

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

更正本

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 7 月 11 日 (11.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/146587 A9

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2024/070516
- (22) 国际申请日: 2024 年 1 月 4 日 (04.01.2024)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310012420.0 2023年1月5日 (05.01.2023) CN
- (71) 申请人: 上海齐鲁制药研究中心有限公司 (SHANGHAI QILU PHARMACEUTICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTRE LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。
- (72) 发明人: 陈杰(CHEN, Jie); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。史腊妮(SHI, Lani); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。靳丛丛(JIN, Congcong); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。王

岩(WANG, Yan); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。李明远(LI, Mingyuan); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。漆佳丽(QI, Jiali); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。张康(ZHANG, Kang); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。陈曦(CHEN, Xi); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。方言(FANG, Yan); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。刘骏(LIU, Jun); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区法拉第路 56 号, 李冰路 576 号 1 幢, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙)(PATENTSINO IP FIRM); 中国北京市朝阳区小营北路 53 号院中源科技大厦 3 号楼 4 层, Beijing 100101 (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,

(54) Title: TRUNCATED INSULATOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 截短的绝缘子及其应用

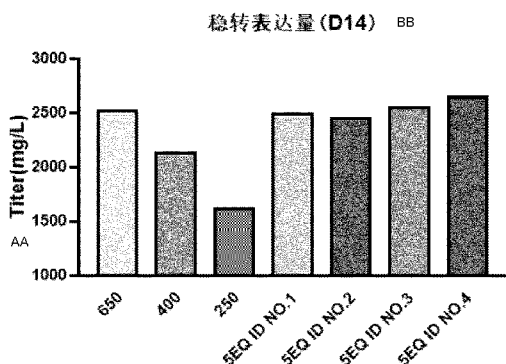


图 5

AA Titer (mg/L)
BB Stable transfection expression quantity (D14)

(57) Abstract: Provided are a truncated insulator and an expression system comprising the insulator and applied to a eukaryotic cell. The truncated insulator breaks through the setting of an original core area, shortens an effective sequence of the insulator, and is more beneficial to the integration of the insulator and other elements of a carrier. The insulator can significantly improve the yield of a protein and obtain a recombinant cell strain having good genetic stability in an expression system in which a transposon (such as PiggyBac) is present.

(57) 摘要: 提供了一种截短的绝缘子以及包含该绝缘子的、应用于真核细胞的表达系统, 该截短的绝缘子打破了原有核心区的设定, 缩短了绝缘子的有效序列, 更利于绝缘子与载体其他元件的整合。该绝缘子可以在转座子(如PiggyBac)存在的表达系统中显著提高蛋白的产量并获得具有良好遗传稳定性的重组细胞株。



CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(48) 更正本的公布日:

2024 年 10 月 17 日 (17.10.2024)

(15) 更正内容:

见 2024 年 10 月 17 日 (17.10.2024) 公布的公告

先前的更正:

见 2024 年 9 月 6 日 (06.09.2024) 公布的公告

说明书

发明名称: 截短的绝缘子及其应用

[0001] 本申请要求于2023年01月05日提交中国专利局、申请号为202310012420.0、发明名称为“截短的绝缘子及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本申请涉及生物技术领域，具体涉及一种截短的绝缘子及其应用。

背景技术

[0003] 目前全球已批准的抗体药物多达上百个，各治疗领域的抗体药物正在越来越多的造福患者。随着抗体药物的发展，抗体市场规模已经达到千亿美元，生产规模最高可达万升/批次。抗体生产环节中，细胞株构建作为抗体生产的基础，一直被广泛研究和关注。如何通过细胞株的构建实现抗体药物的快速研发和高产，是行业一直追求的目标。

[0004] 构建稳转细胞株的过程中，目的基因通常以随机整合的方式插入宿主细胞基因组中，具有以下缺陷：整合效率通常低于万分之一，稳转细胞株的构建依赖大量的筛选，工作量大，构建时间长；目的基因容易受到位置效应的影响，表达量较低；目的基因容易被宿主细胞沉默，稳定性差；细胞池(pool)产量低，难以在早期快速获得足量蛋白满足新药研发的需求。

[0005] 因此，一些定点和半定点整合技术应运而生。例如PiggyBac转座子表达系统，其由供体质粒和辅助质粒或体外转录的mRNA组成，供体质粒携带转座酶识别序列5'端反向重复序列(5ITR)和3'端反向重复序列(3ITR)，辅助质粒或体外转录的mRNA编码PiggyBac转座酶(PB转座酶)，能识别5ITR和3ITR，能够在原始位置上进行剪切或复制，后经环化作用和转座酶辅助下插入到宿主基因组的特定位置，实现一种精确的整合，具有整合效率高、稳定性好、拷贝形式均一等显著优势。但同时，转座子整合技术具有表达量低的缺陷，造成生产成本高，很难在大规模生产中得到应用。

[0006] 研究报道绝缘子(Insulator)在调控真核基因时空特异表达的过程中起着至关重要的作用,其具有保护目的基因免受周围调控因子影响的能力,以避免基因被不正确地激活或是沉默,即增强子阻断和异染色质屏障功能,可以有效抑制“位置效应”。HS4是位于鸡 β 球蛋白基因座5'端上游的一个具有绝缘子功能的DNaseI超敏感位点(DNase I hypersensitive site, HS),即cHS4,其长度约为1.2kp,研究表明其同时具有以上两种功能,但现有研究表明完整序列的插入会造成载体过大,降低其转染效率,从而影响蛋白的表达量,因此需要对cHS4进行截短研究。有研究表明cHS4发挥其功能依赖于5'端的250bp的核心区,但此核心区的功能不完全,并不能起到良好的提升表达的作用,其3'端400bp也起着重要作用,且cHS4-650(250bp核心区和3'端400bp序列)的作用优于cHS4-250,但650bp长度的绝缘子仍然存在导致载体过大、降低转染效率的问题,因而存在着在650bp长度的基础上进一步优化绝缘子序列长度、提高转染效率的技术需求。

[0007] 文献报道中也有利用PiggyBac转座子表达系统进行早期蛋白制备的方法,但从其结果来看,其蛋白表达量较低,无法满足工业生产需求。随着转座子研究的进展,有文献报道在目的基因侧翼加入截短绝缘子,可以显著提高转基因的表达量并降低基因表达的变异系数,从而提高了稳定性。但是,目前对cHS4绝缘子的截短研究,大多依据已有研究的不同区段进行组合的策略,主要是以250bp的核心区为基础加上其他不同区段进行组合,但并未对其长度做进一步优化,也未对截短绝缘子的功能进行验证。以上研究均未在用于抗体药物生产的稳转细胞株的构建中开展,距离工业化应用尚存在很大距离。

[0008] 发明内容

[0009] 本申请的第一方面提供了一种用于真核细胞中多肽或蛋白表达的绝缘子。所述绝缘子的核酸序列包含SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列,或包含与SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列中任一种具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列。

- [0010] 在本申请的一些实施方式中，所述绝缘子为如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列，或者所述绝缘子为与SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列中任一种具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列。
- [0011] 本申请的第二方面提供了一种真核细胞表达系统，其包含本申请第一方面所述的绝缘子，该绝缘子能够起到提高蛋白产量和细胞株稳定性的作用。
- [0012] 在本申请的一些实施方式中，所述真核细胞的表达系统为PiggyBac转座子表达系统。
- [0013] 在本申请的一些实施方式中，所述PiggyBac转座子表达系统包括PiggyBac转座子转基因载体；优选地，所述PiggyBac转座子表达系统还包括PiggyBac辅助载体或编码转座酶的mRNA，其中，所述PiggyBac辅助载体含有转座酶编码核酸。
- [0014] 在本申请的一些实施方式中，所述PiggyBac转座子转基因载体中含有本申请第一方面所述的绝缘子。
- [0015] 在本申请的一些实施方式中，所述的PiggyBac辅助载体为pcDNA3.4。
- [0016] 在本申请的一些实施方式中，所述的PiggyBac转座子转基因载体包括5'末端重复序列5ITR和反向的3'末端重复序列3ITR，5ITR和3ITR之间设有所述绝缘子；优选地，所述5ITR和3ITR之间依次设有正向和反向互补的所述绝缘子或同为正向的两个绝缘子；优选地，所述绝缘子之间设有多克隆位点。优选地，所述的PiggyBac转座子转基因载体其他元件来自P3载体原始序列。
- [0017] 在本申请的一些实施方式中，所述PiggyBac转座子转基因载体还包含筛选标记基因。
- [0018] 在本申请的一些实施方式中，所述筛选标记基因为谷氨酰胺合成酶基因(GS基因)。
- [0019] 本申请的第三方面还提供了本申请第一方面所述的绝缘子在PiggyBac转座子转基因载体或PiggyBac转座子表达系统的构建中的应用。

[0020] 本申请的第四方面还提供了本申请第一方面所述的绝缘子或本申请第二方面所述的真核细胞表达系统的应用，特别是用于核酸的重组表达的应用。

[0021] 在本申请的一些实施方式中，所述核酸能够编码多肽或蛋白质，优选能够编码抗体、融合蛋白、抗原或酶。优选地，所述重组表达在真核宿主细胞中进行。优选地，所述表达系统为PiggyBac转座子表达系统。优选地，所述真核宿主细胞为CHO细胞。

[0022] 本申请的第五方面还提供了本申请第一方面所述的绝缘子或本申请第二方面所述的真核细胞表达系统在构建重组细胞株中的应用。

[0023] 在本申请的一些实施方式中，所述重组细胞株采用的宿主细胞为哺乳动物细胞，优选为CHO细胞。

[0024] 在本申请的一些实施方式中，构建重组细胞株的步骤包括：

[0025] 1)构建含有目的蛋白编码基因和谷氨酰胺合成酶基因的Piggybac转座子转基因载体，和表达PB转座酶的辅助载体或体外转录获得编码PB转座酶的mRNA；

[0026] 2)将步骤1)中转座子转基因载体和辅助载体，或转座子转基因载体和编码PB转座酶的mRNA，通过转染导入宿主细胞中；

[0027] 3)将步骤2)得到的细胞置于培养瓶中恢复一段时间；

[0028] 4)将步骤3)得到的细胞转移至摇瓶中采用GS进行筛选；

[0029] 5)待细胞状态完全恢复后进行接种产量测试，评估抗体表达量。

[0030] 在本申请的一些实施方式中，步骤1)中目的蛋白可以为抗体、融合蛋白、抗原、酶或其他类型蛋白或多肽。

[0031] 在本申请的一些实施方式中，步骤1)中使用体外转录法，以PB转座酶编码DNA序列为模板，通过体外转录、加帽和加尾修饰，获得PB转座酶编码mRNA。

[0032] 在本申请的一些实施方式中，步骤5)中细胞状态完全恢复为细胞活率不低于95%。

[0033] 在本申请的一些实施方式中，步骤1)中载体构建使用无内毒素质粒抽提试剂盒。

[0034] 在本申请的一些实施方式中，步骤2)中的转染方式为电转染。

[0035] 在本申请的一些实施方式中，步骤3)中的培养瓶为T瓶。

[0036] 在本申请的一些实施方式中，步骤3)中的培养基为CD CHO Fusion Medium +6mM谷氨酰胺，恢复时间为24小时。

[0037] 在本申请的一些实施方式中，步骤4)中的摇瓶筛选培养基为CD CHO Fusion Medium。

[0038] 在本申请的一些实施方式中，步骤5)中的产量测试为7天Batch，接种密度为 5×10^5 cells/mL，培养基为BM2，培养体积为30mL，培养至第4天补糖4g/L，培养至第7天检测上清表达量。

[0039] 本申请的第六方面还提供了一种重组细胞株，其中，所述重组细胞株包含本申请第一方面所述的绝缘子或本申请第二方面所述的真核细胞表达系统；优选地，所述重组细胞株采用的宿主细胞为哺乳动物细胞，优选为CHO细胞。

[0040] 本申请的有益效果：本申请首次对cHS4核心区250bp进行截短，打破了原有核心区的设定，相比于现有技术中已有的650bp cHS4绝缘子序列，显著缩短绝缘子序列长度的同时还可以提升蛋白表达量，缩短稳定细胞株的构建时间，且构建得到的细胞株具有良好的遗传稳定性。

附图说明

[0041] 此处所说明的附图用来提供对本申请的进一步理解，构成本申请的一部分，本申请的示意性实施例及其说明用于解释本申请，并不构成对本申请的不当限定。

[0042] 图1为P3-AscI载体的结构示意图；

[0043] 图2为P3-5ITR-3ITR-cHS4载体的结构示意图；

[0044] 图3为pcDNA3.4-PiggyBac载体的结构示意图；

[0045] 图4为瞬时转染6天内蛋白产量图；

[0046] 图5为稳定转染14天内蛋白产量图；

[0047] 图6A为P3-5ITR-R-3ITR-SEQ ID NO.1反向互补cHS4载体的结构示意图；

[0048] 图6B为P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1正向cHS4载体的结构示意图；

[0049] 图7为PiggyBac转座子表达系统克隆生长稳定性的效果图。

具体实施方式

- [0050] 为使本申请的目的、技术方案、及优点更加清楚明白，以下参照附图并举实施例，对本申请进一步详细说明。显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。本领域技术人员基于本申请所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。
- [0051] 术语
- [0052] 本说明书中提及的所有公布、专利和专利申请都以引用的方式并入本申请，所述引用的程度就如同已特定地和个别地指示将各个别公布、专利或专利申请以引用的方式并入本申请。
- [0053] 在下文详细描述本申请前，应理解本申请不限于本申请中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本申请中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本申请的范围。除非另外定义，本申请中使用的所有技术和科学术语与本申请所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。
- [0054] 本申请所公开的某些实施方案包含了数值范围，并且本申请的某些方面可采用范围的方式描述。除非另有说明，应当理解数值范围或者以范围描述的方式仅是出于简洁、便利的目的，并不应当认为是对本申请的范围的严格限定。因此，采用范围方式的描述应当被认为具体地公开了所有可能的子范围以及在该范围内的所有可能的具体数值点，正如这些子范围和数值点在本申请中已经明确写出。不论所述数值的宽窄，上述原则均同等适用。当采用范围描述时，该范围包括范围的端点。
- [0055] 当涉及可测量值比如量、暂时持续时间等时，术语“约”是指包括指定值的 $\pm 20\%$ 、或在某些情况下 $\pm 10\%$ 、或在某些情况下 $\pm 5\%$ 、或在某些情况下 $\pm 1\%$ 、或在某些情况下 $\pm 0.1\%$ 的变化。
- [0056] 本申请所用的术语“抗体”，典型是指包含通过共价二硫键和非共价相互作用保持在一起的两条重(H)多肽链和两条轻(L)多肽链的Y型四聚蛋白。天然IgG抗体即具有这样的结构。每条轻链由一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)组成。每条重链包含一个可变结构域(VH)和恒定区。

- [0057] 如在此使用的，广义上的“抗体”的类型可包括如多克隆抗体(polyclonal antibodies)、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体及灵长类化抗体、CDR移植抗体(CDR-grafted antibody)、人类抗体(包括重组产生的人类抗体)、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双功能融合蛋白、单价抗体、多价抗体、抗个体基因型抗体、合成抗体(包括突变蛋白及其变体)等。
- [0058] 术语“PiggyBac转座子表达系统”指PiggyBac转座子载体系统。PiggyBac载体系统成员主要有：一个辅助载体或质粒：其编码转座酶；一个转座子载体(也称供体载体)或质粒：其两端含优化的亚末端反向重复序列(inverted terminal repeat sequences, ITR)，中间是被转座区域，可插入想转座到宿主基因组中的目的基因序列。实验时需同时将辅助质粒和转座子质粒共同转化靶细胞，辅助质粒编码的转座酶识别转座子质粒两端的ITR序列并切割，释放的被转座区被转座酶整合到宿主基因组中含TTAA序列的位点，并在被转座区两端出现TTAA重复序列。也可使用体外转录的转座酶编码mRNA替换辅助质粒和转座子质粒共同转化靶细胞用于转座酶的表达。
- [0059] 术语“CHO平台”指CHO细胞株筛选技术平台。CHO(中华仓鼠卵巢细胞)驯化至化学成分限定培养基CD CHO Fusion Medium中后，并进行亚克隆筛选后建立CHO细胞系，还包括表达载体P3、克隆构建阶段用的培养基及流加工工艺平台培养基等配套试剂和工艺。
- [0060] 术语“转基因载体”指表达目的基因的表达载体。表达载体指在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件(如启动子、RBS、终止子等)，使目的基因能够表达的载体。目的基因包括但不限于编码广义的抗体、抗原、融合蛋白、多肽等产物的脱氧核苷酸序列。
- [0061] 术语“绝缘子”或“绝缘子序列”指一类染色质结构域边界的DNA序列，其功能作为中性屏障，阻止临近基因元件或周围致密染色质的影响，使被保护的基因得以在正常的时间和空间进行表达。绝缘子的作用效果与其所处基因的位置和自身序列的方向有关。示例性的绝缘子序列包括chicken hypersensitive site-4(cHS4)。

- [0062] 术语“多克隆位点”是指载体上含有的一个人工合成的DNA片段，其上含有多个单一限制性酶切位点，为外源DNA的插入部位，也称为多位点接头，是基因工程中常用载体质粒的标准配置序列。多克隆位点中，每个限制性酶切位点通常是唯一的，即它们在一个特定的载体质粒中只出现一次，不同酶的酶切位点可有重叠。
- [0063] 术语“转录因子”(Transcription factors, TF)是一群能与基因5'端上游特定序列专一性结合，从而保证目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子。
- [0064] 术语“转录因子的结合位点”(transcription factor binding site, TFBS)是指转录因子调节基因表达时，与基因模板链结合的区域。
- [0065] 术语“基因本体”(Gene Ontology, GO)是一个标准化的功能分类体系，该体系提供了一套动态更新的标准化词汇表，并以三个方面描述生物体中基因和基因产物的属性：参与的生物过程(Biological Process, BP)，分子功能(Molecular Function, MF)和细胞组分(Cellular Component, CC)。GO term即Gene Ontology功能的描述信息。
- [0066] 术语“蛋白互作网络分析”(Protein Protein Interactions, PPI)是指应用蛋白质互作数据库，如STRING蛋白质互作数据库，对数据库中包含的物种，直接从数据库中提取出目标基因集(比如差异基因list)的互作关系构建网络。
- [0067] 术语“序列同一性”或“序列相似性”或“序列同源性”，是指在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性，且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后，候选序列中的核苷酸/氨基酸残基与参比序列中的相同核苷酸/氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比核苷酸/氨基酸序列同一性，例如，使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。
- [0068] 术语“重组表达”是指将包含遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体，在足以使得在宿主细胞内表达mRNA、蛋白、多肽或肽的条件下将该构建体与宿主细

胞接触时，所述构建体允许该宿主细胞表达mRNA、蛋白、多肽或肽，所述构建体包含编码mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列。

[0069] 通过以下实施例进一步详细说明本申请。以下列举具体实施例来阐明本申请，然而应当理解，列举这些实施例只是为了对本申请起说明作用，而非限制本申请的范围。

[0070] 材料与试剂：

[0071] P3-AscI(结构示意图如图1所示)，其在P3质粒中插入了AscI酶切位点识别序列GGCGCGCC。

[0072] PiggyBac转座酶编码序列由苏州泓迅生物科技股份有限公司将序列针对CHO细胞进行优化(在5'端侧翼添加EcoRI酶切位点和kozak序列，在3'端侧翼添加HindIII)和基因合成，克隆到载体PUC57上得到PUC57-PiggyBac。

[0073] PiggyBac供体载体元件中5ITR-cHS4序列由苏州泓迅生物合成。

[0074] PiggyBac供体载体元件中3ITR-cHS4序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0075] PiggyBac供体载体元件中包含反向互补绝缘子的3ITR-R-cHS4序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成并克隆到PUC57载体上获得PUC57-3ITR-R-cHS4。

[0076] PiggyBac mRNA模板DNA序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

[0077] 空白表达载体pcDNA3.4由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。

[0078] 实施例1：cHS4绝缘子截短序列的设计和载体构建

[0079] 1.截短的cHS4绝缘子的设计构建

[0080] 使用的绝缘子中cHS4-650、cHS4-400、cHS4-250来源于文献(如CN102943092A、WO2018083274A1、US20150315611A1)。将cHS4-650序列(包括250bp核心区 and 3'端400bp序列)输入AnimalTFDB3.0在线预测网站，对可能结合的转录因子进行预测，结果显示共有3897个TFBS，对应389个转录因子；然后使用STRING数据库对389个转录因子进行富集分析，共1993个GO term被显著富集；挑取与染色质结构调控或绝缘子功能相关的85个GO term对应的91个转录因子进行PPI分析，然后选取连接度高的转录因子和与已报道的与核心区结合的3个转录

因子CTCF、USF1/2、VEZF1，根据AnimalTFDB3.0预测的结合序列，将这些转录因子定位到cHS4-650序列上，挑取转录因子结合较少或无结合的DNA区域进行截短设计，进行单个或多个可截区域组合截短，最后得到4条绝缘子，核酸序列分别SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示，具体如下：

[0081] SEQ ID NO.1

cggggacagccccccccaaagccccagggaatgaattacgtccctccccgctagggggcagcagcgagccgcccggggctccg
ctccgggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcggtgcggggacagccccgggcacggggaagggtggcacgggacgcttctct
gaacgcttctcgtgctctttgagcctgcagacacctggggggataggggaaaatgtgtctgagcctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagc
agaaggggtggaagagcttgctggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctatcccaagaccaacccccacccacca
ccgtgccactggccatgtcttcatcacctccaggacgggtgacccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcacgcgtctttggaga
aggtaaatcttgctaaatccagcccgacccctccctggcacaacgtaaggccattatctct

[0082] SEQ ID NO.2

cggggacagccccccccaaagccccagggaatgaattacgtccctccccgctagggggcagcagcgagccgcccggggctccg
ctccgggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcggtgcggggacagccccgggcacggggaagggtggcacgggacgagcctgca
gacacctggggggataggggaaaatgtgtctgagcctgcatgtttgatggtgtctggatgcaagcagaagggtggaagagcttgctggaga
gatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctatcccaagaccaacccccacccaccacgtgccactggccatgtcttcatcac
tccagggacgggtgacccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcacgcgtctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgacc
ctccctggcacaacgtaaggccattatctct

[0083] SEQ ID NO.3

cggggacagccccccccaaagccccagggaatgaattacgtccctccccgctagggggcagcagcgagccgcccggggctccg
ctccgggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcggtgcggggacagccccgggcacggggaagggtggcacgggacgcttctct
gaacgcttctcgtgctctttgagcctgcagacacctggggggatgatgcaagcagaagggtggaagagcttgctggagagatacagctgg
gtcagtaggactgggacaggcagctatcccaagaccaacccccacccaccacgtgccactggccatgtcttcatcacctccagggacg
gtgacccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcacgcgtctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgacccctccctggca
caacgtaaggccattatctct

[0084] SEQ ID NO.4

cggggacagccccccccaaagccccagggaatgaattacgtccctccccgctagggggcagcagcgagccgcccggggctccg
ctccgggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcggtgcggggacagccccgggcacggggaagggtggcacgggacgagcctgca
gacacctggggggatgatgcaagcagaagggtggaagagcttgctggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctatcc
ccaagaccaacccccacccaccacgtgccactggccatgtcttcatcacctccagggacgggtgacccccacctccgtgggcagctgtg
ccactgcagcacgcgtctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgacccctccctggcacaacgtaaggccattatctct

[0085] 2供体载体构建

[0086] PiggyBac供体载体元件中包含5ITR-cHS4(正向), 3ITR-cHS4(正向), 其中5ITR和3ITR之间有两个正向cHS4, cHS4序列包含cHS4-650、cHS4-400、cHS4-250、SEQ ID NO.1所示的序列、SEQ ID NO.2所示的序列、SEQ ID NO.3所示的序列或SEQ ID NO.4所示的序列。将P3-AscI以AscI单酶切连接和同源重组的方式分别将5ITR-cHS4片段连接至P3-AscI质粒, 构建质粒P3-5ITR-cHS4, 而后利用同源重组的方式分别将3ITR-cHS4整合到P3-5ITR-cHS4中, 构建得到供体载体P3-5ITR-cHS4-3ITR-cHS4, 为了表述方便下文简写为P3-5ITR-3ITR-cHS4(结构示意图如图2所示)。

[0087] 3.表达载体构建

[0088] 载体P3-5ITR-3ITR-cHS4分别利用BstBI/PacI和HindIII/XhoI双酶切连接, 将QL01单抗的重链和轻链编码核酸序列分别连接在相应的多克隆位点上, 构建重组表达载体P3-5ITR-3ITR-cHS4-QL01。

[0089] 4.辅助载体构建

[0090] 将载体PUC57-PiggyBac及空白载体pcDNA3.4采用EcoRI/HindIII双酶切, 然后将载体PUC57-PiggyBac及空白载体pcDNA3.4的酶切产物经NucleoSpin Gel and PCR Clean-up试剂盒纯化回收后连接, 构建包含转座酶编码基因的辅助质粒pcDNA3.4-PiggyBac(结构示意图如图3所示); 也可以采用体外转录法, 以PB转座酶编码DNA序列为模板, 通过体外转录、加帽和加尾修饰, 获得PB转座酶编码mRNA-PiggyBac。

[0091] 实施例2: cHS4绝缘子截短序列的瞬时转染抗体表达

[0092] 使用的宿主细胞为ExpiCHO表达系统(Gibco), 按照宿主细胞建议的方法进行蛋白的瞬时表达。瞬转体系为25mL, 转染用质粒量见表1。按照ExpiCHO表达系统试剂盒建议补料方案进行补料, 并培养至第6天, 采用ForteBio仪器检测抗体表达量, 结果如图4所示。培养7天后收获培养液。

[0093] 比较ExpiCHO瞬转的蛋白产量, 添加了650bp(即P3-5ITR-3ITR-650-QL01)cHS4绝缘子的PiggyBac转座子表达系统产量均高于400bp(即P3-5ITR-3ITR-400-QL01)和250bp(即P3-5ITR-3ITR-250-QL01)绝缘子的PiggyBac转座子系统。转染6天后, 添加了650bp cHS4绝缘子的PiggyBac转座子表达系统

的蛋白产量比400bp和250bp绝缘子的PiggyBac转座子表达系统分别提高了23 %和28 %。上述结果表明PiggyBac转座子表达系统中添加650bp cHS4绝缘子最有利于产量提高。与650bp cHS4相比，添加了SEQ ID NO.1所示序列的cHS4绝缘子的PiggyBac转座子表达系统的蛋白产量提高了13 %，且载体P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.2-QL01(含SEQ ID NO.2所示序列的cHS4绝缘子)、P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.3-QL01(含SEQ ID NO.3所示序列的cHS4绝缘子)和P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.4-QL01(含SEQ ID NO.4所示序列的cHS4绝缘子)转染后的蛋白产量与添加了SEQ ID NO.1所示序列的cHS4绝缘子的PiggyBac转座子表达系统的蛋白产量相当。

[0094] 表1瞬转质粒及用量

编号	质粒名称	质粒量
1	P3-5ITR-3ITR-650-QL01	20μg
2	P3-5ITR-3ITR-400-QL01	20μg
3	P3-5ITR-3ITR-250-QL01	20μg
4	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1-QL01	20μg
5	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.2-QL01	20μg
6	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.3-QL01	20μg
7	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.4-QL01	20μg

[0095] 实施例3：cHS4绝缘子截短序列的稳定转染抗体表达

[0096] 电转法转染CHO细胞，转染条件见表2。细胞转染后用培养基EX-CELL®CD CHO Fusion Medium(含6mM L-谷氨酰胺)重悬，并置于培养箱培养，条件为37℃，5 % CO₂；培养24h后，将细胞在1000rpm转速下离心5min，去上清后取适量EX-CELL CD CHO Fusion培养基重悬细胞，并全部转移至12 5mL摇瓶并置于摇床培养，培养条件37℃，5 % CO₂，湿度80 %，转速130rpm。每1-5天对细胞进行计数传代，至Pool细胞活率恢复，以5 × 10⁵细胞/mL的密度接种进行产量测试，稳转表达第14天的Fed batch结果如图5所示。结果显示，包含序列如SEQ ID No.1-4所示的绝缘子的PiggyBac转座子表达系统均可以实现良好的表达能力，尤其是包含序列如SEQ No.1、3和4所示的绝缘子的PiggyBac转座子表达系统的表达量与包含650bp的绝缘子的PiggyBac转座子表达系统相当或

更高，其中包含序列如SEQ NO.4所示的截短序列的PiggyBac转座子表达系统的表达产量增加了5%，即产量增加了134mg/L；相比包含核心区250bp的绝缘子表达系统，包含序列如SEQ NO.4所示的截短序列的PiggyBac转座子表达系统的表达产量增加了28%，即产量增加了711mg/L；不限于任何理论，发明人认为，这可能由于截短序列不仅保留了对照采用的650bp绝缘子序列的优化表达的能力，并且由于序列更短，载体更小，从而提高了表达效率。另一方面，包含序列如SEQ No.1-4所示的绝缘子的PiggyBac转座子表达系统也比包含核心区250bp的绝缘子的PiggyBac转座子表达系统明显具有更好的表达能力。

[0097] 表2稳定转染条件

编号	质粒	质粒量(μg)	细胞数	转染条件
1	P3-5ITR-3ITR-650-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF
2	P3-5ITR-3ITR-400-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF
3	P3-5ITR-3ITR-250-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF
4	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF
5	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.2-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF
6	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.3-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF
7	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.4-QL01 + pcDNA3.4-PiggyBac	50+5	1.00E+07	300V, 950uF

[0098] 实施例4：转座子表达系统中绝缘子的方向对抗体表达的影响

[0099] 1.供体载体P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1构建

[0100] 以载体PUC57-3ITR-R-SEQ ID NO.1(含与SEQ ID NO.1所示序列反向互补的序列)为模板，PCR扩增目的片段3ITR-R-SEQ ID NO.1。将P3-5ITR-SEQ ID NO.1(正向)质粒采用SgrAI单酶切，并将3ITR-R-SEQ ID NO.1基

因片段以同源重组法连接，构建载体P3-5ITR-SEQ ID NO.1-3ITR-R-SEQ ID NO.1，在5TIR和3ITR之间有一个正向cHS4和反向互补cHS4，即P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1(结构示意图如图6A所示)。

[0101] 2.载体P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1-QL02和P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL02构建

[0102] 分别利用BstBI/PacI和HindIII/XhoI双酶切连接，将QL02双抗的Knob和Hole链编码核酸序列分别连接在P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1(结构示意图如图6B所示)和P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1相应的多克隆位点上，构建重组表达载体P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1-QL02和P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL02。

[0103] 3.抗体蛋白表达

[0104] 使用的宿主细胞为ExpiCHO表达系统(Gibco)，按照宿主细胞建议的方法进行蛋白的瞬时表达。瞬转体系为25mL，转染用质粒量见表3。按照ExpiCHO表达系统试剂盒建议补料方案进行补料，并培养至第7天，采用ForteBio仪器检测抗体表达量，结果见表4。

[0105] 表3瞬转实验组

编号	质粒及用量
1	25μg P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL02 +5μg pcDNA3.4-PiggyBac
2	25μg P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1-QL02 +5μg pcDNA3.4-PiggyBac

[0106] 表4瞬转第7天表达量

编号	质粒名称	瞬转表达量(mg/L)
1	P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL02	102.1
2	P3-5ITR-3ITR-SEQ ID NO.1-QL02	91.7

[0107] 比较PiggyBac转座子表达系统中含3ITR+反向互补绝缘子(载体P3-5ITR-3ITR-R-cHS4)和含3ITR+正向绝缘子(载体P3-5ITR-3ITR-cHS4)的表达量，载体中含3ITR+反向互补绝缘子较含3ITR+正向绝缘子提高11.3%，表明载体3ITR+反向互补绝缘子组合对产量的提升更为显著。

- [0108] 实施例5：cHS4绝缘子截短序列的稳定转染抗体表达在PiggyBac转座子系统中的应用
- [0109] 1.供体载体P3-5ITR-3ITR构建
- [0110] 将载体P3-5ITR-3ITR-cHS4中的绝缘子删去以构建不含绝缘子的P3-5ITR-3ITR载体。
- [0111] 2.表达载体构建
- [0112] 分别利用HindIII/XhoI和BstBI/PacI酶切连接将抗体QL03的轻链和重链编码核酸序列分别整合到P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1和P3-5ITR-3ITR的轻链和重链多克隆位点，构建表达载体P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL03、P3-5ITR-3ITR-QL03。
- [0113] 3.瞬转表达抗体蛋白
- [0114] 使用的宿主细胞为ExpiCHO表达系统(Gibco)，按照宿主细胞建议的方法进行蛋白的瞬时表达。瞬转体系为50mL，转染用质粒量为50 μ g供体载体+5 μ g辅助载体，按照ExpiCHO表达系统试剂盒建议补料方案进行补料，并培养至第7天，采用ForteBio仪器检测抗体表达量，结果见表5。
- [0115] 比较瞬转7天后的产量，添加了cHS4绝缘子的PiggyBac转座子表达系统的产量为247mg/L，比不添加绝缘子的PiggyBac转座子表达系统提高了1.5倍。上述结果表明PiggyBac转座子表达系统中添加cHS4绝缘子可以显著提高细胞株的产量。
- [0116] 表5瞬时表达量

编号	质粒名称	瞬转表达量(mg/L)
1	P3-5ITR-3ITR-QL03	89.2
2	P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL03	247.0

- [0117] 4.稳转表达抗体蛋白
- [0118] 电转法转染CHO细胞，转染质粒量为50 μ g供体载体+5 μ g辅助载体，电压300V，950 μ F，细胞量为1E7，一次电击。细胞转染后用培养基EX-CELL[®] CD CHO Fusion Medium(含6mM L-glutamine)重悬，并置于培养箱培养，条件为37℃，5% CO₂。

[0119] 培养24h的细胞进行计数，确定活细胞密度(VCD)和细胞活率(Via)，进行minipool铺板，并在96孔板、24孔板和TPP进行逐级筛选和扩培，待细胞状态完全恢复(活率>90%)，以 5×10^5 cells/mL密度接种Batch实验进行产量测试，产量排名前14位的minipool产量结果见表6。

[0120] 比较稳转minipool产量测试的产量结果，添加了cHS4绝缘子的PiggyBac转座子表达系统的最高产量为158mg/L，比不添加绝缘子的PiggyBac转座子表达系统最高产量提高了15.3%；产量排名前3位的平均表达量为150.6mg/L，比不添加绝缘子的提高54.9%，平均表达量为112.3mg/L，比不添加绝缘子的提高了102.4%。上述结果表明PiggyBac转座子表达系统中添加cHS4绝缘子可以提高细胞株的产量。

[0121] 表6稳定转染minipool表达量

克隆编号	P3-5ITR-3ITR-QL03 表达量(mg/L)	P3-5ITR-3ITR-R-SEQ ID NO.1-QL03 表达量(mg/L)
1	137	158
2	83.1	154
3	71.8	140
4	71.6	120
5	67.1	111
6	59.8	106
7	49.4	106
8	48.9	106
9	45.8	101
10	40.7	98.5
11	38.2	96.3
12	32.6	95.4
13	19.8	92.9
14	10.6	86.1

[0122] 实施例6：PiggyBac转座子表达系统保证细胞株稳定性

- [0123] 随机选择三个含SEQ ID NO.1绝缘子的PiggyBac转座子表达系统构建的稳转细胞株，细胞株构建方法如实施例5，评估细胞株最终单克隆细胞的稳定性，包括：(1)生长稳定性：将细胞株复苏后连续培养60代，评估细胞在传代过程中的细胞密度、活率、直径和生长速度；(2)生产稳定性：对传代30、45和60代后的细胞进行产量测试，评估产品的产量和质量；(3)遗传稳定性：检测0代、60代细胞株进行cDNA测序。
- [0124] 1、生长稳定性实验
- [0125] a)复苏候选克隆；
- [0126] b)每隔2-3天，以 2×10^5 - 5×10^5 cells/mL密度对细胞进行传代，培养条件为温度37℃、湿度80%、转速130rpm、CO₂浓度5%；
- [0127] c)记录传代过程中的细胞密度、活率和直径，计算翻倍时间。
- [0128] 2、生产稳定性实验
- [0129] a)在PDL15、PDL30、PDL45、PDL60、PDL70时冻存细胞；
- [0130] b)传代结束之后复苏PDL15、PDL30、PDL45、PDL60、PDL70的细胞，待细胞恢复后接种产量测试；
- [0131] c)培养过程中按需求补料；
- [0132] d)待细胞培养结束，收获细胞培养上清，取1mL送测HPLC，根据表达量计算CV值， $CV = (n \text{ PDL表达量} - 0 \text{ PDL表达量}) / 0 \text{ PDL表达量} \times 100\%$ ， $n = 30/45/60$ 。
- [0133] 3、遗传稳定性实验
- [0134] 在稳定性传代结束后复苏PDL0、PDL60代的细胞，提取总RNA并反转录为cDNA，利用相应的引物扩增出目的基因后进行测序；将测序结果与理论序列进行比对，确认目的基因DNA序列是否发生突变。
- [0135] 生长稳定性数据如图7所示，A、B、C克隆以相同密度传代并培养相同时间后，细胞密度的差异不显著，细胞活率维持在95%以上，直径变化幅度在8%以内，表明PiggyBac转座子表达系统构建的克隆在生长性能和细胞形态上保持稳定。
- [0136] A、B、C克隆的cDNA测序结果均与理论序列保持一致，无突变。表明PiggyBac转座子表达系统构建的克隆遗传特性不改变，且细胞经连续传代后目的

基因序列遗传稳定。三个项目细胞株产量变化均在±10%以内(具体数据见表7)，变化幅度远小于行业平均标准变化±30%，表明该系统具有良好的细胞株遗传稳定性。

[0137] 表7 PiggyBac转座子表达系统构建的克隆生产稳定性数据

克隆名称	稳定性代次	产量 (g/L)	CV%
A	P0	3.3	/
	P30	3.5	7.0
	P45	3.6	9.5
	P60	3.6	8.2
B	P0	4.5	/
	P30	4.4	-1.0
	P45	4.2	-5.9
	P60	4.0	-10.3
C	P0	3.1	/
	P30	3.3	10.2
	P50	3.2	5.6
	P60	3.3	6.1

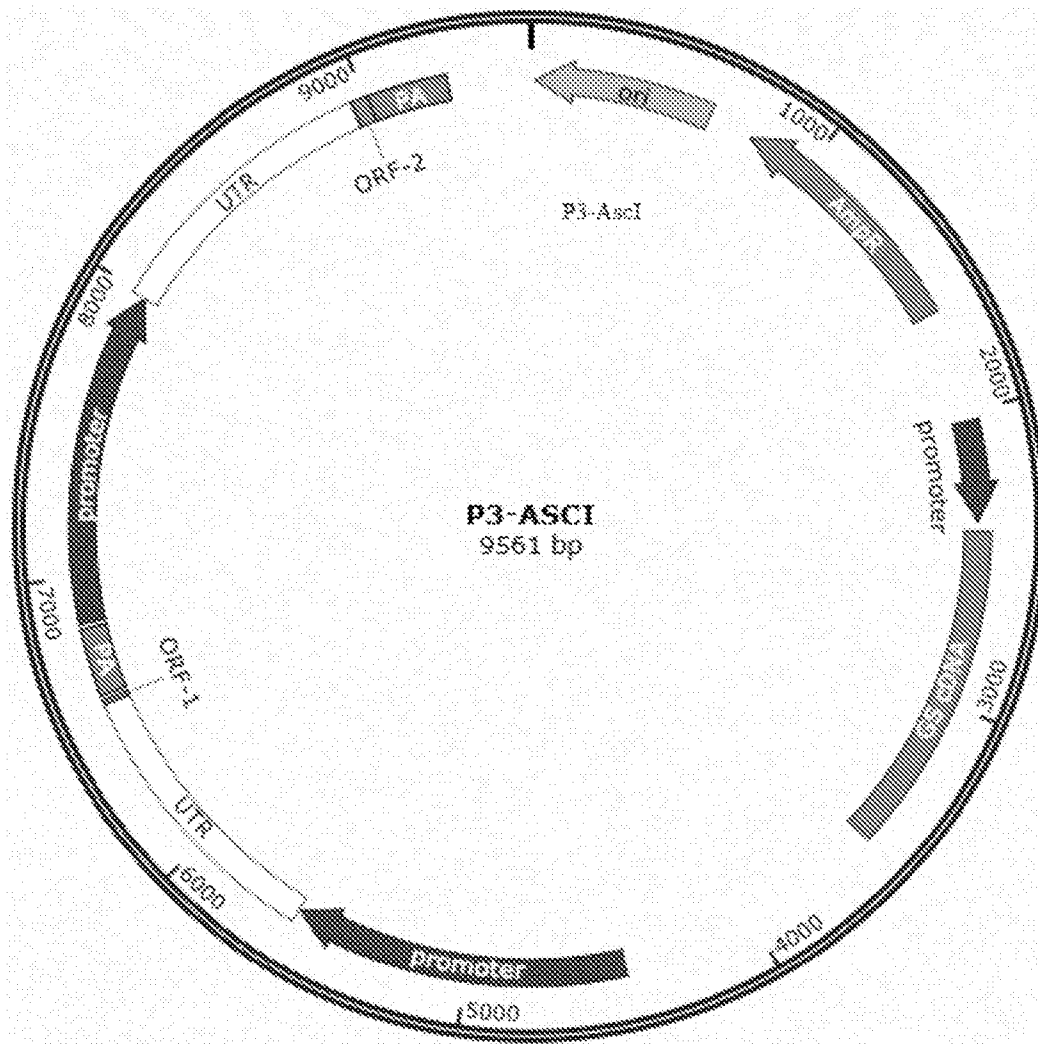
[0138] 以上所述仅为本申请的较佳实施例，并不用以限制本申请，凡在本申请的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本申请保护的范围之内。

权利要求书

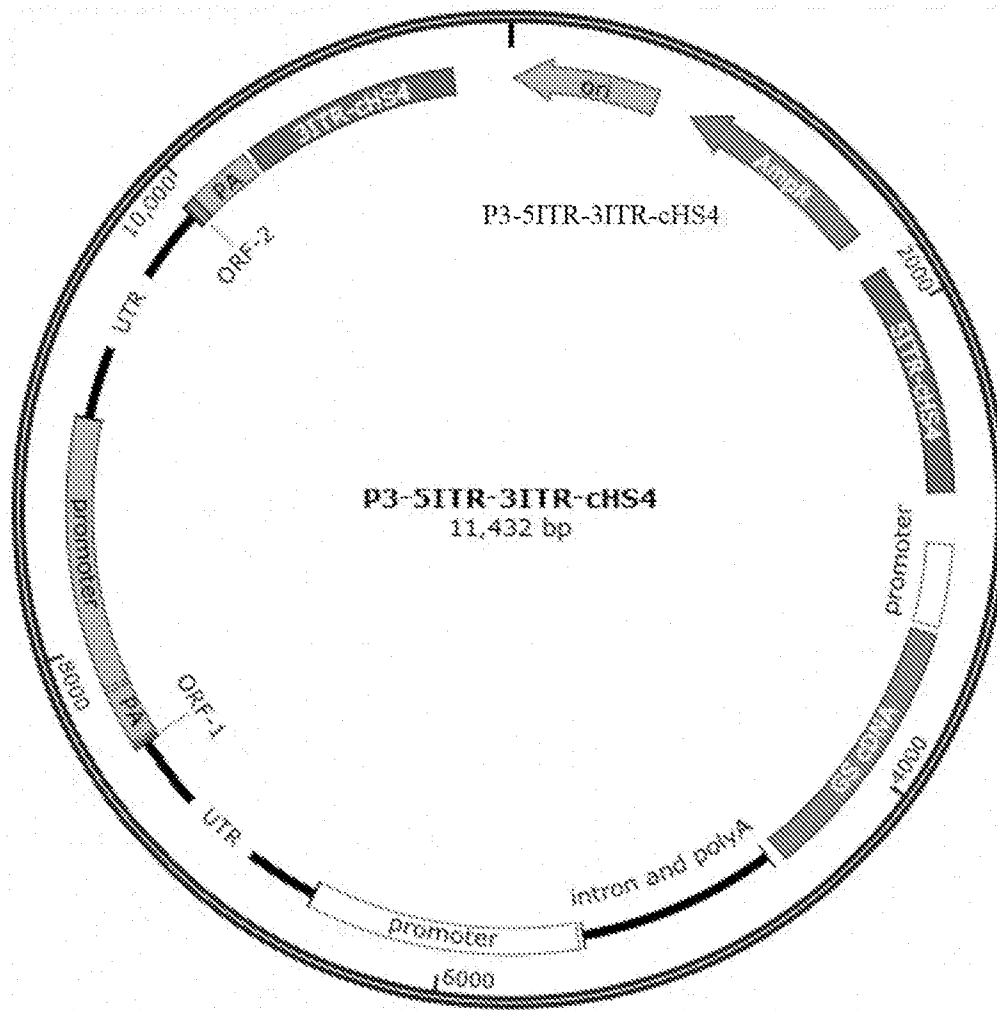
- [权利要求 1] 一种绝缘子，其中，所述绝缘子的核酸序列包含与SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列中的任一种具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列，或所述绝缘子的核酸序列包含如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的绝缘子，其中，所述绝缘子的核酸序列为与SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的核酸序列中的任一种具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列，或所述绝缘子的核酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示。
- [权利要求 3] 一种真核细胞表达系统，其包含权利要求1或2所述的绝缘子。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的真核细胞表达系统，其中，所述真核细胞表达系统是PiggyBac转座子表达系统。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的真核细胞表达系统，其中，所述PiggyBac转座子表达系统包含PiggyBac转座子转基因载体；优选地，所述PiggyBac转座子表达系统还包含PiggyBac辅助载体或编码转座酶的mRNA，其中，所述PiggyBac辅助载体包含编码转座酶的核酸序列。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的真核细胞表达系统，其中，所述PiggyBac转座子转基因载体包括5'末端重复序列5ITR和反向的3'末端重复序列3ITR，所述5ITR和所述3ITR之间设有所述绝缘子；优选地，所述5ITR和所述3ITR之间依次设有正向和反向互补的所述绝缘子或均为正向的两个所述绝缘子；优选地，所述绝缘子之间设有多克隆位点。

- [权利要求 7] 根据权利要求5或6所述的真核细胞表达系统，其中，所述PiggyBac转座子转基因载体包含筛选标记基因。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的真核细胞表达系统，其中，所述筛选标记基因为GS基因。
- [权利要求 9] 权利要求1或2所述的绝缘子或权利要求3-8中任一项所述的真核细胞表达系统在核酸的重组表达中的应用。
- [权利要求 10] 根据权利要求9所述的应用，其中，所述核酸能够编码抗体、融合蛋白、抗原或酶。
- [权利要求 11] 根据权利要求1或2所述的绝缘子或权利要求3-8中任一项所述的真核细胞表达系统在制备蛋白或多肽中的应用。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的应用，其中，所述蛋白或多肽包括抗体、融合蛋白、抗原和酶。
- [权利要求 13] 权利要求1或2所述的绝缘子或权利要求3-8中任一项所述的真核细胞表达系统在构建重组细胞株中的应用。
- [权利要求 14] 根据权利要求13所述的应用，其中，所述重组细胞株采用的宿主细胞为哺乳动物细胞，优选为CHO细胞。
- [权利要求 15] 一种重组细胞株，其中，所述重组细胞株包含权利要求1或2所述的绝缘子或权利要求3-8中任一项所述的真核细胞表达系统；优选地，所述重组细胞株采用的宿主细胞为哺乳动物细胞，优选为CHO细胞。

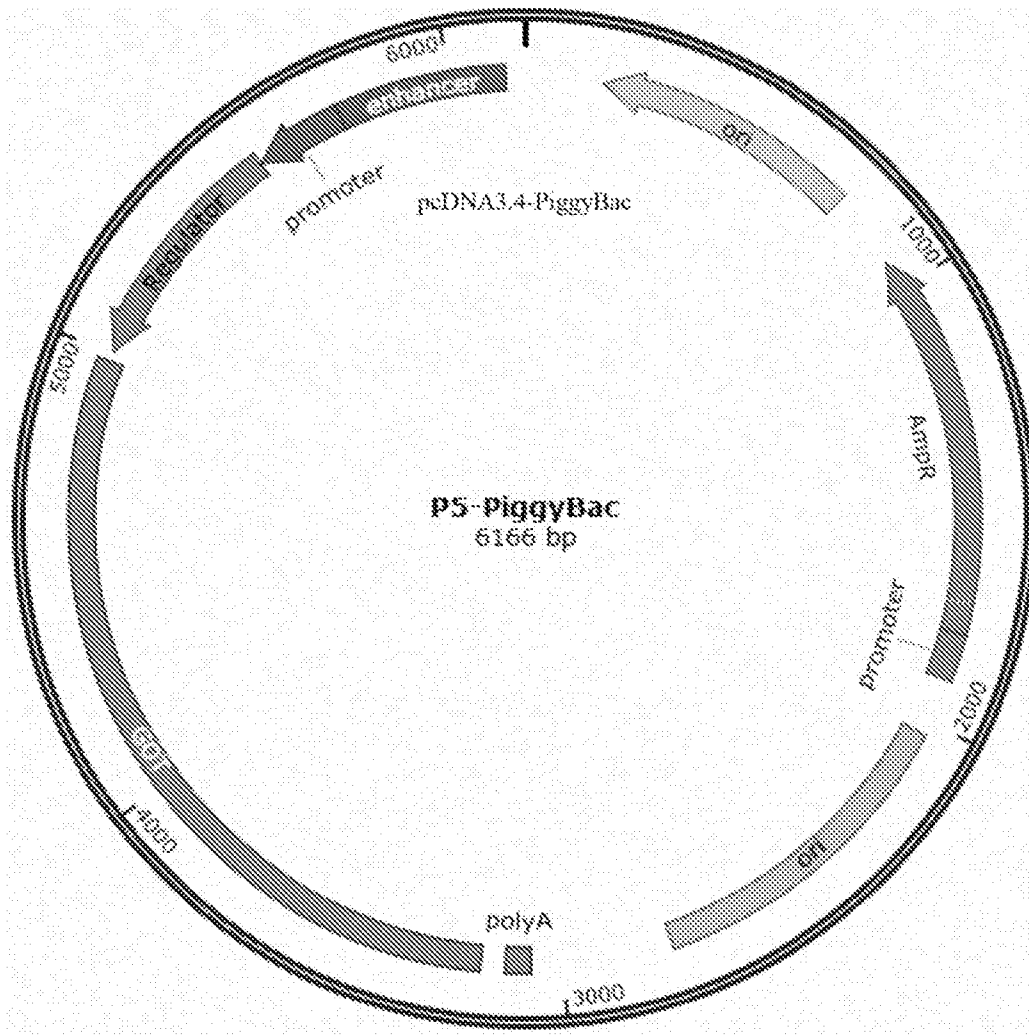
[图 1]



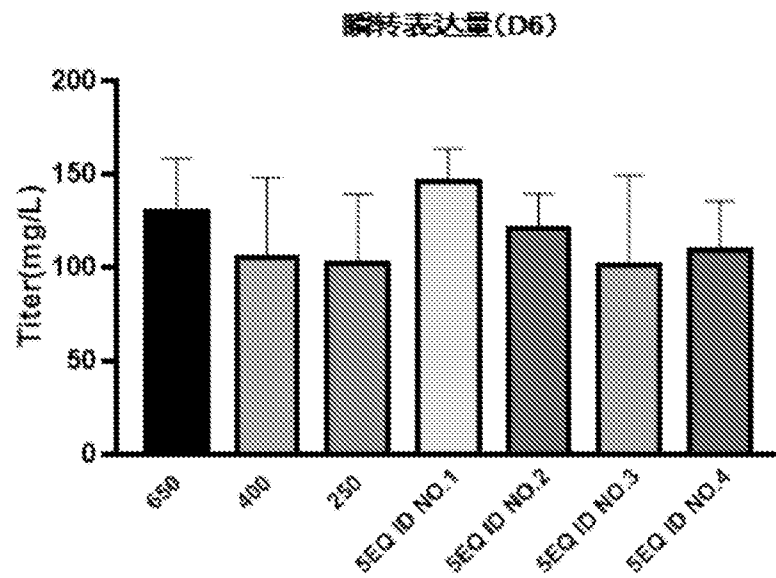
[图 2]



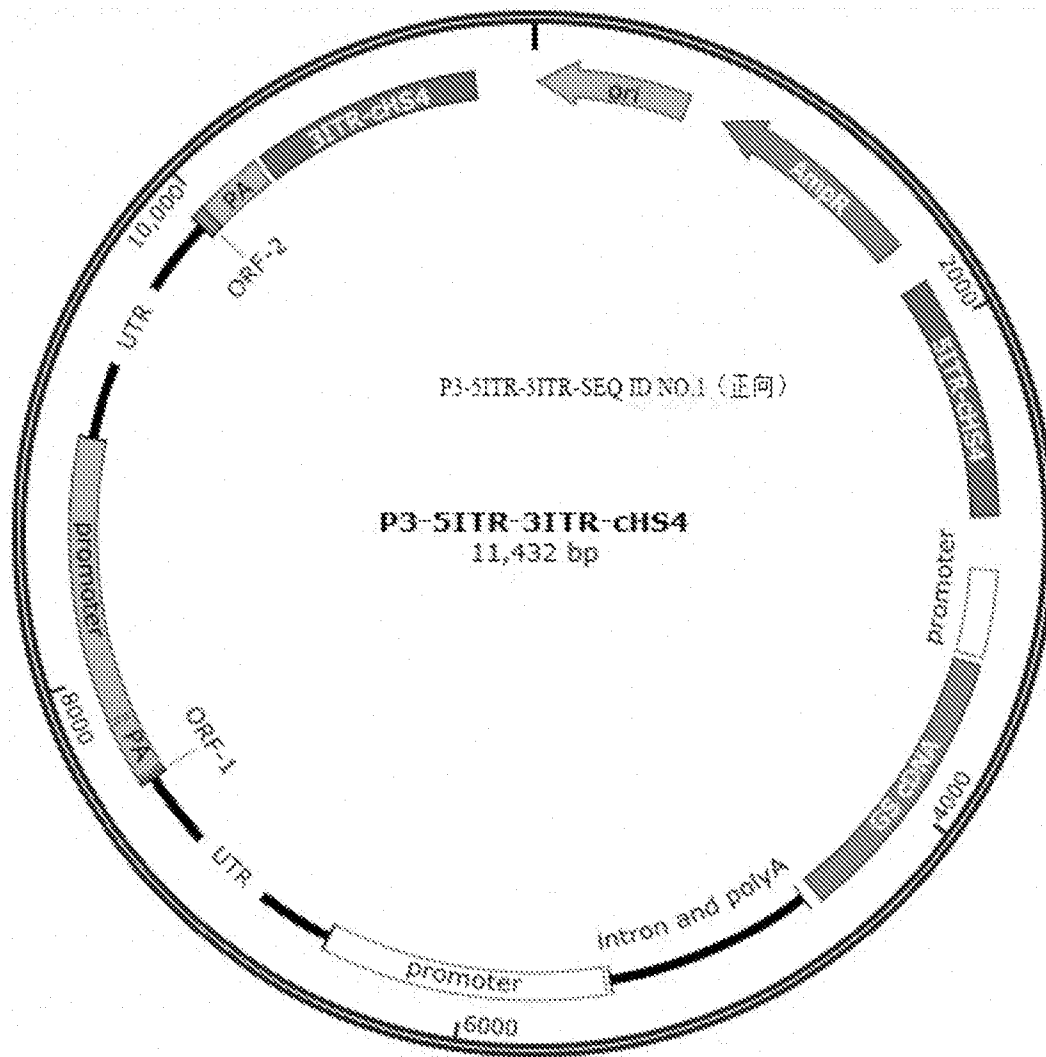
[图 3]



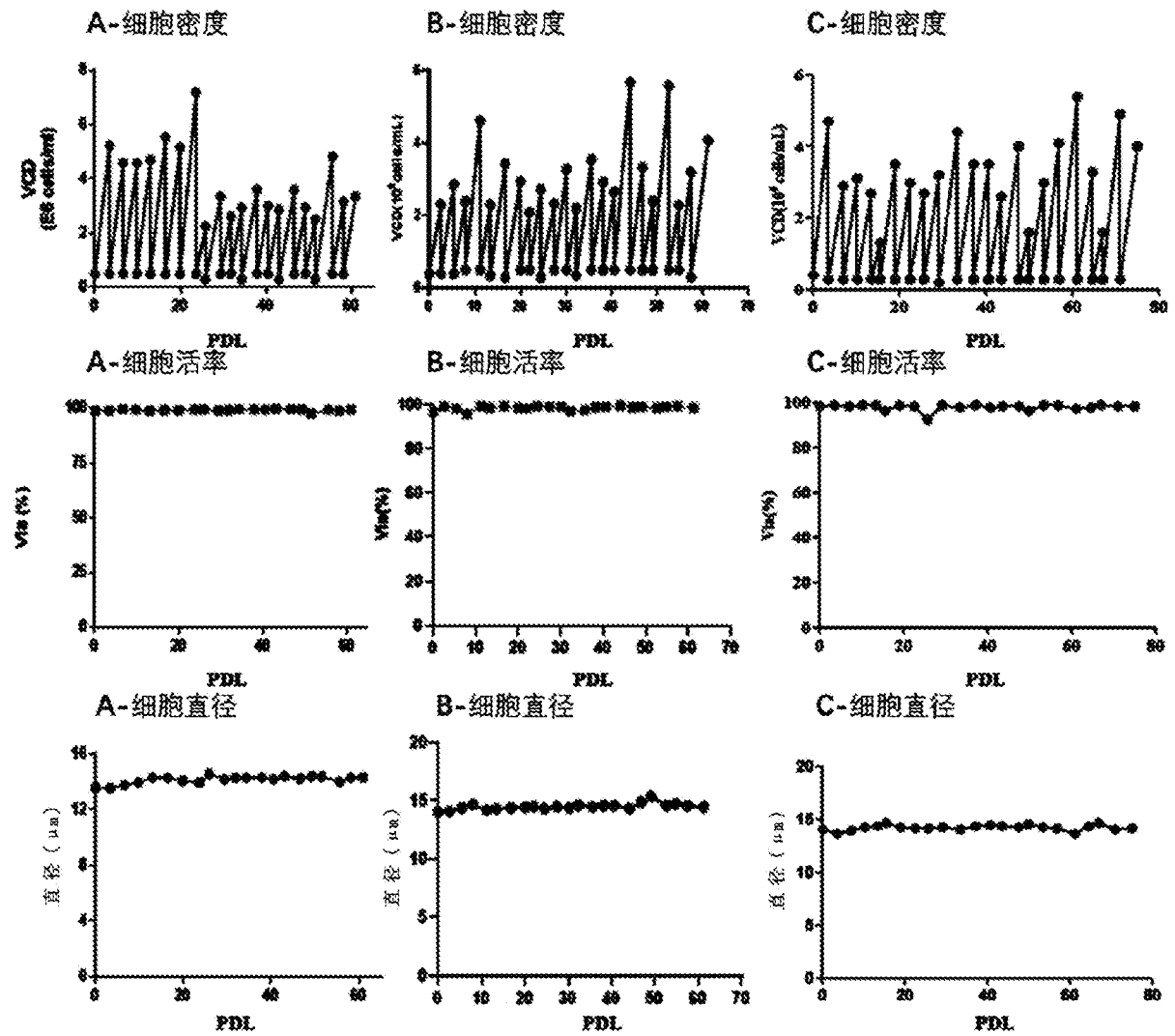
[图 4]



[图 6B]



[图 7]



细则 26,
13.09.2024
细则 26,
25.07.2024

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/070516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12P 21/00(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)

IPC:C12N,C12P

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)

CNXTX, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, CNKI, 万方, WANFANG, ISI web of knowledge, Elsevier Science Direct, Springerlink, pubmed, genbank, ENA, EMBL, Uniprot, STN, 百度, BAIDU, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, patentics: 绝缘子, 绝缘体, insulator, 鸡染色质绝缘子, 超敏感位点4, HS4, HS4-650, IS2, 调控, 截短, 筛选, 序列1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016032318 A1 (FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD et al.) 04 February 2016 (2016-02-04) claims 1-24, and sequence 3	1, 3-15
X	CN 110760543 A (CHANGZHOU NO.2 PEOPLE'S HOSPITAL) 07 February 2020 (2020-02-07) claims 1-5, and sequence 2	1, 3-15
X	CN 106544362 A (XINXIANG MEDICAL UNIVERSITY) 29 March 2017 (2017-03-29) claims 1-10, and description, paragraph 40	1, 3-15
X	WO 2022232191 A1 (CSL BEHRING L. L. C. et al.) 03 November 2022 (2022-11-03) claims 1-87, and sequence 1	1, 3-15
A	CN 102943092 A (NORTHWEST A&F UNIVERSITY et al.) 27 February 2013 (2013-02-27) entire document	1-15



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

06 March 2024

Date of mailing of the international search report

14 March 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/070516

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	胡樱虹等 (HU, Yinghong et al.). "鸡染色质绝缘子HS4的不同区域对杆状病毒表达egfp基因的影响 (Non-official translation: Effects of Different Regions of Chicken Chromatin Insulator HS4 on Expression of egfp Gene in Baculovirus)" 复旦学报 (自然科学版) (<i>Journal of Fudan University (Natural Science)</i>), Vol. 52, No. 4, 31 August 2013 (2013-08-31), pages 442-446	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/070516

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/070516

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2016032318	A1	04 February 2016	US	10053709	B2	21 August 2018
				WO	2014140218	A1	18 September 2014
				ES	2793173	T3	13 November 2020
				EP	2971009	A1	20 January 2016
				EP	2971009	B1	01 January 2020
CN	110760543	A	07 February 2020	None			
CN	106544362	A	29 March 2017	None			
WO	2022232191	A1	03 November 2022	CA	3217247	A1	03 November 2022
				AU	2022267266	A1	02 November 2023
				AU	2022267266	A9	16 November 2023
CN	102943092	A	27 February 2013	None			

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12P 21/00(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)

IPC:C12N,C12P

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))

CNXTX, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, 中国专利生物序列检索系统, CNKI, 万方, ISI web of knowledge, Elsevier Science Direct, Springerlink, pubmed, genbank, ENA, EMBL, Uniport, STN, 百度, 百度学术, patentics: 绝缘子, 绝缘体, insulator, 鸡染色质绝缘子, 超敏感位点4, HS4, HS4-650, IS2, 调控, 截短, 筛选, 序列1-4

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	US 2016032318 A1 (FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD等) 2016年2月4日 (2016 - 02 - 04) 权利要求1-24, 序列3	1,3-15
X	CN 110760543 A (常州市第二人民医院) 2020年2月7日 (2020 - 02 - 07) 权利要求1-5, 序列2	1,3-15
X	CN 106544362 A (新乡医学院) 2017年3月29日 (2017 - 03 - 29) 权利要求1-10, 说明书第40段	1,3-15
X	WO 2022232191 A1 (CSL BEHRING L. L. C.等) 2022年11月3日 (2022 - 11 - 03) 权利要求1-87, 序列1	1,3-15
A	CN 102943092 A (西北农林科技大学等) 2013年2月27日 (2013 - 02 - 27) 全文	1-15
A	胡樱虹等. "鸡染色质绝缘子HS4的不同区域对杆状病毒表达egfp基因的影响" 复旦学报(自然科学版), 第52卷, 第4期, 2013年8月31日 (2013 - 08 - 31), 第442-446页	1-15

☐ 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

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"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

2024年3月6日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

王慧

电话号码 (+86) 010-53962103

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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:
- b.

☐

为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),

☐

附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
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/CN2024/070516

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)
US	2016032318	A1	2016年2月4日	US	10053709	B2	2018年8月21日
				WO	2014140218	A1	2014年9月18日
				ES	2793173	T3	2020年11月13日
				EP	2971009	A1	2016年1月20日
				EP	2971009	B1	2020年1月1日
CN	110760543	A	2020年2月7日	无			
CN	106544362	A	2017年3月29日	无			
WO	2022232191	A1	2022年11月3日	CA	3217247	A1	2022年11月3日
				AU	2022267266	A1	2023年11月2日
				AU	2022267266	A9	2023年11月16日
CN	102943092	A	2013年2月27日	无			