



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/05/29  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/12/05  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/11/27  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/001809  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/096349  
(30) Priorité/Priority: 2001/06/01 (01/07275) FR

(51) Cl.Int.<sup>7</sup>/Int.Cl.<sup>7</sup> A61K 48/00, A61K 31/7088, A61K 39/39,  
A61K 39/12, A61K 39/21, A61P 31/14  
(71) Demandeur/Applicant:  
MERIAL, FR  
(72) Inventeur/Inventor:  
FISCHER, LAURENT, FR  
(74) Agent: FETHERSTONHAUGH & CO.

(54) Titre : VACCINATION CONTRE LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE FELINE  
(54) Title: VACCINATION AGAINST THE FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne un kit de vaccination des félinés contre FIV, comprenant, conditionnés séparément: un premier vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un plasmide contenant et exprimant in vivo un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, un deuxième vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un vecteur viral contenant et exprimant in vivo un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux. Utilisation des plasmides et/ou vecteurs viraux pour la préparation de vaccins contre le FIV.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
5 décembre 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/096349 A2

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : **A61K**
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01809
- (22) Date de dépôt international : 29 mai 2002 (29.05.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
01/07275 1 juin 2001 (01.06.2001) FR
- (71) Déposant : **MERIAL** [FR/FR]; 17, rue Bourgelat,  
F-69002 Lyon (FR).
- (72) Inventeur: **FISCHER, Laurent**; 17, chemin Vert,  
F-69110 Sainte Foy Les Lyon (FR).
- (74) Mandataires : **COLOMBET, Alain** etc.; Cabinet Lavoix,  
2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :**  
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: VACCINATION AGAINST THE FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

(54) Titre : VACCINATION CONTRE LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE FELINE

(57) **Abstract:** The invention relates to a kit for vaccinating cats against FIV, comprising a first vaccine comprising a first vaccine comprising a plasmid containing and expressing *in vivo* a polynucleotide coding for env and/or gag and/or gag/pro of FIV in a vehicle or excipient which is pharmaceutically acceptable and a second vaccine comprising a viral vector containing and expressing *in vivo* a polynucleotide coding for env and/or gag and/or gag/pro of FIV in a vehicle or excipient which is pharmaceutically acceptable, said vaccines being packed separately, with the proviso that at least one of the proteins env or gag or gag/pro is coded by the plasmids and the viral vectors. The plasmids and/or viral vectors are used in the preparation of vaccines against FIV.

(57) **Abrégé :** L'invention concerne un kit de vaccination des félinés contre FIV, comprenant, conditionnés séparément: un premier vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un plasmide contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, un deuxième vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un vecteur viral contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux. Utilisation des plasmides et/ou vecteurs viraux pour la préparation de vaccins contre le FIV.



WO 02/096349 A2

## Vaccination contre le virus de l'immunodéficience féline

La présente invention a pour objet l'immunisation et la vaccination contre le virus de l'immunodéficience féline. Elle a également pour objet des kits de vaccination.

5 Le virus de l'immunodéficience féline (FIV) est un rétrovirus à ARN simple brin de polarité positive appartenant à la famille des lentivirus.

Largement répandu sur l'ensemble de la planète, le FIV touche essentiellement les félins, en particulier les chats.

10 La maladie se caractérise par une détérioration et une suppression du système immunitaire permettant le développement de maladies opportunistes et pouvant conduire à la mort.

La molécule d'ARN de FIV se compose de plusieurs cadres ouverts de lecture (COLs) codant pour les protéines de structure, notamment env et gag, les enzymes virales, notamment pol et pro, les transactivateurs, notamment tat et rev. Le COL rev  
15 est composé de deux exons.

Des vaccins inactivés ont été proposés, mais nécessitent pour être protecteurs des quantités d'antigènes très importantes ce qui pose des problèmes d'industrialisation.

20 D'autres approches vaccinales ont été tentées en particulier l'utilisation de la protéine d'enveloppe sous forme de sous-unité ou exprimée par un vecteur d'expression recombiné. Ces travaux n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants. Ils ont par ailleurs mis en évidence des phénomènes de facilitation se traduisant par une virémie plus précoce chez les animaux vaccinés que chez les animaux témoins.

L'article de Cuisinier (Cuisinier A. M. *et al.*, *Vaccine*, 1997, **15(10)**, 1085-1094)  
25 rappelle que suite à des essais de vaccination à l'aide de virus inactivés il est apparu que la glycoprotéine de surface gp120 serait déterminante pour la protection. Il rappelle toutefois que plusieurs essais de vaccination utilisant la protéine env recombinaison n'ont pas permis d'induire une protection. Les auteurs décrivent des expériences de vaccination de chats par administration intramusculaire d'ADN  
30 codant pour gp120 et p10 (nucléocapside) de FIV. L'administration d'ADN codant pour gp120 de FIV n'induit qu'une protection partielle. En cas de combinaison gp120 et p10 on n'observe pas de protection.

De son côté l'article de Richardson (Richardson J. *et al.*, *J. Virol.*, 1997, **71(12)**, 9640-9649) rapporte avec l'administration de plasmides codant pour env de

FIV un phénomène de facilitation. Ce phénomène a aussi été observé lors de vaccination à l'aide de protéines recombinées de FIV (Lutz H. *et al.*, AIDS Research and Human Retroviruses, 1996, **12(5)**, 431-433) et de virus de la vaccine exprimant env de FIV (Osterhaus A. D. M. E. *et al.*, AIDS Research and Human Retroviruses, 5 1996, **12(5)**, 437-441).

WO-A-98/21354 décrit un protocole de vaccination contre FIV dans lequel on administre d'abord un vecteur canarypox recombiné ayant comme insert env et gag/pro de FIV, puis du FIV inactivé produit sur lymphocytes T.

Dans Cuisinier A. M. *et al.*, Vaccine, 1999, **17**, 415-425, l'administration d'ADN 10 exprimant gp120 est là encore à l'origine de phénomènes de facilitation.

Différentes approches de vaccination ont donc été étudiées à savoir les vaccins inactivés, les vaccins de sous-unités et les vaccins recombinés (vecteurs viraux et ADN). Il n'existe pas à ce jour de solution satisfaisante, ni d'orientation claire de recherche.

15 Après des efforts de recherches importants, la déposante a pu mettre au point une technique de vaccination des félins contre FIV utilisant des vaccins recombinés de type vecteur viral et ADN (plasmide). De façon remarquable la technique mise au point permet d'utiliser l'expression d'env sans générer de problème de facilitation.

Ainsi, l'invention a pour premier objet une méthode d'immunisation et de 20 vaccination des félins contre FIV par un protocole d'administration comprenant au moins une primo-administration et au moins une administration de rappel mettant en oeuvre au moins un immunogène commun. Les préparations immunogènes et les vaccins utilisés en primo-administration sont de nature différente de ceux utilisés en rappel. Ce protocole d'administration est dit « prime-boost ». Le protocole prime- 25 boost selon l'invention comprend une primo-administration avec une préparation immunogène ou un vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un plasmide contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, suivie d'un rappel avec une préparation immunogène ou un vaccin recombiné comprenant, dans un 30 véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un vecteur viral contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et les vecteurs viraux.

La primo-administration peut comprendre une ou plusieurs administrations des mêmes préparations immunogènes ou vaccins à base de plasmides. De même l'administration de rappel peut comprendre une ou plusieurs administrations des mêmes préparations immunogènes ou vaccins à base de vecteurs viraux. Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, le protocole comprend deux administrations successives d'une même préparation immunogène ou vaccin à base de plasmides, puis une administration d'une préparation immunogène ou vaccin à base de vecteurs viraux à titre de rappel.

Les différentes administrations sont de préférence faites à un intervalle de 3 à 6 semaines et plus particulièrement de l'ordre de 4 semaines. Suivant une modalité préférée on prévoit en plus un rappel annuel, préférentiellement à l'aide de la préparation immunogène ou vaccin à base de vecteurs viraux. De préférence les animaux sont âgés d'au moins 6 à 8 semaines lors de la première administration.

De préférence les plasmides et les vecteurs viraux utilisés dans le protocole prime/boost expriment à la fois env et gag ou env et gag/pro.

Au sens de l'invention, le terme protéine englobe les fragments, y compris peptides et polypeptides possédant substantiellement la même activité immunologique que la protéine entière. Les expressions gène env, gène gag, gène gag/pro, etc. incluent donc les fragments polynucléotidiques codant pour ces fragments de protéine, peptides et polypeptides.

Pour contrôler leur expression, les polynucléotides sont fonctionnellement associés à un promoteur, et éventuellement à des séquences activatrices (en anglais « enhancer »), à des séquences stabilisatrices, et/ou à des séquences signal permettant la sécrétion de la protéine.

D'autres protéines de FIV peuvent être exprimées conjointement à env et/ou gag et/ou gag/pro, en primo-administration et/ou en rappel. On peut notamment exprimer la protéine tat et/ou la protéine rev, de préférence tat et optionnellement rev. Elles peuvent être exprimées dans les mêmes plasmides et/ou vecteurs viraux que ceux utilisés pour env et/ou gag et/ou gag/pro ou dans des plasmides et/ou vecteurs viraux propres.

Suivant une modalité particulière, plusieurs souches de FIV sont représentées dans les préparations ou vaccins de l'invention, c'est-à-dire que le protocole comprend l'administration de plasmides et de vecteurs viraux comportant et exprimant *in vivo* des polynucléotides codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de

deux, trois ou plus, souches de FIV. Ainsi, des polynucléotides de plusieurs souches de FIV peuvent être portés par un vecteur viral unique ou par des vecteurs viraux propres. Pour les plasmides, on préfère des plasmides propres, mais on n'exclut cependant pas qu'un plasmide unique comporte les polynucléotides de plusieurs souches de FIV.

Suivant une autre modalité encore, et comme on le verra plus en détail plus loin, le protocole peut comprendre l'administration concomitante d'une ou plusieurs cytokines, soit sous forme protéique, soit par incorporation d'un polynucléotide codant pour une cytokine dans des plasmides et/ou des vecteurs viraux, ceux utilisés pour exprimer les protéines FIV et/ou d'autres.

Pour réaliser les vecteurs d'expression selon l'invention l'homme du métier dispose de différentes souches de FIV, de l'organisation de leur génome et de la séquence nucléotidique de leur génome. Des souches FIV utilisables, telle que la souche Petaluma, sont citées dans la partie Exemples. Des informations complémentaires sur ces souches ainsi que d'autres, leurs séquences nucléotidiques, sont données en introduction de la partie Exemples.

Selon l'invention, la primo-administration comprend l'utilisation de plasmides exprimant *in vivo* la ou les protéines de FIV. Le terme plasmide se réfère à une unité de transcription ADN comprenant un polynucléotide selon l'invention et les éléments nécessaires à son expression *in vivo*. On préfère la forme plasmide circulaire, superenroulée ou non. La forme linéaire entre également dans le cadre de cette invention.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer, dans les cellules hôtes, l'expression du polynucléotide inséré sous sa dépendance. Il s'agit en général d'un promoteur eucaryote fort. Le promoteur eucaryote fort préféré est le promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV-IE), d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cobaye. Le promoteur CMV-IE peut comprendre la partie promoteur proprement dite, associée ou non à la partie activatrice (enhancer). On peut se référer à EP-A-260 148, EP-A-323 597, US-A-5 168 062, US-A-5 385 839, US-A-4 968 615, WO-A-87/03905. On préfère le CMV-IE humain (Boshart M. *et al.*, Cell., 1985, 41, 521-530) ou murin.

De manière plus générale, le promoteur est soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme promoteur viral fort autre que CMV-IE, on peut citer le promoteur précoce ou le promoteur tardif du virus SV40 ou le promoteur LTR du virus du

Sarcome de Rous. Comme promoteur cellulaire fort, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, tel que par exemple le promoteur de la desmine (Kwissa M. *et al.*, Vaccine, 2000, **18(22)**, 2337-2344), ou encore le promoteur de l'actine (Miyazaki J. *et al.*, Gene, 1989, **79(2)**, 269-277).

5 Par équivalence, les sous-fragments de ces promoteurs, conservant une activité promotrice adéquate sont compris dans la présente invention : e.g. les promoteurs CMV-IE tronqués selon WO-A-98/00166. La notion de promoteur selon l'invention inclut donc les dérivés et sous-fragments conservant une activité promotrice adéquate, de préférence substantiellement similaire à celle du promoteur proprement dit dont ils sont issus. Pour le CMV-IE, cette notion comprend la partie promoteur proprement dite et/ou la partie activatrice et les dérivés et sous-fragments.

10 De préférence les plasmides comprennent d'autres éléments de contrôle de l'expression. En particulier, il est avantageux d'incorporer des séquences stabilisatrices du type intron, de préférence intron II du gène de la  $\beta$ -globine de lapin (van Ooyen *et al.* Science, 1979, **206**: 337-344).

15 Comme signal de polyadénylation (polyA) pour les plasmides on peut utiliser notamment celui du gène de l'hormone de croissance bovine (bGH) (US-A-5,122,458), celui du gène de la  $\beta$ -globine du lapin ou celui du virus SV40.

20 Selon l'invention, l'administration de rappel comprend l'utilisation de vecteurs viraux exprimant in vivo la ou les protéines de FIV. Ces vecteurs d'expression viraux sont avantageusement des avipox (en particulier canarypox, fowlpox) ou des mutants atténués du virus de la vaccine.

25 Pour les poxvirus, l'homme du métier peut se reporter à WO-A-90/12882, et plus particulièrement pour le virus de la vaccine à US-A-4,769,330 ; US-A-4,722,848 ; US-A-4,603,112 ; US-A-5,110,587 ; US-A-5,494,807 ; US-A-5,762,938 ; pour le fowlpox à US-A-5,174,993 ; US-A-5,505,941 ; US-5,766,599 ; pour le canarypox à US-A-5,756,103.

30 Comme mutant atténué du virus de la vaccine, on peut citer le MVA (souche Ankara) (Stickl H. et Hochstein-Mintzel V., Munch. Med. Wschr., 1971, **113**, 1149-1153 ; Sutter G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, **89**, 10847-10851 ; souche commerciale ATCC VR-1508 ; MVA est obtenue après plus de 570 passages de la souche vaccine Ankara sur fibroblastes d'embryons de poulet) ou le NYVAC (sa construction est décrite dans US-A-5 494 807, notamment aux exemples 1 à 6 ; ce brevet décrit aussi l'insertion de gènes hétérologues dans des sites de ce

recombinant et l'utilisation de promoteurs adaptés ; se reporter également à WO-A-96/40241).

Selon l'un des modes préférés de l'invention, le vecteur d'expression poxvirus est un virus canarypox, éventuellement atténué, e.g. un ALVAC ou un virus canarypox (par exemple de la souche Rentschler) qui a été atténué, notamment par plus de 200 passages sur cellules de fibroblastes d'embryons de poulet (CEF). Un virus canarypox de souche ALVAC a été déposé le 14 novembre 1996 auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro d'accès VR-2547. Un canarypox est commercialement disponible auprès de l'ATCC sous le numéro d'accès VR-111. Des canarypox atténués ont été décrits dans US-A-5,756,103 et dans WO-A-01/05934.

D'autres poxvirus atténués peuvent être utilisés, notamment des fowlpox atténués (e.g. TROVAC). Sur le poxvirus TROVAC, l'homme de l'art peut se reporter au brevet WO-A-96/40241. De nombreuses souches vaccinales de virus fowlpox sont accessibles, par exemple le vaccin DIFTOSEC CT® commercialisé par MERIAL et le vaccin NOBILIS® VARIOLE commercialisé par Intervet.

Lorsque le vecteur d'expression est un mutant atténué du virus de la vaccine, les sites d'insertion du (des) polynucléotide(s) à exprimer sont en particulier le gène de la thymidine kinase (TK), le gène de l'hémagglutinine (HA), la région du corps d'inclusion de type A (ATI). L'insertion de gènes dans le virus MVA est aussi décrite dans diverses publications dont Carroll M. W. *et al.*, *Vaccine*, 1997, **15(4)**, 387-394 ; Stittelaar K. J. *et al.*, *J. Virol.*, 2000, **74(9)**, 4236-4243 ; Sutter G. *et al.*, *Vaccine*, 1994, **12(11)**, 1032-1040, auxquelles l'homme du métier peut se référer. Le génome complet de MVA est décrit dans Antoine G., *Virology*, 1998, **244**, 365-396 ce qui permet à l'homme du métier d'utiliser d'autres sites d'insertion ou d'autres promoteurs.

Lorsqu'il s'agit d'un canarypox, les sites d'insertion sont en particulier situés dans, ou constitués par, les COLs C3, C5 et C6. Lorsqu'il s'agit d'un fowlpox, les sites d'insertion sont en particulier situés dans, ou constitués par, les COLs F7 et F8.

De préférence, lorsque le vecteur d'expression est un poxvirus, le polynucléotide à exprimer est inséré sous le contrôle d'un promoteur spécifique des poxvirus, notamment le promoteur vaccine 7,5 kDa (Cochran *et al.*, *J. Virology*, 1985, **54**, 30-35), le promoteur vaccine I3L (Riviere *et al.*, *J. Virology*, 1992, **66**, 3424-3434), le promoteur vaccine HA (Shida, *Virology*, 1986, **150**, 451-457), le promoteur

cowpox ATI (Funahashi *et al.*, J. Gen. Virol., 1988, **69**, 35-47), ou encore le promoteur vaccine H6 (Taylor J. *et al.* Vaccine, 1988, **6**, 504-508 ; Guo P. *et al.* J. Virol., 1989, **63**, 4189-4198 ; Perkus M. *et al.* J. Virol., 1989, **63**, 3829-3836).

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une part de plasmides  
5 contenant et exprimant *in vivo* le/les polynucléotide(s) codant pour env et/ou gag  
et/ou gag/pro de FIV, pour la production d'une première préparation immunogène ou  
d'un premier vaccin comprenant les plasmides et un véhicule ou excipient  
pharmaceutiquement acceptable, destiné à être primo-administré aux félins, et  
d'autre part de vecteurs viraux contenant et exprimant *in vivo* le/les polynucléotides  
10 codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, pour la production d'une deuxième  
préparation immunogène ou d'un deuxième vaccin comprenant les vecteurs viraux et  
un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné à être administré  
en rappel aux mêmes félins, avec la condition selon laquelle au moins l'une des  
protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les  
15 vecteurs viraux, pour la vaccination des félins contre FIV.

L'invention a également pour objet l'utilisation de plasmides contenant et  
exprimant *in vivo* un ou des polynucléotide(s) codant pour env et/ou gag et/ou  
gag/pro de FIV, pour la production d'un vaccin comprenant les plasmides et un  
véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné, pour la vaccination  
20 des félins contre FIV, à être administré à des félins en primo-administration, le rappel  
étant effectué à l'aide d'un vaccin comprenant des vecteurs viraux contenant et  
exprimant *in vivo* un ou des polynucléotides codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro  
de FIV et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, avec la  
condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est  
25 codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux.

L'invention a également pour objet l'utilisation de vecteurs viraux contenant et  
exprimant *in vivo* un ou des polynucléotides codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro  
de FIV, pour la production d'un vaccin comprenant les vecteurs viraux et un véhicule  
ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné, pour la vaccination des félins  
30 contre FIV, à être administré à des félins en rappel d'un vaccin comprenant des  
plasmides contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotide(s) codant pour  
env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement  
acceptable, avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag  
ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux.

La présente invention a encore pour objet un kit d'immunisation ou de vaccination des félidés contre FIV, notamment destiné à être utilisé selon le protocole d'administration selon l'invention, comprenant, conditionnés séparément :

- une préparation immunogène ou un vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un plasmide contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV,
- une préparation immunogène ou un vaccin recombiné comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un vecteur viral contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV,

avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux.

De préférence, les plasmides et vecteurs viraux expriment env et gag ou env et gag/pro.

Il va de soi que l'ensemble des caractéristiques décrites dans la présente demande, qui concernent par exemple la composition des plasmides et vecteurs viraux, la composition des préparations et vaccins, les associations de polynucléotides de FIV, le protocole d'administration s'appliquent dans les mêmes conditions aux différents objets de l'invention.

La notion de composition immunogène recouvre toute composition susceptible, une fois administrée à l'espèce cible dans les conditions de l'invention, d'induire une réponse immunitaire dirigée contre FIV. Par vaccin, on entend une composition capable d'induire une protection efficace. Les espèces cibles sont les félidés, de préférence le chat.

Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables sont parfaitement connus de l'homme du métier. A titre d'exemple, il peut s'agir de solution saline NaCl à 0,9% ou de tampon phosphate. Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables englobent aussi tout composé ou combinaison de composés permettant la facilitation de l'administration du vecteur, notamment de la transfection, et/ou l'amélioration de la conservation.

Les compositions immunogènes et les vaccins selon l'invention comprennent de préférence un ou plusieurs adjuvants, choisis notamment parmi les adjuvants usuels. Conviennent particulièrement bien dans le cadre de la présente invention : (1) polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique, polymères d'anhydride maléique

et de dérivé alcényle, (2) séquences immunostimulatrices (ISS), notamment séquences oligodésoxyribonucléotidiques ayant un ou plusieurs motifs CpG non méthylés (Klinman D. M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883 ; WO-A1-98/16247), (3) une émulsion huile-dans-l'eau, en particulier l'émulsion SPT  
5 décrite à la page 147 de « Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach » edited by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, et l'émulsion MF59 décrite à la page 183 du même ouvrage, (4) lipides cationiques contenant un sel d'ammonium quaternaire, (5) cytokines, ou (6) leurs combinaisons ou mélanges.

L'émulsion huile-dans-l'eau (3), qui est particulièrement adaptée pour les  
10 vecteurs viraux, peut notamment être à base :

- d'huile de paraffine liquide légère (type Pharmacopée européenne) ;
- d'huile isoprénoïde telle que le squalane, le squalène ;
- d'huile résultant de l'oligomérisation d'alcènes, en particulier  
15 d'isobutène ou de decène ;

- d'esters d'acides ou d'alcools à groupement alkyle linéaire ;
- plus particulièrement huiles végétales, oléate d'éthyle, di(caprylate /  
20 caprate) de propylène glycol, tri(caprylate / caprate) de glycérol, dioléate de propylène glycol ;

- d'esters d'acides ou d'alcools gras ramifiés, en particulier esters de  
25 l'acide isostéarique.

L'huile est utilisée en association avec des émulsifiants pour former l'émulsion. Les émulsifiants sont de préférence des tensio-actifs non ioniques, en particulier :

- les esters d'une part de sorbitan, de mannide (e.g. oléate  
25 d'anhydromannitol), de glycérol, de polyglycérol, ou de propylène glycol et d'autre part d'acide oléique, isostéarique, ricinoléique, hydroxystéarique, ces esters étant éventuellement éthoxylés,

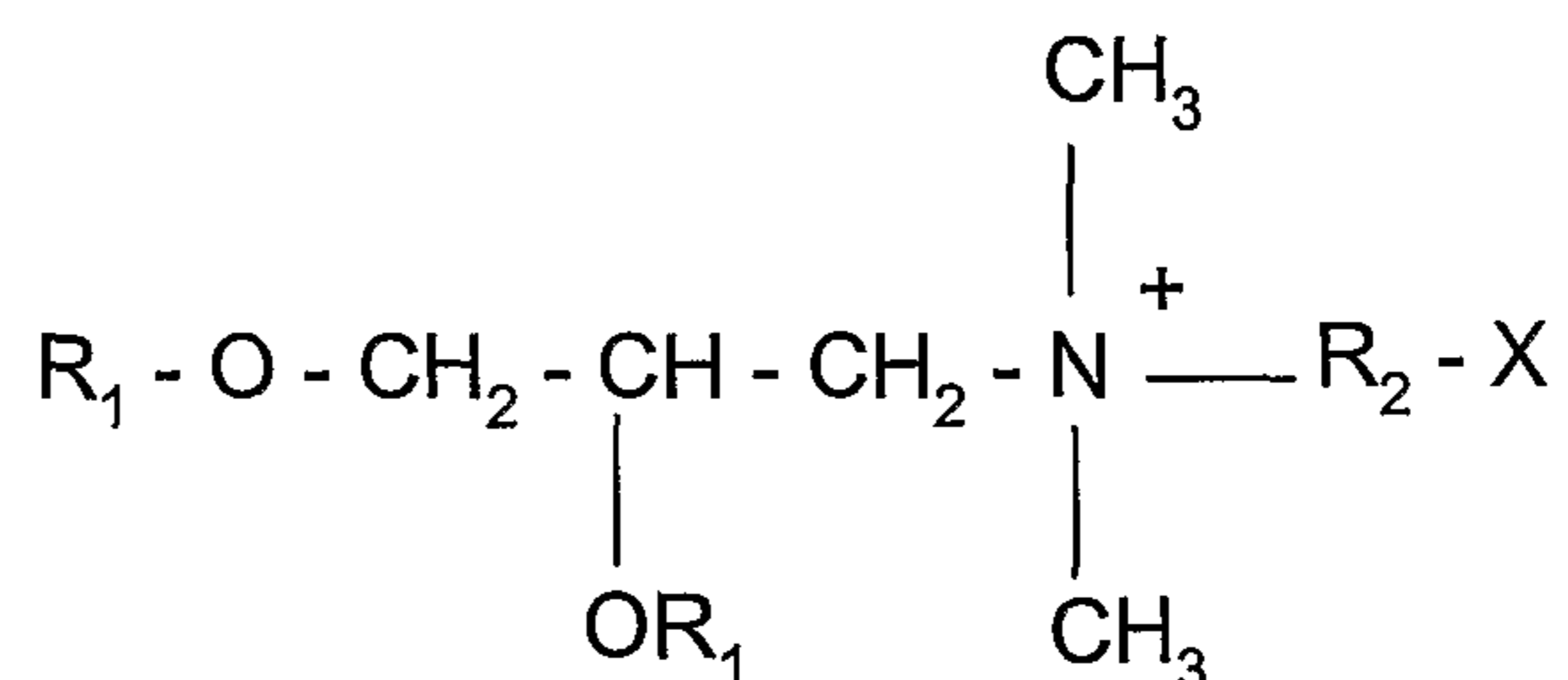
- les blocs copolymères polyoxypropylène–polyoxyéthylène, en  
particulier les Pluronic®, notamment L121.

30 Parmi les polymères adjuvants de type (1), on préfère les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique réticulés, notamment réticulés par des éthers polyalcényliques de sucres ou de polyalcools. Ces composés sont connus sous le terme carbomère (Pharmeuropa vol. 8, n° 2, juin 1996). L'homme de l'art peut aussi se référer à US-A-2 909 462 qui décrit de tels polymères acryliques réticulés par un

composé polyhydroxylé ayant au moins 3 groupes hydroxyle, de préférence pas plus de 8, les atomes d'hydrogène d'au moins trois hydroxyles étant remplacés par des radicaux aliphatiques insaturés ayant au moins 2 atomes de carbone. Les radicaux préférés sont ceux contenant de 2 à 4 atomes de carbone, e.g. vinyles, allyles et autres groupes éthyléniquement insaturés. Les radicaux insaturés peuvent eux-mêmes contenir d'autres substituants, tels que méthyl. Les produits vendus sous la dénomination Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) sont particulièrement appropriés. Ils sont notamment réticulés par un allyl saccharose ou par de l'allylpentaérythritol. Parmi eux, on peut citer en particulier les Carbopol® 974P, 934P et 971P.

La concentration en polymère de type carbomère dans la composition vaccinale finale peut notamment aller de 0,01 % à 1,5 % P/V, plus particulièrement de 0,05 à 1 % P/V, de préférence de 0,1 à 0,4 % P/V.

Les lipides cationiques (4) contenant un sel d'ammonium quaternaire, qui sont particulièrement mais pas exclusivement adaptés pour les plasmides, sont de préférence ceux qui répondent à la formule suivante :



dans laquelle R1 est un radical aliphatique linéaire, saturé ou insaturé, ayant 12 à 18 atomes de carbone, R2 est un autre radical aliphatique, renfermant 2 ou 3 atomes de carbone, et X un groupement hydroxyle ou amine.

Parmi ces lipides cationiques, on préfère le DMRIE (N-(2-hydroxyéthyl)-N,N-diméthyl-2,3-bis(tétradécyloxy)-1-propanammonium ; WO-A-96/34109), de préférence associé avec un lipide neutre, de préférence le DOPE (dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine ; Behr J. P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389), pour former le DMRIE-DOPE.

De préférence, le mélange plasmide avec cet adjuvant se fait de manière extemporanée et l'on préfère, avant son administration, laisser le temps au mélange ainsi constitué de se complexer, par exemple pendant une durée allant de 10 à 60 minutes, notamment de l'ordre de 30 minutes.

Lorsque du DOPE est présent, le ratio molaire DMRIE : DOPE va de préférence de 95 : 5 à 5 : 95, plus particulièrement de 1 : 1.

Le ratio pondéral plasmide : adjuvant DMRIE ou DMRIE-DOPE peut aller notamment de 50 : 1 à 1 : 10, en particulier de 10 : 1 à 1 : 5, et de préférence de 1 : 1 à 1 : 2.

La ou les cytokines (5) éventuellement présentes peuvent être apportées sous  
5 forme de protéine à la composition ou vaccin, ou être co-exprimées chez l'hôte avec le ou les protéines de FIV. La préférence va à la co-expression de la ou des cytokines, soit par le même vecteur que celui exprimant les protéines, soit par un vecteur propre.

Les cytokines peuvent notamment être choisies parmi des cytokines félines,  
10 notamment celles du chat, telles que l'interleukine 18 féline (fIL-18) (Taylor S. *et al.*, DNA Seq., 2000, **10(6)**, 387-394), fIL-16 (Leutenegger C. M. *et al.*, DNA Seq., 1998, **9(1)**, 59-63), fIL-12 (Fehr D. *et al.*, DNA Seq., 1997, **8(1-2)**, 77-82 ; Imamura T. *et al.*, J. Vet. Med. Sci., 2000, **62(10)**, 1079-1087) et GM-CSF félin (facteur de stimulation de la formation de colonies granulo-macrophagiques, ou en anglais Granulocyte-  
15 Macrophage Colony-Stimulating Factor) (GenBank AF053007).

Conformément à l'invention, la vaccination contre FIV peut être associée à des vaccinations contre d'autres agents pathogènes félines. Les autres pathogènes félines sont notamment le virus de la rhinotrachéite féline ou virus herpès félin (FHV), les virus de la leucémie féline (FeLV de type A et de type B), les parvovirus félines  
20 (FPV), le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), le virus de la calicivirose féline (FCV), le virus de la rage, *Chlamydia*.

L'administration des préparations et vaccins selon l'invention peut se faire notamment par la voie parentérale, e.g. par administration sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, ou par la voie orale et/ou nasale.

25 Les différentes préparations et vaccins peuvent être injectés par un injecteur à jet liquide sans aiguille.

Les compositions immunogènes et les vaccins selon l'invention comprennent une quantité efficace de plasmide ou de vecteur viral, la détermination de ces quantités étant à la portée de l'homme du métier. La déposante recommande :

30 - dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins à base de plasmide, une dose peut comporter de 1 µg environ à 2000 µg environ, notamment de 50 µg environ à 1000 µg environ. Les volumes de dose peuvent être compris entre 0,1 et 2 ml, de préférence entre 0,2 et 1 ml.

- dans le cas des compositions immunogènes ou des vaccins à base de poxvirus, une dose peut être comprise entre environ  $10^3$  pfu et environ  $10^9$  pfu. Lorsque le vecteur est le virus canarypox, la dose est plus particulièrement comprise entre environ  $10^5$  pfu et environ  $10^9$  pfu, de préférence entre environ  $10^6$  et environ  $10^8$  pfu. Les volumes de dose des compositions immunogènes et des vaccins félins à base de vecteurs viraux sont en général compris entre 0,1 et 2,0 ml, de préférence entre 0,2 et 1,0 ml.

Le kit peut comprendre les doses de vaccin pour vacciner soit un animal, soit plusieurs animaux.

Selon une modalité particulière, le kit comprend deux doses de vaccin à base de plasmide pour une dose de vaccin à base de vecteur viral.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs.

#### Exemples :

Toutes les constructions sont réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire (clonage, digestion par les enzymes de restriction, synthèse d'un ADN complémentaire simple brin, amplification en chaîne par polymérase, élongation d'un oligonucléotide par une ADN polymérase...) décrites par Sambrook J. *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention, ainsi que les divers fragments d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), sont isolés et purifiés en utilisant le kit "GeneClean®" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Les exemples mettent en œuvre la souche FIV Villefranche IFFA 1/88 (Steffan A. M. *et al.*, J. Gen. Virol., 1994, **75**, 3647-3653). Il va de soi que l'invention peut être appliquée aux autres souches de FIV. On peut par exemple citer la souche Petaluma (disponible auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro VR-1312, et de la séquence nucléotidique dans GenBank sous le numéro M25381 ; gène env : nucléotides 6266 à 8836 ; gène gag : nucléotides 628 à 1980 ; gag/pro : nucléotides 628 à 2336). On peut citer aussi la souche NCSU1 disponible auprès de l'ATCC sous la référence VR2333. On peut se référer aussi aux articles de Sodora et de Bachmann (Sodora D. L. *et al.*, J. Virol., 1994, **68(4)**, 2230-2238 ; Bachmann M. H. *et al.*, J. Virol., 1997, **71(6)**, 4241-4253) qui décrivent un certain

nombre de souches FIV et indiquent les références d'accès aux séquences dans GenBank. La souche FIV14 est référencée NC\_001482 dans Genbank (gène env : nucléotides 6266-8836 ; gène gag : nucléotides 628-1980 ; gag/pro : nucléotides 628-2336), la souche BM3070 est référencée dans GenBank sous AF474246 (gène env : nucléotides 6272-8833 ; gène gag : nucléotides 634-1986) ; la souche OMA est  
5 référencée dans Genbank sous U56928 (gène env : nucléotides 6506-9097 ; gène gag : nucléotides 679-2179), etc.

L'homme du métier est capable de déterminer les sondes PCR pour cloner les gènes à partir de la souche FIV considérée. Les sondes PCR utilisées dans les  
10 exemples suivants pour cloner env, gag/pro, rev et tat de la souche Villefranche, peuvent être utilisées avec d'autres souches, telles que Petaluma ; ou être adaptées lorsque cela est utile.

#### **Exemple 1 : Culture du virus FIV**

Pour leur amplification, des virus de l'immunodéficience féline de souche  
15 Villefranche IFFA 1/88 sont cultivées sur cellules Q201 (lymphocytes T auxiliaires félins ; Willet B. *et al.*, J. Gen. Virol., 1997, **78**, 611-618).

Les cellules Q201 sont mises en culture en Falcon 25 cm<sup>2</sup> avec du milieu Eagle-MEM supplémenté de 2 mM de glutamine, de 10 % de sérum de veau, de 100 UI/ml de pénicilline, de 100 µg/ml de streptomycine et de 100 UI/ml d'interleukine-2  
20 humaine recombinée, contenant environ 100 000 cellules par ml. Les cellules sont cultivées à +37°C.

Après 3 jours la couche cellulaire arrive à confluence. Le milieu de culture est alors remplacé et le virus FIV est ajouté à raison de 5 pfu/cellule.

Lorsque l'effet cytopathogène (CPE) est complet (généralement 48-72 heures  
25 après le début de la mise en culture), les suspensions virales sont récoltées, puis clarifiées par centrifugation et congelées à -80°C. 3 à 4 passages successifs sont généralement nécessaires à la production d'un lot viral. Le lot viral est stocké à -80°C.

#### **Exemple 2 : Extraction de l'ARN viral de FIV**

L'ARN viral contenu dans 100 ml de suspension virale de la souche FIV  
30 Villefranche est extrait après décongélation avec les solutions du kit « High Pure<sup>TM</sup> Viral RNA Kit » Cat # 1 858 882, Roche Molecular Biochemicals), en suivant les instructions du fournisseur pour les étapes d'extraction. Le culot d'ARN obtenu à la fin de l'extraction est resuspendu avec 1 à 2 ml d'eau distillée stérile sans RNase.

**Exemple 3 : Construction du plasmide pPB371**

L'ADN complémentaire (ADNc) de FIV est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

5 Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral de FIV (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC116 (36 mer) (SEQ ID NO :1)

5' TTTTTTCTGCAGCAATAAGAATGGCAGAAGGATTTG 3'

10 et FC117 (36 mer) (SEQ ID NO :2)

5' TCGCACCTGAAACATCTCGAGTGTTTCCACATGTAT 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction PstI, d'un site de restriction XhoI et d'un codon ATG initiateur en 5' de l'insert.

15 La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC117, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction PCR en présence du couple d'oligonucléotides FC116 et FC117 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 40 cycles (95°C pendant 30 sec, puis 50°C pendant 45 sec, et 72°C pendant 3 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 1476 pb.

Ce fragment est digéré par l'enzyme de restriction PstI puis par l'enzyme de restriction XhoI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment PstI-XhoI d'environ 1450 pb. Ce fragment est appelé fragment A.

25 Une deuxième réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral de FIV (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC118 (36 mer) (SEQ ID NO :3)

5' ATACATGTGGAAACACTCGAGATGTTTCAGGTGCGA 3'

30 et FC119 (54 mer) (SEQ ID NO :4)

5'TTTTTTTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCTGAGATACTTCATCATTCC  
TCCTC 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction XhoI, d'un site de restriction BamHI et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC118, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min.

5 Les conditions de la réaction PCR en présence du couple d'oligonucléotides FC118 et FC119 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 40 cycles (95°C pendant 130 sec, puis 50°C pendant 45 sec, et 72°C pendant 3 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 1193 pb.

10 Ce fragment est digéré par l'enzyme de restriction XhoI puis par l'enzyme de restriction BamHI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment XhoI-BamHI d'environ 1170 pb. Ce fragment est appelé fragment B.

15 Les fragments A et B sont ligaturés avec le plasmide d'expression eucaryote pVR1012 (figure 1 et exemple 7 de WO-A-98/03199 ; Hartikka J. *et al.*, 1997, Human Gene Therapy, 7, 1205-1217) préalablement digéré par XbaI et EcoRI, pour donner le plasmide pPB371 (7467 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce du cytomegalovirus humain ou hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un insert codant pour la protéine env de FIV.

#### **Exemple 4 : Construction du plasmide pPB374**

20 L'ADN complémentaire (ADNc) de FIV est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral de FIV (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

25 PB670 (37 mer) (SEQ ID NO :5)

5' TTTGTCGACAAGGTAGGAGAGATTCTACAGCAACATG 3'

et PB674 (40 mer) (SEQ ID NO :6)

5' TTTGCGGCCGCGTTATTGAGCCACTTAACCTAATATTG 3'.

30 Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction Sall, d'un site de restriction NotI, d'un codon ATG initiateur en 5' et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide PB674, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction PCR en présence du couple d'oligonucléotides PB670 et PB674 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 40 cycles (95°C pendant 30 sec, puis 50°C pendant 45 sec, et 72°C pendant 3 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 1758 pb.

Ce fragment est digéré par l'enzyme de restriction Sall puis par l'enzyme de restriction NotI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment Sall-NotI d'environ 1750 pb. Ce fragment est ligaturé avec le plasmide d'expression pVR1012 (exemple 3) préalablement digéré par Sall et NotI, pour donner le plasmide pPB374 (6633 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce hCMV-IE un insert codant les protéines gag/pro de FIV.

#### **Exemple 5 : Construction du plasmide pPB375**

L'ADN complémentaire (ADNc) de FIV est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral de FIV (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

FC116 (36 mer) (SEQ ID NO :1)

et FC120 (48 mer) (SEQ ID NO :7)

5' TTTTACCTGCATTTCTTCTTCCAGTTTTACCTCTTGAATTTTCGTTC 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction PstI, d'un site de restriction BspMI et d'un codon ATG initiateur en 5' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide FC120, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction PCR en présence du couple d'oligonucléotides FC116 et FC120 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 40 cycles (95°C pendant 30 sec, puis 50°C pendant 45 sec, et 72°C pendant 3 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 265 pb.

Ce fragment est digéré par l'enzyme de restriction PstI puis par l'enzyme de restriction BspMI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment PstI-BspMI d'environ 240 pb. Ce fragment est nommé fragment C.

Une deuxième réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral de FIV (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

PB672 (48 mer) (SEQ ID NO :8)

5' TTTACTGGAAGAAGGAAATGCAGGTAAAAGGAAAAGACAAAGAAGAAG  
3'

10 et PB673 (36 mer) (SEQ ID NO :9)

5' TTTAGATCTTTAGTCCATAAGCATTCTTTCTATTTTC 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction BspMI, d'un site de restriction BgIII et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide PB673, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction PCR en présence du couple d'oligonucléotides PB672 et PB673 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 40 cycles (95°C pendant 30 sec, puis 50°C pendant 45 sec, et 72°C pendant 3 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 246 pb.

Ce fragment est digéré par l'enzyme de restriction BspMI puis par l'enzyme de restriction BgIII pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment BspMI-BgIII d'environ 230 pb. Ce fragment est nommé fragment D.

25 Les fragments C et D sont ligaturés avec le plasmide d'expression pVR1012 (exemple 3) préalablement digéré par les enzymes de restriction PstI et BgIII, pour donner le plasmide pPB375 (5316 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce hCMV-IE un insert codant pour la protéine rev de FIV.

#### **Exemple 6 : Construction du plasmide pPB383**

30 L'ADN complémentaire (ADNc) de FIV est synthétisé avec le kit « Gene Amp RNA PCR Kit » (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, USA) en utilisant les conditions données par le fournisseur.

Une réaction de transcription inverse, suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (Réaction « RT-PCR ») est réalisée avec 50 µl de la suspension d'ARN viral de FIV (exemple 2) et avec les oligonucléotides suivants :

PB680 (29 mer) (SEQ ID NO :10)

5' TTTCTGCAGATGGAAGACATAATAGTATT 3',

et PB681 (32 mer) (SEQ ID NO :11)

5' TTTAGATCTCTAAGCAGTAGTTATTGATAATG 3'.

Ce couple d'oligonucléotides permet l'incorporation d'un site de restriction BglII, d'un site de restriction PstI, d'un codon ATG initiateur en 5' et d'un codon stop en 3' de l'insert.

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait par élongation de l'oligonucléotide PB681, après hybridation de ce dernier à la matrice d'ARN.

Les conditions de synthèse du premier brin d'ADNc sont une température de 42°C pendant 15 min, puis de 99°C pendant 5 min, et enfin de 4°C pendant 5 min. Les conditions de la réaction PCR en présence du couple d'oligonucléotides PB680 et PB681 sont une température de 95°C pendant 2 min, puis 40 cycles (95°C pendant 30 sec, puis 50°C pendant 45 sec, et 72°C pendant 1 min), et enfin 72°C pendant 7 min pour produire un fragment de 254 pb.

Ce fragment est digéré par l'enzyme de restriction PstI puis par l'enzyme de restriction BglII pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, le fragment PstI-BglII d'environ 240 pb. Ce fragment (fragment E) est ligaturé avec le plasmide d'expression pVR1012 (exemple 3) préalablement digéré par PstI et BglII, pour donner le plasmide pPB383 (5089 pb). Ce plasmide contient, sous le contrôle du promoteur précoce hCMV-IE, un insert codant pour la protéine tat de FIV.

#### **Exemple 7 : construction des virus recombinés vCP242, vCP253 et vCP255**

Le brevet WO-A-98/21354 décrit en détail l'obtention des virus recombinés vCP242, vCP253 et vCP255, respectivement aux exemples 1, 2 et 4.

Le virus recombiné vCP242 comprend la séquence nucléotidique codant pour la protéine env de la souche Villefranche de FIV sous le contrôle d'un promoteur H6 du virus de la vaccine et insérée dans le site C6 de virus canarypox ALVAC.

Le virus recombiné vCP253 comprend la séquence nucléotidique codant pour les protéines gag/pro de la souche Villefranche de FIV sous le contrôle d'un

promoteur I3L du virus de la vaccine et insérée dans le site C6 de virus canarypox ALVAC.

Le virus recombiné vCP255 comprend la séquence nucléotidique codant pour la protéine env de la souche Villefranche de FIV sous le contrôle d'un promoteur H6  
 5 du virus de la vaccine et la séquence nucléotidique codant pour les protéines gag/pro de la souche Villefranche de FIV sous le contrôle d'un promoteur I3L du virus de la vaccine, toutes deux insérées dans le site C6 de virus canarypox ALVAC.

**Exemple 8 : construction du plasmide donneur pour l'insertion dans le site C5 du virus canarypox ALVAC**

10 La figure 16 du brevet US-A-5,756,103 montre la séquence d'un fragment de 3199 pb de l'ADN génomique du virus canarypox. L'analyse de cette séquence a révélé un cadre ouvert de lecture (COL) qui a été appelé C5L, qui commence à la position 1538 et se termine à la position 1859. La construction d'un plasmide d'insertion aboutissant à la délétion du COL C5L et à son remplacement par un site  
 15 de clonage multiple flanqué de signaux d'arrêt de transcription et de traduction a été réalisée comme décrit ci-après.

Une réaction PCR a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

C5A1 (42 mer) (SEQ ID NO :12) :

20 5' ATCATCGAGCTCCAGCTGTAATTCATGGTTCGAAAAGAAGTGC 3'

et FC121 (79 mer) (SEQ ID NO :13) :

5'GAATTCCTCGAGAGATCTCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTC  
 ATTTTTTGAGAGTACCACTTCAGCTACCTC 3'

pour isoler un fragment PCR de 229 pb (fragment B).

25 Une réaction PCR a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

FC122 (78 mer) (SEQ ID NO :14) :

5'CCCGGGCTGCAGAGATCTCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTAGT  
 CATTATAAAGATCTAAAATGCATAATTTC 3'

30 et C5D1 (45 mer) (SEQ ID NO :15) :

5' GATGATGGTACCGTAAACAAATATAATGAAAAGTATTCTAAACTA 3'

pour isoler un fragment PCR de 488 pb (fragment C).

Les fragments B et C ont été hybridés ensemble pour servir de matrice à une réaction PCR réalisée avec les oligonucléotides C5A1 (SEQ ID NO :12) et C5D1

(SEQ ID NO :15) pour générer un fragment PCR de 693 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction SmaI et KpnI, pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment SmaI-KpnI de 676 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Cat # 212205),  
 5 préalablement digéré par les enzymes de restriction SmaI et KpnI, pour donner le plasmide pFC115. La séquence de ce plasmide a été vérifiée par séquençage. Ce plasmide contient 166 pb de séquences situées en amont du COL C5L (« bras flanquant gauche C5 »), un signal vaccine d'arrêt précoce de transcription, des codons stops dans les 6 phases de lecture, un site de clonage multiple contenant les  
 10 sites de restriction SmaI, PstI, BglII, XhoI et EcoRI, et enfin 425 pb de séquences situées en aval du COL C5L (« bras flanquant droit C5 »).

Le plasmide pMP528HRH (Perkus M. *et al.* J. Virol. 1989. **63**. 3829-3836) a été utilisé comme matrice pour amplifier la séquence complète du promoteur vaccine H6 (N° d'accès GenBank M28351) avec les oligonucléotides suivants :

15 JCA291 (34 mer) (SEQ ID NO :16)

5' AAACCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG 3'

et JCA292 (43 mer) (SEQ ID NO :17)

5' AAAAGAATTCGTCGACTACGATACAACTTAACGGATATCGCG 3'

pour amplifier un fragment PCR de 149 pb. Ce fragment a été digéré par les  
 20 enzymes de restriction SmaI et EcoRI pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction SmaI-EcoRI de 138 pb. Ce fragment a alors été ligaturé avec le plasmide pFC115, préalablement digéré par SmaI et EcoRI, pour donner le plasmide pFC116.

**Exemple 9 : construction du plasmide donneur pour l'insertion dans le  
 25 site C6 du virus canarypox ALVAC**

La figure 4 du brevet WO-A-01/05934 montre la séquence d'un fragment de 3700 pb de l'ADN génomique du virus canarypox. L'analyse de cette séquence a révélé un cadre ouvert de lecture (COL) qui a été appelé C6L, qui commence à la position 377 et se termine à la position 2254. La construction d'un plasmide  
 30 d'insertion aboutissant à la délétion du COL C6L et à son remplacement par un site de clonage multiple flanqué de signaux d'arrêt de transcription et de traduction a été réalisée comme décrit ci-après.

Une réaction PCR a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

C6A1 (42 mer) (SEQ ID NO :18) :

5' ATCATCGAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT 3'

et FC123 (79 mer) (SEQ ID NO :19) :

5'GAATTCCTCGAGAGATCTCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTC

5 ATTTTTTCGTAAGTAAGTATTTTTATTAA 3'

pour isoler un fragment PCR de 438 pb (fragment D).

Une réaction PCR a été réalisée à partir de la matrice constituée par l'ADN génomique du virus canarypox et avec les oligonucléotides suivants :

FC124 (78 mer) (SEQ ID NO :20) :

10 5'CCCGGGCTGCAGAGATCTCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTAGT

CAAATGAGTATATAATTGAAAAAGTAA 3'

et C6D1 (45 mer) (SEQ ID NO :21) :

5' GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAGTTG 3'

pour isoler un fragment PCR de 1216 pb (fragment E).

15 Les fragments D et E ont été hybridés ensemble pour servir de matrice à une réaction PCR réalisée avec les oligonucléotides C6A1 (SEQ ID NO :18) et C6D1 (SEQ ID NO :21) pour générer un fragment PCR de 1642 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction ScaI et KpnI, pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment ScaI-KpnI de 1625 pb. Ce fragment a été ligaturé avec  
20 le vecteur pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA, Cat # 212205), préalablement digéré par les enzymes de restriction ScaI et KpnI, pour donner le plasmide pFC117. La séquence de ce plasmide a été vérifiée par séquençage. Ce plasmide contient 370 pb de séquences situées en amont du COL C6L (« bras flanquant gauche C6 »), un signal vaccine d'arrêt précoce de transcription, des  
25 codons stops dans les 6 phases de lecture, un site de clonage multiple contenant les sites de restriction SmaI, PstI, BglII, XhoI et EcoRI, et enfin 1156 pb de séquences situées en aval du COL C6L (« bras flanquant droit C6 »).

Le plasmide pMPIVC (Schmitt J. F. C. et al., J. Virol., 1988, 62, 1889-1897 ; Saiki R. K. et al., Science, 1988, 239, 487-491) a été utilisé comme matrice pour  
30 amplifier la séquence complète du promoteur vaccine I3L avec les oligonucléotides suivants :

FC112 (33 mer) (SEQ ID NO :22) :

5' AAACCCGGGCGGTGGTTTGCGATTCCGAAATCT 3'

et FC113 (43 mer) (SEQ ID NO :23) :

5' AAAAGAATTCGGATCCGATTAAACCTAAATAATTGTACTTTGT 3'

pour amplifier un fragment PCR de 151 pb. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction *SmaI* et *EcoRI* pour isoler, après électrophorèse en gel d'agarose, un fragment de restriction *SmaI-EcoRI* d'environ 136 pb. Ce fragment a  
5 alors été ligaturé avec le plasmide pFC117, préalablement digéré par *SmaI* et *EcoRI*, pour donner le plasmide pFC118.

#### Exemple 10 : construction du virus recombiné vCP1719

Les fragments C et D (exemple 5) ont été ligaturés avec le plasmide pFC116 (exemple 8) préalablement digéré par les enzymes de restriction *PstI* et *BglII* pour  
10 donner le plasmide pFC119.

Le fragment E (exemple 6) a été ligaturé avec le plasmide pFC118 (exemple 9) préalablement digéré par les enzymes de restriction *PstI* et *BglII* pour donner le plasmide pFC120.

Le plasmide pFC120 a été linéarisé par *NotI*, puis transfecté dans des cellules  
15 primaires d'embryons de poulets infectées avec du virus canarypox (souche ALVAC) selon la technique de précipitation au phosphate de calcium précédemment décrite (Panicali et Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. **79**. 4927-4931 ; Piccini *et al.* In Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press). Des plages positives ont été sélectionnées sur la base d'une  
20 hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la protéine tat. Ces plages ont subi 4 cycles successifs de sélection/purification de plages jusqu'à ce qu'une population pure ait été isolée. Une plage représentative de la recombinaison *in vitro* entre le plasmide donneur pFC120 et le génome du virus canarypox ALVAC a alors été amplifiée et le stock de virus recombiné obtenu a été  
25 désigné vCP1719.

Optionnellement, les virus recombinés obtenus ont été utilisés pour une deuxième transfection dans des cellules primaires d'embryons de poulets en présence de plasmide pFC119 linéarisé par *NotI*, selon la technique de précipitation au phosphate de calcium. Des plages positives ont été sélectionnées sur la base  
30 d'une hybridation avec une sonde radiomarquée spécifique de la séquence nucléotidique de la protéine rev. Ces plages ont subi 4 cycles successifs de sélection/purification de plages jusqu'à ce qu'une population pure ait été isolée. Une plage représentative de la recombinaison *in vitro* entre les plasmides donneurs

pFC119, pFC120 et le génome du virus canarypox ALVAC a alors été amplifiée et le stock de virus recombiné obtenu a été désigné vCP1720.

### **Exemple 11 : Construction du plasmide pJP090**

Du sang de chat a été récolté sur un tube contenant de l'EDTA par une prise  
 5 de sang à la veine jugulaire. Les cellules mononucléées ont été récoltées par centrifugation sur un gradient de Ficoll, puis mises en culture en boîte de Petri de 60 mm de diamètre. Les cellules mononucléées de chat en culture ont alors été stimulés soit avec de la concanavaline A (conA) (concentration finale d'environ 5 µg/ml) soit avec de la phyto-hémagglutinine (PHA) (concentration finale d'environ 10 µg/ml).  
 10 Après stimulation, les lymphoblastes « ConA » et « PHA » ont été récoltés par grattage des boîtes de culture, et l'ARN total de ces cellules a été extrait en utilisant le kit « mRNA isolation kit for White Blood Cells » (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 1 934 325).

L'ARN total extrait des lymphocytes de chat stimulés par la ConA ou par la  
 15 PHA a servi de matrice pour la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire. Ce premier brin d'ADN complémentaire a été produit par élongation de l'oligonucléotide p(dT)15 (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 814 270). L'ADN complémentaire simple brin obtenu a été ensuite utilisé comme matrice pour une réaction d'PCR avec les oligonucléotides suivants :

20 FC125 (48 mer) (SEQ ID N° 24) :

5' TTTTTTGCGGCCGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTGCTTTTCCTGGGC 3'

et FC126 (50 mer) (SEQ ID N°25) :

5' TTTTTTGCGGCCGCTACGTATCACTTCTTGACTGGTTTCCAGCAGTCAAA 3'

pour amplifier un fragment PCR d'environ 473 paires de bases (pb). Ce fragment a  
 25 été purifié par électrophorèse en gel d'agarose. Ce fragment a été digéré par NotI et le fragment NotI-NotI d'environ 453 pb ainsi obtenu a été ligaturé avec le plasmide pVR1012 (exemple 3), préalablement digéré avec NotI, pour donner le plasmide pJP090 (5365 pb). L'orientation de l'insert dans pJP090 a été vérifiée. Le fragment NotI-NotI cloné sur ce plasmide a été entièrement séquencé. Cette séquence (SEQ  
 30 ID N° 26), qui code pour une protéine de 144 acides aminés (SEQ ID N° 27) est la cytokine GM-CSF féline.

### **Exemple 12 : Production de vaccins ADN**

Une solution d'ADN contenant le plasmide pPB371 (exemple 3) est concentrée par précipitation éthanolique comme décrit dans Sambrook et al (1989).

Le culot d'ADN est repris par une solution de NaCl 1,8% de façon à obtenir une concentration de 1 mg/ml. Une solution de DMRIE-DOPE à 0,75 mM est préparée par reprise d'un lyophilisat de DMRIE-DOPE par un volume adapté d'H<sub>2</sub>O stérile.

La formation des complexes ADN plasmidique-lipide est réalisée par dilution à parties égales de la solution à 0.75 mM de DMRIE-DOPE (1:1) par la solution d'ADN à 1 mg/ml dans NaCl 1,8%. La solution d'ADN est introduite progressivement à l'aide d'une aiguille sertie 26G le long de la paroi du flacon contenant la solution de lipide cationique de façon à éviter la formation de mousse. On procède à une agitation douce dès que les deux solutions sont mélangées. On obtient en final une composition comprenant 0,375 mM de DMRIE-DOPE et 500 µg/ml de plasmide.

Il est souhaitable que l'ensemble des solutions utilisées soient à température ambiante pour l'ensemble des opérations décrites ci-dessus. On laisse la complexation ADN/DMRIE-DOPE se mettre en place à température ambiante pendant 30 minutes avant de procéder à l'immunisation des animaux.

Des vaccins ADN peuvent également être produits avec des solutions d'ADN contenant les plasmides pPB374 (exemple 4), pPB375 (exemple 5), pPB383 (exemple 6), pJP090 (exemple 11) ou des mélanges d'au moins deux de ces 5 plasmides selon la technique décrite dans le présent exemple.

#### **Exemple 13 : Tests d'expression *in vitro***

L'expression des protéines FIV est testée pour chaque construction par les méthodes classiques d'immunofluorescence indirecte et de Western Blot.

Ces tests sont effectués sur boîtes de Pétri contenant les cellules CHO cultivées en monocouches et transfectées par des plasmides ou contenant les cellules CEF cultivées en monocouches et infectées par des virus recombinés.

Les protéines FIV sont détectées par utilisation de sérums de chats infectés et d'anti-sérums marqués.

La taille des fragments obtenus après migration sur gel d'agarose est comparée à celles attendues.

#### **Exemple 14 : Efficacité sur animaux**

Des chats Hillgrove (Biological Laboratories Europe Ltd.) EOPS et sans anticorps anti-FIV, approximativement âgés de 12 semaines sont randomisés en trois groupes de 6 animaux.

Les chats du premier groupe (groupe A) sont vaccinés à J0 et J28 par administration intramusculaire d'1 ml de mélange de plasmides pPB371 (exemple 3)

et pPB374 (exemple 4), puis administration de rappel à J56 par voie intramusculaire d'1 ml de virus recombiné vCP255 (exemple 7) à un titre de  $10^{8,0}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Les chats du deuxième groupe (groupe B) sont vaccinés à J0 et J28 par administration intramusculaire d'1 ml de mélange des plasmides pPB371 et pPB374, formulé avec du DMRIE-DOPE (exemple 12), puis administration de rappel à J56 par voie intramusculaire d'1 ml de virus recombiné vCP255 (exemple 7) à un titre de  $10^{8,0}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

La concentration en ADN total dans les vaccins ADN est de 200 µg/ml, soit 100 µg/ml pour chaque plasmide contenu dans le mélange.

Le rapport molaire lipide/ADN pour les vaccins ADN formulés avec du DMRIE-DOPE est de 0,25.

Le troisième groupe (contrôles) est le groupe témoin (pas de vaccination, épreuve à J84).

Tous les chats sont éprouvés à J84 par administration intra-péritonéale de 1 ml de virus FIV pathogène (souche Petaluma) à un titre de 25 CID<sub>50</sub>/ml (CID étant dose infectieuse 50% chez le chat).

Sont observés d'une part la virémie appréciée par réisolement viral et PCR, la réponse en anticorps.

Réisolement viral à partir de la semaine 4 après épreuve à la semaine 16 (nombre d'animaux présentant une virémie positive) :

Groupes	réisolement viral	PCR
Groupe A	2/6	2/6
Groupe B	3/6	2/6
Contrôles	6/6	5/6

Le réisolement viral se réalise par co-culture d'environ  $5 \times 10^6$  cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec environ  $10^6$  cellules MYA-1 en milieu RPMI 1640 pendant 21 jours. La présence d'ADN proviral FIV présent dans les cellules PBMC est identifiée par PCR.

On observe une absence de virémie chez 67% des animaux du groupe A et 50% du groupe B.

Réponse cellulaire le jour de l'épreuve et 4 semaines après épreuve (nombre d'animaux présentant une réponse CTL positive) :

Antigène détecté	Gag	Gag	Env	Env
	Semaine 0	Semaine 4	Semaine 0	Semaine 4
Groupe A	1/6	4/6	0/6	2/6
Groupe B	2/6	6/6	2/6	0/6
Contrôles	0/5*	2/6	0/5*	0/6

\* : les prélèvements n'ont pas pu être réalisés sur 1 animal.

Des fibroblastes cutanés sont prélevés par biopsie chez chacun des chats. Les fibroblastes sont marqués au  $^{51}\text{Cr}$  et ensuite infectés par un recombinant vaccine exprimant soit env soit gag en présence de PBMC provenant de chacun des chats.

5 La réponse cytotoxique (CTL) est mesurée par la libération de  $^{51}\text{Cr}$ .

On observe que la vaccination stimule (effet priming) la réponse cytotoxique pour les groupes d'animaux vaccinés, particulièrement pour gag.

Réponse humorale après épreuve (nombre d'animaux ayant une réponse sérologique positive en ELISA anti-TM) :

10

Semaine	0	2	4	8	12	16
Groupe A	0/6	3/6	4/6	3/6	3/6	5/6
Groupe B	0/6	3/6	5/6	5/6	4/6	6/6
Contrôles	0/6	0/6	0/6	3/6	5/6	5/6

Il s'agit d'un ELISA pour quantifier les anticorps en utilisant un peptide correspondant à l'épitope majeur de la protéine transmembranaire (TM).

La vaccination stimule (effet priming) la réponse immunitaire humorale.

15

Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

BET 02-0321 SEQUENCES.txt  
 SEQUENCE LISTING<110> Merial<120> Vaccination contre  
 le virus de l'immunodéficience féline<130> FIV prime/boost<160> 25 <170>  
 PatentIn version 3.1<210> 1<211> 36<212> DNA<213> Artificial<400> 1

tttttctgc agcaataaga atggcagaag gatttg 36

<210> 2<211> 36<212> DNA<213> Artificial<400> 2 36  
 tcgcacctga aacatctcga gtgtttccac atgtat

<210> 3<211> 36<212> DNA<213> Artificial<400> 3 36  
 atacatgtgg aaacactcga gatgtttcag gtgcga

<210> 4<211> 54<212> DNA<213> Artificial<400> 4 54  
 ttttttgat cccccgggct gcaggaattc tgagatactt catcattcct cctc

<210> 5<211> 37<212> DNA<213> Artificial<400> 5 37  
 tttgtcgaca aggtaggaga gattctacag caacatg

<210> 6<211> 40<212> DNA<213> Artificial<400> 6 40  
 tttgcggccg cgttattgag ccattactaa cctaatttg

<210> 7<211> 48<212> DNA<213> Artificial<400> 7 48  
 tttttacctg catttccttc ttccagtttt acctctgaa tttcgttc

<210> 8<211> 48<212> DNA<213> Artificial<400> 8 48  
 tttactggaa gaaggaaatg caggtaaaag gaaaagacaa agaagaag

<210> 9<211> 36<212> DNA<213> Artificial<400> 9 36  
 tttagatctt tagtccataa gcattctttc tatttc

<210> 10<211> 29<212> DNA<213> Artificial<400> 10 29  
 tttctgcaga tggaagacat aatagtatt

<210> 11<211> 32<212> DNA<213> Artificial<400> 11 32  
 tttagatctc taagcagtag ttattgataa tg

<210> 12<211> 42<212> DNA<213> Artificial<400> 12 42  
 atcatcgagc tccagctgta attcatggtc gaaaagaagt gc

<210> 13<211> 79<212> DNA<213> Artificial<400> 13 60  
 gaattcctcg agagatctct gcagcccggg tttttatagc taattagtca ttttttgaga 79  
 gtaccacttc agctacctc

<210> 14<211> 78<212> DNA<213> Artificial<400> 14 60  
 cccgggctgc agagatctct cgaggaattc tttttattga ttaactagtc attataaaga 78  
 tctaaaatgc ataatttc

<210> 15<211> 45<212> DNA<213> Artificial<400> 15 45  
 gatgatggta ccgtaaacia atataatgaa aagtattcta aacta

<210> 16<211> 34<212> DNA<213> Artificial<400> 16 34  
 aaaccgggt tctttattct atacttaaaa agtg

## BET 02-0321 SEQUENCES.txt

<210> 17<211> 43<212> DNA<213> Artificial<400> 17 aaaagaattc gtcgactacg atacaaactt aacggatata gcg	43
<210> 18<211> 42<212> DNA<213> Artificial<400> 18 atcatcgagc tgcgaggccgc ctatcaaaag tcttaatgag tt	42
<210> 19<211> 79<212> DNA<213> Artificial<400> 19 gaattcctcg agagatctct gcagcccggg tttttatagc taattagtca ttttttcgta agtaagtatt tttatttaa	60 79
<210> 20<211> 78<212> DNA<213> Artificial<400> 20 cccgggctgc agagatctct cgaggaattc tttttattga ttaactagtc aatgagtat atataattga aaaagtaa	60 78
<210> 21<211> 45<212> DNA<213> Artificial<400> 21 gatgatggta ccttcataaa tacaagtttg attaaactta agttg	45
<210> 22<211> 33<212> DNA<213> Artificial<400> 22 aaaccgggc ggtggtttgc gattccgaaa tct	33
<210> 23<211> 43<212> DNA<213> Artificial<400> 23 aaaagaattc ggatccgatt aaacctaat aattgtactt tgt	43
<210> 24<211> 48<212> DNA<213> Artificial<400> 24 ttttttgcgg ccgccacat gtggctgcag aacctgcttt tcctgggc	48
<210> 25<211> 50<212> DNA<213> Artificial<400> 25 ttttttgcgg ccgctacgta tcacttcttg actggtttcc agcagtcaaa	50

## REVENDEICATIONS

1- Kit de vaccination des félidés contre FIV, comprenant, conditionnés séparément :

5 - un premier vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un plasmide contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV,

- un deuxième vaccin comprenant, dans un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, un vecteur viral contenant et exprimant *in vivo* un polynucléotide codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV,

10 avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux.

2- Kit selon la revendication 1, caractérisé en ce que les plasmides et les vecteurs viraux comprennent les polynucléotides codant pour env et pour gag ou pour env et pour gag/pro.

3- Kit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le premier vaccin et/ou le deuxième vaccin exprime *in vivo* un polynucléotide codant pour tat.

4- Kit selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que les vecteurs viraux sont choisis parmi les avipox, de préférence canarypox ou fowlpox, et les mutants atténués du virus de la vaccine.

5- Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend les doses de vaccin pour vacciner soit un animal, soit plusieurs animaux.

6- Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend deux doses de vaccin à base de plasmide pour une dose de vaccin à base de vecteur viral.

7- Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le vaccin à base de plasmide et/ou le vaccin à base de vecteur viral comporte un adjuvant.

8- Kit selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'adjuvant est une cytokine, de préférence le GM-CSF félin.

9- Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le vaccin comportant des vecteurs viraux est destiné à être administré en rappel du vaccin comportant des plasmides.

10-Utilisation d'une part de plasmides contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotide(s) codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, pour la production d'un premier vaccin comprenant les plasmides et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné à être primo-administré aux félins, et  
5 d'autre part de vecteurs viraux contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotides codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, pour la production d'un deuxième vaccin comprenant les vecteurs viraux et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné à être administré en rappel aux mêmes félins, avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou  
10 gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux, pour la vaccination des félins contre FIV.

11-Utilisation de plasmides contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotide(s) codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, pour la production d'un vaccin comprenant les plasmides et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné, pour la vaccination des félins contre FIV, à  
15 être administré à des félins en primo-administration, le rappel étant effectué à l'aide d'un vaccin comprenant des vecteurs viraux contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotides codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, avec la condition selon laquelle au moins  
20 l'une des protéines env ou gag ou gag/pro est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux.

12-Utilisation de vecteurs viraux contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotides codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV, pour la production d'un vaccin comprenant les vecteurs viraux et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, destiné, pour la vaccination des félins contre FIV, à  
25 être administré à des félins en rappel d'un vaccin comprenant des plasmides contenant et exprimant *in vivo* un ou des polynucléotide(s) codant pour env et/ou gag et/ou gag/pro de FIV et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, avec la condition selon laquelle au moins l'une des protéines env ou gag ou gag/pro  
30 est codée à la fois par les plasmides et par les vecteurs viraux.

13-Utilisation selon la revendication 10, 11 ou 12, caractérisée en ce que les plasmides et les vecteurs viraux comprennent les polynucléotides codant pour env et gag ou pour env et gag/pro.

14-Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisée en ce que les plasmides et/ou les vecteurs viraux comprennent un polynucléotide codant pour tat.

5 15-Utilisation selon l'une quelconque des revendication 10 à 14, caractérisée en ce que les vecteurs viraux sont choisis parmi les avipox, de préférence canarypox ou fowlpox, et les mutants atténués du virus de la vaccine.

16-Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que les deux vaccins sont destinés à être administrés à un intervalle de 3 à 6 semaines, de préférence de l'ordre de 4 semaines.

10 17-Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 16, caractérisée en ce que le vaccin à base de plasmide et/ou le vaccin à base de vecteur viral comporte un adjuvant.

18-Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'adjuvant est une cytokine, de préférence le GM-CSF félin.