005	A1	2016年 6月 2日
				EP	3011031	A1	2016年 4月 27日
				SG	11201510284X	A	2016年 1月 28日
CN	108342387	A	2018年 7月 31日		无		
CN	105886498	A	2016年 8月 24日		无		