

(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
15 janvier 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/005334 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/435

[FR/FR]; 6, rue Isaac Albeniz, F-91440 Bures-Sur-Yvette (FR). FAYE, Loïc [FR/FR]; 3056, rue des Canadiens, Bois d' Ennebourg, F-76160 Saint-Jacques-Sur-Darnetal (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002085

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Bresseé-Majerowicz, 3 avenue de l' Opera, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2003 (04.07.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/08485

5 juillet 2002 (05.07.2002) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : STALLERGENES SA [FR/FR]; 6, rue Alexis de Tocqueville, F-92183 Antony Cedex (FR). SOCIETE NATIONAL D'EXPLOITATION INDUSTRIELLE DE TABACS ET ALLUMETTES - SEITA [FR/FR]; 182-188 avenue de France, F-75639 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GOMORD, Véronique [FR/FR]; Parc Vivaldi, 61, rue Chasselièvre, F-76000 Rouen (FR). LIENARD, David [FR/FR]; 90 avenue de la Porte des Champs, F-76000 Rouen (FR). VAN REE, Ronald [NL/NL]; John Coltranstraat 19, NL-1066 GN Amsterdam (NL). VAN OORT, Erica [NL/NL]; Antonio Morohof 11, NL-3451 JR Vleuten (NL). DORLHAC DE BORNE, François [FR/FR]; Le Monteil, F-24680 Lamonzie-Saint-Martin (FR). DIDIER LAURENT, Alain

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING AN ALLERGEN PREPROTEIN OF A MITE OF GENUS DERMATOPHAGOIDES OR EUROGLYPHUS AND USE THEREOF FOR PROTECTING SAID ALLERGEN IN PLANTS

(54) Titre : MOLECULE D'ACIDE NUCLEIQUE CODANT UNE PREPROPROTEINE D'ALLERGENE D'UN ACARIEN DU GENRE DERMATOPHAGOIDES OU EUROGLYPHUS ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION DUDIT ALLERGENE DANS LES PLANTES

(57) Abstract: The invention concerns a purified nucleic acid molecule comprising or consisting of a polynucleotide sequence coding for (i) the mature form of a protein allergen of a mite of genus Dermatophagoides and (ii) a propeptide located at the N-terminal end of said protein allergen. Said nucleotide sequence also codes for (iii) a signal peptide located at the N-terminal end of said propeptide. The invention also concerns the use of said nucleic acid molecule for preparing recombinant allergens. The invention further concerns the method for obtaining said allergen.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à une molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence polynucléotidique codant pour (i) la forme mature d'un allergène protéique d'un acarien du genre Dermatophagoides et (ii) un propeptide placé à l'extrémité N-terminale dudit allergène protéique. Ladite séquence nucléotidique code aussi pour (iii) un peptide signal placé à l'extrémité N-terminale dudit propeptide. L'invention concerne aussi l'utilisation de cette molécule d'acide nucléique pour la préparation d'allergènes recombinants. La présente invention concerne également le procédé d'obtention dudit allergène.

WO 2004/005334 A2

MOLECULE D'ACIDE NUCLEIQUE CODANT UNE PREPROPROTEINE D'ALLERGENE D'UN ACARIEN DU GENRE DERMATOPHAGOIDES OU EUROGLYPHUS ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION DUDIT ALLERGENE DANS LES PLANTES.

5

La présente invention concerne la production d'allergènes d'acariens de la poussière domestique du genre Dermatophagoides ou Euroglyphus dans des cellules végétales. L'invention concerne aussi des plantes transgéniques ou
10 partie de ces plantes et plus particulièrement des cellules végétales transformées exprimant un tel allergène recombinant. L'invention se rapporte tout particulièrement à des méthodes de diagnostic et de traitement des allergies provoquées par de tels allergènes et aux compositions pour
15 leur mise en œuvre.

Les allergènes sont des protéines provenant de matière diverse, par exemple du pollen ou d'acariens, qui constituent la cause majeure d'allergies dans les climats
20 tempérés. Certains individus prédisposés génétiquement deviennent hypersensibles (allergiques) à des antigènes provenant de sources environnementales très variées. Les antigènes capables d'induire une réaction d'hypersensibilisation immédiate ou retardée sont appelés
25 allergènes. Les allergènes peuvent notamment avoir pour origine des arbres, des plantes herbacées, des insectes, des mammifères, de la nourriture, des médicaments ou des produits chimiques. Les allergènes sont classés en groupes de I à V selon leurs propriétés immunochimiques.

30 La présente invention s'intéresse aux allergènes de *Dermatophagoides farinae*, de *Dermatophagoides pteronyssinus* ou de *Euroglyphus maynei*, respectivement aussi désigné Der p, Der f ou Eur m, et plus particulièrement aux allergènes d'acariens choisis dans le groupe I. L'allergène Der p1 est
35 l'un des allergènes majeurs accumulés dans les excréments

d'acariens (*Dermatophagoïdes sp*). La protéine Der p1 a une masse moléculaire de 28 kDa et présente une activité cystéine protéase.

Les anticorps impliqués dans l'allergie
5 appartiennent à la classe des immunoglobulines de type IgE. En présence d'un allergène, les IgE se lient aux mastocytes et aux basophiles, ce qui conduit au relargage par ces cellules de différents médiateurs chimiques et à la manifestation de l'allergie. Celle-ci peut prendre
10 différentes formes, comme par exemple un choc anaphylactique, de l'asthme, une rhinite ou une dermatite atopique.

Lorsque le diagnostic de l'allergie à un composé particulier a été établi, la désensibilisation du patient
15 vis-à-vis de l'allergène en cause est l'approche thérapeutique la plus fréquente, notamment lorsque la présence de l'allergène ne peut être évitée comme dans le cas du pollen et des acariens. Ce type de traitement a prouvé son efficacité, mais il nécessite de disposer d'un
20 produit efficace et sûr. En effet, le traitement présente un risque de choc anaphylactique, de plus le produit administré doit être dépourvu de toute impureté qui pourrait constituer un autre allergène potentiel. Or, aujourd'hui, on ne sait utiliser que des mélanges complexes d'allergènes et pas de
25 produit pur. Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'allergènes sous une forme structurale la plus proche possible de l'allergène natif et présentant le plus grand degré de pureté possible.

L'un des moyens possibles pour atteindre ce but est
30 la production d'allergènes recombinants dans un organisme hôte (Laffer, S. et al., J. Allergy Clin. Immunol., Septembre 1996, volume 98, no. 3, pages 652-658).

Ainsi, il a été proposé dans l'art antérieur d'exprimer des gènes codant ces protéines d'allergènes dans
35 *E. coli*. Ce système d'expression présente l'inconvénient de

ne pas assurer les modifications post-traductionnelles des protéines qui peuvent être réalisées dans les cellules eucaryotes. Par exemple, les protéines produites ne sont pas glycosylées, or la glycosylation de certaines protéines allergènes peut être importante pour leur capacité de fixation aux IgE (Petersen, A. et al., Clinical and Experimental Allergy, 1998, volume 28, pages 315-321 ; Van Ree et al., J. Biol. Chem., 2000, volume 275, pages 11451-11458).

Il a également été proposé d'exprimer des protéines actives dans les plantes. A cet égard on peut citer la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO 00/20612 qui décrit de façon générale des plantes transgéniques exprimant des protéines actives et envisage parmi celles-ci des allergènes.

Or, les travaux de recherche réalisés par les inventeurs dans le cadre de l'invention ont mis en évidence que les protéines d'allergènes du groupe I des acariens genre Dermatophagoides sont des protéines complexes dont le clonage et l'expression dans les plantes nécessitent des travaux de mise au point et de sélection importants pour obtenir un polypeptide présentant effectivement l'antigénicité de l'allergène natif.

On a décrit dans l'art antérieur, par exemple dans les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les No. WO 88/10297 et WO 92/04445, le clonage et l'expression d'ADN recombinants codant pour un polypeptide d'allergène des acariens du genre Dermatophagoides.

L'ADNc codant Der p1 n'étant pas disponible, son clonage a été réalisé pour obtenir l'ADNc codant pour la protéine mature. Une première expérience d'expression a échoué. En effet, il n'y a pas eu expression de l'allergène sous forme recombinante à partir de cellules de tabac transformées avec l'ADNc codant la protéine mature. Une

nouvelle expérience de clonage a permis d'obtenir un ADNc de 960 bp codant la préproprotéine.

L'utilisation de l'ADNc codant la préproprotéine pour la transformation de cellules de tabac a permis la
5 production de l'allergène Der p1 sous forme recombinante.

Les ADNc codant les allergènes ont été sous-clonés dans des vecteurs d'expression compatibles avec le système végétal. Ces vecteurs ont été utilisés pour la transformation de cellules de tabac cultivées en suspension
10 et pour une production dans des plantes de tabac.

Les vecteurs d'expression construits au cours de ces travaux contiennent le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et la séquence de terminaison de la nopaline synthase (*nos*) encadrant la séquence d'ADNc codant chaque
15 allergène natif. Leur transfert dans des cellules de tabac BY2 a été réalisé à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. A l'issue de cette transformation des cals transgéniques exprimant l' allergène recombinant ont été sélectionnés par résistance sur un milieu nutritif contenant
20 l'antibiotique kanamycine. Les cals résistants exprimant l'allergène recombinant ont été criblés par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine Der p1. Enfin, trois cals exprimant fortement Der p1 recombinant ont été sélectionnés pour initier une culture en suspension de
25 cellules transgéniques de tabac.

La localisation de l'allergène recombinant a été ensuite étudiée par fractionnement cellulaire. La localisation extracellulaire de Der p1, a été mise en évidence. Cet allergène est accumulé dans les fractions
30 correspondant au milieu de culture des suspensions cellulaires mais également dans la fraction correspondant aux protéines ioniquement liées à la paroi des cellules végétales.

Ces travaux ont permis de montrer que la protéine
35 Der p1 d'acarien est une protéine synthétisée sous forme de

préproprotéine. La protéine mature Der p1 a une masse moléculaire de 28 kDa et présente un site de N-glycosylation potentiel ; toutefois les données de la littérature concernant la glycosylation de cette protéine chez les
5 acariens sont contradictoires (Chua et al., 1988, J. Exp. Med, volume 167, pages 175-182 ; - Thomas et al., 1988, Int. Archs. Allergy Appl. Immun., volume 85, pages 127-129).

L'analyse de l'allergène recombinant par SDS-PAGE et immunodétection après transfert sur membrane de
10 nitrocellulose a révélé 4 polypeptides immunoréactifs avec des anticorps spécifiques de Der p1 d'acarien. L'un de ces polypeptides immunodétectés présente une migration électrophorétique proche de la protéine d'acarien et correspond à la protéine Der p1 mature et glycosylée. Les 3
15 autres polypeptides présentent une migration électrophorétique plus faible et correspondent à des étapes intermédiaires de maturation de la protéine.

L'allergène est synthétisé sous forme d'une préproprotéine présentant à son extrémité N-terminale un
20 peptide signal de 18 a.a. et un propeptide de 80 a.a. Le peptide signal et le propeptide sont clivés au cours de la maturation co- et post-traductionnelle de la protéine dans la cellule d'acarien pour donner une protéine mature de 222 a.a. Ainsi, le peptide signal permet d'introduire la
25 protéine en cours de synthèse dans la lumière du reticulum endoplasmique. Le rôle du propeptide N-terminal n'a pas encore été identifié, mais la présente invention a mis en évidence son rôle décisif pour l'expression et la stabilité de l'allergène.

30 Ces travaux montrent la complexité des protéines d'acariens qui sont synthétisées sous forme de préproprotéines et subissent une glycosylation. Ainsi, le propeptide N-terminal constitué de 80 a.a. est indispensable pour exprimer la protéine Der p1 dans un système eucaryote
35 tel que la cellule végétale ou la levure.

En outre, les cellules végétales transformées par l'ADNc codant pour la préproprotéine constituent à ce jour le seul système d'expression hétérologue permettant la production de l'allergène sous sa forme mature.

5

En conséquence, l'invention a pour objet une molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence polynucléotidique codant pour (i) la forme mature d'un allergène protéique d'un acarien du genre Dermatophagoides ou Euroglyphus et (ii) un propeptide placé à l'extrémité N-terminale dudit allergène protéique

Avantageusement, ladite séquence nucléotidique code aussi pour (iii) un peptide signal placé à l'extrémité N-terminale dudit propeptide.

15

L'acarien est choisi dans le groupe comprenant : *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* et *Euroglyphus maynei*.

20

L'invention se rapporte tout particulièrement à la mise en œuvre d'un allergène protéique mature d'acariens du genre Dermatophagoides choisi dans le groupe comprenant : Der p1 (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Der f1 (*Dermatophagoides farinae*) et Eur m1 (*Euroglyphus maynei*).

25

L'invention a tout spécialement pour objet la forme mature des allergènes protéiques suivants :

- Der p1, dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.2 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.1,

30

- Der f1, dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.4 qui est codée par la séquence nucléotidique

représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.3,

- Eur m1, dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.6 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.5,

Le propeptide placé à l'extrémité N-terminale dudit allergène protéique est choisi dans le groupe comprenant les propres propeptides des allergènes ci-dessus :

- pour Der p1 : la séquence en acides aminés du propeptide est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.8 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.7.

- pour Der f1 : la séquence en acides aminés du propeptide est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.10 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.9.

- pour Eur m1 : la séquence en acides aminés du propeptide est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.12 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.11.

Selon une forme de réalisation préférée, on préfère associer à chaque allergène mature son propre propeptide.

Le peptide signal placé à l'extrémité N-terminale dudit propeptide peut être tout peptide signal responsable de l'introduction de proforme dans la lumière du réticulum endoplasmique des cellules. Plus particulièrement, ledit peptide signal est choisi dans le groupe comprenant les propres peptides signaux des allergènes ci-dessus :

- pour Der p1 : la séquence en acides aminés du peptide signal est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.14 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en
5 annexe sous le SEQ ID NO.13.

- pour Der f1 : la séquence en acides aminés du peptide signal est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.16 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en
10 annexe sous le SEQ ID NO.15

- pour Eur m1 : la séquence en acides aminés du peptide signal est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.18 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en
15 annexe sous le SEQ ID NO.17.

Selon une forme de réalisation préférée, on préfère associée à chaque allergène mature son propre peptide signal.

20 Un exemple spécifique de séquence polynucléotidique selon l'invention codant pour (i) la forme mature d'un allergène protéique d'un acarien du genre Dermatophagoides, (ii) un propeptide placé à l'extrémité N-terminale dudit allergène protéique, et (iii) un peptide signal placé à
25 l'extrémité N-terminale dudit propeptide, est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO.19 (Figure 2). La séquence en acides aminés correspondant codée par cette séquence polynucléotidique est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID
30 NO.20.

L'invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique recombinant comprenant une molécule d'acide nucléique définie précédemment, un promoteur lié de manière
35 fonctionnelle à ladite molécule d'acide nucléique,

éventuellement un gène de sélection placé sous le contrôle de son propre promoteur ou du même promoteur que ladite molécule d'acide nucléique, et avantageusement une séquence de terminaison placée en aval de ladite molécule d'acide
5 nucléique.

A titre d'exemple de promoteurs, on peut citer ceux choisis dans le groupe comprenant :

- les promoteurs compatibles du système d'expression,
- les promoteurs constitutifs,
- 10 -les promoteurs spécifiques pour diriger l'expression dans un organe,
- les promoteurs spécifiques du développement de la plante,
- les promoteurs inductibles par le stress, par
15 exemple mécanique, thermique, sucre, chimique.

A titre d'exemple de gènes de sélection, on peut citer ceux choisis dans le groupe comprenant ceux conférant une résistance à un antibiotique comme la kanamycine, la
20 ripamycine, etc.

A titre d'exemple de séquences de terminaison, on peut citer toutes celles compatibles avec le système d'expression.

Une molécule d'acide nucléique recombinant selon
25 l'invention peut être un vecteur. L'invention se rapporte donc à un vecteur d'expression comprenant une origine de réplication eucaryote, une séquence promotrice adaptée, un marqueur de sélection et une molécule d'acide nucléique comme définie précédemment placée sous le contrôle desdites
30 séquences de régulation.

L'invention concerne encore un hôte eucaryote d'origine végétale transformé par une molécule d'acide nucléique définie ci-dessus. A titre d'exemple d'un tel hôte
35 eucaryote selon l'invention, on peut citer une cellule ou

une suspension de cellules de plante dans le génome de laquelle est incorporée, avantageusement de façon stable, une molécule d'acide nucléique définie précédemment sous le contrôle de séquence de régulation de manière à exprimer
5 l'allergène dans la cellule ou suspension de cellules.

A titre d'exemple d'un tel hôte eucaryote selon l'invention, on peut aussi citer une plante ayant incorporé, avantageusement de façon stable, dans son génome une molécule d'acide nucléique définie précédemment sous le
10 contrôle de séquence de régulation de manière à exprimer l'allergène dans une partie déterminée de ladite plante.

Par conséquent, l'hôte eucaryote objet de la présente invention est avantageusement choisi parmi une plante, une cellule ou une suspension de cellules de
15 plantes.

L'invention envisage comme plantes tant les dicotylédones que les monocotylédones. L'invention envisage tout particulièrement comme monocotylédones, le maïs, les céréales graminées et le riz. L'invention envisage tout
20 particulièrement comme dicotylédones, le tabac, la tomate, le colza, la pomme de terre, les légumineuses, comme le soja et la luzerne.

L'invention se rapporte donc aussi à un procédé d'obtention d'un allergène protéique d'un acarien du genre
25 Dermatophagoides ou Euroglyphus recombinant, comprenant la culture d'un organisme eucaryote, transformé par une molécule d'acide nucléique définie précédemment dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre l'expression de ladite protéine, puis l'isolement des
30 protéines produites à partir de la culture des organismes transformés. L'organisme eucaryote avantageusement utilisé dans le cadre du procédé d'obtention d'un allergène protéique d'un acarien du genre Dermatophagoides ou Euroglyphus recombinant objet de la présente invention est

choisi parmi une plante, une cellule ou une suspension de cellules de plante.

Plus particulièrement, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

- 5 (i) la transformation de cellules végétales avec une molécule d'acide nucléique définie précédemment liée de manière opérationnelle à un promoteur,
- (ii) la culture desdites cellules transformées,
- (iii) l'isolement de l'allergène exprimé dans
- 10 lesdites cellules.

Le procédé de l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'utiliser des cellules végétales qui ont la capacité de synthétiser et de maturer correctement des allergènes biologiquement actifs et parfaitement conformes

15 pour leurs caractéristiques physicochimiques.

Le procédé de l'invention admet plusieurs modes de réalisation comprenant ou non à l'étape (ii) la régénération de plantes ou partie de plantes génétiquement transformées pour exprimer un allergène.

20 Un mode préféré de production d'allergènes recombinants selon l'invention consiste à l'étape (i) à transformer des cellules végétales issues de suspensions cellulaires, et à l'étape (ii) à sélectionner les cals transformés, puis à initier des suspensions cellulaires à

25 partir desdits cals transformés et cultiver ces suspensions, et à l'étape (iii) à purifier l'allergène à partir d'extraits protéiques issus des suspensions cellulaires transgéniques, en particulier du milieu de culture.

Dans ce mode de réalisation, l'allergène recombinant

30 est isolé à l'étape (iii) par purification à partir d'extraits protéiques issus de suspensions cellulaires transgéniques dans des conditions non dénaturantes via un procédé de purification pouvant être une chromatographie d'affinité sur une colonne de métal chélaté et/ou une

35 chromatographie de tamisage moléculaire.

Plus particulièrement, ce procédé permet d'obtenir à partir de cellules de plantes cultivées en suspension, donc dans un environnement confiné, des allergènes recombinants utiles dans des applications de diagnostic ou thérapeutiques.

Un autre mode de production d'allergènes recombinants selon l'invention consiste à l'étape (i) à régénérer sur un milieu de sélection, à partir desdites
10 cellules, des plantes ou parties de plantes génétiquement transformées pour exprimer un allergène, puis éventuellement à obtenir de semences par autofécondation de la plante régénérée, et enfin facultativement, à produire des plantes à partir des semences. L'allergène recombinant est alors
15 obtenu à l'étape (iii) à partir de cellules végétales cultivées en suspension ou partie de plantes par extraction puis purification.

La sélection des cellules, tissus ou parties de plantes transformées par la molécule d'ADN comprenant une
20 séquence codant un allergène hétérologue est avantageusement réalisée, à l'étape (ii) grâce à la présence dans ladite molécule d'ADN d'un gène exprimant une résistance à un agent de sélection présent dans le milieu de culture. De tels gènes sont bien connus de l'homme du métier, il s'agit
25 notamment de ceux conférant une résistance à un antibiotique comme la kanamycine, la ripamycine, etc....

La transformation des cellules à l'étape (i) du procédé de l'invention peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier :

30 - directement par électroporation ou bombardement de microparticules avec la molécule d'ADN formant un vecteur d'expression, ou

- indirectement à l'aide d'un micro-organisme apte à transformer les cellules de plantes, lui-même préalablement

transformé par ledit vecteur d'expression, comme, par exemple, *Agrobacterium tumefaciens*.

5 L'invention a pour objet un allergène protéique d'un acarien du genre Dermatophagoides ou Euroglyphus recombinant obtenu par le procédé ci-dessus. Un tel allergène protéique est une molécule active dont la maturation est proche de l'allergène natif. Il présente une glycosylation avec un glycanne de petite taille, le poids moléculaire observé est
10 donc très proche de l'allergène natif.

L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique pour le traitement ou le diagnostic d'une allergie aux acariens du genre Dermatophagoides, comprenant
15 comme principe actif une quantité efficace d'une protéine ci-dessus ou d'un anticorps dirigé contre cette protéine.

L'invention se rapporte à un procédé de détection de la sensibilité manifestée par un individu aux acariens du genre Dermatophagoides comprenant la mise en contact,
20 avantageusement *in vitro*, d'un échantillon provenant d'un individu avec une protéine définie ci-dessus ou un anticorps dirigé contre cette protéine, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, puis la détection dudit complexe.

25 L'invention a enfin pour objet un réactif de diagnostic d'une allergie aux acariens du genre Dermatophagoides ou Euroglyphus comprenant une protéine définie ci-dessus ou un anticorps dirigé contre cette protéine.

30

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant le clonage et l'expression dans des plantes ou cellules de plantes d'une molécule d'acide nucléique selon l'invention
35 codant une préproprotéine de l'allergène Der p1. Il sera

fait référence dans ce qui suit aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 est une représentation schématique de l'ADNc selon l'invention codant une préproprotéine de l'allergène Der p1.

- La figure 2 est la séquence de l'ADNc et de la préproprotéine Der p1 clonée au cours de l'invention.

- La figure 3 représente les alignements des ADNc codant pour la préproprotéine et pour la protéine mature.

- La figure 4 représente la recherche de similitude avec l'allergène Der p1 dans les banques de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

- La figure 5 est une représentation schématique des ADNc codant la préproprotéine (A) ou l'ADNC mature de Der p1 (B).

- La figure 6 représente l'immunodétection de la protéine Der p1 recombinante. Les protéines extraites des cals (piste 1), du milieu intracellulaire des cellules en suspension (piste 2), du milieu de culture des cellules en suspension (piste 3), des feuilles de tabac (piste 4) transformées par la préproprotéine, les protéines d'acariens (piste 5) et les protéines transformées par l'ADNc codant la protéine mature fusionnée au peptide signal de la sporamine ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose et immunodétectée avec l'anticorps spécifique de Der p1. Une charge plus faible de l'extrait issu du milieu extracellulaire permet de visualiser les différentes formes accumulées dans les cellules en suspension.

- La figure 7 représente l'analyse électrophorétique de la protéine Der p1 recombinante. Les polypeptides présentant une réaction croisée avec la protéine Der p1 ont été extraits et purifiés sur colonne d'immunoaffinité à partir des acariens (piste 1), des cellules de tabac (piste 2) ou des levures (piste 3). Ces polypeptides ont été

séparés par électrophorèse SDS-PAGE et les protéines ont été colorées par coloration au nitrate d'argent.

- La figure 8 représente la séquence N-terminale de la forme majoritaire produite par les acariens, par les
5 cellules BY2 et par les levures.

- La figure 9 représente l'analyse de l'activité de Der p1 recombinant produit dans les cellules BY2.

- La figure 10 représente l'analyse de la glycosylation de l'allergène Der p1 recombinant. Les
10 protéines purifiées d'acariens (piste 1), de tabac (piste 2) et de levure (piste 3) ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE, colorées au nitrate d'argent (panneau A) ou transférées sur membrane de nitrocellulose et immunodétectées avec un anticorps spécifique de l'allergène
15 Der p1 (panneau B), des résidus xylose (panneau C), des résidus fucose (panneau D), des épitopes Lewis a (panneau E) ou affinodétectées avec la concanavale A (panneau F).

- La figure 11 représente l'analyse de la glycosylation de Der p1 recombinant produit dans les
20 cellules BY2 par spectrométrie de masse.

- La figure 12 représente l'analyse électrophorétique (A) de la forme précurseur et de la forme mature de Der p1 produite dans des cellules végétales de tabac en suspension après séparation par chromatographie.
25 L'identité des protéines a été vérifiée par immunodétection sur membrane après transfert à l'aide d'un anticorps anti-Der p1 (B) ainsi que la glycosylation par affinodétection sur membrane à l'aide de la concanavale A (C). Les pistes sont chargées à quantités de protéines égales.

30 - La figure 13 représente l'analyse de la protéine Der p1 recombinante produite dans les suspensions cellulaires de tabac par Elisa. La protéine recombinante réagit avec les IgE spécifiques de la protéine d'acarien.

- La figure 14 représente l'analyse de la protéine
35 recombinante Der p1 produite dans les suspensions

cellulaires et les feuilles de tabac par des expériences d' « histamine release ». La protéine recombinante produite dans les feuilles de tabac ou dans les cellules en suspension mobilise des cellules sensibilisées par différents sérums (1 - 2 - 4 et 5) et déclenche une sécrétion d'histamine de façon identique à la molécule native.

I) Expression de l'allergène Der p1 recombinant.

10 Au cours de cette étude, l'ADNc codant la protéine Der p1 a été cloné par RT-PCR en utilisant les amorces suivantes (VanOortetal ; 2002, Eur.J.Biochem., volume 269, pages 1-9) :

- pPICZalphaA5' cloning primer pro-Der p1:
15 GGGCTCGAGAAAAGACGTCCATCATCGATCAAAACTTTTG (SEQ ID NO.21) ;
- pPICZalphaA5' cloning primer mature et pro-Der p1:
GGGGAGCTCTTAGAGAATGACAACATATGG (SEQ ID NO.22) ;
- pPICZalphaA5' cloning primer mature Der p1:
20 GGGCTCGAGAAAAGAACTAACGCCTGCAGTATCAAT (SEQ ID NO.23).

Les ARNms utilisés pour cette expérience ont été obtenus à partir d'ARN d'acariens de l'espèce *Dermatophagoïdes pteronyssinus*. Deux ADNcs ont été successivement clonés, l'ADNc codant pour la protéine mature correspondant aux 666 nucléotides en position 3' ainsi que l'ADNc codant la préproprotéine, soit un ADNc de 1089 bp (Figure 2).

L'analyse des séquences a mis en évidence que les ADNc clonés codent pour une isoforme de l'allergène Der p1 précédemment décrite par Chua et al. (1988 ; J. Exp. Med., volume 167, pages 175-182). Ainsi le codon (GTA) codant une valine en position 765-767 a été remplacé par le codon GCA codant une alanine. La recherche de similitude présentée figure 4 met en évidence que cette séquence présente de

fortes homologies avec les allergènes Eur m1 (84,4%) et Der f1 (82,6%) isolés respectivement de *Euroglyphus maynei* et *Dermatophagoïdes farinae*.

5 II) Clonage et expression dans la cellule végétale.

Les deux ADNc codant la protéine mature et la préproprotéine ont ensuite été clonés dans des vecteurs d'expression compatibles avec le système levure ou le système plante.

10 Deux constructions ont été utilisées pour exprimer la protéine Der p1 dans la cellule végétale. Dans un premier temps, afin d'exprimer la protéine sous sa forme mature, un peptide signal d'origine végétale a été fusionné à l'extrémité N-terminale de l'ADNc codant pour la forme
15 mature (Figure 5). Ce peptide signal provient d'une protéine végétale vacuolaire de pomme de terre, la sporamine. Ce peptide signal a été montré efficace dans le système BY2 et plante de tabac lors d'études antérieures réalisées dans notre laboratoire.

20 Ce peptide signal a été amplifié par PCR à l'aide des amorces suivantes SPO35S5' (SEQ ID NO.24) et PPSP03' (SEQ ID NO.25) :

SPO35S5' : GCCCGAAGCTTGCATGCCTTCAG

P P S P O 3 ' : C A T T G A T A C T G C A

25 GGCGTTAGTGGCTGGATTGGGCAGGAGATAGAGGG

puis cloné à l'extrémité 5' de l'ADNc codant la protéine mature à l'aide l'enzyme de restriction Sph I. Puis cet ADNc modifié ainsi que l'ADNc codant la préproprotéine ont été clonés sous dépendance du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et en amont de la séquence de
30 terminaison de la nopaline synthase (Figure 5).

Ces deux cassettes d'expression ont été introduites dans le génome des cellules BY2 (*Nicotianae tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens*. Puis l'analyse de l'expression a
35 été réalisée par immunodétection avec un anticorps dirigé

contre la protéine Der p1 d'acariens. Comme dans le cas de la levure, aucun polypeptide n'a pu être immunodéecté dans les cellules transformées avec l'ADNc codant la protéine mature fusionnée au peptide signal de la sporamine (Figure 6, piste 2) alors que 70% des cellules transgéniques transformées avec l'ADNc codant la préproprotéine accumule 4 polypeptides immunodéectés par l'anticorps spécifique de Der p1 (Figure 6, piste 3).

Il a été observé que l'un des polypeptides, immunodéecté dans la cellule de tabac (Figure 6, piste 3 et encadré), présente une migration électrophorétique proche de la protéine issue d'acariens (Figure 6, piste 5). Les trois autres polypeptides présentent une migration électrophorétique plus faible et correspondent probablement à des intermédiaires de synthèse de la protéine mature. Ces résultats d'expression ont été confirmés chez la levure. La comparaison de la protéine Der p1 produite dans les cellules en suspension (figure 6, piste 1 et 3) ou dans les feuilles de tabac (figure 6, piste 4) met en évidence que les feuilles de tabac accumulent principalement la forme mature mais en plus faible quantité. Aucun polypeptide n'est observé lorsque les cellules sont transformées par l'ADNc codant la protéine mature fusionnée au peptide signal de la sporamine. Ces expériences mettent en évidence que le propeptide N-terminal constitué de 80 a.a. (Figure 3) est indispensable pour exprimer la protéine Der p1 dans un système eucaryote tel que la cellule végétale ou la levure.

III) Analyse de l'allergène Der p1 recombinant.

1) Purification de la protéine recombinante.

La protéine Der p1 recombinante produite dans la cellule végétale ou chez la levure a été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité sur une colonne d'anticorps dirigé contre la protéine Der p1 d'acariens. Les protéines purifiées sont présentées figure 7. Nous avons également pu

mettre en évidence que l'on pouvait dissocier la forme la plus mature des formes précurseurs (Figure 12)

2) Caractérisation de l'allergène Der p1.

5 L'analyse de la séquence N-terminale de l'allergène Der p1 produit dans les cellules BY2 a mis en évidence que la forme majoritairement accumulée dans le milieu extracellulaire présentent 5 acides aminés (DLNAE) supplémentaires par rapport à la forme mature de Der p1
10 produite par les acariens (Figure 8). Toutefois nous avons également pu mettre en évidence dans les cellules BY2 la présence d'une forme minoritaire dont la maturation correspond à la maturation N-terminale de l'allergène d'acariens.

15 Afin d'étudier le repliement de la protéine recombinant produite par les cellules BY2, l'activité enzymatique de l'allergène recombinant Der p1 a été analysée. En effet, il a été montré chez les acariens que cette protéine présentait une activité cystéine protéase.
20 Comme l'illustre la figure 9, la molécule Der p1 produite par les cellules BY2 hydrolyse un mélange de substrats composé de Cbz-Phe-Arg-AMC et de Boc-Gln-Ala-AMC. L'activité protéasique est mesurée par la fluorescence émise par le composé AMC clivé au cours de la réaction. L'activité
25 mesurée pour Der p1 recombinant semble moindre que dans le cas de la papaïne, cystéine protéase utilisée comme contrôle lors de cette étude.

3) Etude de la glycosylation de l'allergène recombinant.

30

Cette étude structurale a été complétée en analysant la glycosylation de la molécule produite par les cellules végétales. L'analyse a été réalisée dans un premier temps par " Western blot " à l'aide d'anticorps spécifiques des
35 résidus sucres présents chez les plantes. Ainsi, comme il

est illustré Figure 10, la molécule Der p1 produite par la cellule végétale (piste 2) réagit avec l'ensemble des sondes utilisées signifiant que la molécule est glycosylée et que le glycanne présente des résidus α 1,3-fucose, β 1,2-xylose
5 spécifiques des plantes et l'épitope Lewis a. L'allergène produit par les acariens (piste 1) ne répond avec aucune des sondes utilisées et ne semble pas glycosylé dans notre étude. A l'inverse, l'allergène Der p1 produit par les levures (piste 3) réagit avec la concanavaline A,
10 l'importante glycosylation de cet allergène pourrait expliquer en partie le haut poids moléculaire observée pour cet allergène. L'analyse structurale des glycanes de Der p1 produit par les cellules végétales a été ensuite réalisée par spectrométrie de masse. Cette étude a permis de
15 confirmer la présence de résidus xylose et fucose sur le glycanne, les formes prédominantes rencontrées sont de type [GlcNAcMAN₃GlcNAc₂XylFuc] et [GlcNAc₂MAN₃GlcNAc₂XylFuc] (Figure 11). Cette analyse structurale de l'allergène recombinant met en évidence que le système végétal est l'un
20 des systèmes permettant de produire une molécule active dont la maturation est proche de la protéine native. Dans tous les autres système de production (cellules CHO, cellules d'insectes SF9, cellules de drosophiles, levures), aucun clivage du propeptide N-terminal n'est observé, ce clivage
25 est indispensable à l'activité de la protéine. L'analyse de la glycosylation nous a permis de montrer que la molécule Der p1 était glycosylée comme cela est observée dans tous les systèmes d'expression utilisés pour produire cet allergène. Toutefois contrairement au système animaux et
30 levures, la molécule produite présente un glycanne de petite taille et par conséquent le poids moléculaire observé est très proche de la molécule d'acariens. L'ensemble de ces données mettent en évidence que le système végétal est le seul système d'expression à ce jour capable de produire une

molécule Der p1 active et dont le repliement est similaire à la molécule native.

4) Analyse de l'allergénicité des allergènes
5 recombinant.

a) Test de liaison aux IgE.

La capacité de liaisons aux IgE de l'allergène Der p1 a été comparée par une analyse Elisa. La comparaison des deux molécules native et recombinante n'a permis de mettre
10 en évidence que de faibles différences. Toutefois, il apparaît que la molécule recombinante est deux fois plus compétente pour lier les anticorps monoclonaux que la protéine native (figure 13).

15 b) Essai de libération d'histamine.

Les basophiles d'un donneur non-allergique ont été partiellement purifiés par centrifugation sur Percoll. Les cellules ont été dépouillées de leur IgE par un traitement à l'acide lactique puis re-sensibilisées par addition de
20 quatre sérums positifs pour Der p1. Les cellules ont ensuite été incubées avec Der p1 natif ou recombinant à 37°C pendant 45 min. Les cellules ont été centrifugées et la libération d'histamine dans le surnageant a été mesurée par une méthode fluorométrique. Les résultats sont exprimés en
25 % de libération du contenu total en histamine des cellules. Les tests de libération présentés figure 14 démontrent que les protéines native et recombinantes produites dans les cellules ou dans les feuilles de tabac déclenchent une libération d'histamine identique.

REVENDICATIONS

1) Procédé d'obtention d'un allergène protéique d'un
acarien du genre *Dermatophagoides* ou *Euroglyphus*
5 recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend la culture
d'un organisme eucaryote choisi parmi une plante, une
cellule ou une suspension de cellules de plante, transformé
par une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une
séquence polynucléotidique codant pour (i) la forme mature
10 dudit allergène et (ii) un propeptide placé à l'extrémité N-
terminale dudit allergène et éventuellement (iii) un peptide
signal placé à l'extrémité N-terminale dudit propeptide
pendant un temps suffisant pour permettre l'expression de
ladite protéine, puis l'isolement des protéines produites à
15 partir de la culture de l'organisme transformé.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en
ce que l'acarien est choisi dans le groupe comprenant :
Dermatophagoides pteronyssinus, *Dermatophagoides farinae* et
20 *Euroglyphus maynei*.

3) Procédé selon l'une quelconque des revendications
1 ou 2, caractérisé en ce que l'allergène protéique mature
d'acariens est choisi dans le groupe comprenant : Der p1,
25 Der f1 et Eur m1.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3,
caractérisé en ce que l'allergène protéique mature
d'acariens est choisi dans le groupe comprenant :

30 - Der p1, dont la séquence en acides aminés est
celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous
le SEQ ID NO.2 ;

- Der f1, dont la séquence en acides aminés est
celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous
35 le SEQ ID NO.4 ;

- Eur m1, dont la séquence en acides aminés est celle représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.6.

5 5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la séquence polynucléotidique codant pour l'allergène protéique mature est choisie dans le groupe comprenant :

 - la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous SEQ ID NO.1 codant pour Der
10 p1 ;

 - la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.3 codant pour Der f1 ;

 - la séquence nucléotidique représentée dans la
15 liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.5 codant pour Eur m1 ;

 6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le propeptide placé à
20 l'extrémité N-terminale dudit allergène protéique est choisi dans le groupe comprenant les propres propeptides des allergènes suivants :

 - pour Der p1 : la séquence en acides aminés du propeptide représentée dans la liste de séquences en annexe
25 sous le SEQ ID NO.8 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquences en annexe sous le SEQ ID NO.7 ;

 - pour Der f1 : la séquence en acides aminés du propeptide représentée dans la liste de séquences en annexe
30 sous le SEQ ID NO.10 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquences en annexe sous le SEQ ID NO.9 ;

 - pour Eur m1 : la séquence en acides aminés du propeptide représentée dans la liste de séquences en annexe
35 sous le SEQ ID NO.12 qui est codée par la séquence

nucléotidique représentée dans la liste de séquences en annexe sous le SEQ ID NO.11.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le peptide signal placé à l'extrémité N-terminale dudit propeptide est choisi dans le groupe comprenant les propres peptides signaux des allergènes suivants :

- pour Der p1 : la séquence en acides aminés du peptide signal représentée dans la liste de séquences en annexe sous le SEQ ID NO.14 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquences en annexe sous le SEQ ID NO.13 ;

- pour Der f1 : la séquence en acides aminés du peptide signal représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.16 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.15 ;

- pour Eur m1 : la séquence en acides aminés du peptide signal représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.18 qui est codée par la séquence nucléotidique représentée dans la liste de séquence en annexe sous le SEQ ID NO.17.

8) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence polynucléotidique est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO.19.

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence polynucléotidique comprend en outre un promoteur lié de manière fonctionnelle à ladite molécule d'acide nucléique, éventuellement un gène de sélection placé sous le contrôle de son propre promoteur ou du même promoteur que ladite

molécule d'acide nucléique, et avantageusement une séquence de terminaison placée en aval de ladite molécule d'acide nucléique.

5 10) Allergène protéique d'un acarien du genre Dermatophagoides ou Euroglyphus susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

10 11) Hôte eucaryote choisi parmi une plante, une cellule ou une suspension de cellules de plante, dans le génome de laquelle est incorporée, avantageusement de façon stable, une molécule d'acide nucléique comprenant au moins
15 une séquence polynucléotidique codant pour (i) la forme mature dudit allergène et (ii) un propeptide placé à l'extrémité N-terminale dudit allergène et éventuellement (iii) un peptide signal placé à l'extrémité N-terminale dudit propeptide

1/14

Figure 1

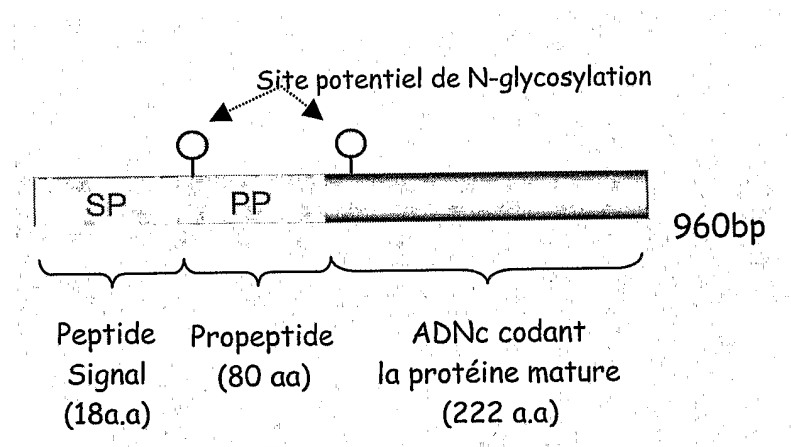


Figure 2

Figure 2

☐ peptide signal
 ☐ propeptide
 ☐ site de N-glycosylation

☐ peptide signal
 ☐ propeptide
 ☐ site de N-glycosylation

3/14

Figure 3

préproprotéine. protéine.	GAATTCCTTTTTTTTCTTCTCTCTCTAAAAATCTAAAAATCCATCCACATGAAAATTGT -----
préproprotéine. protéine.	TTTGGCCATCGCCTCATTTGTTGGCATTGAGCGCTGTTTATGCTCGTCCATCATCGATCAA -----
préproprotéine. protéine.	AACTTTGAAGAATACAAAAAGCCTTCAACAAAAGTTATGCTACCTTCGAAGATGAAGA -----
préproprotéine. protéine.	AGCTGCCCGTAAAAACTTTTGGGAATCAGTAAAAATATGTTCAATCAAATGGAGGTGCCAT -----
préproprotéine. protéine.	CAACCATTGTCCGATTGTCTGTTGGATGAATCAAAAACCGATTTTTGATGAGTGCAGA -----
préproprotéine. protéine.	AGCTTTTGAACACCTCAAAACTCAATTCGATTGAAATGCTGAACTAACGCCTGCAGTAT -----ACTAACGCCTGCAGTAT *****
préproprotéine. protéine.	CAATGGAAATGCTCCAGCTGAAATCGATTGCGACAAATGCGAACTGTCCTCCCATTCG CAATGGAAATGCTCCAGCTGAAATCGATTGCGACAAATGCGAACTGTCCTCCCATTCG *****
préproprotéine. protéine.	TATGCAAGGAGGCTGTGGTTCATGTTGGGCTTTCTCTGGTGTGCCGCACTGAATCAGC TATGCAAGGAGGCTGTGGTTCATGTTGGGCTTTCTCTGGTGTGCCGCACTGAATCAGC *****
préproprotéine. protéine.	TTATTTGGCTTACCGTAATCAATCATTTGGATCTTGTCTGAACAAGAATTAGTCGATTGTGC TTATTTGGCTTACCGTAATCAATCATTTGGATCTTGTCTGAACAAGAATTAGTCGATTGTGC *****
préproprotéine. protéine.	TTCCCAACACGGTTGTCATGGTGATACCATTCACGTGGTATTGAATACATCCAACATAA TTCCCAACACGGTTGTCATGGTGATACCATTCACGTGGTATTGAATACATCCAACATAA *****
préproprotéine. protéine.	TGGTGTCTGTCGAAGAAGCTACTATCGATACGTTGCACGAGAACAAATCATGCCGACGACC TGGTGTCTGTCGAAGAAGCTACTATCGATACGTTGCACGAGAACAAATCATGCCGACGACC *****
préproprotéine. protéine.	AAATGCACAACGTTTCGGTATCTCAAATATTGCCAAATTTACCCACCAATGCAAAACAA AAATGCACAACGTTTCGGTATCTCAAATATTGCCAAATTTACCCACCAATGCAAAACAA *****
préproprotéine. protéine.	AATTCGTGAAGCTTTGGCTCAAACCCACAGCGCTATTGCCGTCAATTATGGCATCAAAGA AATTCGTGAAGCTTTGGCTCAAACCCACAGCGCTATTGCCGTCAATTATGGCATCAAAGA *****
préproprotéine. protéine.	TTTAGACGATTCCGTCATTATGATGGCCGAACAATCATTCAACGCGATAATGGTTACCA TTTAGACGATTCCGTCATTATGATGGCCGAACAATCATTCAACGCGATAATGGTTACCA *****
préproprotéine. protéine.	ACCAAATATCACGCTGTCAACATTGTTGGTTACAGTAACGCACAAGGTGTCGATTATTG ACCAAATATCACGCTGTCAACATTGTTGGTTACAGTAACGCACAAGGTGTCGATTATTG *****
préproprotéine. protéine.	GATCGTACGAAACAGTTGGGATACCAATTGGGGTGATAATGGTTACGGTTATTTTGCTGC GATCGTACGAAACAGTTGGGATACCAATTGGGGTGATAATGGTTACGGTTATTTTGCTGC *****
préproprotéine. protéine.	CAACATCGATTTGATGATGATTGAAGAATATCCATATGTTGTCATTCTCTAAACAAAAAG CAACATCGATTTGATGATGATTGAAGAATATCCATATGTTGTCATTCTCTAAACAAAAAG *****
préproprotéine. protéine.	ACAATTTCTTATATGATTGTCACTAATTTATTTAAATCAAAATTTTAGAAAATGAATA ACAATTTCTTATATGATTGTCACTAATTTATTTAAATCAAAATTTTAGAAAATGAATA *****
préproprotéine. protéine.	AATTCATTACAAAAATTA AATTCATTACAAAAATTA *****

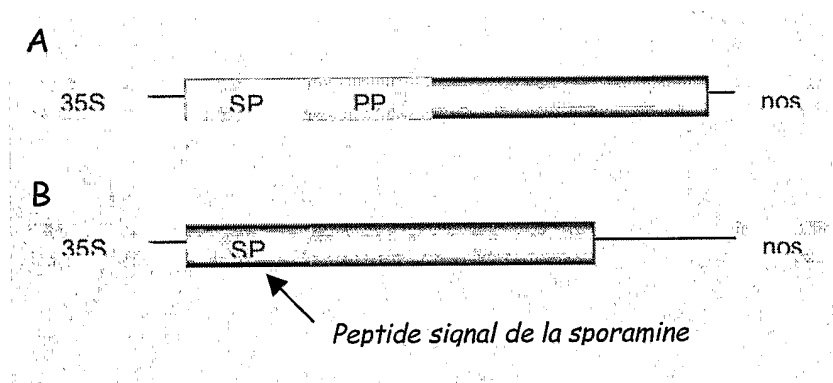
4/14

Figure 4

Sequences producing significant alignments:		(bits)	Value
<u>gi 511952 gb U11695.1 DPU11695</u>	<u>Dermatophagoides pteronyssin...</u>	<u>2147</u>	0.0
<u>gi 3941387 gb AF047610.1 AF047610</u>	<u>Euroglyphus maynei group ...</u>	<u>656</u>	0.0
<u>gi 3941389 gb AF047611.1 AF047611</u>	<u>Euroglyphus maynei group ...</u>	<u>652</u>	0.0
<u>gi 3941391 gb AF047612.1 AF047612</u>	<u>Euroglyphus maynei group ...</u>	<u>644</u>	0.0
<u>gi 9053 emb X65197.1 DPDERPIG</u>	<u>D.pteronyssinus Der-pI gene f...</u>	<u>593</u>	e-168
<u>gi 387591 gb M24794.1 DEPMHDA</u>	<u>Dermatophagoides pteronyssinu...</u>	<u>593</u>	e-168
<u>gi 9837300 gb AF285763.1 AF285763</u>	<u>Dermatophagoides farinae ...</u>	<u>478</u>	e-134
<u>gi 16117375 gb AF194431.1 AF194431</u>	<u>Dermatophagoides farinae...</u>	<u>331</u>	6e-90
<u>gi 9296 emb X60073.1 EMALL1</u>	<u>E.maynei EurmI gene for group I...</u>	<u>299</u>	2e-80
<u>gi 16117377 gb AF194432.1 AF194432</u>	<u>Dermatophagoides farinae...</u>	<u>262</u>	4e-69
<u>gi 7412 emb X65196.1 DFDERFIG</u>	<u>D.farinae Der-fI gene for cys...</u>	<u>200</u>	1e-50

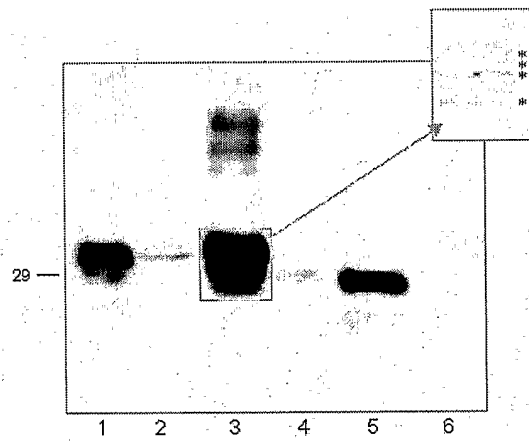
5/14

Figure 5



6/14

Figure 6



7/14

Figure 7

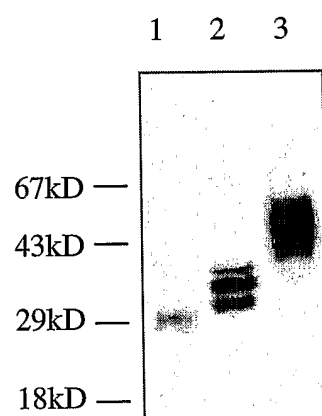


Figure 8

Figure 8: Séquence N-terminale de la forme majoritaire produite par les acariens (■), par les cellules BY2 (■) et par les levures (■).

9/14

Figure 9

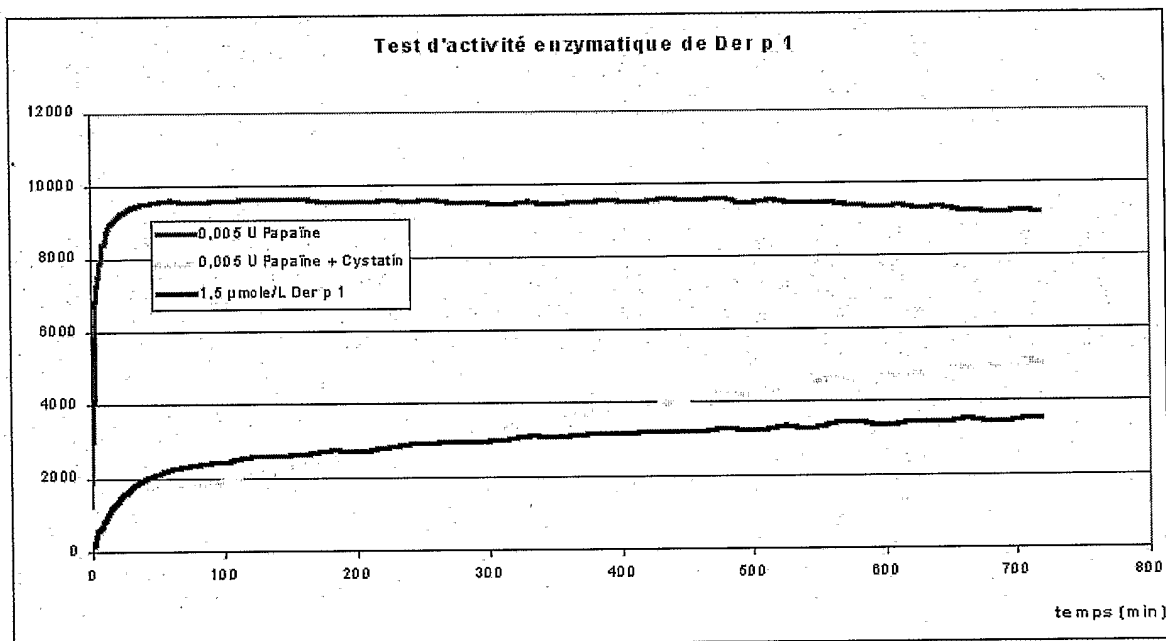


Figure 9: Analyse de l'activité de Der p1 recombinant produit dans les cellules BY2

10/14

Figure 10

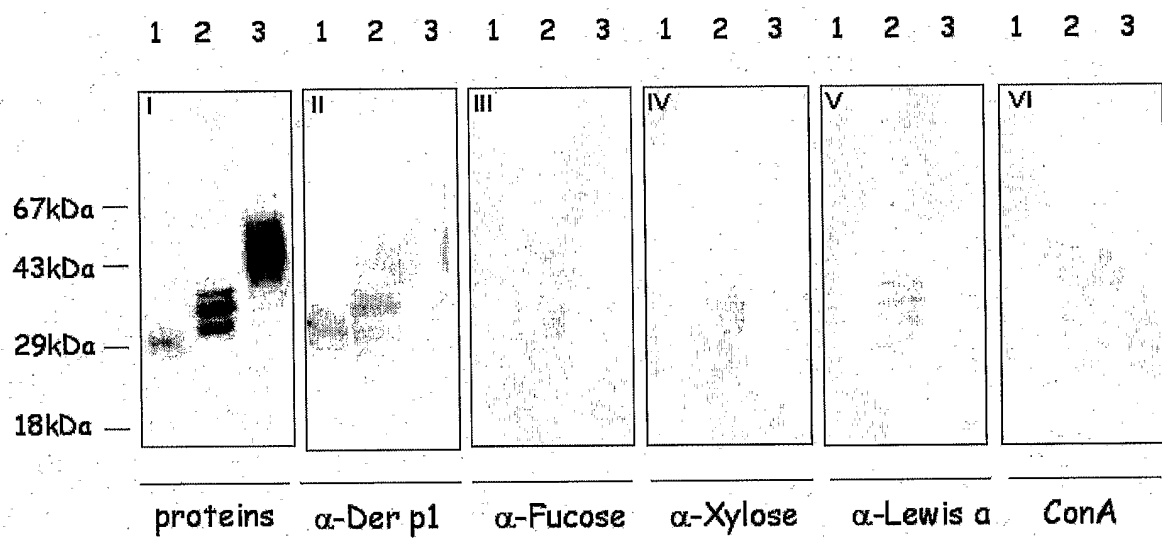
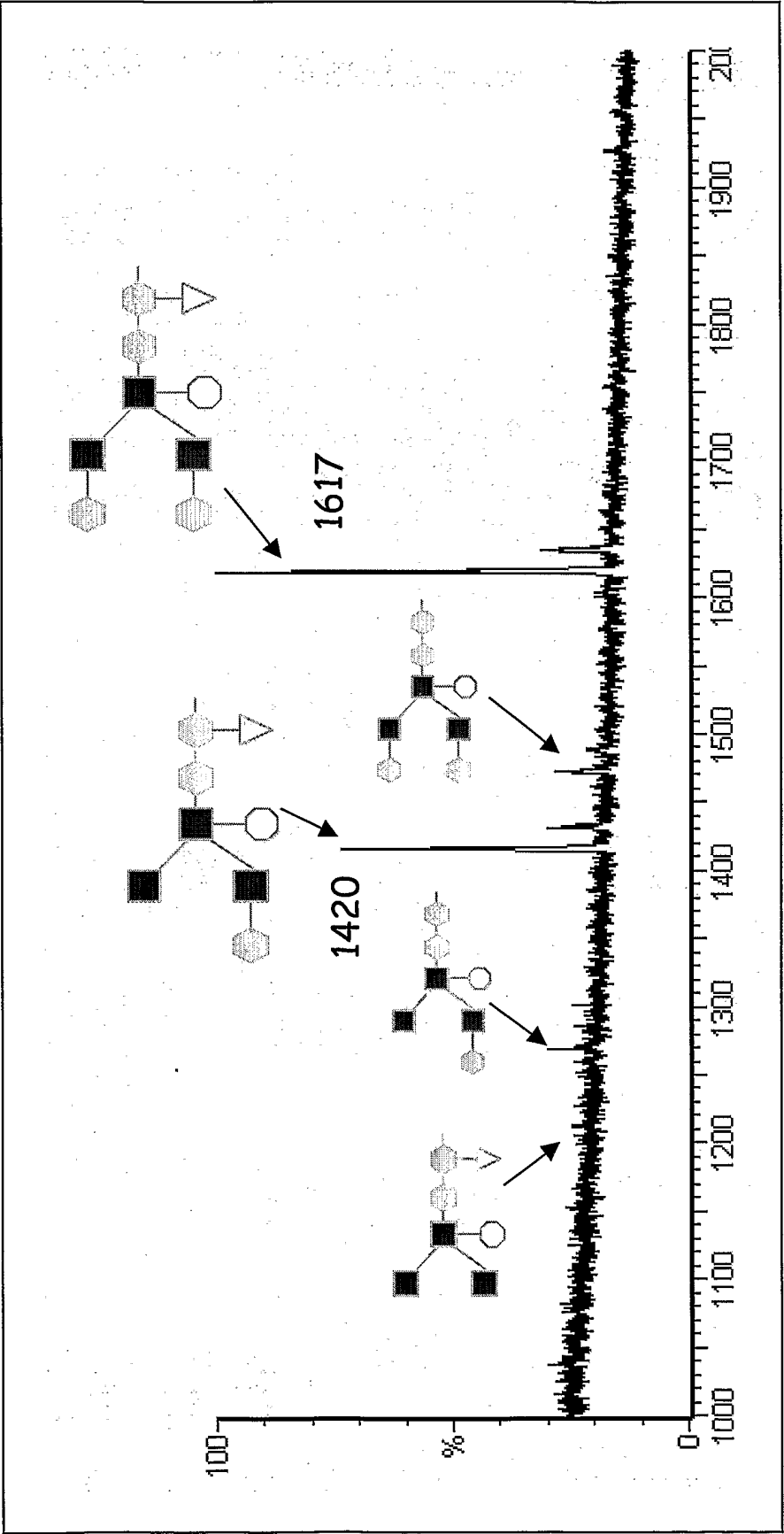
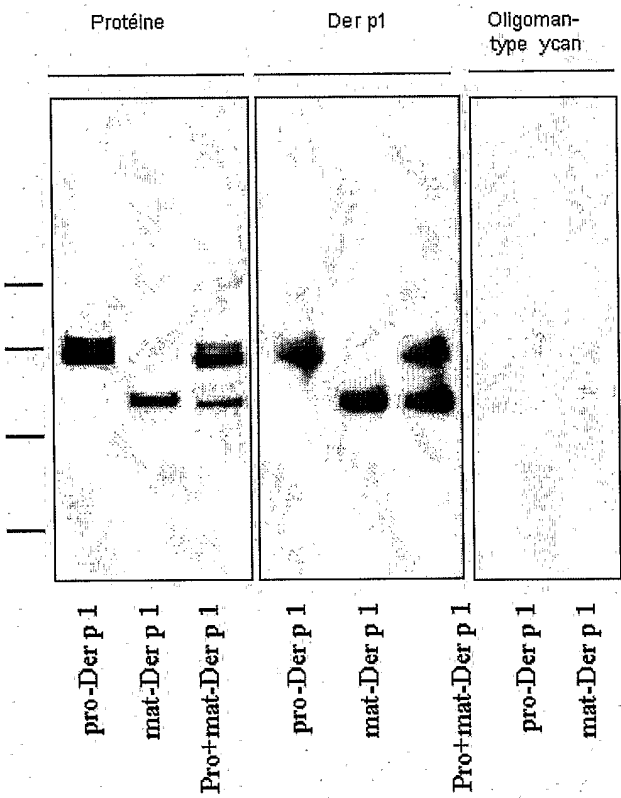


Figure 11



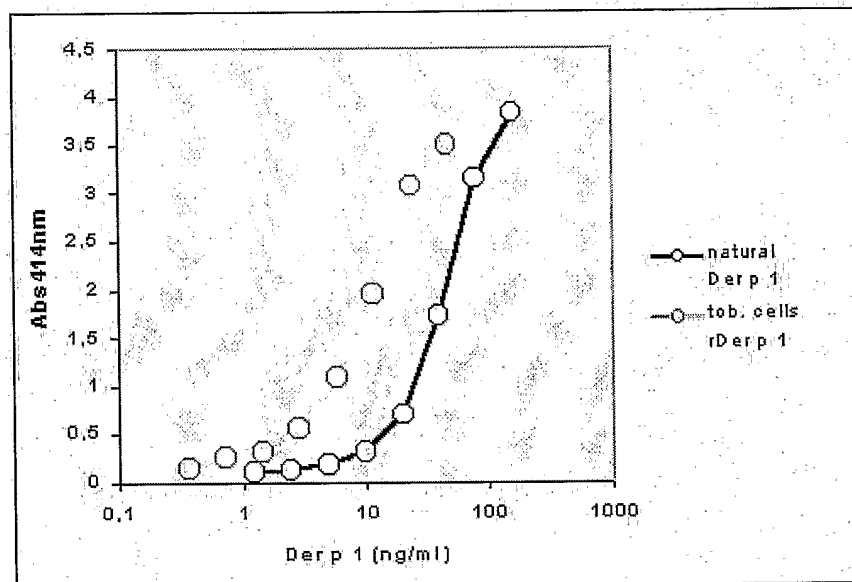
12/14

Figure 12



13/14

Figure 13



14/14

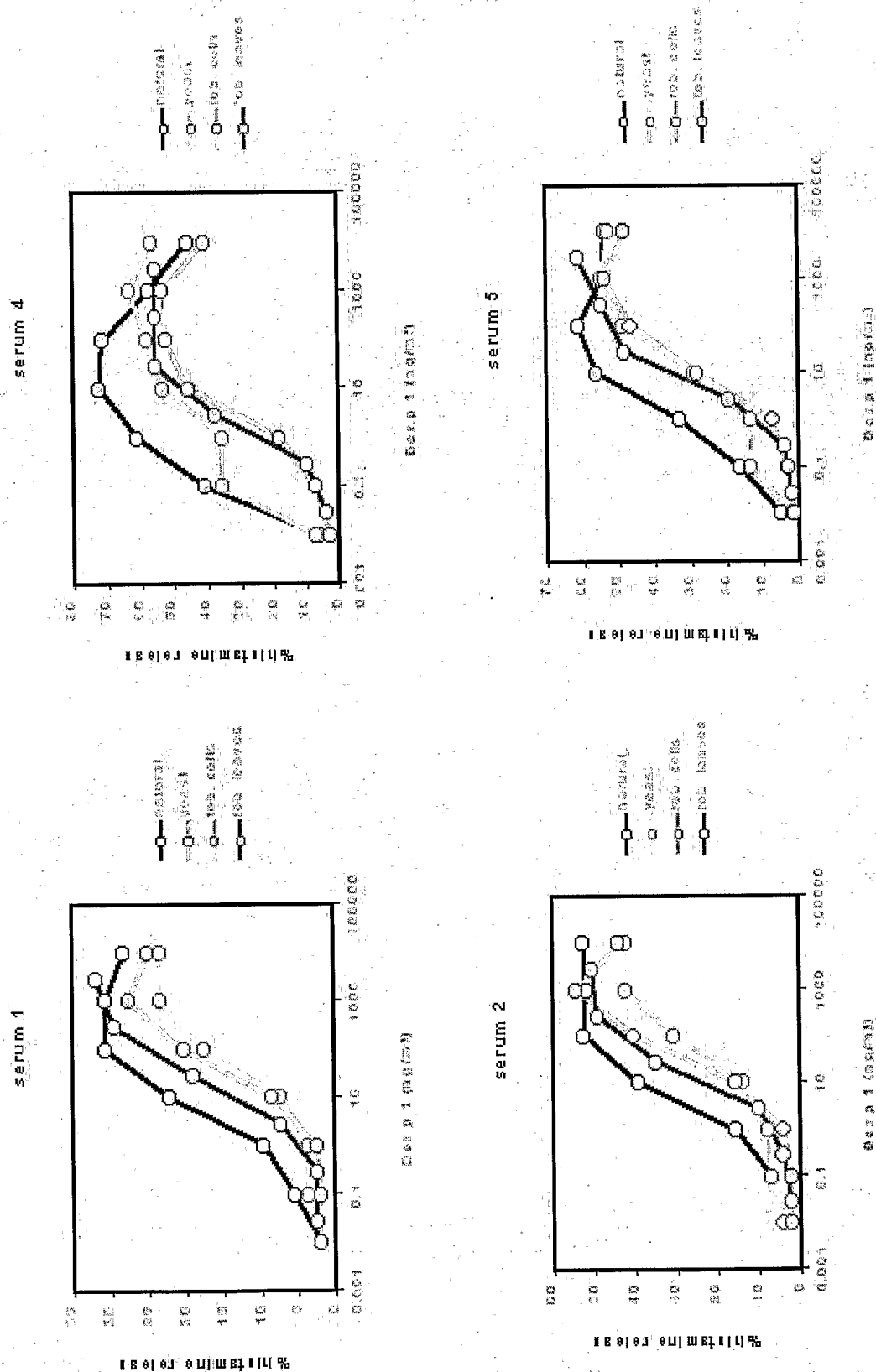


Figure 14

SEQUENCE LISTING

<110> STALLERGENES SA

<120> Molécule d'acide nucléique codant une préproprotéine d'allergène d'un acarien du genre Dermatophagoides et son utilisation pour la production dudit allergène dans les plantes

<130> 23756FR

<140> PCT/FR03/XXXXX

<141> 2003-07-04

<150> FR 02/08485

<151> 2002-07-05

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 669

<212> DNA

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(669)

<223> Forme mature de Der p1

<400> 1

act aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg	48
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
cga caa atg cga act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt	96
Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly	
20 25 30	
tca tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg	144
Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu	
35 40 45	
gct tac cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat	192
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp	
50 55 60	
tgt gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att	240
Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile	
65 70 75 80	
gaa tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac	288
Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	
85 90 95	
gtt gca cga gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt	336
Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly	
100 105 110	
atc tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gta aac aaa att cgt	384
Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg	
115 120 125	

gaa gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc 432
 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
 130 135 140
 aaa gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cga aca atc att caa 480
 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
 145 150 155 160
 cgc gat aat ggt tac caa cca aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt 528
 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
 165 170 175
 tac agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg 576
 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
 180 185 190
 gat acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc 624
 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
 195 200 205
 gat ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc taa 669
 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 210 215 220

<210> 2
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 2

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile

130	135	140	
Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln			
145	150	155	160
Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly			
	165	170	175
Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp			
	180	185	190
Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile			
	195	200	205
Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu			
210	215	220	
<210>	3		
<211>	672		
<212>	DNA		
<213>	Dermatophagoides farinae		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(672)		
<223>	Forme mature de Der fl		
<400>	3		
aca agc gct tgc cgt atc aat tcg gtt aac gtt cca tcg gaa ttg gat			48
Thr Ser Ala Cys Arg Ile Asn Ser Val Asn Val Pro Ser Glu Leu Asp			
1	5	10	15
tta cga tca ctg cga act gtc act cca atc cgt atg caa gga ggc tgt			96
Leu Arg Ser Leu Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys			
	20	25	30
ggg tca tgt tgg ggt ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat			144
Gly Ser Cys Trp Gly Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr			
	35	40	45
ttg gcc tac cgt aac acg tct ttg gat ctt tct gaa cag gaa ctc gtc			192
Leu Ala Tyr Arg Asn Thr Ser Leu Asp Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val			
	50	55	60
gat tgc gca tct caa cac cca tgt cac ggc gat aca ata cca aga ggc			240
Asp Cys Ala Ser Gln His Pro Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly			
65	70	75	80
atc gaa tac atc caa caa aat ggt gtc gtt gaa gaa aga agc tat cca			288
Ile Glu Tyr Ile Gln Gln Asn Gly Val Val Glu Glu Arg Ser Tyr Pro			
	85	90	95
tac gtt gca cga gaa caa cga tgc cga cga cca aat tcc caa cat tac			336
Tyr Val Ala Arg Glu Gln Arg Cys Arg Arg Pro Asn Ser Gln His Tyr			
	100	105	110
cct atc tca aac tac tgc caa att tat cca cca gat gtg aaa caa atc			384
Pro Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asp Val Lys Gln Ile			
	115	120	125
cgt gaa gct ttg act caa aca cac aca gct att gcc gtc att att ggc			432
Arg Glu Ala Leu Thr Gln Thr His Thr Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly			

130 135 140
 atc aaa gat ttg aga gct ttc caa cat tat gat gga cga aca atc att 480
 Ile Lys Asp Leu Arg Ala Phe Gln His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
 145 150 155 160
 caa cat gac aat ggt tat caa cca aac tat cat gcc gtc aac att gtc 528
 Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
 165 170 175
 ggt tac gga act aca caa ccc cac cat tat tcc atc cta cca aac act 576
 Gly Tyr Gly Thr Thr Gln Pro His His Tyr Ser Ile Leu Pro Asn Thr
 180 185 190
 tcc cat act acc tgg gga gat agc gga tac gga tat ttc caa gcc gga 624
 Ser His Thr Thr Trp Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Gln Ala Gly
 195 200 205
 aac aac ctc atg atg atc gaa caa tat cca tat gtt gta atc atg tga 672
 Asn Asn Leu Met Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Ile Met
 210 215 220

 <210> 4
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 4

 Thr Ser Ala Cys Arg Ile Asn Ser Val Asn Val Pro Ser Glu Leu Asp
 1 5 10 15

 Leu Arg Ser Leu Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys
 20 25 30

 Gly Ser Cys Trp Gly Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr
 35 40 45

 Leu Ala Tyr Arg Asn Thr Ser Leu Asp Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val
 50 55 60

 Asp Cys Ala Ser Gln His Pro Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly
 65 70 75 80

 Ile Glu Tyr Ile Gln Gln Asn Gly Val Val Glu Glu Arg Ser Tyr Pro
 85 90 95

 Tyr Val Ala Arg Glu Gln Arg Cys Arg Arg Pro Asn Ser Gln His Tyr
 100 105 110

 Pro Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asp Val Lys Gln Ile
 115 120 125

 Arg Glu Ala Leu Thr Gln Thr His Thr Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly
 130 135 140

Ile Lys Asp Leu Arg Ala Phe Gln His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
145 150 155 160

Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
165 170 175

Gly Tyr Gly Thr Thr Gln Pro His His Tyr Ser Ile Leu Pro Asn Thr
180 185 190

Ser His Thr Thr Trp Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Gln Ala Gly
195 200 205

Asn Asn Leu Met Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Ile Met
210 215 220

<210> 5

<211> 672

<212> DNA

<213> Euroglyphus maynei

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(672)

<223> Protéine mature de Eur ml

<400> 5

act tat gct tgc agt att aac tca gtg agt tta cca tcg gaa ctt gat 48
Thr Tyr Ala Cys Ser Ile Asn Ser Val Ser Leu Pro Ser Glu Leu Asp
1 5 10 15

tta cgt tca ctg cga act gta act cca atc cgt atg caa gga ggc tgt 96
Leu Arg Ser Leu Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Cys
20 25 30

ggc tca tgc tgg gct ttc tct ggt gtt gcc tca act gag tca gct tat 144
Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ser Thr Glu Ser Ala Tyr
35 40 45

ttg gcc tac cgc aac atg tct ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc 192
Leu Ala Tyr Arg Asn Met Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val
50 55 60

gat tgt gct tca caa aac ggt tgc cat ggt gat aca att cca cgc gga 240
Asp Cys Ala Ser Gln Asn Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly
65 70 75 80

att gaa tac atc caa caa aat ggt gtc gtc caa gaa cac tac tat cca 288
Ile Glu Tyr Ile Gln Gln Asn Gly Val Val Gln Glu His Tyr Tyr Pro
85 90 95

tac gtt gca cga gaa caa tca tgc cat cga cca aat gca caa cgt tac 336
Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys His Arg Pro Asn Ala Gln Arg Tyr
100 105 110

ggc ctc aag aac tat tgc caa att tcg cca cca gac tcg aac aaa atc 384
Gly Leu Lys Asn Tyr Cys Gln Ile Ser Pro Pro Asp Ser Asn Lys Ile
115 120 125

cgt caa gct ttg act caa aca cat aca gcc gtt gcc gtc att att ggc 432
Arg Gln Ala Leu Thr Gln Thr His Thr Ala Val Ala Val Ile Ile Gly

130	135	140	
atc aaa gat ttg aac gct ttc cga cat tat gat gga cga aca atc atg			480
Ile Lys Asp Leu Asn Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Met			
145	150	155	160
caa cac gac aat ggt tat caa cca aac tat cat gcc gtc aac att gtt			528
Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val			
	165	170	175
ggt tac ggt aat aca caa ggt gtt gat tat tgg atc gta cga aac agt			576
Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser			
	180	185	190
tgg gat acc act tgg ggt gat aat ggc tat ggt tat ttc gct gcc aac			624
Trp Asp Thr Thr Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn			
	195	200	205
atc aat ttg atg atg atc gaa caa tat cca tat gta gtc atg ctt taa			672
Ile Asn Leu Met Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Met Leu			
210	215	220	

<210> 6
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Euroglyphus maynei
 <400> 6

Thr Tyr Ala Cys Ser Ile Asn Ser Val Ser Leu Pro Ser Glu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys
20 25 30

Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ser Thr Glu Ser Ala Tyr
35 40 45

Leu Ala Tyr Arg Asn Met Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val
50 55 60

Asp Cys Ala Ser Gln Asn Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly
65 70 75 80

Ile Glu Tyr Ile Gln Gln Asn Gly Val Val Gln Glu His Tyr Tyr Pro
85 90 95

Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys His Arg Pro Asn Ala Gln Arg Tyr
100 105 110

Gly Leu Lys Asn Tyr Cys Gln Ile Ser Pro Pro Asp Ser Asn Lys Ile
115 120 125

Arg Gln Ala Leu Thr Gln Thr His Thr Ala Val Ala Val Ile Ile Gly
130 135 140

Ile Lys Asp Leu Asn Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Met
145 150 155 160

Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
165 170 175

Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
180 185 190

Trp Asp Thr Thr Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
195 200 205

Ile Asn Leu Met Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Met Leu
210 215 220

<210> 7
<211> 240
<212> DNA
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(240)
<223> Propeptide de Der p1
<400> 7

cgt cca tca tcg atc aaa act ttt gaa gaa tac aaa aaa gcc ttc aac 48
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

aaa agt tat gct acc ttc gaa gat gaa gaa gct gcc cgt aaa aac ttt 96
Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

ttg gaa tca gta aaa tat gtt caa tca aat gga ggt gcc atc aac cat 144
Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

ttg tcc gat ttg tcg ttg gat gaa ttc aaa aac cga ttt ttg atg agt 192
Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

gca gaa gct ttt gaa cac ctc aaa act caa ttc gat ttg aat gct gaa 240
Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80

<210> 8
<211> 80
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<400> 8

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
 35 40 45

Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
 50 55 60

Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
 65 70 75 80

<210> 9
 <211> 240
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(240)
 <223> Propeptide de Der f1
 <400> 9

cgt cca gct tca atc aaa act ttt gaa gaa ttc aaa aaa gcc ttc aac 48
 Arg Pro Ala Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Phe Lys Lys Ala Phe Asn
 1 5 10 15

aaa aac tat gcc acc gtt gaa gag gaa gaa gtt gcc cgt aaa aac ttt 96
 Lys Asn Tyr Ala Thr Val Glu Glu Glu Glu Val Ala Arg Lys Asn Phe
 20 25 30

ttg gaa tca ttg aaa tat gtt gaa gct aac aaa ggt gcc atc aac cat 144
 Leu Glu Ser Leu Lys Tyr Val Glu Ala Asn Lys Gly Ala Ile Asn His
 35 40 45

ttg tcc gat ttg tca ttg gat gaa ttc aaa aac cgt tat ttg atg agt 192
 Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Tyr Leu Met Ser
 50 55 60

gct gaa gct ttt gaa caa ctc aaa act caa ttc gat ttg aat gcc gaa 240
 Ala Glu Ala Phe Glu Gln Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
 65 70 75 80

<210> 10
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 10

Arg Pro Ala Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Phe Lys Lys Ala Phe Asn
 1 5 10 15

Lys Asn Tyr Ala Thr Val Glu Glu Glu Glu Val Ala Arg Lys Asn Phe
 20 25 30

Leu Glu Ser Leu Lys Tyr Val Glu Ala Asn Lys Gly Ala Ile Asn His
 35 40 45

Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Tyr Leu Met Ser
 50 55 60

Ala Glu Ala Phe Glu Gln Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
 65 70 75 80

<210> 11

<211> 240

<212> DNA

<213> Euroglyphus maynei

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(240)

<223> Propeptide de Eur ml

<400> 11

cgt cca gct tcg atc aaa act ttt gaa gaa ttc aaa aaa gcc ttc aac 48
 Arg Pro Ala Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Phe Lys Lys Ala Phe Asn
 1 5 10 15

aaa acc tat gct acc cct gaa aag gaa gaa gtt gcc cgt aaa aac ttt 96
 Lys Thr Tyr Ala Thr Pro Glu Lys Glu Glu Val Ala Arg Lys Asn Phe
 20 25 30

ttg gaa tca ttg aaa tat gtg gaa tca aac aaa ggt gcc atc aac cat 144
 Leu Glu Ser Leu Lys Tyr Val Glu Ser Asn Lys Gly Ala Ile Asn His
 35 40 45

ttg tcc gat ttg tca ttg gat gaa ttc aaa aac caa ttt ttg atg aat 192
 Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Gln Phe Leu Met Asn
 50 55 60

gct aat gct ttt gaa caa ctc aaa act caa ttc gat ttg aat gct gaa 240
 Ala Asn Ala Phe Glu Gln Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
 65 70 75 80

<210> 12

<211> 80

<212> PRT

<213> Euroglyphus maynei

<400> 12

Arg Pro Ala Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Phe Lys Lys Ala Phe Asn
 1 5 10 15

Lys Thr Tyr Ala Thr Pro Glu Lys Glu Glu Val Ala Arg Lys Asn Phe
 20 25 30

Leu Glu Ser Leu Lys Tyr Val Glu Ser Asn Lys Gly Ala Ile Asn His
 35 40 45

Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Gln Phe Leu Met Asn
 50 55 60

Ala Asn Ala Phe Glu Gln Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
 65 70 75 80

<210> 13

<211> 54

<212> DNA

<213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(54)
 <223> Peptide signal de Der pl
 <400> 13

atg aaa att gtt ttg gcc atc gcc tca ttg ttg gca ttg agc gct gtt 48
 Met Lys Ile Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ala Val
 1 5 10 15
 tat gct 54
 Tyr Ala

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 14

Met Lys Ile Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ala Val
 1 5 10 15

Tyr Ala

<210> 15
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(54)
 <223> Peptide signal de Der fl
 <400> 15

atg aaa ttc gtt ttg gcc att gcc tct ttg ttg gta ttg agc act gtt 48
 Met Lys Phe Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Val Leu Ser Thr Val
 1 5 10 15

tat gct 54
 Tyr Ala

<210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 16

Met Lys Phe Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Val Leu Ser Thr Val
 1 5 10 15

Tyr Ala

<210> 17
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Euroglyphus maynei

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(54)
 <223> Peptide signal de Eur m1
 <400> 17
 atg aaa atc att ttg gcc atc gcc tca ttg ttg gta ttg agc gct gtt 48
 Met Lys Ile Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Val Leu Ser Ala Val
 1 5 10 15
 tat gct
 Tyr Ala 54

<210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Euroglyphus maynei
 <400> 18

Met Lys Ile Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Val Leu Ser Ala Val
 1 5 10 15

Tyr Ala

<210> 19
 <211> 1089
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <220>
 <221> DNA
 <222> (1)..(1089)
 <223> ADNc de la préproprotéine Der p1
 <220>
 <221> CDS
 <222> (49)..(1014)
 <223> Préproprotéine Der p1
 <400> 19

aattcctttt tttttctttc tctctctaaa atctaaaatc catccaac atg aaa att 57
 Met Lys Ile
 1

gtt ttg gcc atc gcc tca ttg ttg gca ttg agc gct gtt tat gct cgt 105
 Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ala Val Tyr Ala Arg
 5 10 15

cca tca tcg atc aaa act ttt gaa gaa tac aaa aaa gcc ttc aac aaa 153
 Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn Lys
 20 25 30 35

agt tat gct acc ttc gaa gat gaa gaa gct gcc cgt aaa aac ttt ttg 201
 Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe Leu
 40 45 50

gaa tca gta aaa tat gtt caa tca aat gga ggt gcc atc aac cat ttg 249
 Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His Leu
 55 60 65

tcc gat ttg tcg ttg gat gaa ttc aaa aac cga ttt ttg atg agt gca 297
 Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser Ala
 70 75 80

gaa gct ttt gaa cac ctc aaa act caa ttc gat ttg aat gct gaa act 345
 Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu Thr
 85 90 95

aac gcc tgc agt atc aat gga aat gct cca gct gaa atc gat ttg cga 393
 Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg
 100 105 110 115

caa atg cga act gtc act ccc att cgt atg caa gga ggc tgt ggt tca 441
 Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser
 120 125 130

tgt tgg gct ttc tct ggt gtt gcc gca act gaa tca gct tat ttg gct 489
 Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala
 135 140 145

tac cgt aat caa tca ttg gat ctt gct gaa caa gaa tta gtc gat tgt 537
 Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys
 150 155 160

gct tcc caa cac ggt tgt cat ggt gat acc att cca cgt ggt att gaa 585
 Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu
 165 170 175

tac atc caa cat aat ggt gtc gtc caa gaa agc tac tat cga tac gtt 633
 Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val
 180 185 190 195

gca cga gaa caa tca tgc cga cga cca aat gca caa cgt ttc ggt atc 681
 Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile
 200 205 210

tca aac tat tgc caa att tac cca cca aat gca aac aaa att cgt gaa 729
 Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu
 215 220 225

gct ttg gct caa acc cac agc gct att gcc gtc att att ggc atc aaa 777
 Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys
 230 235 240

gat tta gac gca ttc cgt cat tat gat ggc cga aca atc att caa cgc 825
 Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg
 245 250 255

gat aat ggt tac caa cca aac tat cac gct gtc aac att gtt ggt tac 873
 Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr
 260 265 270 275

agt aac gca caa ggt gtc gat tat tgg atc gta cga aac agt tgg gat 921
 Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp
 280 285 290

acc aat tgg ggt gat aat ggt tac ggt tat ttt gct gcc aac atc gat 969
 Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp
 295 300 305

ttg atg atg att gaa gaa tat cca tat gtt gtc att ctc taa aca 1014
 Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu Thr
 310 315 320

aaaagacaat ttcttatatg attgtcacta atttatttaa aatcaaaatt tttagaaaat 1074

gaataaattc attca 1089

<210> 20
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 20

Met Lys Ile Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ala Val
 1 5 10 15

Tyr Ala Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala
 20 25 30

Phe Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys
 35 40 45

Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile
 50 55 60

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu
 65 70 75 80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn
 85 90 95

Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile
 100 105 110

Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly
 115 120 125

Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala
 130 135 140

Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu
 145 150 155 160

Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg
 165 170 175

Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr
 180 185 190

Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg
 195 200 205

Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys
 210 215 220

Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile
225 230 235 240

Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile
245 250 255

Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile
260 265 270

Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn
275 280 285

Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala
290 295 300

Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
305 310 315 320

<210> 21
<211> 40
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> pPICZalphaA5' cloning primer pro-Der p1
<400> 21
gggctcgaga aaagacgtcc atcatcgatc aaaacttttg

40

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> pPICZalphaA5' cloning primer mature et pro-Der p1
<400> 22
ggggagctct tagagaatga caacatatgg

30

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(36)
<223> pPICZalphaA5' cloning primer mature Der p1
<400> 23
gggctcgaga aaagaactaa cgctgcagt atcaat

36

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> unidentified

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Amorce SP035S5'
<400> 24
gcccgaagct tgcattgcctt cag 23

<210> 25
<211> 48
<212> DNA
<213> unidentified
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(48)
<223> Amorce PPSP03'
<400> 25
cattgatact gcaggcggtta gtggctggat tgggcaggag atagaggg 48