

Méthode plus efficace et plus productive de transfection à grande échelle de cellules CHO

RÉSUMÉ

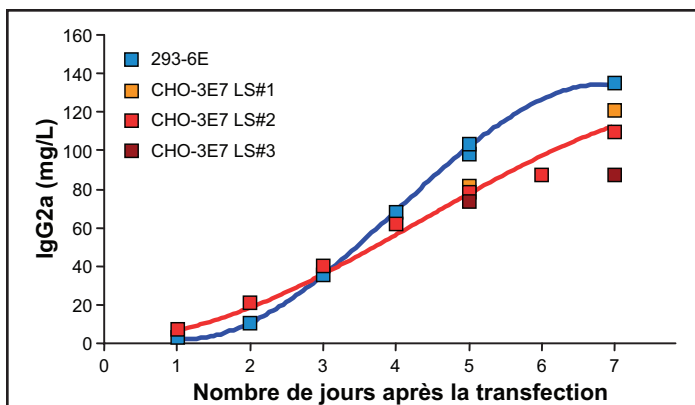
Le milieu de la recherche biomédicale et l'industrie pharmaceutique font grand usage de cellules de hamster chinois (cellules CHO) pour produire des protéines recombinantes (r-protéines). Malgré la reconnaissance croissante dont bénéficie le recours à la transfection à grande échelle pour l'expression rapide et productive de r-protéines, cette méthode n'est pas encore entièrement optimisée quand on utilise ce type de cellules. Grâce aux améliorations apportées aux procédés, aux vecteurs et à la lignée cellulaire, cette technologie permet dorénavant une expression transitoire de gènes plus efficace et rentable à partir des cellules CHO.

APPLICATIONS

- Production de r-protéines à haut rendement et faible coût dans des cellules CHO.
- Production rapide de r-protéines exigeant des modifications pour utilisation par les chercheurs et l'industrie pharmaceutique.

CONCEPT

Devant le besoin croissant d'une production rapide et efficace de protéines dans des systèmes d'expression permettant d'effectuer des modifications post-traductionnelles complexes, il est nécessaire de développer des solutions de rechange à la mise au point de lignées cellulaires mammaliennes stables. La transfection transitoire à grande échelle constitue un moyen d'accélérer la production de r-protéines dans des cellules mammaliennes pour des quantités de l'ordre du milligramme ou du gramme. Même si les cellules CHO l'emportent encore sur les cellules embryonnaires rénales humaines 293 (HEK293) pour ce qui est de l'expression stable de r-protéines, ces dernières demeurent les plus utilisées pour leur expression transitoire. Cette observation s'explique par le fait que la transfection à grande échelle de cellules CHO affiche une faible efficacité et une faible productivité lorsqu'on emploie des réactifs de transfection peu coûteux. De plus, les vecteurs plasmidiques utilisés dans les cellules CHO ne sont pas entièrement optimisés pour l'expression transitoire de gènes. Tirant parti de l'expertise acquise par l'optimisation de sa plate-forme HEK293 (PL-11565), l'IRB-CNRC a mis au point une technologie comportant des procédés, des vecteurs d'expression et une lignée cellulaire améliorée. Une variété entièrement désacétylée d'un polymère cationique peu coûteux, la polyéthylèneimine



L'expression transitoire de gènes dans les cellules CHO-3E7 au moyen d'un processus optimisé et de vecteurs pTT produit des titres d'anticorps qui se rapprochent de ceux obtenus dans les cellules 293 (voir les LOD L-11266 et L-11565)

CONTACTS

Yves Quenneville

Tél. : (514) 496-8507

Agent de développement des affaires

Courriel : yves.quenneville@cnrc-nrc.gc.ca

Daniel Desmarteaux

Tél. : (514) 496-5300

Agent de développement des affaires

Courriel : daniel.desmarteaux@cnrc-nrc.gc.ca

D^r Yves Durocher

Tél. : (514) 496-6192

Groupe Technologies des cellules animales

Courriel : yves.durocher@cnrc-nrc.gc.ca

(PEI), s'est révélée être une solution de rechange rentable au réactif de transfection actuellement utilisé pour l'introduction d'ADN plasmidique dans les cellules CHO. Pour rehausser la productivité, une lignée de cellules CHO exprimant de façon stable une protéine EBNA1 optimisée a été mise au point. Un tel système permet d'augmenter l'expression transitoire des r-protéines d'un facteur de 3 à 4 quand on emploie des plasmides contenant l'origine de réplication du VEB (oriP), par exemple la famille de vecteurs pTT. Une augmentation supplémentaire de l'expression transitoire et de la productivité des cellules CHO a été obtenue par la potentialisation à l'acide valproïque.

CARACTÉRISTIQUES ET AVANTAGES

Système d'expression et lignée cellulaire hôte validé

Cette technologie est une alternative à la plate-forme d'expression transitoire de gènes HEK293 de l'IRB-CNRC (L-11266; PL-11565), une plate-forme robuste et largement validée par la production et la purification de centaines de r-protéines. L'application de plusieurs caractéristiques de cette plate-forme permet d'optimiser l'expression transitoire de gènes dans les cellules CHO, une lignée cellulaire mammalienne bien établie pour la production de r-protéines, particulièrement celles qui nécessitent des modifications post-traductionnelles.

Procédé de transfection efficace

L'emploi d'un polymère PEI linéaire entièrement désacétylée comme réactif de transfection entraîne une efficacité et une productivité accrues de la transfection des cellules CHO comparativement à l'utilisation du PEI linéaire de 25 kDa. Ce réactif offre les avantages d'être stable, non toxique, d'utilisation facile et disponible sur le marché. En outre, il est plus économique que les formulations de réactifs connues vendues actuellement pour l'introduction d'ADN plasmidique dans les cellules CHO.

Instruments d'expression optimisés

Un clone de CHO stable exprimant une forme tronquée mais fonctionnelle d'EBNA1 (CHO-3E7) a été obtenue et sa capacité à rehausser la production de r-protéines avec le recours à des vecteurs pTT a été démontrée. De plus, il a été noté que placer le gène d'intérêt sous le contrôle d'une cassette d'expression à base de cytomégalovirus (CMV) sur un vecteur pTT portant oriP permet d'obtenir une productivité nettement plus grande que lorsqu'on emploie le promoteur fort EF1 α . L'expression transitoire de gènes et la productivité peuvent être rehaussées encore davantage par la co-expression du facteur de croissance 2 des fibroblastes (FGF-2) ou avec l'utilisation d'acide valproïque en combinaison avec la co-expression de la protéine kinase B (Akt) suivie d'un changement de température.

Plate-forme pratique lors de l'emploi aussi bien de cellules CHO que de cellules HEK293

Grâce à la production accrue de r-protéines obtenue avec la famille des vecteurs pTT, on peut éviter de recourir au procédé peu commode du sous-clonage de l'ADN complémentaire en vecteurs spécifiques à des lignées cellulaires. On peut alors facilement comparer la qualité et l'activité du produit dans les deux lignées cellulaires tout en s'assurant d'une productivité maximale.

PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Procédés, vecteurs et lignées cellulaires mis au point en vue d'une transfection à grande échelle améliorée (CNRC n° 11992).