

(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
2023 年 6 月 15 日 (15.06.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/102735 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/864 (2006.01) *C12N 15/65* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/136105
- (22) 国际申请日: 2021 年 12 月 7 日 (07.12.2021)
- (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, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 林坤章 (LIN, Kunzhang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong

518055 (CN)。韩增鹏 (HAN, Zengpeng); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。骆能松 (LUO, Nengsong); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 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, Guangdong 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, Beijing 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, 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,

(54) **Title:** RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS SPECIFICALLY TARGETING ASTROCYTES, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种特异性靶向星形胶质细胞的重组腺相关病毒及其应用



图 1

(57) **Abstract:** Disclosed in the present invention are a recombinant adeno-associated virus targeting astrocytes, and an application thereof. The backbone of the recombinant adeno-associated virus is pAAV2/11, and the recombinant adeno-associated virus is obtained by co-transfecting a packaging cell line by an adeno-associated virus core plasmid, a recombinant adeno-associated virus packaging plasmid, and an adenovirus element helper plasmid; the recombinant adeno-associated virus core plasmid comprises inverted terminal repeat (ITR) sequences at both ends, a GfaABC1D promoter, an exogenous gene, a transcriptional regulatory element WPRE, and a

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))。

transcriptional termination sequence SV40 poly A; the recombinant adeno-associated virus packaging plasmid comprises a Rep gene of adeno-associated virus type 2, and a Cap gene of adeno-associated virus type 11. In the present invention, for the first time, pAAV2/11 is used as a gene transfer vector to specifically target astrocytes, better tools and technical support are provided for neuroscience research, disease model establishment, gene therapy, or the like, and the present invention has a great application value and market prospect.

(57) 摘要: 本发明公开了一种靶向星形胶质细胞的重组腺相关病毒及其应用, 所述重组腺相关病毒的骨架为 pAAV2/11, 由腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒共转染包装细胞系获得, 所述重组腺相关病毒核心质粒包含两端反向末端重复序列 ITR、GfaABC1D 启动子、外源基因、转录调节元件 WPRE 和转录终止序列 SV40 poly A, 所述重组腺相关病毒包装质粒包括 2 型腺相关病毒的 Rep 基因和 11 型腺相关病毒的 Cap 基因。本发明首次将 pAAV2/11 作为基因转移载体实现星形胶质细胞的特异性靶向, 为神经科学研究、疾病模型建立和基因治疗等提供了更好的工具和技术支撑, 具有广泛的应用价值和市场前景。

一种特异性靶向星形胶质细胞的重组腺相关病毒及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种特异性靶向星形胶质细胞的重组腺相关病毒及其应用。

背景技术

大脑网络由各种各样的神经细胞组成，神经细胞主要包括神经元和胶质细胞（neuroglia）两大类，分别在大脑中扮演不同的角色。神经胶质细胞的数量比神经元多几十倍，一般可分为小胶质细胞、星形胶质细胞以及少突胶质细胞等。随着神经科学的发展，人们发现不同类型的神经细胞具有不同的网络结构连接与功能，其发生变异可引起不同的大脑疾病和行为障碍。越来越多的证据表明星形胶质细胞跟各种脑疾病相关（*Nature*. 2014;509(7499):189-194.）。因此，有必要开发特异性靶向星形胶质细胞的工具，用于解析星形胶质细胞的结构与功能，为脑疾病的治疗提供理论依据和技术支撑。

目前，科研工作者对星形胶质细胞的解析主要依赖于转基因动物。然而，转基因动物，如小鼠、大鼠、狗、猪和猴子等，具有繁殖周期长、饲养成本高以及不能灵活地携带目的基因进行神经细胞的操控与疾病的治疗。因此，继续发展能够特异性靶向星形胶质细胞的方法具有十分重要的意义。

发明内容

为了解决现有技术中的不足，本发明的目的是提供一种特异性靶向星形胶质细胞的重组腺相关病毒及其应用。

本发明第一方面提供一种重组腺相关病毒核心质粒，其包含两端反向末端重复序列 ITR、GfaABC1D 启动子、外源基因、转录调节元件 WPRE 和转录终止序列 SV40 polyA。

进一步地，所述外源基因包括报告基因；

优选地，所述报告基因为 EGFP。

进一步地，所述重组腺相关病毒核心质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

本发明第二方面提供一种重组腺相关病毒载体系统，包括所述的腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒。

进一步地，所述重组腺相关病毒包装质粒包括 2 型腺相关病毒的 Rep 基因和 11 型腺相关病毒的 Cap 基因；

优选地，所述重组腺相关病毒包装质粒以 pAAV-RC2/1 为骨架；

优选地，所述腺病毒元件辅助质粒为 pAd-Helper。

进一步地，所述重组腺相关病毒包装质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

本发明第三方面提供一种重组腺相关病毒，由所述的腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒共转染包装细胞系获得。

进一步地，所述包装细胞系选自 HEK-293 细胞、HEK-293T 细胞或 HEK-293FT 细胞；

优选地，所述的腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒的分子数为 1:1:1。

进一步地，所述重组腺相关病毒包装质粒包括 2 型腺相关病毒的 Rep 基因和 11 型腺相关病毒的 Cap 基因；

优选地，所述重组腺相关病毒包装质粒以 pAAV-RC2/1 为骨架；

优选地，所述重组腺相关病毒包装质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

优选地，所述腺病毒元件辅助质粒为 pAd-Helper。

本发明第四方面提供所述的重组腺相关病毒核心质粒、所述的重组腺相关病毒载体系统或所述的重组腺相关病毒在特异性靶向星形胶质细胞中的应用。

本发明的有益效果为；

本发明首次将 pAAV2/11 作为基因转移载体实现星形胶质细胞的特异性靶向，为神经科学研究、疾病模型建立和基因治疗等提供了更好的工具和技术支撑，具有广泛的应用价值和市场前景。

附图说明

图 1 为重组腺相关病毒核心质粒表达载体图谱。

图 2 为重组腺相关病毒感染背侧海马区域的信号。其中，“DAPI”代表对细胞核进行染色的信号，为蓝色荧光；“GFAP”代表对星形胶质细胞标志物 GFAP 进行染色后的信号，为红色荧光；“EGFP”代表 rAAV2/11-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 标记的细胞信号，为绿色荧光，与红色荧光共标。

具体实施方式

为了更清楚地理解本发明，现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条

件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

实施例 1：重组腺相关病毒核心质粒的构建

使用 BglII 和 NheI (New England Biolabs) 限制性内切酶酶切载体 pZac2.1-GfaABC1D-rM3D-mCherry-SV40 polyA(购自 Addgene, 编号: 92285)，用胶回收试剂盒 (Omega 公司) 回收 GfaABC1D 启动子片段，用 T4 连接酶(购于 TaKaRa 公司)连入同样经 BglII 和 NheI 双酶切的腺相关病毒载体 pAAV-hSyn-EGFP-WPRE-SV40 polyA(布林凯斯(深圳)生物技术有限公司)，连接产物转化大肠杆菌 Stbl3 感受态细胞，置于 35℃培养箱过夜，挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定，鉴定引物为 GfaABC1D-F(SEQ ID NO.1)和 GfaABC1D-R(SEQ ID NO.2)，对阳性菌落进行扩大培养和质粒提取，质粒用 BglII 和 NheI 双酶切验证和测序，测序正确的质粒命名为 pAAV-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA。构建获得的重组腺相关病毒核心质粒 pAAV-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 表达载体的图谱如图 1 所示，其基因序列如 SEQ ID NO.3 所示。本发明所有 PCR 使用引物合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

实施例 2：重组腺相关病毒的制备

利用重组腺相关病毒包装质粒 pAAV-RC2/11 表达载体包装重组腺相关病毒，将重组腺相关病毒核心质粒 pAAV-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 与 pAAV-RC2/11 血清型 AAV 衣壳质粒、腺病毒元件辅助质粒 pAd-Helper 按质粒分子数 1: 1: 1 共转染 HEK-293T 细胞，转染 72 小时后分别收集上清和细胞沉淀，用碘克沙醇梯度离心法进行浓缩和纯化，最后用 SYBR Green qPCR 法检测重组腺相关病毒滴度，最终获得 rAAV2/11-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 病毒的滴度为 6.0×10^{12} VG/mL。

重组腺相关病毒包装质粒 pAAV-RC2/11 具有如 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。

实施例 3：重组腺相关病毒的活体应用

将制备的 rAAV2/11-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA (100nL/只) 病毒通过脑立体定位方式注射于 8-10 周龄 C57BL/6 小鼠(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司)的背侧海马区域，3 周后灌流取脑，小鼠脑组织经 DEPC 处理过的 PFA 溶液固定 4 小时后再用 DEPC 处理过的 30%蔗糖-PBS 溶液脱水 48 小时，将脱水后的脑组织用组织包埋剂充分包埋并用冰冻切片机切成 40μm 厚度的脑片。将包含背侧海马区域的脑片利用 GFAP 抗体进行免疫组化染色，之后贴片并使用玻片扫描仪显微镜对其进行成像。活体检测结果可以看出，

rAAV2/11-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 标记的绿色荧光信号与星形胶质细胞标志物 GFAP 的红色信号共标，表明 rAAV2/11-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 重组腺相关病毒能够特异性靶向星形胶质细胞。图 2 为 rAAV2/11-GFaABC1D-EGFP-WPRE-SV40 polyA 重组腺相关病毒感染背侧海马区域的信号。

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。

本发明的核苷酸序列如下：

SEQ ID NO: 1

aacatatcctggtgtggagt

SEQ ID NO: 2

gctagcctatagtgagtcgta

SEQ ID NO: 3

cgcaaacgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttccccgactggaaagcgggcagtgagcgca
acgcaattaatgtgagttagctcactcattagcaccacagccttacactttatgctccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaat
ttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccagattaattaaggccttaattaggctgcgcgctcgtcgtcactgagggccgcccgggc
aaagcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacc
gcatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatctaacatatcctggtgtggagtaggggacgctgctctgacagaggctcgggggcct
gagctggctctgtgagctggggaggaggcagacagccaggccttgctgcaagcagacctggcagcattgggtggtcgccccccagggc
ctcctcttcatgccagtgaatgactcaccttggcacagacacaatgttcgggggtgggcacagtgcctgcttccccgcgcacccagccccct
caaatgccttccgagaagccattgagcagggggcttgattgcacccagcctgacagcctggcatcttgggataaaagcagcacagcccc
taggggctgcccttgctgtgtggcgccaccggcggtggagaacaaggctctattcagcctgtgccaggaaaggggatcaggggatgccag
gcatggacagtgggtggcaggggggagaggagggtgctgcttccagaagtccaaggacacaaatgggtgaggggagagctctcccc
atagctgggctgcggcccaacccacccccctcaggctatgccaggggtgttgccaggggcacccgggcatcgccagtctagcccactcct
cataaagccctcgcacccaggagcgagcagagccagagcaggttgagaggagacgcatcacctccgctgctcgcaagctttattgcggta
gtttatcacagttaaattgtaacgcagtcagtgcttctgacacaacagtctcgaacttaagctgcagaagttggtcgtgaggcactgggcaggta
agtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcttgcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattggt
cttactgacatccactttgctttctctccacaggtgtccactcccagttcaattacagctcttaaggctagagtacttaatacagactcactataggcta
gcgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtgtgcccacctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagtt
cagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccactacggcaagctgacctgaagtcatctgaccaccggcaagctgcccgtgccctgg
cccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgagtgcttcagccgtaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttaagtccgcatgc
ccgaaggctacgtccaggagcgacccatcttcttaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcagggcgacaccct

ggatgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaac
gtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccga
ccactaccagcagaacacccccatcgggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagcaaagac
cccaacgagaagcgcgatcacatggctcctgctggagttcgtgaccgcccgggacactctcggcattggacgagctgtacaagtaagtcga
caatcaacctctggattacaaaatttgaagattgactggattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgat
catgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcctgtataaatcctgggtgctgctctttatgaggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggc
gtggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccactgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctat
tgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgctgctggacaggggctcggtgttgggactgacaattccgtgggtgtgtcggggaa
atcatcgtcctttccttggctgctcgctatgttgcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggacc
ttccttcccgcggcctgctgcggctctgcggcctctccgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgc
gcccgcgcttcgagcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgaatttgt
gatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcagggtcagggggagatgtggg
agggtttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaaatcgataaggatcttcctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaa
tcattaactacaaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggggcagcaaaaggctgccccg
acggccgggctttggccggggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgacgcttaattaacctaattcactggccgctgcttttacaacgtcgtgac
tgggaaaaccttgcggttaccacttaategccttgcagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcc
cttccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatgggacgcgcctgtagcggcgcatgaagcgcgggcggtgtggtggttacgcgcagcgtg
accgtacacttgcagcgccctagcgccgctcctttcgttttcttcccttcttctgccacgttcgccggctttcccgctcaagctctaaatcg
ggggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctg
atagacgggttttcgcccttgacgttggagtccacgttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattctt
ttgatttataagggttttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttaca
atttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctg
ataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgatgatttcaacattccgtgctgccttattccctttttgcggcattttgccttctgttttgc
caccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatgaactggatctcaacagcggtaagatc
cttgagagttttcggccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcggtattatccgctattgacgggggaaga
gcaactcggtcggcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagag
aattatgcagtgtgccataaccatgagtataactgcggccaacttacttctgacaacgatcgaggaccgaaggagctaaccgctttttgc
acaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctg
tagcaatggcaacaacgttgcgcaactatttaactggcgaacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaa
gttgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctgggtgtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgca
gcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtatgttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgt
gagatagggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaattaaaaggatc
taggtgaagatccttttataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatc
ttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttgcgggatcaagagctaccaa

ctcttttccgaaggtactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgta
gcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggtctgctgccagtggtcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatag
ttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacc
tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaaggcggcagggtcggaacaggagag
cgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgt
cagggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttctggccttttctcacatgttcttctcgcgtt
atcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagc
gaggaagcgggaagagcgcccaata

SEQ ID NO: 4

gctgcgcaactgttgggaaggcgatcggctgcccgcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgatta
agttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaacgacggccagtgagcgcgcgtaatacgaactactataggcggaattgggta
ccggggccccctcgaggtcgacgggtatcgggggagctcgagggtctccattttgaagcgggaggtttgaacgcgcagccgccatgccgg
ggttttacgagattgtgattaagggtccccagcgaccttgacgagcatctgcccggcatttctgacagctttgtgaactgggtggccgagaaggaa
gggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacgg
aatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggctcttttctgtgcaatttgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtggaaacc
accggggtgaaatccatggtttgggacgttctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccgcggtatcgagccgactttgcc
aactggttcgcggtcacaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaagggtggtgatgagtgctacatcccaattactgtccccaaa
accagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtatttaagcgcctgtttgaatctcacggagcgtaaacgggttggtggcgcagc
atctgacgcacgtgtcgagacgcaggagcagaacaaagagaatcagaatccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagcca
ggtacatggagctggctgggtggctcgtggacaaggggattacctcgagagaagcagtggtatccaggaggaccaggcctacatctccttca
atgcggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgccttgacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctgg
tgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcgatttataaaattttggaactaaacgggtacgatcccaatatgcggcttccgtctttct
gggatggggccacgaaaaagtctggcaagaggaacaccatctggctgtttgggctgcaactaccgggaagaccaacatcgcgagggccata
gcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactggaccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggagga
ggggaagatgaccgcaaggctcgtggagtcggccaaagccattctcgagggaagcaagggtgcgctggaccagaaatgcaagtcctcggc
ccagatagaccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactcaacgaccttgaacaccagcagcc
gttgcaagaccggatgttcaaatgtgaactcaccgcccgtctggatcatgactttgggaaggctaccaagcagggaagtcaagacttttccggtg
ggcaaggtatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataa
gtgagcccaaacgggtgcgcgagtcagttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtacaaaacaa
atgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttactcacggacag
aaagactgtttagagtgtttcccggtgcagaatctcaaccggttctgtcgtcaaaaaggcgatcagaaactgtgctacattcatcatatcatggg
aaagggtgccagacgcttgactgcctgcgatctggtcaatgtggattggatgactgcactttgaacaataaatgattaaatcagggtatggctgct
gacgggttatctccagattggctcgaggacaacctctctgagggcatttcgcgagtggtgggacctgaaacctggagccccgaagcccaaggcc
aaccagcagaagcaggacgacggccgggggtctgggtgcttctggctacaagtacctcggaccttcaacggactcgacaaggggggagcccg

tcaacgcggcgagcagcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataacc
acgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaagatacgtctttgggggcaacctcgggcgagcagcttccaggccaagaaggaggta
ctcgaacctctgggcctgggtgaagaagggtgctaaacggctcctggaaagaagagaccgttagagtcaccacaagagccccgactcctcctcg
ggcatcggcaaaaaaggcaacaaccagccagaaagaggctcaactttgaagaggacactggagccggagacggacccccctgaaggatca
gataccagcgccatgtcttcagacattgaaatgcgtgcagcaccggcggaatgctgtcgatgcccggacaagggtccgatggagtgggtaat
gcctcgggtgattggcattgcgattccacctggctgagggcaagggtcacaacaacctcgaccagaacctgggtcttggccacctacaacaacc
actgtacctgcgtctcggaacaacatcaagcagcaaacactacaacggattctccacccccctgggataattttgacttcaacagattccactgtca
cttctcaccacgtgactggcaaagactcatcaacaacaactggggactacgacaaaagccatgcgcgttaaaatcttcaatatccaagtaagg
agggtcacaacgtgcaacggcgagactacggctgctaataaccttaccagcacgggtcagatatttgcggactcgtcgatgagctcccgtagctg
atggacgctggacaagaggggagcctgcctctttcccaatgacgtgttcatggctcctcaatatggctactgtggcatcgtgactggcgagaa
tcagaaccaaaccggacagaaacgcttctactgcctggagtattttccttcgcaaatgttgagaactggcaacaacttgaatggcttacaactttg
agaagggtccgttccactcaatgtatgctcacagccagagcctggacagactgatgaatccccctcctggaccagtacctgtggcacttacagtgc
actacctctggagagactctgaatcaaggcaatgcagcaaccacatttgaaaaatcaggagtggagactttgcctttacagaaagaactggct
gcctgggccttgtgttaaacagcagagattctcaaaaactgccagtcaaaattacaagattcctgccagcgggggcaacgctctgttaaagtatg
acaccactataccttaacaaccgctggagcaacatcgcgccccggacctccaatggccacagccggaccttcggatggggacttcagtaacg
cccagcttatattccctggaccatctgttaccggaaatacaacaacttcagccaacaatctgttgtttacatcagaagaagaattgctgccaccaa
cccaagagacacggacatgtttggccagattgctgacaataatcagaatgctacaactgctccataaccggcaacgtgactgctatgggagtgc
ctgcctggcatgggtgtggcaaacagagacatttactaccaaggggccaatttgggccaagatcccacacgcggacggacattttcatccttacc
gctgattgggtgggttggactgaaacccccgctccccagatattcatcaagaacactcccgtacctgccaatcctgcgacaaccttactgcag
ccagagtggactctttcatcacacaatacagcaccggccaggtcgtgttcagattgaatgggaaattgaaaaggaaacgtccaaacgctggaa
tcctgaagtgcagtttacttcaaactatgggaaccagcttctatgttgtgggtcctgatacaactgggaagtatacagagccgcggttattggct
ctcgttatttgactaatcatttgaattacgtgttaatacaataaaccgggtgattcggttcagttgaactttggctcctgtccttcttatcttaccgttacca
tggttatagcttacacattaactgcttgggtgcgttcgcgataaaagacttacgtcatcggggtacccctagggggatccactagtcttagagggtcc
tgtattagaggtcacgtgagtggtttgcgacattttgcgacaccatgtgggtcacgctgggtatttaagcccagtgagcacgcagggtctccatttg
aagcgggaggttgaacgcgcagccccaagccgaattctgcagatatccatcacactggcgccgctcgactagagcgccgccaccgcg
gtggagctccagcttttgtccctttagtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatggctcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcaca
attccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcc
cgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcggggagagggcggttgcgtattgggcgctcttccgctt
cctcgtcactgactcgtgcgctcggctggtcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacgggttatccacagaatcagg
ggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgttttccatagggtcc
gccccctgacgagcatcaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctgga
agctccctcgtgcgctctcgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgctttctccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcac
gctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggt
aactatcgtcttgagtccaacccggtgaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggc

gggtgtacagagttcttgaagtgggtggcctaactacgggtacactagaagaacagtatgttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgga
aaaagagttggttagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggttagcggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaagg
atctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaagga
tcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgag
gcacctatctcagcgatctgtctatttcggtcatccatagttgcctgactccccgctgtagataactacgatacgggagggccttaccatctggccc
cagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagt
ggctctgcaactttatccgctccatccagctatttaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacgttggtgccc
attgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtctgttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtt
gtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatggttatggcagcactgcataat
tctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctct
tgccccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaaactctcaag
gatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcggttctgggtgagcaaa
aacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttat
caggggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccaccta
aattgtaagcgtaatatattttgttaaaattcgcgttaaatgtttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatca
aaagaatagaccgagatagggtgagtggtgttccagtttgaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaa
ccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacctaataagtttttggggtcgaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaccctaaa
gggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctaggg
cgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgttaatgcgccgctacagggcgcgctccattcgccattcag

权 利 要 求 书

1、一种重组腺相关病毒核心质粒，其特征在于，所述重组腺相关病毒核心质粒包含两端反向末端重复序列 ITR、GfaABC1D 启动子、外源基因、转录调节元件 WPRE 和转录终止序列 SV40 polyA。

2、根据权利要求 1 所述的重组腺相关病毒核心质粒，其特征在于，所述外源基因包括报告基因；

优选地，所述报告基因为 EGFP。

3、根据权利要求 1 所述的重组腺相关病毒核心质粒，其特征在于，所述重组腺相关病毒核心质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

4、一种重组腺相关病毒载体系统，其特征在于，包括权利要求 1 所述的腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒。

5、根据权利要求 4 所述的重组腺相关病毒载体系统，其特征在于，所述重组腺相关病毒包装质粒包括 2 型腺相关病毒的 Rep 基因和 11 型腺相关病毒的 Cap 基因；

优选地，所述重组腺相关病毒包装质粒以 pAAV-RC2/1 为骨架；

优选地，所述腺病毒元件辅助质粒为 pAd-Helper。

6、根据权利要求 5 所述的重组腺相关病毒包装质粒，其特征在于，所述重组腺相关病毒包装质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

7、一种重组腺相关病毒，其特征在于，由权利要求 1 所述的腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒共转染包装细胞系获得。

8、根据权利要求 7 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述包装细胞系选自 HEK-293 细胞、HEK-293T 细胞或 HEK-293FT 细胞；

优选地，权利要求 1 所述的腺相关病毒核心质粒、重组腺相关病毒包装质粒和腺病毒元件辅助质粒的分子数为 1:1:1。

9、根据权利要求 7 所述的重组腺相关病毒，其特征在于，所述重组腺相关病毒包装质粒包括 2 型腺相关病毒的 Rep 基因和 11 型腺相关病毒的 Cap 基因；

优选地，所述重组腺相关病毒包装质粒以 pAAV-RC2/1 为骨架；

优选地，所述重组腺相关病毒包装质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

优选地，所述腺病毒元件辅助质粒为 pAd-Helper。

10、权利要求 1-3 任一项所述的重组腺相关病毒核心质粒、权利要求 4-6 任一项所述的重组腺相关病毒载体系统或权利要求 7-9 任一项所述的重组腺相关病毒在特异性靶向星形胶质细胞中的应用。

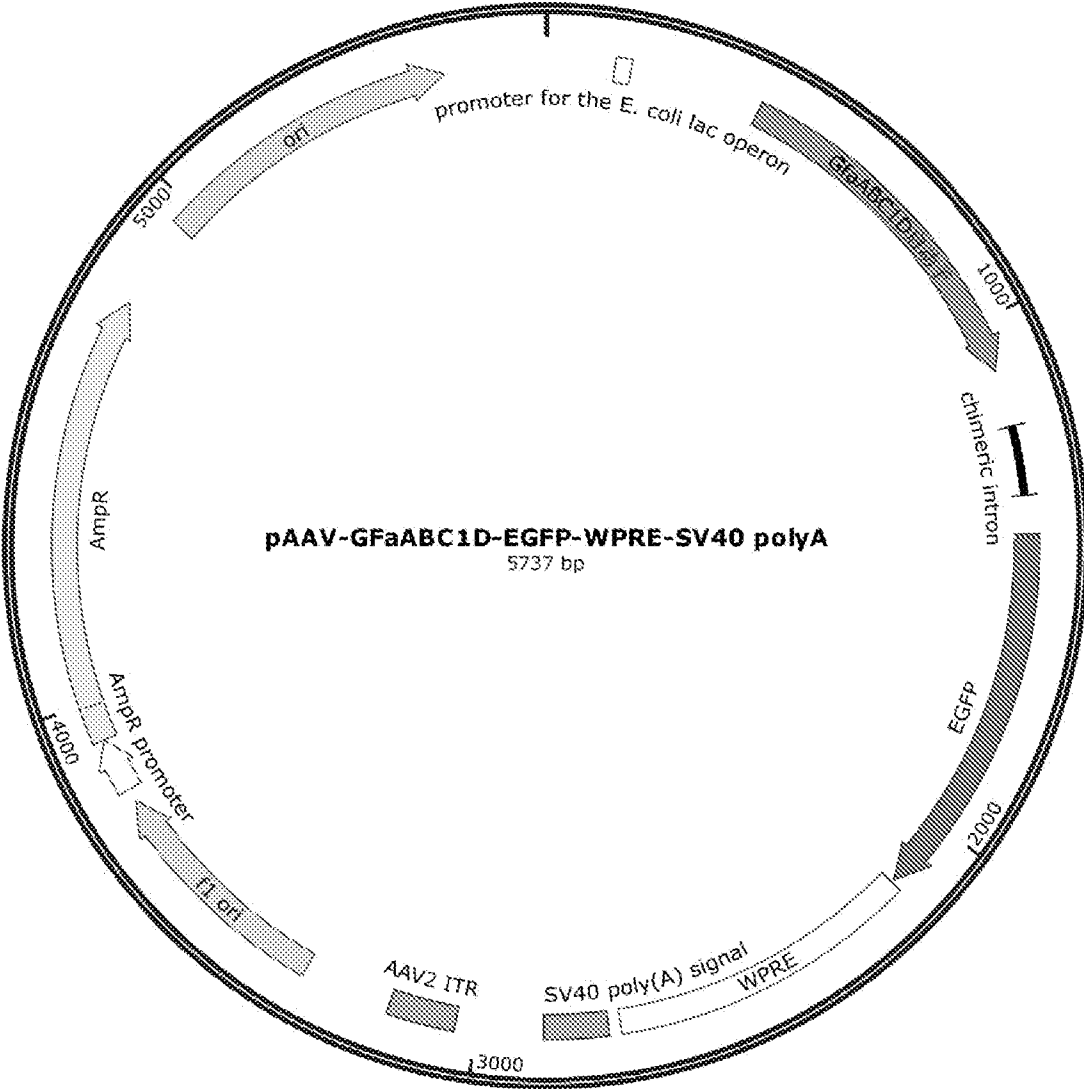


图 1

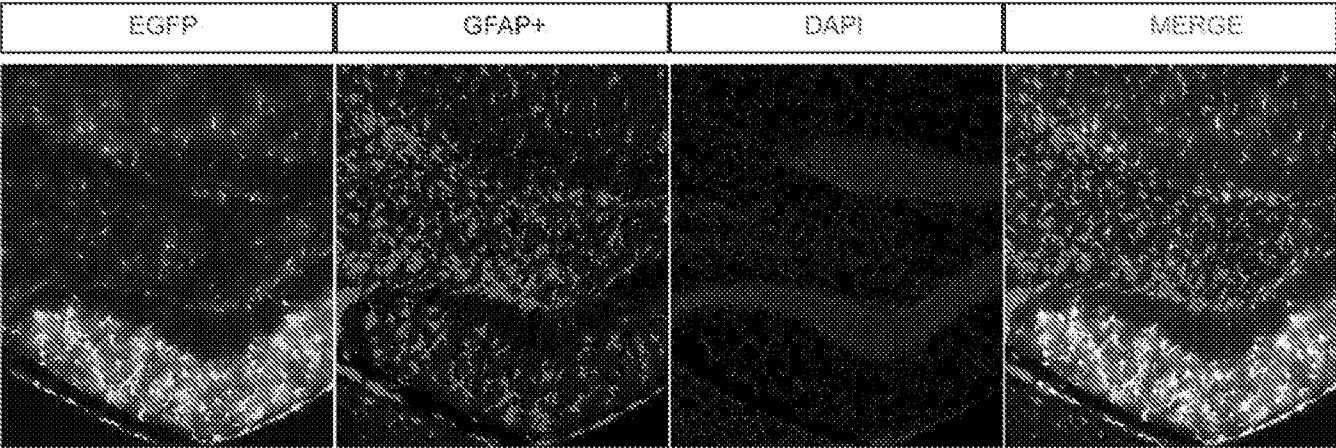


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/136105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/864(2006.01)i; C12N 15/65(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)

Databases: 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, China Patent Biological Sequence Search System; Search terms: 腺相关病毒, AAV, 反向重复序列, ITR, 启动子, promoter, 转录调节元件, WPRE, 终止子, terminator, SV40 polyA, 报告基因, EGFP, 辅助质粒, Rep, Cap, pAAV-RC2/1, pAd-Helper, HEK-293, SEQ ID NO.3-4序列比对, SEQ ID NO.3-4 sequence alignment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 113025655 A (SHANGHAI GENECHM CO., LTD.) 25 June 2021 (2021-06-25) see claims 1-10, and description, paragraphs 49 and 54 and embodiments 1-2	1-2, 4-5, 7-9
X	CN 112501209 A (OBIO TECHNOLOGY (SHANGHAI) CORP., LTD.) 16 March 2021 (2021-03-16) see claims 1-19	1-2, 4-5, 7-9
X	CN 106884014 A (BEIJING FIVEPLUS MOLECULAR MEDICINE INSTITUTE CO., LTD.) 23 June 2017 (2017-06-23) see claims 1-12, and description paragraphs 18-37	1-2, 4-5, 7-9
A	CN 105916990 A (AUTONOMOUS UNIVERSITY OF BARCELONA) 31 August 2016 (2016-08-31) see claims 1-39	1-10
A	CN 111808175 A (OBIO TECHNOLOGY (SHANGHAI) CORP., LTD.) 23 October 2020 (2020-10-23) see claims 1-12	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

23 August 2022

Date of mailing of the international search report

09 September 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/CN2021/136105**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

International application No.

PCT/CN2021/136105

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 10 relates to a treatment method for humans or animals. Therefore, the search with regard to claim 10 is carried out on the basis that the subject matter of claim 10 is expected to be "the use of the recombinant adeno-associated virus core plasmid of any one of claims 1-3, the recombinant adeno-associated virus vector system of any one of claims 4-6 or the recombinant adeno-associated virus of any one of claims 7-9 in specifically targeting astrocytes with a non-therapeutic purpose".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/136105

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	113025655	A	25 June 2021	None	
CN	112501209	A	16 March 2021	None	
CN	106884014	A	23 June 2017	None	
CN	105916990	A	31 August 2016	None	
CN	111808175	A	23 October 2020	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/136105

A. 主题的分类

C12N 15/864(2006.01)i; C12N 15/65(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

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+SIP0ABS), 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: 腺相关病毒, AAV, 反向重复序列, ITR, 启动子, promoter, 转录调节元件, WPRE, 终止子, terminator, SV40 polyA, 报告基因, EGFP, 辅助质粒, Rep, Cap, pAAV-RC2/1, pAd-Helper, HEK-293, SEQ ID NO.3-4序列比对。

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	CN 113025655 A (上海吉凯基因医学科技股份有限公司) 2021年6月25日 (2021 - 06 - 25) 参见权利要求1-10, 说明书第49, 54, 实施例1-2	1-2, 4-5, 7-9
X	CN 112501209 A (和元生物技术上海股份有限公司) 2021年3月16日 (2021 - 03 - 16) 参见权利要求1-19	1-2, 4-5, 7-9
X	CN 106884014 A (北京五加和分子医学研究所有限公司) 2017年6月23日 (2017 - 06 - 23) 参见权利要求1-12, 说明书第18-37段	1-2, 4-5, 7-9
A	CN 105916990 A (巴塞罗那自治大学) 2016年8月31日 (2016 - 08 - 31) 参见权利要求1-39	1-10
A	CN 111808175 A (和元生物技术上海股份有限公司) 2020年10月23日 (2020 - 10 - 23) 参见权利要求1-12	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

2022年8月23日

国际检索报告邮寄日期

2022年9月9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

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:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求10涉及针对人或动物的治疗方法。因此对权利要求10的检索是基于将权利要求10的主题预期为“权利要求1-3任一项所述的重组腺相关病毒核心质粒、权利要求4-6任一项所述的重组腺相关病毒载体系统或权利要求7-9任一项所述的重组腺相关病毒在以非治疗目的特异性靶向星形胶质细胞中的应用。”
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/136105

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	113025655	A	2021年6月25日	无	
CN	112501209	A	2021年3月16日	无	
CN	106884014	A	2017年6月23日	无	
CN	105916990	A	2016年8月31日	无	
CN	111808175	A	2020年10月23日	无	