

La présente invention se rapporte à une protéine de fusion comprenant successivement les fragments suivants :

- a) optionnellement, un peptide signal ;
 - b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;
 - 5 c) un domaine coiled-coil qui ne provient pas d'un virus ; et
 - d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique, de préférence un domaine d'ancrage dans une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques.
- Elle est également relative aux particules pseudo-virales (VLP) obtenues avec une telle
- 10 protéine de fusion, ladite protéine étant ancrée dans leur membrane.

Alors qu'il y a plus de 100 ans que l'immunothérapie allergénique a été décrite par Noon et Freeman (1,2), très peu de progrès ont été réalisés en matière de désensibilisation, à l'exception du mode d'administration des traitements avec le remplacement progressif des

15 traitements par injection par une désensibilisation par la voie sublinguale. Ainsi, depuis janvier 2011, il existe par exemple en France pour les allergies aux pollens de graminées une désensibilisation en comprimé sublingual. L'arrivée sur le marché de ces comprimés de désensibilisation a contribué à diminuer l'invasivité de l'immunothérapie allergénique, mais elle n'en n'a pas accru l'efficacité. En effet, ce sont encore des extraits allergéniques

20 « naturels », peu concentrés en allergènes et peu représentatifs de la diversité des allergènes contenus dans la source allergénique, qui sont utilisés pour le traitement curatif par la voie orale.

Toutefois, au cours de la dernière décennie, de nouvelles stratégies ont été proposées pour

25 augmenter l'efficacité et réduire la durée des traitements d'immunothérapie allergénique.

Ces stratégies de désensibilisation sont basées sur l'utilisation :

- d'extraits allergéniques naturels modifiés pour réduire leur allergénicité tout en conservant leur immunogénicité (Henmar et al),
- d'allergènes recombinants natifs ou modifiés pour les rendre hypoallergéniques
- 30 (Valenta et al),
- de peptides correspondant aux épitopes des allergènes de cellules T, sous forme libre ou en fusion avec des protéines porteuses (Larche M., Patel D. et al, Chen et al),
- d'adjuvants, ou encore
- d'allergènes fusionnés à des nanoparticules ou à des pseudo-particules virales (Kundig

et al, Bachmann MF, Jennings GT, Henmar et al).

Les stratégies faisant appel à des extraits allergéniques modifiés restent cependant d'une efficacité limitée en raison de leur mauvaise représentativité de la diversité des allergènes
5 contenus dans la source.

Les allergènes recombinants, modifiés ou non, ou les peptides, sont faiblement immunogéniques sous forme soluble en l'absence d'adjuvants. Mais de nombreux adjuvants sont mal tolérés et, comme pour les vaccins, leur utilisation n'est pas recommandée en immunothérapie allergénique.

10

L'utilisation d'allergènes fusionnés à des nanoparticules ou à des particules pseudo-virales (VLP) est en revanche une stratégie particulièrement attrayante pour l'immunothérapie allergénique. Les particules pseudo-virales s'auto-assemblent à partir d'antigènes viraux. Elles ne contiennent aucun matériel génétique, elles sont donc non infectieuses et incapables
15 de se multiplier. En revanche, elles miment la structure originale d'un virus, ce qui leur permet d'être reconnues facilement par le système immunitaire et d'activer de façon très efficace la mémoire immunologique. Des vaccins à base de VLP contre l'hépatite B, les infections à papillomavirus, la grippe (Garland et al, Paavonen et al, D'Aoust et al) illustrent l'efficacité vaccinale d'antigènes lorsqu'ils sont présentés au système immunitaire à la surface
20 de VLP ou de nanoparticules.

Ainsi les VLP ont le potentiel d'être utilisées comme des structures présentatrices d'antigènes et en particulier d'allergènes permettant d'induire une forte réponse immunogénique chez l'homme.

Les VLP sont de deux grands types: celles qui sont fabriquées à partir de protéines de capsid virale (VLP CP) et celles qui sont fabriquées à partir de virus enveloppés (VLP Env). La structure et la composition de ces deux types diffèrent sensiblement. Les VLP CP sont généralement fabriquées en produisant la protéine recombinante de la capsid qui s'auto-
25 assemble dans des cellules-hôtes selon des mécanismes similaires à ceux des virus natifs. La production de VLP Env se produit quand une protéine d'enveloppe Env est synthétisée et modifiée par le système endomembranaire d'une cellule-hôte, puis migre vers les radeaux
30 lipidiques (lipid rafts) de la membrane plasmique, où elle se concentre et déclenche le bourgeonnement extracellulaire de tout l'assemblage membrane/protéine. La particule résultante, la VLP, porte à sa surface des épitopes immunogènes de la protéine Env.

L'utilisation d'allergènes sous forme de particules pseudo-virales semble donc un critère de réussite important pour l'immunothérapie. Les résultats obtenus avec des VLP fusionnées à un peptide de l'allergène majeur d'acarien (Der p 1) ou à l'allergène majeur de chat (Fel d 1) ont illustré la très grande immunogénicité de ces fusions chez la souris et chez l'homme (Schmitz et al, Kundig et al). Cette immunogénicité est si élevée qu'une seule injection de ces VLPs induit une production d'IgG suffisante pour une protection contre une réaction allergique de type I.

Cependant, la préparation de ces VLPs est malheureusement d'une complexité extrême et comprend de nombreuses étapes dont certaines sont difficilement standardisables. Notamment, les VLPs sont produites d'une part chez *E. coli*, après expression de la protéine d'enveloppe du bactériophage Qbeta. D'autre part l'allergène est exprimé sous forme recombinante chez *E. coli*, purifié puis solubilisé et purifié à nouveau en plusieurs étapes. Une fois ces deux constituants produits et purifiés, ils sont couplés *in vitro*. Cette technique de production est évidemment trop complexe, trop coûteuse et trop difficilement standardisable pour que le produit final puisse être disponible un jour pour le traitement des patients allergiques.

Il existe donc un besoin pour une structure non immunogène en tant que telle et polyvalente, qui s'auto-assemble dans des cellules eucaryotes, qui soit facile à synthétiser, et qui puisse supporter des protéines ou des peptides sur sa surface. Une telle structure pourrait être utilisée pour le traitement de patients allergiques, mais également dans d'autres cadres cliniques.

La Demanderesse a maintenant mis au point une telle structure, qui s'auto-assemble et permet une utilisation en thérapie.

En particulier, les caractéristiques uniques d'une telle structure sont:

- une immunogénicité indétectable de la structure en tant que telle;
- sa capacité à s'assembler en oligomères, comme des trimères ou des tétramères ;
- sa membrane contenant des lipides uniques, typiques des radeaux lipidiques ;
- sa membrane pauvre en protéines de la membrane de la cellule-hôte ;
- sa capacité à être exprimée à des rendements élevés dans de nombreux types de cellules eucaryotes (levures, insectes ou plantes) ; et
- sa facilité de préparation.

Selon un premier aspect, l'invention consiste en une protéine de fusion transmembranaire de type I ou de type II comprenant successivement les fragments suivants :

- a) optionnellement, un peptide signal ;
- b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;
- 5 c) un domaine coiled-coil (ou séquence d'oligomérisation) qui ne provient pas d'un virus ; et
- d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique et plus particulièrement dans les radeaux lipidiques, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique.

10 Une telle protéine de fusion se comporte comme une protéine de surface virale lors de son expression dans des cellules eucaryotes.

Sans être limité par une quelconque théorie, cette protéine est synthétisée dans le réticulum endoplasmique puis transportée via l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique. Une fois qu'elle atteint des zones spécialisées de la membrane plasmique, de préférence des radeaux lipidiques, cette protéine de fusion transmembranaire provoque la courbure de ladite

15 membrane, qui forme finalement un bourgeon qui se sépare de la membrane cellulaire et est libéré dans l'espace extracellulaire. Lors du bourgeonnement, la protéine ou le peptide d'intérêt porté par le domaine coiled-coil (ou séquence d'oligomérisation) est exposé à la surface extérieure de la particule nouvellement formée. Le domaine transmembranaire reste ancré dans la membrane et n'est pas exposé à la surface. On obtient ainsi une particule

20 pseudo-virale (VLP), illustrée en Figure 8A, comprenant une membrane plasmique dont la composition est de préférence typique des radeaux lipidiques, dans laquelle les protéines de fusion selon l'invention sont fixées au niveau de leur domaine d'ancrage, et qui expose la protéine ou le peptide d'intérêt à sa surface, sous forme oligomérisée (grâce à la séquence d'oligomérisation).

25 La structure des protéines de fusion assemblées à la surface de la VLP est illustrée en Figure 8B.

Selon un second aspect, l'invention consiste en une particule pseudo-virale (VLP) comprenant :

- 30 - une enveloppe constituée d'une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques ; et
- au moins une protéine de fusion transmembranaire de type I ou II ancrée dans ladite membrane (i.e. ladite enveloppe), ladite protéine de fusion comprenant successivement les fragments suivants:

- b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;
c) un domaine coiled-coil (ou séquence d'oligomérisation) qui ne provient pas d'un virus ; et
d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique, de préférence un domaine d'ancrage dans une
5 membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques,
les fragments b) et c) étant exposés à la surface de la VLP.

Dans la VLP selon l'invention, la protéine de fusion est ancrée dans la membrane (et donc dans l'enveloppe) par le biais de son domaine d'ancrage d).

10

Par particule pseudo-virale (ou VLP), on entend une nanoparticule constituée d'une enveloppe de membrane plasmique dans laquelle sont ancrées une ou plusieurs protéines, qui ne contient aucun matériel génétique, qui est non infectieuse et incapable de se multiplier, et qui s'auto-assemble pour mimer la structure originale d'un virus. La structure d'une VLP est
15 illustrée en Figure 8A : l'enveloppe membranaire comprend des protéines ancrées et exposées à sa surface.

Une telle particule pseudo-virale selon l'invention présente les propriétés intéressantes indiquées ci-dessus. En outre, lorsque la protéine ou le peptide d'intérêt b) de la protéine de
20 fusion est un allergène ou un fragment d'allergène, ou plus généralement un antigène, la particule pseudo-virale est efficace dans la présentation d'antigènes, et présente une grande capacité d'activation des cellules du système immunitaire. Cela permet une désensibilisation efficace de patients allergiques. En outre, la particule pseudo-virale selon l'invention stimule la production d'IgG spécifiques de l'allergène tout en minimisant l'accessibilité aux
25 basophiles.

Les particules pseudo-virales selon l'invention ont typiquement un diamètre compris entre 120 et 200 nm.

Selon un troisième aspect, l'invention se rapporte à un procédé de production d'une particule
30 pseudo-virale, comprenant l'expression de la protéine de fusion selon l'invention dans des cellules eucaryotes, de préférence dans des cellules de plante.

En effet, de préférence, le procédé développé comprend l'expression, dans une cellule végétale, des protéines de fusion selon l'invention. Après leur synthèse au niveau du réticulum endoplasmique et leur transport dans le système endomembranaire de sécrétion de

la cellule végétale, ces protéines de fusion ont la capacité de former des vésicules lorsqu'elles sont intégrées à la membrane plasmique. Ce processus est identique au bourgeonnement d'un virus à la surface des cellules qu'il infecte.

L'un des grands avantages de cette technologie est qu'elle est simple, puisqu'après expression
5 des protéines de fusion et extraction, les VLP portant à leur surface l'allergène d'intérêt sont de préférence purifiées en deux étapes. Ces VLPs formées *in planta* présentent à leur surface une densité constante d'allergènes ou de fragments d'allergènes. La qualité du produit est donc facilement standardisable et sa composition est constante.

- 10 La protéine de fusion transmembranaire de type I ou II selon l'invention comprend successivement les fragments suivants :
- a) optionnellement, un peptide signal ;
 - b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;
 - c) un domaine coiled-coil (ou séquence d'oligomérisation) qui ne provient pas d'un virus ; et
 - 15 d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique, de préférence un domaine d'ancrage dans une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques.

Par « protéine de fusion », on entend une protéine comprenant les différents fragments b) à d),
20 et optionnellement a), lesdits fragments étant d'origine différente. En d'autres termes, les fragments b) à d), et optionnellement a), ne sont jamais présents fusionnés comme tels dans la nature.

Par « successivement », on entend que les fragments a) à d) (ou b) à d)) sont présents dans l'ordre a)-b)-c)-d) (ou b)-c)-d) ou d)-c)-b)). Ces différents fragments peuvent être directement
25 fusionnés les uns aux autres, ou bien fusionnés les uns aux autres via un ou plusieurs linker(s). De préférence, la protéine de fusion selon l'invention comprend un linker présent entre les séquences b) et c), et/ou entre les séquences c) et d).

La protéine de fusion contient initialement les fragments a) à d) : la présence du peptide signal permet l'adressage correct de ladite protéine dans le réticulum endoplasmique. Le peptide
30 signal est ensuite clivé. Ainsi, lors du bourgeonnement et de la formation des VLP selon l'invention, la protéine de fusion ne contient plus le peptide signal a), mais seulement les fragments b) à d). Par conséquent, les VLP selon l'invention ne contiennent pas de peptide signal a). En revanche, la description des fragments b) à d) qui suit est applicable aux VLP.

Par protéine transmembranaire de type I ancrée dans une membrane, on entend une protéine transmembranaire dont l'extrémité N-terminale est extracellulaire et l'extrémité C-terminale est cytosolique. Par conséquent, la protéine transmembranaire de type I comprend de l'extrémité N-terminale à C-terminale, optionnellement le peptide signal a), puis la protéine
5 ou le peptide d'intérêt b), puis le domaine coiled-coil c) et enfin le domaine d'ancrage d).

Par protéine transmembranaire de type II ancrée dans une membrane, on entend une protéine transmembranaire dont l'extrémité C-terminale est extracellulaire et l'extrémité N-terminale est cytosolique. Par conséquent, la protéine transmembranaire de type II comprend de l'extrémité N-terminale à C-terminale, le domaine d'ancrage d), puis le domaine coiled-coil c)
10 et enfin la protéine ou le peptide d'intérêt b).

De préférence, la protéine de fusion selon l'invention est une protéine transmembranaire de type I.

Peptide signal a)

15 Le peptide signal a) est tout peptide signal reconnu par une cellule eucaryote.

De préférence, le peptide signal est choisi parmi le peptide signal naturel de la pectate lyase et le peptide signal de la chitinase de tabac.

De préférence, le peptide signal est celui de la chitinase du tabac, de séquence SEQ ID NO :
20 21.

Protéine ou peptide d'intérêt b)

La protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention peut être toute séquence d'acides aminés qui a un intérêt en thérapie ou en prophylaxie.

La protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention peut être toute séquence
25 d'acides aminés qui gagnerait à être entièrement ou partiellement exposée à la surface d'une particule pseudo-virale, et susceptible d'être reconnue par des cellules immunitaires, et/ou de déclencher une réaction biologique.

Par « protéine d'intérêt », on entend une séquence ayant au moins 51 acides aminés, de préférence au moins 100, de préférence au moins 200.

30 Par « peptide d'intérêt », on entend une séquence comprenant de 2 à 50 acides aminés, de préférence de 5 à 45 acides aminés.

La protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est de préférence choisi parmi:

- les allergènes et leurs fragments. L'application majeure d'une particule pseudo-virale contenant une telle protéine ou peptide est l'immunothérapie,

- les protéines virales et leurs fragments. L'intérêt principal d'une particule pseudo-virale contenant une telle protéine ou peptide est la vaccination,
- les protéines de surface cellulaire et leurs fragments. L'intérêt principal d'une particule pseudo-virale contenant une telle protéine ou peptide peut notamment être de restaurer une
5 activité immunitaire,
- les protéines et les peptides accumulés dans les maladies chroniques ou neurodégénératives,
- les protéines et peptides impliqués dans l'hypertension (tels que l'angiotensinogène, l'angiotensine I et l'angiotensine II),
- les immunoglobulines, leurs fragments (tels que les Fab) et leurs dérivés (tels que les scFv),
10 • les cytokines et leurs fragments, et
- les hormones et leurs fragments.

De préférence, la protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est un allergène. De préférence, elle est choisie parmi les allergènes responsables d'allergies respiratoires issus
15 d'acariens domestiques, tels que *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* ou *Euroglyphus manei*, les allergènes d'acariens de stockage tel que *Blomia tropicalis*, les allergènes d'acariens de type *Acarus siro* (autrefois nommé *Tyroglyphus farinae*), les allergènes de blattes, les allergènes de pollens d'arbres ou de graminées, les allergènes d'animaux (chat, chien cheval), les allergènes de moisissures, les allergènes responsables
20 d'allergies de contact comme ceux du latex d'hévéa ou encore les allergènes responsables d'allergies alimentaires (lait, œuf, poisson, fruits).

Parmi les allergènes de *Dermatophagoides farinae*, on peut citer Der f 10, Der f 11, Der f 13, Der f 14, Der f 15, Der f 16, Der f 17, Der f 18, Der f 2, Der f 2.0101, Der f 2.0102, Der f 2.0103, Der f 2.0104, Der f 2.0105, Der f 2.0106, Der f 2.0107, Der f 2.0108, Der f 2.0109,
25 Der f 2.0110, Der f 2.0111, Der f 2.0112, Der f 2.0113, Der f 2.0114, Der f 2.0115, Der f 2.0116, Der f 2.0117, Der f 20, Der f 3, Der f 4, Der f 5, Der f 6, Der f 7, Der f 8, Der f 9 et Der f HSP70.

Parmi les allergènes de *Dermatophagoides pteronyssinus*, on peut citer Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 2, Der p 2.0101, Der p 2.0102, Der p 2.0103, Der p
30 2.0104, Der p 2.0105, Der p 2.0106, Der p 2.0107, Der p 2.0108, Der p 2.0109, Der p 2.0110, Der p 2.0111, Der p 2.0112, Der p 2.0113, Der p 20, Der p 21, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9.

Parmi les allergènes d'animaux, on peut citer les allergènes issus du liquide séminal, de l'épithélium, du lait, de la salive, de la transpiration et/ou de l'urine desdits animaux. Les animaux sont de préférence les chiens, les chats ou les chevaux.

Parmi les allergènes de chat (*Felis domesticus*), on peut citer Fel d 1, Fel d 1.0101, Fel d 2, 5 Fel d 2.0101, Fel d 3, Fel d 3.0101, Fel d 4, Fel d 4.0101, Fel d 5, Fel d 5.0101, Fel d 6, Fel d 6.0101, Fel d 7, Fel d 7.0101, Fel d 8, Fel d 8.0101, Fel d Hp, Fel d IgG ou Fel d S100.

Parmi les allergènes de chien (*Canis familiaris*), on peut citer Can f 1, Can f 1.0101, Can f 2, Can f 2.0101, Can f 3, Can f 3.0101, Can f 4, Can f 4.0101, Can f 5, Can f 5.0101, Can f 6, Can f 6.0101, Can f 7, Can f 7.0101, Can f 8, Can f Feld1-like, Can f Homs2-like, Can f 10 Phosvitin ou Can f TCTP.

Parmi les allergènes de cheval (*Equus caballus*), on peut citer Equ c 1, Equ c 1.0101, Equ c 2, Equ c 2.0101, Equ c 2.0102, Equ c 3, Equ c 3.0101, Equ c 4, Equ c 4.0101, Equ c PRVB, Equ c 10, Equ c 11, Equ c 12, , Equ c 8, Equ c 9, Equ c ALA ou Equ c BLG.

15 Les séquences de ces allergènes sont connues, notamment dans la base Uniprot.

De préférence, la protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est un allergène de séquence SEQ ID NO : 22 (séquence mature de Der p 2) ou SEQ ID NO :32 (séquence de la chaîne CH1 de l'allergène félin Fel d 1).

20

De préférence, la protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est une protéine virale ou un de ses fragments.

Parmi les protéines virales, on peut citer notamment les protéines d'enveloppe du virus Zika, ainsi que les protéines des virus de la grippe, comme les hémagglutinines et les 25 neuraminidases. De préférence, la protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est la chaîne HA1 de l'hémagglutinine de séquence SEQ ID NO : 34 ou la protéine d'enveloppe du virus Zika de séquence SEQ ID NO :35.

De préférence, la protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est une protéine 30 de surface cellulaire ou un de ses fragments.

Parmi les protéines de surface, on peut citer notamment les antigènes de surface des tumeurs. De telles protéines et leurs fragments trouvent leur application notamment dans la restauration d'une activité immunitaire, par exemple dans le traitement des tumeurs.

De préférence, la protéine ou le peptide d'intérêt utilisable selon l'invention est une protéine accumulée dans les maladies neurodégénératives ou chroniques.

Parmi les peptides accumulés dans les maladies chroniques, on peut citer notamment le peptide amyloïde β impliqué dans la maladie d'Alzheimer, la protéine alpha-synucléine
5 impliquée dans la maladie de Parkinson, ainsi que les protéines CD 20, TNF-alpha ou HLA (human leucocyte antigen) impliquées dans les polyarthrites rhumatoïdes.

Domaine coiled-coil (ou séquence d'oligomérisation) c)

Le domaine coiled-coil, ou séquence d'oligomérisation, comprend plusieurs motifs d'alpha
10 hélice sens ou antisens qui sont parallèles les uns aux autres et forment une matrice organisée qui a plusieurs fonctions biologiques bien caractérisées. Ces domaines sont omniprésents et se trouvent en tant que domaines spécifiques de nombreux types de protéines de la plupart des organismes. Des domaines coiled-coil de différentes sources peuvent s'assembler pour former des formes allant du dimère à l'heptamère; certains domaines coiled-coil adopteront des
15 niveaux de polymérisation différents suivant les mutations ponctuelles de leur séquence d'acides aminés.

Un domaine coiled-coil est typiquement constitué d'un motif répété de 7 acides aminés, de type « hxxhxc », où « h » est un acide aminé hydrophobe, « c » est un acide aminé chargé, et « x » est un acide aminé quelconque.

20

Le domaine coiled-coil utilisable selon l'invention ne provient pas d'un virus ; il n'est pas viral.

Parmi les domaines coiled-coil utilisables selon l'invention, on citera de préférence ceux issus de la cortexilline, la vimentine, le tétrabrachion, les golgines, des protéines de la superfamille
25 des "Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) Attachment protein REceptor" ou SNARE, ou encore des facteurs de transcription comme le GCN4 ou d'un de ses variants, tels que GCN4-pLI ou GCN4-pII.

De préférence, le domaine coiled-coil est celui issu du facteur de transcription GCN4, GCN4-pLI ou GCN4-pII.

30 De préférence, le domaine coiled-coil est choisi parmi SEQ ID NO : 24 (séquence de trimérisation GCNA-pII du facteur de transcription GCN4 de levure), SEQ ID NO :27 (séquence de tétramérisation GCN4-pLI du facteur de transcription GCN4 de levure), SEQ ID NO :28 (séquence d'heptamérisation GCN4-pAA du facteur de transcription GCN4 de levure), SEQ ID NO :29 (séquence d'oligomérisation glycosylée IZN4 du facteur de

transcription GCN4 de levure), SEQ ID NO : 33 (séquence synthétique mimant un coiled-coil) et SEQ ID NO : 30 (séquence d'oligomérisation de SNARE).

Domaine d'ancrage dans la membrane plasmique (ou domaine transmembranaire) d)

- 5 Le domaine transmembranaire est une courte séquence d'acides aminés lipophiles qui interagit avec les lipides spécifiques des composants de la membrane plasmique. De préférence, la membrane plasmique comprend au moins une partie typique des radeaux lipidiques.
- Ces domaines d'ancrage sont communs (mais pas par une séquence consensus) aux protéines de surface des virus, mais aussi à des protéines qui sont naturellement intégrées dans la
- 10 membrane des cellules vivantes. Chaque domaine transmembranaire participe à la courbure et au bourgeonnement de la membrane plasmique.

Parmi les domaines d'ancrage utilisables selon l'invention, on citera de préférence ceux issus des protéines listées dans le Tableau 1A :

15

Tableau 1A : protéines transmembranaires

Protéines transmembranaires (TM)	Exemples (références Uniprot)	Nombre de domaines TM
Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase NtTMK1	Q9M7A8	1
Cavéoline	Q03135	1
BRI1-associated receptor kinase 1 (BAK1)	Q94F62	1
Receptor kinases	Q9LDG0, Q9ZT08, Q8LD58, Q7XHW7, Q8H811, Q9SUQ3, Q5ZBN0	1
Calcium-dependent protein kinases	Q6KC54, Q6EE26, Q5EDD1, P28582, Q9ARI5, Q7XZK4, Q8GSB1, Q9FWF0, Q94KH6	1
NtRac2/NTGP3	Q9ZRD2	1
ARF1-like GTP-binding protein	Q9M7P4	1
Stomatine	Q93VP6, Q60634	1
Ascorbate peroxydase	Q8W4V7	1
LAT	O43561	1
VIP36	P49256	1
Elicitor-inducible protein (EIG-J7)	Q9FXT1	1
Chaperone Hsp90-2	Q6UJX5	1
Syntaxine	Q9SF29, Q9SRV7, Q9ZSD5	1
Phragmoplastine	Q9SMB6	1
Fasciclin-like arabinogalactan protein 8 (précurseur)	O22126	1
Ras-related protein RAB8-3	Q8W3J3	2

Ras-related protein RAB8-5	Q8W3J2	2
Flotilline	Q501E6, 075955	2
Harpin-inducing protein 1	Q6L7J8, Q6L7J7	2
Pectinesterase-like	Q9FHN6	2
Protein kinase	Q9SH35	3
Endo-1,4- β -glucanase	O04890	3
MAL	P21145	4
Synatophysine	Q62277	4
Prominine	O43490	5
Aquaporine	O09224, O09222, Q40595, Q8W506, O24662, Q9FPZ6, Q9FPZ7	6
NADPH oxidase NtrbohD	Q8RVJ9	6
Respiratory burst oxidase homolog StrbohB	Q948T9	6
Lysine- and histidine-specific transporteur LHT1	O24405	8
glucan synthase	Q9SJM0, Q8S8D4, Q5VS25, Q9ZT82, Q9SFU6	8
callose synthase	Q8H046, Q9LXT9, Q9LTG5, Q9XEG1	9
Plasma membrane ATPase	Q42932, Q08436, Q03194, Q5U9D4, Q9SWH2, Q9SWH0	10
calcium-transporting ATPase	Q9LU41	10
Ammonium transporter	P58905	11
MDR-like ABC transporter mdr8	Q7FMW3	12
P-glycoprotein-like protein pgp3	Q9SY12	12
ABC transporter	O80725, Q9FWX8	12
Phosphate transporter	Q9ST22, Q9LLS5, Q9AYT1	12
Transmembrane protein PT3	Q8W4W9	12
H ⁺ /monosaccharide co-transporter MST1	Q06312	12
High affinity nitrate transporter protein	Q84MZ8	12
PDR-type ABC transporter 1 NtPDR1	Q76CU2	12

Parmi les domaines d'ancrage utilisables selon l'invention, on citera également de préférence ceux issus des protéines d'enveloppe virales listées dans le Tableau 1B ci-dessous :

Famille	Exemples	Protéines d'enveloppe
Flavivirus	le virus de la dengue	Protéine E
	le virus de la fièvre jaune	
	le virus de l'encéphalite de Saint Louis	
	le virus de l'encéphalite japonaise	
	le virus du Nil occidental	
	le virus Zika	
	le BYD virus (identifié en Chine en 2010, qui affecte les canards)	
Togavirus	le virus de Sindbis	GP

	le virus de l'encéphalite équine de l'est	
	le virus de l'encéphalite équine de l'ouest	
	le virus de Ross River	
	Le virus O'nyong'nyong	
Retrovirus	oncovirus (5 genres)	GP41/120
	lentivirus (tel que VIH)	
	Spumavirus	
Coronavirus	Coronavirus canin	Protéine S et protéine HE (hémagglutinine et estérase)
	Coronavirus félin	
	virus de la gastroentérite transmissible du porc	
	virus respiratoire porcin	
	coronavirus bovin	
	coronavirus humain	
	virus des hépatites murines	
	Virus de silodacryonite du rat	
Filovirus	Le virus Ebola	glycoprotéine
	Le virus de Marburg	
Rhabdovirus	le virus de la rage	GP
	Fièvre hémorragique virale	
	VSV-EBOV	
	maladie de la betterave	
Bunyavirus	virus hantaan	Gn/Gc
	Dugbe virus	
	Fièvre de la vallée du Rift	
	Virus de la maladie bronzée de la tomate	
Orthomyxovirus	Influenza virus (myxoinfluenza)	Hémagglutinine/ neuraminidase
Paramyxovirus	le virus des oreillons	Protéine F de fusion Protéine d'attachement (HN,H ou G)
	le virus sendaï	
	le virus SV5	
	le virus de la maladie de Newcastle	
	le virus de la rougeole	
	le virus de la maladie de Carré	
	le virus de la peste bovine	
	le virus respiratoire syncytial (VRS)	
	le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB)	
	parainfluenza	
Arenavirus	la fièvre de Lassa	GP
	la fièvre hémorragique d'Argentine	
	la fièvre hémorragique de Bolivie	
	la fièvre hémorragique du Brésil	
	la fièvre hémorragique du Venezuela	

Hepadnavirus	le virus de l'hépatite B (VHB)	GPL, S ou M
Herpesvirus	Herpes simplex virus (HSV)	Glycoprotéine gD, gB, gH, gL, gC
	EHV-1 (equine herpes virus)	
	le virus de l'herpès génital	
Poxvirus	Orthopoxvirus; type d'espèce: virus de la Vaccine; Maladie: cowpox, vaccine, smallpox	GP41/120
	Parapoxvirus; type d'espèce: Orf virus	
	Avipoxvirus; type d'espèce: Fowlpox virus	
	Capripoxvirus; type d'espèce: Sheeppox virus	
	Leporipoxvirus; type d'espèce: Myxoma virus	
	Suipoxvirus; type d'espèce: Swinepox virus	
	Molluscipoxvirus; type d'espèce: Molluscum contagiosum virus	
	Yatapoxvirus; type d'espèce: Yaba monkey tumor virus	

De préférence, le domaine d'ancrage utilisable selon l'invention est choisi parmi la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :26) et la séquence d'ancrage de la protéine PDLP1 (A0A0D3D8S3) (SEQ ID NO :31).

5

Linkers

De préférence, la protéine de fusion selon l'invention comprend un linker présent entre les fragments b) et c), et/ou entre les fragments c) et d).

Les linkers sont de courtes séquences d'acides aminés (2 à 10 acides aminés, de préférence 2 à 6) qui créent un bras flexible. Ils peuvent être utiles pour créer un espacement flexible entre le domaine d'ancrage et l'enroulement en spirale du domaine coiled-coil, si une trop grande proximité entre les deux domaines interfère avec un assemblage correct. Ils ne sont pas nécessaires dans des conditions où un lien direct entre les deux domaines (d'ancrage et coiled-coil) n'interfère pas avec la structure tridimensionnelle globale de la protéine de fusion.

De préférence, le linker est une séquence de type $-(GGGS)_n-$, où n est un entier. De préférence, le linker est choisi parmi SEQ ID NO : 23 ($n=2$) et SEQ ID NO :25 ($n=1$).

Ainsi, de préférence, la protéine de fusion selon l'invention est telle que :

- a) le peptide signal optionnel a pour séquence SEQ ID NO : 21 ;
- b) la protéine ou le peptide d'intérêt est choisi parmi :
 - les allergènes et leurs fragments,
 - les protéines virales et leurs fragments,
 - les protéines de surface cellulaire et leurs fragments,

- les protéines et les peptides accumulés dans les maladies chroniques ou neurodégénératives,
 - les protéines et peptides impliqués dans l'hypertension,
 - les immunoglobulines et leurs fragments,
 - les cytokines et leurs fragments, et
- 5 • les hormones et leurs fragments ;
- c) le domaine coiled-coil est choisi parmi SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 30 ; et
- d) le domaine d'ancrage est choisi parmi la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :26) et la séquence d'ancrage de la protéine PDLP1
- 10 (SEQ ID NO :31).

Ainsi, de préférence, la protéine de fusion selon l'invention comprend, de préférence consiste en, une séquence choisie parmi SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18 et SEQ ID

15 NO :20.

De la même façon, de préférence, la VLP selon l'invention comprend :

- une enveloppe constituée d'une membrane plasmique dont au moins une partie a une composition typique des radeaux lipidiques ; et
- 20 - au moins une protéine de fusion transmembranaire de type I ou II ancrée dans ladite membrane, ladite protéine de fusion comprenant successivement les fragments suivants :
- b) la protéine ou le peptide d'intérêt choisi parmi :
- les allergènes et leurs fragments,
 - les protéines virales et leurs fragments,
- 25 • les protéines de surface cellulaire et leurs fragments,- les protéines et les peptides accumulés dans les maladies chroniques ou neurodégénératives,
- les protéines et peptides impliqués dans l'hypertension,
- les immunoglobulines et leurs fragments,
- les cytokines et leurs fragments, et

30 • les hormones et leurs fragments ;

c) le domaine coiled-coil choisi parmi SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 30 ; et

d) le domaine d'ancrage choisi parmi la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :26) et la séquence d'ancrage de la protéine PDLPI (SEQ ID NO :31),

les fragments b) et c) étant exposés à l'extérieur de la VLP.

5

La présente invention a également pour objet l'acide nucléique (ou séquence nucléotidique) codant la protéine de fusion.

Une fois que la séquence nucléotidique a été obtenue, cette dernière est placée dans un vecteur d'expression par des méthodes classiques. La présente invention a donc également
10 pour objet un vecteur comprenant l'acide nucléique codant la protéine de fusion. 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 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,
15 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.

De préférence, le vecteur d'expression comprend :

- 20 - au moins une séquence nucléotidique codant pour la protéine de fusion, de préférence 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
25 de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos (séquence de terminaison de la nopaline synthase).

De préférence, le vecteur d'expression est pAG01.

Les promoteurs utilisés pour contrôler l'expression de la protéine de fusion sont des
30 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.

La présente invention a également pour objet une cellule-hôte comprenant au moins un acide
5 nucléique codant la protéine de fusion. La cellule-hôte peut être une cellule végétale.

La présente invention a également pour objet un procédé de production de particules pseudo-virales (VLP), comprenant l'expression de l'acide nucléique codant la protéine de fusion dans des cellules eucaryotes, de préférence des cellules végétales.

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 recombinantes est décrit dans la demande FR1255510, et comprend une première étape de
15 culture de la plante, en aéroponie ou en hydroponie et sous éclairage LEDs. Après cette première étape, l'agroinfiltration des plantes est réalisée sous vide, par des agrobactéries comprenant un fragment d'ADN codant pour la protéine de fusion selon l'invention. 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
20 Venturi. Parmi les agrobactéries utilisables selon l'invention, on peut citer de préférence, les souches LBA4404, GV3101, EHA 101/105 ou C58.

Une fois l'étape d'agroinfiltration réalisée, les plantes sont 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. Puis, les VLP sont extraites et
25 purifiées comme décrit ci-dessous.

L'extraction des VLP peut être effectuée par extraction enzymatique. Cette méthode est une adaptation de la méthode décrite notamment dans la demande WO2014/153674. De préférence, l'extraction enzymatique des VLP est effectuée par les étapes suivantes :

- infiltration sous vide (notamment comme il a été décrit ci-dessus pour
30 l'agroinfiltration) de la partie aérienne des plantes (i.e. les feuilles), dans une solution enzymatique contenant des enzymes pecto-cellulosiques, qui ne présente pas d'activité protéolytique. De préférence, un mélange de pectinases et de cellulases formulé à 4% dans un milieu comprenant 50mM de citrate de sodium pH5.2, 0.5M NaCl et 0.04% métabisulfite. De préférence, la macérozyme est formulée à 0.5% dans un milieu

- comprenant 50mM de citrate de sodium, pH5.2, 0.5M NaCl et 0.04% métabisulfite,
- les feuilles sont ensuite prélevées puis incubées dans la solution enzymatique,
 - le mélange est placé sous agitation sur un agitateur orbital entre 20 et 30 rpm à température ambiante (i.e. environ 20-23°C) pendant une durée comprise entre 30 minutes et 2h,
 - le digestat est ensuite filtré, de préférence sur une toile de 2-3mm puis 250µm, puis éventuellement centrifugé en continu (par exemple à 1000xg pendant 2-5 minutes), le surnageant est récupéré afin d'effectuer une filtration tangentielle.

10 Un tel procédé est illustré en figure 7.

Ainsi, de préférence, l'invention a également pour objet un procédé de production de particules pseudo-virales (VLP) selon l'invention dans une cellule végétale ou une plante, comprenant les étapes suivantes :

- 15 a) transformation d'agrobactéries avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour une protéine de fusion 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).

20

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 :

- 25 b1) culture de la cellule végétale ou de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, et sous éclairage LEDs, de préférence pendant quatre à six semaines,
- 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.
- 30 b3) remise en culture de la cellule végétale ou de la plante obtenue en b2), typiquement pendant 3 à 6 jours pour obtenir les particules pseudo-virales.

Enfin, les VLP obtenues sont extraites et purifiées notamment par extraction enzymatique tel que décrit ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une particule pseudo-virale comprenant :

- une enveloppe constituée d'une membrane plasmique dont au moins une partie a une composition typique des radeaux lipidiques ; et
- au moins une protéine de fusion selon l'invention sans peptide signal a), ancrée dans ladite membrane.

Une telle particule pseudo-virale (VLP) comprend ainsi :

- une enveloppe constituée d'une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques ; et
- au moins une protéine de fusion transmembranaire de type I ou II ancrée dans ladite membrane, ladite protéine de fusion comprenant successivement les fragments suivants :
 - b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;
 - c) un domaine coiled-coil (ou séquence d'oligomérisation) qui ne provient pas d'un virus ; et
 - d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique, de préférence un domaine d'ancrage dans une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques, les fragments b) et c) étant exposés à l'extérieur de la VLP.

Par « partie de membrane plasmique typique des radeaux lipidiques », on entend une bicouche phospholipidique (i.e. membrane plasmique) retrouvée dans les microdomaines des radeaux lipidiques (ou lipid rafts en anglais). Une telle bicouche est riche en cholestérol et en phospholipides, de préférence en phosphatidylcholine et en phosphatidyléthanolamine, et en sphingolipides, tel que la sphingomyéline, mais pauvre en acide docosahexaénoïque. En outre, elle présente une faible densité, et est insoluble dans les détergents doux (par exemples les polysorbates).

Les caractéristiques uniques d'une telle VLP sont une immunogénicité indétectable (hormis la protéine ou le peptide d'intérêt b), sa capacité à s'assembler spontanément, son contenu spécifique en lipides, de préférence typiques des radeaux lipidiques, le fait que sa membrane soit très pauvre en protéines de la membrane de la cellule-hôte, sa capacité à être exprimée à des rendements élevés dans de nombreux types de cellules eucaryotes (levures, insectes ou plantes) et sa facilité de préparation.

La VLP selon l'invention peut être utilisée en thérapie. Elle peut être utilisée comme médicament. Elle peut également être utilisée en immunothérapie allergénique (ITA).

Les séquences listées dans la présente demande sont résumées dans le tableau ci-dessous :

SEQ ID NO :	Définition
1	ADNc codant la forme naturelle de Der p2
2	Protéine Der p2
3 à 20	ADNc et protéines de fusion selon l'invention
21	Peptide signal de la chitinase du tabac
22	Séquence mature de Der p2
23	Linker
24	Domaine coiled-coil GCN4-pII
25	Linker
26	Séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1
27	Domaine coiled-coil GCN4-pLI
28	Domaine coiled-coil GCN4-pAA
29	Domaine coiled-coil IZN4
30	Domaine coiled-coil SNARE
31	Séquence d'ancrage de la protéine PDLP1
32	Séquence de la chaîne CH1 de l'allergène félin Fel d1
33	Domaine coiled-coil synthétique
34	Chaîne HA1 de l'hémagglutinine
35	Protéine d'enveloppe du virus Zika

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.

Les légendes des figures sont les suivantes :

Figure 1 : Représentation schématique des différentes cassettes d'expression permettant de produire un allergène associé à une séquence d'oligomérisation et à une séquence d'ancrage dans la membrane plasmique, de préférence au niveau des radeaux lipidiques

A) L'ADNc codant la séquence de Der p2 (DP2, SEQ ID NO :22) optimisé, de préférence harmonisé, est associé à 1) l'ADNc codant le peptide signal de la chitinase de tabac (PS Chit, SEQ ID NO :21), 2) une séquence d'oligomérisation (coiled-coil) issue d'un facteur de transcription (GCN4-pII/forme trimérique, B – GCN4-PLI/forme tétramérique, C – GCN4-IZN4/forme glycosylée, E – GCN4-pAA/forme heptamérique, D) ou de toute autre famille de protéines présentant une séquence coiled-coil (SNARE, Golgin, Fibrin, G) ou une séquence synthétique mimant une séquence coiled-coil (F), et enfin 3) une séquence d'ancrage issue de protéine d'enveloppe de virus enveloppé (TM/CT de H5 influenza, B à I) ou de protéine de type I ancrée dans les radeaux lipidiques (« lipid raft ») (J).

B) Schéma représentant la structure de la séquence d'oligomérisation ou coiled-coil. Cette séquence est constituée d'un motif répété de 7 acides aminés, de type « hxxhxcx », où « h » est un acide aminé hydrophobe, « c » est un acide aminé chargé, et « x » est un acide aminé quelconque.

Figure 2 : La plateforme AllergoPur utilisée pour l'expression et la production des différentes formes de VLP

20

Figure 3 : Production des protéines décrite Figure 1A

Les protéines extraites de plantes transfectées sous vide pour l'expression des protéines DP2 (piste 1), DP2-Tri (pistes 2-3) DP2-Tetra (pistes 4-5) ou FD1-Tri (pistes 6-7) ont été analysées par immunodétection avec un anticorps dirigé contre l'allergène Der p2 ou Fel d1. L'analyse par immunodétection met en évidence la production spécifique des protéines dont la masse moléculaire correspond à la masse attendue. Deux clones d'agrobactéries (Cl.1 et Cl.2) ont été analysés pour chaque construction.

Figure 4 : Purification et Caractérisation des VLP portant les allergènes par chromatographie d'exclusion stérique

Des extraits protéiques de feuilles produisant DP2-Tri (panneau D), DP2-Tetra (Panneau E), DP2 soluble (panneau F) FD1-Tri (panneau G), DP2triDGCN4 (délétion GCN4, panneau H), DP2tri-Syn (remplacement GCN4, panneau I) et DP2tri-KEI (remplacement GCN4, panneau J) ont été séparés par chromatographie sur une colonne S-500/HR calibrée. La teneur en

protéines solubles totales de chaque fraction a été évaluée en spectrométrie (panneau A) et coloration par Bleu de Coomassie après séparation par SDS-PAGE (panneau B). La teneur en allergènes des fractions d'élution a été révélée par détection immunologique utilisant des anticorps anti-Der p 2 ou anti-Fel d 1. Des extraits protéiques de feuilles produisant l'hémagglutinine sous forme de VLP de H5N1 (panneau C), ont été séparés par filtration sur gel sur une colonne S-500/HR calibrée et sont utilisés comme contrôles.

Figure 5 : Caractérisation des VLP portant les allergènes isolés par examen en microscopie électronique et coloration négative

Les VLP portant les allergènes présentent une morphologie et une taille très proches de celles décrites pour des virions de la grippe.
La barre représente 50 nm.

Figure 6: Réactivité des allergènes produits sous forme de VLP avec des sérums de patients allergiques à Der p2

Les protéines extraites de plantes transfectées sous vide pour l'expression des protéines DP2 (piste 1), DP2-Tri (pistes 2) et DP2-Tetra (pistes 3) ont été analysées par immunodétection avec des sérums de patients allergiques à Der p2. L'analyse par immunodétection met en évidence la reconnaissance des allergènes portés par des VLP par les IgE des sérums de patients.

Figure 7: Procédé de production des VLP à grande échelle

Figure 8: Structure des VLP et des protéines de fusion assemblées selon l'invention

A) Structure d'une VLP selon l'invention. La VLP est constituée d'une enveloppe de membrane plasmique, dans laquelle sont fixées les protéines de fusion selon l'invention. La protéine ou le peptide d'intérêt (par exemple l'allergène) est ainsi exposé à sa surface.
B) Structure des protéines de fusion selon l'invention, assemblées au sein de la VLP. Les séquences d'oligomérisation permettent aux protéines de fusion de former des polymères (par exemple ici l'allergène, A) à la surface de la VLP.

Figure 9 : Les antigènes conjugués à de VLP présentent un très fort pouvoir immunogène mais pas d'allergénicité

Panneau A : Évaluation de l'hyperréactivité des voies aériennes induites par l'allergène Der p 2 par la méthode Flexivent. Les souris (n = 10 / groupe) ont été sensibilisées par l'allergène der p 2 sous forme soluble (DP2-Alum) ou sous forme VLP (DP2-VLP/alum et DP2-VLP/saline) et challengées avec un extrait d'acarien. Vingt-quatre heures après le dernier défi, l'hyperréactivité des voies aériennes à la méthacholine inhalée a été déterminée par la méthode Flexivent. La réactivité pulmonaire déclenchée en présence de l'allergène sous forme de VLP est comparable aux souris contrôle.

Panneau B : Numération des cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, recueillies par lavage broncho-alvéolaire du poumon (BAL). Les souris (n = 10/groupe) ont été sensibilisées par l'allergène der p 2 sous forme soluble (DP2-Alum) ou sous forme VLP (DP2-VLP/alum et DP2-VLP/saline) et challengées par un extrait d'acarien. Vingt-quatre heures après le dernier défi, les cellules BAL ont été collectées et les cellules ont été comptées (éosinophiles; neutrophiles; macrophages; lymphocytes). Les neutrophiles sont largement majoritaires chez les souris ayant reçu l'allergène der p 2 sous forme soluble.

Panneau C : dosage des IgG spécifique de Der p 2 . Les souris (n = 10 / groupe) ont été sensibilisées par l'allergène der p 2 sous forme soluble (DP2-Alum) ou sous forme VLP (DP2-VLP/alum et DP2-VLP/saline) et challengées par un extrait d'acarien. Vingt-quatre heures après le dernier défi, les IgG ont été mesurées dans le liquide BAL et dans le sérum du sang recueilli par ponction cardiaque. Les souris ayant reçu des injections de DP2-VLP avec ou sans adjuvant présentent un taux d'IgG, mille fois supérieur aux souris ayant reçu le Der p 2 soluble.

EXEMPLES :

Exemple 1 : Design moléculaire et synthèse des gènes

Les ADNc sont synthétisés en optimisant puis en harmonisant l'usage des codons pour leur reconnaissance par le système végétal. Dans le cadre de cette invention, l'optimisation préférée est l'optimisation pour une expression chez *Nicotiana benthamiana*.

30

Les constructions sont illustrées en Figure 1. En particulier :

A: ADNc codant pour la forme naturelle de la protéine (SEQ ID NO :1). Cet ADNc pourra être ou non fusionné à des signaux d'adressage décrits dans le brevet WO/2008/056265. La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :2.

B: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à la séquence de trimérisation GCN4-pII du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :3) . La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :4.

C: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à la séquence de tétramérisation GCN4-pLI du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :5) . La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :6.

D: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à la séquence d'heptamérisation GCN4-pAA du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :7). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :8.

E: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à la séquence d'oligomérisation glycosylée IZN4 du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :9). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :10.

F: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à une séquence synthétique mimant un coiled-coil et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :11). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :12.

G: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à une séquence d'oligomérisation de SNARE et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :13). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :14.

H: ADNc codant pour deux fragments de Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnés à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996) à la séquence de trimérisation GCN4-pII du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine

H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :15). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :16.

I: ADNc codant pour la chaîne CH1 de l'allergène Fel d1 (SEQ ID NO :32) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996) à la séquence de trimérisation
5 GCN4-pII du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :17). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :18.

J: ADNc codant pour la forme mature de l'allergène Der p2 (SEQ ID NO :22) fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M. 1996), à la séquence de trimérisation
10 GCN4-pII du facteur de transcription GCN4 de levure et à la séquence d'ancrage de la protéine PDLP1 (A0A0D3D8S3) de radeaux lipidiques (SEQ ID NO :19). La protéine correspondante a pour séquence SEQ ID NO :20.

Exemple 2 : Préparation des plasmides

15

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. 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
20 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*.

Exemple 3 : Expression transitoire de Der p 2 produit sous forme de VLP 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 Der p 2 associé à une séquence d'oligomérisation et à une
30 séquence d'ancrage 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 10L d'eau osmose) et sous éclairage LED.

L'agrobactérie est transférée dans le tissu foliaire par agro-infiltration selon deux procédés. Pour la production de petits lots de protéases 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 VLP. Cette étape de criblage permet de définir le vecteur d'expression qui sera utilisé pour l'obtention de l'allergène Der p 2 ancré dans la membrane de qualité optimale. Le même procédé est utilisé pour la production 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 3-6 jours avant la purification des VLP portant l'allergène (Figure 2).

Exemple 4 : Production des VLP portant l'allergène Der p2

L'expression des protéines produites à l'exemple 3 ainsi que les rendements sont respectivement analysés par Western blotting et ELISA. Les résultats sont illustrés pour 3 allergènes produits sous forme de VLP (DP2-tri; DP2-tetra et FD1-tri) (Figure 3).

Exemple 5 : Evaluation de la formation de VLP / analyse de distribution de tailles

Une analyse de la distribution de la taille des structures porteuses des allergènes Der p2 (DP2-tri/DP2-tetra) ou Fel d1 (FD1-Tri) a été réalisée. Après infiltration sous vide de plantes *N. benthamiana* avec la souche d'*Agrobacterium* LBA4404, comme décrit à l'exemple 3, les extraits protéiques totaux ont été séparés par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne haute résolution S-500 (HR) (GE Healthcare Bio-Science Corporation). Les fractions d'élution ont été contrôlées pour leur teneur en protéines totales et pour leur teneur en VLP-allergènes par Western blotting avec des anticorps anti-allergènes. Pour tous les extraits analysés, la concentration en protéines solubles dans l'éluât atteint un maximum dans les fractions 14-16 (Figure 4). En revanche, l'analyse par Western blotting met en évidence une accumulation des allergènes dans les fractions 6 et 7 (c'est-à-dire avant l'élution du Bleu Dextran utilisé comme marqueur) ce qui montre l'association des allergènes à des structures de très haut poids moléculaire dans la zone de 2 MDa.

Les colonnes de 32 ml de Sephacryl S-500/HR (GE Healthcare Bio-Science Corporation) ont été équilibrées avec 50 mM, PBS, pH 7,4, NaCl 150 mM. Des échantillons d'extrait de

protéines totales de 1,5 mL ont été chargés puis élués avec le tampon d'équilibration. Vingt-quatre fractions d'élution de 1,5 ml ont été recueillies et analysées pour la teneur en protéines mesurées par spectrophotométrie de l'absorbance à 280 nm. Les protéines de chaque fraction ont été concentrées par précipitation à l'acétone puis remises en solution dans un même volume de tampon d'élution avant l'analyse par SDS-Page et Western blotting. Les profils d'élution du Bleu Dextran 2000 et des protéines solubles ont été comparés pour chaque chromatogramme afin de s'assurer de la reproductibilité de cette technique de séparation.

Exemple 6 : Morphologie des VLP - Analyse par microscopie électronique

10

La microscopie électronique à transmission du produit purifié (issu de la production à l'exemple 3 puis purifié) indique que les structures de haut poids moléculaire isolées par chromatographie de tamisage sont des VLP auxquelles sont liées des allergènes. A la fois par leur taille, par leur morphologie, comprenant une membrane phospholipidique couverte de pointes, ces VLP ressemblent beaucoup à des virions de la grippe (Figure 5).

15

Exemple 7: Production d'allergènes ou d'hypoallergènes portés par des VLP

Le couplage d'un allergène à une VLP réduit considérablement sa réactivité in vivo avec les IgE de sérums de patients.

20

Toutefois, l'utilisation d'hypoallergènes réduit encore la réactivité avec les IgE et par là les risques de réaction anaphylactique. La réduction de réactivité d'une forme hypoallergénique de l'allergène Der p 2 portée par des VLP est illustrée en figure 6.

Exemple 8 : Production des VLP

25

Le procédé de production détaillé des VLP, jusqu'à leur purification (comme cela est décrit à l'exemple 6), est illustré en figure 7.

Exemple 9 : Pouvoir immunogène des VLP en comparaison aux allergènes solubles

30

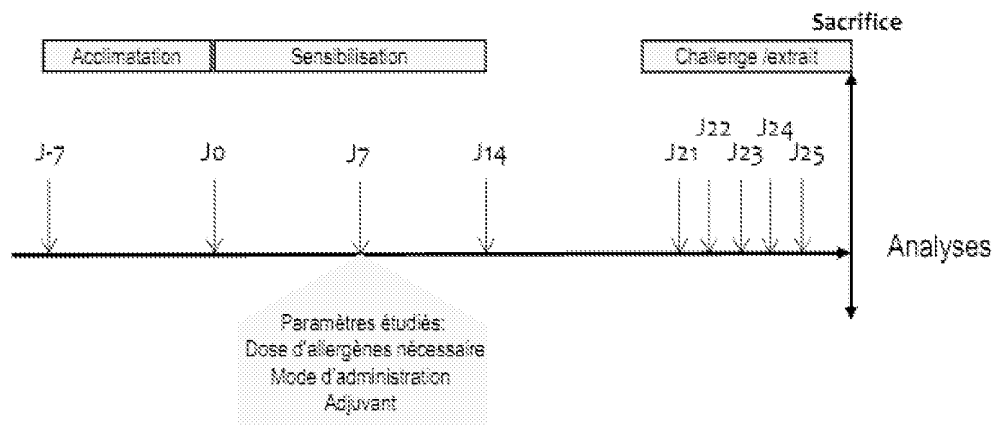
La présentation d'un antigène dans un réseau hautement ordonné et répétitif provoque normalement de fortes réponses immunitaires, alors que le même antigène présenté en tant que monomère est non immunogène.

Pour comparer la réponse immunitaire de l'allergène lorsqu'il est présenté sous forme de réseau hautement ordonné, des souris ont été immunisées avec l'allergène Der p2 sous forme de monomère soluble ou porté par des VLP. Les titres en IgG contre l'allergène Der p2 ont été déterminés par ELISA.

5

Protocole

Le protocole est illustré comme suit :



Analyses après le sacrifice :

- 10
- La perte de poids et le changement de comportement
 - La fonction pulmonaire (flexiVent, plethysmographie)
 - Réponse sérologique à l'allergène (IgG sérique, IgE, blot)
 - Test d'activation des basophiles
 - Histopathologie et d'autres résultats sérologiques (par exemple: isoformes IgG1) dans
- 15 les phases ultérieures

Cette étude a démontré que les VLP couplés à l'allergène Der p 2 ne déclenchent pas d'hyperréactivité bronchique chez la souris contrairement au Der p 2 soluble (voir Figure 9, Panneau A). De plus les VLP liés à Der p 2 déclenchent une réponse systémique de type Th1

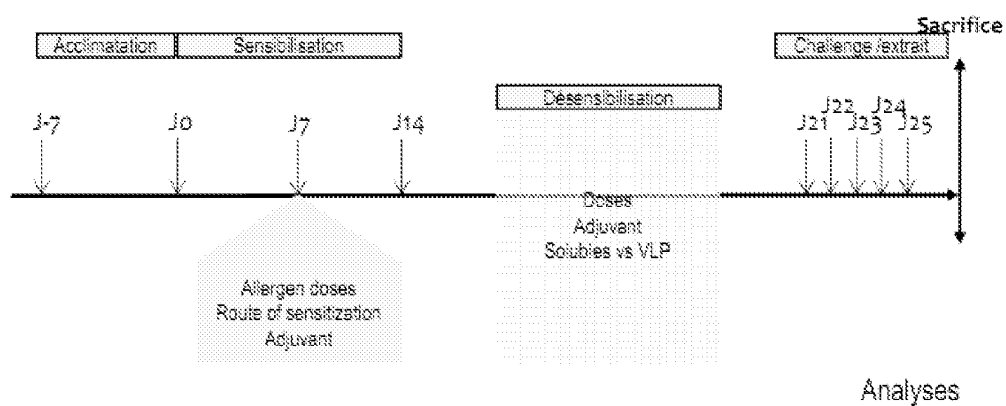
20 avec une activation des neutrophiles (voir figure 9, Panneaux B et C).

Exemple 10 : Désensibilisation/Vaccination utilisant les VLP

Les paramètres clés d'un vaccin efficace sont les suivants: une induction rapide d'un titre élevé d'anticorps en absence d'adjuvants et l'absence d'effets secondaires majeurs.

Protocole

- 5 Le protocole est illustré comme suit :



Références bibliographiques

Les références citées dans la présente demande sont les suivantes :

- 5 1-Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever Lancet 1911 ; 1 :1572-3
- 2-Freeman J. Further observation on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. Lancet 1911 ;2 :814-817
- 3-Henmar et al Clin Exp Immunol 2008 ;153 : 316-323
- 4-Valenta et al J Allergy Clin Immunol 2007 ;119 :826_830
- 10 5-Larche M. J Allergy Clin Immunol 2007 ;119 :906-909
- 6-Patel D. et al J Allergy Clin Immunol 2013 ;131 :103-109
- 8-Chen et al Allergy 2012 ;67 :609-621
- 9-Kundig et al J Allergy Clin Immunol 2006 ;117 :1470-1476
- 10-BachmannMF, Jennings GT Phil Trans R Soc B Biol SCI 2011 ;366 :2815-2822
- 15 11-Klimek et al Am J Rhinol Allergy 2013 ;27 :206-212
- 12-Henmar et al Clin Exp Immunol 2008 ;153 :316-323.
- 13-Jegerlehner et al Eur J Immunol2002 ;32 :3305-3314.
- 14-D'aoust et al Plant Biotech J 2008 ; 6 :930-940
- 15-Garland SM et al N Engl J Med 2007 ;356 :1928-1943
- 20 16-Paavonen et al Lancet.2007 ;369 :2161-2170
- 17-Schmitz et al J.Exp.Med. 2009 ;206 :1941-1955
- 18-Kundig et al J Allerg Clin Immunol ; 2006 ; 117 : 1470-1476
- 19-Cielens et al FEBS Letters 2000 ;482 :261-264

REVENDICATIONS

1. Particule pseudo-virale comprenant :

- une enveloppe constituée d'une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques ; et

- au moins une protéine de fusion transmembranaire de type I ou II ancrée dans ladite membrane, ladite protéine de fusion comprenant successivement les fragments suivants :

b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;

c) un domaine coiled-coil ou séquence d'oligomérisation, qui ne provient pas d'un virus ; et

d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique, de préférence un domaine d'ancrage dans une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques, les fragments b) et c) étant exposés à la surface de la particule pseudo-virale.

2. Particule pseudo-virale selon la revendication 1, dans laquelle un linker est présent entre les fragments b) et c), et/ou entre les fragments c) et d).

3. Particule pseudo-virale selon l'une des revendications 1 à 2, dans laquelle :

b) la protéine ou le peptide d'intérêt est choisi parmi :

- les allergènes et leurs fragments,
- les protéines de surface cellulaire et leurs fragments,
- les protéines et les peptides accumulés dans les maladies chroniques ou neurodégénératives,
- les protéines et peptides impliqués dans l'hypertension,
- les immunoglobulines et leurs fragments,
- les cytokines et leurs fragments, et
- les hormones et leurs fragments ;

c) le domaine coiled-coil est choisi parmi SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 30 ; et

d) le domaine d'ancrage est choisi parmi la séquence d'ancrage de l'hémagglutinine H5 du virus de l'influenza H5N1 (SEQ ID NO :26) et la séquence d'ancrage de la protéine PDLP1 (SEQ ID NO :31).

4. Particule pseudo-virale selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la protéine ou le peptide d'intérêt est choisi parmi les allergènes et leurs fragments.

5. Protéine de fusion transmembranaire de type I ou II comprenant successivement les fragments suivants :
- a) optionnellement, un peptide signal ;
 - b) une protéine ou un peptide d'intérêt ;
 - c) un domaine coiled-coil ou séquence d'oligomérisation, qui ne provient pas d'un virus ; et
 - d) un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique, constitué par un segment transmembranaire et un segment cytosolique, de préférence un domaine d'ancrage dans une membrane plasmique dont au moins une partie est typique des radeaux lipidiques.
6. Protéine de fusion transmembranaire selon la revendication 5, dans laquelle la protéine ou le peptide d'intérêt est choisi parmi les allergènes et leurs fragments.
7. Acide nucléique codant une protéine de fusion selon la revendication 5 ou 6.
8. Cellule-hôte ou vecteur comprenant au moins un acide nucléique selon la revendication 7.
9. Particule pseudo-virale selon l'une des revendications 1 à 4 pour son utilisation en thérapie.
10. Particule pseudo-virale selon l'une des revendications 1 à 4 pour son utilisation pour l'immunothérapie allergénique.
11. Procédé de production de particules pseudo-virales selon l'une des revendications 1 à 4, comprenant l'expression de l'acide nucléique selon la revendication 7 dans des cellules eucaryotes.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules eucaryotes sont des cellules végétales, et en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) transformation d'agrobactéries avec un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 5 lié de manière fonctionnelle à un promoteur fort ; et
 - b) transfection des cellules végétales avec les agrobactéries obtenues à l'étape a), ladite transfection comprenant les étapes suivantes :
- b1) culture des cellules végétales, en aéroponie ou en hydroponie, et sous éclairage LEDs, de préférence pendant quatre à six semaines en hydroponie,

b2) agroinfiltration des cellules végétales obtenues en b1) sous vide, par les agrobactéries obtenues à l'étape a), de préférence réalisée sous vide par effet Venturi,

b3) remise en culture des cellules végétales obtenues en b2), typiquement pendant 3 à 6 jours, pour obtenir les particules pseudo-virales,

puis extraction des particules pseudo-virales obtenues et purification notamment par extraction enzymatique.