

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 novembre 2013 (28.11.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/175358 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/09 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2013/053983
- (22) Date de dépôt international :
15 mai 2013 (15.05.2013)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1254613 21 mai 2012 (21.05.2012) FR
- (71) Déposant : INSTITUT NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147 rue de
l'Université, F-75007 Paris (FR).
- (72) Inventeurs : BERMUDEZ HUMARAN, Luis; 50 ter rue
Charles de Gaulle, F-78350 Jouy En Josas (FR). LAN-
GELLA, Philippe; 4 avenue du Général de Gaulle, F-
78140 Velizy-Villacoublay (FR). KHARRAT, Pascale; 5
avenue Lombart, F-92260 Fontenay-aux-Roses (FR).
- (74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie-José et al.;
Cabinet Orès, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris
(FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : 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, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (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,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des sé-
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : STRESS-REGULATED PROKARYOTIC EXPRESSION CASSETTES

(54) Titre : CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES RÉGULÉES PAR LE STRESS.

(57) Abstract : The invention relates to prokaryotic expression cassettes comprising a stress-regulated promoter, the promoter of the GroESL operon of *Lactococcus lactis*. Said cassettes can be used for the expression of genes of interest in gram-positive bacteria, and especially for producing and releasing a protein of interest when the bacteria are administered to an individual.

(57) Abrégé : L'invention est relative à des cassettes d'expression procaryotes comprenant un promoteur régulé par le stress, le pro-
moteur de l'opéron GroESL de *Lactococcus lactis*. Ces cassettes peuvent être utilisées pour l'expression de gènes d'intérêt dans des
bactéries à gram- positif, et en particulier pour produire et libérer une protéine d' intérêt lorsque les bactéries sont administrées à un
individu.



WO 2013/175358 A1

CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES RÉGULÉES PAR LE STRESS

L'invention concerne la production de protéines hétérologues chez des bactéries à Gram-positif, notamment des bactéries lactiques.

A côté de leurs usages traditionnels dans l'industrie agro-alimentaire, qui ont prouvé leur innocuité, les bactéries lactiques, notamment les lactocoques et lactobacilles, sont actuellement de plus en plus utilisées en tant que cellules hôtes pour la production de protéines hétérologues d'intérêt. Des bactéries lactiques recombinantes servent de vecteurs vivants pour délivrer par voie mucosale des molécules d'intérêt pour la santé (pour revues : Daniel et al., *Trends Biotechnol.*, 29(10), 409-508, 2011 ; et Bermúdez-Humarán et al., *Microb. Cell Fact.*, 10 (Suppl 1):S4, 2011).

Parmi les bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* en particulier est une bactérie non invasive et non pathogène, largement utilisée dans la fabrication de produits laitiers, en particulier de fromages. Elle résiste jusqu'à 90% au passage gastrique chez l'homme et chez la souris. *L. lactis* est la bactérie lactique modèle et fait partie des bactéries les mieux caractérisées avec *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. De ce fait, *L. lactis* est considérée comme une excellente candidate pour l'expression de protéines d'intérêt pour la santé (antigènes, cytokines, hormones, etc.) au niveau des muqueuses.

Steidler et al. (*Science*, 289, 1352-1355, 2000) décrivent par exemple l'utilisation d'une souche de *L. lactis* recombinante exprimant la cytokine interleukine-10 (IL-10) sous contrôle du promoteur constitutif P1 de *L. lactis*.

La même équipe a par la suite cherché à identifier des promoteurs constitutifs forts pouvant être utilisés pour exprimer des protéines d'intérêt thérapeutique dans des bactéries du genre *Lactococcus*

(Demande PCT WO2008/084115), ces promoteurs étant définis comme étant plus forts que le promoteur du gène de la thymidylate synthase (*thyA*) de *L. lactis*. 53 promoteurs candidats répondant potentiellement à cette définition ont
5 été identifiés par analyses transcriptomique et protéomique. Parmi ceux-ci, 17 ont pu être sous-clonés pour tester leur capacité à contrôler l'expression d'une protéine hétérologue : il s'agit des promoteurs des gènes *rpoB*, *dpsA*, *glnA*, *glnR*, *pepV*, *atpD*, *pgk*, *fabF*, *fabG*, *rpoA*,
10 *pepQ*, *rpsD*, *sodA*, *luxS*, *rpsK*, *rpIL*, et *hIIA* (ainsi nommés chez *L. lactis* MG1363). 4 de ces promoteurs ont effectivement permis d'atteindre le niveau d'expression espéré : les promoteurs des gènes *dpsA*, *pepV*, *sodA*, et *hIIA*.

15 Les promoteurs décrits dans les documents cités ci-dessus sont tous des promoteurs constitutifs. Dans certains cas, il est préférable d'utiliser des promoteurs inductibles, permettant de déclencher ou d'arrêter l'expression au moment souhaité. En effet, certaines
20 protéines, telles que les cytokines, peuvent s'accumuler au sein du cytoplasme de la bactérie et dégrader la cellule hôte. Des systèmes d'expression intégrant un promoteur inductible permettent de mieux contrôler l'expression de la protéine hétérologue et de prévenir les effets négatifs qui
25 pourraient résulter de sa surproduction.

Bien que l'on connaisse chez les bactéries lactiques et chez *L. lactis* en particulier, un très grand nombre de gènes dont l'expression est régulée par divers facteurs, on ne dispose à l'heure actuelle que d'un choix
30 restreint de promoteurs inductibles utilisables en pratique pour la construction de cassettes d'expression de gènes d'intérêt (pour revues : De Vos, *Curr. Op. Microbiol.*, 2, 289-295, 1999 ; Morello et al., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14(1-3):48-58, 2008 ; Nouaille et al., *Genet. Mol. Res.*, 2(1):102-111, 2003). En effet, cette utilisation
35 demande non seulement que les promoteurs concernés soient

inductibles, mais encore qu'il existe un différentiel d'expression suffisant entre les différents états d'induction ; idéalement, l'expression doit atteindre un niveau élevé en conditions d'induction, et être absente ou
5 faible en conditions de non-induction.

Le système NICE (« *Nisin Controlled Expression system* ») (Kuipers et al., *J. of Biol. Chem.*, 270(45):27299-27304, 1995 ; de Ruyter et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:3662-3667, 1996 ; Kuipers et al.,
10 *J. of Biotechnol.*, 64(1):15-21, 1998; Mierau et al., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 68(6):705-17, 2005) est aujourd'hui le plus largement utilisé pour exprimer un gène d'intérêt en fonction de la présence ou non dans le milieu extérieur d'une bactériocine, la nisine. Cependant, les inconvénients
15 inhérents à ce système sont, d'une part, la nécessité de la présence de gènes régulateurs de ce système (apportés par des plasmides, ou clonés et intégrés dans le chromosome bactérien), et d'autre part, la contrainte d'une étape constituée par la mise en présence de la bactérie avec la
20 nisine.

Dans ce contexte, les Inventeurs ont cherché à mettre en œuvre un système d'expression inductible convenant pour l'expression de protéines hétérologues d'intérêt au sein de bactéries lactiques destinées à être
25 utilisées comme vecteur thérapeutique ou vaccinal, et ont eu l'idée de rechercher un système d'expression qui serait induit lors de l'administration des bactéries au sujet que l'on souhaite traiter. Ils sont partis de l'hypothèse que cette administration, qui place les bactéries dans des
30 conditions très différentes de leurs conditions de vie habituelles pouvait induire chez celles-ci différents types de stress : il peut s'agir notamment de stress thermique, si la température corporelle du sujet à traiter est suffisamment élevée par rapport à la température optimale
35 de croissance de la bactérie administrée ; en cas d'administration orale, le stress thermique peut être

accompagné d'un stress acide lors du passage dans l'estomac (où le pH est d'environ 1,5 à 2), puis d'un stress biliaire au niveau du duodénum.

Les Inventeurs ont recherché s'il était possible d'identifier, parmi les promoteurs des nombreux gènes identifiés comme étant induits par un ou plusieurs de ces stress (pour revue cf. par exemple Van de Guchte et al., *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 187-216, 2002), un promoteur effectivement utilisable en pratique pour contrôler l'expression inductible de protéines hétérologues.

Ils se sont intéressés au promoteur de l'opéron GroESL de *Lactococcus lactis*. Les protéines GroES et GroEL, présentes dans de nombreuses bactéries, sont des chaperonines et des protéines de réponse au choc thermique ou *hsp* (pour « *heat-shock proteins* »). L'opéron GroESL de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a été décrit par Kim et al. (*Gene*, 127(1) :121-126, 1993), qui ont rapporté que sa transcription était inductible par un choc thermique. Arnau et al. (*Microbiology*, 142, 1685-1691, 1996) ont étudié la cinétique d'induction de la transcription des gènes *dnaK*, *dnaJ* et *groEL* de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* pendant un choc thermique provoqué par une élévation de température, de 30°C (température optimale de croissance de *Lactococcus lactis*) à 43°C. Ils ont observé un niveau de transcription allant de 10 fois (pour *dnaJ* et *groEL*) à 100 fois (pour *dnaK*) le niveau de base pendant les 15 premières minutes du choc thermique, et diminuant après 20 minutes.

Les Inventeurs ont cloné le promoteur de l'opéron GroESL de *Lactococcus lactis*, et ont testé ses capacités à contrôler l'expression d'une protéine hétérologue et son inductibilité dans des conditions reproduisant celles d'une administration *in vivo* chez l'homme.

Ils ont constaté qu'en conditions basales (c'est-à-dire en conditions optimales de croissance pour

L. lactis), le promoteur PGroESL permettait l'expression d'une protéine hétérologue, à un niveau faible, et qu'une élévation de température à 37°C, bien que plus faible que les températures (supérieures à 40°C) habituellement
5 utilisées pour l'induction d'un stress thermique chez *L. lactis*, suffisait pour augmenter de 1,3 à 5 fois la quantité de protéine hétérologue produite.

La présente invention a donc pour objet une cassette d'expression comprenant :

10 - le promoteur (PGroESL) de *Lactococcus lactis*,
et

- une séquence nucléotidique hétérologue codant pour un polypeptide d'intérêt, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

15 On définit ici comme : « promoteur PGroESL de *L. lactis* » un polynucléotide de 82 à 150 pb constituant un promoteur fonctionnel chez *L. lactis*, et comprenant une séquence nucléotidique présentant au moins 90%, et par ordre de préférence croissante, au moins 91%, au moins 92%,
20 au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99%, ou 100%, d'identité avec la séquence suivante :

CTTGACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAGCACTCAACTATTAAGA
GTGCTAAAAATAAAAAATGGAGG (SEQ ID NO. : 1).

25 Le promoteur PGroESL contient les éléments de cis-régulation suivants, positionnés à titre d'exemple sur la SEQ ID NO. : 1 :

- Un site de liaison pour la protéine régulatrice CtsR, aux positions 1-17, la protéine CtsR
30 étant impliquée dans la régulation de différents gènes intervenant dans la réponse au choc thermique ;

- Un élément CIRCE (pour l'anglais « Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression »), aux positions 40-66, qui est une séquence répétée inversée
35 impliquée dans la régulation de l'expression des protéines chaperonnes ;

- Une boîte -35, aux positions 41-46 ;
- Une boîte -10, aux positions 64-69 ;
- Une boîte ACD (ou ACiD) (cf. Madsen et al., *Molec. Microbiol.*, 56(3), 735-746, 2005), aux positions 29-42, impliquée dans la réponse au pH acide ; et
- Un site de liaison des ribosomes (RBS, pour l'anglais « *Ribosome Binding Site* »), aux positions 78-82.

La séquence SEQ ID NO. : 1, indiquée ici comme séquence de référence, est issue de la souche modèle de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (GenBank NC_009004).

D'autres promoteurs PGroESL utilisables pour la construction d'une cassette d'expression conforme à l'invention peuvent également être isolés et clonés à partir de n'importe quelle souche de *L. lactis*, par les techniques classiques du génie génétique.

A titre d'exemples non-limitatifs, on citera :

- le promoteur PGroESL de la souche A76 (GenBank CP003132) de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, qui comprend la séquence SEQ ID NO. : 1 ;

- le promoteur PGroESL de la souche NZ9000 (GenBank CP002094) de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, qui comprend la séquence SEQ ID NO. : 1 ;

- le promoteur PGroESL de la souche SK11 (GenBank NC_008527) de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, qui comprend la séquence suivante :

CTTGACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAGCACACAACTATTAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGT (SEQ ID NO. : 2) ;

- les promoteurs PGroESL des souches IL1403 (GenBank NC_002662) ou CV56 (GenBank CP002365) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, qui comprennent la séquence :

CTTGACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAGCACTCGTTTAATAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGG (SEQ ID NO. : 3) ;

- le promoteur PGroESL de la souche KF147 (GenBank NC_013656) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,

qui comprend la séquence suivante :

CTTGACTAAATCTGACCATTGAGATAAAATAAGAATATGTTAGCACTCGTTTAAACAAGA
GTGCTAAAAAATAAAAAATGGAGG (SEQ ID NO. : 4).

On définit ici comme « séquence nucléotidique
5 hétérologue » toute séquence nucléotidique autre que celle
naturellement située chez *L. lactis* en aval du promoteur
PGroESL, et notamment toute séquence nucléotidique ne
comprenant pas celles codant pour les protéines GroES et
GroEL de *L. lactis*. De préférence, il s'agira d'une
10 séquence qui n'est pas issue de *L. lactis*.

Il peut s'agir de toute séquence codant pour un
polypeptide d'intérêt, notamment d'intérêt thérapeutique ou
vaccinal, que l'on souhaite faire exprimer par la bactérie
hôte. Ledit polypeptide peut le cas échéant être un
15 polypeptide chimérique, associant des séquences polypep-
tidiques d'origine diverse.

A titre d'exemples non limitatifs, ladite
séquence nucléotidique hétérologue peut être :

- une séquence nucléotidique codant pour une
20 cytokine, par exemple l'interleukine-10 (IL-10), l'IL-12,
l'IL-2, l'IL-4, le GM-CFS (« *Granulocyte-macrophage colony-
stimulating factor* »), ou le TGF- β (« *Transforming growth
factor-beta* »);

- une séquence nucléotidique codant pour un
25 antigène vaccinal, d'origine virale ou bactérienne, ou
d'origine eucaryote, tel qu'un antigène fongique, ou un
antigène parasitaire ; l'antigène est par exemple une des
protéines E6, E7, ou L1 du virus du papillome humain (VPH)
de type 16, la protéine VapA de *Rhodococcus equi*, la
30 protéine L7/L12 de *Brucella abortus*, ou la protéine Nuc de
Staphylococcus aureus ;

- une séquence nucléotidique codant pour un
inhibiteur de protéase, par exemple l'élafine (ou trappine-
2), le SLPI (« *Secretory leukocyte protease inhibitor* »),
35 ou un des inhibiteurs de protéase à sérine (famille des
serpines) ;

- une séquence nucléotidique codant pour une hormone, par exemple la leptine, l'insuline, l'hormone de croissance, l'IGF-1 (« *Insulin-like growth factor* »), l'IGF-2, ou le facteur de croissance épidermique (EGF) ;

5 - une séquence nucléotidique codant pour une enzyme d'origine bactérienne ou eucaryote, par exemple une catalase, une superoxyde dismutase, une lipase, une polymérase, une isomérase, ou une ligase.

10 Une cassette d'expression conforme à l'invention peut, le cas échéant, comprendre en outre les éléments nécessaires pour permettre l'adressage de la protéine d'intérêt à la surface cellulaire, ou sa sécrétion dans le milieu extérieur.

15 Dans ce cadre, la cassette d'expression selon l'invention peut comprendre une séquence nucléotidique codant pour un peptide d'adressage extracellulaire placée sous contrôle transcriptionnel du promoteur PGroESL, ladite cassette d'expression permettant le clonage de la séquence nucléotidique hétérologue d'intérêt en fusion
20 traductionnelle avec ledit peptide d'adressage. Le peptide d'adressage peut être par exemple un peptide signal de sécrétion, un domaine transmembranaire, un signal d'ancrage à la paroi, etc.

25 De nombreux peptides d'adressage utilisables dans le cadre de la présente invention sont connus en eux mêmes. A titre d'exemples non limitatifs, on citera le peptide signal de la protéine Exp4 de *L. lactis*, défini par la séquence :

30 MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA (SEQ ID NO. : 5), ou les peptides identifiés respectivement dans les publications de Poquet et al. (*J. Bacteriol.*, 180, 1904-1912, 1998), de Le Loir et al. (*Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4119-4127, 2001), et de Ravn et al. (*Gene*, 242, 347-356, 2000).

35 L'invention concerne aussi un vecteur recombinant comprenant un insert constitué par une cassette

d'expression selon l'invention.

Des vecteurs recombinants conformes à l'invention peuvent être obtenus, de façon classique, par insertion d'une cassette d'expression conforme à l'invention dans un vecteur fonctionnel chez *L. lactis*.

De très nombreux vecteurs fonctionnels chez *L. lactis* sont connus en eux-mêmes. L'homme du métier choisira le vecteur le plus approprié (vecteur intégratif ou extra-chromosomique, vecteur à nombre de copies plus ou moins important) en fonction notamment de la nature de la protéine hétérologue à exprimer, et l'usage particulier à laquelle elle est destinée.

L'invention a également pour objet une bactérie de l'espèce *Lactococcus lactis*, transformée par au moins une cassette d'expression conforme à l'invention.

Le cas échéant, il peut s'agir d'une bactérie provenant d'une souche de *L. lactis* comportant une ou plusieurs modifications de son génome. Il peut s'agir par exemple de modifications visant à améliorer la production et/ou la sécrétion de protéines exprimées dans ladite bactérie, et/ou à éviter leur dégradation. Par exemple, dans le cadre de la production de protéines exportées, on peut utiliser une souche bactérienne dans laquelle l'activité protéasique PrtP et/ou le cas échéant l'activité protéasique HtrA et/ou ClpP sont inactives, telle que celle décrite dans la Demande PCT WO00/39309, ou une souche bactérienne surproduisant une protéine permettant de stabiliser les protéines exportées, telle que la protéine Nlp4 de *Lactococcus lactis*, ou un de ses homologues (Poquet et al. 1998, publication précitée), ou encore une souche bactérienne modifiée par ajout d'un gène hétérologue responsable de la sécrétion des protéines, tel que le gène *secDF* de *Bacillus subtilis* (Nouaille et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3) :2272-9, 2006).

On peut aussi utiliser une bactérie incluant un gène auxotrophique défectueux, afin de rendre la survie de

cette bactérie dépendante de la présence d'un ou plusieurs composés spécifiques. Le gène auxotrophique visé peut être le gène *thyA* (Demande PCT WO2011/086172), codant pour la thymidylate synthase, enzyme générant la thymidine monophosphate (dTMP) qui est ensuite phosphorylée en thymidine triphosphate, impliquée dans la synthèse et la réparation de l'ADN, ou le gène *alr*, codant pour l'alanine racémase (Bron et al., *Environ. Microbiol.*, 5663-5370, 2002). Le gène auxotrophique choisi pourra être inactivé par toute méthode connue, et par exemple, par insertion de la séquence nucléotidique hétérologue au niveau du locus de ce gène, dans le chromosome bactérien.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une bactérie transformée conforme à l'invention pour produire un polypeptide d'intérêt lorsque ladite bactérie est soumise à un choc thermique, résultant de son exposition à une température supérieure à sa température normale de croissance.

Dans ce cadre, les bactéries transformées conformes à l'invention peuvent le cas échéant être utilisées pour produire *in vitro* un polypeptide d'intérêt. De manière préférée, elles peuvent être utilisées notamment comme médicaments ou comme vaccins, en tant que vecteurs d'administration d'une protéine d'intérêt thérapeutique ou vaccinal.

En particulier la présente invention a pour objet un procédé pour faire produire un polypeptide d'intérêt par une bactérie transformée conforme à l'invention contenant une séquence codant pour ledit polypeptide d'intérêt placée sous contrôle transcriptionnel du promoteur PGroESL, caractérisé en ce que pour induire l'expression dudit polypeptide l'on expose ladite bactérie à une température supérieure à 36°C, et inférieure ou égale à 40°C. De préférence, ladite température sera égale ou supérieure à 36,5°C, et de manière tout à fait préférée égale ou supérieure à 37°C.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de ce procédé, ledit polypeptide est une protéine d'intérêt thérapeutique ou vaccinal, et l'exposition de ladite bactérie à la température permettant d'induire l'expression dudit polypeptide est effectuée en administrant ladite bactérie à un sujet, qui peut être de préférence un humain, ou le cas échéant un animal, notamment un mammifère, dont la température corporelle est supérieure à 37°C.

Les bactéries conformes à l'invention peuvent être administrées en particulier par voie mucosale, plus particulièrement par voies intra-nasale, orale, rectale, ou vaginale, et de préférence par voie intra-nasale ou par voie orale. Leur utilisation permet l'expression *in situ* de la protéine d'intérêt, au niveau des muqueuses concernées.

L'utilisation des bactéries transformées conformes à l'invention est particulièrement intéressante dans le cadre du traitement de maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), car elle permet de délivrer localement la protéine d'intérêt, directement dans l'intestin, lors du passage de la bactérie au niveau du duodénum, permettant ainsi une action très localisée de la protéine et donc une efficacité plus importante. Dans ce cadre, elles peuvent notamment être utilisées pour l'administration de cytokines anti-inflammatoires, comme l'interleukine-10.

A titre d'autres exemples non-limitatifs d'utilisation de bactéries transformées conformes à l'invention, on citera :

- la vaccination contre le cancer du col de l'utérus, par l'administration intranasale de l'antigène E7 du papillomavirus humain de type 16 ;

- une thérapie contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), par l'administration orale de molécules anti-inflammatoires telles que la cytokine IL-10 ou l'élafine ;

- une thérapie contre les allergies, par l'administration intranasale de molécules pro-inflammatoires telles que la cytokine IL-12 ou le TGF- β .

A titre indicatif, les bactéries transformées conformes à l'invention peuvent être administrées à une dose comprise entre 1.10^8 et 1.10^{10} UFC (Unités Formant Colonies), de préférence entre 5.10^8 et 1.10^{10} UFC, avantageusement entre 5.10^8 et 5.10^9 UFC pour une administration intranasale et entre 1.10^9 et 1.10^{10} UFC pour une administration orale. Par exemple, elles peuvent être administrées à une dose de 1.10^9 UFC par voie intranasale ou de 5.10^9 UFC par voie orale.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant la construction et l'utilisation de cassettes d'expression conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : CLONAGE DU PROMOTEUR GROESL ET CONSTRUCTION DU SYSTÈME D'EXPRESSION RÉGULÉ PAR LE STRESS.

Une région d'ADN en amont du gène GroESL a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de la souche de *Lactococcus lactis* MG1363.

Les amorces utilisées sont l'amorce sens *Bgl*III-ProGroEL de séquence CCAAGATCTAAATGTTTTCTCTTGACTAAATCTGACC (SEQ ID NO. : 6) et l'amorce antisens *Nhe*I-ProGroEL de séquence AGCTAGCGTTAATAAAGCAAGGTTTATTTTTTTCATATAC (SEQ ID NO. : 7). Ces amorces ont été conçues de façon à cloner, grâce aux sites de restriction *Bgl*III et *Nhe*I (soulignés), le produit de la PCR dans le vecteur pLB141 (Morello et al., 2008, précité). De plus, l'amorce antisens a été choisie de manière à introduire le produit de la PCR dans ce vecteur en phase de lecture avec la séquence codant pour les 12 premiers acides aminés du peptide signal PSExp4.

Le produit de la PCR a été digéré, purifié et cloné dans le vecteur intermédiaire pCR®2.1 (TOPO®, Invitrogen). La séquence du plasmide obtenu, pLB263

(pCR:TOPO:PGroESL) (Fig. 1A), a été confirmée par digestion enzymatique et par séquençage (Eurofins).

Le fragment amplifié, contenant le promoteur PGroESL, a la séquence suivante :

5 ATCTAAATGTTTTCTTCTTGACTAAATCTGACCATGAGATAAAATAAGAATATGTTAGC
ACTCAACTATTAAGAGTGCTAAAAATAAAAAATGGAGGAAAGTATA (SEQ ID
NO. : 8).

10 Le promoteur PGroESL a été isolé du plasmide pLB263, par digestion avec les enzymes *Bgl*II et *Nhe*I, et cloné dans le vecteur pLB141 (Fig. 1B), préalablement digéré avec les mêmes enzymes, en remplacement du promoteur (P_{hisA}) initialement présent dans ce vecteur.

15 Le plasmide résultant, pLB333 (pPGroESL:PSExp4:Nuc) (Fig. 1C), contient une cassette d'expression exprimant PSExp4 en fusion avec la forme mature d'une protéine sécrétée modèle, la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc), sous le contrôle du promoteur PGroESL.

20 Le plasmide pLB333 présente un site de restriction *Nsi*I, entre la séquence codant pour PSExp4 et le gène rapporteur *nuc* codant pour la nucléase Nuc, et un site de clonage multiple à la fin du gène *nuc* et avant le terminateur de transcription *trpA* (ter), pour permettre le remplacement de ce gène par un gène d'intérêt.

25 Ce plasmide a ensuite été introduit chez *L. lactis* MG1363 pour obtenir la souche recombinante MG(pLB333).

EXEMPLE 2 : EXPRESSION IN VITRO DE LA PROTEINE NUC.

30 L'expression du gène rapporteur *nuc* a été testée par Western Blot après avoir induit un choc thermique chez la souche recombinante MG(pLB333) obtenue à l'Exemple 1.

35 Pour cela, une pré-culture de nuit de la souche MG(pLB333) a été diluée au 1/100^{ème} le matin, jusqu'à une densité optique (DO) comprise entre 0,4 et 0,6. Ensuite, trois volumes de 6 ml de la pré-culture diluée ont été

versés dans trois tubes. En parallèle, trois tubes de 6 ml de milieu de culture GM17 contenant 10 µg/ml de chloramphénicol (Cm) ont été préparés et incubés respectivement à 30°C et 37°C. Les trois cultures ont
5 chacune été centrifugées 5 min à 4700 rpm, puis reprises dans les 6 ml de milieu frais GM17+Cm préalablement chauffé. Les tubes ainsi obtenus ont été incubés pendant 5 et 30 min à 30°C et 37°C.

Les tubes ont ensuite été centrifugés 10 min à
10 13000 rpm, et culot et surnageant ont été séparés. Le surnageant a été précipité au TCA 10% et repris dans du NaOH+bleu de charge (obtention de la fraction S). Le culot a été repris dans 150 µl de PBS+antiprotéase 1X, un volume de bille y a été ajouté, et le tout a été passé au système
15 FastPrep® afin de casser les bactéries et libérer les protéines cytoplasmiques (obtention de la fraction C). La production et la sécrétion de la protéine Nuc a été analysée par Western blot à l'aide d'anticorps anti-Nuc. Les résultats, illustrés à la Figure 2, démontrent qu'après
20 le choc thermique (5 min à 37°C), la souche MG(pLB333) est capable de produire très fortement la protéine Nuc.

EXEMPLE 3 : PRODUCTION IN VITRO D'INTERLEUKINE-10.

L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire précédemment proposée pour son
25 utilisation dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Le gène codant pour l'IL-10 murine a été inséré dans le vecteur pLB333 en remplacement du gène *nuc*. Le plasmide obtenu, pLB350 (pPGroESL:PSExp4:IL-10), a été
30 introduit chez *L. lactis* MG1363 pour obtenir la souche recombinante MG(pLB350).

Selon le même protocole que celui décrit dans l'Exemple 2, la production d'IL-10 a été confirmée par Western Blot après avoir induit un choc thermique chez la
35 souche recombinante MG(pLB350). Les résultats, illustrés à la Figure 3, démontrent qu'après le choc thermique, la

souche MG(pLB350) est capable de produire très fortement la protéine IL-10.

EXEMPLE 4 : PRODUCTION IN VITRO DE L'ANTIGÈNE E7 DU VPH DE TYPE 16.

5 Le papillomavirus humain de type 16 (VPH-16) est un des principaux virus responsables du cancer du col de l'utérus. L'utilisation de l'antigène E7 du VPH-16, protéine retrouvée systématiquement dans les carcinomes provoqués par une infection par un VPH, a déjà été proposée
10 comme vaccin, prophylactique ou thérapeutique, contre le cancer du col de l'utérus (Bermudez et al., *J. of Med. Microbiol.*, 53, 427-433, 2004).

 Le gène codant pour l'antigène E7 a été inséré dans le vecteur pLB333 en remplacement du gène *nuc*. Le
15 plasmide obtenu, pLB356 (pPGroEL:PSExp4:E7), a été introduit chez *L. lactis* MG1363 pour obtenir la souche recombinante MG(pLB356).

 Selon le même protocole que celui décrit dans l'Exemple 2, la production d'antigène E7 a été confirmée
20 par Western Blot après avoir induit un choc thermique chez la souche recombinante MG(pLB356). Les résultats, illustrés à la Figure 4, démontrent qu'après le choc thermique (30 min à 37°C), la souche MG(pLB350) est capable de produire très fortement et de sécréter efficacement la
25 protéine E7.

EXEMPLE 5 : UTILISATION DES BACTERIES RECOMBINANTES PRODUISANT L'ANTIGÈNE E7 POUR IMMUNISER DES SOURIS.

 L'effet de l'administration intranasale (i.n.) de la souche recombinante MG(pLB356) obtenue à l'Exemple 4
30 a été testé dans un modèle de souris développant des tumeurs cancéreuses induites par une lignée tumorale (TC-1) exprimant l'antigène E7 du VPH-16.

 Des groupes de 12 souris, de 6 à 8 semaines d'âge, ont été immunisés par voie i.n. avec du PBS, ou avec
35 la souche sauvage MG1363 (MG), ou avec la souche

recombinante MG(pLB356).

Pour cela, un total de 1.10^9 UFC (Unité formant colonies) de chaque souche a été resuspendu dans 10 μ L de PBS. Il a été déterminé que 1.10^9 UFC de bactéries
5 recombinantes contenaient environ 15 μ g d'antigène E7. 5 μ L de la suspension ainsi obtenue ont été administrés à l'aide d'une micropipette dans chaque narine des souris, aux jours 0, 14 et 28. Au jour 35, soit 7 jours après la dernière immunisation, la moitié de chaque lot de souris ($n=6$) a été
10 sacrifiée pour l'analyse de la réponse immunitaire, et on a administré à l'autre moitié ($n=6$), par injection sous-cutanée (s.c.), une lignée tumorale TC-1.

Le volume des tumeurs développées chez ces souris a été mesuré une fois par semaine pendant 5
15 semaines. Les résultats des mesures sont montrés à la Figure 5. Le volume des tumeurs chez les souris vaccinées avec la souche MG(pLB356) est inférieur de 1 cm^3 en moyenne à celui des tumeurs développées par les souris vaccinées avec la souche témoin MG ou avec du PBS, qui est
20 respectivement de 2,7 cm^3 et 2,9 cm^3 . Le volume des tumeurs est donc significativement réduit chez les souris vaccinées avec la souche recombinante MG(pLB356).

Par ailleurs, chez les souris vaccinées avec la souche MG(pLB356), il n'y a pas eu de mortalité (les 6
25 souris ont survécu), alors que les souris témoins (MG ou PBS) présentent une mortalité de 16% (5 souris sur 6 ont survécu dans chaque lot).

Pour l'analyse de la réponse immunitaire, des prélèvements sanguins ont été effectués au sinus rétro-orbital chez les souris avant leur sacrifice. A partir de
30 ces prélèvements, les sérums ont été récupérés après centrifugation, et stockés à -80°C jusqu'à analyse des anticorps IgG et IgA spécifiques de l'antigène E7 et de différentes cytokines.

35 Afin de pouvoir déterminer la production de cytokines caractéristiques d'une réponse immune de type Th1

et de déterminer leur activité cytotoxique *in vitro*, les splénocytes des souris sacrifiées ont également été isolés, puis cultivés et re-stimulés avec une protéine E7 marquée à l'aide d'une étiquette polyhistidine (« His-tag »), et
5 purifiée à partir d'*Escherichia coli*. Pour l'essai de cytotoxicité, les splénocytes re-stimulés ont été transférés sur une plaque de culture contenant des cellules TC-1 viables, et incubés pendant 5 jours.

La lyse des cellules TC-1 par les splénocytes a
10 ensuite été observée au microscope (Fig. 6, micrographies au grossissement x100). Après 5 jours de co-culture, les splénocytes des souris immunisées avec la souche MG(pLB356) ont clairement proliféré (Fig. 6C, flèches blanches), contrairement aux traitements témoins (Fig. 6A et 6B). Par
15 ailleurs, les cellules TC-1, qui ont formé une couche dense et bien adhérente en présence des splénocytes de souris témoins vaccinées avec du PBS (Fig. 6A) ou avec la souche témoin MG (Fig. 6B), ont presque complètement disparu en présence des splénocytes de souris vaccinées avec la souche
20 recombinante MG(pLB356) (Fig. 6C, cercles blancs), confirmant que les splénocytes de ces souris immunisées induisent une lyse très efficace des cellules tumorales TC-1 *in vitro*.

EXEMPLE 6 : UTILISATION DES BACTERIES RECOMBINANTES 25 PRODUISANT IL-10 POUR TRAITER DES SOURIS.

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont les deux formes principales de Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). L'inflammation observée dans la rectocolite hémorragique
30 atteint toujours le rectum et parfois le côlon. Elle ne touche en aucun cas d'autres segments du tractus digestif, alors que dans le cas de la maladie de Crohn, l'inflammation peut atteindre toutes les parties du tractus digestif (depuis la bouche jusqu'à l'anus), mais se situe
35 préférentiellement sur la partie terminale de l'intestin grêle (iléon) et sur le côlon.

L'utilisation de probiotiques pour le traitement de ces maladies inflammatoires est suggéré depuis plusieurs années et différentes études ont montré l'effet bénéfique de tels produits bactériens testés seuls ou en combinaison. Ces résultats ont suggéré que les bactéries probiotiques pourraient être utilisées comme porteurs d'un gène bénéfique dans l'intestin, en plus de leurs pouvoirs propres et intrinsèques comme agent anti-inflammatoire. Cette stratégie a été utilisée pour exprimer l'IL-10 dans des bactéries *L. lactis* sous contrôle du promoteur P1 (Steidler et al., 2000, précité). Des essais cliniques de phase I conduits avec ces bactéries recombinantes ont montré que leur administration n'occasionne pas d'effet délétère chez les patients mais ne permet d'obtenir qu'un effet protecteur de courte durée.

La souche recombinante MG(pLB350) a montré un rôle protecteur dans deux modèles différents de souris, dans lesquels une colite aiguë était engendrée par du DSS (*Dextran sulfate sodium*) (modèle utilisé par Steidler et al., 2000, précité) ou par de l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (modèle utilisé par Foligne et al., *Gastroenterology*, 133(3):862-74, 2007) (résultats non montrés). Dans le présent exemple, la souche recombinante MG(pLB350) est testée dans un modèle de colite chronique.

Le modèle utilisé reproduit les périodes de récupération et de récurrence observées chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Pour ce faire, la colite a été induite chez la souris par l'injection intrarectale d'acide 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS). Des souris mâles C57BL/6 âgées de 6 à 8 semaines, réparties en 4 groupes de 8 souris, ont d'abord reçu (J1 à 3) une première dose de 2 mg de DNBS (Groupes 1 à 3) ou de l'éthanol (Groupe 4) à titre de contrôle. Une période de récupération a suivi, entre J4 et J14. Puis, entre J14 et J23, on leur a administré quotidiennement par voie orale 5.10^9 UFC de bactéries recombinantes MG(pLB350) (Groupe 1), de la

dexaméthasone (Groupe 2), ou du PBS (Groupes 3 et 4). La dexaméthasone est une hormone glucocorticoïde utilisée notamment pour traiter diverses maladies inflammatoires telles que les MICI. Un second épisode d'inflammation a été
5 induit à J21 par administration d'1 mg de DNBS. Les souris ont été sacrifiées à J24.

L'inflammation a été évaluée selon les critères de Wallace, et le score de Wallace (note de 0 à 10 selon les lésions macroscopiques du côlon) a été attribué à
10 chaque souris.

Les résultats obtenus (Figure 7) démontrent l'effet protecteur de la souche MG(pLB350) après la réactivation de la colite par la seconde administration de DNBS (DNBS+IL10). Cet effet est supérieur à celui observé
15 après traitement avec la dexaméthasone (DNBS+DEX).

REVENDICATIONS

- 1) Cassette d'expression comprenant :
- le promoteur (PGroESL) de l'opéron GroESL de
5 *Lactococcus lactis*, et
 - une séquence nucléotidique hétérologue codant pour un polypeptide d'intérêt, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.
- 2) Cassette d'expression selon la revendication
10 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une séquence nucléotidique codant pour un peptide d'adressage extracellulaire, sous contrôle transcriptionnel du promoteur, ladite cassette d'expression permettant le clonage de la séquence nucléotidique hétérologue en fusion
15 traductionnelle avec ledit peptide d'adressage.
- 3) Cassette d'expression selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit peptide d'adressage extracellulaire est le peptide signal de la protéine Exp4 de *Lactococcus lactis*, et a la séquence suivante :
20 MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA (SEQ ID NO. : 5).
- 4) Vecteur recombinant comprenant un insert constitué par une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Bactérie lactique du genre *Lactococcus*,
25 transformée par une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 6) Bactérie selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie de l'espèce *Lactococcus lactis*.
- 30 7) Bactérie selon la revendication 5 ou 6, pour son utilisation comme médicament ou comme vaccin, comme vecteur d'administration d'une protéine thérapeutique ou vaccinale d'intérêt.

8) Bactérie selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est administrée par voie mucosale, de préférence par voie intra-nasale ou par voie orale.

5 9) Bactérie selon la revendication 7 ou 8, pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, dans laquelle la séquence nucléotidique hétérologue code pour l'interleukine-10.

10 10) Bactérie selon la revendication 7 ou 8, pour son utilisation comme vaccin contre le cancer du col de l'utérus, dans laquelle la séquence nucléotidique hétérologue code pour l'antigène E7 du papillomavirus humain (VPH) de type 16.

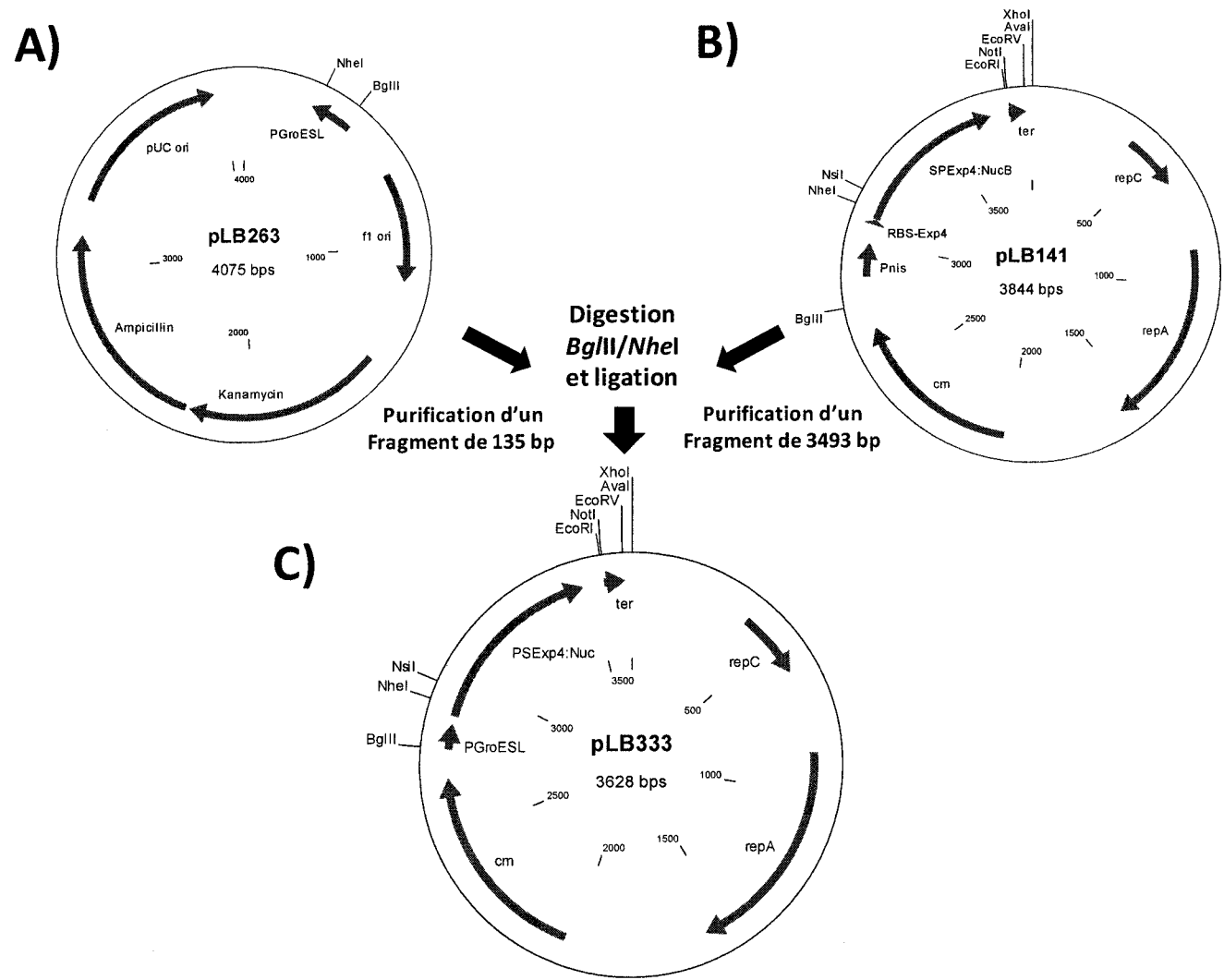


Figure 1

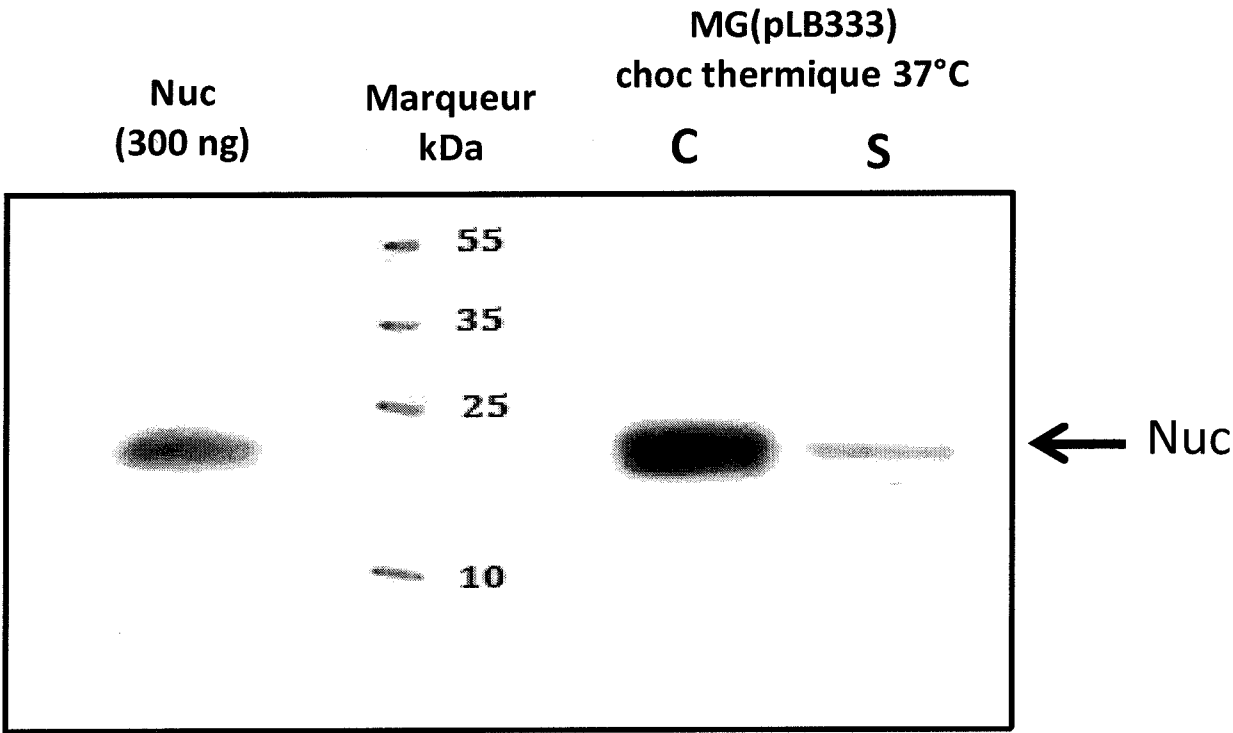


Figure 2

3/5

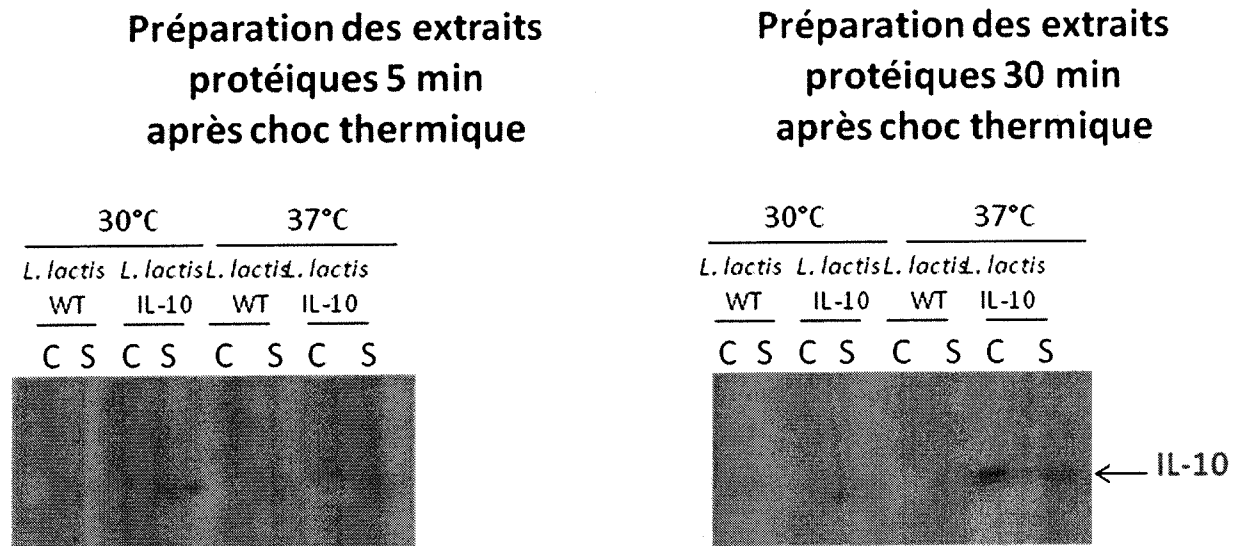


Figure 3

Préparation des extraits protéiques 30 min après choc thermique

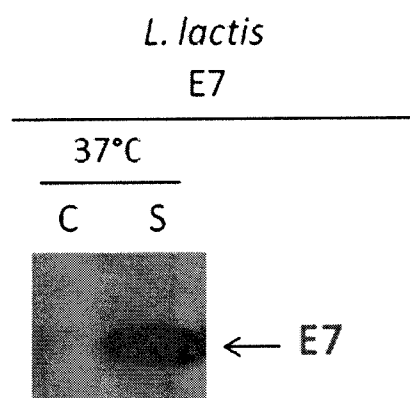


Figure 4

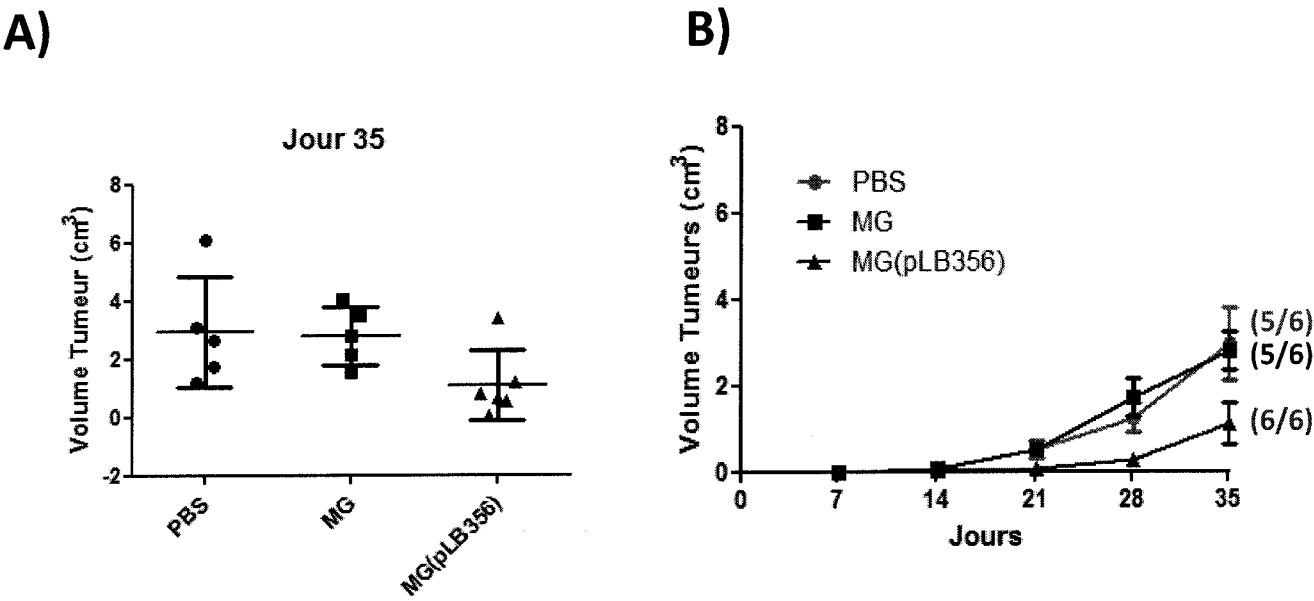


Figure 5

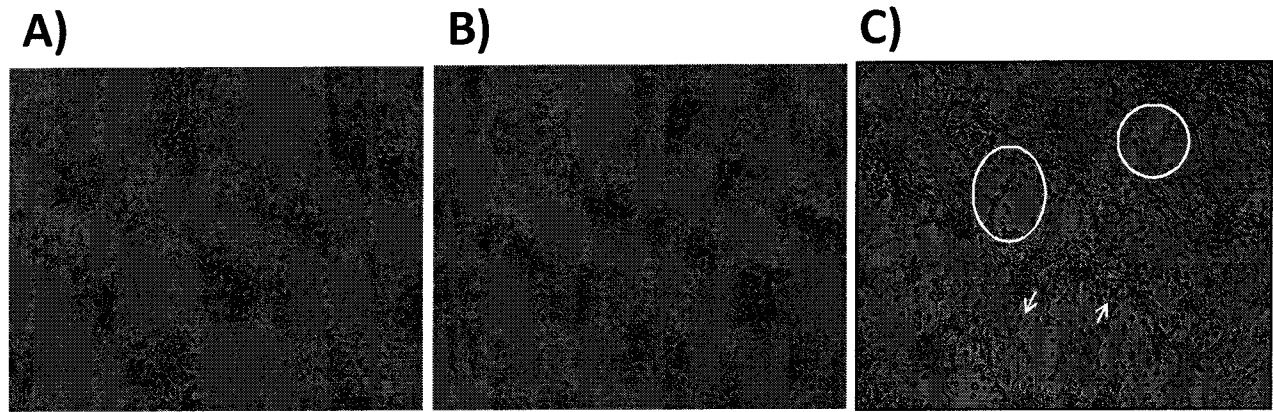


Figure 6

5/5

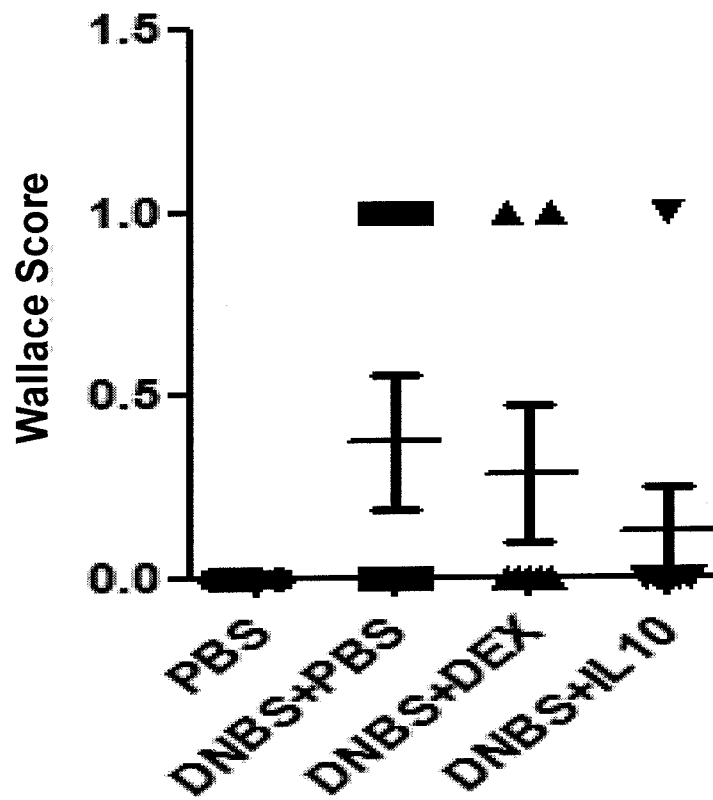


Figure 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/053983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/09 C12N15/74
ADD.

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 A61K

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/084115 A2 (ACTOGENIX N V [BE]; STEIDLER LOTHAR [BE]; VANDENBROUCKE KLAAS [BE]; NE) 17 July 2008 (2008-07-17)	1,2,4-9
Y	sentence 1 - sentence 2 page 5, line 8 sentence 23 - sentence 27 page 29, line 19 - page 30, line 5 page 36, line 6 - line 10 page 39, line 13 - line 14 claim 2 (51) ----- -/-	3,10

☒ 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

9 September 2013

Date of mailing of the international search report

16/09/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Surdej, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/053983

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MORELLO E ET AL: "Lactococcus lactis, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion.", JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 2008 LNKD- PUBMED:17957110, vol. 14, no. 1-3, 2008, pages 48-58, XP002682709, ISSN: 1464-1801 page 49, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 2 page 54, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column -----	3
Y	BAHEY-EL-DIN MOHAMMED ET AL: "Lactococcus lactis as a Cell Factory for Delivery of Therapeutic Proteins", CURRENT GENE THERAPY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 10, no. 1, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 34-45, XP009153380, ISSN: 1566-5232, DOI: 10.2174/156652310790945557 page 34, left-hand column, paragraph 2 - page 37, left-hand column, paragraph 1 page 38, right-hand column, paragraph 3 - page 40, left-hand column, paragraph 1 -----	10
A	KIM S G ET AL: "Cloning and sequencing of the Lactococcus lactis subsp. lactis groESL operon", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 127, no. 1, 15 May 1993 (1993-05-15), pages 121-126, XP023539742, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(93)90626-E [retrieved on 1993-05-15] abstract page 125, left-hand column, paragraph 2 - page 126, left-hand column, paragraph 1 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2013/053983

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008084115 A2	17-07-2008	AU 2008204442 A1	17-07-2008
		CA 2675115 A1	17-07-2008
		EP 2115146 A2	11-11-2009
		JP 2010515445 A	13-05-2010
		RU 2009130728 A	20-02-2011
		US 2010080774 A1	01-04-2010
		WO 2008084115 A2	17-07-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/IB2013/053983

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K39/09 C12N15/74
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2008/084115 A2 (ACTOGENIX N V [BE]; STEIDLER LOTHAR [BE]; VANDENBROUCKE KLAAS [BE]; NE) 17 juillet 2008 (2008-07-17)	1,2,4-9
Y	phrase 1 - phrase 2 page 5, ligne 8 phrase 23 - phrase 27 page 29, ligne 19 - page 30, ligne 5 page 36, ligne 6 - ligne 10 page 39, ligne 13 - ligne 14 revendication 2 (51) ----- -/-	3,10

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 septembre 2013

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/09/2013

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Surdej, Patrick

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2013/053983

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MORELLO E ET AL: "Lactococcus lactis, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion.", JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY 2008 LNKD- PUBMED:17957110, vol. 14, no. 1-3, 2008, pages 48-58, XP002682709, ISSN: 1464-1801 page 49, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 2 page 54, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite -----	3
Y	BAHEY-EL-DIN MOHAMMED ET AL: "Lactococcus lactis as a Cell Factory for Delivery of Therapeutic Proteins", CURRENT GENE THERAPY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 10, no. 1, 1 février 2010 (2010-02-01), pages 34-45, XP009153380, ISSN: 1566-5232, DOI: 10.2174/156652310790945557 page 34, colonne de gauche, alinéa 2 - page 37, colonne de gauche, alinéa 1 page 38, colonne de droite, alinéa 3 - page 40, colonne de gauche, alinéa 1 -----	10
A	KIM S G ET AL: "Cloning and sequencing of the Lactococcus lactis subsp. lactis groESL operon", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 127, no. 1, 15 mai 1993 (1993-05-15), pages 121-126, XP023539742, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(93)90626-E [extrait le 1993-05-15] abrégé page 125, colonne de gauche, alinéa 2 - page 126, colonne de gauche, alinéa 1 -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2013/053983

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008084115 A2	17-07-2008	AU 2008204442 A1	17-07-2008
		CA 2675115 A1	17-07-2008
		EP 2115146 A2	11-11-2009
		JP 2010515445 A	13-05-2010
		RU 2009130728 A	20-02-2011
		US 2010080774 A1	01-04-2010
		WO 2008084115 A2	17-07-2008
