

(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
2022 年 1 月 20 日 (20.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/012028 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/869 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/074620

(22) 国际申请日: 2021 年 2 月 1 日 (01.02.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010680925.0 2020 年 7 月 15 日 (15.07.2020) CN

(71) 申请人: 东莞市东阳光生物药研发有限公司 (**DONGGUAN HEC BIOPHARMACEUTICAL R&D CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省东莞市长安镇长安振安中路 368 号 7 号楼 102 室, Guangdong 523871 (CN)。广东东阳光药业有限公司 (**SUNSHINE LAKE PHARMA CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省东莞市松山湖科技产业园区, Guangdong 523000 (CN)。

(72) 发明人: 张旭辉 (**ZHANG, Xuhui**); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。罗显麟 (**LUO, Xianlin**); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。何亮亮 (**HE, Liangliang**); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。宁维瑜 (**NING, Weiyu**); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。陈小锋 (**CHEN, Xiaofeng**); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。李文佳 (**LI, Wenjia**); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, 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:** CONSTRUCT, ONCOLYTIC VIRUS AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 构建体、溶瘤病毒及其应用

(57) **Abstract:** Provided are a construct, an oncolytic virus and an application thereof. The construct knocks out the ICP34.5 gene and the ICP47 gene of herpes simplex virus type 1, inserts an immunostimulatory factor expression sequence at the UL23 gene, and constructs the oncolytic virus. The oncolytic virus selectively infects tumor cells for replication and proliferation, and the sensitivity to tumor cells is increased.

(57) 摘要: 提供一种构建体、溶瘤病毒及其应用。该构建体将 I 型单纯疱疹病毒的 ICP34.5 基因、ICP47 基因敲除, 并在 UL23 基因上插入免疫刺激因子表达序列, 构建得到的溶瘤病毒, 可选择性在肿瘤细胞中感染复制增殖, 并且对肿瘤细胞的敏感性提高。



WO 2022/012028 A1

构建体、溶瘤病毒及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术和基因治疗领域，具体地，本发明涉及一种构建体、敏感性提高的溶瘤病毒以及制药用途。

背景技术

溶瘤病毒具有良好的抗肿瘤效果，其选择性在肿瘤细胞上复制直接裂解杀伤肿瘤细胞，释放的肿瘤相关抗原通过抗原呈递作用，激活了机体抗肿瘤免疫，达到抑制肿瘤生长甚至肿瘤完全消退的效果。由受感染的肿瘤细胞碎片引起的抗肿瘤免疫响应可通过加入免疫刺激因子而被放大。为了进一步提升溶瘤病毒治疗效果，通常可以将一些免疫调节或免疫激活基因插入病毒基因组，使病毒在肿瘤细胞上复制的同时表达相应基因，并释放在肿瘤周围，改善肿瘤免疫微环境，起到增强抗肿瘤免疫的作用。

IL12即白介素12，一种具有免疫调节活性的细胞因子。

利用溶瘤病毒表达IL12，使肿瘤中IL12的水平提高，可以避免传统通过静脉给药带来的全身性毒副作用，提高安全性。虽然现有技术中不乏溶瘤病毒表达IL12的报道，如专利CN202010145491.4，但是溶瘤病毒的具体构建策略及外源基因(如IL12)的插入位点不同，对所构建的溶瘤病毒的生物活性影响是未可知的。至今还没有关于表达IL12的溶瘤病毒的敏感性的报道。

将IL12运用在抗肿瘤领域，构建的新型溶瘤病毒HSV1-IL12 (+)，具有高效、特异性强等优点，还可引起特异的抗肿瘤免疫反应，提升对肿瘤细胞的敏感性。

发明内容

本申请旨在至少在一定程度上解决上述背景技术中的技术问题之一。

为此，在本发明的第一方面，本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例，所述构建体的载体来源于 HSV，所述构建体携带免疫刺激因子基因编码框，所述免疫刺激因子基因编码框设置于 UL23 基因位置。发明人在实验中意外而惊喜发现，当免疫刺激因子基因编码框设置于 UL23 基因位置时，构建体可持续高表达免疫刺激因子。

根据本发明的实施例，上述构建体还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述构建体的 ICP47 和双拷贝 ICP34.5 被敲除，

敲除 HSV 基因组中的复制非必需基因 ICP47，可提高被病毒感染的肿瘤细胞表面 MHC-I 的表达和细胞抗原呈递的能力；敲除双拷贝 ICP34.5，可使单纯疱疹病毒（HSV）在正常细胞内复制受限，选择性地在肿瘤细胞中复制，进而提高 HSV 病毒的用药安全性。

根据本发明的实施例，所述免疫刺激因子基因编码框设置于 UL23 基因序列的第 387-521 位核苷酸之间位置。需要说明的是，本申请所述的 UL23 基因序列编码是以 UL23 基因起始密码子的第一位核苷酸为第 1 位进行顺序编码的，UL23 基 因 的 序 列 可 参 考 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001806.2?report=genbank&from=46609&to=47803&strand=true。根据本发明的实施例，免疫刺激因子基因编码框设置于 UL23 基因序列的第 387-521 位核苷酸之间是通过将 UL23 基因序列的第 388-520 位核苷酸敲除，之后将免疫刺激因子基因编码框插入 UL23 基因序列的第 387-521 位核苷酸之间获得的。

根据本发明的实施例，IL-12 基因编码框与启动子可操作地连接，所述启动子包括选自 CMV、CAG、EF1 α 、劳斯肉瘤病毒长末端重复序列（RSV LTR）、金属硫蛋白 I（MTI）的至少之一，所述免疫刺激剂选自 GM-CSF、IL 2、IL 5、IL 7、IL 12、IL 15、IL 24 和 IL 27 的至少之一。

根据本发明的实施例，所述启动子为 CMV。

根据本发明的实施例，所述免疫刺激因子为 IL12。

经试验验证，当 IL-12 基因编码框设置于 HSV 载体的 UL23 基因位置时，上述构建体可持续高表达 IL-12，不仅高选择地在肿瘤细胞内繁殖感染，而且还具有免疫调节作用，确保肿瘤细胞被机体自身的免疫反应彻底清除。

根据本发明的实施例，所述 HSV 为 HSV1。发明人发现，HSV2 可能引起生殖器感染，进而选择 HSV1，安全性进一步提高。

根据本发明的实施例，IL12 基因编码框具有如下所示的核苷酸序列，1) SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；2) 与 1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的核苷酸序列。

atggagccgctggtgacctgggtgggtccccctctctctctctctctggtggtccaggcagggcgctgacctgcagaacca
gtgagtgtgttttcaggacccgccatatccggatgcagactcaggctcggcctcgggcccctagggacctgagatgtatcg
gatatccagtgtacgttacgagtgtcctggcagtatgaggggtccacagctgggtcagccactcctgcggtgttccttag
ctccgggcgctgtgctacttcgccgccgggtcagccaccaggctgcagttctccgaccaggctgggtgtctgtgtgtaca
ctgtcacactctgggtggaatcctgggcccaggaaccagacagagaagtctcctgaggtgacctgcagctctacaactcag
ttaaataatgagcctcctctgggagacatcaaggtgtccaagttggccgggcagctgcgtatggagtgggagaccccgata
accaggttggtgtgaggtgcagttccggcaccggacacccagcagcccatggaagttgggcgactgcggacctcagga
tgtatgatactgagtcctgtcctctgccccctggagatgaatgtggcccaggaattccagctccgacgacggcagctggggag
ccaaggaagttcctggagcaagtgagcagccccgtgtcgttccccctgaaaaacccccacagcctcaggtgagattct
cgggtggagcagctgggcccaggtgggaggaggcggtgacctgaaagagcagccaacccagctggagcttcagaa
gggtgtcaagggctggcgctggcacggaggtcacttaccgactacagctccacatgtgtcctgccgtgtaaggccaag
gccaccaggacctgcacctggggaagatgccctatctctcgggtgtgcctacaacgtggctgtcatctcctcgaaccaatt
tggtcctggcctgaaccagacgtggcacattcctgccgacacccacacagaaccagtggtctgaatatcagcgtcggaa
ccaacgggaccacatgtattggccagcccgggtcagagcatgacgtattgattgaatggcagcctgtgggcccaggac
gggggacctgccacctgcagcctgactgcgccgaagacccggatccggtggaatggcaacctacagctggagtcgag
agtctggggcaatggggcaggaaaagtgttactacattaccatctttgcctctgcgcaccccgagaagctcacctgtggtct
acggctcctgtccacctaccactttgggggaatgctcagcagctgggacaccgcaccacgtctcggtaagaatcatagc
ttggactctgtgtgtgtgactgggacccatccctgtgagcacctgtccggcgctcctaaaggagtagttgtccgctgccga
gatgaagacagcaaacaggtgtcagagcatcccggtcagcccacagagaccaagttaccctcagtgacctgcgggctg
gtgtagcctacacggtgcaggtgcgagcagacacagcgtggctgaggggtgtctggagccagccccagcgcttcagcat
cgaagtgcaggtttctgattggctcatcttctgcctccctggggagcttctgagcatccttctgtggcgctccttggtacctt
ggcctgaacagggccgcacggcacctgtgccgccgctgccacacccctgtgccagctccgccattgagttccctggagg
gaaggagactggcagtgatcaaccagtggtgactccaggaagaggcatccctgcaggaggccctgggtgtagagatg
tcctgggacaaaggcgagaggactgagcctctcgagaagacagagctacctgaggggtgccctgagctggccctggata
cagagttgtccttgaggatggagacaggtgcaaggccaagatgtga (SEQ ID NO:1)。

根据本发明的实施例，所述构建体具有如下所示的核苷酸序列，a) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列；b) 与 a) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%同一性的核苷酸序列。

tcgatgtgtctgtcctccggaagggcccccaacacgatgtttgtgccgggcaaggtcggcgggatgagggccacg

aacgccagcacggcctggggggtcatgctgcccataaggtatcgcgctcttcattgacgtcaatgggtggagtatttac
ggtaaactgccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcc
cgctggcattatgccagtagcatgaccttatgggactttctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgtattaccatg
gtgatgcgggtttggcagtagcatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgt
caatgggagtttgggtggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggc
ggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttactggcttatcgaaa
ttaatacgtactactataggagacccaagctggctagcgtttaaacttaagcttggtagcagctcggtaccactagtcag
tgtggatggagccgctggtagcctgggtgggtccccctctcttctctctctgctgtccaggcagggcgctgcctgcagaac
cagtgagtgctgtttcaggacccgccatatccggatgcagactcaggctcgccctcgggccctaggacactgagatgcta
tcggatatccagtgtacgttacgagtgctcctggcagtagtaggggtcccacagctggggtcagccacttctgcgggtgtgc
cttagctccgggcgtgctgctacttcgccgccggctcagccaccaggctgcagttctccgaccaggctgggggtgctgtg
ctgtacactgtcacactctgggtggaatcctgggccaggaaccagacagagaagtctcctgaggtgacctgcagctctac
aactcagttaaatatgagcctcctctgggagacatcaaggtgtccaagttggccgggcagctgcgtatggagtgggagacc
ccggataaccaggttgggtgctgaggtgcagttccggcacccggacaccagcagcccatggaagtggggcactgcgga
cctcaggatgatgatactgagtcctgcctctgccccctggagatgaatgtggcccaggaattccagctccgacgacggcag
ctgggggagccaaggaagttcctggagcaagtggagcagccccgtgtgcgttccccctgaaaacccccacagcctcagg
tgagattctcgggtggagcagctgggccaggatgggaggaggcggtgacctgaaagagcagccaaccagctggag
cttcagaaggctgtcaagggtggcgctggcacggaggtcacttaccgactacagctccacatgctgtcctgccctgt
aaggccaaggccaccaggacctgcacctggggaagatgcctatctctcgggtgctgcctacaacgtggctgtcatctc
ctcgaaccaatttggctctggcctgaaccagacgtggcacattcctgccgacaccacacagaaccagtggctctgaatat
cagcgtcggaaccaacgggaccaccatgtattggccagccgggctcagagcatgacgtattgcattgaatggcagcctg
tgggccaggacgggggcttggcacctgcagcctgactgcgccgcaagacccggatccggctggaatggcaacctaca
gctggagtcgagagtctggggcaatggggcaggaaaagtgttactacattaccatcttgcctctgcgcaccccgagaagc
tcaccttgtggtctacggtcctgtccacctaaccatttgggggcaatgcctcagcagctgggacaccgcaccacgtctcgt
gaagaatcatagcttggactctgtgtctgtggactgggcaccatccctgctgagcacctgtcccggtcctaaaggagtat
gtgtccgtgccgagatgaagacagcaaacaggtgtcagagcatccgtgcagcccacagagaccaagtaccctca
gtggcctgcgggctgggtgtacgtacacgggtgcaggtgcgagcagacacagcgtggctgaggggtgtctggagccagc
cccagcgttcagcatcgaagtgcaggtttctgattggctcatcttctgcctccctggggagcttctgagcatccttctct
gggcgtccttggctaccttggcctgaacagggccgcacggcacctgtgccgccgctgcccacacctgtgccagctcc
gccattgagttccctggaggggaaggagacttggcagtgatcaaccagtgacttccaggaagaggcatccctgcagg
aggccctgggtgtagagatgtcctgggacaaaaggcgagaggactgagcctctcgagaagacagagctacctgaggggtg

cccctgagctggccctggatacagagttgtccttggaggatggagacaggtgcaaggccaagatgtgacagatatccagc
acagtggcgccgctcgagtctagagggccgtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgtccagccatct
gttggttggccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcat
cgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaat
agcaggcatgctggggatgcgggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggggtatcccc
acgcgccctgtagcggcgcatgaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgcct
agcgcccgtccttctgctttctcccttcttctcgccacgttcgcgggttccccgtggatccccgggtaccgagctccc
cattgttatctgggcgcttgcattaccaccgcgcgtccccggccgatatctaccctggtcgaggcgggtgtgtgtgtgt
agatgttcgcgattgtctcgg (SEQ ID NO:2)。

在本发明的第二方面，本发明提出了一种溶瘤病毒。

根据本发明的实施例，所述溶瘤病毒携带前面所述的构建体。

现有技术中，相较于野生型病毒，改造后的病毒往往对肿瘤敏感性会明显降低，例如 Mckie E A 等的研究显示可降低 100 倍 (Mckie E A, Maclean A R, Lewis A D, et al. Selective in vitro replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP34.5 null mutants in primary human CNS tumours--evaluation of a potentially effective clinical therapy.[J]. British Journal of Cancer, 1996, 74(5): 745-752.)。

根据本发明实施例的溶瘤病毒，HSV1 携带 IL12，不仅保持了在肿瘤细胞中较强的复制能力和对肿瘤细胞较强的杀伤力，增强了病毒株对肿瘤细胞的靶向性，还可通过外源 IL12 基因表达 IL12 蛋白，激活机体抗肿瘤免疫反应。表达 IL12 的根据本发明实施例的溶瘤病毒，可通过瘤内注射的方式使病毒在肿瘤复制并在局部持续高表达 IL12，避免通过静脉给药带来的全身性毒副作用。

根据本发明的实施例，所述溶瘤病毒可持续高表达 IL12。

在本发明的第三方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物包括前面所述的构建体或前面所述的溶瘤病毒。根据本发明的实施例的药物组合物在低剂量就能起效，对于肿瘤细胞杀伤效果佳。

在本发明的第四方面，本发明提出了前面所述的构建体、前面所述的溶瘤病毒或前面所述的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途。

根据本发明的实施例，所述药物用于选择性杀伤肿瘤细胞。

根据本发明的实施例，所述肿瘤为胰腺癌、卵巢癌、咽鳞癌、肺癌、肝癌、黑色素瘤、食道癌、结肠癌。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 是根据本发明实施例的 pMD18-HOM-hIL12 质粒图谱；

图 2 是根据本发明实施例的构建的重组病毒的 PCR 凝胶电泳检测图；

图 3 是根据本发明实施例的构建的重组病毒的测序结构图；

图 4 是根据本发明实施例的 hIL12 在 Vero 细胞中的表达结果图；

图 5 是根据本发明实施例的 2k-hIL12、2K 对不同肿瘤细胞的抑制曲线；

图 6 是根据本发明实施例的 2k-hIL12、2K 对不同肿瘤细胞的抑制曲线；

图 7 是本发明实施例的 2k-hIL12、2K 在不同肿瘤细胞中的增殖结果图。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

此外，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

需要说明的是，本申请所述的“免疫刺激因子”是指能调节免疫细胞功能的多肽，在本发明中，当使用本发明的溶瘤病毒来治疗肿瘤时，特别优选地，所述免疫刺激因子为能够用于肿瘤治疗的免疫刺激因子。“免疫刺激因子”的实例包括但不限于，细胞因子（如 IL2、IL7、IL12、IL15、GM-CSF、IFN γ 等）、趋化因子（如 IL8）、生长因子（如 IL5）。

本申请所述的“IL12”又称 IL-12 或白介素 12 或白细胞介素 12，是一种具有免疫调节作用的细胞因子。各种癌症类型影响的早期研究揭示了其广泛的抗肿瘤潜力。其中“hIL12”是人白介素 12。

本申请所述的“IL12 基因编码框”是指能够表达功能性 IL12 的核酸序列，也

就说，该核酸序列所编码的 IL12 区段是能够实现该 IL12 功能的区段，或者说，该核酸序列所编码的 IL12 区段是 IL12 必要功能区。

本申请所述的“ICP47 和 ICP34.5 被敲除”是指 ICP47 和 ICP34.5 基因被沉默，这两种基因的表达量相比于未被敲除 ICP47 和 ICP34.5 的 HSV-1，显著降低。

本申请所述的“UL23 基因失活”是指插入失活，也就是说在 UL23 基因位置插入外源基因后，UL23 基因的原有功能丧失。

本申请所述的“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上，使得载体内的控制元件，例如启动子序列等等，能够发挥其预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。

以下实施例利用 CRISPR/Cas9 系统构建重组 HSV-1 病毒，具体包括质粒构建，重组筛选，及病毒鉴定等。重组 HSV-1 病毒的生物学活性，具体包括 hIL12 的表达情况，病毒在肿瘤细胞上感染杀伤能力等。

实施例 1 构建重组单纯疱疹病毒

将编码 hIL12 基因序列插入至含 UL23 基因左右两侧同源臂序列之间，获得 pMD18T-HOM-hIL12 质粒，如图 1，通过 Crisper-Cas9 系统在 HSV-1/ICP47-/ICP34.5-双敲除 KOS 病毒株的 UL23 基因上的 LacZ 位点替换为治疗性基因 hIL12(人类 IL12)，构建重组病毒，并用 X-gal 蓝白斑筛选方法筛选构建成功的病毒。

需要说明的是，由于在病毒的保存和使用过程中，病毒在一些碱基位点会发生变异，本实施例中用到的 KOS 病毒株相较于野生型 KOS 病毒株，具有 99%的核苷酸序列相似性。

以下实施例 2~4 对多轮纯化后单一病毒斑的 HSV-1-hIL12 进行 PCR 和 ELISA 验证，并评价 HSV1-hIL12 在不同肿瘤细胞的细胞毒性。

实施例 2 PCR 验证

(1) 实验材料：

多轮筛选后的病毒单克隆 2K-hIL12-lacZ11-3-1。

(2) PCR 验证：

引物为 B45577UL22F/B48431UL24R, PCR 产物大小 4051bp。

引物序列，

B45577UL22F	GAGGCGGTTGGATTGTGCAAGAGAC
B48431UL24R	ACGAGAACTGCGGTCGTTGTCCTAA

PCR 体系:

成分	体积(uL)
5xPS GXL Buffer	10
Template (Virus gDNA)	1
Forward primer (B45577UL22F)	1
Reverse primer (B48431UL24R)	1
primeSTAR GXL	1
dNTP Mix	4
ddH ₂ O	32
Total	50

PCR 程序:

98°C, 3min; (98°C, 10s; 60°C, 15s; 68°C, 3min) x 35 个循环; 72°C, 5min; 12°C, forever。

(3) 测序结果与分析: PCR 产物进行凝胶电泳检测, 如图 2 所示, 产物回收后进行测序, 如图 3 所示, 测序验证 UL23HOM1 以左 222 bp 到 UL23HOM2 以右 500 bp 序列完整无突变。

实施例 3 蛋白 ELISA 鉴定

(1) 实验材料:

实验组 HSV1-hIL12 指代 2K-hIL12-lacZ11-3-1, 阴性对照为 HSV-1/2K。

(2) ELISA 验证: 以 Vero (非洲绿猴肾细胞) 为宿主细胞, 条件如下: HSV1-hIL12、HSV-1/2K 感染 MOI (病毒与细胞数量的比值) 为 0.01, 分别在感染 Vero 细胞后, 24、48、72 小时收取培养病毒培养上清。

(3) hIL12 表达结果:

hIL12 在 Vero 细胞中的表达结果如表 1 所示。

表 1:

宿 主 细胞	MOI	感染时 间 (h)	hIL12 表达量 (ng/mL)		
			HSV1-hIL12	HSV-1/2K	无病毒对照组
Vero	0.01	24	45.38	0	0.01
		48	92.29		
		72	90.94		

hIL12 在 Vero 细胞中的表达结果如图 4 所示。

实施例 4 2k-hIL12 病毒细胞毒性实验

(1) 实验材料：2k-hIL12（即前面所述的 HSV1-hIL12，其指代 2K-hIL12-lacZ11-3-1），HSV-1/2K（简称为 2K），细胞为 ASPC-1（胰腺癌细胞）；SKOV3（人卵巢癌细胞）；Fadu（人咽鳞癌细胞）；Hep3B2.1-7（肝癌细胞）；Skmel-28（黑色素瘤细胞）HepG2（人肝癌细胞）；HCT-116（结肠癌细胞）；SW620（结直肠癌细胞）；T.Tn（人食管鳞癌细胞）；NCI-H460（人大细胞肺癌）。

(2) 细胞杀伤验证：以合适的细胞密度接种于 96 孔培养板，培养过夜后，分别加入 7 个梯度浓度（MOI=10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01）的两种病毒，再分别培养 24，48 或 72 小时，依照 CCK8 试剂盒说明书进行细胞活力的检测。

(3) 细胞杀伤结果：

2k-hIL12、2K 对不同肿瘤细胞的毒性如表 2 所示。

2k-hIL12 病毒在较低剂量对 Hep3B2.1-7 肝癌细胞、Skmel-28 黑色素瘤细胞、ASPC-1 人胰腺癌细胞、Fadu 鼻咽癌细胞、Skov3 人卵巢癌、HepG2 人肝癌细胞、HCT-116 结肠癌细胞、SW620 结直肠癌细胞、T.Tn 人食管鳞癌细胞、NCI-H460 人大细胞肺癌细胞均具有良好的杀伤作用，48h 时 2k-hIL12 病毒对 Hep3B2.1-7 肝癌细胞、ASPC-1 肿瘤细胞、Fadu 鼻咽癌细胞的杀伤力明显强于 2K 病毒。可以得出本发明所构建的重组溶瘤病毒 2k-hIL12 选择性地某些肿瘤细胞上的敏感性有所提高，如图 5 和图 6 所示。

表 2:

肿瘤细胞	感染时间	2k-hIL12		2k	
		IC50	拟合度	IC50	拟合度
Hep3B2.1-7	24h	0.1117	0.8268	0.3751	0.8921
	48h	0.008723	0.9277	0.2388	0.8463
	72h	0.4573	0.8472	N/A	0.2652
Skmel-28	24h	0.3339	0.9394	3.866	0.8343
	48h	0.1809	0.9757	0.1113	0.9308
	72h	0.02185	0.9806	0.02644	0.9346
ASPC-1	24h	0.165	0.9754	0.1515	0.9792
	48h	0.08305	0.7899	0.9481	0.6844
	72h	0.01668	0.7224	0.03851	0.9589
Fadu	24h	1.309	0.947	0.5313	0.9742
	48h	0.07347	0.9887	0.3479	0.9799
	72h	0.006876	0.8274	0.0428	0.7413

Skov-3	24h	5.65	0.9442	5.171	0.939
	48h	0.5487	0.9764	0.3735	0.9778
	72h	0.9561	0.5926	0.9256	0.06006
HepG2	48h	0.1403	0.8899	0.1871	0.8395
	72h	0.002715	0.6486	0.001145	0.7885
HCT-116	24h	3.914	0.8852	1.379	0.7593
	48h	0.1934	0.9866	0.1907	0.9823
	72h	0.04994	0.9732	0.05038	0.9893
SW620	24h	11.58	0.6977	14.79	0.5299
	48h	0.1417	0.942	0.1538	0.8278
	72h	0.001739	0.8078	0.001836	0.8356
T.Tn	48h	0.2522	0.9762	0.5312	0.9784
NCI-H460	48h	0.05786	0.8723	0.08896	0.9074

实施例 4 2k-hIL12 病毒在肿瘤细胞系上的复制能力

(1) 实验材料：2k-hIL12（即前面所述的 HSV1-hIL12）、HSV-1/2K（简称为 2K），细胞为 Hep3B2.1-7 肝癌细胞、Skmel-28 黑色素瘤细胞、ASPC-1 肿瘤细胞、Fadu 鼻咽癌细胞、Skov3 人卵巢癌细胞、NCI-H460 大细胞肺癌细胞、HepG2 肝癌细胞、HCT-116 人结肠癌细胞和 SW620 人结肠癌细胞。

(2) 细胞给药：取对数生长期上述细胞以合适的细胞密度接种于 6 孔培养板，培养过夜后，对 6 孔板细胞进行计数，根据每孔细胞数将病毒母液用含 1% 灭活 FBS 的高糖 DMEM 或 RPMI-1640 培养基稀释，配制成 MOI=0.1 的病毒溶液。对应每孔依次加入 300 μ l 的病毒溶液，置于 37 $^{\circ}$ C，5 % CO₂ 条件下孵育，每 15min 摇动培养板使得病毒更好的吸附细胞，1.25 h 后添加 1 ml 的培养基。2 h 后弃掉培养基，再补充 2 ml 的培养基，放置 CO₂ 培养箱中分别孵育 24 h、48 h 或 72 h。

(3) 病毒滴度测定：培养结束后，收取病毒液。冻融三次（-80 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C）后，梯度稀释收取的病毒液，取 300 μ l 感染 Vero 细胞（6 孔板），每 15min 摇动培养板使得病毒更好的吸附细胞，1.25 h 后添加 2ml 的培养基。2 h 后弃掉培养基，添加 300 μ l 的 DMEM 完全培养基、3 ml 2% 甲基纤维素固定病毒。培养 3-4 天后，吸弃覆盖培养基，加入 10% HCHO 溶液，1 mL/孔，固定 20 min。之后吸掉甲醛溶液，加入 1% 结晶紫染色液，500 μ L/孔，染色 30 min。最后倒掉染色液，自来水缓缓冲洗干净，吸水纸倒扣擦干，进行空斑计数，并计算病毒滴度。病毒滴度=病毒稀释倍数*（1000/300）*空斑数。

(4) 2k-hIL12 病毒在肿瘤细胞的复制能力评价

2k-hIL12 和 2k 病毒在不同肿瘤系细胞上的增殖结果如表 3 和图 7 所示。

表 3:

肿瘤细胞	病毒	感染时间	病毒滴度平均值
Hep3B2.1-7	2k	24h	8.47E+07
		48h	5.32E+07
	2k-hIL12	24h	9.78E+07
		48h	2.42E+07
Skmel-28	2k	24h	4.52E+06
		48h	1.96E+07
	2k-hIL12	24h	2.33E+06
		48h	2.03E+07
ASPC-1	2k	24h	3.53E+07
		48h	8.80E+06
	2k-hIL12	24h	3.10E+07
		48h	7.84E+06
Fadu	2k	24h	1.32E+07
		48h	6.63E+07
	2k-hIL12	24h	3.67E+06
		48h	1.00E+08
Skov3	2k	24h	7.65E+07
		48h	1.43E+08
	2k-hIL12	24h	8.65E+07
		48h	2.11E+08
NCI-H460	2k	24h	7.31E+07
		48h	8.61E+07
	2k-hIL12	24h	9.42E+07
		48h	1.12E+08
HepG2	2k	24h	9.88E+07
		48h	6.62E+07
	2k-hIL12	24h	1.86E+07
		48h	9.03E+07
HCT-116	2k	48h	4.70E+07
	2k-hIL12	48h	7.61E+07
SW620	2k	48h	1.92E+07
	2k-hIL12		1.45E+07

对于 Hep3B2.1-7 细胞, 24h 时, 2K 的病毒滴度与 hIL12 病毒滴度相差不大, 48 h 时, 从数据上看 2k 病毒滴度高于 hIL12 的病毒滴度, 但 48h 时部分细胞已飘起来对后续滴度测定影响很大, 滴度下降较大, 参考 24h 时的数据, 可以得出 2k-hIL12 的病毒滴度稍高于 2k 病毒滴度, 复制增殖能力相当; 且两种病毒 48h、MOI=0.1 时就已完全感染, 说明其感染能力很强。

对于 Skmel-28 细胞, 24h 时, 2k 病毒滴度高于 2k-hIL12 的病毒滴度, 48h 时 Skmel-28 细胞已完全感染, 滴度增大, 参考 48h 时的数据, 可以得出两种病

毒滴度相差不大,增值复制能力相当;且两种病毒 48h 时就已完全感染,滴度都在 10 的 7 次方,说明其感染能力较强。

对于 ASPC-1 细胞,24h 时,2K 的病毒滴度与 hIL12 病毒滴度相差不大,48h 时从数据上看 2k-hIL12 病毒滴度稍低于 2k 的病毒滴度,但 48h 时 ASPC-1 细胞已完全感染,部分细胞飘起来对后续滴度测定影响很大,滴度下降较大,两种病毒 48h、MOI=0.1 时就已完全感染,说明其感染增殖能力很强。

对于 Fadu 细胞,24h 时,2K 的病毒滴度稍高于 hIL12 病毒滴度,48h 时,hIL12 的病毒滴度为 $1.00\text{E}+08$,2K 的病毒滴度低于 hIL12 病毒滴度,且两种病毒 48h 时就已完全感染,说明其感染能力较强。

对于 Skov3 细胞,24h 时,2K 的病毒滴度为 $7.65\text{E}+07$,hIL12 的病毒滴度为 $8.65\text{E}+07$,48h 时 2K 的病毒滴度为 $1.43\text{E}+08$,hIL12 的病毒滴度为 $2.11\text{E}+08$,可以得出 2k-hIL12 病毒滴度稍高于 2k 病毒滴度,且病毒滴度达到 10 的 8 次方,说明其感染能力较强。

对于 NCI-H460 细胞,2k-hIL12 病毒滴度稍高于 2k 病毒滴度,两种病毒在 NCI-H460 细胞上复制增殖能力相当,且两种病毒 48h 时就已完全感染,说明其感染能力很强。

对于 HepG2 细胞,24 h 时,2K 的病毒滴度均值为 $9.88\text{E}+07$,hIL12 的病毒滴度均值为 $1.86\text{E}+07$,2K 的病毒滴度稍高于 hIL12 病毒滴度;48 h 时,2K 的病毒滴度均值为 $6.62\text{E}+07$,hIL12 的病毒滴度均值为 $9.03\text{E}+07$,从数据上看 24h 时 2k-hIL12 病毒滴度低于 2k 的病毒滴度,但 48h 时 2k-hIL12 又大于 2k 病毒滴度且与 2k 最大值相差不大,可以得出 2k 病毒在 HepG2 细胞上能够更快进行复制,但复制增殖能力 2k-hIL12 与 2k 相当;两种病毒 48h、MOI=0.1 时就已完全感染,说明其感染能力较很强。

对于 HCT-116 细胞,48 h 时,HCT-116 细胞已完全感染,2K 的病毒滴度为 $4.70\text{E}+07$,hIL12 的病毒滴度为 $7.61\text{E}+07$,从数据上看 2k 病毒滴度低于 2k-hIL12 的病毒滴度,得出在 HCT-116 细胞上 2k-hIL12 病毒复制增殖稍高于 2k 病毒;且两种病毒 48h 时就已完全感染,滴度都在 10 的 7 次方,说明感染能力较强。

对于 SW620 细胞,48 h 时,SW620 细胞已完全感染,2K 的病毒滴度均值为 $1.92\text{E}+07$,hIL12 的病毒滴度均值为 $1.45\text{E}+07$,在 SW620 细胞上 2k-hIL12 病毒复制增殖稍低于 2k 病毒,复制增殖能力相当;两种病毒 48h 时就已完全感染,滴度都在 10 的 7 次方,说明感染能力较强。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权 利 要 求 书

- 1、一种构建体，其特征在于，所述构建体的载体来源于 HSV，所述构建体携带免疫刺激因子基因编码框，并将免疫刺激因子基因编码框设置于 UL23 基因位置。
- 2、根据权利要求 1 所述的构建体，其特征在于，所述构建体的 ICP47 和双拷贝的 ICP34.5 基因被敲除。
- 3、根据权利要求 1 所述的构建体，其特征在于，免疫刺激因子基因编码框设置于 UL23 基因序列的第 387-521 位核苷酸之间位置。
- 4、根据权利要求 1 所述的构建体，其特征在于，所述免疫刺激因子基因编码框与启动子可操作地连接，所述启动子包括选自 CMV、CAG、EF1 α 、RSV LTR、MTI 的至少之一，所述免疫刺激因子选自 GM-CSF、IL2、IL5、IL7、IL12、IL15、IL24 和 IL27 的至少之一；任选地，所述免疫刺激因子为 IL12。
- 5、根据权利要求 4 所述的构建体，其特征在于，IL12 基因编码框具有如下所示的核苷酸序列，
 - 1) SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；
 - 2) 与 1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%同源性的核苷酸序列。
- 6、根据权利要求 4 所述的构建体，其特征在于，所述构建体具有如下所示的核苷酸序列，
 - 1) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列；
 - 2) 与 1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%同源性的核苷酸序列。
- 7、一种溶瘤病毒，其特征在于，携带权利要求 1-6 任一项所述的构建体。
- 8、根据权利要求 7 所述的敏感性提高的溶瘤病毒，其特征在于，所述病毒表达 IL12。
- 9、一种药物组合物，其特征在于，包括权利要求 1-6 任一项所述的构建体或权利要求 7-8 任一项所述的溶瘤病毒。
- 10、权利要求 1-6 任一项所述的构建体、权利要求 7-8 任一项所述的溶瘤病毒或权利要求 9 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途，任选地，所述药物用于选择性杀伤肿瘤细胞，所述肿瘤为胰腺癌、卵巢癌、咽鳞癌、肝癌、黑色素瘤、结肠癌。

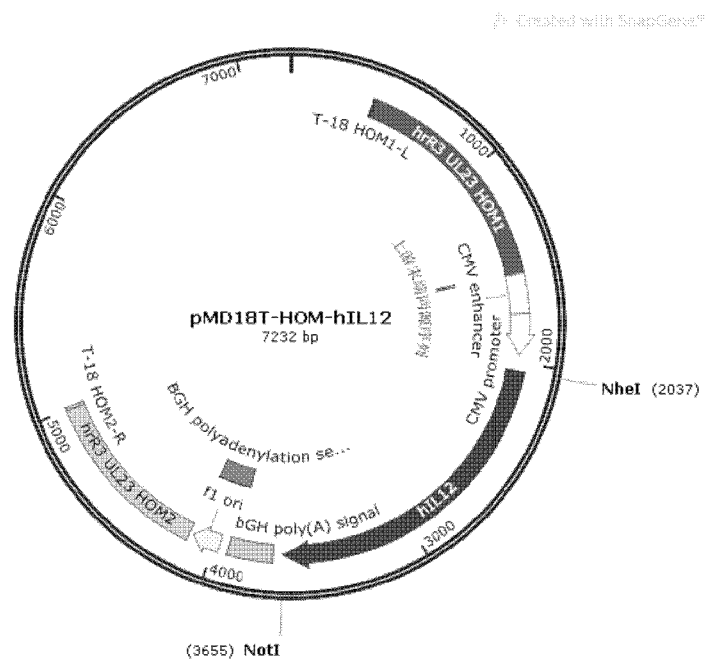


图 1

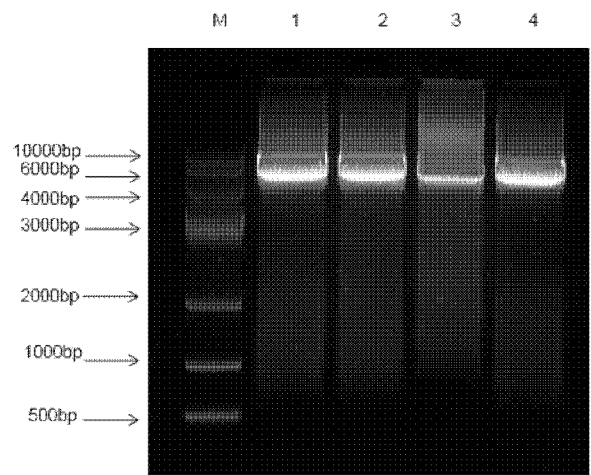


图 2

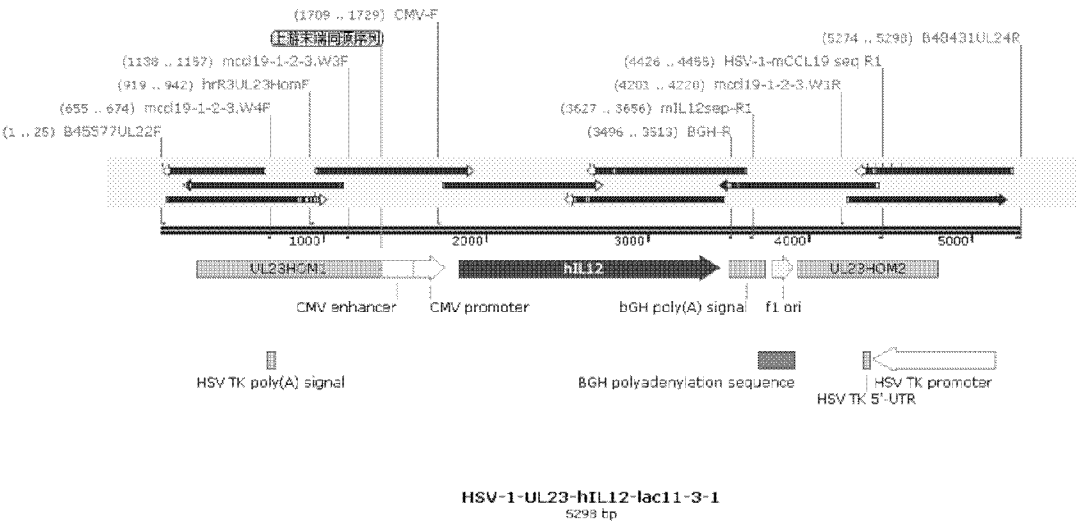
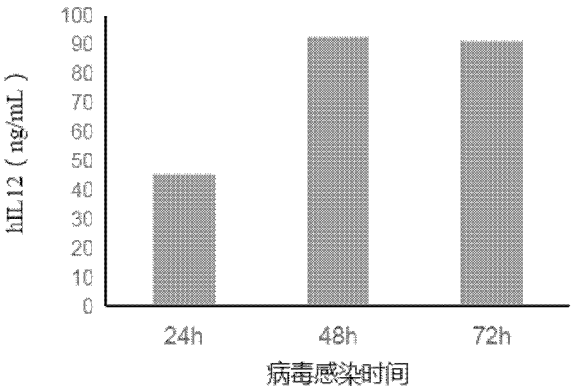


图 3



ELISA检测hIL12蛋白表达

图 4

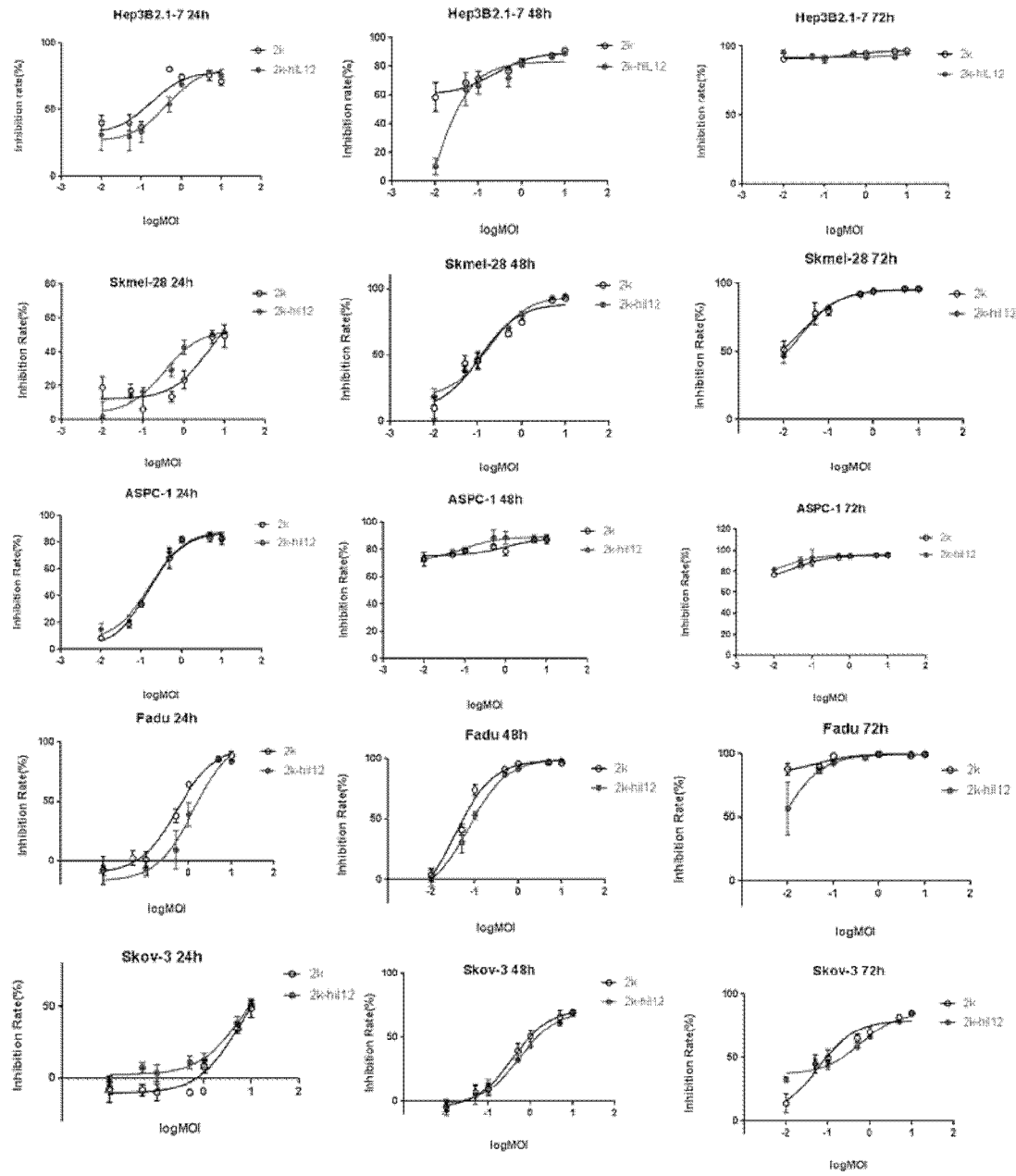


图 5

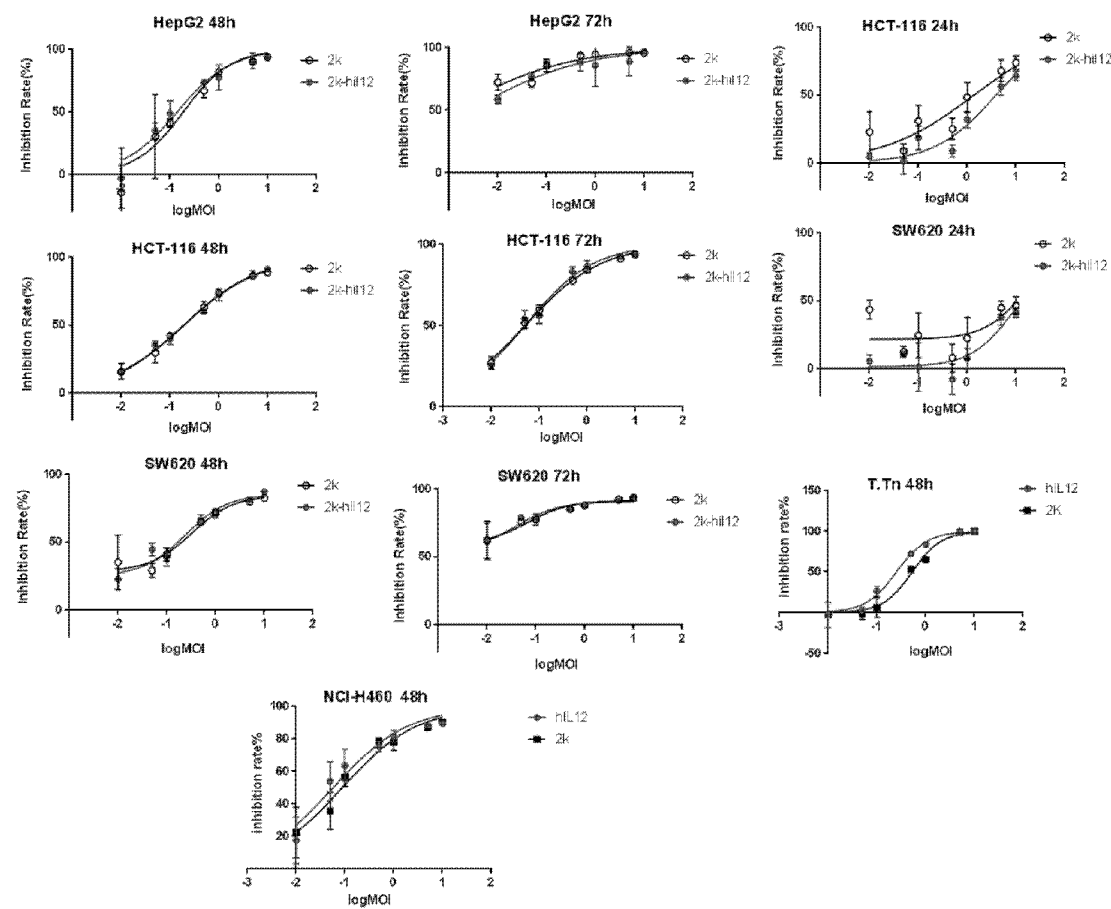


图 6

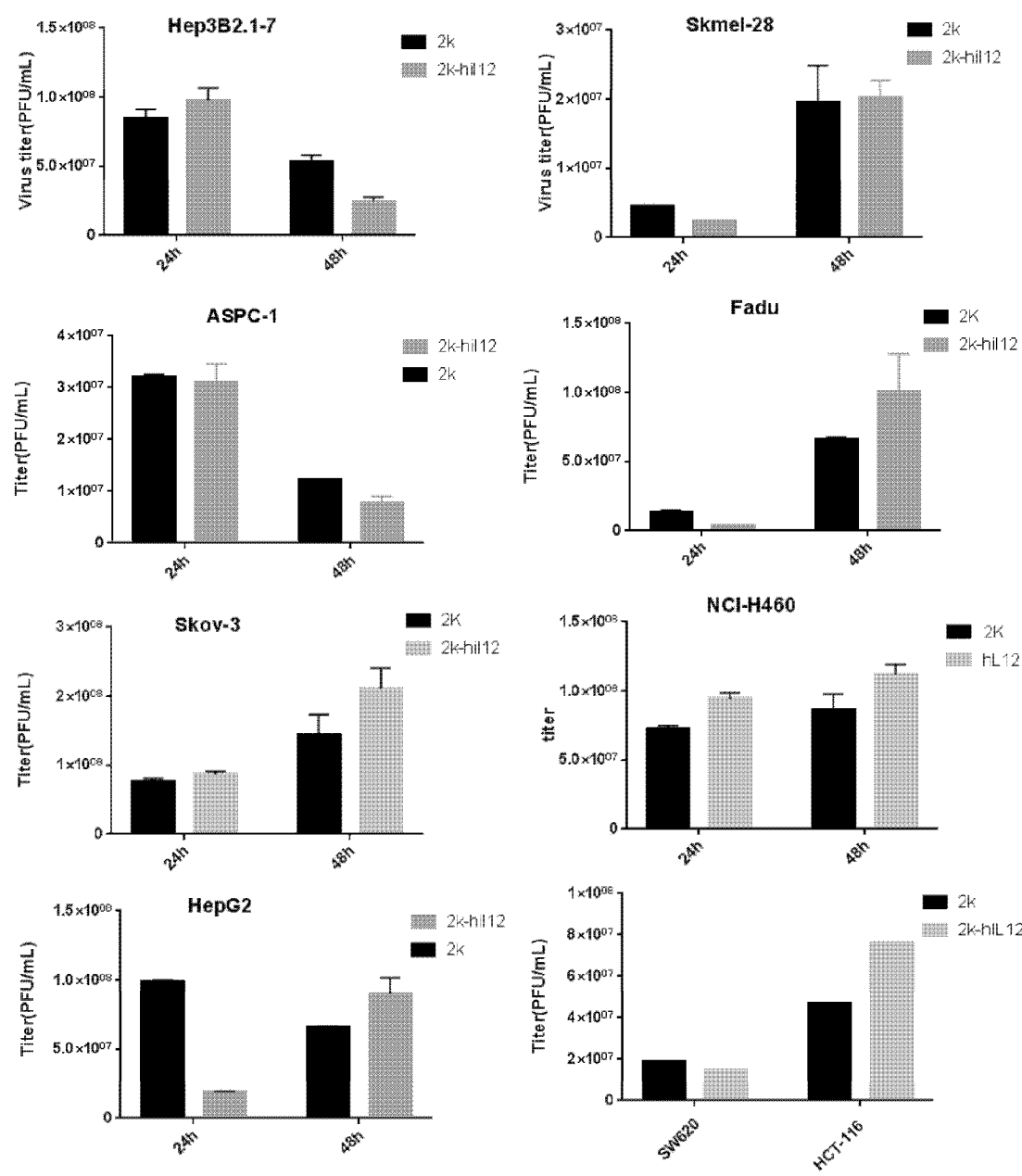


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/074620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/869(2006.01)i; C12N 15/19(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i;
A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(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; A61K; 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)

DATABASE: CNABS, VEN (DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank, EMBL, China Patents Biological Sequence Search System; Keyword 溶瘤病毒, 重组, 细胞因子, 抗原, 肿瘤, HSV, UL23, ICP47, ICP34.5, recombina+, tumor, search for SEQ ID NO: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019236931 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF UNIV OF ILLINOIS) 12 December 2019 (2019-12-12) see claims 1-7, 9, 10	1, 4, 5, 7-10
Y	WO 2019236931 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF UNIV OF ILLINOIS) 12 December 2019 (2019-12-12) see claims 1-7, 9, 10	2
Y	CN 104877969 A (LIU, Binlei) 02 September 2015 (2015-09-02) see claim 1, description paragraph 3	2
A	CN 101724608 A (BEIJING FIVE-PLUS MOLECULAR MEDICINE INSTITUTE; INSTITUTE FOR VIRAL DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CHINESE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) 09 June 2010 (2010-06-09) see entire document	1-10
A	CN 101768574 A (BEIJING FIVE-PLUS MOLECULAR MEDICINE INSTITUTE) 07 July 2010 (2010-07-07) see 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

16 April 2021

Date of mailing of the international search report

08 May 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/074620

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/CN2021/074620

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019236931	A1	12 December 2019	AU	2019282755	A1	28 January 2021
				CN	112243378	A	19 January 2021
CN	104877969	A	02 September 2015	None			
CN	101724608	A	09 June 2010	None			
CN	101768574	A	07 July 2010	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/074620

A. 主题的分类

C12N 15/869(2006.01)i; C12N 15/19(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(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; A61K; 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))

数据库: CNABS, VEN (DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统; 检索词: 溶瘤病毒, 重组, 细胞因子, 抗原, 肿瘤, HSV, UL23, ICP47, ICP34.5, recombina+, tumor, 对于SEQ ID NO: 1-2的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2019236931 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF UNIV OF ILLINOIS) 2019年 12月 12日 (2019 - 12 - 12) 参见权利要求1-7, 9, 10	1, 4, 5, 7-10
Y	WO 2019236931 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF UNIV OF ILLINOIS) 2019年 12月 12日 (2019 - 12 - 12) 参见权利要求1-7, 9, 10	2
Y	CN 104877969 A (刘滨磊) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见权利要求1, 说明书第3段	2
A	CN 101724608 A (中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京五加和分子医学研究有限公司) 2010年 6月 9日 (2010 - 06 - 09) 参见全文	1-10
A	CN 101768574 A (北京五加和分子医学研究有限公司) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 参见全文	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

2021年 4月 16日

国际检索报告邮寄日期

2021年 5月 8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

授权官员

石迪

电话号码 010-62411299

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/CN2021/074620

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	2019236931	A1	2019年 12月 12日	AU	2019282755	A1	2021年 1月 28日
				CN	112243378	A	2021年 1月 19日
CN	104877969	A	2015年 9月 2日	无			
CN	101724608	A	2010年 6月 9日	无			
CN	101768574	A	2010年 7月 7日	无			