

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 021 328**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②1 N° d'enregistrement national : **14 54653**
⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 N 15/82** (2017.01), C 12 N 5/04, 5/10, 15/29, 15/
60, C 12 P 21/00, C 07 K 14/415, A 01 H 5/00, A 61 K 39/36,
38/16, A 61 P 37/08

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PRODUCTION COMMERCIALE DE L'ALLERGENE AMB A1 PAR EXPRESSION TRANSI-
TOIRE CHEZ LES PLANTES.

②2 Date de dépôt : 23.05.14.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 27.11.15 Bulletin 15/48.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 05.01.18 Bulletin 18/01.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *ANGANY GENETICS Société par
actions simplifiée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : GOMORD VERONIQUE, FITCHETTE
ANNE-CATHERINE, CATALA VIRGINIE et FAYE
LOIC.

⑦3 Titulaire(s) : *ANGANY GENETICS Société par
actions simplifiée.*

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

FR 3 021 328 - B1



La présente invention se rapporte à une cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort.

5 L'invention se rapporte également un procédé de production de la pectate lyase utilisant la cellule végétale.

L'ambrosie, en particulier *Ambrosia artemisiifolia*, est une plante annuelle, qui appartient à la famille des Composées tubuliflores (ou Astéracées). Cette plante sauvage, originaire
10 d'Amérique du nord, fleurit de la fin de l'été jusqu'à l'automne. Son pollen a un pouvoir allergénique très élevé. Ainsi, l'ambrosie est la première cause d'allergie pollinique aux Etats-Unis, avec environ 30 millions de personnes sur 40 millions souffrant de pollinoses. Introduite involontairement en France au XIXème siècle, l'ambrosie est une plante fortement
15 invasive qui a rapidement progressé à partir de la région Rhône-Alpes vers le nord de la France. Ainsi, en 2011, des pieds d'ambrosie ont été retrouvés dans l'Ile de France.

Le pollen de cette plante provoque chez les personnes sensibles une réaction allergique caractérisée par sa sévérité. Globalement, la rhinite allergique à l'ambrosie est beaucoup plus
20 sévère que celle causée par d'autres pollens. Les symptômes tels que prurit, anosmie (perte ou diminution de la sensibilité aux odeurs), rhinorrhée, éternuements et obstruction nasale sont plus importants. De plus, dans 50% des cas, cette allergie évolue en un asthme, souvent plus sévère que celui provoqué par d'autres pollens. Ces symptômes sont d'autant plus prononcés que le taux de pollen dans l'air est élevé.

25 Dans la région Rhône-Alpes, l'allergie à l'ambrosie touche aujourd'hui 6 à 12% de la population entre fin août et début septembre. Ainsi, pour cette seule région, le nombre total de consommateurs de médicaments antiallergiques à l'ambrosie a fortement augmenté (+60%) entre 2008 et 2011, passant de 161 200 à 258 700 personnes, et les dépenses de santé engendrées par cette allergie représentent entre 5,6 et 8,6 millions d'euros. L'allergie à
30 l'ambrosie représente donc aujourd'hui un véritable problème de santé publique. Le plus simple pour se protéger des risques d'allergie serait d'éviter les expositions au pollen d'ambrosie, mais une éviction totale semble d'ores et déjà impossible malgré des arrêtés préfectoraux rendant obligatoire la destruction de l'ambrosie. Ces mesures n'ont pas permis d'enrayer la propagation de cette plante invasive dans un grand nombre de régions.

Les traitements dits « symptomatiques » soit par voie locale (gouttes, collyres, sprays), soit par voie générale (comprimés, gélules), permettent de soulager les symptômes pendant la période où les pollens sont présents dans l'air. Mais les symptômes reviennent rapidement dès l'arrêt du traitement. A l'inverse des traitements "symptomatiques", l'immunothérapie allergénique (ou désensibilisation) est le seul traitement susceptible de modifier l'évolution de la maladie allergique. Cette voie thérapeutique permet de traiter la cause de l'allergie contrairement aux médicaments dits « symptomatiques ». Toutefois, comme pour les autres allergies, les extraits utilisés aujourd'hui pour la désensibilisation des patients allergiques à l'ambrosie sont d'une qualité insuffisante pour que ce traitement soit efficace. Plusieurs allergènes d'ambrosie ont été caractérisés, en particulier Amb a 1 qui est responsable de plus de 80% des cas d'allergie à l'ambrosie. Différentes tentatives de production d'un Amb a 1 recombinant destiné à une désensibilisation spécifique ont échoué. En effet, Amb a 1 est une protéine végétale complexe présentant des maturations post-traductionnelles typiquement végétales, et seul un système d'expression végétale sera capable de produire cet allergène sous une forme utilisable et efficace en immunothérapie allergénique.

Il existe donc un besoin pour produire cet allergène Amb a 1 sous forme recombinante, avec une bonne qualité, et de façon reproductible et efficace (avec un bon rendement). Par « bonne qualité », on entend que l'allergène est très fortement similaire, dans sa séquence et sa structure, à l'allergène présent naturellement dans l'ambrosie. Il existe également un besoin pour produire cet allergène à des niveaux commercialement et économiquement acceptables.

De façon surprenante, les inventeurs ont maintenant découvert que la production de l'allergène Amb a 1, bien que toxique *in vivo*, sous forme recombinante est possible, par expression transitoire chez les plantes. Cette production, qui se fait dans une cellule végétale, permet l'obtention de l'allergène Amb a 1 sous forme mature et active, avec un bon rendement, de façon très simple et reproductible. En outre, l'allergène Amb a 1 obtenu n'est pas contaminé par des protéases et/ou d'autres contaminants d'origine végétale. Les inventeurs ont ainsi pu obtenir une production, à des niveaux commercialement acceptables, de l'allergène Amb a 1.

L'invention a donc pour objet une cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préprotéine

d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S. La molécule d'ADN liée au promoteur fort permet d'exprimer de façon transitoire la pectate lyase mature et active dans la cellule. De préférence, ladite cellule végétale est une cellule de *Nicotiana benthamiana*. De préférence, la cellule végétale selon l'invention comprend une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine de la pectate lyase liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S, ladite molécule d'ADN n'étant pas intégrée dans le génome de la cellule végétale.

10

La pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1 est appelée « pectate lyase selon l'invention » dans la présente demande.

15 L'invention a également pour objet une plante comprenant au moins une cellule végétale selon l'invention.

Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé de production d'une pectate lyase selon l'invention, comprenant l'expression de ladite pectate lyase dans une cellule végétale selon l'invention, ou dans une plante comprenant une telle cellule.

20 Un autre objet de l'invention se rapporte à une pectate lyase susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, avec une cellule végétale selon l'invention, ou avec une plante selon l'invention. La pectate lyase ainsi obtenue peut être utilisée comme médicament. Elle peut également être utilisée en immunothérapie allergique, seule ou en combinaison avec au moins un autre allergène d'Asteracée. Elle peut également être utilisée dans le diagnostic
25 d'allergies, et être intégrée dans un kit de diagnostic d'allergies.

La cellule végétale selon l'invention comprend une molécule d'ADN liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S. Par « lié de manière fonctionnelle », on entend que la molécule d'ADN est fusionnée avec le promoteur fort, de telle sorte que le promoteur fort induise la transcription de la molécule d'ADN.

30

Cela permet l'expression de ladite molécule d'ADN sous forme transitoire, i.e. sans intégration de l'ADN, notamment l'ADNc, dans le génome de la cellule végétale. En effet, l'utilisation de l'expression transitoire dans une cellule végétale ou une plante selon l'invention permet d'augmenter les rendements de production de la pectate lyase selon

l'invention sous forme active jusqu'à des niveaux élevés, compatibles avec une exploitation commerciale, mais incompatibles avec la survie d'une plante qui exprimerait ces pectates lyases toxiques de façon stable. Dans le cas d'une expression transitoire, la récolte de la biomasse végétale a lieu lors du pic d'expression de la protéine recombinante, i.e. typiquement 4 à 6 jours après la transfection.

De préférence, la cellule végétale selon l'invention comprend un vecteur d'expression comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S.

10

Amb a 1 est une pectate lyase provenant d'*Ambrosia artemisiifolia*. Reconnu par plus de 80 % des patients sensibilisés à l'ambrosie, cet allergène est responsable de plus de 90 % de l'activité allergénique du pollen d'ambrosie. C'est une protéine de 38 kDa décrite comme non glycosylée appartenant à la famille des pectates lyases. Douze isoformes de Amb a 1 sont recensées, de Amb a 1.0101 à Amb a 1.0502 (d'après le site www.allergome.org).

15

Les séquences nucléique et d'acides aminés des douze isoformes sont détaillées dans le tableau 1 ci-dessous :

Isoallergènes	N° d'accension (GenBank) Séquence nucléique	N° d'accension (UniProt) Séquence d'acides aminés
Amb a 1.0101	<u>M80558</u>	<u>P27759</u>
Amb a 1.0201	<u>M62981</u>	<u>P27760</u>
Amb a 1.0202	<u>FR669658</u>	<u>E1XUL3</u>
Amb a 1.0301	<u>M62961</u>	<u>P27761</u>
Amb a 1.0302		<u>P27761 (variant L48Y)</u>
Amb a 1.0303	<u>M80560</u>	<u>P27761 (variant H392R)</u>
Amb a 1.0304	<u>FR669659</u>	<u>E1XUL4</u>
Amb a 1.0305	<u>FR669660</u>	<u>E1XUL5</u>
Amb a 1.0401	<u>M80562</u>	<u>P28744</u>
Amb a 1.0402	<u>FR669664</u>	<u>E1XUL9</u>
Amb a 1.0501	<u>M80561</u>	<u>P27762</u>
Amb a 1.0502	<u>FR669666</u>	<u>E1XUM1</u>

Tableau 1 : les douze isoformes d'Amb a 1, leurs séquences nucléiques et protéiques

Par « Amb a 1 » selon l'invention, on entend les douze isoformes précitées dans le tableau 1 ci-dessus. Les séquences protéiques décrites dans ce tableau 1 correspondent aux préproprotéines des différentes isoformes.

20

- Amb a 1 subit une protéolyse dans le grain de pollen et/ou au cours du processus d'extraction ou de purification résultant en deux chaînes, alpha (26 kDa) et bêta (12 kDa), associées de façon non covalente (King et al, 1974, 1981). Il a été démontré que des modifications chimiques d'Amb a 1, y compris la réduction et l'alkylation des ponts disulfures ainsi que le processus de dénaturation/renaturation par l'urée ou la succinylation des résidus lysine, réduit sa réactivité vis-à-vis des IgE (King, 1976; Smith et al, 1988). Les sous-chaînes alpha et bêta d'Amb a 1 ont une réactivité différente sur les IgE et les lymphocytes T. En effet, Amb a 1 bêta contient un nombre important d'épitopes fixant les IgE, tandis que Amb a 1 alpha se comporte comme un hypoallergène et stimule l'activité des cellules T.
- 10 De préférence, Amb a 1 a pour séquence protéique SEQ ID NO :7 (préproprotéine). De préférence, la sous-unité bêta a pour séquence protéique SEQ ID NO :8. De préférence, la sous-unité alpha a pour séquence protéique SEQ ID NO :9.

- Par « homologues d'Amb a 1 », on entend des protéines de la famille des Astéracées qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1. De préférence, l'homologue d'Amb a 1 est une protéine de plante du genre *Ambrosia* ou *Artemisia*, plus préférentiellement d'*Artemisia vulgaris*, d'*Ambrosia psilostachya* ou d'*Ambrosia trifida*, qui présente au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1. De préférence, l'homologue d'Amb a 1 est choisi parmi Amb p 1 (provenant d'*Ambrosia psilostachya*, de code d'accèsion 9064 sur www.allergome.org) et Art v 6 (provenant d'*Artemisia vulgaris*, de numéro d'accèsion A0PJ16 dans Uniprot).

- 25 Par "pourcentage d'identité" entre deux séquences d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", on entend l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé.
- 30 Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite

comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981, J. Mol Evol., 18:38-46), au moyen de
5 l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988, PNAS, 85: 2444-2448), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

10

Ainsi, de préférence, la pectate lyase selon l'invention est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines de la famille des Astéracées qui
15 présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

20

Plus préférentiellement, la pectate lyase selon l'invention est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité
alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines d'*Artemisia vulgaris*, d'*Ambrosia psilostachya* ou d'*Ambrosia trifida*, qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

25

La molécule d'ADN comprend au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine de la pectate lyase selon l'invention.

30

La préproprotéine de la pectate lyase selon l'invention comprend un peptide signal, un propeptide et la pectate lyase mature. La séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine selon l'invention comprend donc une séquence codant le peptide signal, une
séquence codant le propeptide et une séquence codant la pectate lyase mature. De préférence, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine selon l'invention comprend une séquence codant le peptide signal, une séquence codant le propeptide de la sous-unité bêta, une séquence codant la sous-unité bêta, une séquence codant le propeptide de la sous-unité alpha et une séquence codant la sous-unité alpha.

Le peptide signal est notamment tout peptide signal reconnu par la cellule végétale, provenant ou non d'une pectate lyase. Il cible notamment la pectate lyase selon l'invention dans le milieu intercellulaire. De préférence, le peptide signal est celui de la chitinase de tabac, ou le peptide signal naturel de la pectate lyase.

5 Le propeptide est, quant à lui, le propeptide naturel d'une pectate lyase, ou bien le propeptide d'une peptidase C1A. Dans un mode de réalisation préféré, le propeptide est un propeptide de peptidases C1A, notamment d'acariens ou d'origine végétale. De préférence, le propeptide de peptidase C1A est le propeptide naturel ou le propeptide muté ou non de Der p1. De préférence, le propeptide de peptidase C1A est choisi parmi le propeptide naturel de peptidase
10 C1A et la séquence SEQ ID NO :6 (i.e. les acides aminés 19 à 98 de la séquence Uniprot p08176). Dans un mode de réalisation préférée de la présente invention, la pectate lyase selon l'invention est produite en fusion avec son propre propeptide ou en fusion avec le propeptide de peptidase C1A d'acariens ou en fusion avec un propeptide de peptidase C1A végétale, afin d'augmenter les rendements de production de la protéine.

15

De préférence, la séquence de la préproprotéine de pectate lyase est choisie parmi les séquences protéiques listées dans le tableau 1 ci-avant et les séquences présentant au moins 57%, de préférence au moins 60%, de préférence au moins 64% d'identité avec l'une de ces dernières.

20

De préférence, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine est choisie parmi SEQ ID NO :1 à 5. De préférence, elle a pour séquence SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 ou SEQ ID NO :5.

25 Selon l'invention, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine peut être obtenue à partir d'un gène connu déjà cloné codant pour une pectate lyase selon l'invention, ou bien par criblage d'une banque d'ADNc avec des anticorps anti-pectate lyase. Les méthodes utilisées sont bien connues de l'homme de l'art, et incluent notamment l'identification du gène par hybridation avec des sondes, PCR, séquençage et clonage
30 moléculaire. Il est également possible de synthétiser le gène pour refléter l'utilisation des codons préférés chez les plantes ; dans ce cas, on parle d'optimisation de codons, souvent utile pour une forte expression des protéases sélectionnées (Murray et al, Nucleic Acid Res. 17:477 498 (1980)).

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine comprend en outre une séquence, appelée séquence d'adressage intracellulaire. Cette séquence permet de cibler un compartiment de stockage de la pectate lyase selon l'invention, afin de contrôler sa maturation. Cette maturation est nécessaire pour l'obtention des pectates lyases sous la forme la plus adaptée pour le diagnostic d'allergie et l'immunothérapie. De préférence, cette séquence peptidique d'adressage cible la pectate lyase selon l'invention sous forme soluble ou membranaire vers le réticulum endoplasmique ou les différents compartiments constitutifs du système endomembranaire de sécrétion de la cellule végétale.

10

Une fois que le gène d'intérêt a été isolé et modifié pour contenir tout ou partie des modifications décrites ci-dessus et obtenir la séquence nucléotidique hétérologue, cette dernière est placée dans un vecteur d'expression par des méthodes classiques. La sélection d'un vecteur d'expression approprié dépendra de la méthode d'introduction du vecteur d'expression dans des cellules hôtes. Un vecteur d'expression typique contient des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de répllication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique à fournir pour la croissance et la sélection du vecteur d'expression dans l'hôte bactérien, un site de clonage pour l'insertion d'une séquence d'ADN exogène codant pour la pectate lyase; des éléments d'ADN eucaryotes comme une séquence d'initiation de la transcription du gène exogène, comme un promoteur, et des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation et une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing. Il contient également des séquences telles que des t-DNA qui sont nécessaires pour l'intégration d'un morceau d'ADN dans la plante ou dans la cellule végétale.

25

De préférence, le vecteur d'expression comprend :

- des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de répllication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique ;
- au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S ;
- une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing, de préférence p19 ; et

30

- des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos (séquence de terminaison de la nopaline synthase).

De préférence, le vecteur d'expression est pAG01.

5

Les promoteurs utilisés pour contrôler l'expression de la pectate lyase sont des promoteurs forts, et peuvent être des promoteurs de gènes de plantes, tels que par exemple, le promoteur de l'ubiquitine, le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose-1, 5-bis-phosphate carboxylase, des promoteurs *d'Agrobacterium tumefaciens*, les promoteurs de la nopaline-synthase et de l'octopine synthase, ou encore des promoteurs viraux comme les 19S et 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). De préférence, le promoteur fort est le 35S.

10

L'expression élevée et la qualité des pectates lyases recombinantes produites dans l'invention permettent de concevoir leur production commerciale. En effet, la pectate lyase selon l'invention est typiquement exprimée en une quantité égale à au moins 0,1 % des protéines solubles totales de la plante, mais souvent en une quantité beaucoup plus élevée, pouvant atteindre 5 à 10%.

15

La plante comprenant les cellules végétales selon l'invention peut être une plante entière, mais peut également être une partie de plante, telle que des feuilles.

20

La plante ou les cellules végétales selon l'invention peuvent être utilisées en tant que telles, comme médicament.

25

La plante ou les cellules végétales selon l'invention peuvent être utilisées en tant que telles, pour des applications comme biocarburant, dans la nutrition animale, ou encore dans la production de papier ou de textile (fibres de coton notamment).

30

Dans d'autres applications, la pectate lyase recombinante est purifiée après extraction à partir de la plante ou des cellules végétales qui l'expriment. Afin de faciliter sa purification, l'enzyme pourra être exprimée en fusion avec des tags (His6, GST, MBP, FLAG etc..) qui seront localisés de préférence en position N- ou C-terminale de la protéine mature.

La pectate lyase selon l'invention susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, avec une cellule végétale selon l'invention, ou avec une plante selon l'invention, peut être utilisée comme médicament. Elle peut également être utilisée en immunothérapie allergique,

seule ou en combinaison avec au moins un autre allergène d'Asteracée. Cet autre allergène d'Asteracée peut être choisi parmi Amb a 11, Amb a 5 et leurs mélanges.

Elle peut également être utilisée dans le diagnostic d'allergies, notamment d'allergies aux pollens. L'invention a donc également pour objet un kit de diagnostic d'allergies, comprenant
5 la pectate lyase selon l'invention, et des moyens de mesure des anticorps dirigés contre cette protéine. L'invention a également pour objet un kit de diagnostic d'allergies, comprenant la pectate lyase selon l'invention, des moyens de mesure des anticorps dirigés contre cette protéine, et des moyens de mesure des anticorps dirigés contre un autre allergène d'Asteracée, par exemple l'allergène Amb a 11 ou Amb a 5.

10

Les méthodes générales de culture de plantes, ainsi que les procédés pour introduire des vecteurs d'expression dans un tissu végétal, sont à la disposition de l'homme de l'art. Ils sont variés et dépendent de la plante sélectionnée. De préférence, les plantes seront cultivées selon les techniques propres à la plateforme Allergopur. Ce procédé de production de protéines
15 recombinantes est décrit dans la demande FR1255510, et comprend une première étape de culture de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, de préférence culture sur flotteur libre, et sous éclairage LEDs. Après cette première étape, notamment cinq semaines de culture en hydroponie sur des flotteurs libres, l'agroinfiltration des plantes est réalisée sous vide, par des agrobactéries comprenant un fragment d'ADN codant pour la pectate lyase selon l'invention.
20 Cette étape d'agroinfiltration peut être mise en œuvre par tout moyen permettant de faire le vide. De préférence, dans le procédé utilisé selon l'invention, elle est réalisée sous vide par effet Venturi. Parmi les agrobactéries utilisables selon l'invention, on peut citer de préférence, les souches LBA4404, GV3101, EHA 101/105 ou C58. Selon une première alternative, une fois l'étape d'agroinfiltration réalisée, les plantes sont typiquement égouttées tête en bas
25 pendant 15 minutes, puis remises en culture, typiquement 3 à 6 jours, idéalement en assurant une brumisation fréquente de ces dernières pendant les 6 premières heures de culture qui suivent l'agroinfiltration. Enfin, la protéine est extraite et purifiée. Selon une seconde alternative, une fois l'étape d'agroinfiltration réalisée, les plantes sont directement remises en culture, typiquement 3 à 6 jours, puis la protéine est extraite et purifiée.

30

Ainsi, de préférence, l'invention a également pour objet un procédé de production d'une pectate lyase selon l'invention dans une cellule végétale ou une plante, comprenant les étapes suivantes :

- a) transformation d'agrobactéries avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort ; et
- b) transfection de la cellule végétale ou de la plante avec les agrobactéries obtenues à l'étape a).

De préférence, les agrobactéries utilisables dans l'étape a) sont choisies parmi les souches LBA4404, GV3101, EHA 101/105 et C58. De préférence, le vecteur d'expression utilisé dans l'étape a) comprend :

- des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de répllication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique ;
- au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S ;
- une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing, de préférence p19 ; et
- des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos.

La transformation de l'étape a) se fait typiquement par des méthodes connues de l'art antérieur, par exemple par chocs thermiques avec passages successifs à 4°C, -80°C et 37°C.

La transfection de l'étape b) comprend de préférence les étapes suivantes :

- b1) culture de la cellule végétale ou de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, et sous éclairage LEDs, de préférence pendant cinq semaines en hydroponie sur des flotteurs libres,
- b2) agroinfiltration de la cellule végétale ou plante obtenue en b1) sous vide, par les agrobactéries obtenues à l'étape a). Cette étape d'agroinfiltration est, de préférence, réalisée sous vide par effet Venturi.
- b3) remise en culture de la cellule végétale ou de la plante obtenue en b2), typiquement pendant 3 à 6 jours.

Enfin, de préférence, la pectate lyase selon l'invention ainsi produite est extraite et purifiée.

Les exemples qui suivent, illustrent, mais ne visent pas à limiter la portée de l'invention. Il sera évident pour l'homme de l'art que des variantes et modifications sont possibles et entrent dans le cadre et l'esprit de l'invention.

5 Les légendes des figures sont les suivantes :

Figure 1 : Représentation schématique des différentes cassettes permettant de produire une pectate lyase Amb a 1 mature et active (A, B, C, F et G) ou la sous-unité alpha (E et I) ou la sous-unité bêta (D et H), en utilisant soit le peptide signal et le propeptide naturel de la protéine (A-F), soit le peptide signal de la chitinase de tabac et un propeptide de la famille des peptidases C1A (G-I) afin d'augmenter les rendements.

10

La pectate lyase est également produite sous forme mutée sur la lysine 180 (K180) afin de limiter la protéolyse permettant la production des sous-unités alpha et bêta (F).

15

A (SEQ ID NO :1): ADNc codant pour la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265,

B (SEQ ID NO : 2): ADNc optimisé pour une utilisation chez *N.benthamiana*, codant pour la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265,

20

C (SEQ ID NO : 3): ADNc harmonisé codant pour la forme la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7). Cet ADNc contient des codons optimisés pour une utilisation chez *N.benthamiana*, mais comprend également des codons rares, afin de préserver le rythme de synthèse de la protéine pour une meilleure conservation de la structure 3D. Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265,

25

D (SEQ ID NO : 4) : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité bêta (de séquence SEQ ID NO :8). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

30

E (SEQ ID NO : 5) : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité alpha (de séquence SEQ ID NO :9). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

F : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la forme mutée (K180) de la protéine. Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

G : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la forme mature de la protéine fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M., 1996) et au propeptide Der p1 (p08176 – aa 19 à 98 ou SEQ ID NO :6). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

5 H : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité bêta de la protéine fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M., 1996) et au propeptide Der p1 (p08176 – aa 19 à 98 ou SEQ ID NO :6). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

10 I : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité alpha de la protéine fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M., 1996) et au propeptide Der p1 (p08176 – aa 19 à 98 ou SEQ ID NO :6). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

15 **Figure 2 : La plateforme AllergoPur** utilisée pour l'expression et la production des différentes formes de pectate lyase selon l'invention.

20 **Figure 3: Expression de la protéine Amb a 1.** Les protéines extraites de plantes transfectées par l'ADNc natif (F1-F3), par l'ADNc optimisé (F4-F6) ou par l'ADNc harmonisé (F7-F9) codant la protéine Amb a 1 ont été séparées par SDS-PAGE et analysées immuno-détection avec un anticorps dirigé contre une étiquette Flag. L'analyse par immuno-détection met en évidence la production spécifique de la protéine Amb a 1 et de la sous-unité alpha. La sous-unité bêta clivée n'est pas immunodéTECTÉE sur ce blot.

25 **Figure 4: Purification de l'allergène Amb a 1.** Les protéines extraites de plantes ont été transfectées sous vide avec l'ADNc harmonisé codant la protéine Amb a 1 par chromatographie IMAC. Puis les fractions retenues sur la colonne ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE. Compte tenu de la position C-terminale du Flag, deux polypeptides correspondant à la forme précurseur (préproprotéine) (Amb a 1p) et à la sous-unité alpha sont purifiés à partir de l'extrait transfecté par l'ADNc complet (piste 3). Ces deux polypeptides (Amb a 1 alpha et Amb a 1p) sont ensuite séparés (pistes 4 et 5 respectivement)
30 par chromatographie de tamisage moléculaire. Les deux polypeptides produits présentent une mobilité électrophorétique légèrement plus faible que les protéines natives. Cette différence s'explique par la présence du flag en position C-terminale.

Figure 5 : Expression de l'allergène Amb a 11. Les protéines extraites de 3 plantes (P1 – P3) transfectées par l'ADNc codant l'allergène Amb a 11 ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Les extraits protéiques sont analysés dès leur extraction (0H) ou après une incubation de 12h (12H) à température ambiante. L'incubation à température ambiante met en évidence l'accumulation de deux polypeptides correspondant à Amb a 11, ainsi que la dégradation quasi-totale des protéines de *N.benthamiana*. L'allergène Amb a 11 est donc produit sous forme active selon le même procédé que celui décrit présentement pour Amb a 1.

10 EXEMPLE :

Design moléculaire et synthèse de gène

Les ADNc sont synthétisés sous forme native, en optimisant l'usage des codons pour leur reconnaissance par le système végétal ou en harmonisant l'usage de codons (réintroduction de codons rares pour rythmer la synthèse de la protéine). Dans le cadre de cette invention, l'optimisation préférée est l'optimisation pour une expression chez *Nicotiana benthamiana*, comme indiqué en Figure 1.

Préparation des plasmides

Des sites de restriction Xba I/kpn I et Sal I/Sac I sont respectivement intégrés aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc lors de la synthèse. Ces sites sont ensuite utilisés afin de cloner les ADNc dans le vecteur binaire d'expression pAG01 (Figure 1). Les ADNc sont clonés en amont d'un promoteur 35S (35S) et en aval d'une séquence de terminaison de la nopaline synthase (Tnos) ; le vecteur pAG01 contient en outre une cassette d'expression permettant d'exprimer l'inhibiteur de silencing p19 simultanément de la protéine recombinante afin d'augmenter les rendements de production. Les vecteurs sont ensuite utilisés pour transformer la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

30 Expression transitoire de pectates lyases selon l'invention dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* – Utilisation de la plateforme AllergoPur

Pour la production par expression transitoire *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 est utilisé pour le transfert d'un ADNc codant la pectate lyase sans que le gène d'intérêt soit intégré dans le génome de la cellule végétale : on parle ici de transfection et non de transgénèse. Les plantes sont cultivées en condition hydroponique en présence d'un milieu nutritif (GHE,

floragrow, floramicro, florabloom, 10mL/ 15mL/ 5mL pour 10 L d'eau osmosée) et sous éclairage LED.

L'agrobactérie est transférée dans le tissu foliaire par agro-infiltration selon deux procédés.

5 Pour la production de petits lots de pectates lyases destinés au criblage de prototypes, les agrobactéries sont injectées manuellement grâce à une seringue appliquée contre l'épiderme de la face inférieure de la feuille. Des disques foliaires prélevés dans les feuilles 4 à 6 jours après l'agro-infiltration sont utilisés pour l'analyse des différents prototypes de pectates lyases. Cette étape de criblage permet de définir le vecteur d'expression qui sera utilisé pour l'obtention d'une pectate lyase de qualité optimale. Le même procédé est utilisé pour la

10 production commerciale à grande échelle mais, dans ce cas, l'agro-infiltration s'effectue sous vide, dans des enceintes contenant plusieurs litres d'une culture d'agrobactéries et où plusieurs dizaines de plantes sont infiltrées simultanément. Ces plantes sont ensuite remises en culture pendant 4 à 6 jours avant la purification des pectates lyases à partir des extraits foliaires (Figure 2).

15

Expression de la pectate lyase Amb a 1 et de ses sous-unités

L'expression des protéines ainsi que les rendements sont respectivement analysés par Western blotting et ELISA. Les résultats sont illustrés pour les 3 formes d'ADNc codant la protéine naturelle (Figure 3).

20

Les protéines exprimées sont actives. En effet, l'expression d'Amb a 1 provoque des nécroses importantes dès le 4^{ème} jour d'expression comparé à des plantes contrôles. Ces nécroses sont dues à une forte activité pectate lyase (Liu et al, 2010).

25 Purification et caractérisation

Comme l'illustre la figure 4, les pectates lyases sont extraites à partir de la biomasse fraîche ou congelée puis purifiées sur colonne IMAC (HisTrap Excell).

Cette purification permet la production de la forme précurseur (préproprotéine) et de la sous-unité alpha.

30

Enfin, comme le montre la figure 5, il est possible de combiner les allergènes Amb a 1 et Amb a 11 obtenus par le procédé selon l'invention, pour obtenir une composition utilisable en immunothérapie allergique.

REVENDICATIONS

1. Cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, et dans laquelle ladite molécule d'ADN n'est pas intégrée dans le génome de la cellule végétale.

2. Cellule végétale selon l'une des revendications 1, dans laquelle la pectate lyase est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines de la famille des Astéracées qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

3. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 2, dans laquelle la pectate lyase est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines d'*Artemisia vulgaris*, d'*Ambrosia psilostachya* ou d'*Ambrosia trifida*, qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

4. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle la séquence nucléotidique hétérologue comprend une séquence codant le peptide signal, une séquence codant le propeptide et une séquence codant la pectate lyase mature.

5. Cellule végétale selon la revendication 4, dans laquelle :

- le peptide signal est choisi parmi le peptide signal naturel de la pectate lyase et le peptide signal de la chitinase de tabac ; et
- le propeptide est choisi parmi les propeptides naturels de pectates lyases et les propeptides de peptidases C1A.

6. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle la séquence nucléotidique hétérologue comprend en outre une séquence peptidique d'adressage intracellulaire qui cible la pectate lyase sous forme soluble ou membranaire vers le réticulum endoplasmique ou les différents compartiments constitutifs du système endomembranaire de sécrétion de la cellule végétale.

7. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 6, qui comprend un vecteur d'expression comprenant :

- des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de répllication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique ;
- la séquence nucléotidique hétérologue telle que définie dans l'une des revendications précédentes ;
- une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing, de préférence p19 ; et
- des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos.

8. Plante comprenant au moins une cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Procédé de production d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les homologues d'Amb a 1, comprenant l'expression de ladite pectate lyase dans une cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 7, ou dans une plante selon la revendication 8.

10. Procédé de production d'une pectate lyase selon la revendication 9, comprenant les étapes suivantes :

- a) transformation d'agrobactéries avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort ; et
- b) transfection de la cellule végétale ou de la plante avec les agrobactéries obtenues à l'étape a).

11. Procédé de production d'une pectate lyase selon la revendication 10, dans lequel les agrobactéries utilisées dans l'étape a) sont choisies parmi les souches LBA4404, GV3101,

EHA 101/105 et C58, et dans lequel la transfection de l'étape b) comprend de préférence les étapes suivantes :

b1) culture de la cellule végétale ou de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, et sous éclairage LEDs, de préférence pendant cinq semaines en hydroponie sur des flotteurs libres,

b2) agroinfiltration de la cellule végétale ou plante obtenue en b1) sous vide, par les agrobactéries obtenues à l'étape a) ; et

b3) remise en culture de la cellule végétale ou de la plante obtenue en b2), typiquement pendant 3 à 6 jours.

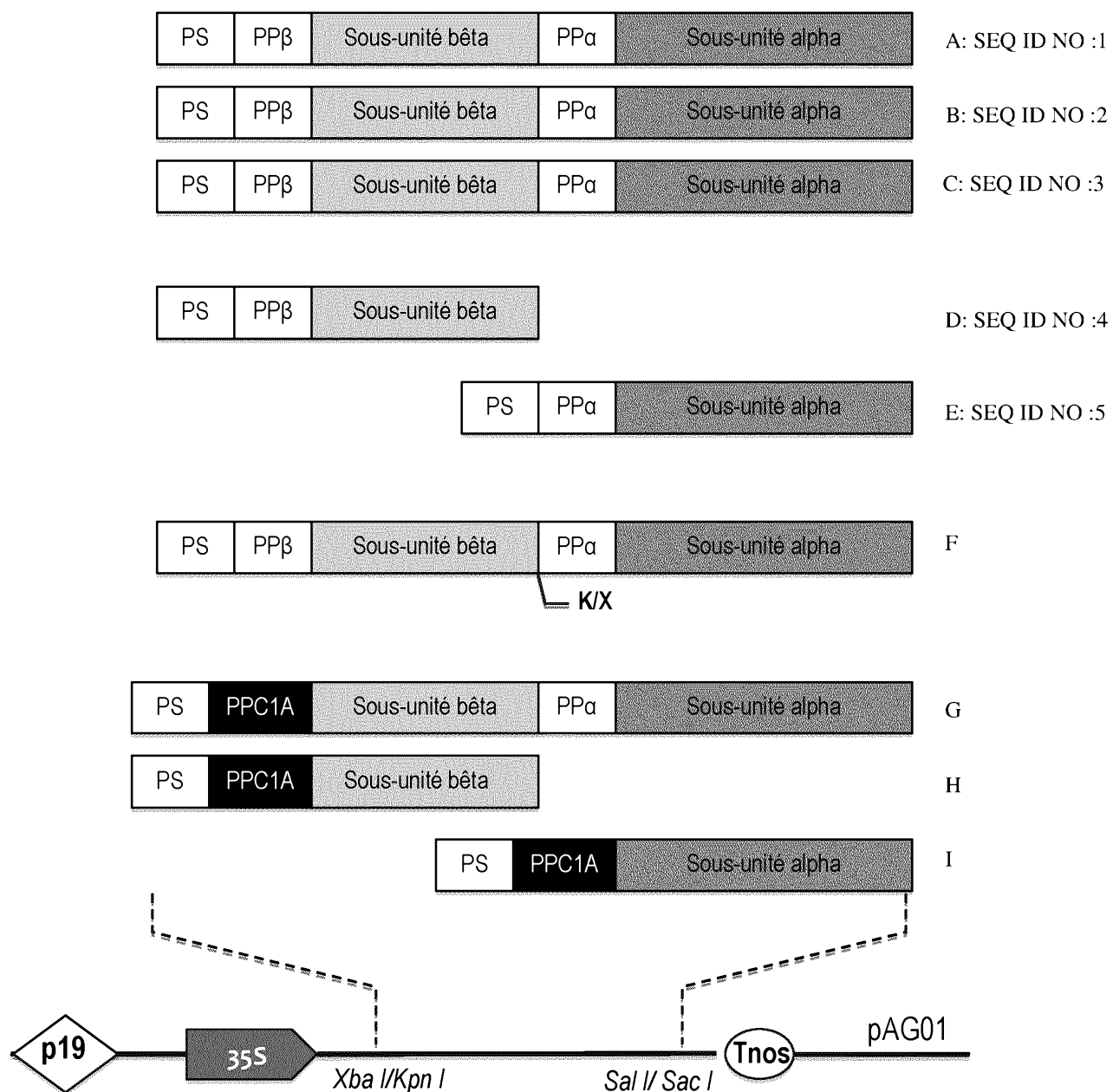
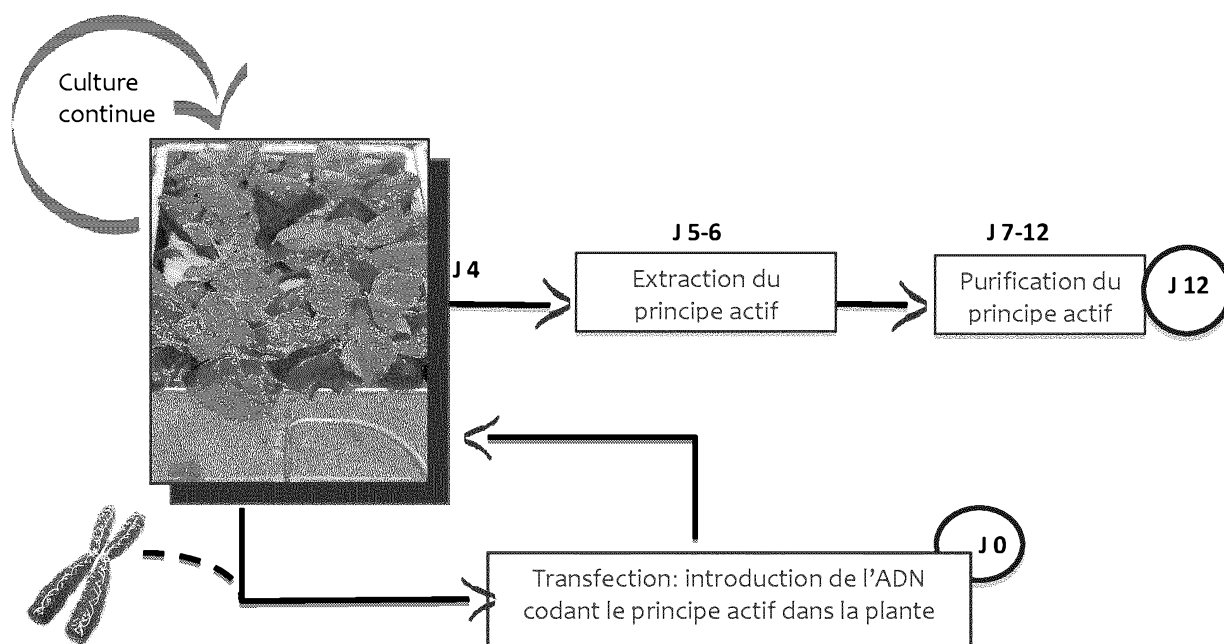
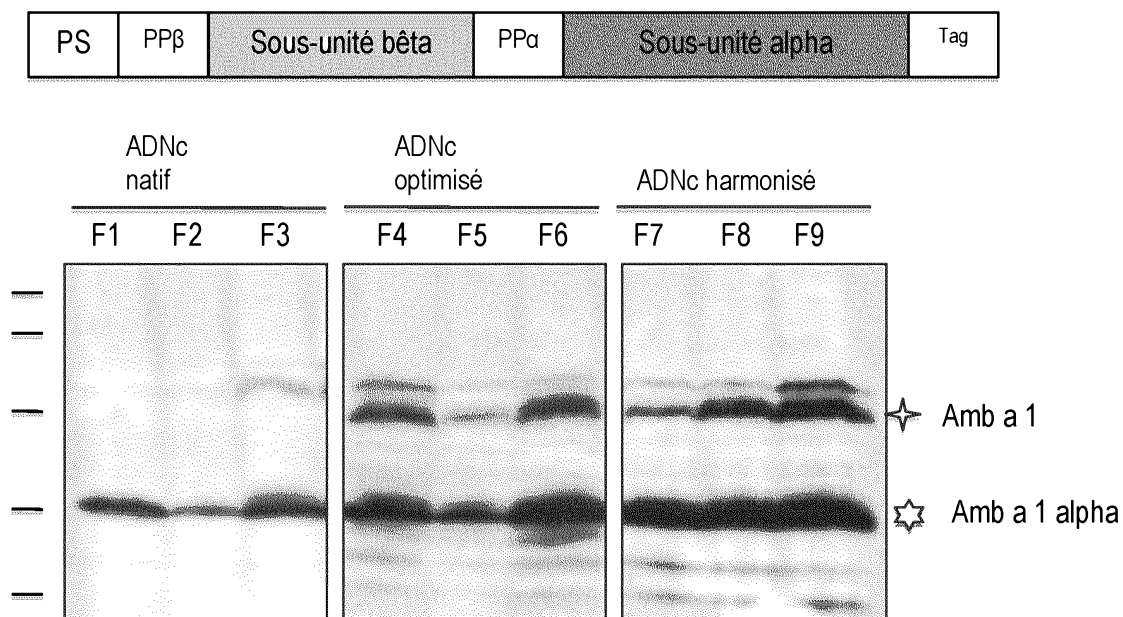
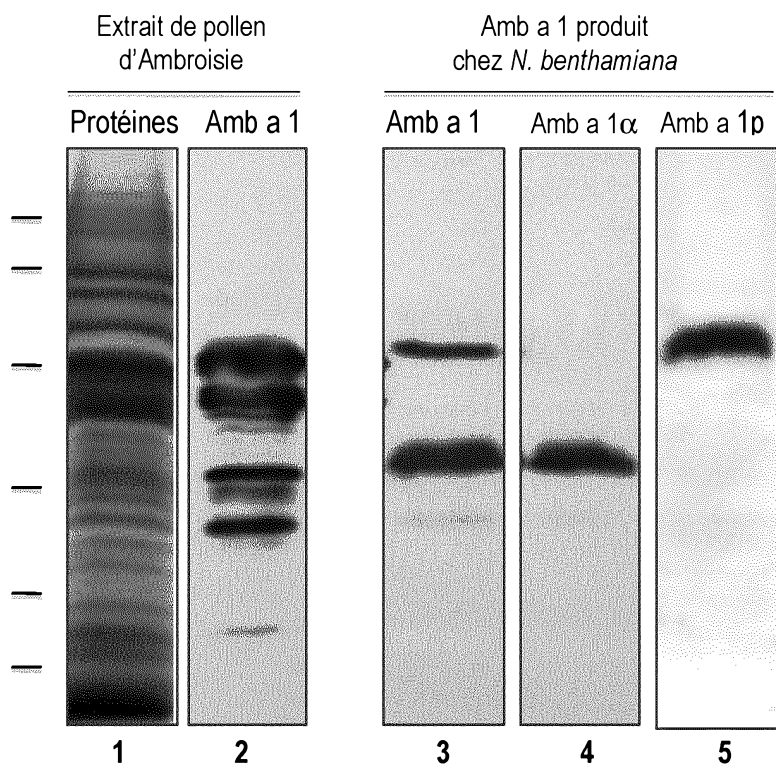
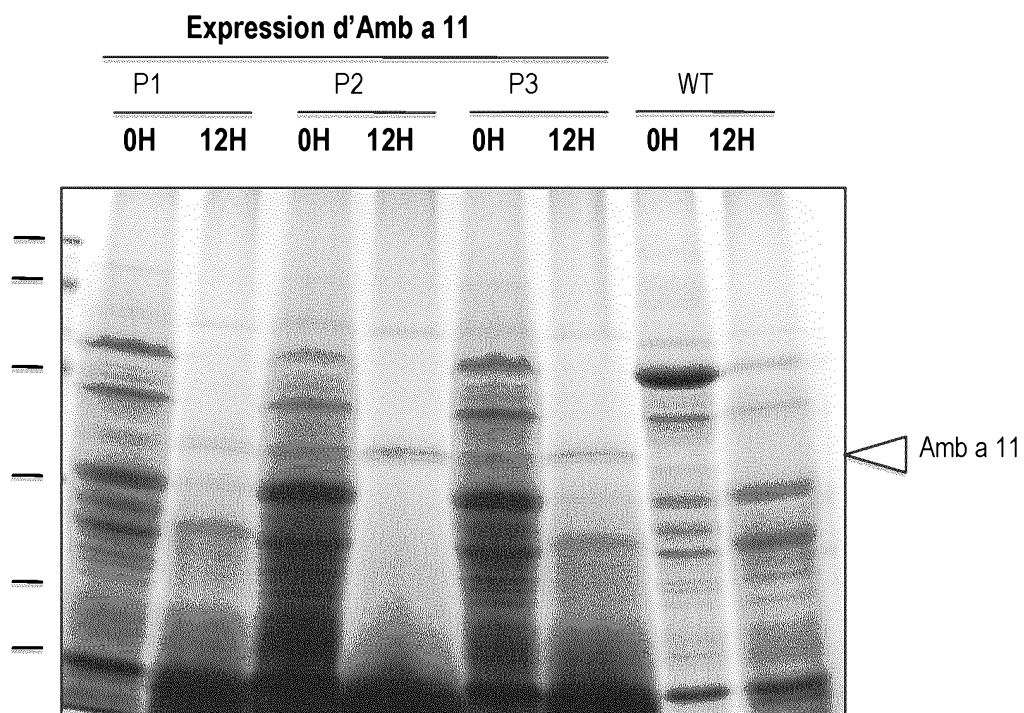


Figure 1

**Figure 2**

**Figure 3**

**Figure 4**

**Figure 5**

Listage_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> ANGANY GENETICS

<120> Production commerciale de l'allergène Amb A1 par expression transitoire chez les plantes

<130> BFF140239

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1254

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADNc codant pour la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7)

<400> 1

tctagaggta ccatggggat caaacactgt tgttacatct tgtatTTTtac ctagccctt	60
gtcacttttg tgcaacctgt tcgTtctgcc gaagatctcc aggaaatctt accagttaac	120
gaaacaagga ggctgacaac aagtggagca tacaacatta tagacgggtg ctggaggggc	180
aaagccgatt gggcggaaaa ccgaaaagcg ttagccgatt gtgccaagg tttTgggaag	240
ggaacagtgg gcggaaaaga tggTgatata tacacggTca ccagtgagct agatgatgat	300
gTtgcaaatc caaaagaagg cacactccgg tTtggTgccg cccaaaacag gccctTgtgg	360
atcattttttg aaagagatat ggtgattcgt ttggataaag agatggtggt aaacagtgac	420
aagaccatcg atggccgagg ggcgaaagtt gaaatcatta acgctggTtt cacccttaat	480
ggtgtcaaga atgtaatcat tcataacata aatatgcatg atgtTaaagt gaatccagga	540
ggcctgatta agtccaacga tggTccagca gTcCaagag ctggtagtga tggTgatgct	600
ataagtattt ctggtagTtc acaaatatgg atcgaccatt gTtcgctcag taagtctgtt	660
gatgggctgg tagatgcca gctcggcacc acacgctTaa ccgTttcca cagcttattc	720
accCaacacc agTttgtact attattcggg gctggTgacg aaaatattga agatagaggc	780
atgctagcaa cggTcgtTtt caacacgTtc actgataacg ttgaccaaag aatgcctaga	840
tgtcggcatg ggtttttcca agtcgTtaac aacaactatg ataaatgggg atcgtatgcc	900
atcggtggta gcgcgtcccc aaccatactc agccaagggg acagattctg cgccccgat	960
gaacgcagca agaaaaatgt cctaggaagg catggtgaag ccgccgcaga gTcgatgaag	1020
tggaaactgga gaacgaataa agacgtgctt gaaaatggTg ctattttTgt tgcattccggg	1080
gTcgatccag tgctaacccc tgagcaaagc gcagggatga ttccagccga accaggagag	1140
tccgctctaa gcctcactag tagtgctggt gtactctcat gccaacccgg agcacctTgc	1200
catcatcatc atcatcatga ttataaagat gatgatgata aagTttgagt cgac	1254

<210> 2

<211> 1254

<212> DNA

Listage_ST25

<213> Artificial sequence

<220>

<223> ADNc optimisé pour une utilisation chez N.benthamiana, codant pour la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7)

<400> 2

```
tctagaggta ccatgggcat caagcactgc tgctacatcc tctacttcac cctcgccctc      60
gtcaccctcc tccagcccgt ccgctccgcc gaggacctcc aggagatcct ccccgtcaac      120
gagacccgcc gcctcaccac ctccggcgcc tacaacatca tcgacggctg ctggcgcggc      180
aaggccgact gggccgagaa ccgcaaggcc ctcgccgact gcgcccaggg cttcggcaag      240
ggcaccgtcg gcggcaagga cggcgacatc tacaccgtca cctccgagct cgacgacgac      300
gtcgccaacc ccaaggaggg caccctccgc ttcggcgccg cccagaaccg ccccctctgg      360
atcatcttcg agcgcgacat ggtcatccgc ctcgacaagg agatggtcgt caactccgac      420
aagaccatcg acggccgchg cgccaaggtc gagatcatca acgccggctt caccctcaac      480
ggcgtcaaga acgtcatcat ccacaacatc aacatgcacg acgtcaaggt caaccccggc      540
ggcctcatca agtccaacga cggccccgcc gccccccgcy cgggctccga cggcgacgcc      600
atctccatct ccggctcctc ccagatctgg atcgaccact gctccctctc caagtccgctc      660
gatggcctcg tcgatgcaa gctcggcacc acccgctca cegtctcaa ctccctcttc      720
accagcacc agttcgtcct cctcttcggc gccggcgacg agaacatcga ggaccgchg      780
atgctcgcca ccgtcgcctt caacaccttc accgacaacg ttgaccagcg catgccccgc      840
tgccgccacg gcttcttcca ggtcgtcaac aacaactacg acaagtgggg ctctacgcc      900
atcggcggct ccgcctcccc caccatctc tcccagggca accgcttctg ccccccgac      960
gagcgtcca agaagaacgt cctcggccgc cacggcgagg ccgccgccga gtccatgaag     1020
tggaactggc gcaccaaaa ggacgtcctc gagaacggcg ccatcttctg cgcctccggc     1080
gttgaccccg tcctacccc cgagcagtcc gccggcatga tccccgccga gcccgcgag     1140
tccgccctct ccctacctc ctccgccggc gtctctctct gccagcccgg cggcccctgc     1200
catcatcatc atcatcatga ttataaagat gatgatgata aagtttgagt cgac           1254
```

<210> 3

<211> 1254

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> ADNc harmonisé codant pour la forme la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7)

<400> 3

```
tctagaggta ccatggggat taaacactgt tgttacatth tgtactttac tctcgactc      60
gtgaccctcc tccagcctgt gcgctccgca gaggatcttc aggagattct cccagttaat     120
gagaccagga ggctgaccac ctccggagca tacaatatta tcgacggatg ctggagggga     180
aaggcagatt gggccgagaa tcggaaggcc ctcgcagatt gcgcacaagg ttttggaag     240
ggaaccgtgg gaggaaagga tggatgatc tacaccgtga cttccgagct cgatgatgat     300
```

Listage_ST25

gttgcaaadc caaaggaggg aaccctccgc ttcggtgcag cacagaatag gccctctgg 360
 attatTTTTg agagggatat ggtgattcgg ctcgataagg agatggtggt caattccgac 420
 aagactattg atggacgggg agccaagggt gagattatta atgctggttt cactctcaat 480
 ggtgttaaga atgtcattat tcataatadc aatatgcacg atgttaagggt gaatcctgga 540
 ggactgatta agtccaatga tggctctgca gctcctagag ctggttccga tggatgatgct 600
 atctccattt ccggttcctc ccagatctgg attgaccatt gttccctttc caagtccgtg 660
 gatggtctcg tcgatgctaa gcttggaaact acccgctca ctggttccaa ttcctcttc 720
 actcagcacc agtttgtcct cctcttcggc gctggtgacg agaatattga ggataggggt 780
 atgctcgcaa ccgtggcttt caataccttc accgataatg ttgaccagag gatgcctagg 840
 tgccggcatg gatTTTTcca ggtggttaat aataattacg ataagtgggg atcctacgca 900
 attggtggtt ccgctcccc tactatcctt tcccaggga ataggttctg cgcaccgat 960
 gagcgtcca agaagaatgt gctcggaagg cacggtgagg cagcagcaga gtccatgaag 1020
 tggaattgga ggaccaataa ggacgtgctc gagaatggtg ctatTTTTgt tgcacccgga 1080
 gttgatcctg tgctcactcc tgagcagtcc gcaggaatga ttctgcaga gcctggagag 1140
 tccgctctct cccttacctc ctccgctggt gtcctttct gccagcccgg agcaccttgc 1200
 catcatcatc atcatcatga ttataaagat gatgatgata aagtttgagt cgac 1254

<210> 4
 <211> 606
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité bêta

<400> 4
 tctagaggta ccatggggat caaacactgt tgttacatct tgtatTTTtac cttagccctt 60
 gtcactttgc tgcaacctgt tcgttctgcc gaagatctcc aggaaatctt accagttaac 120
 gaaacaagga ggctgacaac aagtggagca tacaacatta tagacgggtg ctggaggggc 180
 aaagccgatt gggcggaaaa ccgaaaagcg ttagccgatt gtgcccagg ttttgggaag 240
 ggaacagtgg gcggaaaaga tggatgataa tacacggtca ccagtgagct agatgatgat 300
 gttgcaaadc caaaagaagg cacactccgg tttggtgccg cccaaaacag gcccttgtgg 360
 atcatTTTTg aaagagatat ggtgattcgt ttggataaag agatggtggt aaacagtgac 420
 aagaccatcg atggccgagg ggcgaaagtt gaaatcatta acgctggttt cacccttaat 480
 ggtgtcaaga atgtaatcat tcataacata aatatgcatg atgttaaagt gaatccagga 540
 ggctgatta agcatcatca tcatcatcat gattataaag atgatgatga taaagtttga 600
 gtcgac 606

<210> 5
 <211> 786
 <212> DNA

Listage_ST25

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité alpha

<400> 5

```
tctagaggta ccatggggat caaacactgt tgttacatct tgtattttac cttagccctt      60
gtcactttgc tgcaacctgt tcgttctaac gatggtccag cagctccaag agctggtagt      120
gatggtgatg ctataagtat ttctggtagt tcacaaatat ggatcgacca ttgttcgctc      180
agtaagtctg ttgatgggct ggtagatgcc aagctcggca ccacacgctt aaccgtttcc      240
aacagcttat tcaccaaca ccagtttgta ctattattcg gggctgggta cgaaaatatt      300
gaagatagag gcatgctagc aacggtcgct ttcaacacgt tcaactgataa cgttgaccaa      360
agaatgccta gatgtcggca tgggtttttc caagtcgtta acaacaacta tgataaatgg      420
ggatcgtatg ccatcggtagg tagcgcgtcc ccaaccatac tcagccaagg gaacagattc      480
tgcgcccccg atgaacgcag caagaaaaat gtcctaggaa ggcatgggta agccgccgca      540
gagtcgatga agtggaactg gagaacgaat aaagacgtgc ttgaaaatgg tgctattttt      600
gttgcatccg gggtcgatcc agtgctaacc cctgagcaaa gcgcagggat gattccagcc      660
gaaccaggag agtccgctct aagcctcact agtagtgctg gtgtactctc atgccaaccc      720
ggagcacctt gccatcatca tcatcatcat gattataaag atgatgatga taaagtttga      780
gtcgac                                          786
```

<210> 6

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> propeptide Der p1

<400> 6

```
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> 7

<211> 417

<212> PRT

<213> *Ambrosia artemisiifolia*

Listage_ST25

<400> 7

Ser Arg Gly Thr Met Gly Ile Lys His Cys Cys Tyr Ile Leu Tyr Phe
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Pro Val Arg Ser Ala Glu Asp
20 25 30

Leu Gln Glu Ile Leu Pro Val Asn Glu Thr Arg Arg Leu Thr Thr Ser
35 40 45

Gly Ala Tyr Asn Ile Ile Asp Gly Cys Trp Arg Gly Lys Ala Asp Trp
50 55 60

Ala Glu Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln Gly Phe Gly Lys
65 70 75 80

Gly Thr Val Gly Gly Lys Asp Gly Asp Ile Tyr Thr Val Thr Ser Glu
85 90 95

Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu Arg Phe Gly
100 105 110

Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu Arg Asp Met Val
115 120 125

Ile Arg Leu Asp Lys Glu Met Val Val Asn Ser Asp Lys Thr Ile Asp
130 135 140

Gly Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Ile Asn Ala Gly Phe Thr Leu Asn
145 150 155 160

Gly Val Lys Asn Val Ile Ile His Asn Ile Asn Met His Asp Val Lys
165 170 175

Val Asn Pro Gly Gly Leu Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro Ala Ala Pro
180 185 190

Arg Ala Gly Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gln
195 200 205

Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Val Asp Gly Leu Val
210 215 220

Asp Ala Lys Leu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Val Ser Asn Ser Leu Phe
225 230 235 240

Thr Gln His Gln Phe Val Leu Leu Phe Gly Ala Gly Asp Glu Asn Ile
245 250 255

Glu Asp Arg Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Thr Phe Thr Asp
260 265 270

Listage_ST25

Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His Gly Phe Phe Gln Val
 275 280 285
 Val Asn Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr Ala Ile Gly Gly Ser
 290 295 300
 Ala Ser Pro Thr Ile Leu Ser Gln Gly Asn Arg Phe Cys Ala Pro Asp
 305 310 315 320
 Glu Arg Ser Lys Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly Glu Ala Ala Ala
 325 330 335
 Glu Ser Met Lys Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp Val Leu Glu Asn
 340 345 350
 Gly Ala Ile Phe Val Ala Ser Gly Val Asp Pro Val Leu Thr Pro Glu
 355 360 365
 Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ser Ala Leu Ser
 370 375 380
 Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Gln Pro Gly Ala Pro Cys
 385 390 395 400
 His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Val Val
 405 410 415

Asp

<210> 8
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> *Ambrosia artemisiifolia*

<400> 8

Ser Arg Gly Thr Met Gly Ile Lys His Cys Cys Tyr Ile Leu Tyr Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Pro Val Arg Ser Ala Glu Asp
 20 25 30
 Leu Gln Glu Ile Leu Pro Val Asn Glu Thr Arg Arg Leu Thr Thr Ser
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Asn Ile Ile Asp Gly Cys Trp Arg Gly Lys Ala Asp Trp
 50 55 60
 Ala Glu Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln Gly Phe Gly Lys
 65 70 75 80

Listage_ST25

Gly Thr Val Gly Gly Lys Asp Gly Asp Ile Tyr Thr Val Thr Ser Glu
85 90 95

Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu Arg Phe Gly
100 105 110

Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu Arg Asp Met Val
115 120 125

Ile Arg Leu Asp Lys Glu Met Val Val Asn Ser Asp Lys Thr Ile Asp
130 135 140

Gly Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Ile Asn Ala Gly Phe Thr Leu Asn
145 150 155 160

Gly Val Lys Asn Val Ile Ile His Asn Ile Asn Met His Asp Val Lys
165 170 175

Val Asn Pro Gly Gly Leu Ile Lys His His His His His His Asp Tyr
180 185 190

Lys Asp Asp Asp Asp Lys Val Val Asp
195 200

<210> 9
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Ambrosia artemisiifolia*

<400> 9

Ser Arg Gly Thr Met Gly Ile Lys His Cys Cys Tyr Ile Leu Tyr Phe
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Pro Val Arg Ser Asn Asp Gly
20 25 30

Pro Ala Ala Pro Arg Ala Gly Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser
35 40 45

Gly Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Val
50 55 60

Asp Gly Leu Val Asp Ala Lys Leu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Val Ser
65 70 75 80

Asn Ser Leu Phe Thr Gln His Gln Phe Val Leu Leu Phe Gly Ala Gly
85 90 95

Asp Glu Asn Ile Glu Asp Arg Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn
100 105 110

Thr Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His Gly
115 120 125

Listage_ST25

Phe Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr Ala
 130 135 140

Ile Gly Gly Ser Ala Ser Pro Thr Ile Leu Ser Gln Gly Asn Arg Phe
 145 150 155 160

Cys Ala Pro Asp Glu Arg Ser Lys Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly
 165 170 175

Glu Ala Ala Ala Glu Ser Met Lys Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp
 180 185 190

Val Leu Glu Asn Gly Ala Ile Phe Val Ala Ser Gly Val Asp Pro Val
 195 200 205

Leu Thr Pro Glu Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu
 210 215 220

Ser Ala Leu Ser Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Gln Pro
 225 230 235 240

Gly Ala Pro Cys His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 245 250 255

Asp Lys Val Val Asp
 260

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

WO 00/20612 A2 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]; HEIFETZ PETER BER)

13 avril 2000 (2000-04-13)

EP 2 692 732 A1 (STALLERGENES SA [FR])

5 février 2014 (2014-02-05)

FR 2 809 413 A1 (TABACS & ALLUMETTES IND [FR])

30 novembre 2001 (2001-11-30)

GRIFFITH I J ET AL: "SEQUENCE POLYMORPHISM OF AMB A I AND AMB A II, THE MAJOR ALLERGENS IN AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA (SHORT RAGWEED)", INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, BASEL, CH, vol. 96, no. 4, 1 janvier 1991 (1991-01-01), pages

296-304, XP000647685, ISSN: 0020-5915

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

GREGORY P. POGUE ET AL: "Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 1 juin 2010 (2010-06-01), pages 638-654, XP55038517, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00495.x

VOINNET O ET AL: "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus", THE PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 33, no. 5, 1 mars 2003 (2003-03-01), pages 949-956, XP002367694,

ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1046/J.1365-313X.2003.01676.X

LOÏC FAYE ET AL: "Success stories in molecular farming-a brief overview", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 9 mai 2010 (2010-05-09), pages 525-528, XP55038398, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00521.x

Jos Cantillo ET AL: "From Molecular Cloning to Vaccine Development for Allergic Diseases" In: "An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications", 1 juillet 2013 (2013-07-01), InTech, XP55161355, ISBN: 978-9-53-511151-1 DOI: 10.5772/52821,

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT