

(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
2025 年 6 月 26 日 (26.06.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/129387 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/866 (2006.01) *C12N 7/01* (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/139457

(22) 国际申请日: 2023 年 12 月 18 日 (18.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(72) 发明人: 文鹏杰 (WEN, Pengjie); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。王培培 (WANG, Peipei); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。徐富强 (XU, Fuqiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

韩丹 (HAN, Dan); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。朱续涛 (ZHU, Xutao); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。齐玉祥 (QI, Yuxiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905 100123 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING TRANSFER VECTOR PAAV-DONOR IN BACULOVIRUS-RAAV PRODUCTION SYSTEM AND USE

(54) 发明名称: 一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法及应用

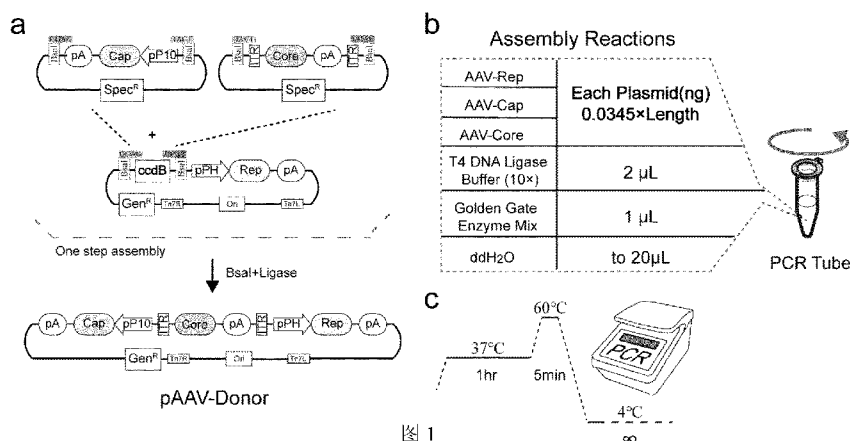


图 1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a method for preparing a transfer vector pAAV-Donor in a baculovirus-rAAV production system and the use. The preparation method comprises: removing type IIS restriction enzyme recognition sites from an AAV Cap gene expression cassette by means of mutation; modifying the obtained AAV Cap gene expression cassette; preparing AAV-Core, AAV-Cap and AAV-Rep backbone plasmids; sequentially inserting the modified Cap gene expression cassette, a heterologous functional gene expression element and the modified AAVRep gene expression cassette into the multiple cloning sites of the AAV-Cap, AAV-Core and AAV-Rep backbone plasmids to obtain pAAV-Rep, pAAV-Cap and pAAV-Core; and assembling the three plasmids in one step by means of the Golden Gate cloning technology, transforming same into Stb13 competent cells, and screening positive clones to obtain pAAV-Donor.



(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(57) 摘要: 本发明公开一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法及应用, 制备方法包括: 突变去除AAVCap基因表达框中的IIS型限制酶识别位点; 修饰获得的AAV Cap基因表达框; 制备AAV-Core、AAV-Cap和AAV-Rep骨架质粒; 将经修饰的Cap基因表达框、异源功能性基因表达元件、经修饰的AAVRep基因表达框依次插入至AAV-Cap、AAV-Core、AAV-Rep骨架质粒的多克隆位点中, 得到pAAV-Rep、pAAV-Cap和pAAV-Core; 将三个质粒通过Golden gate克隆技术一步组装, 转化Stbl3感受态细胞, 筛选阳性克隆, 即得pAAV-Donor。

一种杆状病毒-rAAV 生产系统中转移载体 pAAV-Donor 的制备方法及应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种杆状病毒-rAAV 生产系统中转移载体 pAAV-Donor 的制备方法及应用。

背景技术

重组腺相关病毒（recombinant Adeno-Associated Virus, rAAV）是基因治疗递送的明星载体，也是解析大脑结构与功能网络的重要工具。当前，包装AAV最常用的方法包括贴壁或悬浮细胞/三质粒转染系统和昆虫细胞/杆状病毒生产系统。尽管通过三质粒瞬时转染贴壁的人胚肾（HEK）293细胞可生产研究级的rAAV，不过这一工艺无法扩大。而悬浮HEK293细胞/三质粒瞬时转染的方法虽然快捷、适用于所有的血清型、也可规模化发酵，但产量有限、空-全衣壳比率批次差异明显而且生产成本高昂。相比之下，基于杆状病毒的AAV生产系统因其具有可扩展性、低成本和可预测的生物安全性而备受关注。

目前，利用杆状病毒大规模生产rAAV主要有三种方法：1）两杆状病毒系统；2）依赖包装细胞系的一杆状病毒系统；3）不依赖包装细胞系的基于穿梭质粒的一杆状病毒系统（OneBac system）。然而这些制备工艺的周期均较长，需要耗费数周时间执行从转移载体构建、重组杆粒制备、转染、病毒扩增到下游分离纯化等流程。对于可灵活、高效生产不同种类rAAV的第3种方法而言，转移载体的构建是限速步骤也是难点，因为AAV的Cap基因、Rep基因和ITR核心表达元件需要被构建到一个转移载体上，欲获得不同血清型或含有不同核心表达元件的rAAV就必须重新制备对应的转移载体。

Golden Gate 克隆技术是一种通过一步反应高效组装复杂载体的强大工具，这为解决上述限速步骤提供了可能。尽管利用该技术已经开发可简单、高效构建多基因表达载体的GoldenBac系统，但与表达重组蛋白不同的是，AAV各元件的编码要复杂的多：1）Cap基因除了通过来自不同的起始密码子翻译三个衣壳亚基VP1、VP2和VP3外还编码组装活化蛋白MAAP、AAP等，2）在杆状病毒AAV制备系统中，Rep基因编码病毒复制所需的两种蛋白Rep78和Rep52，且与Rep52相比，Rep78表达丰度较低有利于较高的载体产量，3）核心表达元件两端是用作病毒复制起点和包装信号的两个T形反向末端重复序列（ITR），ITR容易缺失并影响病毒包装和感染，更不用说AAV元件内部包含的IIS型限制酶识别位点，因此该

方法并不适用于 One Bac system 中转移载体的构建。

发明内容

针对现有技术的以上缺陷，本发明提供一种杆状病毒-rAAV 生产系统中转移载体 pAAV-Donor 的制备方法及应用，其目的在于，通过将异源功能性基因表达元件置于 AAV-Core 骨架质粒、血清型 Cap 基因置于 AAV-Cap 骨架质粒、Rep 基因置于 AAV-Rep 骨架质粒，从而根据需求一步 Golden gate 自由组装上述三质粒，由此提高杆状病毒-rAAV 生产系统中转移载体构建的便捷性、灵活性和高效性，进一步缩短利用杆状病毒生产 rAAV 的周期。

本发明的具体技术方案如下：

本发明提供一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法，包括以下步骤：

(1) 突变去除AAV Cap基因表达框中的IIS型限制酶识别位点；

(2) 修饰步骤(1)中获得的AAV Cap基因表达框：所述修饰的方式选自1)-4)中的一种或几种：1) 在VP1 ATG起始密码子5'端插入额外框外起始密码子；2) 将VP1的ATG起始密码子更换为次优翻译起始密码子、突变VP3亚基表达框外VP1表达框内的ATG密码子；3) 在AAV衣壳编码序列的非ATG翻译起始密码子与编码氨基酸残基的密码子之间插入一个或多个氨基酸残基的编码序列；4) 插入内含子剪接受体序列调控VP1、VP2、VP3的相对表达；

修饰AAV Rep基因表达框：所述修饰的方式选自1)-2)中的一种：1) 突变Rep78起始密码子与Rep52起始密码子之间所有的ATG序列、更换Rep78基因的起始密码子为非ATG序列；2) 插入内含子剪接受体序列弱化Rep78蛋白的表达；

(3) 分别制备AAV-Core、AAV-Cap和AAV-Rep骨架质粒；

所述AAV-Core骨架质粒属于Golden gate组装供体质粒，包含两个相同类型的IIS型限制性内切酶位点、两个AAV-ITR序列；

所述AAV-Cap骨架质粒属于Golden gate组装供体质粒，包含两个与所述AAV-Core骨架质粒相同的IIS型限制性内切酶位点、杆状病毒启动子、转录和转录后调控序列；

所述AAV-Rep骨架质粒属于Golden gate组装受体质粒，包含两个与所述AAV-Cap骨架质粒相同的IIS型限制性内切酶位点、杆状病毒启动子、转录和转录后调控序列、负筛选标记基因、Tn7转座元件；

(4) 将步骤(2)中获得的经修饰的Cap基因表达框插入至步骤(3) AAV-Cap骨架质粒的多克隆位点中, 将异源功能性基因表达元件插入至步骤(3) AAV-Core骨架质粒的多克隆位点中, 将步骤(2)中获得的经修饰的AAV Rep基因表达框插入步骤(3) AAV-Rep骨架质粒的多克隆位点中, 得到pAAV-Rep、pAAV-Cap和pAAV-Core;

(5) 将步骤(4)中获得的三个质粒通过Golden gate克隆技术一步组装, 转化Stbl3感受态细胞, 筛选阳性克隆, 即可获得转移载体pAAV-Donor。

进一步地, 所述AAV血清型选自AAV1-13及其衍生血清型中一种或几种;

步骤(1)中突变去除的AAV Cap基因表达框中IIS型限制酶识别位点包含BsaI或Eco31I(GGTCTC 1/5)、BsmBI (CGTCTC 1/5)、BbsI (GAAGAC 2/6)、SapI (GCTCTTC 1/4)的其中一个;

优选地, 步骤(1)突变去除的AAV Cap基因表达框中IIS型限制酶识别位点为BsaI或Eco31I (GGTCTC) ;

优选地, 所述突变去除IIS型限制酶识别位点为对IIS型限制酶识别位点进行密码子同义替换或氨基酸同属性突变;

优选地, 所述突变去除IIS型限制酶识别位点包括VP3亚基表达框中密码子同义替换、VP1/VP2与MAAP/AAP亚基重叠的表达框中氨基酸同属性突变、除了VP3/MAAP/AAP亚基编码区外其余Cap表达框中密码子同义替换。

进一步地, 步骤(2)中所述修饰AAV Cap基因表达框的方式为将VP1的ATG起始密码子更换为次优翻译起始密码子CTG且在CTG 5'端插入GCCGCC序列, 同时突变VP1起始密码子到VP3起始密码子之间的ATG密码子;

优选地, 步骤(2)中所述修饰AAV Rep基因表达框的方式为去除Rep78起始密码子与Rep52起始密码子之间所有的ATG序列, 并且Rep78的ATG翻译起始密码子更换为CTG同时在CTG 5'端插入GCCGCC序列。

进一步地, 步骤(3)所述IIS型限制性内切酶包含BsaI或Eco31I(GGTCTC 1/5)、BsmBI (CGTCTC 1/5)、BbsI (GAAGAC 2/6)、SapI (GCTCTTC 1/4)的其中一个;

优选地, 步骤(3)所述AAV-Core、AAV-Cap和AAV-Rep骨架质粒中的两个IIS型限制性内切酶为BsaI或Eco31I(GGTCTC 1/5);

优选地, 步骤(3)所述杆状病毒启动子来源于AcMNPV或BmNPV, 包含Pp10、Pph、Pp6.9、Pgp64、Pie-1及其相互联合或启动子前添加增强子形成的组成型启动子;

优选地，步骤（3）所述 AAV-Core 骨架质粒中核心元件 5'→3' 为 GGTCTCATACT-ITR-MCS-ITR-CCATTGAGACC；

优选地，步骤（3）所述 AAV-Cap 骨架质粒中核心元件 5'→3' 为 GGTCTCAAGTA-Pp10-MCS-HSV TK poly(A)-CTCCTGAGACC；

优选地，步骤（3）所述 AAV-Cap 骨架质粒中 p10 启动子选自 AcMNPV；

优选地，步骤（3）所述 AAV-Rep 骨架质粒中核心元件 5'→3' 为 Tn7R-Gen-GGAGTGAGACC-ccdB-GGTCTCACCAT-Pph-MCS-SV40 poly(A)-Tn7L；

优选地，步骤（3）所述 AAV-Rep 骨架质粒中 ph 启动子优选自 AcMNPV；

优选地，步骤（3）所述 AAV-Rep 骨架质粒中负筛选标记基因包括但不限于 ccdB、sacB。

进一步地，步骤（4）所述异源功能性基因表达元件中至少不含有与步骤（3）所述 AAV-Core 或 AAV-Cap 或 AAV-Rep 骨架质粒相同的 IIS 型限制性内切酶位点；

优选地，步骤（4）所述异源功能性基因表达元件至少包含启动子、基因表达框、转录和转录后调控序列；

优选地，步骤（4）所述异源功能性基因表达元件中转录和转录后调控序列包括但不限于 cw3sl、WPRE、hGH polyA、bGH polyA。

进一步地，步骤（4）所述异源功能性基因表达元件、经修饰的 Cap 基因表达框与经修饰的 AAV Rep 基因表达框均不含有 IIS 型限制性内切酶识别位点；

优选地，步骤（4）所述异源功能性基因表达元件、经修饰的 Cap 基因表达框与经修饰的 AAV Rep 基因表达框均不含有 IIS 型限制性内切酶识别位点 BsaI 或 Eco31I（GGTCTC）。

进一步地，步骤（4）中经修饰的 Cap 基因表达框插入至 AAV-Cap 骨架质粒的多克隆位点，异源功能性基因表达元件插入至 AAV-Core 骨架质粒的多克隆位点，经修饰的 AAV Rep 基因表达框插入 AAV-Rep 骨架质粒的多克隆位点采取同源重组克隆技术或酶切连接法。

进一步地，步骤（5）所述三个质粒 Golden gate 组装条件为：1）质粒的组装需求量（ng）=0.0345×pAAV-Rep 或 pAAV-Cap 或 pAAV-Core 的质粒大小，T4 DNA Ligase Buffer（10×）2 μL，Golden Gate Enzyme Mix 1 μL，补充 ddH₂O 至 20 μL；2）37℃（1 h）→60℃（5 min）→4℃（∞）；

优选地，步骤（5）所述转化 Stbl3 感受态细胞的剂量为 5 μL。

本发明还提供上述制备方法得到的杆状病毒-rAAV 生产系统中转移载体 pAAV-Donor。

本发明还提供所述制备方法或所述杆状病毒-rAAV 生产系统中转移载体 pAAV-Donor 在生产 rAAV 中的应用。

本发明进一步提供一种生产rAAV的方法，包括以下步骤：

通过Bac-to-Bac系统，将转移载体pAAV-Donor转座至杆状病毒基因组中，获得重组杆粒；

提取相应的重组杆粒，并转染宿主细胞拯救出重组杆状病毒BEV（P1代）；

将获得的P1代重组杆状病毒BEV经连续传代后感染宿主或宿主细胞系，感染一定时间后，收获细胞纯化即得到rAAV；

优选地，所述杆状病毒基因组为AcMNPV、BmNPV或ApNPV；

优选地，所述宿主细胞来源于昆虫的卵巢、精巢、胚胎、成虫盘、中肠、脂肪体或血细胞；

优选地，所述Bac-to-Bac系统为苜蓿银纹夜蛾杆状病毒（AcMNPV）表达系统；

优选地，所述宿主细胞为 Expi-sf9。

本发明的有益效果：

（1）本发明提供的pAAV-Donor制备方法，通过将AAV包装所需的异源功能性基因表达元件、血清型Cap基因、Rep基因分别负载于3个质粒上，从而根据rAAV的生产需求可以一步Golden gate自由组装上述三质粒，实现杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体的便捷、灵活、高效构建，即对于制备携带不同异源功能性基因片段的不同血清型rAAV，只需要在AAV-Cap质粒库、AAV-Core质粒库中选择恰当的质粒与AAV-Rep质粒Golden gate组装即可，无需多次重复依赖限制性核酸内切酶、DNA连接酶或同源重组酶作用将Cap基因、Rep基因和ITR核心表达元件连接在pFBD（pFastBac Dual）载体上；

（2）本发明基于rAAV-Donor制备的便捷性、灵活性、高效性，可大幅缩短利用杆状病毒生产rAAV的周期；

（3）本发明可兼容现有的杆状病毒-rAAV生产系统。

附图说明

图1是本发明转移载体pAAV-Donor的制备流程图。a. pAAV-Cap质粒、pAAV-Core质粒、pAAV-Rep质粒及pAAV-Donor组装策略示意图；b. 组装反应体系；c. Rep、Cap及Core三质粒组装条件；

图2是实施例1中突变去除pAAV-RC中Cap基因表达框内BsaI识别位点后rAAV的制备效果。a. 突变去除1、5、8型AAV Cap基因表达框内BsaI识别位点示意图；b. HEK293T细胞三

质粒共转染包装rAAV示意图及评估指标；c-e. 纯化后的1、5、8型rAAV及突变体蛋白银染检测；f-h. 纯化后的1、5、8型rAAV及突变体qPCR滴度测定及感染HEK293T细胞活性检测；

图3是实施例2中杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的一步组装效果。a-c. 基于骨架质粒制备转移载体pAAV8-CMV-EGFP-hGH和pAAV9-CMV-EGFP-hGH所需的9A08、9A09、2006、T79Ac00-0-4构建示意图；d. Cap、Core及Rep三质粒一步组装后转化Stbl3感受态细胞涂布含有庆大霉素的LB平板生长情况；e. pAAV-Donor阳性克隆菌落PCR鉴定；

图4是实施例3中基于灵活、高效的pAAV-Donor制备方法利用苜蓿银纹夜蛾-杆状病毒(AcMNPV)表达系统生产rAAV2、rAAV8和rAAV9；a. pAAV-Donor中的Cap、Core和Rep元件转座至杆状病毒基因组示意图；b. MOI=1感染悬浮Expi-sf9细胞(2E+06个/mL, 50ml), 3天后细胞中荧光蛋白的表达情况；c. 蛋白免疫印迹检测被BEV感染3天后Expi-sf9细胞中Rep和Cap的表达量；d. 对制备的rAAV纯度及衣壳蛋白比例进行蛋白银染检测；e. qPCR定量rAAV的滴度；f. 基于灵活、高效制备pAAV-Donor系统生产的rAAV感染293T细胞检测病毒活性。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

实施例1 突变去除Cap基因表达框内BsaI识别位点

在常用AAV血清型1、2、5、8、9中，AAV1、AAV5、AAV8的Cap基因表达框中含有IIS型限制酶识别位点BsaI或Eco31I(GGTCTC 1/5)，这阻碍了以模块化方式将AAV的Cap、Rep、Core三个基因元件一步快速组装成杆状病毒-rAAV生产系统中所需的转移载体pAAV-Donor，因此需要突变去除Cap基因表达框中的GGTCTC序列。本实施例以AAV1、AAV5、AAV8(Addgene, 112862、104964、112864)为例，结合HEK293T细胞/三质粒瞬时转染AAV包装系统，以展示突变去除AAV-Cap基因表达框中IIS型限制酶识别位点的方式。

(1) 对pAAV-RC质粒中Cap基因表达框内的BsaI识别位点进行单碱基突变，如附图2a所示；

1.1 将AAV-Cap1中编码VP1-467位丝氨酸(467S)进行密码子同义替换，“tct”突变为“tca”；

1.2 将AAV-Cap5中编码VP1-58位亮氨酸（58L）突变为同属性氨基酸-缬氨酸（58V）、异亮氨酸（58I），“ctc”分别突变为“gtc”、“atc”；

1.3 将AAV-Cap8中编码MAAP-117位精氨酸（117R）突变为同属性氨基酸-赖氨酸（117K），“aga”分别突变为“aaa”。

（2）利用HEK293T细胞/三质粒瞬时转染系统包装突变Cap基因表达框内BsaI识别位点的AAV1、AAV5、AAV8（附图2b），其中pTrans质粒（即核心质粒）携带eGFP表达元件便于检测包装的rAAV特性。通过蛋白银染和实时荧光定量qPCR测定滴度和纯度、感染293T细胞比较感染活性，获取Cap基因表达框中不含BsaI位点的最佳突变体，蛋白银染显示突变去除Cap基因表达框中BsaI识别位点后的AAV1-tct467tca、AAV5-L58V、AAV8-MAAP-R117K均能产生rAAV，而AAV5-L58I无法被包装（附图2c-e）；实时荧光定量qPCR与感染293T细胞显示AAV1突变体的滴度略低于野生型AAV1，而AAV5和AAV8突变体滴度均高于对应的野生型AAV，AAV1、AAV5和AAV8突变体均能感染293T细胞且感染效果接近野生型AAV（附图2f-h）。综上，通过本发明描述的突变去除AAV-Cap基因表达框内IIS型限制酶识别位点的方法可以筛选出具有感染活性且Cap表达框内缺失IIS型限制酶识别位点的AAV突变体。

实施例2 一步组装杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor

为了实现携带AAV三元件（Rep/Cap/Core）转移载体pAAV-Donor的简便、快速构建，1）基于Addgene-47984构建了Cap骨架质粒9A00（pBACKBONE_Ac-AAV-Cap-BsaI-SmR，核酸序列如SEQ ID NO.1）；2）基于Addgene-47985构建了Core骨架质粒2001（pBACKBONE_AAV-Core-cw3sl-BsaI-SmR，核酸序列如SEQ ID NO.2），其中ITR-CW3SL序列由北京六合华大基因科技有限公司合成；3）构建了Rep骨架质粒T79Ac00-0-0（pBACKBONE_Ac-AAV-Rep-BsaI-ccdB-Gen，核酸序列如SEQ ID NO.3），其中ccdB序列由北京擎科生物科技有限公司合成，其余序列从pFastBac Dual表达载体（购自赛默飞世尔科技公司，由本实验室保存）中扩增获得，载体构建过程中使用DB3.1感受态细胞（购自上海唯地生物技术有限公司，DL1040M）。本实施例以制备pAAV8-CMV-EGFP-hGH和pAAV9-CMV-EGFP-hGH转移载体为例，展示杆状病毒-rAAV生产系统中pAAV-Donor的一步组装法。

（1）分别构建AAV Cap、Core和Rep质粒；

1.1 通过PCR分别在Cap8（来源于实施例1，已突变去除BsaI识别位点）和Cap9（来源Addgene，由本实验室保存）基因表达框两端引入同源臂，并将起始密码子“ATG”均突变为

“CTG”后在CTG 5'端增加“gccgcc”序列（修饰后的AAV8和AAV9 Cap基因表达框的核酸序列分别如SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5），接着利用同源重组克隆技术将修饰后的Cap8和Cap9基因表达框分别插入Cap骨架质粒9A00的多克隆位点，如附图3a所示，从而分别获得AAV-Cap质粒9A08和9A09；

1.2 利用融合PCR突变CMV-EGFP-hGH表达框内终止子hGH中的BsaI识别位点（修饰后CMV-EGFP-hGH的核酸序列如SEQ ID NO.6）的同时引入同源臂，随后限制性内切酶BspDI/RsrII双酶切Core骨架质粒2001，将突变去除BsaI识别位点的CMV-EGFP-hGH表达框插入ITR之间，如附图3b所示，从而获得AAV-Core质粒2006；

1.3 通过PCR在修饰后的Rep2基因表达框两端引入同源臂（修饰后的Rep2基因表达框的核酸序列如SEQ ID NO.7），接着利用同源重组克隆技术将该片段插入Rep骨架质粒T79Ac00-0-0的多克隆位点，如附图3a所示，从而获得AAV-Rep质粒T79Ac00-0-4；

（2）利用Goldengate组装试剂盒（NEB公司，E1601L）对AAV Cap、Core和Rep质粒进行一步组装，组装条件如附图1b-c所示，9A08+2006+T79Ac00-0-4组装形成T79A08-2006-4即转移载体pAAV8-CMV-EGFP-hGH（核酸序列如SEQ ID NO.8），9A09+2006+T79Ac00-0-4组装形成T79A09-2006-4即转移载体pAAV9-CMV-EGFP-hGH（核酸序列如SEQ ID NO.9），如附图3a-c所示，取Goldengate组装后的产物5 μL转化stbl3化学感受态细胞，涂布在含有庆大霉素的LB固体培养基上，经过37℃过夜培养可以看到菌落呈颗粒状分布于LB培养板（如附图3d所示），分别在T79Ac08-2006-4和T79Ac09-2006-4平板中挑选10个单克隆菌落进行菌落PCR并筛选阳性克隆（如附图3e所示），选取T79Ac08-2006-4和T79Ac09-2006-4各2个阳性克隆过夜培养，提取质粒进行测序，经序列比对正确。这表明本发明提供的转移载体pAAV-Donor制备方法可根据rAAV的生产需求通过一步Golden gate自由组装实现杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体的便捷、灵活、高效构建。

实施例3 基于灵活、高效制备pAAV-Donor的方法利用苜蓿银纹夜蛾-杆状病毒（AcMNPV）表达系统生产rAAV2、rAAV8和rAAV9

为了验证上述一步组装法快速获得的pAAV-Donor的有效性，将所制备的pAAV-Donor转化至DH10Bac感受态细胞（购自赛默飞世尔科技公司，10361012）中以获得AcMNPV重组杆粒，进一步通过转染Expi-sf9细胞（购自赛默飞世尔科技公司，A35243）拯救出BEV，利用BEV感染Expi-sf9细胞验证是否有rAAV产生。

（1）分别制备rAAV2、rAAV8和rAAV9的AcMNPV重组杆粒；

在实施例2中已获得rAAV8和rAAV9的pAAV-Donor T79A08-2006-4和T79A09-2006-4，使用相同的方法制备rAAV2的pAAV-Donor T79A02-2006-4（核酸序列如SEQ ID NO.10）。按照Bac-to-Bac表达系统使用说明书，如附图4a所示，通过将T79A02-2006-4、T79A08-2006-4和T79A09-2006-4分别转座至AcMNPV基因组中，分别制备重组杆粒AcMNPV-T79A02-2006-4（rAAV2）、AcMNPV-T79A08-2006-4（rAAV8）、AcMNPV-T79A09-2006-4（rAAV9）；

（2）利用杆状病毒（AcMNPV）表达系统生产rAAV；

悬浮培养的 Expi-sf9 细胞以 2×10^6 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中，贴壁培养 1 h 后利用 TransIT-Insect Transfection Reagent（购自 Mirusbio 公司，MIR6105）分别转染 2 μ g 步骤（1）中制备的不同 AAV 重组杆粒，24 h 后对细胞进行换液，再经过 3 天的培养使用 qPCR 对上清中的第一代 BEV(P1)进行定量检测。进一步，取适量的悬浮 Expi-sf9 细胞接种在摇瓶中（ 2×10^6 个/mL，50 mL），按照 MOI=1 分别接种 BEV（P1），经过 3 天的感染收集细胞，荧光显微镜观察到绿色荧光蛋白表达（附图 4b），这表明重组 BEV 感染了细胞并介导 eGFP 的表达；蛋白免疫印迹检测细胞中的 Rep 和 Cap 表达，Rep52 的表达丰度高于 Rep78 且 VP1:VP2:VP3 的表达量接近 1: 1: 10（附图 4c），同时上清中的大量 BEV（P2）可作为种子再次感染 Expi-sf9 细胞生产 rAAV。接着，采用碘克沙醇密度梯度离心分离纯化法（方法参考 Aslanidi 等,2009,Proc.NatlAcad.Sci.USA,206:5059-5064）纯化 Expi-sf9 细胞中的 rAAV，并进行病毒特性检测包括蛋白银染、实时荧光定量 qPCR、感染 293T 细胞，蛋白银染和 qPCR 显示 rAAV2、rAAV8 和 rAAV9 被成功生产，其中的 rAAV9 滴度最高达到 4.099×10^{12} VG/mL（附图 4d-e），取 3 μ L 制备的 rAAV2、rAAV8 和 rAAV9 分别感染贴壁的 293T 细胞，仅感染 36 h 就观察到荧光蛋白表达（附图 4f），这表明生产的 rAAV 具有感染活性。综上，本发明提供的灵活、高效制备转移载体 pAAV-Donor 的方法能够用于杆状病毒表达系统生产 rAAV。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 突变去除AAV Cap基因表达框中的IIS型限制酶识别位点；

(2) 修饰步骤(1)中获得的AAV Cap基因表达框：所述修饰的方式选自1)-4)中的一种或几种：1) 在VP1 ATG起始密码子5'端插入额外框外起始密码子；2) 将VP1的ATG起始密码子更换为次优翻译起始密码子、突变VP3亚基表达框外VP1表达框内的ATG密码子；3) 在AAV衣壳编码序列的非ATG翻译起始密码子与编码氨基酸残基的密码子之间插入一个或多个氨基酸残基的编码序列；4) 插入内含子剪接受体序列调控VP1、VP2、VP3的相对表达；

修饰AAV Rep基因表达框：所述修饰的方式选自1)-2)中的一种：1) 突变Rep78起始密码子与Rep52起始密码子之间所有的ATG序列、更换Rep78基因的起始密码子为非ATG序列；2) 插入内含子剪接受体序列弱化Rep78蛋白的表达；

(3) 分别制备AAV-Core、AAV-Cap和AAV-Rep骨架质粒；

所述AAV-Core骨架质粒属于Golden gate组装供体质粒，包含两个相同类型的IIS型限制性内切酶位点、两个AAV-ITR序列；

所述AAV-Cap骨架质粒属于Golden gate组装供体质粒，包含两个与所述AAV-Core骨架质粒相同的IIS型限制性内切酶位点、杆状病毒启动子、转录和转录后调控序列；

所述AAV-Rep骨架质粒属于Golden gate组装受体质粒，包含两个与所述AAV-Cap骨架质粒相同的IIS型限制性内切酶位点、杆状病毒启动子、转录和转录后调控序列、负筛选标记基因、Tn7转座元件；

(4) 将步骤(2)中获得的经修饰的Cap基因表达框插入至步骤(3) AAV-Cap骨架质粒的多克隆位点中，将异源功能性基因表达元件插入至步骤(3) AAV-Core骨架质粒的多克隆位点中，将步骤(2)中获得的经修饰的AAV Rep基因表达框插入步骤(3) AAV-Rep骨架质粒的多克隆位点中，得到pAAV-Rep、pAAV-Cap和pAAV-Core；

(5) 将步骤(4)中获得的三个质粒通过Golden gate克隆技术一步组装，转化Stbl3感受态细胞，筛选阳性克隆，即可获得转移载体pAAV-Donor。

2. 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述AAV血清型选自AAV1-13及其衍生血清型中一种或几种；

步骤(1)中突变去除的AAV Cap基因表达框中IIS型限制酶识别位点包含BsaI或Eco31II(GGTCTC 1/5)、BsmBI (CGTCTC 1/5)、BbsI (GAAGAC 2/6)、SapI (GCTCTTC 1/4)的其中一个。

3. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)突变去除的AAV Cap基因表达框中IIS型限制酶识别位点为BsaI或Eco3II(GGTCTC)。

4. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)突变去除IIS型限制酶识别位点为对IIS型限制酶识别位点进行密码子同义替换或氨基酸同属性突变。

5. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)突变去除IIS型限制酶识别位点包括VP3亚基表达框中密码子同义替换、VP1/VP2与MAAP/AAP亚基重叠的表达框中氨基酸同属性突变、除了VP3/MAAP/AAP亚基编码区外其余Cap表达框中密码子同义替换。

6. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述修饰AAV Cap基因表达框的方式为将VP1的ATG起始密码子更换为次优翻译起始密码子CTG且在CTG 5'端插入GCCGCC序列,同时突变VP1起始密码子到VP3起始密码子之间的ATG密码子。

7. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述修饰AAV Rep基因表达框的方式为去除Rep78起始密码子与Rep52起始密码子之间所有的ATG序列,并且Rep78的ATG翻译起始密码子更换为CTG同时在CTG 5'端插入GCCGCC序列。

8. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述IIS型限制性内切酶包含BsaI或Eco3II(GGTCTC 1/5)、BsmBI (CGTCTC 1/5)、BbsI (GAAGAC 2/6)、SapI (GCTCTTC 1/4)的其中一个。

9. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述AAV-Core、AAV-Cap和AAV-Rep骨架质粒中的两个IIS型限制性内切酶为BsaI或Eco3II(GGTCTC 1/5)。

10. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述杆状病毒启动子来源于AcMNPV或BmNPV,包含Pp10、Pph、Pp6.9、Pgp64、Pie-1及其相互联合或启动子前添加增强子形成的组成型启动子。

11. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述AAV-Core骨架质粒中核心元件5'→3'为GGTCTCATACT-ITR-MCS-ITR-CCATTGAGACC。

12. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述AAV-Cap骨架质粒中核心元件5'→3'为GGTCTCAAGTA-Pp10-MCS-HSV TK poly(A)-CTCCTGAGACC。

13. 如权利要求12所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述AAV-Cap骨架质粒中p10启动子选自AcMNPV。

14. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述AAV-Rep骨架质粒中核心元件5'→3'为Tn7R-Gen-GGAGTGAGACC-ccdB-GGTCTCACCAT-Pph-MCS-SV40 poly(A)-Tn7L。

15. 如权利要求14所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(3)所述AAV-Rep骨架质粒中ph启动子优选自AcMNPV。

16. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(3)所述AAV-Rep骨架质粒中负筛选标记基因包括但不限于ccdB、sacB。

17. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)所述异源功能性基因表达元件中至少不含有与步骤(3)所述AAV-Core或AAV-Cap或AAV-Rep骨架质粒相同的IIS型限制性内切酶位点。

18. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)所述异源功能性基因表达元件至少包含启动子、基因表达框、转录和转录后调控序列。

19. 如权利要求18所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)所述异源功能性基因表达元件中转录和转录后调控序列包括但不限于cw3sl、WPRE、hGH polyA、bGH polyA。

20. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)所述异源功能性基因表达元件、经修饰的Cap基因表达框与经修饰的AAV Rep基因表达框均不含有IIS型限制性内切酶识别位点。

21. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)所述异源功能性基因表达元件、经修饰的Cap基因表达框与经修饰的AAV Rep基因表达框均不含有IIS型限制性内切酶识别位点BsaI或Eco3II (GGTCTC)。

22. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)中经修饰的Cap基因表达框插入至AAV-Cap骨架质粒的多克隆位点, 异源功能性基因表达元件插入至AAV-Core骨架质粒的多克隆位点, 经修饰的AAV Rep基因表达框插入AAV-Rep骨架质粒的多克隆位点采取同源重组克隆技术或酶切连接法。

23. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(5)所述三个质粒Golden gate组装条件为: 1) 质粒的组装需求量 (ng) = $0.0345 \times \text{pAAV-Rep或pAAV-Cap或pAAV-Core的质粒大小}$, T4 DNA Ligase Buffer (10×) 2 μL , Golden Gate Enzyme Mix 1 μL , 补充ddH₂O至20 μL ; 2) 37°C (1 h) $\rightarrow$ 60°C (5 min) $\rightarrow$ 4°C (∞)。

24. 如权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(5)所述转化Stbl3感受态细胞的剂量为5 μL 。

25. 权利要求1-24任一项所述制备方法得到的杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor。

26. 权利要求25所述杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor在生产rAAV中的应用。

27. 一种生产rAAV的方法，其特征在于，包括以下步骤：

通过Bac-to-Bac系统，将权利要求25所述的转移载体pAAV-Donor转座至杆状病毒基因组中，获得重组杆粒；

提取相应的重组杆粒，并转染宿主细胞拯救出重组杆状病毒BEV（P1代）；

将获得的P1代重组杆状病毒BEV经连续传代后感染宿主或宿主细胞系，感染一定时间后，收获细胞纯化即得到rAAV。

28. 如权利要求27所述的方法，其特征在于，所述杆状病毒基因组为AcMNPV、BmNPV或ApNPV；

所述宿主细胞来源于昆虫的卵巢、精巢、胚胎、成虫盘、中肠、脂肪体或血细胞；

所述Bac-to-Bac系统为苜蓿银纹夜蛾杆状病毒（AcMNPV）表达系统；

所述宿主细胞为 Expi-sf9。

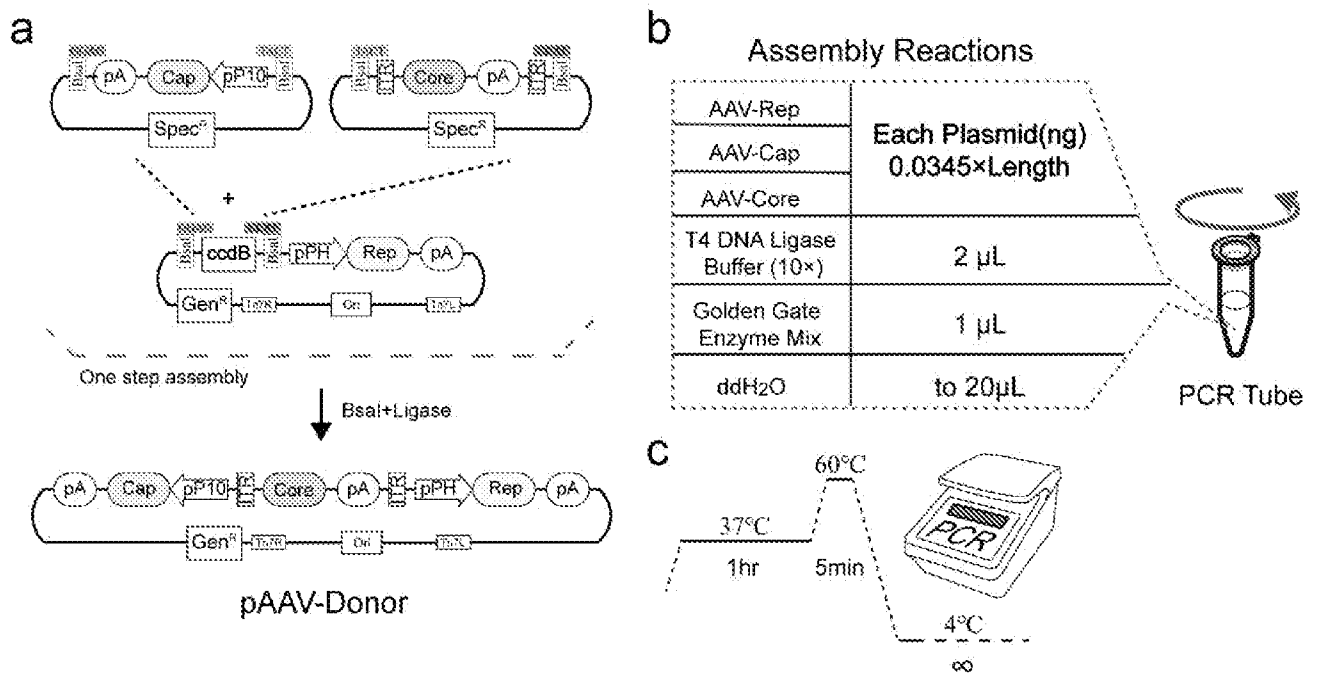


图 1

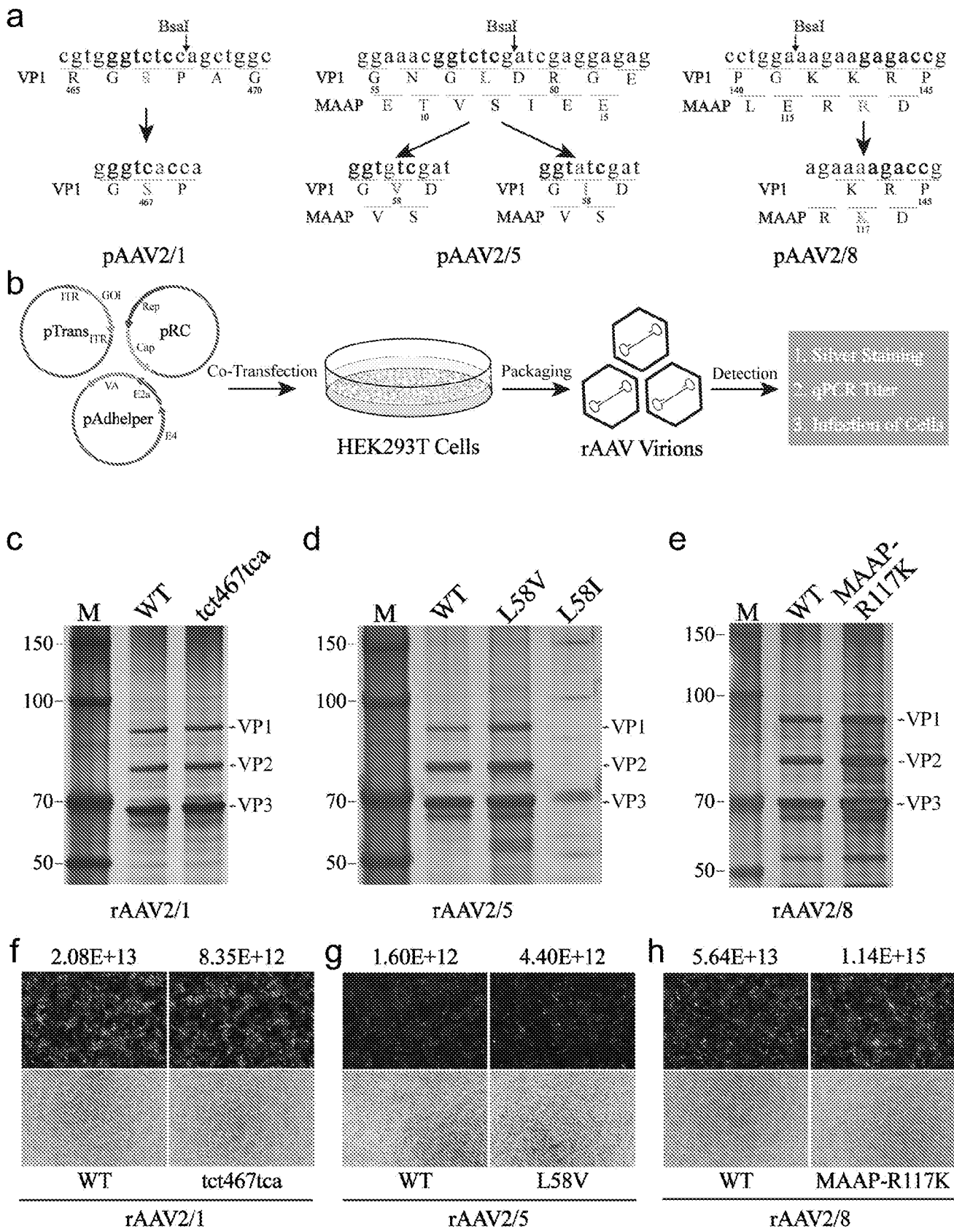


图 2

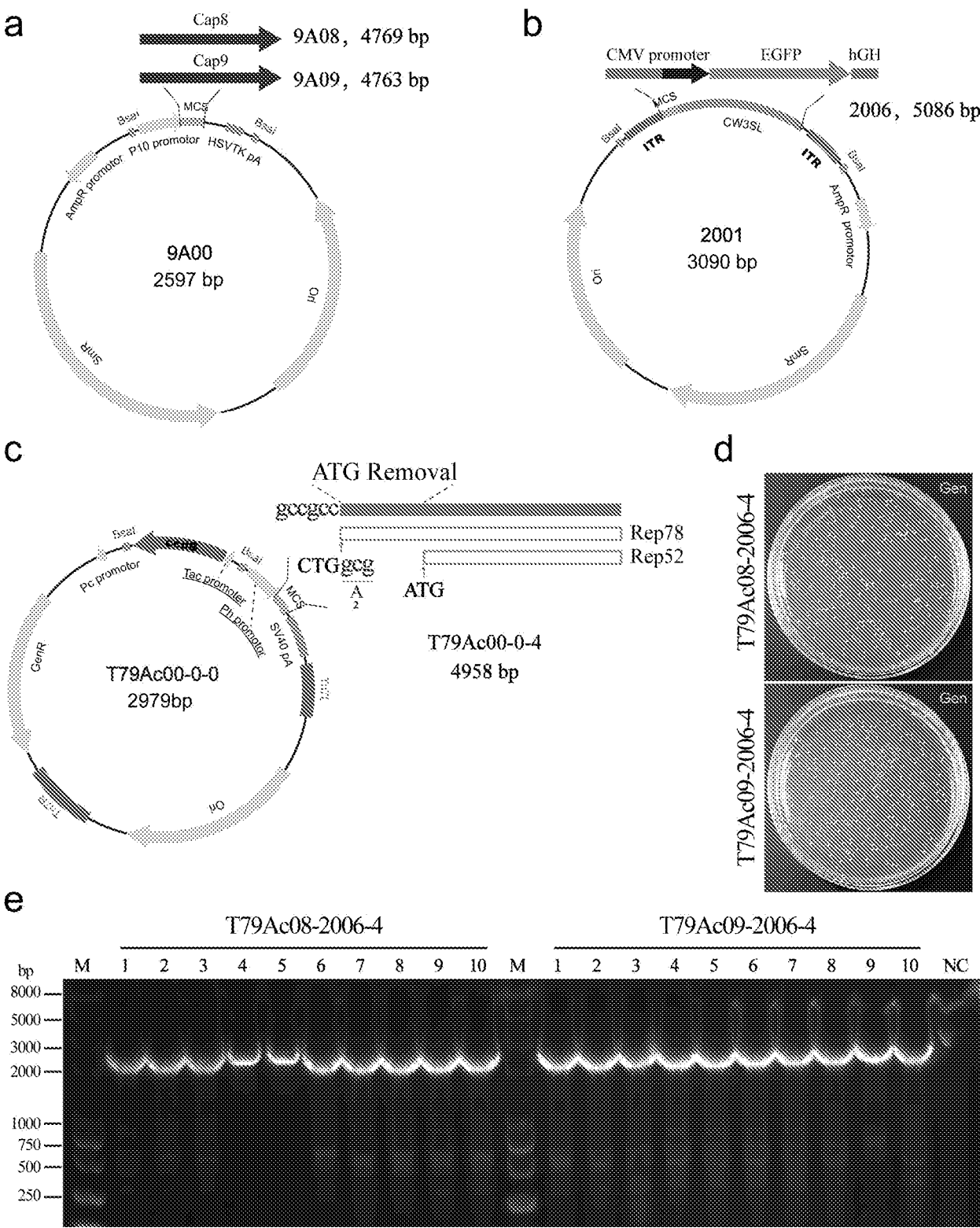


图 3

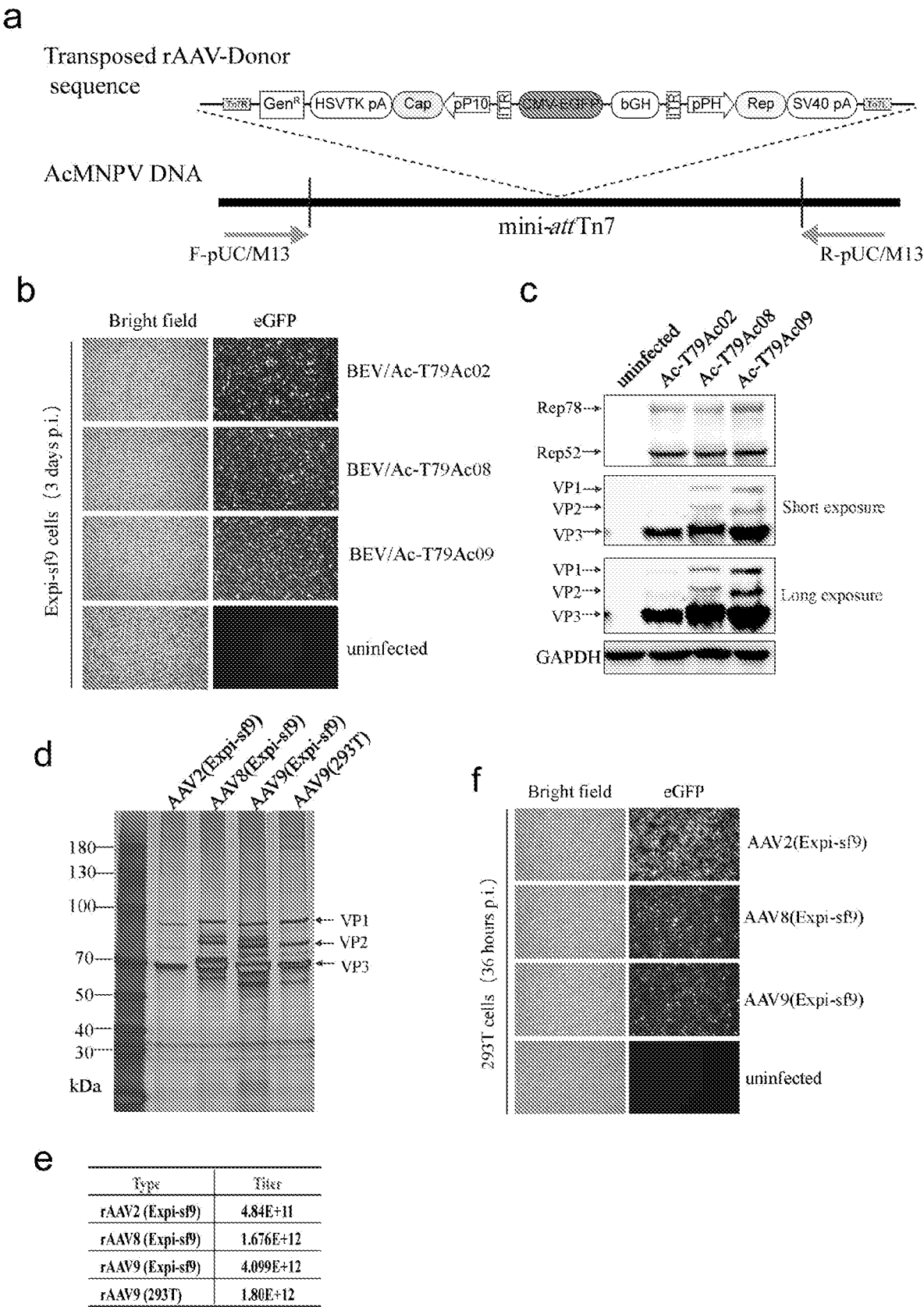


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/139457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/866(2006.01)i; C12N15/864(2006.01)i; C12N7/01(2006.01)i; C12N5/10(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)

IPC: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, CNTXT, CJFD, ENTXTC, VEN, ENTXT, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Science, PubMed: 中国科学院深圳先进技术研究院, 文鹏杰, 腺相关病毒, 衣壳, Golden gate 克隆, Golden gate 组装, IIS型限制酶, II型S型限制酶, 密码子, 苜蓿银纹夜蛾杆状病毒, SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES, AAV, adeno associated virus, Cap, VP1, VP2, VP3, Rep, Rep78, Rep52, Core, gene, Golden gate, GGC, codon, BsaI, Eco31I, GGTCTC, AcMNPV

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 116355936 A (LEVOSTAR BIOTECH LLC) 30 June 2023 (2023-06-30) claims 1-10	1-28
A	WO 2022166027 A1 (GENMEDICN BIOPHARMA INC.) 11 August 2022 (2022-08-11) claims 1-10	1-28
A	LUO, Yonglun et al. "Efficient Construction of rAAV-Based Gene Targeting Vectors by Golden Gate Cloning" <i>BioTechniques</i> , Vol. 56, No. 5, 31 May 2014 (2014-05-31), abstract, page 267, paragraph 2-page 268, paragraph 1, and figure 4	1-28



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
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 September 2024

Date of mailing of the international search report

10 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/139457

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/139457

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	116355936	A	30 June 2023	None	
WO	2022166027	A1	11 August 2022	None	

A. 主题的分类

C12N15/866(2006.01)i; C12N15/864(2006.01)i; C12N7/01(2006.01)i; C12N5/10(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)

IPC: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;CNTXT;CJFD;ENTXTC;VEN;ENTXT;CNKI;万方;ISI Web of Science;PubMed; 中国科学院深圳先进技术研究院, 文鹏杰, 腺相关病毒, 衣壳, Golden gate 克隆, Golden gate 组装, IIS型限制酶, II型S型限制酶, 密码子, 苜蓿银纹夜蛾杆状病毒, SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCEDTECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES, AAV, adeno associated virus , Cap, VP1, VP2, VP3, Rep, Rep78, Rep52, Core , gene, Golden gate, GG-C, codon, BsaI, Eco31I, GGTCTC, AcMNPV

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 116355936 A (苏州左旋星生物科技有限公司) 2023年6月30日 (2023 - 06 - 30) 权利要求1-10	1-28
A	WO 2022166027 A1 (GENMEDICN BIOPHARMA INC) 2022年8月11日 (2022 - 08 - 11) 权利要求1-10	1-28
A	Yonglun Luo 等. "Efficient Construction of rAAV-Based Gene Targeting Vectors by Golden Gate Cloning" BioTechniques, 第56卷, 第5期, 2014年5月31日 (2014 - 05 - 31), 摘要, 第267页第2段-第268页第1段, 图4	1-28

☐ 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

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"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

2024年9月4日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月10日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

夏文静

电话号码 (+86) 0512-88996514

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

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/CN2023/139457

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	116355936	A	2023年6月30日	无	
WO	2022166027	A1	2022年8月11日	无	