

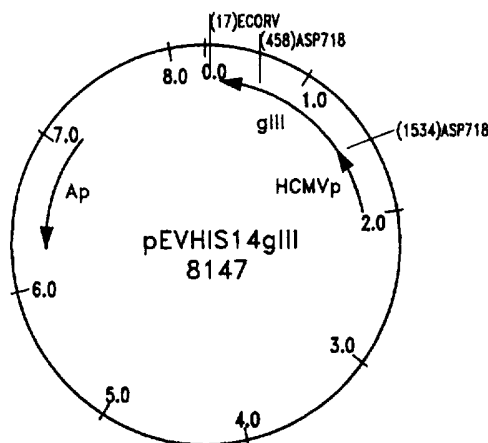


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07K 14/03, A61K 39/245</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/23502</b> (43) Date de publication internationale: 3 juillet 1997 (03.07.97)						
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/EP96/05611</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 décembre 1996 (06.12.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:</p> <table border="0"> <tr> <td>9501059</td> <td>21 décembre 1995 (21.12.95)</td> <td>BE</td> </tr> <tr> <td>9600533</td> <td>12 juin 1996 (12.06.96)</td> <td>BE</td> </tr> </table> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOLVAY (SOCIÉTÉ ANONYME) [BE/BE]; Rue du Prince-Albert 33, B-1050 Bruxelles (BE).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SWYSEN, Christine [BE/BE]; Eekhoornlaan 3, B-3090 Kampenhout (BE). DE-PIERREUX, Christophe [BE/BE]; Chaussée de l'Ourthe 180, B-6900 Marche-en-Famenne (BE).</p> <p>(74) Mandataires: MEYERS, Liliane etc.; Solvay (Société Anonyme), Dept. de la Propriété Industrielle, Rue de Ransbeek 310, B-1120 Bruxelles (BE).</p>		9501059	21 décembre 1995 (21.12.95)	BE	9600533	12 juin 1996 (12.06.96)	BE	<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Publiée</b> Avec rapport de recherche internationale.</p>
9501059	21 décembre 1995 (21.12.95)	BE						
9600533	12 juin 1996 (12.06.96)	BE						

(54) Title: PLASMID VACCINE FOR PSEUDORABIES VIRUS

(54) Titre: VACCIN PLASMIDIQUE CONTRE LE VIRUS PSEUDORABIQUE



## (57) Abstract

A vaccine including at least one plasmid coding for pseudorabies virus (PRV) glycoprotein gIII, or for a protein having the same antigenicity as PRV glycoprotein gIII, and a pharmaceutically acceptable carrier, is disclosed. The pEVhis14gIII plasmid used for making a vaccine is also disclosed.

## (57) Abrégé

Vaccin comprenant au moins un plasmide codant pour la glycoprotéine gIII du virus PRV ou pour une protéine présentant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV et un excipient pharmaceutiquement acceptable pour celui-ci. L'invention concerne également le plasmide pEVhis14gIII utilisée dans la fabrication d'un vaccin.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Vaccin plasmidique contre le virus pseudorabique

La présente invention concerne un vaccin plasmidique contre le virus pseudorabique, encore connu sous le nom de virus de la maladie d'Aujeszky (ADV), de virus porcin de l'herpès 1 (PHV-1) ou de virus herpès-1 Suid (SHV-1).

5 La maladie d'Aujeszky est une maladie d'origine virale à laquelle la plupart des mammifères sont sensibles. Cependant, l'homme ne semble pas être sensible à cette maladie.

L'agent provoquant cette maladie est un virus enveloppé à ADN bicaténaire de la famille des Herpesviridae, sous-famille des alpha-herpesvirinae, à  
10 savoir, le virus pseudorabique (PRV).

Le génome du virus PRV est formé par une molécule d'ADN bicaténaire d'environ 150 kb et consiste en une région unique longue ( $U_L$ ) et en une région unique courte ( $U_S$ ) qui est flanquée par deux séquences répétées inverses, l'une terminale ( $T_R$ ) et l'autre interne ( $I_R$ ) (BEN-PORAT, T. et al, 1979, Virology 95,  
15 p. 285-294).

Le génome du virus de la maladie d'Aujeszky contient au moins 70 gènes.

Les principales caractéristiques et propriétés biologiques des gènes du PRV les mieux caractérisées sont reprises dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Propriétés de certains gènes du PRV, leurs caractéristiques et propriétés biologiques (extrait de Mettenleiter T., Acta Veterinaria Hungarica, 42 (2-3), p. 153-177 (1994)).

Segment du Génome	Désignation Gène (HSV)	Désignation Gène (PRV)	Protéine	Taille (kDa)	Essentielle (réplication in vitro)	Fonction / Activité	Virulence
UL	gB	gII	913 aa	110-68-55	+	pénétration, fusion cellulaire	+
	gC	gIII	479 aa	92	-	adsorption, relargage	+
	TK	TK	320 aa	35	-	thymidine kinase	+
	gH	gH	686 aa	84	+	pénétration, fusion cellulaire	n.a.
Us	prot. kinase	PK	336 aa	41	-	protéine kinase	+
	G	gX	498 aa	99	-	inconnu	-
	gD	gp50	402 aa	60	+	pénétration	n.a.
	gI	gp63	350 aa	63	-	inconnu	+
	gE	gI	577 aa	110	-	relargage, transmission de cellule à cellule	+
	TEG	11K	106 aa	11	-	protéine du tégument	inconnu

- 3 -

La transmission du virus se réalise habituellement par voie orale, respiratoire ou par contact direct entre un animal infecté et un animal sain.

La maladie est devenue préoccupante pour les élevages porcins où elle se manifeste sous plusieurs formes :

- 5 1. Les adultes développent peu de signes cliniques, mais deviennent des sources d'infection permanentes. Toutefois, le virus PRV peut provoquer l'avortement des truies en gestation.
2. Les porcelets subissent une atteinte grave du système nerveux central. Les porcelets présentent une sensibilité élevée à la naissance qui diminuera  
10 progressivement. Jusqu'à l'âge de 10 jours, les porcelets atteints, ne bénéficiant pas d'immunité passive provenant de la mère, succombent en quelques heures. Plus âgés, ils sont sujets à des tremblements musculaires, des contractions, mais l'évolution est plutôt bénigne.

Dans d'autres espèces la maladie peut être mortelle et la durée  
15 d'incubation est variable et comprise entre 15 heures et 12 jours.

Il existe actuellement plusieurs méthodes de vaccination contre la maladie d'Ausjeszky.

Une des méthodes classiques consiste en l'injection de virus vivants, qui doivent être atténués pour éviter que la maladie ne se déclare.

20 Ainsi, on utilise pour la vaccination des porcs, des virus PRV de la souche Bartha qui comprennent des mutations dans le génome codant pour les glycoprotéines gI, gp63 et gIII ainsi que pour une protéine de la capsid virale dont le gène se situe sur le fragment BamHI 4. (Mettenleiter T., Acta Veterinaria Hungarica, 42 (2 - 3), p. 153-177 (1994)).

25 On utilise aussi les vaccins vendus sous les noms OMNIVAC®-PRV (FERMENTA ANIMAL HEALTH Co., Kansas City, MO, USA) et OMNIMARK®-PRV (FERMENTA ANIMAL HEALTH Co., Kansas City, MO, USA) qui comprennent des virus PRV de la souche Bucharest, manipulés génétiquement. Ces souches comportent des délétions dans les gènes codant  
30 respectivement pour la thymidine kinase ou pour la thymidine kinase et gIII. Bien entendu, il existe encore d'autres vaccins contre la maladie d'Aujeszky qui fonctionnent selon le même principe.

Cette méthode de vaccination confère au sujet vacciné une bonne protection qui est due à l'action intracellulaire du virus vivant. En effet, les virus  
35 vivants pénètrent dans les cellules où les antigènes viraux seront synthétisés. Ensuite, les peptides dérivés de ces antigènes viraux sont présentés à la surface

des cellules infectées en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I). Une réponse cytotoxique peut ainsi être provoquée en plus de la réponse humorale ce qui induit chez le sujet vacciné une meilleure protection contre le virus.

5 Bien que les virus soient atténués par des mutations, un risque existe que les virus redeviennent pathogènes par des mutations spontanées ou par des recombinaisons avec des virus de type sauvage.

Les vaccinations par des agents viraux vivants peuvent aussi entraîner, sous certaines conditions, une prolifération de virus vivants. Cette prolifération  
10 de virus vivants, même atténués, constitue un risque pour des sujets plus susceptibles, tels que des nouveau-nés ou des sujets en gestation.

Une autre technique mise au point plus récemment, consiste en l'utilisation d'un vecteur vivant non-pathogène portant des gènes sélectionnés du virus PRV.

M. ELOIT et al (J.T. van Oirschot (ed.), Vaccination and control of  
15 Aujeszky's Disease, p. 61-66, ECSC, EEC, EAEC, Brussels and Luxembourg, 1989) ont mis au point un vaccin basé sur l'adénovirus type 5 (AD5) recombinant qui donne lieu à l'expression du gène gp50 du virus PRV.

W.L. MENGELING et al (Arch. of Virology, V 134, n° 3-4, p. 259-269,  
20 1994) ont publié des résultats d'essais avec un virus vaccinia (NYVAC) contenant les gènes du PRV codant pour les glycoprotéines gp50, gII et gIII. Cependant, l'efficacité de ce type de vaccin est limitée.

Par contre M.L. VAN DER LEEK et al (The Veterinary Record (1994)  
134, p. 13-18) ont abouti à des résultats encourageants avec une vaccination de  
25 porcs contre le virus PRV par scarification ou par injection intramusculaire d'un recombinant du virus de la variole porcine et du virus PRV (rSPV-AD). Ce recombinant a été obtenu par insertion des gènes PRV codant pour les gp50 et gp63 attachés au promoteur P 7.5 du virus vaccinia dans le gène de la thymidine kinase du virus SPV.

Bien entendu, il existe encore d'autres vaccins contre la maladie  
30 d'Aujeszky qui fonctionnent selon le même principe.

Une nouvelle approche pour induire une réponse immunologique a été  
décrite récemment par ULMER et al, 1993, Sci. 259:1745). Des souris ont été  
immunisées par injection intramusculaire d'un plasmide comprenant le gène de la  
nucléoprotéine du virus de l'influenza sous le contrôle d'un promoteur  
35 mammalien. Cette immunisation par injection du plasmide a apparemment conduit à une transfection de cellules musculaires, suivie d'une expression in situ

de la protéine, aboutissant à une réponse immunologique spécifique contre le virus de l'influenza, de type cellulaire et humoral, et par conséquent à une protection contre une attaque par ce virus.

Il semble, d'après les expériences publiées, que des parties de protéines virales produites à l'intérieur des cellules transfectées soient reprises par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et présentées à la surface de la cellule.

ROBINSON et al, décrivent en 1993, dans Vaccine 11, 957-960 une immunisation de poules contre le virus de l'influenza par des injections intraveineuses, intrapéritonéales et sous-cutanées de plasmide. De 28 % à 100 % des animaux ainsi immunisés résistent à un "challenge" par une dose létale du virus. Il est à noter que l'efficacité dépend fortement de la voie et du système utilisé pour l'injection et d'un éventuel prétraitement du site d'injection (DANKO et al, Vaccine 12, 1499-1502 (1994)).

GRAHAM J. M. COX et al ont décrit une méthode de vaccination de bovins et de souris contre le virus BHV-1 par injection d'ADN plasmidique, dans J. Virol. 1994 p. 5685-5689. On a pu montrer que l'injection intramusculaire de bovins et de souris (dans le quadriceps) d'ADN plasmidique contenant le gène des glycoprotéines de gI, gIII ou gIV de BHV-1 suscitait une réponse immunitaire dans l'animal vacciné. La réponse immunitaire dépend fortement de la quantité d'ADN injecté, et de la glycoprotéine. Ainsi, le gène de la protéine gIV provoquait une réponse supérieure à celle des protéines gI et gIII.

Aucun des vaccins plasmidiques décrits à ce jour n'est efficace contre des maladies virales infectant les porcs et autres espèces tels que la maladie d'Aujeszky causée par le virus PRV.

Le but de la présente invention est de proposer un vaccin plasmidique contre le virus PRV responsable de la maladie d'Aujeszky.

Ce but est atteint par un vaccin comprenant au moins un plasmide codant pour la glycoprotéine gIII du virus PRV ou pour une protéine présentant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV et un excipient pharmaceutiquement acceptable pour celui-ci.

Un des avantages de cette méthode réside dans le fait que cette méthode est peu onéreuse.

En effet, le plasmide peut être produit, selon des techniques bien maîtrisées, dans des bactéries telles que E. coli.

L'extraction de plasmides est bien connue et un rendement élevé peut être

obtenu.

Il n'est pas nécessaire que le gène introduit dans le plasmide code pour la protéine gIII entière, il suffit qu'il code pour une partie ou un homologue de la protéine gIII du PRV qui a la même antigénicité que la protéine gIII c.-à-d. le même effet sur le système immunologique que la protéine gIII. En effet, une partie seulement de la protéine gIII est identifiée par le système immunologique de l'animal, les autres parties de la protéine, bien que jouant certainement un rôle dans la vie du virus, ne sont pas essentielles dans la reconnaissance de la protéine par l'organisme infecté.

Un autre avantage est qu'on peut facilement distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés par le virus PRV. En effet, les animaux vaccinés ne développent que des anticorps contre la protéine gIII tandis que les animaux infectés par le virus PRV développent aussi des anticorps contre d'autres protéines du virus.

De plus, la méthode est sûre, car une prolifération de virus vivants n'est pas à craindre. Comme on n'injecte qu'une partie bien déterminée du génome du virus, il n'y a pas d'infection par des virus et donc par voie de conséquence il ne peut y avoir de prolifération de virus.

Du fait que les cellules musculaires ont une grande longévité et ne circulent pas dans le corps de l'animal, l'expression locale et continue de l'antigène à de faibles concentrations peut stimuler la réponse immunologique à long terme.

La vaccination par le vaccin selon la présente invention peut être utilisée comme outil diagnostique car elle induit la formation d'anticorps monospécifiques. Ces anticorps peuvent être utilisés pour la détection de l'antigène p.ex. lors des tests ELISA ou autres.

Un effet surprenant de l'invention réside dans l'efficacité de l'immunisation contre le virus PRV. Bien que l'importance de la glycoprotéine gIII dans l'immunisation soit bien connue, l'injection de la protéine gIII purifiée ne semble pas avoir d'effet prononcé d'immunisation.

Z.H. BISEIBUTSU et al décrivent, dans la demande de brevet japonaise JP 05/246888, un vaccin contre le virus PRV, à base de la glycoprotéine gIII purifiée et d'un adjuvant à base d'huile. Cette approche n'est pas utilisée à l'échelle commerciale.

A. MATSUDA TSUCHIDA et al montrent dans un article publié au J. Vet. med. Sci. 54(3):447-452, 1992, qu'un mélange de glycoprotéines gII, gIII et gIV purifié injecté ensemble avec un adjuvant classique à base d'huile, confère une

meilleure protection à des souris contre un challenge par des virus PRV virulents que les glycoprotéines injectées individuellement.

Il reste à noter que des vaccins employant des protéines purifiées sont, en général, très onéreux car les étapes de purification sont longues et compliquées.

5 Selon un premier mode de réalisation avantageux, le plasmide est le plasmide pEVhis14gIII.

Le plasmide pEVhis14gIII a l'avantage de comporter un gène conférant une résistance à l'ampicilline, de sorte que les bactéries transformées, ayant incorporé le plasmide, sont aisément sélectionnables en ajoutant de l'ampicilline  
10 dans leur milieu de croissance.

Bien entendu, on peut envisager d'utiliser d'autres plasmides. Il suffit que le plasmide comprenne un gène codant pour une protéine ayant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV, inséré dans le plasmide de façon à ce qu'il soit exprimé dans l'organisme vacciné. Un marqueur tel qu'un  
15 gène conférant une résistance à un antibiotique permet de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide.

Pour augmenter l'efficacité du vaccin, le plasmide peut contenir outre le gène codant pour la glycoprotéine gIII du virus PRV ou pour une protéine présentant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV, un ou  
20 plusieurs gènes codant pour des cytokines.

Certaines cytokines sont connues pour exercer une activité adjuvante sur les vaccins. Le fait de les introduire dans le plasmide de façon à ce qu'elles puissent être exprimées dans les cellules augmentera l'efficacité du vaccin.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le vaccin comprend aussi  
25 un excipient pharmaceutiquement acceptable dans lequel le plasmide est incorporé. Le terme "excipient pharmaceutiquement acceptable", mentionné dans ce document, se réfère soit à des milieux liquides soit à des milieux solides susceptibles d'être utilisés comme excipient (véhicule) pour introduire le plasmide dans l'animal à vacciner.

30 Citons comme exemple des milieux liquides, l'eau, le sérum physiologique, le tampon phosphate-salin, les solutions contenant des adjuvants, des détergents, des stabilisants et substances favorisant la transfection, les suspensions de liposomes, de virosomes et les émulsions.

Citons comme exemple des milieux solides, les microbilles d'or  
35 recouvertes de plasmide, destinées à être projetées par bombardement ("gene gun") dans les tissus de l'animal et les microparticules contenant de l'ADN,

utilisables par voie parentérale et orale.

La vaccination par ADN peut être éventuellement précédée d'un prétraitement du site de vaccination (par ex. utilisation d'un anesthésiant local) de façon à améliorer son efficacité.

5 La présente invention propose également un vaccin plasmidique contre le virus PRV comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine gIII du virus PRV ou pour une protéine présentant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV ou une construction d'ADN comprenant une cassette d'expression incluant :

- 10 a) une séquence d'ADN codant pour un polypeptide contenant au moins un déterminant antigénique de la glycoprotéine gIII ou un fragment immunogénique de celle-ci, et
- b) des séquences de contrôle reliées opérativement auxdites séquences codantes où ladite séquence codante peut être transcrite et traduite dans une cellule et
- 15 où lesdites séquences de contrôle sont homologues ou hétérologues à ladite séquence codante.

Avantageusement, le vaccin plasmidique contient un ou plusieurs gènes codant pour des cytokines.

20 Selon encore un autre aspect de la présente invention, on propose d'utiliser le plasmide pEVhis14gIII dans la fabrication d'un vaccin.

On propose également d'utiliser le plasmide pEVhis14gIII dans la fabrication d'un vaccin contre le virus PRV.

L'invention est décrite plus en détail, à titre d'illustration, dans les exemples qui suivent.

25 Exemple 1 : Obtention d'un vaccin.

Le vaccin a été obtenu en trois étapes, comprenant la construction d'un plasmide (pEVhis14gIII) contenant le gène de la glycoprotéine gIII du virus PRV, la production de ce plasmide dans des bactéries transformées et la formulation du vaccin comprenant le plasmide et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

30 Etape A : Construction d'un plasmide (pEVhis14gIII) contenant le gène de la glycoprotéine gIII du virus PRV.

L'ADN du plasmide pEVhis14gIII a été obtenu de l'Institute for Animal Science and Health, (ID DLO, Lelystad, NL). Il comprend le gène de la glycoprotéine gIII du virus PRV, sous contrôle du promoteur HCMV et le gène marqueur de la résistance à l'ampicilline: il est utilisé en tant que vaccin à ADN (ADN<sup>+</sup>). La carte du plasmide est donnée à la Figure 1.

35

- 9 -

Le plasmide a été déposé conformément au Traité de Budapest le 16 novembre 1995 à la collection nommée "Belgian Coordinated Collections of Microorganisms - Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmiden collectie" (LMBP), Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35 Gent, Belgique B - 9000  
5 sous le numéro d'accession LMBP3377.

Etape B : Production du plasmide dans des bactéries transformées.

**Préparation de cellules d'E. coli traitées au RbCl.**

Avant d'être transformées, les cellules d'E. coli, souche DH 5\* (Gibco) ont été soumises à un traitement au RbCl pour augmenter l'efficacité de la  
10 transformation. La procédure qui a été suivie, à l'exception près que nous avons utilisé une souche E. coli DH 5 $\alpha$ , est décrite dans le bulletin d'information "The NEB transcript", vol. 6(1)p7, may 1994, édité par NEW ENGLAND BIOLABS, Inc., Beverly, MA01915.

**Transformation de cellules d'E. coli traitées au RbCl.**

15 100  $\mu$ l de cellules traitées au RbCl et 1  $\mu$ l de solution d'ADN contenant 250 ng de plasmide pEVhis14gIII ont été incubés pendant 10 minutes sur de la glace (à 0 °C) et ensuite pendant 5 minutes à 37 °C. Le mélange a ensuite été transféré dans 2 ml de milieu RB (bactopeptone 1 % (p/v), extrait de levure 0.5 % (p/v), NaCl 1 % (p/v)) et incubé entre 30 minutes et 2 heures à 37 °C sous  
20 agitation. L'abréviation % (p/v) représente un pourcentage exprimé en poids par volume.

100 et 500  $\mu$ l de la culture de cellules ont été étalés sur une boîte de Pétri contenant un milieu RB + ampicilline 100  $\mu$ g/ml + agar 2 % (p/v).

**Mini préparation d'ADN plasmidique pEVhis14gIII.**

25 Les colonies obtenues ci dessus ont d'abord été utilisées pour effectuer des mini préparations afin de vérifier la production et la structure du plasmide pEVhis14gIII. Des colonies individuelles ont été mises en culture pendant une nuit dans 2 ml de milieu RB + ampicilline 100  $\mu$ g/ml.

Les cultures ont été traitées ensuite comme décrit dans "Molecular cloning, a laboratory manual", J. Sambrook, E.F.Fritsch et T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) sous le chapitre "Small scale preparations of plasmid DNA", § 1.21 1.28 à l'exception près que pour les étapes 1 4, les centrifugations ont été faites à température ambiante et que la composition de la solution III a été modifiée de façon à contenir de l'acétate de sodium 3 M, à pH  
35 4,8.

Les culots ont été séchés sous vide et repris dans 100 à 200  $\mu$ l d'eau

- 10 -

(filtrée sur appareil Milli Q, Millipore, USA) sans traitement par la RNase.

L'analyse par digestion au moyen de diverses enzymes de restriction, suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose a permis de vérifier la conformité du plasmide (voir aussi "Molecular cloning, a laboratory manual", J. Sambrook, E.F.Fritsch et T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), §6).

### Maxi-préparation d'ADN plasmidique pEVhis14gIII.

Afin d'obtenir de l'ADN plasmidique en quantité suffisante pour les vaccinations, l'ADN plasmidique a été produit en plus grande quantité selon un des deux modes opératoires suivants.

10 Une suspension de E. coli transformé par le plasmide pEVhis14gIII est incubée pendant une heure dans 2 ml de milieu RB et ensuite répartie dans 1 à 4 flacons de 400 ml de milieu RB contenant de l'ampicilline à raison de 100 µg/ml. Les cultures ont été incubées pendant une nuit à 37 °C sous agitation à environ 150-200 tours par minute.

15 Les cultures ont été centrifugées dans des tubes Nalgene de 500 ml pendant 7 minutes à 8 670 g. Toutes les centrifugations ont été effectuées dans une centrifugeuse Beckman modèle J2-21.

Le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 10 ml de solution 1 (glucose 1 % (p/v); tris-HCl 25 mM; pH = 8,0; EDTA 10 mM; lysozyme 1 % (p/v)) et transvasé dans un tube Nalgene de 40 ml. Le tube a été laissé pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite 10 ml de la solution 2 (NaOH 0,2 M; SDS (sodium dodécyl sulfate) 1 % (p/v)) ont été ajoutés, les tubes ont été agités et laissés pendant 5 minutes à température ambiante. 10 ml de solution 3 (acétate de sodium 3 M; pH = 4,8) ont été ajoutés et les flacons ont été agités puis centrifugés pendant 30 minutes à 48 400 g à 0 °C. 25 ml du surnageant ont été transvasés dans un tube Falcon de 50 ml recouvert de six couches de gaze. Si nécessaire, le volume peut être ajusté avec du TE (tris-HCl 10 mM; pH = 8,0; EDTA 1 mM). Ensuite, on a ajouté 15 ml d'isopropanol à température ambiante, agité et transféré le mélange dans un tube Nalgene de 40 ml. Après centrifugation pendant 15 minutes à 48 400 g à 0 °C, le surnageant a été éliminé. Après avoir bien drainé le liquide et dissout le culot dans 5 ml de TE, les suspensions ont été incubées pendant 30 minutes à 37 °C sous agitation en présence de RNase A à une concentration finale de 0,1 mg/ml. Ensuite on a ajouté 10 µl de protéinase K en solution (10 mg/ml) et incubé pendant 30 minutes à 37 °C minimum sous agitation.

Les colonnes TIP 500 QIAGEN (QIAGEN, INC., CA, USA) ont été

- 11 -

équilibrées par 10 ml de tampon QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM; éthanol 15 % (v/v); Triton X-100 0,15 % (v/v); pH = 7,0) par un écoulement sous simple gravité. L'abréviation MOPS représente l'acide sulfonique 3-(N-morpholino)propane. Les échantillons ont été déposés sur les colonnes, et les colonnes ont été lavées 6 fois par 10 ml de tampon QC (NaCl 1 000 mM; MOPS 50 mM; éthanol 15 % (v/v); pH = 7,0). Après élution par 20 ml de tampon QF' (NaCl 1 250 mM; MOPS 50 mM; éthanol 15 % (v/v); pH = 8,2), la solution a été récupérée dans des tubes Nalgene de 40 ml. 14 ml d'isopropanol ont été ajoutés à température ambiante. Après agitation, le mélange a été centrifugé pendant 15 minutes à 48 400 g à 0 °C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché sous vide et repris dans 500 µl d'eau Milli-Q. Après trois extractions du surnageant par 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v) et une extraction par un volume d'éther, l'ADN a été précipité avec 50 µl d'acétate de sodium 3 M et 0,7 ml d'isopropanol. Après centrifugation pendant 10 minutes à 0 °C à 18 320 g, le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol à 70 % (v/v). Le surnageant a été éliminé après une centrifugation de 10 minutes à 18 320 g à 0 °C et le culot comprenant l'ADN plasmidique a été séché sous vide et mis en solution dans 500 µl d'eau Milli-Q. L'abréviation % (v/v) représente le pourcentage de volume par volume.

20 Une autre méthode pour produire de l'ADN plasmidique en grande quantité en utilisant des colonnes PZ523 (5 Prime → 3 Prime, INC., Boulder, CO., USA), est reprise ci-dessous.

Les cultures de 400 ml ont été centrifugées pendant 10 minutes à 8 670 g dans un godet Nalgene de 500 ml (Beckman J2-21). On a ajouté 10 ml de solution 1 (glucose 1 % (p/v); tris-HCl 25 mM pH = 8; EDTA 10 mM; lysozyme 1 % (p/v) (SIGMA)) et on a transvasé 10 ml de ce mélange dans un autre tube Nalgene de 40 ml. Après incubation pendant 5 minutes à température ambiante, on a ajouté 10 ml d'une solution 2 (NaOH 0,2 M; SDS 1 % (p/v) fraîchement préparée. Après légère agitation, le mélange a été incubé pendant cinq minutes sur de la glace. Après ajout de 10 ml de solution 3 (acétate de sodium 3 M; pH = 4,8) froide et centrifugation du tube pendant 20 minutes à 0 °C à 48 400 g, le surnageant, environ 25 ml, a été transvasé dans un tube Falcon de 50 ml recouvert de six couches de gaze. Après avoir ajouté 15 ml d'isopropanol, les 40 ml d'échantillon ainsi obtenus ont été transvasés dans un autre tube Nalgene de 40 ml et centrifugés pendant 20 minutes à 0 °C à 48 400 g. Le surnageant d'isopropanol a été éliminé, le culot obtenu a été lavé avec 1 ml d'éthanol à 70 % (v/v) et le

- 12 -

liquide a été bien drainé. Le culot a été resuspendu dans 5 ml de TE auquel on a ajouté 50 µl de RNase A (solution à 10 mg/ml) et incubé pendant 30 minutes à 37 °C sous agitation. 10 µl de protéinase K (solution à 10 mg/ml) ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant au moins 30 minutes à 37 °C sous agitation.

5 Pour les deux extractions consécutives au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v), 5 ml de cette solution de phénol ont été ajoutés dans un tube Greiner à visser, puis l'échantillon. Après légère agitation pendant 20 à 30 secondes pour mélanger, la solution a été centrifugée pendant 5 minutes à 3 920 g dans un rotor de type "swinging bucket". Après avoir passé la solution dans un

10 tube Nalgene, 1 ml d'acétate d'ammonium 7,5 M et 10 ml d'éthanol absolu ont été ajoutés. Après centrifugation pendant 20 minutes à 0 °C à 48 400 g (Beckman J2-21), le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol à 70 %, puis séché sous vide et remis en suspension dans 1,8 ml de solution 4 (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; NaCl 1 M).

15 Après avoir ôté le bouchon supérieur puis le bouchon inférieur de la colonne, celle-ci a été posée sur un tube de collecte et ensuite centrifugée pendant 1 minute à 980 g. Le tube de collecte ayant recueilli le tampon d'équilibrage a été éliminé. La colonne a été placée sur un autre tube de collecte et l'échantillon dissous (1,8 ml) a été déposé au sommet de la résine. La colonne a été

20 centrifugée pendant 12 minutes à 980 g dans un rotor de type "swinging bucket". La solution plasmidique recueillie a été divisée en deux tubes Eppendorf auxquels on a ajouté 600 µl d'isopropanol. Après centrifugation pendant 15 minutes à 18 320 g (centrifugeuse SIGMA 2K15), le culot a été lavé avec 300 µl d'éthanol à 70 % (v/v) et séché sous vide. Le culot comprenant l'ADN plasmidique est remis en

25 solution dans 500 µl d'eau Milli-Q (Millipore, USA) et conservé au froid jusqu'à la vaccination.

En ce qui concerne la préparation du plasmide ADN<sup>+</sup>, environ 11 mg ont été préparés selon la méthode utilisant les colonnes PZ523 et environ 16 mg en utilisant les colonnes Qiagen. Ces deux préparations ont été mélangées et mises

30 en oeuvre pour les exemples décrits.

Etape C : Formulation du vaccin comprenant le plasmide et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Le culot d'ADN plasmidique étant remis en solution dans de l'eau, la concentration en ADN a été déterminée par dépôt sur gel d'agarose et révélation

35 au bromure d'éthidium (voir "Molecular cloning, a laboratory manual", J. Sambrook, E.F.Fritsch et T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press

(1989), § 6 et appendix E et Winnacker E.L. "From genes to clones", VCH (1987), § 2.1.2.2.). La concentration en ADN a été ajustée de façon à se situer entre 0.3 et 1 µg d'ADN par µl d'eau.

**Exemple 2** : Utilisation du vaccin plasmidique chez la souris pour stimuler l'induction d'une réponse en anticorps et d'une réponse de cellules T cytotoxiques.

L'expérience menée chez la souris pour prouver l'efficacité du vaccin plasmidique requiert la construction d'un plasmide témoin dérivé du plasmide pEVhis14gIII, en préalable à l'immunisation des animaux et à l'analyse de la réponse immunitaire.

**Etape 1** : Construction d'un plasmide dérivé du plasmide pEVhis14gIII par délétion de la séquence codante du gène gIII.

Un plasmide dérivé du plasmide pEVhis14gIII par délétion de la séquence codante du gène de la glycoprotéine gIII a été utilisé en tant que contrôle négatif (pEVhis14gIII<sup>-</sup>, ADN<sup>-</sup>). Ce plasmide délété a été obtenu de la manière suivante : le plasmide pEVhis14gIII a été digéré par les enzymes de restriction Asp 718 et EcoRV. L'ADN a été ensuite traité à l'aide d'ADN polymérase T4 pour obtenir des fragments à bouts francs. L'ADN ainsi obtenu a été ligaturé à l'aide de l'ADN ligase T4 (voir "Molecular cloning, a laboratory manual", J. Sambrook, E.F.Fritsch et T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), § 1.53 1.73).

En ce qui concerne la préparation du vaccin contenant le plasmide délété, les mêmes étapes ont été suivies que celles décrites pour le plasmide ADN<sup>+</sup>, à l'exception près que lors de la production du plasmide pEVhis14gIII par maxi préparation, les colonnes PZ523 ont été utilisées uniquement.

**Etape 2** : Immunisations des souris

5 groupes de 6 à 10 souris femelles de la souche consanguine Balb/c âgées de 16 à 18 semaines à la première injection, ont été utilisées.

Les souris doivent être consanguines pour mesurer les réponses de cellules T cytotoxiques (CTL) car la compatibilité du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) entre les cellules T cytotoxiques et les cellules cibles, - des cellules (fibroblastes) 3T3-swiss albino (haplotype H-2D) -, doit être garantie. Les cellules cibles ont été cultivées dans un milieu DME à 10 % (v/v) de sérum de veau foetal.

L'ADN plasmidique du plasmide pEVhis14gIII, contenant le gène de la glycoprotéine gIII du virus PRV, a été utilisé en tant que ADN positif, (ADN<sup>+</sup>)

- 14 -

tandis que le plasmide équivalent, sans le gène gIII, ( $ADN^-$ ), a été utilisé en tant que contrôle négatif.

100  $\mu$ g d'ADN ont été injectés dans chaque souris de manière intramusculaire, dans l'arrière train supérieur gauche et droit, en deux portions  
5 contenant de 50-150  $\mu$ l de solution aqueuse, selon le protocole d'immunisation suivant.

Le groupe I comprenant 10 souris marquées par un code coloré, a été vacciné quatre fois, à la semaine 0 ( $ADN_1^+$ ) à la semaine 3 ( $ADN_2^+$ ), à la semaine 5 ( $ADN_3^+$ ) et à la semaine 10 ( $ADN_4^+$ ) avec de l' $ADN^+$ . Du sérum,  $sADN_3^+$ , a été prélevé 2 jours avant la dernière injection, du sérum  $sADN_4^+$  a été prélevé 6 jours après le premier prélèvement c.-à-d. 5 jours après la dernière injection  $ADN_4^+$ .

La semaine 11, les cellules de la rate ont été prélevées et restimulées in vitro. Les tests CTL ont été effectués 4 jours plus tard.

15 Le groupe 2 comprenant également 10 souris marquées par un code coloré, a été vacciné trois fois, à la semaine 0 ( $ADN_1^+$ ), à la semaine 3 ( $ADN_2^+$ ) et à la semaine 5 ( $ADN_3^+$ ) avec de l' $ADN^+$ . Du sérum,  $sADN_2^+$ , a été prélevé 2 jours avant la dernière injection et du sérum  $sADN_3^+$  a été prélevé à la semaine 9 c.-à-d. 4 semaines après la dernière injection  $ADN_3^+$ .

20 La semaine 9, les cellules de la rate ont été restimulées in vitro. Les tests CTL ont été effectués 6 jours plus tard.

Le groupe 3 comprenant 8 souris marquées par un code coloré, a été vacciné seulement deux fois, à la semaine 0 ( $ADN_1^+$ ) et à la semaine 3 ( $ADN_2^+$ ). Du sérum,  $sADN_2^+$ , a été prélevé 2 semaines après la dernière injection et à la  
25 semaine 9.

La semaine 9, les cellules de la rate ont été restimulées in vitro. Les tests CTL ont été effectués 6 jours plus tard.

Le groupe 4, ou groupe de contrôle, comprenant 10 souris marquées par un code coloré, a été vacciné trois fois avec de l' $ADN^-$ , à la semaine 0 avec 200  
30  $\mu$ g d' $ADN^-$  ( $ADN_1^-$ ), à la semaine 2 avec 100  $\mu$ g ( $ADN_2^-$ ) et à la semaine 7 avec 100  $\mu$ g d' $ADN^-$  ( $ADN_3^-$ ). Du sérum,  $sADN_2^-$ , a été prélevé 2 jours avant la dernière injection et du sérum  $sADN_3^-$  a été prélevé à la semaine 8 c.-à-d. 1 semaine après la dernière injection  $ADN_3^-$ .

35 La semaine 8, les cellules de la rate ont été prélevées et restimulées in vitro. Les tests CTL ont été effectués 4 jours plus tard.

Le groupe 5 (groupe témoin positif), comprenant 6 souris, a été vacciné

trois fois avec du virus vivant, souche NIA3 M207 (obtenue de l'Institute for Animal Science and Health, ID-DLO, NL) à la dose de  $10^7$  PFU (Plaque Forming Unit) par souris et par injection dans les cous de pied, à la semaine 0, à la semaine 16 et à la semaine 17.

5 Du sérum a été prélevé 2 jours après la deuxième injection. Un mélange de sérum provenant de 5 animaux a été utilisé pour les analyses.

La semaine 18, les cellules de la rate ont été prélevées et restimulées in vitro. Les tests CTL ont été effectués 4 jours plus tard.

**Etape 3** : Analyse de la réponse immunitaire humorale et cellulaire (test CTL).

10 Selon le cas, les animaux ont été euthanasiés et la rate a été prélevée dans des conditions aseptiques entre 7 jours et jusqu'à six semaines après la dernière injection d'ADN.

Partie A - Mise en culture et restimulation in vitro des effecteurs

15 Les souris vaccinées et les souris témoins ont été euthanasiées par dislocation cervicale et rincées à l'alcool (70 % v/v). Les rates de ces animaux ont été déposées dans une boîte de Pétri contenant du PBS (Gibco) et ont été écrasées dans ces boîtes à l'aide d'une gaze en Nylon et d'un tube en plastique recourbé. L'élimination des agrégats et du tissu conjonctif entourant la rate s'est faite par filtration (au travers de la gaze en Nylon) du broyat obtenu. Après une  
20 centrifugation à 220 g pendant 4 minutes, le culot a été récupéré et les érythrocytes ont été lysés par ajout de 4 ml/rate de solution stérile ACK (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM NaEDTA, pH = 7,2-7,4).

Ensuite, deux lavages ont été réalisés avec du milieu effecteur stérile [composé de milieu DME (Dulbecco's modified Eagle, Gibco), complété par 10  
25 % (v/v) de sérum de veau foetal (Gibco), 1 % (v/v) de L-glutamine 200 mM (Gibco), 1 % (v/v) de la solution d'antibiotique pénicilline-streptomycine (pénicilline à 10 000 U/ml et streptomycine à 10 000  $\mu\text{g/ml}$  (Gibco), 10 mM de tampon HEPES (pH = 7,4) (Sigma),  $2 \times 10^{-5}$  M de 2-mercaptoéthanol (Gibco), 2 mM de pyruvate de sodium (Merck)]. Les cellules ont été remises en suspension  
30 à raison de  $5 \times 10^6$  cellules par ml dans ce milieu stérile. Les cellules de rate sont réparties pour leur mise en culture in vitro dans des flacons de culture de  $25 \text{ cm}^2$  (Falcon) au taux de  $25 \times 10^6$  cellules/flacon. Une partie de ces cellules a reçu une restimulation in vitro par ajout d'une des souches virales citées plus haut avec une multiplicité d'infection (MOI) égale à 2 et les autres ont servi de témoins non  
35 restimulés. Ces flacons ont été disposés verticalement dans un incubateur pendant 4 à 7 jours (à 37 °C, 3 % (v/v) de  $\text{CO}_2$  et une humidité supérieure à 90

% de la saturation) comme décrit plus haut.

Partie B - Le test CTL.

Les cellules de la lignée histocompatible (fibroblastes) 3T3-swiss albino (haplotype H-2D) sont utilisées comme cibles.

5 Le test CTL comporte plusieurs étapes :

a) Les cellules cibles ont été infectées ou non par une souche du virus Aujeszky (NIA3 M207) à une MOI égale à 10, les cellules infectées étant désignées CV<sup>+</sup> et les cellules non infectées CV<sup>-</sup>. Quatre-vingt-dix minutes plus tard, le marquage des cellules cibles en suspension a débuté (voir plus loin - Marquage à l'Eu des cellules cibles (3T3) en suspension.

b) Quant aux effecteurs mis en culture in vitro 4 à 7 jours (comme décrit plus haut) auparavant, ils ont été repris dans des flacons de culture, lavés 2 x avec du milieu effecteur et comptés pour être remis en suspension à raison de 5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml. Six heures après le début de l'infection des cellules cibles, celles-ci ont été mises au contact des effecteurs (parmi lesquels des lymphocytes T<sub>C</sub>). Dans une plaque de 96 puits à fond rond, 5 000 cellules cibles dans 50 µl de milieu effecteur (marquées à l'Eu et infectées ou non) ont été déposées sur respectivement 500 000, 250 000, 125 000, 62 500, 31 250, 15 625 effecteurs dans 100 µl (c.-à-d. des rapports effecteurs/cibles allant de 100/1 à 3/1). Des répétitions (3 ou 4 fois) sont effectuées pour chaque condition. La plaque a été centrifugée à ± 50 g pendant 4 minutes et mise à 37 °C durant 4 heures. L'évaluation de la quantité de cellules cibles lysées par les lymphocytes T<sub>C</sub> a été effectuée par un prélèvement de surnageant après une nouvelle centrifugation de 4 minutes à ± 50 g. Celui-ci a été déposé dans une plaque de 96 puits à fond plat dans 200 µl d'une solution amplificatrice de la fluorescence (DELFLIA<sup>®</sup> Enhancement solution, Pharmacia, Sweden) dans le cas du marquage à l'Eu. Le comptage au fluorimètre (delayed-time fluorimeter, 1234 DELFLIA Recherche, Wallac) a été effectué ± 12 heures plus tard en ayant pris soin de mettre les plaques contenant le mélange à l'obscurité et à température ambiante.

La quantification de la lyse spécifique (en %) a été estimée à l'aide de la formule suivante :

Libération expérimentale - bruit de fond

----- x 100 = Lyse spécifique (%)

35 Libération maximale - bruit de fond

Partie C - Marquage à l'Eu des cellules cibles en suspension.

Ce type de marquage est d'application tant pour des cellules se développant en suspension que pour des cellules adhérentes.

Des flacons de culture à confluence maximale ont été utilisés pour les différents marquages des cellules cibles 3T3.

5 Le flacon de culture contenant les cellules cibles 3T3 adhérentes a été débarrassé de son milieu de croissance et lavé 1 x avec du PBS (Gibco). 5 ml de trypsine-EDTA (Gibco) à 37 °C ont été déposés dans le flacon sur le tapis cellulaire. Au bout d'une minute, les cellules ont été décrochées par petits coups secs sur le flacon. Le décrochage complet réalisé, 7 ml de milieu effecteur stérile  
10 [décrit au-dessus] ont été ajoutés. Les cellules ont été lavées 1 x avec une solution composée de tampon HEPES [50 mM HEPES (acide (hydroxy-2-éthyl)-4-pipérazinyl-1,2-éthanesulfonique) (pH = 7,4), (Sigma); 93 mM NaCl (Merck); 5 mM KCl (Merck); 2 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Merck)] et remises en suspension à raison de 6 x 10<sup>6</sup> cellules/ml dans ladite solution. Le comptage de cellules  
15 vivantes a été effectué avec du Bleu Trypan (solution à 0,4 % (p/v), Sigma).

Un ml de cette suspension a été complété par :

- 750 µl de la solution du tampon HEPES (pH 7,4),  
- 200 µl de la solution d'Eu-DTPA (1,52 ml de la solution standard d'Eu (1 000 µg/ml dans 1 % (v/v) d'acide nitrique) (Aldrich); 8 ml de la solution du tampon  
20 HEPES (pH 7,4); 0,5 ml de DTPA acide diéthylène triaminepentaacétique (Merck) à 3,93 g dans 100 ml de la solution du tampon HEPES) et après 2 minutes, par 100 µl de sulfate de dextran (50 mg sulfate de dextran, M.W. = 500 KDa, Pharmacia dans 10 ml de la solution du tampon HEPES).

Trente minutes ont été nécessaires au marquage à température ambiante.  
25 Pendant ce marquage, les tubes ont été agités faiblement toutes les 10 minutes. Après quoi, 7 ml de tampon de réparation [0,588 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck); 1,8 g de glucose (Merck) dans 1 litre de la solution tampon HEPES pH 7,4]; 3 ml de milieu effecteur (voir plus haut) et 12 µl d'ADNase à 17 000 unités/ml (Boehringer Mannheim) ont été ajoutés. Une pause de 8 minutes a été observée.  
30 Ensuite, un lavage avec le milieu effecteur a été suivi d'un coussin de Ficoll-Paque (Ficoll et diatrizoate de sodium, Pharmacia LKB). Pour ce faire, les cellules ont été resuspendues dans 5 ml de milieu effecteur dans un tube de 50 ml (Falcon), et 5 ml de Ficoll-Paque ont été déposés dans le fond.

Après quinze minutes de centrifugation à 800 g et 20 °C, la partie  
35 supérieure de la solution dans le tube jusqu'à l'interface comprise a été récupérée.

Les cellules ont été débarrassées de toutes traces de Ficoll-Paque par un

- 18 -

lavage avec le milieu effecteur. Après comptage, les cellules ont été remises en suspension à une concentration de 10<sup>5</sup> cellules/ml.

5 Pour l'évaluation du marquage, 5 000 cellules cibles ont été déposées dans une plaque de 96 puits à fond rond en présence de 100 µl de milieu effecteur pour déterminer la quantité de bruit de fond de l'Eu.

10 La même quantité de cellules a été déposée dans 100 µl de Triton X-100 (1 % v/v, Merck) pour la libération maximale d'Eu. Après une centrifugation de 4 minutes à 50 g, 20 µl de surnageant ont été prélevés et déposés dans 200 µl d'une solution amplificatrice (voir plus haut) de la fluorescence et la plaque de 96 puits à fond plat a été passée au fluorimètre (1234 DELFIA Recherche, Wallac) après une incubation de 1 heure dans l'obscurité de façon à atteindre une lecture stable.

Partie D - Résultats du test CTL.

Tableau 2 : Comparaison de la lyse spécifique des splénocytes avant et après passage sur un gradient Ficoll-Paque.

Groupes/in vitro/cibles	Lyse spécifique (en %) ± déviation standard (en %)						
	Rapport E/C						
	100/1	50/1	25/1	12/1	6/1	3/1	n
<b>Groupe 5</b>							
SB <sup>++</sup> /MOI 2/CV <sup>+</sup> Avant Ficoll	37,6 ± 10,0	22,9 ± 5,8	16,1 ± 4,7	8,4 ± 2,2	3,8 ± 1,2	-0,5 ± 0,2	4
SB <sup>++</sup> /MOI 2/CV <sup>+</sup> Après Ficoll	42,2 ± 16,4	35,5 ± 12,2	20,3 ± 6,4	17,0 ± 6,9	9,1 ± 3,3	11,4 ± 4,5	4
<b>Groupe 1</b>							
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /V <sup>-</sup> /CV <sup>-</sup> Avant Ficoll	7,5 ± 1,6	6,1 ± 1,1	2,8 ± 0,4	1,2 ± 0,3	-0,7 ± 0,1	-0,9 ± 0,2	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /V <sup>-</sup> /CV <sup>-</sup> Après Ficoll	9,2 ± 1,6	9,1 ± 1,5	5,5 ± 0,6	2,7 ± 0,5	1,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /V <sup>-</sup> /CV <sup>+</sup> Avant Ficoll	11,9 ± 4,0	9,3 ± 3,5	1,8 ± 0,6	-2,1 ± 0,6	-2,7 ± 0,8	-3,6 ± 1,0	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /V <sup>-</sup> /CV <sup>+</sup> Après Ficoll	31,8 ± 14,2	49,4 ± 20,3	45,6 ± 23,8	20,6 ± 9,0	19,8 ± 9,0	10,7 ± 4,7	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /MOI 2/CV <sup>-</sup> Avant Ficoll	-0,3 ± 0,1	-0,7 ± 0,1	-1,0 ± 0,2	-0,6 ± 0,1	-1,3 ± 0,2	-1,2 ± 0,2	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /MOI 2/CV <sup>-</sup> Après Ficoll	-2,0 ± 0,3	-1,6 ± 0,2	-1,2 ± 0,2	-2,7 ± 0,4	-1,1 ± 0,1	-1,3 ± 0,2	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /MOI 2/CV <sup>+</sup> Avant Ficoll	-5,3 ± 1,6	-6,2 ± 1,6	-5,4 ± 1,4	-5,1 ± 1,5	-4,1 ± 1,1	-3,3 ± 0,9	4
ADN <sub>4</sub> <sup>+</sup> /MOI 2/CV <sup>+</sup> Après Ficoll	15,4 ± 6,6	12,8 ± 5,8	19,1 ± 8,6	15,3 ± 7,2	7,6 ± 2,9	22,9 ± 13,3	4
<b>Groupe 4</b>							
ADN <sub>3</sub> <sup>-</sup> /MOI 2/CV <sup>+</sup> Avant Ficoll	-5,5 ± 1,7	-5,2 ± 1,5	-3,9 ± 1,2	-3,3 ± 1,1	-3,9 ± 1,2	-3,7 ± 1,3	4
ADN <sub>3</sub> <sup>-</sup> /MOI 2/CV <sup>+</sup> Après Ficoll	-10,3 ± 4,2	-5,8 ± 2,1	-7,8 ± 3,4	-2,4 ± 1,1	-3,5 ± 1,3	6,5 ± 2,8	4

Notes explicatives concernant les traitements de restimulation in vitro et la préparation des cibles.

5 V<sup>-</sup> : cellules de rate mises en culture in vitro en l'absence de virus

- 20 -

- MOI 2 : cellules de rate mises en culture in vitro et restimulées par ajout de virus vivant (NIA3 M207) avec une multiplicité d'infection (MOI) égale à 2.
- CV<sup>-</sup> : cellules cibles non-infectées, marquées à l'Europium
- 5 CV<sup>+</sup> : cellules cibles infectées par le virus NIA3 M207 à une MOI égale à 10, et marquées à l'Europium
- SB<sup>++</sup> : groupe 5, témoin positif vacciné par du virus vivant
- ADN<sub>4</sub><sup>+</sup> : groupe 1, animaux injectés 4 fois avec l'ADN<sup>+</sup>
- ADN<sub>3</sub><sup>-</sup> : groupe 4, animaux injectés 3 fois avec l'ADN<sup>-</sup>
- 10 n : nombre de répétitions

La lyse des cellules cibles non infectées s'est située entre 0 et 9 % et n'était pas affectée par le passage sur le gradient de Ficoll-Paque. Par contre, le témoin positif (groupe 5), aussi bien avant que après traitement Ficoll a présenté un taux de lyse cellulaire significativement positif. Les pourcentages de lyse des cibles infectées étaient augmentés par le passage sur Ficoll-Paque pour les animaux immunisés avec l'ADN.

15

Le test CTL du groupe 1, injecté 4 fois avec l'ADN<sup>+</sup> (ADN<sub>4</sub><sup>+</sup>) a montré une activité lytique.

Le test CTL du groupe 2, injecté 3 fois avec l'ADN<sup>+</sup> (ADN<sub>3</sub><sup>+</sup>) n'a pas montré d'activité lytique.

20

Le test CTL du groupe 3, injecté 2 fois avec l'ADN<sup>+</sup> (ADN<sub>2</sub><sup>+</sup>) n'a pas montré d'activité lytique.

Le test CTL du groupe 4, injecté 3 fois avec l'ADN<sup>-</sup> (ADN<sub>3</sub><sup>-</sup>) n'a pas montré d'activité lytique.

25

Bien entendu d'autres fréquences et d'autres intervalles sont envisageables, ainsi que d'autres dosages et voies d'immunisation.

#### Partie E - Analyse de la réponse immunologique humorale.

Le sérum a été collecté deux fois au cours de l'expérience, la dernière collecte se faisant juste avant le sacrifice des animaux pour l'obtention des cellules de la rate en vue d'un test CTL, et les réponses anticorps ont été mesurées par :

30

- un test de séroneutralisation du virus PRV (SN)
- un test immunoenzymatique (ELISA) pour la mesure dans le sérum de souris des anticorps dirigés contre un extrait de toutes les glycoprotéines PRV.

Le test de séroneutralisation du virus PRV a été effectué selon le mode opératoire qui est repris ci-dessous.

35

Des cellules PD<sub>5</sub> (SOLVAY-DUPHAR, NL) et des virus de la souche

Bartha K61 (SOLVAY-DUPHAR, NL) ont été utilisés. L'expérience a été réalisée dans des plaques à 96 micropuits à fond plat de Greiner (France).

Le milieu dans lequel le test SN a été effectué avait la composition suivante : 340 ml Milieu essentiel Eagle minimum (Flow), 100 ml hydrolysate de lactalbumine 2,5 % (p/v); 5-10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  à 5,6 % (p/v) et 50 ml de sérum de veau foetal (Gibco).

Le sérum à tester a été dilué en série de 2 en 2 dans le milieu, les dilutions allant de 1:2 à 1:4096 (50  $\mu\text{l}$  de sérum + 50  $\mu\text{l}$  de milieu chaque fois), dans la plaque à 96 puits à fond plat (Greiner). Chaque échantillon a été testé en double.

Le virus a été dilué à 100 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infectious dose at 50 %) dans 0,05 ml de milieu et 50  $\mu\text{l}$  de cette solution diluée de virus ont été ajoutés à chaque puit. Le mélange sérum/virus a été incubé pendant 24 heures à 37 °C. 50  $\mu\text{l}$  de la suspension de cellules PD<sub>5</sub> ayant une concentration de  $4 \times 10^5$  cellules/ml ont été ajoutés à chaque échantillon de sérum/virus. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 5 jours.

Les résultats ont été observés au microscope et les titres ont été calculés en prenant l'inverse de la dilution qui correspond à 50 % de la dilution limite.

Le virus a été contrôlé en incubant un échantillon de virus dilué pendant 24 heures à 4 °C et un autre échantillon de virus pendant 24 heures à 37 °C. Les deux suspensions de virus ont été diluées (v/v) avec le milieu du test SN (voir plus haut) 1:10; 1:100 et 1:1000. Puis, 0,05 ml de chaque dilution des suspensions de virus ont été ajoutées par puit en utilisant 8 puits pour chaque dilution. Puis 0,05 ml de milieu et 0,05 ml de suspension de cellules ont été ajoutés. L'interprétation des résultats sous le microscope a eu lieu après une incubation de 5 jours à 37 °C.

Les réponses humorales mesurées par le test SN, après deux, trois et quatre injections d'ADN, ont montrés des valeurs nulles ou faiblement positives.

Il est à noter qu'après immunisation avec du virus vivant à fortes doses, des titres mesurables mais relativement bas ont été observés dans l'essai de séroneutralisation. Ces observations sont confirmées par la littérature.

Le mode opératoire du test ELISA est décrit par M. ELOIT et al dans ARCH. virol. (1992), 123, 135-143.

En plus du sérum provenant des groupes d'animaux traités comme décrit sous "immunisation des souris", 2 sérums supplémentaires ont été inclus dans l'analyse, un sérum positif (sérum +) et un sérum négatif (sérum -). Le sérum - provient de souris non-injectées (souris OF1, âgées de 3 semaines). Un mélange

- 22 -

de sérum de 10 souris a été effectué. Le sérum + est un mélange de sérum provenant de 10 souris OF1 ayant reçu à 3 semaines  $10^9$  TCID (tissue culture infectious dosis) d'adénovirus recombinant exprimant le gène gD par voie intramusculaire et prélevé 3 semaines plus tard.

5 Le Tableau 3 et le Tableau 4, repris ci-dessous, montrent la densité optique (OD) en fonction des dilutions du sérum. Les échantillons ont d'abord été testés à une dilution de 1/10 (Tableau 3 - test 1) afin d'identifier les échantillons positifs c. à-d. les échantillons pour lesquels l'OD était supérieure à la densité  
10 optique du sérum du contrôle négatif ( $OD \times 100 = 509$ ). Les échantillons positifs ainsi identifiés ont été testés une deuxième fois à des dilutions variables (Tableau 4).

Dans le sérum des animaux auxquels on avait injecté de l'ADN plasmidique sans le gène gIII (ADN<sup>-</sup> - pEVhis14gIII<sup>-</sup>), on n'a découvert aucun anticorps dirigé contre la glycoprotéine gIII. Il a été montré qu'après 4 injections  
15 de plasmides ADN<sup>+</sup>, espacées de 2 semaines ou plus, les souris ont montré une bonne réponse humorale contre le virus. Sept animaux sur 9 testés ont montré des anticorps anti-gIII après quatre injections.

Même après trois injections d'ADN<sup>+</sup>, le sérum de 9 animaux sur 10 montrait des titres d'anticorps anti-gIII mesurables. De même, après 2 injections  
20 d'ADN<sup>+</sup>, le sérum de 7 animaux sur 8 montrait des réponses positives en ELISA.

**Tableau 3** : Test ELISA : Densité optique (OD) en fonction des dilutions du sérum - Identification des échantillons positifs.

	n° de souris	OD (x 100) dilution 1/10
Témoin positif (NIA3 M207)	mélange	2000
sADN <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1+2+3	552
	4+5+6	545
	7+8+9+10	395
sADN <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1+2+3	587
	4+5+6	679
	7+8+9+10	697
sADN <sub>3</sub> <sup>+</sup>	1	2000
	2	2000
	3	2000
	4	511
	5	1263
	6	2000
	7	2000

- 24 -

	8	2000
	9	2000
	10	2000
sADN <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2	2000
	3	2000
	4	874
	5	759
	6	2000
	7	2000
	8	2000
	9	2000
	10	2000
sérum -	mélange	509
sérum +	mélange	2000

notes explicatives :

- sADN<sub>2</sub><sup>-</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 2 fois avec ADN<sup>-</sup>  
sADN<sub>3</sub><sup>-</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 3 fois avec ADN<sup>-</sup>  
sADN<sub>3</sub><sup>+</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 3 fois avec ADN<sup>+</sup>  
5 sADN<sub>4</sub><sup>+</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 4 fois avec ADN<sup>+</sup>  
témoin positif (NIA3 M207) : sérum provenant d'animaux injectés avec du virus vivant NIA3 M207

sérum - : sérum provenant d'animaux non-injectés

sérum + : sérum provenant d'animaux injectés avec de l'adénovirus exprimant le gène gD.

Tableau 4 : Test ELISA - densité optique (OD) en fonction des dilutions du sérum test 2

5

groupe	souris N°	dil. 1/100	1/300	1/900	1/2700
témoin positif (M207)	moyenne	2000	2000	2000	2000
sADN <sub>2</sub> <sup>+</sup>	3	1087	599	287	171
	4	1378	622	303	192
	5	1506	866	405	261
	6	673	261	152	136
	7	1676	913	353	205
	8	1731	837	355	229
	9	1710	778	274	167
	1	Négatif à dil 1/10			
	2 et 10	non testé			
sADN <sub>3</sub> <sup>+</sup>	1	2000	1029	329	142
	2	2000	2000	879	296
	3	2000	2000	2000	2000

- 26 -

	5	197	123	89	83
	6	2000	1704	528	244
	7	2000	2000	1084	435
	8	2000	809	188	122
	9	2000	1501	285	169
	10	2000	2000	722	263
	4	Négatif à dil 1/10			
sADN <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2	2000	2000	684	262
	3	2000	2000	2000	2000
	4	263	138	98	103
	5	143	110	96	104
	6	2000	1641	566	256
	7	2000	2000	1122	419
	8	2000	1097	350	143
	9	2000	1739	462	211

- 27 -

	10	2000	2000	549	249
	1	non testé			
sérum -	mélange	155	96	83	92
sérum +	mélange	827	305	146	106

notes explicatives :

sADN<sub>2</sub><sup>-</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 2 fois avec ADN<sup>-</sup>

sADN<sub>3</sub><sup>-</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 3 fois avec ADN<sup>-</sup>

sADN<sub>3</sub><sup>+</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 3 fois avec ADN<sup>+</sup>

5 sADN<sub>4</sub><sup>+</sup> : sérum provenant d'animaux injectés 4 fois avec ADN<sup>+</sup>

témoin positif (NIA3 M207) : sérum provenant d'animaux injectés avec du virus vivant NIA3 M207

sérum - : sérum provenant d'animaux non-injectés

10 sérum + : sérum provenant d'animaux injectés avec de l'adénovirus exprimant le gène gD.

Exemple 3 : Induction d'une protection chez la souris contre une inoculation d'épreuve avec des virus virulents.

Partie A - Protocole d'immunisation.

15 Cinq groupes de dix souris (Charles River, Germany) femelles de 16 semaines d'âge de la souche consanguine Balb c ont été utilisés.

Pour le groupe G0, le contrôle négatif, on a utilisé uniquement un tampon PBS (Gibco).

Le groupe G1 (le contrôle positif) a été vacciné à l'aide d'un virus atténué (souche NIA3 M207) par voie intrapéritonéale.

20 10<sup>7</sup> PFU (unités formant des plaques) ont été utilisées pour chaque souris. Ceci est une dose très élevée par comparaison aux doses utilisées pour la vaccination des porcs avec les souches vaccinales atténuées utilisées traditionnellement à la dose de 10<sup>5,5</sup> PFU.

25 Les trois autres groupes ont reçu de l'ADN plasmidique obtenu selon la méthode décrite à l'exemple 1.

La vaccination par l'ADN plasmidique a été réalisée par injection intramusculaire de 100 µg dans 2 fois 100 µl d'eau/souris dans l'arrière-train

gauche et droit pendant plusieurs jours consécutifs.

Le groupe C a été vacciné deux fois, le vendredi et le lundi respectivement.

5 Le groupe B a reçu quatre injections consécutives réparties du mercredi au lundi.

Le groupe A a reçu 6 doses réparties du lundi au lundi suivant.

Les animaux ont été logés dans des cages, séparés par groupe et les individus ont été marqués individuellement au feutre bleu.

10 Le sérum prélevé sur chaque animal a été codé de façon à pouvoir suivre chaque animal individuellement en ce qui concerne le dosage d'anticorps et la protection conférée par les vaccinations.

#### Partie B - Analyse des réponses immunitaires.

Le développement des réponses humorales a été contrôlé selon le protocole ELISA présenté à l'exemple 2.

15 Le test de neutralisation de virus du sérum a été effectué selon la méthode décrite à l'exemple 2.

20 Des échantillons de sérum ont été prélevés au début de la période d'immunisation, c.-à-d. 3 jours après la dernière injection de vaccin, à la fin de la période d'immunisation, c.-à-d. un mois après la dernière injection de vaccin et juste avant l'inoculation d'épreuve par le virus virulent qui a eu lieu 9 jours plus tard. Enfin, un mois après le challenge, du sérum a été prélevé à nouveau.

#### Partie C - Inoculation d'épreuve.

25 Environ 37 jours après la dernière vaccination, toutes les souris ont été exposées à l'infection par un virus virulent vivant de la souche NIA3 à raison de 7 000 PFU dans 200 µl par animal injecté intrapéritonéalement. Le dosage est très élevé car la dose létale pour 50 % des animaux est environ 100 fois moins élevée ( $LD_{50} = 70$  PFU).

30 Les animaux sont observés et les décès sont enregistrés pendant les 15 jours suivant le challenge comme indiqué au Tableau 5.

Les résultats montrent l'évolution du taux de survie exprimé en pourcentage en fonction des jours suivant le challenge.

Tous les animaux du groupe de contrôle négatif sont morts après le challenge.

**Tableau 5** : Suivi du taux de survie des souris après une inoculation d'épreuve avec virus virulents.

Groupes de souris (Dix par groupe)	Taux de survie (en %) en fonction des jours après l'épreuve					
	4 jours	5 jours	6 jours	7 jours	10 jours	15 jours
G0	0	0	0	0	0	0
G1	100	80	80	80	80	80
ADN <sup>+</sup> 2 x 100 mg	50	20	0	0	0	0
ADN <sup>+</sup> 4 x 100 mg	80	40	30	30	30	30
ADN <sup>+</sup> 6 x 100 mg	90	60	60	60	60	60

Les résultats montrent qu'une protection a eu lieu même à la dose de vaccination la plus faible c.-à-d. 2 x 100 µg. En effet, la mort de ces animaux a été retardée par rapport au groupe de contrôle négatif (G0).

A un dosage de 4 x 100 µg, 30 % des animaux ont survécu, tandis qu'à 6 x 100 µg, 60 % des animaux ont survécu. Les résultats montrent que la protection induite par cette nouvelle méthode de vaccination plasmidique est efficace, surtout si on la compare au taux de survie de 80 % observé dans le groupe G1 (le contrôle positif) c.-à-d. le groupe d'animaux vaccinés par le virus atténué à dose très élevée (10<sup>7</sup> PFU).

Il reste à noter que la méthode de vaccination utilisée dans cet exemple peut encore être optimisée. D'après les résultats de l'essai de cytotoxicité contre le virus PRV, la vaccination par injection plasmidique pendant plusieurs jours consécutifs n'a pas induit de réponse CTL tandis que l'injection de la même quantité d'ADN à des intervalles de 3 semaines ou plus, telle qu'utilisée dans l'exemple 2 a induit une réponse CTL prononcée. De plus, la réponse humorale induite, mesurée par la réponse des anticorps anti-gIII dans le test ELISA, était plus faible suite aux injections plasmidiques pendant plusieurs jours consécutifs que la réponse humorale induite par des injections de la même quantité d'ADN à des intervalles de 3 semaines, décrite dans l'exemple 2.

**Exemple 4** : Induction d'une protection chez la souris contre une inoculation d'épreuve avec des virus virulents.

Pour ces expériences, le protocole d'immunisation de l'exemple 3 a été suivi, à la seule différence que des injections d'ADN plasmidiques ont été

- 30 -

effectuées toutes les trois semaines et que les souris étaient âgées de 19 semaines.

Pour le groupe G0 (contrôle négatif), on a utilisé uniquement du tampon PBS (Gibco).

Le groupe G1 (contrôle positif) a été vacciné à l'aide du virus atténué (souche NIA3 M207) dans les cous de pied avec une dose de  $10^7$  PFU par souris. Quatre injections d'ADN plasmidique ont été réalisées par voie intramusculaire dans les deux arrière trains de groupes de souris comprenant chacun 10 animaux, marqués par un code coloré.

Du sérum a été prélevé soit le jour même, soit dans les trois jours précédant la nouvelle immunisation.

Trois semaines après la dernière injection de plasmide et six semaines après les immunisations des groupes de contrôle, toutes les souris ont été exposées au virus virulent NIA3 à raison de 7 000 PFU/animal, injecté intrapéritonéalement. Les décès sont enregistrés pendant les 15 jours suivant l'épreuve et sont repris dans le tableau 6. Les résultats montrent les taux de survie exprimés en pourcentage en fonction des jours suivant l'épreuve.

Tableau 6 : Suivi du taux de survie des souris après une inoculation d'épreuve avec virus virulents.

Groupes de souris (Dix par groupe)	Taux de survie (en %) en fonction des jours après l'épreuve					
	4 jours	5 jours	6 jours	7 jours	10 jours	15 jours
G0	40	0	0	0	0	0
G1	100	90	90	80	80	80
ADN+ 4 x 100 µg	80	70	60	50	40	40

Tous les animaux du groupe G0 (contrôle négatif) sont morts après l'épreuve. Un taux de 80 % de survie est observé dans le groupe G1, c. à d. les animaux vaccinés par le virus atténué à dose très élevée.

A un dosage de 4 fois 100 mg d'ADN plasmidique, 40 % des animaux ont survécu. La méthode d'immunisation par laquelle les animaux sont vaccinés avec de l'ADN plasmidique (4 injections) toutes les trois semaines s'est montrée plus efficace en comparaison aux injections journalières (meilleur taux de survie de 40 % au lieu de 30 % et retardement relatif de la mort des animaux).

Exemple 5 : Induction d'une réponse humorale chez le porc.

Trois groupes de porcs de 3 animaux, âgés de 5 semaines ont été utilisés. Les animaux proviennent d'un élevage exempt de PRV et de la même portée. Ils

- 31 -

sont marqués individuellement par une bague à l'oreille.

Un groupe de 3 animaux (# 1, 2 et 3) qui n'ont pas été vaccinés est utilisé comme contrôle négatif.

5 Pour les 2 autres groupes, trois injections intramusculaires du plasmide pEVhis14gIII ont été effectuées à l'âge de 5, 7 et 9 semaines.

Trois animaux (# 4, 5 et 6) ont reçu une dose de 75 µg de plasmide, alors que 3 autres porcs (# 7, 8 et 9) recevaient 560 µg de plasmide à chaque injection. La dose d'ADN a été diluée dans 4 ml de tampon PBS (Gibco, USA) et administrée en 4 portions de 1 ml à 4 endroits d'inoculation : des 2 côtés de la nuque et au  
10 centre de l'arrière train gauche et droit. L'injection s'est pratiquée à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille Terumo de 40 mm de long avec une ouverture de 0.9 mm.

Du sérum a été prélevé lors de chaque injection et 2 semaines après la dernière injection. L'analyse des réponses humorales (anticorps contre la protéine  
15 gIII) avant et pendant l'immunisation a été effectuée par un test de séroneutralisation (test sensible à la médiation par le complément, voir Bitsch et Eskilsen, *curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 12, 41-49, 1982) et par un test IPMA (Immuno Peroxydase Monolayer Assay).

Le test IPMA a été effectué selon le mode opératoire qui est repris ci-dessous. A  
20 chaque puit des plaques à 96 puits (Corning, USA) recouvert d'un tapis de cellules SK 6 confluentes (ATCC, USA) ont été ajoutés 500 TCID<sub>50</sub> de virus PRV de la souche 89V87 ((Nauwynck H., Pensaert M., *Am. J. Vet. Research*, 53 (4) 489 (1992)) dans du milieu MEM (Gibco, USA). Dès l'apparition d'un effet cytopathique les plaques sont thermofixées: après un lavage au tampon PBS, les  
25 plaques sont séchées à 37 °C jusqu'à évaporation du liquide. Ensuite elles sont incubées à 80 °C pendant 1 heure.

Le sérum à tester, dilué de 2 en 2 en série dans du PBS a été distribué dans les puits et la plaque a été incubée pendant 1 heure à 37 °C.

Le sérum a été retiré et les plaques ont subi 2 lavages au PBS, suivis d'une  
30 incubation d'une heure en présence d'anticorps anti porcins marqués à la peroxydase (Nordic, Hollande) et dilués 100 fois dans du PBS. Après 1 heure, les plaques ont été incubées en présence de substrat 3-amino-9-éthylcarbazole (2 mg AEC dans 10 ml de tampon acétate de sodium (0.05 M à pH 5) et 75 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 %).

35 L'apparition d'une coloration rouge est observée au microscope optique. La réaction a été interrompue après 15 minutes par 3 lavages à l'eau de ville. Les

titres IPMA sont calculés en prenant l'inverse de la dilution la plus forte qui engendre une coloration rouge des foyers d'antigène viral sur les cellules infectées.

Les résultats du test de séroneutralisation et du test IPMA sont repris dans le

5 tableau 7.

Tableau 7 : Titres en anticorps contre le virus PRV déterminés par le test de séroneutralisation et par le test IPMA

		Titres en anticorps en fonction de l'âge							
		âge							
N° du porc	Dose de plasmide pEVhis14gIII administrée	5 semaines		7 semaines		9 semaines		11 semaines	
		SN	IPMA	SN	IPMA	SN	IPMA	SN	IPMA
1	0 mg	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5
2	0 mg	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5
3	0 mg	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5
4	(75 mg)	< 2	< 5	< 2	< 5	<b>4</b>	< 5	<b>6</b>	<b>128</b>
5	(75 mg)	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5
6	(75 mg)	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	<b>4</b>	<b>128</b>
7	(560 mg)	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5
8	(560 mg)	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5
9	(560 mg)	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	<b>3</b>	<b>128</b>

#### Notes explicatives

SN : titre en anticorps séroneutralisants

10 IPMA : titre en anticorps déterminés par la méthode IPMA

Les résultats montrent qu'aucun des animaux non vaccinés n'a développé des anticorps contre le virus PRV. Les résultats indiquent que même à la dose de vaccination la plus faible c'est à dire 3 x 75 µg, une réponse humorale a été induite dans 2 porcs sur 3. Un seul animal sur 3 a réagi à un dosage de 560 µg.

15 Les réponses sont faibles et les différences entre les 2 groupes immunisés ne sont pas significatives.

Exemple 6 : Induction d'une protection contre une épreuve avec un virus virulent chez le porc.

On reproduit exactement le protocole de l'exemple 5.

On a utilisé trois groupes de 3 porcs âgés de 5 semaines. Les animaux proviennent d'un élevage exempt de PRV et de la même portée. Ils sont marqués individuellement par une bague à l'oreille.

Un groupe de 3 animaux qui n'ont pas été vaccinés, a été utilisé comme contrôle négatif.

Pour les 2 autres groupes, trois injections intramusculaires du plasmide pEVhis14gIII ont été effectuées à l'âge de 5, 7 et 9 semaines conformément à la technique décrite à l'exemple 5. Trois animaux (N° de porc 4, 5 et 6) ont reçu une dose de 75 µg de plasmide, alors que les trois autres animaux (N° de porc 7, 8 et 9) ont reçu une dose de 560 µg de plasmide.

L'épreuve par virus virulent a été effectuée selon la méthode décrite dans Vaccine 1994, 12 (7), p. 661 665 et est décrite ci après.

27 semaines après, c'est à dire 18 semaines après la dernière injection de plasmide, tous les animaux sont transférés dans une unité isolée en vue d'une exposition au virus virulent PRV souche 75V19 (Andries K, Pensaert MB, Vandeputte J, Am. J. Vet. Res., 1978, 39, p. 1282 1285).

La température de l'unité isolée est maintenue à 18 °C et la ventilation à 0,2 m/s.

$10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub> de virus PRV (souche 75V19) mis en suspension dans 5 ml de tampon phosphate sont administrés à tous les animaux. 2 ml de cette suspension est donné oralement et 1,5 ml de cette suspension est instillé dans chaque narine.

Tous les animaux ont été observés quotidiennement durant les deux semaines qui suivent l'épreuve. La température du corps des animaux a été notée, ainsi que leur poids. Le gain de poids relatif (RDWG) a été calculé selon la formule ci après, en vue de comparer les performances des trois groupes.

RDWG à partir du jour de l'épreuve jusqu'au jour x :

$$\text{RDWG} = \frac{\text{poids au jour x} - \text{poids au jour de l'épreuve}}{\text{poids au jour de l'épreuve}}$$

Les sécrétions nasales de tous les animaux ont été prélevées avec un écouvillon tous les deux jours durant 14 jours après l'épreuve. Le poids des sécrétions nasales prélevées a été noté. Les sécrétions nasales prélevées ont été

- 34 -

5 mises en suspension dans un tampon phosphate. Des dilutions décimales de ces suspensions ont été inoculées à des cultures de cellules en monocouche, ces cellules venant d'une lignée cellulaire continue de testicule de porc (ST). Ensuite, la présence d'un effet cytologique pour ces cultures de cellules a été contrôlée durant cinq jours. La dose létale 50 a été calculée selon la méthode de Reed et Muench (Amer. J. Hyg., 1938, 27, 493 497). Les titres en virus ont été exprimés en TCID50 par gramme de sécrétion nasale.

Les résultats des examens sérologiques sont rassemblés dans le tableau 8.



- 36 -

L'analyse des réponses humorales a été effectuée par un test de séroneutralisation sensible (test sensible à la médiation par le complément selon la technique décrite par Bitsch et Eskilsen, *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.*, 1982, 12, p. 41-49) et par un test de séroneutralisation conventionnel (selon la technique  
5 décrite par Andries K, Pensaert MB, Vandeputte J, *Am. J. Vet. Res.*, 1978, 39, p. 1282-1285).

Ces résultats montrent qu'une réponse sérologique a été trouvée pour seulement un des six animaux vaccinés au moment de la dernière vaccination. Deux et dix-huit semaines après, des titres en anticorps séroneutralisants entre 3 et  
10 24 ont été observés respectivement pour trois des animaux (N° du porc 4, 6 et 9) et pour quatre des animaux (N° du porc 4, 6, 8 et 9).

14 jours après l'épreuve, les titres en anticorps séroneutralisants ont été observés entre 64 et 128 pour les animaux faisant partie du groupe contrôle négatif, entre 128 et > 384 pour les animaux ayant reçu une dose de 75 µg de  
15 plasmide, et entre 128 et 192 pour les animaux ayant reçu une dose de 560 µg de plasmide.

Tous les animaux ont été hébétés et anorexiques. Ils ont éternué du troisième jour après l'épreuve jusqu'au huitième ou neuvième jour après  
20 l'épreuve. Des vomissements et des troubles nerveux ont été observés pour deux animaux (N° de porc 3 et 5).

Tous les animaux, sauf un (N° de porc 8), ont eu de la fièvre (> 40 °C) du troisième jour jusqu'au septième jour après l'épreuve. La température moyenne maximale a été de 41,3 °C pour le groupe contrôle négatif et de 41 °C pour les  
deux autres groupes.

25 Les résultats concernant les changements de poids par animal sont rassemblés au tableau 9.

Tableau 9 : Changement de poids des animaux

Groupe	N° de porc	$\Delta G7$	$\Delta G14$	RDWG 7	RDWG 14
Contrôle négatif	1	-5,4	2,8	-0,861	0,223
	2	-5,6	3,4	-0,845	0,256
	3	-5	-10,7	-1,26	-1,352
75 $\mu$ g vacciné	4	-0,4	9,7	-0,092	1,110
	5	-5,4	-8,1	-1,467	-1,099
	6	-3,3	4,3	-0,630	0,411
560 $\mu$ g vacciné	7	0,8	7,7	0,178	0,857
	8	-1,1	7	-0,185	0,587
	9	-3,5	7,6	-0,661	0,718

$\Delta G7$  = poids 7 jours après l'épreuve - poids le jour de l'épreuve

$\Delta G14$  = poids 14 jours après l'épreuve - poids le jour de l'épreuve

RDWG7 = RDWG 7 jours après l'épreuve

5 RDWG14 = RDWG 14 jours après l'épreuve

Tous les animaux, sauf un (N° de porc 8) ont perdu du poids durant la première semaine après l'épreuve.

10 Quatorze jours après l'épreuve, seulement deux animaux (N° de porc 3 et 5), n'avaient pas repris le poids qu'ils avaient avant l'épreuve. Ils ont, de plus, continué à perdre du poids. Les trois animaux ayant reçu une dose de 560  $\mu$ g de plasmide et un animal (N° de porc 4) ayant reçu une dose de 75  $\mu$ g de plasmide, ont montré un gain de poids compensatoire entre le septième et le quatorzième jour après l'épreuve, de telle sorte qu'ils avaient repris leur courbe de croissance initiale entre le onzième et le quatorzième jour après l'épreuve. Les deux groupes  
15 d'animaux vaccinés montrent une valeur moyenne de gain de poids significativement positive, alors que le groupe de contrôle, animaux non vaccinés, montre une valeur moyenne de gain de poids négatives (= perte de poids).

Les résultats des titrations en virus dans les sécrétions nasales sont rassemblés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Sécrétion de virus après l'épreuve

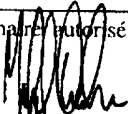
Groupe	N° de porc	Sécrétion de virus exprimé en (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> ) en fonction du nombre de jours après l'épreuve							
		jours après l'épreuve							
		0	2	4	6	8	10	12	14
Contrôle négatif	1	≤ 1,5	<b>3,2</b>	<b>5,5</b>	<b>5,5</b>	<b>2,0</b>	≤ 1,5	<b>1,7</b>	≤ 1,5
	2	≤ 1,5	≤ 1,5	<b>5,0</b>	<b>7,5</b>	<b>3,0</b>	<b>2,3</b>	<b>2,0</b>	≤ 1,5
	3	≤ 1,5	<b>2,7</b>	<b>6,7</b>	<b>7,3</b>	<b>4,5</b>	<b>4,5</b>	<b>4,3</b>	≤ 1,5
75 µg vacciné	4	≤ 1,5	<b>2,0</b>	<b>6,5</b>	<b>7,3</b>	<b>1,7</b>	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	5	≤ 1,5	<b>4,7</b>	<b>6,3</b>	<b>3,7</b>	<b>2,0</b>	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	6	≤ 1,5	≤ 1,5	<b>6,7</b>	<b>7,5</b>	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
560 µg vacciné	7	≤ 1,5	<b>2,7</b>	<b>6,3</b>	<b>8,0</b>	<b>4,5</b>	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	8	≤ 1,5	≤ 1,5	<b>7,3</b>	<b>7,0</b>	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	9	≤ 1,5	<b>5,3</b>	<b>6,3</b>	<b>6,3</b>	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5

Les premiers virus ont été isolés des sécrétions nasales, deux jours après l'épreuve, pour deux des trois animaux dans chaque groupe. Les titres en virus ont atteint un niveau maximum entre le quatrième et le sixième jour après l'épreuve, les titres en virus étant compris entre 10<sup>5,5</sup> et 10<sup>8,0</sup> TCID<sub>50</sub>. La sécrétion de virus a été stoppée entre le sixième et le huitième jour après l'épreuve pour les animaux vaccinés, alors qu'elle a continué jusqu'au douzième jour après l'épreuve pour les animaux du groupe contrôle négatif.

-39-

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>9</u> , ligneS <u>2-5</u>	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS (BCCM)	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) Laboratorium voor Moleculaire Biologie - Plasmidencollectie (LMBP) Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat, 35 B-9000 GENT (Belgique)	
Date du dépôt 16 NOVEMBRE 1995	n° d'ordre LMBP3377
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
pEV his14gIII L'accessibilité du micro-organisme ne peut être réalisée que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant.	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant) Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	
Réservé à l'office récepteur	Réservé au Bureau international
<input checked="" type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale	<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé 	Fonctionnaire autorisé

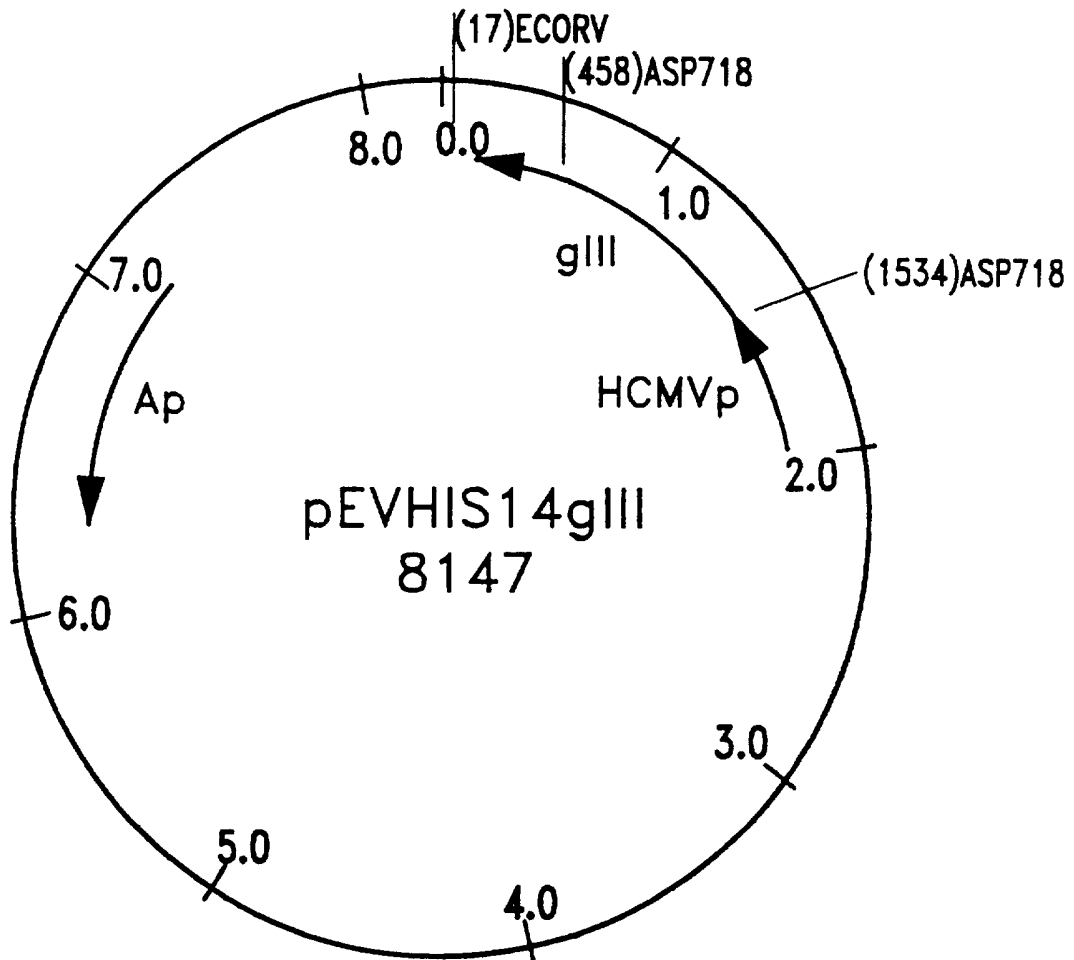
RE V E N D I C A T I O N S

- 1 - Vaccin comprenant un plasmide contenant un gène codant pour la glycoprotéine gIII du virus PRV ou pour une protéine présentant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV et un excipient pharmaceutiquement acceptable pour celui-ci.
- 5
- 2 - Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que le plasmide contient aussi un "promoteur du Cytomegalovirus humain".
- 3 - Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que le plasmide utilisé est le plasmide pEVhis14gIII.
- 10
- 4 - Vaccin selon les revendications 1 à 3 caractérisées en ce que le plasmide contient aussi au moins un gène ou une portion de celui-ci codant pour au moins une cytokine ou un fragment d'une cytokine.
- 5 - Vaccin selon une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'excipient pharmaceutiquement acceptable comprend des billes minuscules en or revêtues du vaccin qui sont introduites dans le tissu de l'animal à vacciner.
- 15
- 6 - Utilisation d'un plasmide pour un vaccin contre le virus PRV, ledit plasmide comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine gIII du virus PRV ou pour une protéine présentant la même antigénicité que la glycoprotéine gIII du virus PRV ou une construction d'ADN comprenant une cassette d'expression incluant :
- 20
- a) une séquence d'ADN codant pour un polypeptide contenant au moins un déterminant antigénique de la glycoprotéine gIII ou un fragment immunogénique de celle-ci, et
- 25
- b) des séquences du contrôle reliées opérativement auxdites séquences codantes où ladite séquence codante peut être transcrite et traduite dans une cellule et où lesdites séquences de contrôle sont homologues ou hétérologues à ladite séquence codante.
- 7 - Un vaccin plasmidique contre le virus PRV selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il contient aussi au moins un gène ou une portion de celui-ci codant pour au moins une cytokine ou un fragment d'une cytokine.
- 30

-41-

8 - Plasmide pEHis14gIII utilisé dans la fabrication d'un vaccin.

9 - Plasmide pEHis14gIII utilisé dans la fabrication d'un vaccin contre le virus PRV.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/05611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/03 A61K39/245

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>J. VET. MED. SCI., vol. 54, no. 3, 1992, pages 447-452, XP000618878 MATSUDA TSUCHIDA, A. ET AL.: "Protection from Pseudorabies virus challenge in mice by a combination of purified gII, gIII and gVI antigens" cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 March 1997

Date of mailing of the international search report

12. 03. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. ( + 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax ( + 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/05611

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9343 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-339654 XP002026841 &amp; JP 05 246 888 A (BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUSHO KK) , 24 September 1993 cited in the application see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 9, 1 September 1993, pages 5664-5667, XP000574935 COX G J M ET AL: "BOVINE HERPESVIRUS 1: IMMUNE RESPONSES IN MICE AND CATTLE INJECTED WITH PLASMID DNA" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 9, September 1994, pages 5685-5689, XP000645186 ROUSE, R. J. D. ET AL.: "Induction in vitro of primary cytotoxic T-lymphocyte responses with DNA encoding Herpes Simplex virus proteins" cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>EP 0 261 940 A (APPLIED BIOTECHNOLOGY INC) 30 March 1988 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>WO 92 03537 A (THERION BIOLOG CORP) 5 March 1992 see examples 2-6</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>WO 91 00359 A (AGRACETUS) 10 January 1991 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 96/05611

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
**Remark: Although this claim concerns a method for treatment (prophylaxis) of the animal body, the search has been carried out, based on the alleged effects of the composition.**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/05611

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0261940 A	30-03-88	CA 1312837 A JP 63245670 A US 5242829 A	19-01-93 12-10-88 07-09-93
-----			
WO 9203537 A	05-03-92	CA 2089497 A EP 0652967 A JP 6500232 T US 5420026 A	16-02-92 17-05-95 13-01-94 30-05-95
-----			
WO 9100359 A	10-01-91	AU 5787394 A AU 5856790 A CA 2019676 A EP 0431135 A JP 4500314 T	19-05-94 17-01-91 26-12-90 12-06-91 23-01-92
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D: de Internationale No  
PCT/EP 96/05611

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C07K14/03 A61K39/245		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J. VET. MED. SCI., vol. 54, no. 3, 1992, pages 447-452, XP000618878 MATSUDA TSUCHIDA, A. ET AL.: "Protection from Pseudorabies virus challenge in mice by a combination of purified gII, gIII and gVI antigens" cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	1
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  4 Mars 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  12. 03. 97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Chambonnet, F

2

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9343 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-339654 XP002026841 & JP 05 246 888 A (BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUSHO KK) , 24 Septembre 1993 cité dans la demande voir abrégé	1
A	--- JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 9, 1 Septembre 1993, pages 5664-5667, XP000574935 COX G J M ET AL: "BOVINE HERPESVIRUS 1: IMMUNE RESPONSES IN MICE AND CATTLE INJECTED WITH PLASMID DNA" voir le document en entier	1
A	--- JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 9, Septembre 1994, pages 5685-5689, XP000645186 ROUSE, R. J. D. ET AL.: "Induction in vitro of primary cytotoxic T-lymphocyte responses with DNA encoding Herpes Simplex virus proteins" cité dans la demande voir le document en entier	1
A	--- EP 0 261 940 A (APPLIED BIOTECHNOLOGY INC) 30 Mars 1988 voir le document en entier	1
A	--- WO 92 03537 A (THERION BIOLOG CORP) 5 Mars 1992 voir exemples 2-6	1
A	--- WO 91 00359 A (AGRACETUS) 10 Janvier 1991 voir le document en entier -----	5

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n°s 6 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
**Remarque: Pour autant que cette revendication concerne une méthode de traitement/prophylaxie du corps animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.**
2.  Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3.  Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

**Remarque quant à la réserve**

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D n° de Internationale No

PCT/EP 96/05611

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0261940 A	30-03-88	CA 1312837 A	19-01-93
		JP 63245670 A	12-10-88
		US 5242829 A	07-09-93
-----			
WO 9203537 A	05-03-92	CA 2089497 A	16-02-92
		EP 0652967 A	17-05-95
		JP 6500232 T	13-01-94
		US 5420026 A	30-05-95
-----			
WO 9100359 A	10-01-91	AU 5787394 A	19-05-94
		AU 5856790 A	17-01-91
		CA 2019676 A	26-12-90
		EP 0431135 A	12-06-91
		JP 4500314 T	23-01-92
-----			