

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 40371 B1**
- (51) Cl. internationale : **C12N 15/00; C12P 21/06;
C12P 21/00; C12N 15/85**
- (43) Date de publication : **31.03.2021**
-
- (21) N° Dépôt : **40371**
- (22) Date de Dépôt : **19.08.2015**
- (30) Données de Priorité : **19.08.2014 US 201462039416 P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2015/045793 19.08.2015**
- (71) Demandeur(s) : **Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road Tarrytown, NY 10591 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **DESPANDE, Dipali ; BURAKOV, Darya ; CHEN, Gang ; FANDL, James**
- (74) Mandataire : **CABINET DIANI**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: EP15833421.9**
-
- (54) Titre : **SÉLECTIVITÉ EFFICACE DES PROTÉINES RECOMBINÉES**
- (57) Abrégé : Cette invention concerne un nouveau système d'expression comprenant un marqueur de mammifère sélectionnable qui favorise les modifications post-traductionnelles souhaitables des glycoprotéines. En particulier, l'invention concerne des procédés et des compositions permettant une expression optimale des protéines recombinées dans des cellules de mammifères par utilisation d'un système de marqueur de sélection basé sur des gènes GPT d'origine mammifère. L'invention concerne également des procédés qui facilitent la sélectivité, des copies d'expression améliorées ainsi qu'un rendement protéique des protéines recombinées amélioré dans des cellules de mammifères, ainsi que des procédés d'utilisation des systèmes d'expression GPT.

Revendications

1. Cellule isolée comprenant :
 - (a) un gène de résistance à la tunicamycine (Tn) de mammifère codant une protéine ayant au moins 93% d'identité à la séquence d'acide aminé de SEQ ID NO : 3, dans lequel le gène de résistance à la Tn est ajouté de manière exogène à la cellule ;
 - (b) un premier gène d'intérêt (GDI), dans lequel le premier GDI est un GDI ajouté de manière exogène ; et
 - (c) au moins un élément régulateur,dans lequel le gène de résistance au Tn est lié de manière fonctionnelle au premier GDI et le au moins un élément régulateur, dans lequel la cellule est une cellule de mammifère, et dans lequel le premier GDI code une chaîne légère d'anticorps ou un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, une chaîne lourde d'anticorps ou un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, ou une protéine de fusion Fc ou un fragment de celle-ci.
2. Vecteur comprenant un acide nucléique, dans lequel l'acide nucléique comprend un gène de résistance à la tunicamycine (Tn) de mammifère codant une protéine ayant une identité d'au moins 93 % à la séquence d'acide aminé de SEQ ID NO : 3, un premier gène d'intérêt (GDI) lié de manière fonctionnelle au gène de résistance Tn, et au moins un élément régulateur, et dans lequel le premier GDI code une chaîne légère d'anticorps ou un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, une chaîne lourde d'anticorps ou un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, ou une protéine de fusion Fc ou un fragment de celle-ci.
3. Cellule isolée selon la revendication 1, ou vecteur selon la revendication 2, dans lequel le gène de résistance Tn comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée à partir du groupe constitué de SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 11, SEQ ID NO : 12, SEQ ID NO : 13, SEQ ID NO : 14, SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 16, et SEQ ID NO : 17.
4. Cellule isolée selon la revendication 1, ou vecteur selon la revendication 2, dans lequel l'au moins un élément régulateur

est sélectionné à partir du groupe constitué d'un promoteur, d'un site de liaison au ribosome et d'un activateur.

5. Cellule isolée selon la revendication 1, ou vecteur selon la revendication 2, dans lequel le premier GDI est lié de manière fonctionnelle à un promoteur.

6. Cellule isolée selon la revendication 1, ou vecteur selon la revendication 2, comprenant en outre un deuxième gène d'intérêt ajouté de manière exogène (GDI), facultativement dans lequel le deuxième GDI code une glycoprotéine et, facultativement, dans lequel la glycoprotéine est sélectionnée à partir d'une chaîne légère d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une chaîne lourde d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une protéine de fusion Fc ou d'un fragment de celle-ci, d'un ligand, et d'un récepteur ou d'un fragment de liaison de ligand de celui-ci.

7. Procédé, comprenant

(a) l'introduction d'un vecteur comprenant un acide nucléique dans une population de cellules hôtes de mammifère par transfection, dans lequel l'acide nucléique comprend un gène de résistance à la tunicamycine (Tn) de mammifère codant une protéine ayant une identité d'au moins 93% à la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3, un premier gène d'intérêt (GDI) lié de manière fonctionnelle au gène de résistance Tn, et au moins un élément régulateur ;

(b) la culture de la population cellulaire de l'étape (a) en présence de Tn, ce qui permet alors l'obtention d'un transfectant cellulaire comprenant l'acide nucléique du vecteur.

8. Procédé de production d'une protéine d'intérêt (PDI) recombinante, dans lequel le procédé comprend :

(a) la fourniture d'une cellule hôte de mammifère qui comprend :

(i) un gène de résistance à la tunicamycine (Tn) de mammifère codant une protéine ayant une identité d'au moins 93% à la séquence d'acide aminé de SEQ ID NO : 3, dans lequel le gène de résistance Tn est ajouté de manière exogène à la cellule ;

5

(ii) un premier gène d'intérêt (GDI), dans lequel le premier GDI est un GDI ajouté de manière exogène ; et

(iii) au moins un élément régulateur, dans lequel le gène de résistance à la Tn est lié de manière

10 fonctionnelle au premier GDI et à l'au moins un élément régulateur ; et

(b) la culture de la cellule en présence de Tn pour exprimer un POI à partir de la GDI.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, dans lequel :

15 (i) le gène de résistance à la Tn comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe constitué de SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 11, SEQ ID NO : 12, SEQ ID NO : 13, SEQ ID NO : 14, SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 16, et SEQ ID NO : 17 ;

(ii) l'au moins un élément régulateur est sélectionné à

20 partir du groupe constitué d'un promoteur, d'un site de liaison au ribosome et d'un activateur ;

(iii) le premier GDI est lié de manière fonctionnelle à un promoteur ; et/ ou

(iv) le premier GDI code une glycoprotéine et

25 facultativement dans laquelle la glycoprotéine est sélectionnée à partir d'une chaîne légère d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une chaîne lourde d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une protéine de fusion Fc ou d'un fragment de celle-ci, d'un ligand,

30 et d'un récepteur ou d'un fragment de liaison de ligand de celui-ci.

10. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le vecteur comprend en outre un deuxième gène d'intérêt ajouté de manière exogène (GDI), facultativement, dans lequel le deuxième GDI code

35 une glycoprotéine et, facultativement, dans lequel la

glycoprotéine est sélectionnée à partir d'une chaîne légère d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une chaîne lourde d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une protéine de fusion Fc ou d'un fragment de celle-ci, d'un ligand, et d'un récepteur ou d'un fragment de liaison de ligand de celui-ci.

11. Procédé selon la revendication 8, dans lequel la cellule de mammifère comprend en outre un deuxième gène d'intérêt ajouté de manière exogène (GDI), facultativement dans lequel le deuxième GDI code une glycoprotéine et, facultativement, dans lequel la glycoprotéine est sélectionnée à partir d'une chaîne légère d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une chaîne lourde d'anticorps ou d'un fragment de liaison d'antigène de celle-ci, d'une protéine de fusion Fc ou d'un fragment de celle-ci, d'un ligand, et d'un récepteur ou d'un fragment de liaison de ligand de celui-ci.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7-11, dans lequel la Tn est à une concentration d'au moins 1 µg/mL, de préférence dans lequel la Tn est à une concentration de 1 µg/mL, 2,5 µg/ml, ou 5 µg/ml.

13. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le transfectant cellulaire est obtenu par la culture de la population cellulaire de l'étape (b) en présence de concentrations séquentiellement croissantes de Tn, ou le procédé selon la revendication 8, dans lequel la culture comprend la culture en présence de concentrations séquentiellement croissantes de Tn, facultativement dans lequel la culture comprend la culture à une première concentration de Tn de 1 µg/ml, suivie par la culture à une deuxième concentration de Tn de 2,5 µg/ml ou 5 µg/ml.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7-11 et 13 comprenant en outre l'isolation d'un POI exprimé par le GDI.

15. Cellule isolée selon l'une quelconque des revendications 1 et 3-6, ou le procédé selon l'une quelconque des revendications

7-14, dans laquelle la cellule est : (a) sélectionnée à partir du groupe constitué de CHO-K1, COS-7, HEK293, cellule tumorale, lymphocyte, cellule rétinienne et cellule souche ; ou (b) une cellule CHO-K1.