权利要求书

1. 一种用于制备用于生产携带目的核酸片段的逆转录病毒载体的生产细胞的方法，所述方法包括：

利用睡美人(Sleeping Beauty，SB)转座子系统将逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 PiggyBac (PB)转座子系统将所述逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将所述逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

2. 一种用于制备用于生产携带目的核酸片段的慢病毒载体的生产细胞的方法，所述方法包括：

利用 SB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 PB 转座子系统将所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中利用 SB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 PB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列位于两个以上的构建体上。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中 gag、pol 基因的序列位于一个构建体上，rev 基因的序列位于另一个构建体上，病毒包膜蛋白的编码序列位于第三个构建体上，并且携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列位于第四个构建体上。

6. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因是 HIV-1 病毒的 gag、pol 和 rev 基因。

7. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白选自猫白血病病毒(RD114)包膜蛋白、两性逆转录病毒包膜蛋白、嗜性逆转录病毒包膜蛋白、狒狒猿白血病病毒包膜蛋白、尼帕病毒包膜蛋白、莫科拉病毒包膜蛋白、淋巴细胞脉络膜脑膜炎病毒包膜蛋白、基孔肯雅病毒包膜蛋白、罗斯河病毒包膜蛋白、塞姆利基森林病毒包膜蛋白、信德比斯病毒包膜蛋白、委内瑞拉马脑炎病毒包膜蛋白、西部马脑炎病毒包膜蛋白、流感病毒包膜蛋白、禽瘟病毒包膜蛋白、昌迪普拉病毒和皮里病毒包膜蛋白、猿免疫缺陷病毒包膜蛋白、猫免疫缺陷病毒包膜蛋白、马传染性贫血病毒包膜蛋白、埃博拉病毒包膜蛋白、狂犬病病毒包膜蛋白、杆状病毒包膜蛋白、丙型肝炎病毒包膜蛋白、猫内源反转录病毒包膜蛋白、麻疹病毒包膜蛋白、鼠白血病病毒的兼嗜性 4070A 和 10A1、长臂猿白血病病毒的包膜蛋白、人免疫缺陷病毒的 gp120 和水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)。

8. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白是水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)。

9. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述 SB 系统中使用的转座酶是 SB100X，和/或所述 PB 系统中使用的转座酶是 ePiggyBac。

10. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述 gag、pol 和 rev 基因、病毒包膜蛋白的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒中的一种或多种的转录是受控的。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白是 VSV-G 并且 rev 基因和 VSV-G 的编码序列的转录是受控的。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白是 VSV-G 并且 gag、pol 和 rev 基因以及 VSV-G 的编码序列的转录是受控的。

13. 根据权利要求 10 所述的方法 ,其中所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于诱导表达系统的控制下实现的。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述诱导表达系统选自四环素诱导表达系统和 Cumate 诱导表达系统。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述基因或序列被置于 Tet-On 诱导表达系统的单独控制下或 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，和/或 VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列、$TRE_{3G}CuO$ 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 VSV-G 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、

TRE_{3G}序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子、TRE_{adv}序列-内含子、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G}序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在TRE_{3G}序列的控制下，VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G}序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G}序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G}序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G}序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下 ,并且 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 2-8 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 1:1 至 4:1。

19. 根据权利要求 18 所述的方法 ,其中 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 4-6 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 2:1 至 3:1。

20. 根据权利要求 15 所述的方法 ,其中利用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列或 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述 Tet-On 反式激活物蛋白是 $rtTA_{3G}$。

22. 根据权利要求 15 所述的方法 ,其中利用 SB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列以及 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列或 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 PB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列以及 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列或 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

23. 通过根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法制备的生产细胞。

24. 根据权利要求 23 所述的生产细胞 ,其中所述生产细胞于 2020 年 4 月 13 日以保藏编号 CGMCC No. 19675 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

25. 一种用于生产携带目的核酸片段的逆转录病毒载体的生产细胞，所述生产细胞在其基因组中整合有逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列，所述 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病

毒基因组转录盒序列的两端分别具有用于被SB转座酶识别的IR/DR序列或用于被PB转座酶识别的ITR序列，并且所述IR/DR序列和所述ITR序列在所述生产细胞中同时存在。

26. 根据权利要求25所述的生产细胞，其中所述gag和pol基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被SB转座酶识别的IR/DR序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被PB转座酶识别的ITR序列，或者所述gag和pol基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被PB转座酶识别的ITR序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被SB转座酶识别的IR/DR序列。

27. 根据权利要求25所述的生产细胞，其中所述逆转录病毒是慢病毒，所述生产细胞在其基因组中还整合有慢病毒的rev基因的序列，并且所述rev基因的序列的两端具有用于被SB转座酶识别的IR/DR序列或用于被PB转座酶识别的ITR序列。

28. 根据权利要求27所述的生产细胞，其中所述逆转录病毒是HIV-1病毒。

29. 根据权利要求27所述的生产细胞，其中所述gag、pol和rev基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被SB转座酶识别的IR/DR序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被PB转座酶识别的ITR序列，或者所述gag、pol和rev基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被PB转座酶识别的ITR序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被SB转座酶识别的IR/DR序列。

30. 根据权利要求25所述的生产细胞，其中所述病毒包膜蛋白是水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)。

31. 根据权利要求23所述的生产细胞或根据权利要求25所述的生产细胞，其中所述目的核酸片段序列两端具有用于位点特异性重组酶系统的识别序列，和/或所述外包膜蛋白的编码序列两端具有用于位点特异性重组酶系统的识别序列。

32. 用于逆转录病毒载体的目的核酸片段和/或外包膜蛋白替换系统，所述系统包括：根据权利要求31所述的生产细胞，位点特异性重组酶系统，以及待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列。

33. 根据权利要求32所述的系统，其中所述位点特异性重组酶系统是FLP-FRT或Cre-lox重组酶系统。

34. 根据权利要求32所述的系统，其中所述生产细胞中原有的目的核酸片段包含标记基因或与标记基因相连和/或所述生产细胞中原有的外包膜蛋白的编码序列与标记基因相连，并且与待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列相连的标记基因与所述生产细胞中原有的标记基因不同。

35. 根据权利要求34所述的系统，其中所述标记基因是用于真核细胞的抗性基因序列，代谢通路筛选基因，荧光蛋白标记基因，能够用于报告基因检测蛋白酶基因，或其任意组合。

36. 根据权利要求35所述的系统，其中所述抗性基因序列选自：潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、新霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、博莱霉素抗性基因。

37. 根据权利要求 35 所述的系统，其中所述代谢通路筛选基因选自编码二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)、胸苷激酶(Thymidine kinase) 的基因。

38. 根据权利要求 35 所述的系统，其中所述荧光蛋白标记基因选自编码绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(dsRed)、樱桃色荧光蛋白(mcherry)、青色荧光蛋白(ECFP)、黄色荧光蛋白(EYFP)、以及荧光蛋白的其它突变衍生蛋白的基因序列。

39. 根据权利要求 35 所述的系统，其中所述能够用于报告基因检测蛋白酶基因选自编码萤光素酶(luciferase)、β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenical acetyltransferase)的基因序列。

40. 用于替换逆转录病毒的生产细胞中的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的方法，所述方法包括：提供根据权利要求 31 所述的生产细胞，以及利用位点特异性重组酶系统将生产细胞中原有的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列替换为待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述位点特异性重组酶系统是 FLP-FRT 或 Cre-lox 重组酶系统。

42. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述生产细胞中原有的目的核酸片段包含标记基因或与标记基因相连和/或所述生产细胞中原有的外包膜蛋白的编码序列与标记基因相连，并且与待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列相连的标记基因与所述生产细胞中原有的标记基因不同。

43. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述标记基因是用于真核细胞的抗性基因序列，代谢通路筛选基因，荧光蛋白标记基因，能够用于报告基因检测蛋白酶基因，或其任意组合。

44. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述抗性基因序列选自：潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、新霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、博莱霉素抗性基因。

45. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述代谢通路筛选基因选自编码二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)、胸苷激酶(Thymidine kinase) 的基因。

46. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述荧光蛋白标记基因选自编码绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(dsRed)、樱桃色荧光蛋白(mcherry)、青色荧光蛋白(ECFP)、黄色荧光蛋白(EYFP)、以及荧光蛋白的其它突变衍生蛋白的基因序列。

47. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述能够用于报告基因检测蛋白酶基因选自编码萤光素酶(luciferase)、β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenical acetyltransferase)的基因序列。

48. 通过根据权利要求 40 所述的用于替换逆转录病毒的生产细胞中的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的方法获得的逆转录病毒的生产细胞。

49. 一种用于生产携带目的核酸片段的逆转录病毒载体的方法，所述方法包括以下步骤：

向根据权利要求 23-31 中任一项所述的生产细胞或根据权利要求 48 所述的生产细胞加入诱导表达系统的诱导物，和

收集和纯化所得的携带目的核酸片段的逆转录病毒载体。

50. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述诱导物是四环素或四环素衍生物和/或 Cumate 及其功能类似物。

51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述四环素衍生物是多西环素。

52. 通过根据权利要求 49 所述的方法制备的携带目的核酸片段的逆转录病毒载体。

53. 根据权利要求 23-31 中任一项所述的生产细胞、根据权利要求 48 所述的生产细胞或根据权利要求 52 所述的携带目的核酸片段的逆转录病毒载体在制备用于向细胞递送目的核酸片段的试剂中的用途。

54. 一种用于制备用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞的方法，所述方法包括将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)的编码序列转入宿主细胞中，所述 gag、pol 和 rev 基因以及 VSV-G 的编码序列中的一种或多种的转录在 Tet-On 诱导表达系统的单独控制下或 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，和/或 VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列、$TRE_{3G}CuO$ 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 VSV-G 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子、TRE_{adv} 序列-内含子、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

56. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及 VSV-G 的编码序列被整合在宿主细胞的基因组中。

57. 根据权利要求 56 所述的方法，其中通过 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及 VSV-G 的编码序列整合在宿主细胞的基因组中。

58. 根据权利要求 56 所述的方法，其中在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 2-8

个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 1:1 至 4:1。

59. 根据权利要求 58 所述的方法，其中 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 4-6 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 2:1 至 3:1。

60. 根据权利要求 56 所述的方法，其中在通过 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及 VSV-G 的编码序列整合在宿主细胞的基因组中后，通过相同的转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或通过瞬时转染的方法将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步转入所述宿主细胞中。

61. 一种用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，所述包装/生产细胞包含慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)的编码序列，所述 gag、pol 和 rev 基因以及 VSV-G 的编码序列中的一种或多种的转录在 Tet-On 诱导表达系统的单独控制下或 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，和/或 VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列、$TRE_{3G}CuO$ 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 VSV-G 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子、TRE_{adv} 序列-内含子、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

62. 根据权利要求 61 所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中所述慢病毒的 gag 基因的序列及/或 pol 基因的序列及/或 rev 基因的序列及/或水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)的编码序列被整合在所述包装/生产细胞的基因组中。

63. 根据权利要求 61 所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

64. 根据权利要求 61 所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag/pol 基因在所述包装/生产细胞的基因组中的插入拷贝数为 2-8 个拷贝/细胞，并且插入在所述包装/生产细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 1:1 至 4:1。

65. 根据权利要求 64 所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中 gag/pol 基因在所述包装/生产细胞的基因组中的插入拷贝数为 4-6 个拷贝/细胞，并且插入在所述包装/生产细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 2:1 至 3:1。

66. 根据权利要求 61 所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其于 2020 年 4 月 13 日以保藏编号 CGMCC No. 19674 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

67. 一种生产慢病毒载体的方法，其包括在适于生产慢病毒载体的条件下培养根据权利要求 61 至 66 任一项所述的包装/生产细胞。