

(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6月9日 (09.06.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/116815 A1

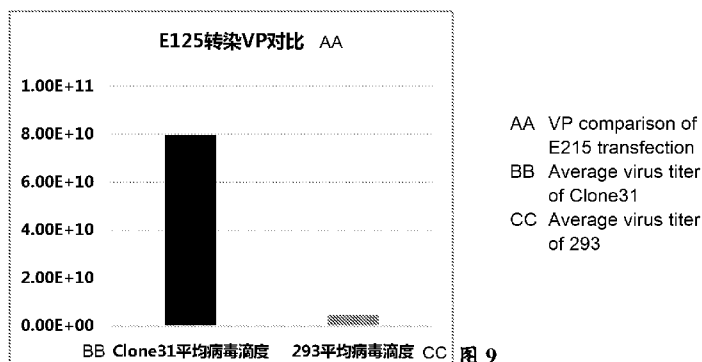
- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01) C12R 1/91 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/130967
- (22) 国际申请日: 2021年11月16日 (16.11.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202011403323.7 2020年12月4日 (04.12.2020) CN
- (71) 申请人: 北京艺妙神州医药科技有限公司(BEIJING IMMUNOCHINA PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区杏石口路80号益园文化创意产业基地B区1号楼3层316号, Beijing 100195 (CN)。北京艺妙医疗科技有限公司(BEIJING YIMIAOYILIAO CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市大兴区中关村科技园区

大兴生物医药产业基地宝参南街16号院2号楼四层, Beijing 102629 (CN)。

- (72) 发明人: 齐菲菲(QI, Feifei); 中国北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地宝参南街16号院2号楼四层, Beijing 102629 (CN)。鲁薪安(LU, Xin'an); 中国北京市海淀区杏石口路80号益园文化创意产业基地B区1号楼3层316号, Beijing 100195 (CN)。何霆(HE, Ting); 中国北京市海淀区杏石口路80号益园文化创意产业基地B区1号楼3层316号, Beijing 100195 (CN)。邓翠云(DENG, Cuiyun); 中国北京市海淀区杏石口路80号益园文化创意产业基地B区1号楼3层316号, Beijing 100195 (CN)。
- (74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

(54) Title: STABLE LENTIVIRUS PACKAGING CELL LINE AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种慢病毒稳定包装细胞系及其制备方法



(57) Abstract: Provided are a stable lentivirus packaging cell line and a preparation method therefor. The stable lentivirus packaging cell line contains a packaging plasmid group consisting of a pPuro.coTetR plasmid, a pVSVG plasmid, and a pGagPol-RRE-NES-cINT plasmid, wherein the pPuro.coTetR plasmid contains a CoTetR gene, the pVSVG plasmid contains a VSVG gene, and the pGagPol-RRE-NES-cINT plasmid contains GagPol and Rev genes. The stable lentivirus packaging cell line is relatively stable in terms of passage, virus production, and a genetic gene copy number, and the lentivirus produced by using the stable lentivirus packaging cell line has a high titer and a low impurity content.

(57) 摘要: 提供了一种慢病毒稳定包装细胞系及其制备方法, 该慢病毒稳定包装细胞系包含由 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒组成的包装质粒组; 其中, pPuro.coTetR 质粒包含 CoTetR 基因, pVSVG 质粒包含 VSVG 基因, pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒包含 GagPol 和 Rev 基因。该慢病毒稳定包装细胞系在传代、产毒和遗传基因拷贝数方面都比较稳定, 而且使用该慢病毒稳定包装细胞系生产的慢病毒滴度高, 杂质含量少。

WO 2022/116815 A1

(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))。

一种慢病毒稳定包装细胞系及其制备方法

技术领域

5 本发明涉及免疫学和分子生物学领域，主要是细胞治疗领域，尤其涉及一种慢病毒稳定包装细胞系及其制备方法。

背景技术

10 慢病毒 (Lentivirus) 是一种基因治疗载体，包括人类免疫缺陷病毒 (HIV)、马传染性贫血病毒 (EIA)、猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV) 等。慢病毒载体与其它逆转录病毒载体不同，可以感染分裂细胞和非分裂细胞。慢病毒可以感染心肌细胞、肿瘤细胞、神经元细胞、干细胞、肝细胞、内皮细胞等多种类型的细胞，容纳外源片段大，实现目的基因的稳定表达，免疫反应小，从而达到良好的基因治疗效果，具有广阔的应用前景。

15 目前的慢病毒在大多数情况下是通过将包装质粒和表达质粒瞬时转染细胞产生的。但是目前的生产工艺生产的慢病毒滴度低，杂质残留多，且病毒批次间产毒量也不稳定。因此，需要构建稳定的慢病毒包装细胞系，使生产的慢病毒滴度高，杂质含量少。

发明内容

20 有鉴于此，本发明的目的是提出一种慢病毒稳定包装细胞系及其制备方法，该慢病毒稳定包装细胞系在传代、产毒和遗传基因拷贝数方面都比较稳定，而且使用该慢病毒稳定包装细胞系生产的慢病毒滴度高，杂质含量少。

基于上述目的，本发明的一个方面提供了一种慢病毒稳定包装细胞系，其中，包含包装质粒组，所述包装质粒组由 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒组成；

25 所述 pPuro.coTetR 质粒包含 CoTetR 基因，所述 pVSVG 质粒包含 VSVG 基因，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒包含 GagPol 和 Rev 基因。

在本发明的优选的实施方案中，其中，所述 pPuro.coTetR 质粒还包含 CMV 启动子、嵌合体内含子、SV40 启动子、嘌呤霉素抗性基因和多腺苷酸化信号；

30 所述 pVSVG 质粒还包含由 CMV 启动子和两个四环素操纵子组成的杂合启动子、SV40 启动子、博来霉素抗性基因和多腺苷酸化信号；

所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒还包含由 CMV 启动子和两个四环素操纵子组成的杂合启动子、嵌合体内含子、SV40 启动子、潮霉素抗性基因、cPPT/CTS 元件、RRE 元件和多腺苷酸化信号。

35 在本发明的优选的实施方案中，其中，所述 CoTetR 基因的序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述 VSVG 基因的序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述 GagPol 和 Rev 基因的序列分别如 SEQ ID NO: 3 和 4 所示。

在本发明的优选的实施方案中，其中，所述 pPuro.coTetR 质粒的序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述 pVSVG 质粒的序列如 SEQ ID NO: 6 所示，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

40 在本发明的优选的实施方案中，其中，所述细胞系选自 HEK293、HEK293-T、HEK293-SF、TE671、HT1080 或 HeLa 细胞系中的一种；

优选地，所述细胞系为 HEK293 细胞系。

基于相同的发明构思，本发明的另一个方面提供了一种制备上述的慢病毒稳定包装细胞系的方法，其中，包括以下步骤：

1) 将 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒分别线性化酶切；

5 2) 将线性化的 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒共转染细胞，并加入第一抗生素进行筛选，得到第一阳性单克隆细胞；

3) 用线性化的 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒转染第一阳性单克隆细胞，并加入第二抗生素进行筛选，得到第二阳性单克隆细胞，即为慢病毒稳定包装细胞系。

10 在本发明的优选的实施方案中，其中，在步骤 2) 中，将线性化的 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒共转染细胞的过程中还加入聚乙烯亚胺，所述聚乙烯亚胺与质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：(pPuro.coTetR 质粒+pVSVG 质粒) = (1~8) :1；

优选地，所述聚乙烯亚胺与质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：(pPuro.coTetR 质粒+pVSVG 质粒) = (2~5) :1；

15 更优选地，所述聚乙烯亚胺与质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：(pPuro.coTetR 质粒+pVSVG 质粒) =4:1；

和/或，在步骤 3) 中，将线性化的 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒转染第一阳性单克隆细胞的过程中还加入聚乙烯亚胺，所述聚乙烯亚胺与 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质量比为 (1~8) :1；

优选地，所述聚乙烯亚胺与 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质量比为 (2~5) :1；

20 更优选地，所述聚乙烯亚胺与 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质量比为 4:1。

在本发明的优选的实施方案中，其中，在步骤 2) 中，所述 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒的用量均为 (0.2~1.0) $\mu\text{g}/10^6$ 个细胞；

优选地，所述 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒的用量均为 (0.4~0.9) $\mu\text{g}/10^6$ 个细胞；

更优选地，所述 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒的用量均为 0.8 $\mu\text{g}/10^6$ 个细胞；

25 和/或，在步骤 3) 中，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 (0.2~1.0) $\mu\text{g}/10^6$ 个第一阳性单克隆细胞；

优选地，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 (0.4~0.9) $\mu\text{g}/10^6$ 个第一阳性单克隆细胞；

30 更优选地，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 0.8 $\mu\text{g}/10^6$ 个第一阳性单克隆细胞。

在本发明的优选的实施方案中，其中，在步骤 2) 中，所述第一抗生素为嘌呤霉素和博来霉素的组合物，其用量分别为 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 300~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；更优选地，所述嘌呤霉素和博来霉素的用量分别为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

35 和/或，在步骤 3) 中，所述第二抗生素为嘌呤霉素、博来霉素和潮霉素的组合物，其用量分别为 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、300~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 300~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；更优选地，所述嘌呤霉素、博来霉素和潮霉素的用量分别为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

基于相同的发明构思，本发明的另一个方面提供了一种慢病毒的生产方法，其中，将目的质粒转染上述的慢病毒稳定包装细胞系。

在本发明的优选的实施方案中，其中，包括：

40 将目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系，然后加入诱导剂诱导慢病毒稳定包装细胞系产生慢病毒。

在本发明的优选的实施方案中，其中，将目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系的过程

中还加入聚乙烯亚胺，所述聚乙烯亚胺与目的质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：目的质粒=(1~8):1；

优选地，所述聚乙烯亚胺与目的质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：目的质粒=(2~5):1；

更优选地，所述聚乙烯亚胺与目的质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：目的质粒=4:1。

5 在本发明的优选的实施方案中，其中，所述目的质粒的用量为(0.2~0.8) $\mu\text{g}/10^6$ 个慢病毒稳定包装细胞系；

优选地，所述目的质粒的用量均为(0.3~0.5) $\mu\text{g}/10^6$ 个慢病毒稳定包装细胞系；

更优选地，所述目的质粒的用量为 0.4 $\mu\text{g}/10^6$ 个慢病毒稳定包装细胞系。

在本发明的优选的实施方案中，其中，所述诱导剂为强力霉素；

10 优选地，所述诱导剂的加入时间为转染后 20~30h；更优选地，所述诱导剂的加入时间为转染后 24h；

优选地，所述诱导剂的加入浓度为 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，更优选地，所述诱导剂的加入浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

15 在本发明的优选的实施方案中，其中，在慢病毒产生过程中还加入增强剂提高慢病毒的表达量；

所述增强剂为丁酸钠；

优选地，所述增强剂的加入浓度为 5~15mM；更优选地，所述增强剂的加入浓度为 10mM；

20 优选地，所述增强剂的加入时间为转染后 20~30h；更优选地，所述增强剂的加入时间为转染后 24h；

优选地，所述增强剂的换液时间为加入增强剂后 6~8h；

和/或，所述慢病毒收集的时间为 45~50h；优选地，所述慢病毒收集的时间为 48h。

附图说明

25 图 1 为包装细胞系的质粒图谱；其中图 1a 为 pPuro.coTetR 质粒的质粒图谱，图 1b 为 pVSVG 质粒的质粒图谱，图 1c 为 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质粒图谱；

图 2 为半定量 PCR 鉴定单克隆细胞 Clone1、5、6、7、14、17、18、19、23、24、26、27、28、31、32 和 33 的 CoTetR、VSVG 和 GagPol 基因的琼脂糖凝胶电泳图；

图 3 为目的质粒转染慢病毒包装细胞系进行产毒验证的柱状图；

30 图 4 为 Clone31 进行转染和诱导产毒的优化实验结果的柱状图；

图 5 为 Clone31 传代稳定性实验结果的柱状图；

图 6 为 Clone31 产毒稳定性实验结果的柱状图；

35 图 7 为 Clone31 细胞的拷贝数稳定实验结果的柱状图；其中图 7a 为 Clone31 VSVG 基因拷贝数稳定实验结果的柱状图；图 7b 为 Clone31 GagPol 基因拷贝数稳定实验结果的柱状图；图 7c 为 Clone31 Rev 基因拷贝数稳定实验结果的柱状图；

图 8 为 Clone31 和 293 细胞批次间病毒滴度对比图；

图 9 为 Clone31 和 293 细胞病毒滴度 VP (P24) 对比图；

图 10 为 Clone31 和 293 细胞放大对比图；其中图 10a 为 E1000 转染 24h 和 48h 活率对比图；图 10b 为 E1000 转染 HCP 残留对比图；图 10c 为 E1000 转染 VP 对比图。

40

具体实施方式

需要说明的是，除非另外定义，本说明书一个或多个实施例使用的技术术语或者科学

术语应当为本公开所属领域内具有一般技能的人士所理解的通常意义。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的培养基、试剂材料和试剂盒等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

需要说明的一点，本发明中的抗生素（嘌呤霉素、博来霉素和潮霉素）、诱导剂（强力霉素）和增强剂（丁酸钠）的浓度均指的是在培养基中的终浓度。例如，丁酸钠的加入浓度为 5-15mM 指的是，丁酸钠的加入量为使丁酸钠在培养基中的终浓度为 5-15mM。

慢病毒载体系统以慢病毒为骨架发展起来，有包装结构和载体结构。慢病毒包装系统一般由两个部分组成：慢病毒包装质粒和慢病毒表达质粒。慢病毒包装质粒由编码产生病毒蛋白的序列组成，慢病毒表达质粒含有长末端重复序列、包装信号等包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息。利用包装质粒和表达质粒时共转染细胞，病毒在细胞中包装并分泌到细胞外培养基，产生病毒颗粒，可以用于宿主细胞的感染。

目前的慢病毒在大多数情况下是通过将包装质粒和表达质粒瞬时转染在细胞工厂中培养的 293 或 293T 细胞产生的；其中包装质粒含有长末端重复序列、包装信号等包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息，表达质粒含有目的基因。

利用 293 细胞瞬时转染大规模生产慢病毒是可行的，并显示出良好的前景。然而，瞬时转染在工艺生产中还需要进一步的优化，其主要瓶颈是转染过程需要大量的质粒 DNA，因此生产成本昂贵，不易放大，不可持续生产病毒。瞬时转染生产的病毒，杂质残留多，特别是宿主蛋白、DNA 残留等，增加后续纯化工艺难度，且病毒批次间产毒量也不稳定，这给下游工艺安排带来不确定性。因此，需要构建稳定的慢病毒包装细胞系，将包装病毒所需的载体元件稳定的整合在宿主细胞的基因组中，使其可以稳定的遗传，方便放大，实现可持续生产。

本发明的目的是构建一种慢病毒稳定包装细胞系，实现悬浮细胞（特别是 293 细胞）放大工艺生产，使生产的慢病毒滴度高，杂质含量少。

基于上述目的，本发明的一个方面提供了一种慢病毒稳定包装细胞系，其中，包含包装质粒组，所述包装质粒组由 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒组成；

所述 pPuro.coTetR 质粒包含 CoTetR 基因，所述 pVSVG 质粒包含 VSVG 基因，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒包含 GagPol 和 Rev 基因。

现有技术中慢病毒的生产方法中是将包装质粒和表达质粒同时转染细胞（例如 293 或 293T 细胞），其存在的主要问题在于生产的慢病毒滴度低，杂质含量高，且病毒批次间产毒量也不稳定。本发明先将包装质粒转染细胞系得到慢病毒稳定包装细胞系，即将 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒转染细胞系得到慢病毒稳定包装细胞系，然后再将目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系，使生产的慢病毒滴度高，杂质含量少。

本发明对构建的慢病毒稳定包装细胞系进行了稳定性研究，包括传代稳定性、产毒稳定性和拷贝数稳定性，实验结果表明，构建的慢病毒稳定包装细胞系在无筛选压力（不加抗生素）时能稳定传代遗传，并且活率可达 97% 以上，说明其在无筛选压力时能稳定传代 30 代以上；在不加抗生素传代的细胞能正常遗传，具有产毒能力；GagPol 基因、Rev 基因和 VSVG 基因的拷贝数相对稳定。即本发明构建的慢病毒稳定包装细胞系在传代、产毒和遗传基因拷贝数方面都比较稳定。

本发明的 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒均是以商业化的质粒骨架为基础，然后插入目的基因而构建的。例如 pPuro.coTetR 质粒是以

pIRESpuro3质粒为基础,插入CoTetR基因而构建的,CoTetR基因是密码子优化后的TetR(四环素阻遏物)基因,CoTetR基因的序列如SEQ ID NO: 1所示,pVSVG质粒是以pcDNA4质粒为基础,插入VSVG基因而构建的,VSVG(水泡性口炎病毒糖蛋白)基因的序列如SEQ ID NO: 2所示,pGagPol-RRE-NES-cINT质粒是以pcDNA5质粒为基础,插入GagPol(Gag基因编码病毒的壳蛋白,Pol基因编码病毒的反转录酶和基因整合酶)和Rev基因(其编码病毒颗粒蛋白表达调节因子)而构建的,GagPol和Rev基因的序列分别如SEQ ID NO: 3和4所示。

如图1a所示,pPuro.coTetR质粒还包含人类巨细胞病毒(CMV)启动子、嵌合体内含子(可提高蛋白的表达水平)、猿猴病毒40(SV40)启动子、嘌呤霉素抗性基因(Puro^R)和多腺苷酸化信号,SV40启动子是表达嘌呤霉素抗性基因所需的启动子。pPuro.coTetR质粒含有嘌呤霉素抗性基因,用嘌呤霉素选择后,几乎所有存活的细胞都会稳定表达CoTetR基因,从而减少了筛选大量细胞以寻找功能性克隆的需要。当使用pPuro.coTetR质粒时,抗生素会在整个表达盒上施加选择性压力。因此,高剂量的抗生素将选择表达高水平CoTetR基因的细胞。这种选择压力还确保了CoTetR基因的表达将保持稳定。所述pPuro.coTetR质粒的序列如SEQ ID NO: 5所示。

如图1b所示,pVSVG质粒还包含由人类巨细胞病毒(CMV)启动子和两个四环素操纵子(TetO₂)组成的杂合启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、博来霉素抗性基因(Zeo^R)和多腺苷酸化信号,SV40启动子是表达博来霉素抗性基因所需的启动子。所述pVSVG质粒的序列如SEQ ID NO: 6所示。

如图1c所示,pGagPol-RRE-NES-cINT质粒还包含由人类巨细胞病毒(CMV)启动子和两个四环素操纵子(TetO₂)组成的杂合启动子、嵌合体内含子(可提高蛋白的表达水平)、猿猴病毒40(SV40)启动子、潮霉素抗性基因(Hygro^R)、cPPT/CTS元件、RRE元件和多腺苷酸化信号,SV40启动子是表达潮霉素抗性基因所需的启动子。所述pGagPol-RRE-NES-cINT质粒的序列如SEQ ID NO: 7所示。

pGagPol-RRE-NES-cINT质粒含有人类免疫缺陷病毒(HIV) rev应答元件(RRE),该RRE元件为逆转录病毒输出元件,调节RNA转录物从细胞核到细胞质的转运。

pGagPol-RRE-NES-cINT质粒含有顺式作用元件——中央多聚嘌呤区(cPPT)和中心终止序列(CTS),cPPT/CTS序列可以是HIV1的cPPT/CTS,能够提高载体整合和转导效率。

在本发明中,由人类巨细胞病毒(CMV)启动子和两个四环素操纵子(TetO₂)组成的杂合启动子是指两个TetO₂操纵子序列插入到CMV启动子中,赋予四环素调节该启动子的功能。TetO₂序列由19个核苷酸序列(5'-TCCCTATCAGTGATAGAGA-3')的2个拷贝组成。

基于相同的发明构思,本发明的另一个方面提供了一种制备上述的慢病毒稳定包装细胞系的方法,其中,包括以下步骤:

1) 将pPuro.coTetR质粒、pVSVG质粒和pGagPol-RRE-NES-cINT质粒分别线性化酶切;

2) 将线性化的pPuro.coTetR质粒和pVSVG质粒共转染细胞,并加入第一抗生素进行筛选,得到第一阳性单克隆细胞;

3) 用线性化的pGagPol-RRE-NES-cINT质粒转染第一阳性单克隆细胞,并加入第二抗生素进行筛选,得到第二阳性单克隆细胞,即为慢病毒稳定包装细胞系。

由于本发明的pPuro.coTetR质粒和pVSVG质粒分别含有嘌呤霉素抗性基因和博来霉

素抗性基因，因此在筛选第一阳性克隆细胞的过程中通过加入嘌呤霉素和博来霉素来进行抗性筛选；同时 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒含有潮霉素抗性基因，因此在筛选第二阳性克隆细胞的过程中通过加入嘌呤霉素、博来霉素和潮霉素来进行抗性筛选。另外，在两次转染过程中需要加入聚乙烯亚胺 (PEI) 以提高转染效率，并且控制 PEI 与各个质粒的用量可获得本发明的慢病毒稳定包装细胞系。

基于相同的发明构思，本发明的另一个方面提供了一种慢病毒的生产方法，其中，将目的质粒（含有目的基因的表达质粒）转染上述的慢病毒稳定包装细胞系。

在本发明的优选的实施方案中，其中，包括：

将目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系，然后加入诱导剂诱导慢病毒稳定包装细胞系产生慢病毒。

本发明的慢病毒稳定包装细胞系是诱导系统，在产生慢病毒时，需要加入强力霉素 (dox) 进行诱导产毒，同时发现在产毒过程中加入丁酸钠可提高慢病毒的产量。本发明还对目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系和诱导产毒的条件进行了优化，最优的条件为：目的质粒量为 $0.4\mu\text{g}/10^6$ 个细胞，PEI 量：目的质粒量=4:1，丁酸钠的浓度为 10mM，加入丁酸钠的时间为转染后 24h，丁酸钠换液时间为加入丁酸钠后 6-8 小时，加入 dox 时间为 24h，加入 dox 的浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ，病毒收获时间为 48h。现有技术中四质粒瞬时转染产生慢病毒的方法中无需添加强力霉素 (dox) 和丁酸钠。

在本发明中，对目的质粒并不作限制，可以根据需要转染多种目的质粒。优选的，目的质粒为 CAR 表达质粒。

CAR (Chimeric Antigen Receptor) -T 全称即嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法，是一种过继免疫细胞疗法；将能够识别肿瘤特异性抗原的 scFv 片段通过基因工程改造，融合在由 CD28、4-1BB 等一系列参与 T 细胞激活的分子组成的跨膜链段上，然后将该基因片段通过慢病毒或逆转录病毒基因转导方式转染患者外周血中提取的 T 细胞；经基因修饰的 T 细胞回输患者体内后，利用表达的 CAR 受体结合肿瘤细胞表面的分子，从而产生内部信号激活 T 细胞快速摧毁肿瘤细胞。CAR-T 细胞整合了抗体的识别特异性和 T 细胞的杀伤效应及记忆性功能，识别肿瘤抗原无需 MHC 限制，较天然 T 细胞可识别更广泛的目标。基于实际需要，可将 CAR 表达质粒转染上述慢病毒稳定包装细胞系，用于治疗复发/难治 CD19 阳性的非霍奇金淋巴瘤。CAR 的设计及载体构建可参考中国发明专利申请 201510324558.X 的公开文本，特别是其实施例 1 和 2，设计包含顺序连接的信号肽、胞外结合区、任选的铰链区、跨膜区和胞内信号区的嵌合抗原受体 (CAR)，并进行载体（例如 IM19 质粒）构建。

本发明对 CAR 表达质粒转染上述慢病毒稳定包装细胞系和现有技术四质粒瞬时转染 (pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒、pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒和 CAR 表达质粒同时转染 293 细胞) 进行比较，包括细胞活率、病毒滴度 VP (P24)、宿主蛋白残留和批次间病毒滴度稳定性等，实验结果表明，本发明构建的慢病毒稳定包装细胞系的病毒滴度 VP 含量高和批次间产毒稳定，有利于下游纯化工艺。

另外，在放大工艺下比较了 CAR 表达质粒转染上述慢病毒稳定包装细胞系和现有技术四质粒瞬时转染，包括细胞活率、病毒滴度 VP 和 HCP (宿主蛋白) 残留。实验结果表明慢病毒稳定包装细胞系在转染后细胞活率高，生产的病毒 HCP (宿主蛋白) 残留低，病毒滴度 VP 高，可进行放大生产病毒。

病毒滴度 VP (P24) 中的 VP 是指测定病毒滴度的一种方法——病毒颗粒数 (VP) 法——是利用 OD260 检测病毒颗粒数，P24 是指病毒外壳蛋白-P24 蛋白，通过对 P24 蛋

白进行测定，从而检测病毒滴度。

从上面所述可以看出，本发明提供的慢病毒稳定包装细胞系及其制备方法，该慢病毒稳定包装细胞系在传代、产毒和遗传基因拷贝数方面都比较稳定，而且可进行放大生产病毒。该慢病毒稳定包装细胞系和 293 细胞四质粒瞬时转染对比，其细胞活率高、病毒滴度 VP 含量高、宿主蛋白少和批次间产毒稳定，有利于下游纯化工艺。

下面结合具体的实施例对本发明提供的技术方案做进一步的描述。下述实施例仅用于对本发明进行说明，并不会对本发明的保护范围进行限制。

实施例 1 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的构建
本实施例构建的慢病毒稳定包装细胞系，由三个质粒构成，pPuro.coTetR(包含 CoTetR 基因)，pVSVG (包含 VSVG 基因)，pGagPol-RRE-NES-cINT (包含 GagPol 和 Rev 基因)，它们的质粒图谱分别参见图 1a，图 1b 和图 1c。

pPuro-coTetR 载体构建：

通过引物 TetR-WF-1F/TetR-1R-linker 和模板 pIRESpuro3 (TaKaRa, 货号: 631619) 获得 INT 片段 (230 bp)，通过引物 TetR-2F-linker/TetR-2R-linker 和模板 coTetR (其序列如 SEQ ID NO:1 所示)获得 coTetR 片段(624 bp)，通过引物 TetR-3F-linker/TetR-WF-3R 和模板 pcDNA4(Thermo, 货号: V102020)获得 PA+F1 ori+SV40 promoter 片段(1042 bp)。再通过搭桥 PCR，引物 TetR-WF-1F/TetR-2R-linker 获得片段 TNT+coTetR，引物 TetR-WF-1F/TetR-WF-3R 获得全长片段 TNT+coTetR+PA+F1 ori+SV40 promoter。

将上述制备的全长片段通过无缝克隆的方法插入 pIRESpuro3 载体的 Hind III 位点，转化感受态 stbl3 (全式金, 货号: CD521)，经测序正确后，使用康为无内毒素中提试剂盒提取质粒 (康为世纪, 货号: cw2105s)，将构建的目的质粒用于后续的包装细胞系构建实验。

引物名称	引物序列
TetR-WF-1F	5'-ACTCACTATAGGGAGACCCA GTGAGTACTCCCTCTCAAAA-3'
TetR-1R-linker	5'-TTGGACTIONTGTCCAGCCTAGACATCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGGAT-3'
TetR-2F-linker	5'-ATCCACTIONTGCCTTTCTCTCCACAGATGTCTAGGCTGGACAAGTCCAA -3'
TetR-2R-linker	5'-ATGGCTGGCAACTAGAAAGGCACAGTCAGCTGCCGCTTTCGCACTTGA -3'
TetR-3F-linker	5'- TCAAGTGC GAAAGCGGCAGCTGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT-3'
TetR-WF-3R	5'-CTTGTGGGTTGTGGCAAGCT TTTGCAAAGCCTAGGCCTC -3'

pVSVG 载体构建：

通过引物 VSVG-WF-F/VSVG-WF-R 和模板 VS-SC (其序列 SEQ ID NO: 8 所示) 获得 VSVG 片段 (1536 bp)，将上述制备的片段通过无缝克隆的方法插入 pcDNA4 载体的 Xho I 位点，转化感受态 stbl3，经测序正确后，使用康为无内毒素中提试剂盒提取质粒，将构建的目的质粒用于后续的包装细胞系构建实验。

引物名称	引物序列
VSVG-WF-F	5'-ATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCATGAAGTGCCTTTTGTACTT-3'
VSVG-WF-R	5'-AACGGGCCCTCTAGACTCGATTACTTTCCAAGTCGGTTCA-3'

pGagPol-RRE-NES-cINT 载体构建：

通过引物 pGagPol-Xho I -WF/pGagPol-Xho I -WR 和模板 MDK-SC (其序列如 SEQ ID NO: 9 所示) 获得 GagPol 片段(4307 bp), 将上述制备的片段通过无缝克隆的方法插入 pcDNA5 载体 (Thermo, 货号: V103320) 的 Xho I 位点, 转化感受态 stb13, 经测序正确后, 使用康为无内毒素中提试剂盒提取质粒, 将构建的目的质粒 pGagPol 用于后续的载体构建。

通过引物 pGagPol-REV-Xba I -WF/ pGagPol-REV-Xba I -WR 和模板 AX (也称为 psPAX2 载体, 其序列如 SEQ ID NO: 10 所示) 获得 RRE-NES 片段(1705 bp), 将上述制备的片段通过无缝克隆的方法插入 pGagPol 载体的 Xba I 位点, 转化感受态 stb13, 经测序正确后, 使用康为无内毒素中提试剂盒提取质粒, 将构建的目的质粒 pGagPol-RRE-NES 用于后续的载体构建。

通过引物 pGagPol-RN-cINT--Not I -QF/ pGagPol-INT- Not I -WR 和模板 AX 获得 cINT 片段(1122 bp), 将上述制备的片段通过无缝克隆的方法插入 pGagPol-RRE-NES 载体的 Not I 位点, 转化感受态 stb13, 经测序正确后, 使用康为无内毒素中提试剂盒提取质粒, 将构建的目的质粒 pGagPol-RRE-NES-cINT 用于后续的载体构建。

引物名称	引物序列
pGagPol-Xho I -WF	5'-TCCAGCACAGTGGCGGCCGCATGGGTGCGAGAGCGTCAGT-3'
pGagPol-Xho I -WR	5'-AACGGGCCCTCTAGACTCGATTAATCCTCATCCTGTCTAC-3'
pGagPol-REV-Xba I -WF	5'-AGGATGAGGATTAATCGAGTCACATGGAATTCTGCAACAA -3'
pGagPol-REV-Xba I -WR	5'-GGTTTAAACGGGCCCTCTAGAGCCAGAAGTCAGATGCTCA-3'
pGagPol-RN-cINT--Not I -QF	5'-CAGATATCCAGCACAGTGGCGGAGTCGCTGCGCGCTGCCT -3'
pGagPol-INT- Not I -WR	5'-GCTCTCGCACCCATGCGGCCCTCTACCAGTCGCCGCC-3'

实施例 2 慢病毒稳定包装细胞系的制备

将实施例 1 构建的三个质粒都经过 Fsp I (Thermo, 货号: FD1224) 线性化酶切, 然后去磷酸化后, 用于转染 293 细胞。

线性化的 pPuro.coTetR 和 pVSVG 质粒, 用 PEI (聚乙烯亚胺) (Polysciences, 货号: 23966) 共转染 293 悬浮细胞, 转染时 pPuro.coTetR 和 pVSVG 质粒用量均为 0.8μg/10⁶ 个细胞, PEI 量: (pPuro.coTetR 质粒量+pVSVG 质粒量) =4:1, 经过用 2μg/mL Puro (嘌呤霉素) (Invivogen, 货号: ant-pr-1), 400μg/mL Zeo (博来霉素) (Invitrogen, 货号: R25001) 抗生素进行加压筛选 2 周, 得到抗药的阳性稳转细胞池, 即多克隆 PV 细胞。将多克隆 PV 细胞进行 96 孔板 (Thermo, 货号: 167008) 有限稀释法铺细胞, 每孔 200μL 培养基。然后显微镜观察, 挑出只有单个细胞的孔, 并标记, 培养箱培养约 20-30 天。

将 96 孔板中存活下来的单克隆细胞进行扩大培养, 分别用 48 孔板、24 孔板、12 孔板、6 孔板、摇瓶 E125。取 PV 单克隆细胞进行提取 RNA, 经过反转录成 cDNA 后, 进行半定量 PCR 鉴定是否含有目的基因 CoTetR 和 VSVG, 用 β-actin 作为内参基因。

将鉴定正确的 PV 单克隆细胞, 用 PEI (聚乙烯亚胺) 转染线性化的质粒 pGagPol-RRE-NES-cINT, 转染时 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 0.8μg/10⁶ 个第一阳性单克隆细胞, PEI 量: pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒量=4:1, 经过用 2μg/mL Puro (嘌呤霉素), 400μg/mL Zeo (博来霉素), 400μg/mL HYG (潮霉素) (Invitrogen, 货号: 10687010) 抗生素进行加压筛选 2 周, 得到抗药的阳性稳转细胞池, 即多克隆 PVGR 细胞。将多克隆 PVGR 细胞进行 96 孔板有限稀释法铺细胞, 每孔 200μL 培养基。然后显微镜观察, 挑出只有单个细胞的孔, 并标记, 培养箱培养约 20-30 天。在 96 孔板中存活下来的单

克隆细胞编号为 Clone1、5、6、7、14、17、18、19、23、24、26、27、28、31、32 和 33。

实施例 3 稳定包装细胞系半定量 PCR 鉴定

将 96 孔板中存活下来的单克隆细胞进行扩大培养，分别用 48 孔板、24 孔板、12 孔板、6 孔板、摇瓶 E125。取 PVGR 单克隆细胞进行提取 RNA，经过反转录成 cDNA 后，进行半定量 PCR 鉴定是否含有目的基因 CoTetR、VSVG 和 GagPol。用 β -actin 作为内参基因。具体步骤如下：

前一天将 PVGR 单克隆细胞铺于 12 孔板中，用 1mL SMM293 TI (Sino Biological, 货号: M293TI) +0.1% F68 (Gibco, 货号: 24040-032) 培养基，每孔铺 3×10^5 个/mL，第二天加 2 μ g/mL dox (强力霉素) (Sigma, 货号: D9891)，第三天收获细胞，用于提取 RNA。用 TRIzol™ 试剂 (Invitrogen™, 货号: 15596026) 提取 RNA，提取方法按照说明书操作。

将提取的 RNA 各用 2 μ g 进行反转录成 cDNA，用第一链 cDNA 合成试剂盒 (Thermo Scientific™, Cat: K1612) 操作方法见说明书。

将反转录的 cDNA 进行 PCR 扩增目的基因 CoTetR、VSVG 和 GagPol，各用 2 μ g。用 β -actin 作为内参基因，然后进行琼脂糖凝胶电泳。PCR 扩增目的基因体系：2 \times phanta Max master mix (南京诺唯赞, 货号: P515-02) 加 10 μ L，正向和反向引物各加 1 μ L，ddH₂O 加 7 μ L，cDNA 模板 1 μ L。PCR 反应程序：95 $^{\circ}$ C 10min，95 $^{\circ}$ C 30s，56 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 10min，30 个循环。半定量 PCR 引物如下：

CoTetR 正向引物：

5'-atccaactttgctttctctccacagatgtctaggctggacaagtccaa-3'

CoTetR 反向引物：

5'-atggctggcaactagaagggcacagtcagctgccgtttcgcaattga-3'

VSVG 正向引物：5'-ccgctegagatgaagtgccttttgactt-3'

VSVG 反向引物：5'-tgcattttccgttgatgaac-3'

GagPol 正向引物：5'-ccggccataaagcaagagtt-3'

GagPol 反向引物：5'-ccgcagatttctatgagtat-3'

β -actin 正向引物：5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'

β -actin 反向引物：5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

实验结果见图 2 所示。根据图 2 可知，其中 Clone1、18、19、23、28、31、32 和 33 都有目的片段 CoTetR、VSVG 和 GagPol。

实施例 4 目的质粒 (CAR 表达质粒) 的构建

4.1 CAR 分子的核苷酸序列的制备

本实施例的 CAR 分子包含信号肽、胞外结合区、任选的铰链区、跨膜区和胞内信号区。所述胞外结合区的核苷酸序列是在抗 CD19 的嵌合抗原受体的抗原结合区 (在此命名为 anti-CD19scFv-S0, 简称为 scFv-S0, 其来源于小鼠, 参见 J Immunother.2009September; 32(7):689-702.) 的核苷酸序列的基础上进行人源化改造而获得的。具体说明 CAR 分子的核苷酸序列的制备步骤。

首先进行引物设计，本实施例中使用的引物序列如下：

1-1: 5'-ATGCTTCTCCTGGTGACAAG-3'

1-2: 5'-TGGGATCAGGAGGAATGCTG-3'

2-1: 5'-TACATCTGGGCGCCCTTGGCCGG-3'
 2-2: 5'-GGAGCGATAGGCTGCGAAGTCGCG-3'
 3-1: 5'-AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG-3'
 3-2: 5'-TTAGCGAGGGGGCAGGGCCT-3'
 5 4-1: 5'-ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCC-3'
 4-2: 5'-TGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCTTGG-3'
 5-1: 5'-GCGGCCGCAATTGAAGTTATGTA-3'
 5-2: 5'-TTAGCGAGGGGGCAGGGCCTGC-3'
 6-1: 5'-CTAGACTAGTATGCTTCTCCTGGTGACAAGCC-3'
 10 6-2: 5'-CGACGCGTTTAGCGAGGGGGCAGGGCCTGC-3'

以人的 cDNA 文库为模板, 分别以 1-1 和 1-2、2-1 和 2-2、3-1 和 3-2 为引物, 通过 PCR 克隆出相应的 CAR 分子部分, 分别为 GMCSF、CD28-TM+CD28-signal (这两部分是相连的) 和 CD3 ζ -signal。再通过搭桥引物 4-1 和 4-2 获得 GMCSF+scFv 片段, 通过搭桥引物 5-1 和 5-2 获得 CD28-TM+CD28-signal+CD3 ζ -signal 片段, 随后通过搭桥引物 6-1 和 6-2 获得完整的 CAR 分子的核苷酸序列, 酶切位点为 SpeI 和 MluI。

4.2 包含 CAR 分子的核酸序列的病毒载体的构建

将上述制备的 CAR 分子的核苷酸序列经 SpeI (Fermentas) 和 MluI (Fermentas) 双酶切、经 T4 连接酶 (Fermentas) 连接插入慢病毒 IM19 载体的 SpeI-MluI 位点, 转化到感受态 E.coli (DH5 α), 经测序正确后, 使用 Qrigene 公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒, 将构建的目的质粒 (CAR 表达质粒) 用于后续的产毒实验。

实施例 5 稳定包装细胞系产毒验证

在本实施例中, 将鉴定正确的 PVGR 单克隆进行产毒验证, 即用实施例 4 构建的目的质粒瞬时转染实施例 3 的 PVGR 单克隆细胞进行产毒验证。具体步骤如下:

前一天将 PVGR 单克隆细胞铺于 12 孔板中, 用 1mL SMM293 TI+0.1% F68 培养基, 每孔铺 8×10^5 个/mL, 第二天进行目的质粒转染。转染 24h 后, 加终浓度为 2 μ g/mL 诱导剂 dox (强力霉素)。转染 48h 后收集病毒, 3000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 20min。将病毒感染 Jurkat 细胞, 48h 后检测流式, 计算出病毒滴度 (TU/mL)。实验结果表明, Clone1、18、19、23、28、31、32 和 33 均能产毒, 而且 Clone31 的病毒滴度最高为 2.68E+06 (即 2.68×10^6) TU/mL (参见图 3)。后续实验选择 Clone31 作为实验细胞。

实施例 6 目的质粒转染稳定包装细胞系和诱导产毒的条件优化实验

挑取产毒滴度比较高的单克隆 Clone31 进行进一步的研究。将 Clone31 分别接种于 E125 摇瓶中 (Corning, Cat: 431145), 各接种 8×10^5 个/mL, 各 10mL, 用 10mL SMM293 TI 培养基。使用 DoE 设计 (试验设计), 第一次使用筛选设计实验, 因子包括: 质粒量 (目的质粒)、PEI (聚乙烯亚胺) 量、丁酸钠的浓度、加入丁酸钠时间、丁酸钠换液时间、加入 dox (强力霉素) 时间、加入 dox (强力霉素) 的浓度和病毒收获时间, 确定曲率和因子的影响。第二次使用中心复合设计, 确定最优的实验方案。转染 48h 后收集病毒, 3000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 20min, 检测病毒滴度 TU。

最终得出, 最优的实验方案为: 质粒量 (目的质粒) 为 0.4 μ g/10 6 个细胞, PEI (聚乙烯亚胺) 量: 质粒量 (目的质粒) =4:1, 丁酸钠 (Sigma, 货号: B5887) 的浓度为 10mM, 加入丁酸钠的时间为转染后 24h, 丁酸钠换液时间为加入丁酸钠后 6-8 小时, 加入 dox (强

力霉素) 时间为 24h, 加入 dox (强力霉素) 的浓度为 2 μ g/mL, 病毒收获时间为 48h。将收获的病毒用于感染 Jurkat 细胞, 48h 后检流式, 计算出病毒滴度。Clone31 在 E125 摇瓶中, 最终优化的病毒滴度为 4E+06 (即 4 \times 10⁶) TU/mL (见图 4)。

5 实施例 7 稳定包装细胞系传代、产毒、拷贝数稳定性验证

慢病毒稳定包装细胞系 Clone31 进行进一步的稳定性研究, 包括传代稳定性、产毒稳定性和拷贝数稳定性。

7.1 传代稳定性

10 将 Clone31 单克隆细胞分别在加抗生素和不加抗生素时, 进行 E125 摇瓶传代, 每次各培养 10mL, 分别计细胞数和活率。具体为: 将 Clone31 分别接种于 E125 摇瓶中 (Corning, Cat: 431145), 各接种 8 \times 10⁵ 个/mL, 各 10mL, 分别用 10mL SMM293 TI 培养基 (不加抗生素), 10mL SMM293 TI +0.6 μ g/mL Puro+50 μ g/mL Zeo+50 μ g/mL Hyg。每隔一天传代一次, 并计细胞数和活率。看其传代稳定性。

15 实验证明, 在不加抗生素 (无筛选压力) 时, Clone31 单克隆细胞与加抗生素时, 细胞数差别不大, 且 Clone31 单克隆细胞在不加抗生素 (无筛选压力) 时, 其能稳定传代遗传, 并且活率可达 97% 以上, 说明其在无筛选压力时能稳定传代 30 代以上 (见图 5)。

7.2 产毒稳定性

20 探索 Clone31 单克隆细胞在加和不加抗生素时的产毒稳定。在抗生素和不加抗生素下, 每隔几代, 将目的质粒 (实施例 4 构建) 分别转染 Clone31, 检测病毒滴度。具体为: 前一天, 将 Clone31 分别接种于 E125 摇瓶中 (Corning, Cat: 431145), 各接种 1.4 \times 10⁶ 个/mL, 各 10mL, 分别用 10mL SMM293 TI 培养基 (不加抗生素), 10mL SMM293 TI +0.6 μ g/mL Puro (嘌呤霉素) +50 μ g/mL Zeo (博来霉素) +50 μ g/mL Hyg (潮霉素)。第二天, 进行目的质粒 (实施例 4 构建) 转染。每隔几代进行转染验证产毒情况。

25 实验结果表明, 在不加抗生素时, 其具有产毒能力, 说明不加抗生素传代的细胞能正常遗传 (见图 6)。

7.3 拷贝数稳定性

Clone31 单克隆细胞, 每隔几代, 在加和不加抗生素时进行拷贝数稳定验证。用细胞基因组提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 货号: DP304-03), 分别提取在加和不加抗生素下, Clone31 单克隆细胞的基因组 DNA, 然后用 Taqman-qPCR 方法, 扩增 Clone31 单克隆细胞基因组中的 GagPol、Rev 和 VSVG 的拷贝数。具体为: 将 Clone31 分别接种于 E125 摇瓶中 (Corning, Cat: 431145), 各接种 8 \times 10⁵ 个/mL, 各 10mL, 分别用 10mL SMM293 TI 培养基 (不加抗生素), 10mL SMM293 TI +0.6 μ g/mL Puro (嘌呤霉素) +50 μ g/mL Zeo (博来霉素) +50 μ g/mL Hyg (潮霉素)。每隔几代提取细胞基因组 DNA。取 2 \times 10⁶ 个/mL, 用于提取细胞基因组 DNA, 用细胞基因组提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司, 货号: DP304-03), 具体操作见试剂盒说明书。将细胞基因组 DNA 稀释成大约 5ng/ μ L, 用于 qPCR。Taqman-qPCR 探针法操作步骤: 用核酸稀释液分别将 3 个标准品质粒 DNA 稀释至 1 \times 10⁶copies/ μ L, 1 \times 10⁵copies/ μ L, 1 \times 10⁴copies/ μ L, 1 \times 10³copies/ μ L, 1 \times 10²copies/ μ L。分别扩 3 个基因 GagPol, Rev, VSVG, 制作 3 个标准曲线, 标准品拷贝数对数为横坐标, CT 值为纵坐标。qPCR 反应体系 (Takara, 货号: RR390A) 为: 2 \times Premix Ex Taq (Probe qPCR) 加 10 μ L, F 引物 (10 μ mol/L) 加 0.4 μ L, R 引物 (10 μ mol/L) 加 0.4 μ L, TaqMan Probe (5 μ mol/L) 加 0.4 μ L, ROX Reference DyeII (50 \times) 加 0.4 μ L, 模板加 2 μ L, ddH₂O 加 6.4 μ L; 其中 F 引物和 R 引物如下所示:

(1) VSVG 基因 qPCR 引物:

VSVG-q-F: 5'-AAGAAACCTGGAGCAAAATCAGA-3'

VSVG-q-R: 5'-CCTGGGTTTTTAGGAGCAAGATAG-3'

VSVG-Taqman-Probe:

5 5'-FAM-CGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCT-TAMRA-3'

(2) GagPol 基因 qPCR 引物:

GagPol-q-F: 5'-GCAGTTCATGTAGCCAGTGGATAT-3'

GagPol-q-R: 5'-TGGTGAAATTGCTGCCATTG-3'

GagPol-Taqman-Probe:

10 5'-FAM-CAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCC-TAMRA-3'

(3) Rev 基因 qPCR 引物:

Rev-q-F: 5'-CCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAA-3'

Rev-q-R: 5'-TGTTAATTTCTCTGTCCACTCCAT-3'

Rev-Taqman-Probe:

15 5'-FAM-TCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACC-TAMRA-3'

qPCR 反应程序为: 95°C 30 s, 95°C 5 s, 55°C 15 s, 72°C 35 s, 40 个循环。将得出的 CT 值代入标曲, 计算出拷贝数, 然后根据质量, 计算出每个细胞拷贝数。

Clone31 VSVG 基因拷贝数见图 7a, Clone31 GagPol 基因拷贝数见图 7b; Clone31 Rev 基因拷贝数见图 7c。实验结果表明, Clone31 单克隆细胞中的 GagPol、Rev 和 VSVG 基因的拷贝数相对稳定。

实施例 8 稳定包装细胞系和 293 细胞转染对比

将 Clone31 单克隆细胞和 293 细胞进行转染比较, 做 3 批, 每批各 3 个平行。Clone31 单克隆细胞用转染和诱导优化后的条件, 293 细胞用瞬时转染条件 (PEI 量: 质粒量=4:1), 进行转染比较。具体为: 将 293 细胞和 Clone31 分别接种于 E125 摇瓶中 (Corning, Cat: 431145), 各接种 8×10^5 个/mL, 各 10mL, 用 10mL SMM293 TI+0.1% F68 培养基, 各三个 E125 摇瓶, 即三个平行。Clone31 单克隆细胞用转染和诱导优化后的条件, 实验方案为: 质粒量为 $0.4 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞, PEI (聚乙烯亚胺) 量: 质粒量=4:1, 丁酸钠的浓度为 10mM, 加入丁酸钠的时间为转染后 24h, 丁酸钠换液时间为加入丁酸钠后 6-8 小时, 加入 dox (强力霉素) 时间为 24h, 加入 dox (强力霉素) 的浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$, 病毒收获时间为 48h。

293 细胞用瞬时转染条件: 将实施例 1 构建的 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒以及实施例 4 构建的目的质粒同时转染 293 细胞, 瞬时转染的质粒量在一定范围内对病毒的滴度影响不大, 例如总质粒量为 $0.8 \mu\text{g} \sim 1.0 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞均可, 在本实施例中, 按照 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒、pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒和目的质粒的质量比为 1: 1: 1: 2, 总质粒量为 $0.8 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞 (即 pPuro.coTetR 质粒为 $0.16 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞、pVSVG 质粒为 $0.16 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞、pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒为 $0.16 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞和目的质粒为 $0.32 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞), PEI (聚乙烯亚胺) 量: 质粒量 (pPuro.coTetR 质粒+pVSVG 质粒+pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒+目的质粒) =4:1, 进行转染比较。比较转染后批次间病毒滴度稳定性和病毒滴度 VP (P24) (参见图 8 和 9)。

由图 8 的实验结果可以看出, Clone31 单克隆细胞的批次间病毒滴度稳定性好于 293 细胞; 由图 9 的实验结果可以看出, Clone31 单克隆细胞的病毒滴度 VP (P24) 远远高于 293 细胞, Clone31 单克隆细胞的病毒滴度 VP (P24) 含量高。

实施例9 稳定包装细胞系放大工艺

5 将 Clone31 单克隆细胞由 E125 摇瓶扩大到 E1000 (Corning, 货号: 431147), 然后将目的质粒 (实施例 4 构建) 转染 Clone31 单克隆细胞进行产毒验证, 同时转染 293 细胞进行对照, Clone31 单克隆细胞和 293 细胞的转染条件和实施例 8 相同。进行各项比较细胞活率、病毒滴度 VP (Takara, 货号: 632200) 和 HCP (宿主蛋白) (Cygnum, 货号: F650) 残留 (参见图 10)。

10 图 10a 的实验结果表明 Clone31 单克隆细胞在转染 24h 和 48h 细胞活率均高于 293 细胞; 图 10b 的实验结果表明 Clone31 单克隆细胞的 HCP (宿主蛋白) 残留是 293 细胞 1/3, Clone31 单克隆细胞的 HCP (宿主蛋白) 残留少; 图 10c 的实验结果表明 Clone31 单克隆细胞的病毒滴度 VP (P24) 是 293 细胞的 10-20 倍, Clone31 单克隆细胞的病毒滴度 VP (P24) 含量高。

权利要求书

1. 一种慢病毒稳定包装细胞系，其中，包含包装质粒组，所述包装质粒组由 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒组成；

5 所述 pPuro.coTetR 质粒包含 CoTetR 基因，所述 pVSVG 质粒包含 VSVG 基因，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒包含 GagPol 和 Rev 基因。

2. 根据权利要求 1 所述的慢病毒稳定包装细胞系，其中，所述 pPuro.coTetR 质粒还包含 CMV 启动子、嵌合体内含子、SV40 启动子、嘌呤霉素抗性基因和多腺苷酸化信号；

10 所述 pVSVG 质粒还包含由 CMV 启动子和两个四环素操纵子组成的杂合启动子、SV40 启动子、博来霉素抗性基因和多腺苷酸化信号；

所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒还包含由 CMV 启动子和两个四环素操纵子组成的杂合启动子、嵌合体内含子、SV40 启动子、潮霉素抗性基因、cPPT/CTS 元件、RRE 元件和多腺苷酸化信号。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的慢病毒稳定包装细胞系，其中，所述 CoTetR 基因的序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述 VSVG 基因的序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述 GagPol 和 Rev 基因的序列分别如 SEQ ID NO: 3 和 4 所示。

4. 根据权利要求 1-3 之一所述的慢病毒稳定包装细胞系，其中，所述 pPuro.coTetR 质粒的序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述 pVSVG 质粒的序列如 SEQ ID NO: 6 所示，所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

5. 根据权利要求 1-4 之一所述的慢病毒稳定包装细胞系，其中，所述细胞系选自 HEK293、HEK293-T、HEK293-SF、TE671、HT1080 或 HeLa 细胞系中的一种；

优选地，所述细胞系为 HEK293 细胞系。

6. 一种制备如权利要求 1-5 任一项所述的慢病毒稳定包装细胞系的方法，其中，包括以下步骤：

1) 将 pPuro.coTetR 质粒、pVSVG 质粒和 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒分别线性化酶切；

2) 将线性化的 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒共转染细胞，并加入第一抗生素进行筛选，得到第一阳性单克隆细胞；

3) 用线性化的 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒转染第一阳性单克隆细胞，并加入第二抗生素进行筛选，得到第二阳性单克隆细胞，即为慢病毒稳定包装细胞系。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，在步骤 2) 中，将线性化的 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒共转染细胞的过程中还加入聚乙烯亚胺，所述聚乙烯亚胺与质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：(pPuro.coTetR 质粒+pVSVG 质粒) = (1~8) : 1；

35 优选地，所述聚乙烯亚胺与质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：(pPuro.coTetR 质粒 + pVSVG 质粒) = (2~5) : 1；

更优选地，所述聚乙烯亚胺与质粒的质量比为：聚乙烯亚胺：(pPuro.coTetR 质粒 + pVSVG 质粒) = 4:1；

和/或，在步骤 3) 中，将线性化的 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒转染第一阳性单克隆细胞的过程中还加入聚乙烯亚胺，所述聚乙烯亚胺与 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质量比为 (1~8) : 1；

40 优选地，所述聚乙烯亚胺与 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质量比为 (2~5) : 1；

更优选地，所述聚乙烯亚胺与 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的质量比为 4:1。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法, 其中, 在步骤 2) 中, 所述 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒的用量均为 $(0.2\sim 1.0) \mu\text{g}/10^6$ 个细胞;

优选地, 所述 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒的用量均为 $(0.4\sim 0.9) \mu\text{g}/10^6$ 个细胞;

更优选地, 所述 pPuro.coTetR 质粒和 pVSVG 质粒的用量均为 $0.8 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞;

5 和/或, 在步骤 3) 中, 所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 $(0.2\sim 1.0) \mu\text{g}/10^6$ 个第一阳性单克隆细胞;

优选地, 所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 $(0.4\sim 0.9) \mu\text{g}/10^6$ 个第一阳性单克隆细胞;

10 更优选地, 所述 pGagPol-RRE-NES-cINT 质粒的用量为 $0.8 \mu\text{g}/10^6$ 个第一阳性单克隆细胞。

9. 根据权利要求 6-8 之一所述的方法, 其中, 在步骤 2) 中, 所述第一抗生素为嘌呤霉素和博来霉素的组合物, 其用量分别为 $1\sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $300\sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$; 更优选地, 所述嘌呤霉素和博来霉素的用量分别为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$;

15 和/或, 在步骤 3) 中, 所述第二抗生素为嘌呤霉素、博来霉素和潮霉素的组合物, 其用量分别为 $1\sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $300\sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $300\sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$; 更优选地, 所述嘌呤霉素、博来霉素和潮霉素的用量分别为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

10. 一种慢病毒的生产方法, 其中, 将目的质粒转染权利要求 1-5 之一所述的慢病毒稳定包装细胞系。

11. 根据权利要求 10 所述的生产方法, 其中, 包括:

20 将目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系, 然后加入诱导剂诱导慢病毒稳定包装细胞系产生慢病毒。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的方法, 其中, 将目的质粒转染慢病毒稳定包装细胞系的过程中还加入聚乙烯亚胺, 所述聚乙烯亚胺与目的质粒的质量比为: 聚乙烯亚胺: 目的质粒 = $(1\sim 8) : 1$;

25 优选地, 所述聚乙烯亚胺与目的质粒的质量比为: 聚乙烯亚胺: 目的质粒 = $(2\sim 5) : 1$;

更优选地, 所述聚乙烯亚胺与目的质粒的质量比为: 聚乙烯亚胺: 目的质粒 = $4 : 1$ 。

13. 根据权利要求 10-12 之一所述的方法, 其中, 所述目的质粒的用量为 $(0.2\sim 0.8) \mu\text{g}/10^6$ 个慢病毒稳定包装细胞系;

优选地, 所述目的质粒的用量均为 $(0.3\sim 0.5) \mu\text{g}/10^6$ 个慢病毒稳定包装细胞系;

30 更优选地, 所述目的质粒的用量为 $0.4 \mu\text{g}/10^6$ 个慢病毒稳定包装细胞系。

14. 根据权利要求 10-13 之一所述的方法, 其中, 所述诱导剂为强力霉素;

优选地, 所述诱导剂的加入时间为转染后 $20\sim 30\text{h}$; 更优选地, 所述诱导剂的加入时间为转染后 24h ;

35 优选地, 所述诱导剂的加入浓度为 $1\sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$, 更优选地, 所述诱导剂的加入浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

15. 根据权利要求 10-14 之一所述的方法, 其中, 在慢病毒产生过程中还加入增强剂提高慢病毒的表达量;

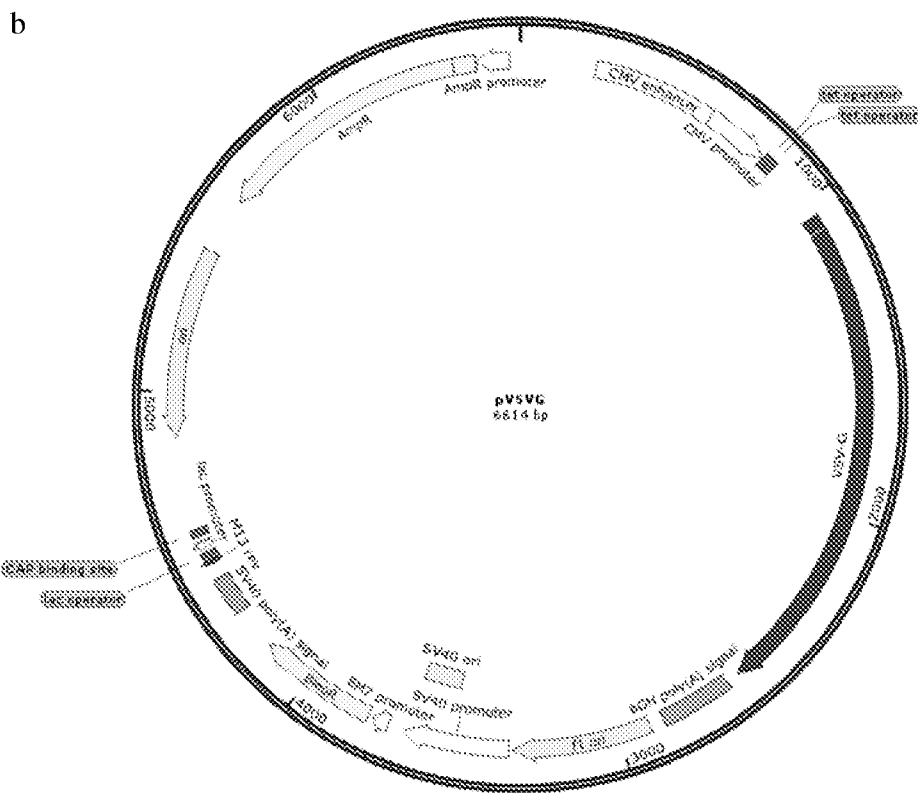
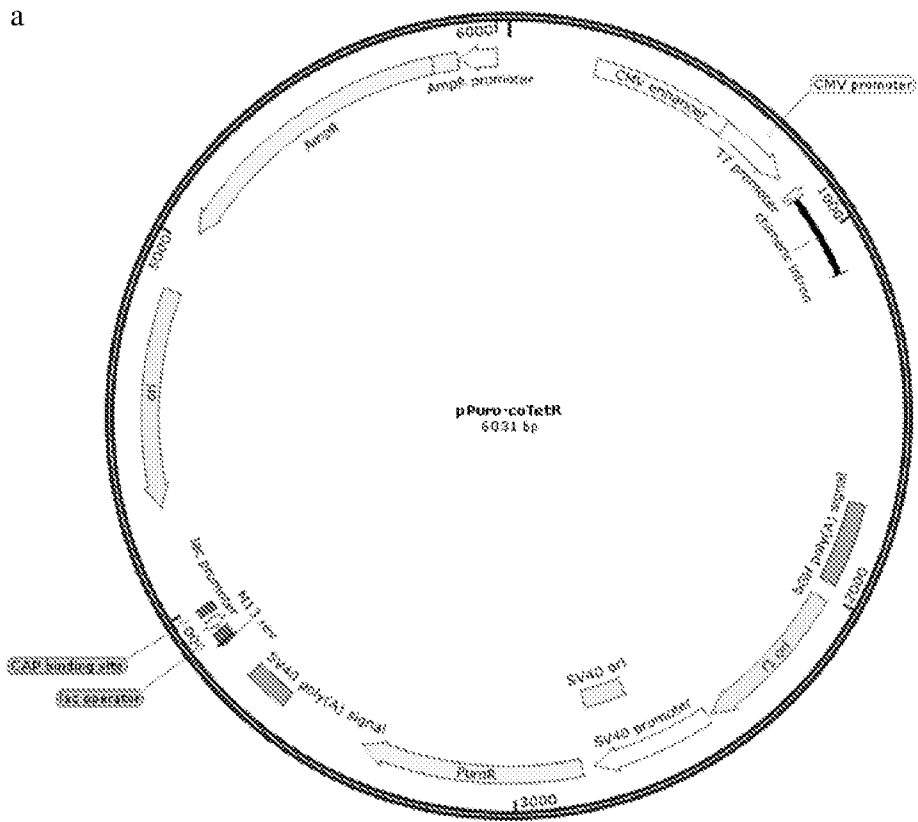
所述增强剂为丁酸钠;

40 优选地, 所述增强剂的加入浓度为 $5\sim 15\text{mM}$; 更优选地, 所述增强剂的加入浓度为 10mM ;

优选地, 所述增强剂的加入时间为转染后 $20\sim 30\text{h}$; 更优选地, 所述增强剂的加入时间为转染后 24h ;

优选地，所述增强剂的换液时间为加入增强剂后 6~8h；

和/或，所述慢病毒收集的时间为 45~50h；优选地，所述慢病毒收集的时间为 48h。



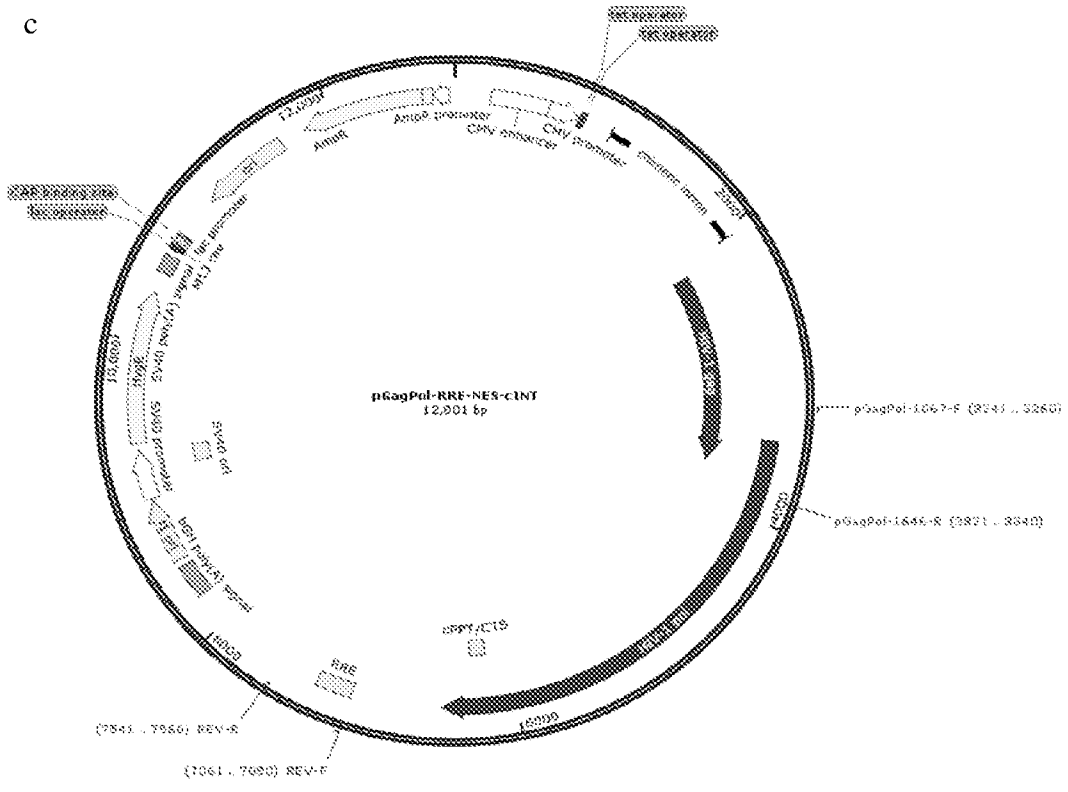


图 1

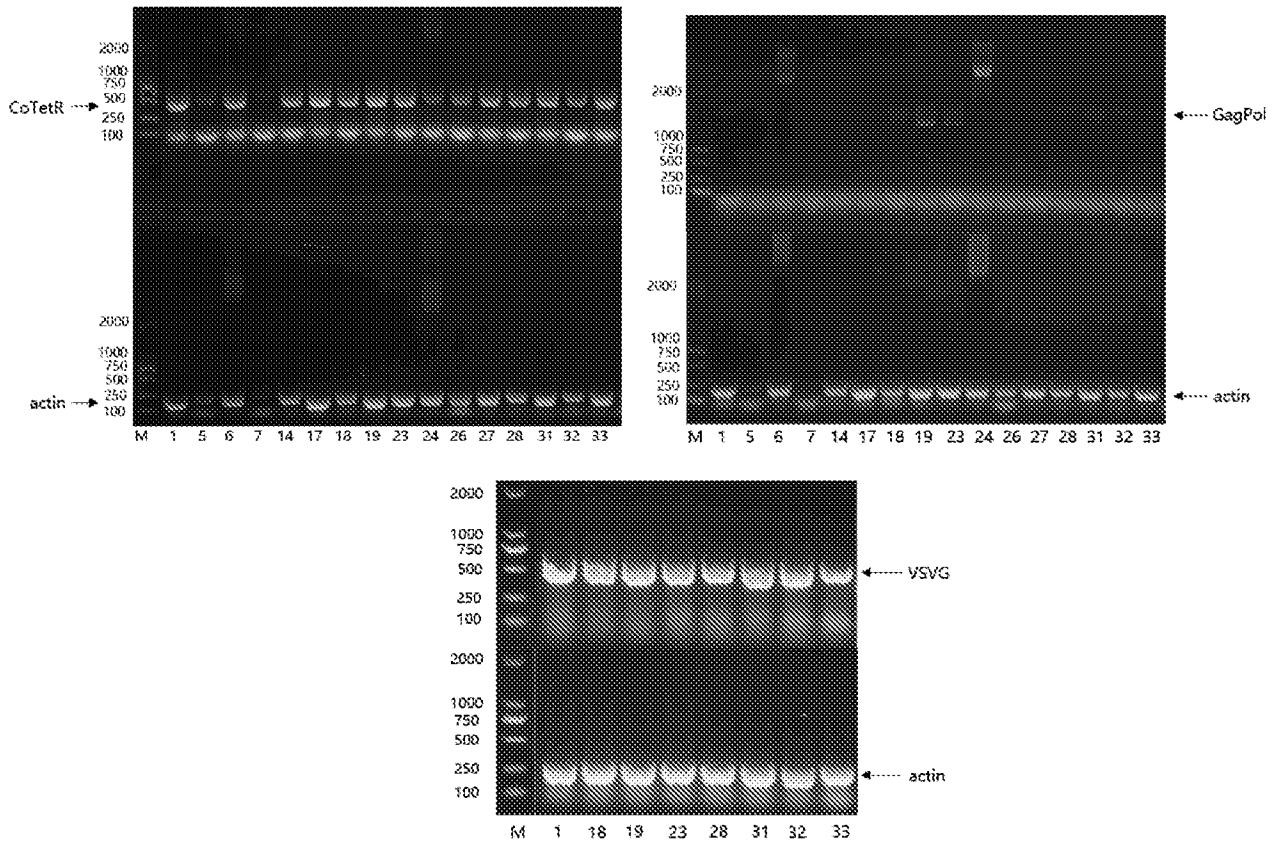


图 2

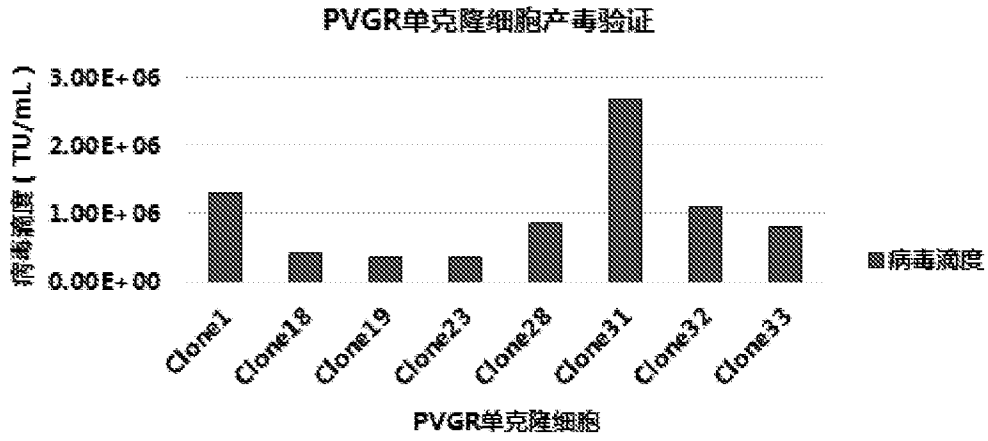


图 3

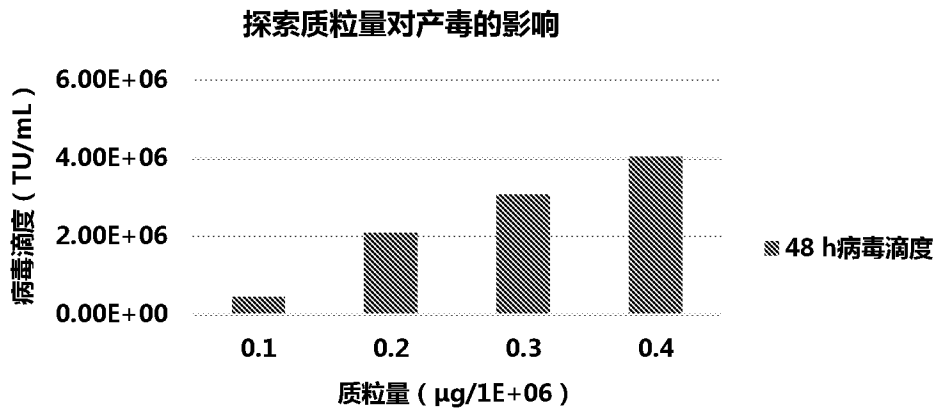


图 4

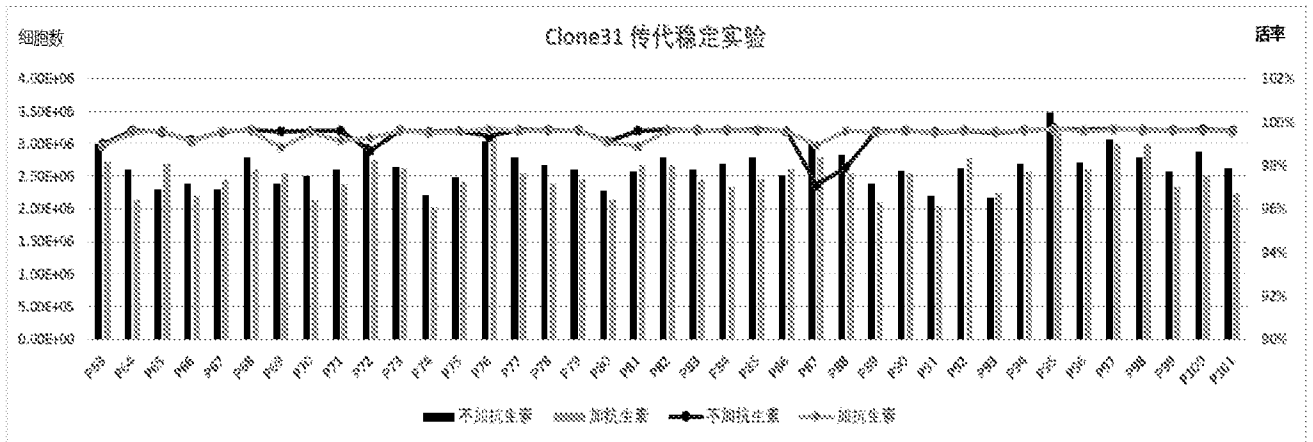


图 5

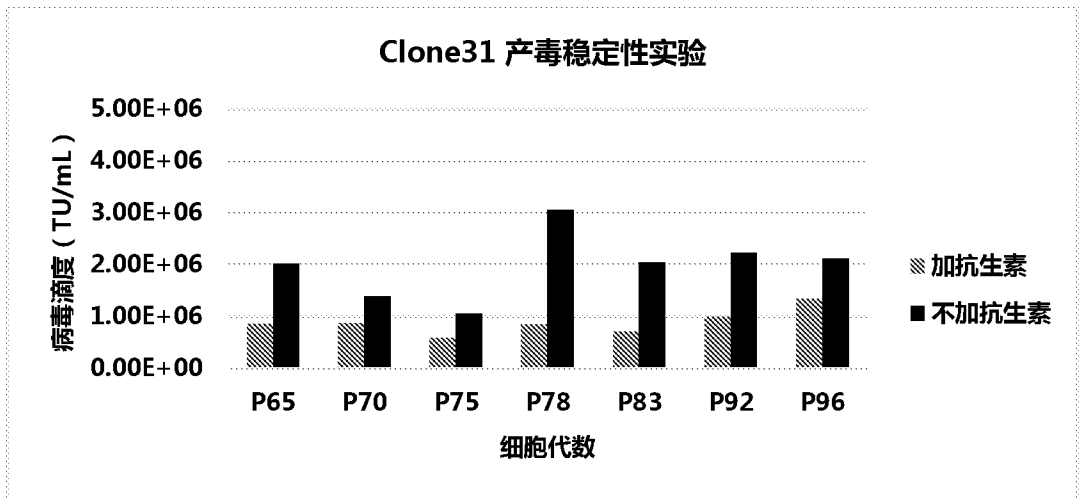


图 6

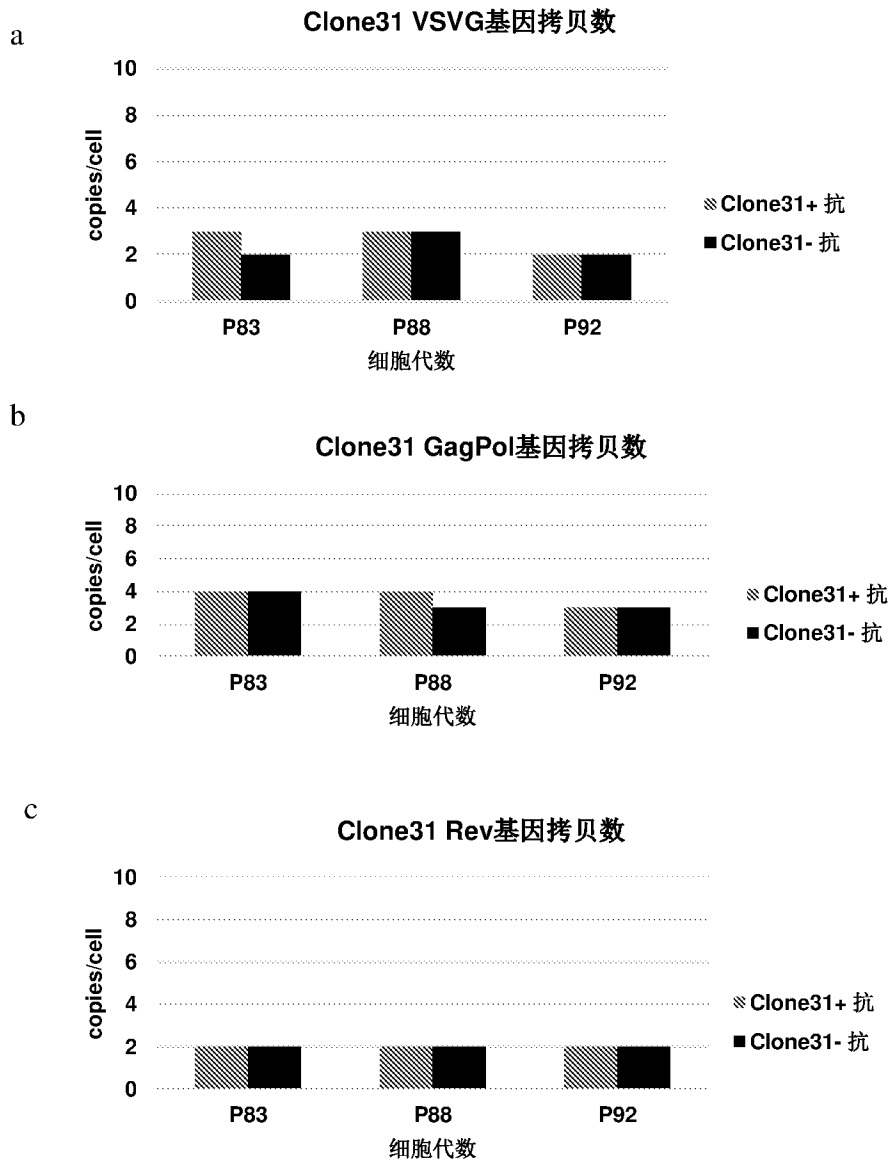


图 7

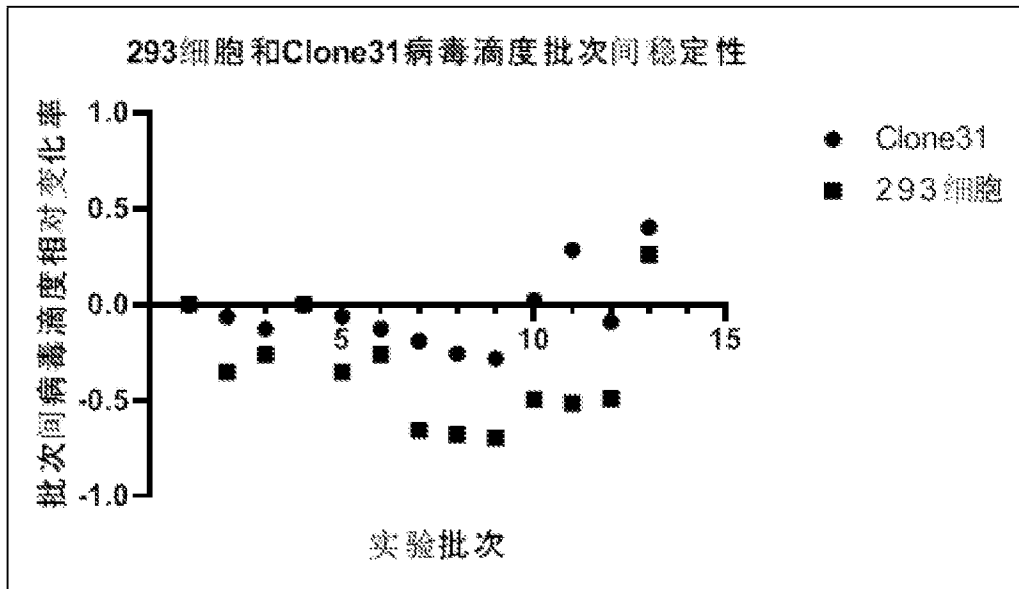


图 8

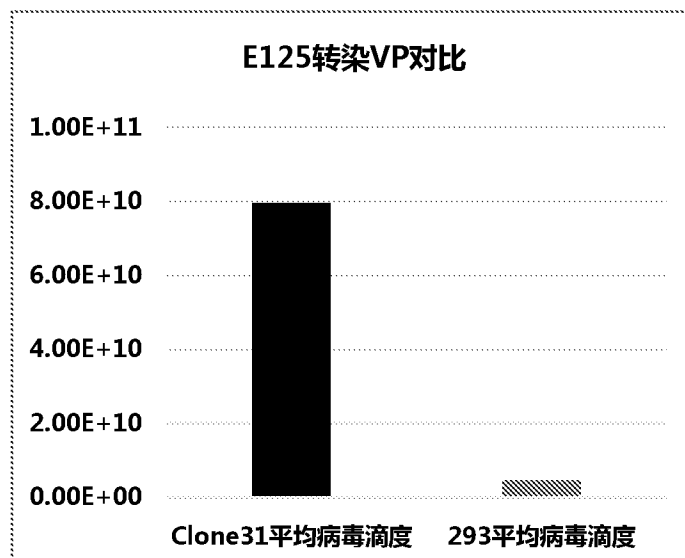


图 9

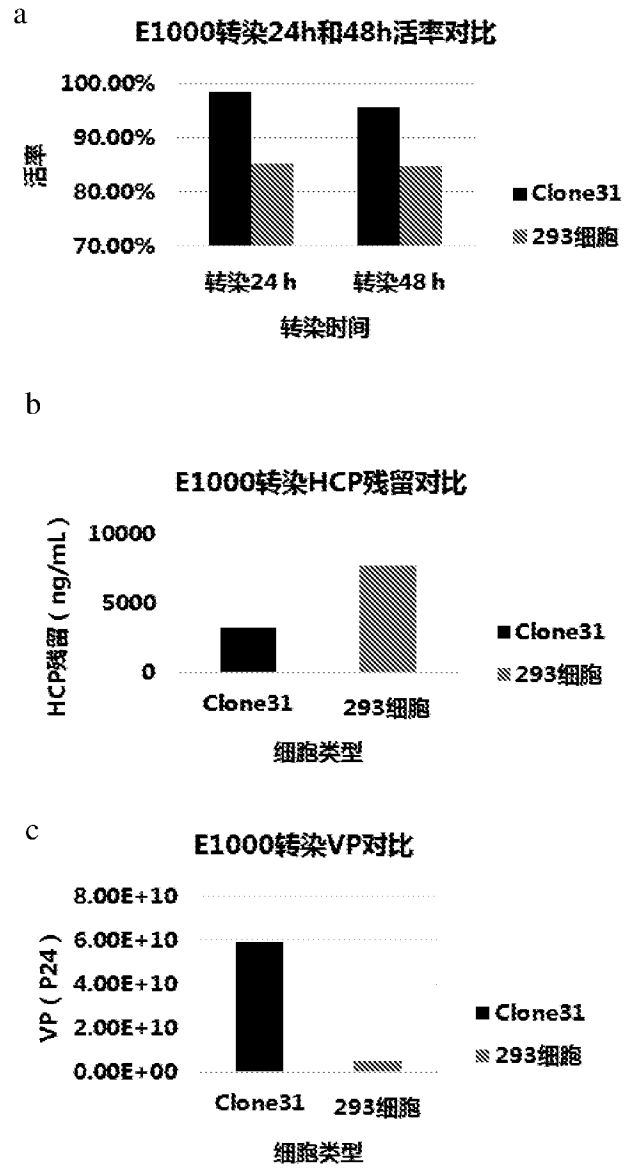


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12R 1/91(2006.01)n		
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; C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库: 慢病毒, 细胞系, 载体, 质粒, 四环素阻遏物, 包膜, 聚乙烯亚胺, 诱导, 强力霉素, 多西环素, 丁酸钠, lentiviral, lv, cell line, vector, plasmid, TetR, envelop, CoTetR, VSVG, GagPol, Rev, PEI, polyethyleneimine, doxycycline hyclate, NaB, sodium butyrate; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: sequence search for SEQ ID NOs: 1-7.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112430582 A (BEIJING IMMUNOCHINA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 02 March 2021 (2021-03-02) see claims 1-15	1-15
X	US 2019211358 A1 (OXFORD BIOMEDICA LTD) 11 July 2019 (2019-07-11) see description paragraphs 0174, 0323, 0362-0368 and table 1	1-15
A	CN 106029891 A (OXFORD BIOMEDICA (UK) LTD.) 12 October 2016 (2016-10-12) see entire document	1-15
A	HJ Stewart et al. "Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines" <i>Gene Therapy</i> , Vol. 16, 05 March 2009 (2009-03-05), ISSN: 0969-7128, pp. 805-814, see entire document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 08 February 2022		Date of mailing of the international search report 17 February 2022
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/CN2021/130967

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	孟凡荣等 (MENG, Fanrong et al.). "慢病毒载体及其研究进展 (Advances of Lentiviral Vectors)" <i>中国肺癌杂志 (Chinese Journal of Lung Cancer)</i> , Vol. 17, No. 12, 31 December 2014 (2014-12-31), ISSN: 1009-3419, pp. 870-876, see entire document	1-15
.....		

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/CN2021/130967

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)	
CN	112430582	A	02 March 2021	None		
US	2019211358	A1	11 July 2019	EP	3502260 A1	26 June 2019
				EP	3633040 A1	08 April 2020
				EP	3696272 A1	19 August 2020
CN	106029891	A	12 October 2016	JP	2020096609 A	25 June 2020
				ES	2748377 T3	16 March 2020
				EP	3083969 A1	26 October 2016
				EP	3083969 B1	07 August 2019
				EP	3650548 A1	13 May 2020
				DK	3083969 T3	14 October 2019
				GB	201322798 D0	05 February 2014
				JP	2017500870 A	12 January 2017
				JP	6655014 B2	26 February 2020
				US	2016333373 A1	17 November 2016
				US	10544429 B2	28 January 2020
				KR	20160122125 A	21 October 2016
				WO	2015092440 A1	25 June 2015
				PL	3083969 T3	31 March 2020
				US	2020102578 A1	02 April 2020

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12R 1/91(2006.01)n</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; C12R</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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库: 慢病毒, 细胞系, 载体, 质粒, 四环素阻遏物, 包膜, 聚乙烯亚胺, 诱导, 强力霉素, 多西环素, 丁酸钠, lentiviral, lv, cell line, vector, plasmid, TetR, envelop, CoTetR, VSVG, GagPol, Rev, PEI, polyethyleneimine, doxycycline hyclate, NaB, sodium butyrate; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID NOs:1-7的序列检索。</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>PX</td> <td>CN 112430582 A (北京艺妙神州医药科技有限公司 等) 2021年3月2日 (2021 - 03 - 02) 参见权利要求1-15</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2019211358 A1 (OXFORD BIOMEDICA LTD) 2019年7月11日 (2019 - 07 - 11) 参见说明书第0174、0323、0362-0368段和表1</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106029891 A (牛津生物医学英国有限公司) 2016年10月12日 (2016 - 10 - 12) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>HJ Stewart 等. "Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines" Gene Therapy, 第16卷, 2009年3月5日 (2009 - 03 - 05), ISSN: 0969-7128, 第805-814页, 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>孟凡荣 等. "慢病毒载体及其研究进展" 中国肺癌杂志, 第17卷, 第12期, 2014年12月31日 (2014 - 12 - 31), ISSN: 1009-3419, 第870-876页, 参见全文</td> <td>1-15</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	PX	CN 112430582 A (北京艺妙神州医药科技有限公司 等) 2021年3月2日 (2021 - 03 - 02) 参见权利要求1-15	1-15	X	US 2019211358 A1 (OXFORD BIOMEDICA LTD) 2019年7月11日 (2019 - 07 - 11) 参见说明书第0174、0323、0362-0368段和表1	1-15	A	CN 106029891 A (牛津生物医学英国有限公司) 2016年10月12日 (2016 - 10 - 12) 参见全文	1-15	A	HJ Stewart 等. "Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines" Gene Therapy, 第16卷, 2009年3月5日 (2009 - 03 - 05), ISSN: 0969-7128, 第805-814页, 参见全文	1-15	A	孟凡荣 等. "慢病毒载体及其研究进展" 中国肺癌杂志, 第17卷, 第12期, 2014年12月31日 (2014 - 12 - 31), ISSN: 1009-3419, 第870-876页, 参见全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 112430582 A (北京艺妙神州医药科技有限公司 等) 2021年3月2日 (2021 - 03 - 02) 参见权利要求1-15	1-15																		
X	US 2019211358 A1 (OXFORD BIOMEDICA LTD) 2019年7月11日 (2019 - 07 - 11) 参见说明书第0174、0323、0362-0368段和表1	1-15																		
A	CN 106029891 A (牛津生物医学英国有限公司) 2016年10月12日 (2016 - 10 - 12) 参见全文	1-15																		
A	HJ Stewart 等. "Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines" Gene Therapy, 第16卷, 2009年3月5日 (2009 - 03 - 05), ISSN: 0969-7128, 第805-814页, 参见全文	1-15																		
A	孟凡荣 等. "慢病毒载体及其研究进展" 中国肺癌杂志, 第17卷, 第12期, 2014年12月31日 (2014 - 12 - 31), ISSN: 1009-3419, 第870-876页, 参见全文	1-15																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <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>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年2月8日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年2月17日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>吴汀晨</p> <p>电话号码 86-(010)-62089319</p>																		

第1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/CN2021/130967

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	112430582	A	2021年3月2日	无			
US	2019211358	A1	2019年7月11日	EP	3502260	A1	2019年6月26日
				EP	3633040	A1	2020年4月8日
				EP	3696272	A1	2020年8月19日
CN	106029891	A	2016年10月12日	JP	2020096609	A	2020年6月25日
				ES	2748377	T3	2020年3月16日
				EP	3083969	A1	2016年10月26日
				EP	3083969	B1	2019年8月7日
				EP	3650548	A1	2020年5月13日
				DK	3083969	T3	2019年10月14日
				GB	201322798	D0	2014年2月5日
				JP	2017500870	A	2017年1月12日
				JP	6655014	B2	2020年2月26日
				US	2016333373	A1	2016年11月17日
				US	10544429	B2	2020年1月28日
				KR	20160122125	A	2016年10月21日
				WO	2015092440	A1	2015年6月25日
				PL	3083969	T3	2020年3月31日
				US	2020102578	A1	2020年4月2日