

(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
2019年12月19日 (19.12.2019)

(10) 国际公布号
WO 2019/237376 A1

(51) 国际专利分类号:

CI2N 15/12 (2006.01) *CI2N 5/22* (2006.01)
CI2N 15/86 (2006.01)

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/091706

(22) 国际申请日: 2018年6月16日 (16.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳市博奥康生物科技有限公司
(SHENZHEN BIOCAN TECHNOLOGIES CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽街道珠光路134号珠光创新科技园1栋509室毛吉炎, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 毛吉炎(MAO, Jiyang); 中国广东省深圳市南山区西丽街道珠光路134号珠光创新科技园1栋509室, Guangdong 518055 (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)。

(54) **Title:** METHOD FOR SITE-DIRECTED INTEGRATION OF TXGP1 GENE INTO RAJI CELL AND USE THEREOF

(54) 发明名称: TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法及其应用

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for the site-directed integration of the TXGP1 gene into a Raji cell, which method uses an insect protein expression system to synthesize the necessary components required for a recombinant adeno-associated virus (rAAV), and achieves the aim of integrating the TXGP1 gene in a site-directed manner into the AAVS1 locus of chromosome 19 in a Raji cell.

(57) 摘要: 一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法, 其借助昆虫蛋白表达系统合成重组腺相关病毒(rAAV)所需的必要元件, 并实现将TXGP1基因定点整合至Raji细胞19号染色体AAVS1位点的目的。



WO 2019/237376 A1

TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域。更具体地说，本发明涉及TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法及其应用。

背景技术

[0002] TXGP1是TNF受体超家族成员之一，为I型跨膜糖蛋白。TXGP1的表达谱局限于活化的CD4+和CD8+ T细胞表面，且以CD4+ T细胞为主。人TXGP1配体属TNF家庭成员，为II型跨膜糖蛋白。IMD16/TXGP1是一对重要的协同刺激分子，在机体的免疫应答和多种疾病中起重要作用，其相互作用能促进CD+4 T细胞的活化、增殖、迁移，延长其寿命，并促进生发中心的形成和DC的分化成熟。

发明概述

技术问题

[0003] TXGP1能协同刺激T细胞的活化，促进B细胞产生高效价抗体和类别转换，介导IMD16+T细胞向炎性反应部位浸润，在肿瘤的免疫治疗中起重要的作用，其潜在的临床转化价值很大，需进行扎实的研究方可投入实际应用，但现有技术中缺乏敲除TXGP1基因表达的手段，对相关研究的进展造成了一定的阻碍。

[0004] 腺相关病毒（AAV）是一种无包膜的单链DNA病毒，其具有安全性好、嗜性广泛、可感染分裂或不分裂的细胞、理化性质稳而易于保存等优点。携带外源基因的重组腺相关病毒（rAAV）可将外源基因定点整合到宿主基因组上，实现外源基因在宿主细胞体内的长期稳定表达。

问题的解决方案

技术解决方案

[0005] 本发明的目的在于提供一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法，使改造后的Raji细胞稳定过表达TXGP1蛋白。

[0006] 为了实现根据本发明的这些目的和其它优点，提供了一种TXGP1基因定点整合

至Raji细胞的方法，其包括以下步骤：

- [0007] 1) 设计包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒，并委托合成；
- [0008] 2) 将所述包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒插入pFastBac1载体中，构建得到质粒pFastBac1-ITR-TXGP1；
- [0009] 3) 以pAAV-RC载体为模板，分别以pRC-F和pRC-R为上下游引物，扩增Rep组件和Cap组件融合序列，然后将其插入pFastBac1载体中，获得pFastBac1-RC载体。其中，pRC-F引物的序列为5'-GACTAGTGCCACCATGCCGGGGTTTTACGAG-3'，pRC-R引物的序列为5'-TAGCATGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGT-3'；
- [0010] 4) 将步骤2)得到的pFastBac1-ITR-TXGP1载体和步骤3)得到的pFastBac1-RC载体分别转化感受态大肠杆菌DH10Bac，蓝白斑筛选出阳性克隆，抽提重组Bacmid，获得Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC；
- [0011] 5) 用Cellfectin II Reagent分别将Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC转染处于对数生长期的sf9细胞。感染120 h后收集培养上清，即为P1。取P1连续感染sf9细胞两次后获得高滴度的P3病毒Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC；
- [0012] 6) 用Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC共同感染处于对数生长期的sf9细胞，继续培养72 h后，收集细胞，分别提取DNA并分离出其中的小分子量DNA；
- [0013] 7) 通过电转将步骤6)获得的小分子量DNA转染至处于对数生长期的Raji细胞中，继续培养72 h后，对TXGP1的表达情况及其插入位点进行鉴定。
- [0014] 其中，所述包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒的序列如SEQ ID No.1所示。
- [0015] 其中，所述定点整合位点为Raji细胞的19号染色体AAVS1位点。
- [0016] 优选的，步骤5)所述Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC载体的比例为3-10。
- [0017] 优选的，步骤7)所述的电转条件为：电压为600~900V、脉冲时间为20~30 ms。

发明的有益效果

有益效果

- [0018] 本发明可实现TXGP1基因在Raji细胞内的定点整合于19号染色体AAVS1位点，使其获得持续过表达TXGP1蛋白的能力，并且借助昆虫蛋白表达系统合成AAV

所必需的元件，避免了大肠杆菌基因克隆系统带来的潜在内毒素污染的风险，极大地提升了Raji细胞用于临床前研究的安全性和实用性。

对附图的简要说明

附图说明

- [0019] 图1为包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒结构示意图；
- [0020] 图2为TXGP1基因荧光定量PCR的结果图；
- [0021] 图3为PCR鉴定TXGP1基因插入位点的结果图，其中M-Marker，1-对照组，2-实验组。

发明实施例

本发明的实施方式

- [0022] 下面结合附图与具体实施例对本发明做进一步的说明。
- [0023] SpeI和SphI限制酶购自Fermentas，PCR Cleanup试剂盒购自Omega bio-tek，T4 DNA连接酶购自NEB，感受态大肠杆菌DH5 α 和DH10Bac购自Invitrogen，pFastBac1和pAAV-RC载体购自BioVector NTCC保藏中心，
- [0024] 实施例一：**pFastBac1-ITR-TXGP1**载体的构建
- [0025] 根据GenBank中提供的人TXGP1基因的序列，设计包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒，其序列如SEQ ID No.1所示，在其5'端和3'端分别加上SpeI和SphI酶切位点序列，委托上海生工以基因合成的方式合成该序列。
- [0026] 合成所得的包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒整合在pUC19-ITR-TXGP1载体上。使用SpeI和SphI酶对pUC19-ITR-TXGP1载体进行酶切，琼脂糖凝胶电泳后回收~1500 bp的目的片段AAV-ITR-TXGP1。
- [0027] 使用SpeI和SphI酶对pFastBac1载体进行酶切，PCR Cleanup试剂盒回收经酶切的pFastBac1载体。
- [0028] 取pFastBac1载体50 μ g，按pFastBac1载体与AAV-ITR-TXGP1的摩尔比为1:5量取AAV-ITR-TXGP1，混匀后用T4 DNA连接酶，16 $^{\circ}$ C连接过夜。转化感受态大肠杆菌DH5 α ，氨苄青霉素筛选培养并挑单克隆菌株，测序鉴定。大量培养测序正确的大肠杆菌，提取重组载体pFastBac1-ITR-TXGP1。
- [0029] 实施例二：**pFastBac1-RC**载体的构建

- [0030] 以pAAV-RC载体为模板，分别以pRC-F和pRC-R为上下游引物，扩增Rep组件和Cap组件融合序列，纯化回收后使用SpeI和SphI酶进行酶切，然后将其按照实施例一中的步骤将其插入pFastBac1载体中，获得pFastBac1-RC载体。其中，pRC-F引物的序列为5'-GACTAGTGCCACCATGCCGGGGTTTTACGAG-3'，pRC-R引物的序列为5'-TAGCATGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGT-3'。
- [0031] 转化感受态大肠杆菌DH5 α ，氨苄青霉素筛选培养并挑单克隆菌株，测序鉴定。大量培养测序正确的大肠杆菌，提取重组载体pFastBac1-RC。
- [0032] 实施例三：高滴度杆状病毒Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC的制备
- [0033] 将pFastBac1-ITR-TXGP1载体和pFastBac1-RC载体分别转化感受态大肠杆菌DH10Bac，蓝白斑筛选出阳性克隆，抽提重组Bacmid，获得Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC。
- [0034] 用Cellfectin II Reagent分别将Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC转染处于对数生长期的sf9细胞。感染120 h后收集培养上清，即为P1。取P1连续感染sf9细胞两次后获得高滴度的P3病毒Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC。
- [0035] 实施例四：定点插入TXGP1基因的Raji细胞的构建及鉴定
- [0036] 用实施例三获得的P3病毒Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC共同感染处于对数生长期的sf9细胞，继续培养72 h后，收集细胞，分别提取DNA并分离出其中的小分子量DNA，并通过电转将其转染至处于对数生长期的Raji细胞中，继续培养72 h。
- [0037] 荧光定量PCR检测经转染的Raji细胞（实验组）和正常Raji细胞（对照组）的TXGP1基因表达水平，其结果如图2所示，可以看到，实验组细胞的TXGP1基因表达水平显著高于对照组细胞，说明TXGP1基因序列被成功整合到了Raji细胞中。
- [0038] 接下来对TXGP1基因的插入位点进行鉴定。以Raji细胞AAVS1位点部分序列（登录号：S51329.1）5'端序列为上游引物（序列为：5'-GAATTCCTAACTGCCCGGGGC-3'），以TXGP1基因5'端部分序列为下游引物（序列为：5'-GAAACCTTCTCCTTCTTATA-3'）进行PCR，其结果如图3所示。可以看到，实验组细胞出现了~1000 bp的条带，而对照组细胞无任何条带。

出现，说明TXGP1基因已被成功整合至AAVS1位点中。

工业实用性

[0039] 本发明可实现TXGP1基因在Raji细胞内的定点整合于19号染色体AAVS1位点，使其获得持续过表达TXGP1蛋白的能力，并且借助昆虫蛋白表达系统合成AAV所必需的元件，避免了大肠杆菌基因克隆系统带来的潜在内毒素污染的风险，极大地提升了Raji细胞用于临床前研究的安全性和实用性。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法，其特征在于，包括以下步骤：
- 1) 设计包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒，并委托合成；
 - 2) 将所述包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒插入pFastBac1载体中，构建得到质粒pFastBac1-ITR-TXGP1；
 - 3) 以pAAV-RC载体为模板，分别以pRC-F和pRC-R为上下游引物，扩增Rep组件和Cap组件融合序列，然后将其插入pFastBac1载体中，获得pFastBac1-RC载体。其中，pRC-F引物的序列为5'-GACTAGTGCCACCATGCCGGGGTTTTACGAG-3'，pRC-R引物的序列为5'-TAGCATGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGT -3'；
 - 4) 将步骤2) 得到的pFastBac1-ITR-TXGP1载体和步骤3) 得到的pFastBac1-RC载体分别转化感受态大肠杆菌DH10Bac，蓝白斑筛选出阳性克隆，抽提重组Bacmid，获得Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC；
 - 5) 用Cellfectin II Reagent分别将Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC转染处于对数生长期的sf9细胞。感染120 h后收集培养上清，即为P1。取P1连续感染sf9细胞两次后获得高滴度的P3病毒Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC；
 - 6) 用Bac-ITR-TXGP1和Bac-RC共同感染处于对数生长期的sf9细胞，继续培养72 h后，收集细胞，分别提取DNA并分离出其中的小分子量DNA；
 - 7) 通过电转将步骤6) 获得的小分子量DNA转染至处于对数生长期的Raji细胞中，继续培养72 h后，对TXGP1的表达情况及其插入位点进行鉴定。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法，其特征在于，步骤1) 所述包含TXGP1基因的AAV-ITR表达盒的序列如SEQ ID No.1所示。
- [权利要求 3] 如权利要求1所述的一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法，其

特征在于，所述定点整合位点为Raji细胞的19号染色体AAVS1位点。

[权利要求 4] 如权利要求1所述的一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法，其特征在于，步骤5) 所述Bacmid-ITR-TXGP1和Bacmid-RC载体的比例为3-10。

[权利要求 5] 如权利要求1所述的一种TXGP1基因定点整合至Raji细胞的方法，其特征在于，步骤7) 所述的电转条件为：电压为600~900V、脉冲时间为20~30 ms。



图 1

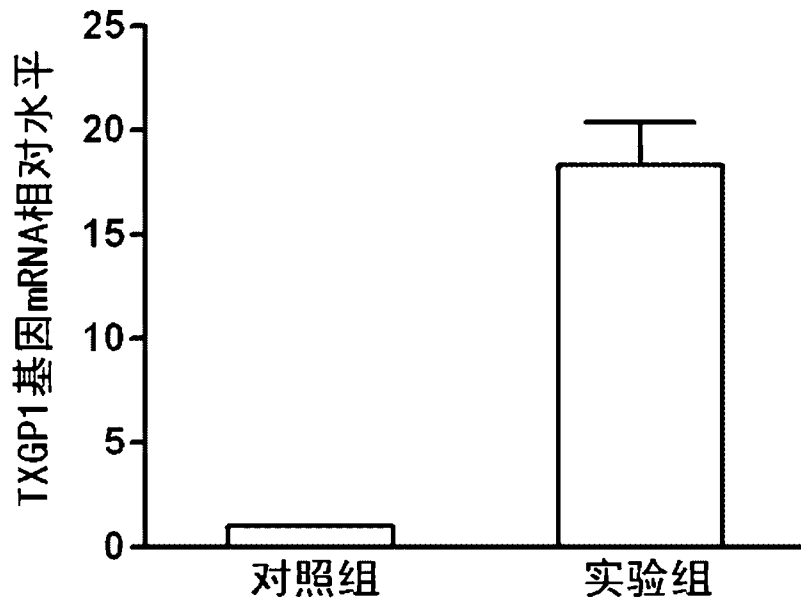


图 2

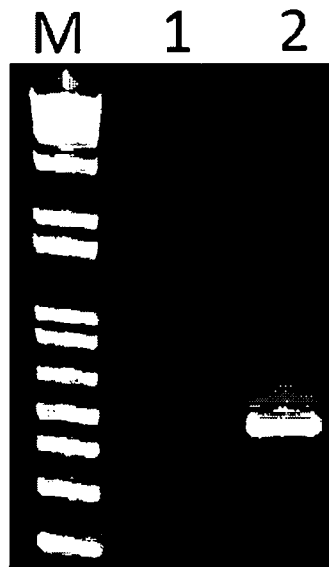


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 5/22(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, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED: 腺相关病毒, 载体, adeno-associated virus, aav, vector, sF9, paav-rc, itr, bacmid, pfastbac, rep, cap, OX401, TNFSF4, gp34, txgp1, raji, s1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102686732 A (GENETHON) 19 September 2012 (2012-09-19) see description, paragraphs 39, 40, and 51	1-5
A	CN 104136613 A (VIROVEK INC.) 05 November 2014 (2014-11-05) see entire document	1-5
X	夏玉龙 (XIA, Yulong). "应用昆虫细胞表达系统生产用于基因治疗的重组腺相关病毒的研究 (Non-official translation: Production of Recombinant Adeno-Associated Virus for Gene Therapy by Insect Cell Expression System)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(基础科学辑) (Basic Sciences, China Master's Theses Full-text Database), No. S2, 15 December 2013 (2013-12-15), ISSN: 1674-0246, A006-410, see pp. 10-14, 20-45, 47-55, 59-61, 67	1-5

 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

14 February 2019

Date of mailing of the international search report

20 March 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091706

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	陈雅宁等 (CHEN, Yaning et al.). "Bac-to-Bac 杆状病毒昆虫表达系统介导的重组腺相关病毒制备 (Production of Adeno-Associated Virus Mediated by Bac-To-Bac Baculovirus Insect Expression System)" <i>中华实验外科杂志 (Chinese Journal of Experimental Surgery)</i> , Vol. 29, No. 7, 31 July 2012 (2012-07-31), ISSN: 1001-9030, pages 1363-1366, see page 1364	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091706

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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/CN2018/091706

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102686732	A	19 September 2012	US	8993317	B2	31 March 2015
				HU	E025056	T2	28 January 2016
				WO	2011020710	A3	05 May 2011
				ES	2627744	T3	31 July 2017
				EP	2467489	B1	27 May 2015
				CA	2771250	A1	24 February 2011
				PT	2933336	T	12 June 2017
				EP	2933336	A2	21 October 2015
				EP	2933336	A3	02 December 2015
				US	2012149010	A1	14 June 2012
				EP	2467489	A2	27 June 2012
				EP	2292781	A1	09 March 2011
				EP	3187589	A3	20 September 2017
				EP	3187589	A2	05 July 2017
				ES	2542740	T3	11 August 2015
				US	2018127728	A1	10 May 2018
				US	2015252335	A1	10 September 2015
				DK	2467489	T3	20 July 2015
				PT	2467489	E	04 September 2015
				US	9862934	B2	09 January 2018
DK	2933336	T3	12 June 2017				
WO	2011020710	A2	24 February 2011				
EP	2933336	B1	29 March 2017				
CN	104136613	A	05 November 2014	JP	5998229	B2	28 September 2016
				EP	2788489	B1	15 March 2017
				US	9175312	B2	03 November 2015
				CA	2856364	A1	13 June 2013
				NZ	612227	A	24 April 2015
				US	2014296324	A1	02 October 2014
				DK	2788489	T3	15 May 2017
				EP	2788489	A4	22 July 2015
				CA	2856364	C	27 June 2017
				AU	2012348332	A1	11 July 2013
				JP	2015500645	A	08 January 2015
				EP	2788489	A1	15 October 2014
				WO	2013085624	A1	13 June 2013
				CN	104136613	B	29 December 2017
				ES	2623259	T3	10 July 2017
				AU	2012348332	B2	29 June 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/091706

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 5/22(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, ISI WEB OF SCIENCE, PUBMED:腺相关病毒, 载体, adeno-associated virus, aav, vector, sf9, paav-rc, itr, bacmid, pfastbac, rep, cap, OX401, TNFSF4, gp34, txgp1, raji, s1</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 102686732 A (吉尼松公司) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 参见说明书第39, 40和51段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104136613 A (威洛克有限公司) 2014年 11月 5日 (2014 - 11 - 05) 参见全文</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>夏玉龙. "应用昆虫细胞表达系统生产用于基因治疗的重组腺相关病毒的研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(基础科学辑), 第S2期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), ISSN: 1674-0246, A006-410, 参见第10-14, 20-45, 47-55, 59-61, 67页</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>陈雅宁等. "Bac-to-Bac杆状病毒昆虫表达系统介导的重组腺相关病毒制备" 中华实验外科杂志, 第29卷, 第7期, 2012年 7月 31日 (2012 - 07 - 31), ISSN: 1001-9030, 第1363-1366页, 参见第1364页</td> <td>1-5</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 102686732 A (吉尼松公司) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 参见说明书第39, 40和51段	1-5	A	CN 104136613 A (威洛克有限公司) 2014年 11月 5日 (2014 - 11 - 05) 参见全文	1-5	X	夏玉龙. "应用昆虫细胞表达系统生产用于基因治疗的重组腺相关病毒的研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(基础科学辑), 第S2期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), ISSN: 1674-0246, A006-410, 参见第10-14, 20-45, 47-55, 59-61, 67页	1-5	X	陈雅宁等. "Bac-to-Bac杆状病毒昆虫表达系统介导的重组腺相关病毒制备" 中华实验外科杂志, 第29卷, 第7期, 2012年 7月 31日 (2012 - 07 - 31), ISSN: 1001-9030, 第1363-1366页, 参见第1364页	1-5
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 102686732 A (吉尼松公司) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 参见说明书第39, 40和51段	1-5															
A	CN 104136613 A (威洛克有限公司) 2014年 11月 5日 (2014 - 11 - 05) 参见全文	1-5															
X	夏玉龙. "应用昆虫细胞表达系统生产用于基因治疗的重组腺相关病毒的研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(基础科学辑), 第S2期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), ISSN: 1674-0246, A006-410, 参见第10-14, 20-45, 47-55, 59-61, 67页	1-5															
X	陈雅宁等. "Bac-to-Bac杆状病毒昆虫表达系统介导的重组腺相关病毒制备" 中华实验外科杂志, 第29卷, 第7期, 2012年 7月 31日 (2012 - 07 - 31), ISSN: 1001-9030, 第1363-1366页, 参见第1364页	1-5															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																	
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																
2019年 2月 14日	2019年 3月 20日																
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																
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	潘俊宇																
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411108																

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/CN2018/091706

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	102686732	A	2012年 9月 19日	US	8993317	B2	2015年 3月 31日
				HU	E025056	T2	2016年 1月 28日
				WO	2011020710	A3	2011年 5月 5日
				ES	2627744	T3	2017年 7月 31日
				EP	2467489	B1	2015年 5月 27日
				CA	2771250	A1	2011年 2月 24日
				PT	2933336	T	2017年 6月 12日
				EP	2933336	A2	2015年 10月 21日
				EP	2933336	A3	2015年 12月 2日
				US	2012149010	A1	2012年 6月 14日
				EP	2467489	A2	2012年 6月 27日
				EP	2292781	A1	2011年 3月 9日
				EP	3187589	A3	2017年 9月 20日
				EP	3187589	A2	2017年 7月 5日
				ES	2542740	T3	2015年 8月 11日
				US	2018127728	A1	2018年 5月 10日
				US	2015252335	A1	2015年 9月 10日
				DK	2467489	T3	2015年 7月 20日
				PT	2467489	E	2015年 9月 4日
				US	9862934	B2	2018年 1月 9日
DK	2933336	T3	2017年 6月 12日				
WO	2011020710	A2	2011年 2月 24日				
EP	2933336	B1	2017年 3月 29日				
CN	104136613	A	2014年 11月 5日	JP	5998229	B2	2016年 9月 28日
				EP	2788489	B1	2017年 3月 15日
				US	9175312	B2	2015年 11月 3日
				CA	2856364	A1	2013年 6月 13日
				NZ	612227	A	2015年 4月 24日
				US	2014296324	A1	2014年 10月 2日
				DK	2788489	T3	2017年 5月 15日
				EP	2788489	A4	2015年 7月 22日
				CA	2856364	C	2017年 6月 27日
				AU	2012348332	A1	2013年 7月 11日
				JP	2015500645	A	2015年 1月 8日
				EP	2788489	A1	2014年 10月 15日
				WO	2013085624	A1	2013年 6月 13日
				CN	104136613	B	2017年 12月 29日
				ES	2623259	T3	2017年 7月 10日
				AU	2012348332	B2	2017年 6月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)