



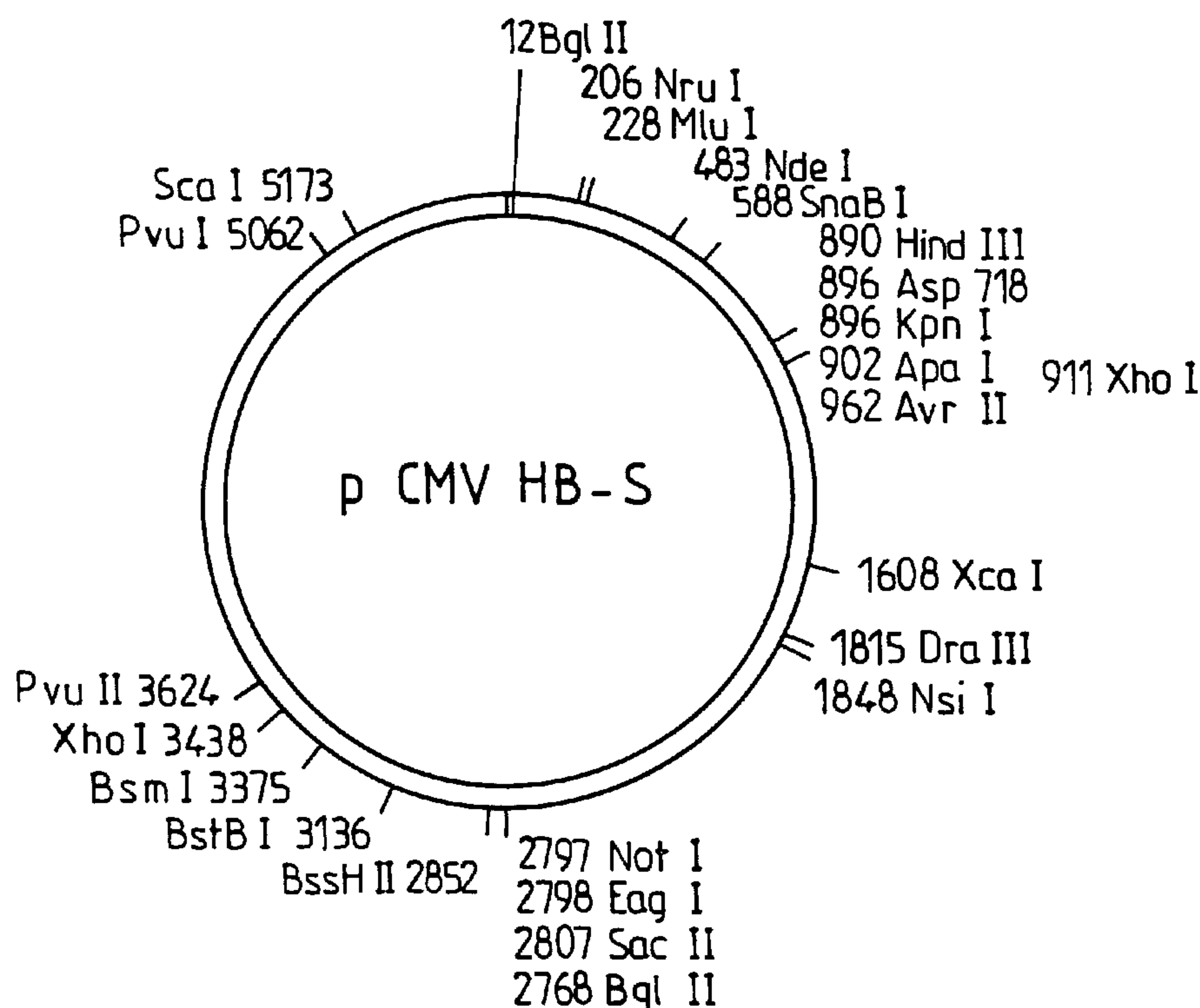
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1994/04/27
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1995/04/27
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2010/03/30
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1996/04/19
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1994/000483
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1995/011307
(30) Priorité/Priority: 1993/10/22 (FR93/12659)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/85* (2006.01),
A61K 31/70 (2006.01), *A61K 39/12* (2006.01),
A61K 39/29 (2006.01), *A61K 48/00* (2006.01),
C07K 14/02 (2006.01), *C12N 15/51* (2006.01),
A61K 39/00 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
DAVIS, HEATHER LYNN, CA;
WHALEN, ROBERT GERALD, FR;
MICHEL, MARIE-LOUISE, FR

(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT PASTEUR, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM), FR; ...

(54) Titre : VECTEUR NUCLEOTIDIQUE, COMPOSITION LE CONTENANT ET VACCIN POUR L'IMMUNISATION A
L'ENCONTRE D'UNE HEPATITE
(54) Title: NUCLEOTIDE VECTOR, COMPOSITION CONTAINING SUCH VECTOR AND VACCINE FOR
IMMUNIZATION AGAINST HEPATITIS



(57) Abrégé/Abstract:

Vecteur nucléotidique comprenant au moins un gène ou un ADN complémentaire codant pour au moins une partie d'une protéine d'un virus, et un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires. Le gène peut être le gène S du virus de l'hépatite B. Une préparation vaccinale contenant cet ADN nu est injectée à l'hôte préalablement prétraité par une substance capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires.



(73) Propriétaires(suite)/Owners(continued):UNIVERSITE D'OTTAWA/ UNIVERSITY OF OTTAWA, CA

(74) Agent: ROBIC



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

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/85, A61K 48/00, 39/12, 39/29	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/11307 (43) Date de publication internationale: 27 avril 1995 (27.04.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00483 (22) Date de dépôt international: 27 avril 1994 (27.04.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/12659 22 octobre 1993 (22.10.93) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). UNIVERSITE D'OTTAWA [CA/CA]; 115 Séraphin Marion, Ottawa, Ontario (CA). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DAVIS, Heather, Lynn [CA/CA]; 33 Willard Avenue, Ottawa, Ontario (CA). WHALEN, Robert, Gérald [US/FR]; 332, rue Lecourbe, F-75015 Paris (FR). MICHEL, Marie-Louise [FR/FR]; 9, passage du Mont-Cenis, F-75018 Paris (FR). (74) Mandataire: MICHELET, Alain; Cabinet Harlé & Phelip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec une indication relative à un micro-organisme déposé, qui en vertu de la règle 13bis, n'a pas été donnée en même temps que la description mais séparément</i> <i>Date de réception par le bureau international:</i> 20 juin 1994 (20.06.94) 2174652
(54) Title: NUCLEOTIDE VECTOR, COMPOSITION CONTAINING SUCH VECTOR AND VACCINE FOR IMMUNIZATION AGAINST HEPATITIS (54) Titre: VECTEUR NUCLEOTIDIQUE, COMPOSITION LE CONTENANT ET VACCIN POUR L'IMMUNISATION A L'ENCONTRE D'UNE HEPATITE (57) Abstract Nucleotide vector comprising at least one gene or one complementary DNA coding for at least a portion of a protein of a virus, and a promoter providing for the expression of such gene in muscle cells. The gene may be the S gene of the hepatitis B virus. A vaccine preparation containing said bare DNA is injected into the host previously treated with a substance capable of inducing a coagulating necrosis of the muscle fibers. (57) Abrégé Vecteur nucléotidique comprenant au moins un gène ou un ADN complémentaire codant pour au moins une partie d'une protéine d'un virus, et un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires. Le gène peut être le gène S du virus de l'hépatite B. Une préparation vaccinale contenant cet ADN nu est injectée à l'hôte préalablement prétraité par une substance capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires.		

VECTEUR NUCLEOTIDIQUE, COMPOSITION LE CONTENANT ET
VACCIN POUR L'IMMUNISATION A L'ENCONTRE D'UNE
HEPATITE.

5 La présente demande a pour objet un vecteur
pour l'immunisation à l'encontre d'une hépatite.

Elle est en outre relative à une composition
contenant ce vecteur .

10 L'immunisation par injection d'ADN nu dans les
tissus musculaires a fait l'objet de plusieurs travaux
depuis le début des années 1990.

15 Ainsi, ULMER et al. (Science, 259, 1745-1749,
1993) ont obtenu une protection à l'encontre du virus
Influenza par induction des lymphocytes T cytotoxiques
en injectant dans des quadriceps de souris un plasmide
codant pour la nucléoprotéine Influenza A. Le plasmide
utilisé porte soit le promoteur du virus du sarcome de
Rous soit le promoteur du cytomégalo virus.

20 RAZ et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90,
4523-4527, 1993) ont injecté des vecteurs comprenant
le promoteur du virus du sarcome de Rous et un gène
codant pour l'interleukine-2, l'interleukine-4 ou le
facteur de croissance transformant de type $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$).
Les réponses immunitaires humorale et cellulaire, des
souris auxquelles ont été administrés par voie
25 intramusculaire ces plasmides, sont améliorées.

30 WANG et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
90,4156-4160, 1993), ont injecté dans les muscles de
souris un plasmide portant un gène codant pour la
protéine d'enveloppe du virus HIV-1. L'injection des
plasmides a été précédée par un traitement par de la
bupivacaine au même endroit dans le muscle. Les
auteurs mettent en évidence la présence d'anticorps
capables de neutraliser l'infection par le virus HIV-
1. On remarquera néanmoins que l'ADN a été injecté

deux fois par semaine pour un nombre total de quatre injections.

5 DAVIS et al. (Compte-Rendu du 28ème Congrès Européen sur le muscle, Bielefeld, Allemagne, 21-25 Septembre 1992) ont injecté des plasmides portant un gène codant pour la luciférase ou la β -galactosidase en prétraitant les muscles par du sucrose ou une cardiotoxine. Les auteurs observent l'expression de la luciférase ou de la β -galactosidase.

10 Plus récemment, un article paru dans Science et Avenir (Septembre 1993, pages 22-25) indique que WHALEN et DAVIS ont réussi à immuniser des souris contre le virus de l'hépatite B en leur injectant de l'ADN pur du virus dans les muscles. Une injection
15 préalable de toxine de venin de serpent suivie de l'injection d'ADN 5 à 10 jours plus tard est citée de manière générale. Il est précisé que cette méthode n'est pas pratique.

20 Ces travaux avaient été précédés par d'autres expérimentations dans lesquelles différents ADN avaient été injectés, en particulier dans des tissus musculaires. Ainsi, la demande PCT/US 90/01 515 (publiée sous le n° WO-90/11 092) divulgue diverses constructions plasmidiques pouvant être injectées, en
25 particulier dans des tissus musculaires pour le traitement de la dystrophie musculaire. Néanmoins, ce document précise que l'ADN est préférentiellement injecté dans des liposomes.

Il en est de même du brevet canadien CA 362.966
30 (publié sous le n° 1.169.793) qui décrit l'injection intramusculaire de liposomes contenant de l'ADN codant en particulier pour les antigènes HBs et HBc. Les résultats décrits dans ce brevet mentionnent l'expression d'antigènes HBs. La présence d'anticorps

anti-HBs n'a pas été recherchée.

La demande Internationale PCT/FR 92/00 898 (publiée sous le n° WO-93/06 223) décrit des vecteurs viraux pouvant être acheminés par la voie sanguine jusqu'à des cellules cibles. Ces vecteurs sont ainsi reconnus par les récepteurs de cellules, telles que des cellules musculaires et peuvent être employés dans le traitement de la dystrophie musculaire ou de la thrombose.

Cette demande ne concerne pas l'immunisation à l'encontre de virus tels que par exemple celui de l'hépatite B.

Il ressort donc de l'état de la technique citée que, si l'on connaissait déjà des techniques d'immunisation à l'encontre de l'hépatite par injection d'ADN nu, celles-ci présentaient un grand nombre d'inconvénients ne les rendant pas pratiques à mettre en oeuvre.

D'autre part, l'ADN nu utilisé pour vacciner des souris était l'ADN pur du virus. Ce type de traitement n'est pas envisageable pour la vaccination humaine, du fait des risques qu'il fait courir aux patients.

Enfin, les expérimentations plus anciennes dans lesquelles l'ADN injecté est contenu dans des liposomes n'ont pas démontré de réponse immunitaire.

Le demandeur s'est donc attaché à trouver de nouvelles constructions de vecteurs permettant d'immuniser à l'encontre de l'hépatite tout en n'ayant pas de conséquences négatives pour la santé humaine.

Il s'est d'autre part attaché à trouver un additif à des compositions contenant ces constructions permettant une dégénérescence efficace du tissu musculaire avant l'injection de l'ADN, et compatible

avec les impératifs de la santé humaine.

Le demandeur a montré de manière surprenante que l'on pouvait obtenir un niveau d'anticorps efficace et durable largement supérieur au niveau permettant d'obtenir chez l'homme une protection immunitaire efficace et durable à l'encontre de l'infection par le virus de l'hépatite en administrant par injection intramusculaire un vecteur ayant une construction définie, et une substance capable
10 d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires.

La présente demande a donc pour objet un vecteur nucléotidique comprenant au moins :

- un gène ou un ADN complémentaire codant pour au moins une partie d'une protéine de virus, et
- un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires.

Plus spécifiquement, la présente demande a pour objet un vecteur nucléotidique comprenant au moins :

- 20
- un gène ou un ADN codant pour au moins une partie d'une protéine antigénique d'un virus pathogène chez l'homme ;
 - la séquence de terminaison non traduite dudit gène ou dudit ADN, incluant le signal de polyadénylation ; et
 - un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires.

Plus spécifiquement, la présente demande a aussi pour objet une composition immunogène contre une infection virale comprenant :

- un vecteur nucléotidique, ledit vecteur nucléotidique étant constitué par :
 - (i) un gène ou un ADN codant pour au moins une partie d'une protéine antigénique d'un virus pathogène chez l'homme,
 - (ii) la séquence de terminaison non traduite dudit gène ou dudit ADN, incluant le

4a

signal de polyadénylation, située en aval dudit gène ou dudit ADN,

(iii) un promoteur contrôlant l'expression dudit gène ou dudit ADN dans des cellules musculaires, ledit promoteur étant choisi parmi :

- le promoteur du cytomégalovirus,
- le promoteur RSV,
- le promoteur des gènes de surface du virus HBV, ou HIV ou Hépatite A,
- un promoteur homologue à l'hôte auquel doit être administré ledit vecteur nucléotidique, et
- un promoteur d'un gène d'une protéine du cytosquelette, et

10 (iv) des adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

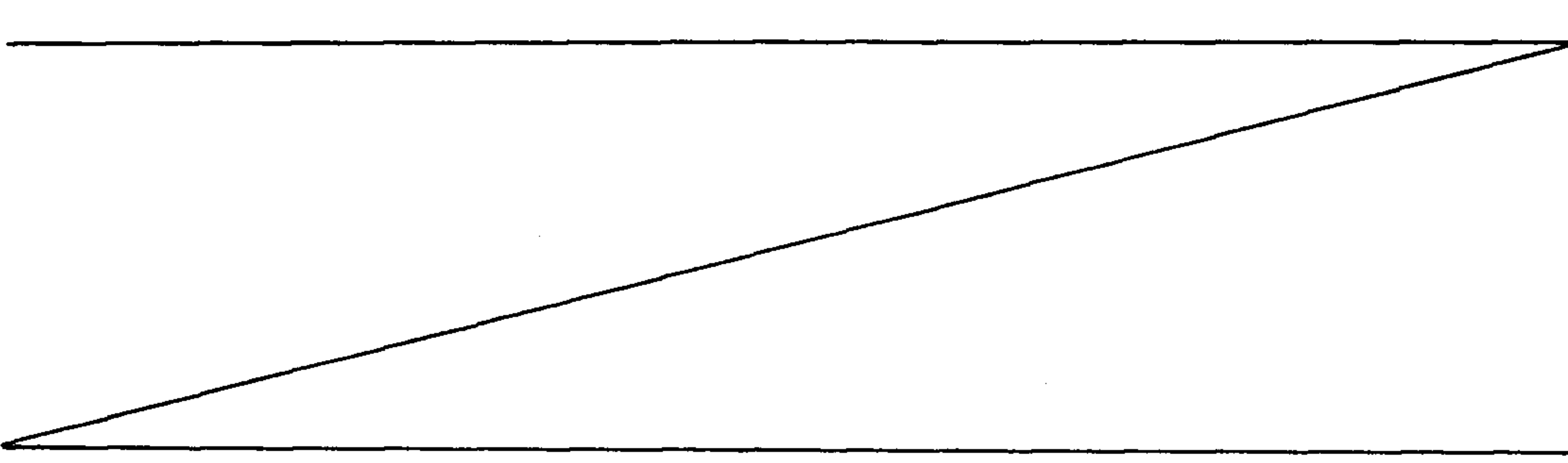
Ledit vecteur peut ne pas se répliquer dans ces cellules .

Il peut aussi être réplcatif ce qui permet d'obtenir un nombre élevé de copies par cellule et d'améliorer la réponse immunitaire.

Le vecteur est en outre choisi afin d'éviter son intégration au sein de l'ADN cellulaire, de telles intégrations étant connues pour activer les oncogènes et induire la cancérisation des cellules.

20 Le vecteur selon la présente invention est avantageusement un plasmide en partie d'origine bactérienne et portant notamment une origine de réplication bactérienne et un gène permettant sa sélection, tel qu'un gène de résistance à un antibiotique.

Ce vecteur peut être aussi pourvu d'une origine de réplication lui permettant de se répliquer dans les



cellules musculaires de son hôte, telle qu'une origine de répllication du virus du papillome bovin.

5 Le gène ou l'ADN complémentaire compris dans ce vecteur code avantageusement pour une protéine de structure d'un virus mais il peut aussi coder pour une protéine régulatrice.

10 Le gène ou l'ADN complémentaire porté par ce vecteur peut coder pour au moins une partie d'une protéine du virus d'une hépatite en particulier de l'hépatite B et préférentiellement la protéine HBs, sous l'une de ses formes S, S-préS2 ou S-préS2-préS1, auquel cas le gène est le gène S.

15 Le virus peut aussi être responsable d'une autre hépatite telle qu'une hépatite A ou qu'une hépatite non-A, non-B, telle qu'une hépatite C, E ou delta.

Les séquences des gènes ou des protéines des virus de ces hépatites sont décrites ou peuvent être déduites des documents suivants :

20 brevet FR-79 21 811, brevet FR 80.09.039, brevet EP-81.400.634, brevet FR 84.03.564, brevet EP 91.830.479 et article de Najarian et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2627-2631).

25 Le vecteur peut aussi comprendre des gènes codant au moins en partie pour la protéine gp160 du virus HIV1 associée à la protéine p25, et/ou à la protéine p55, et/ou à la protéine p18 ou au moins un gène codant pour la protéine Rev du virus HIV1.

30 Le vecteur peut aussi comprendre au lieu d'une protéine d'un virus, une protéine d'un microorganisme pathogène tel qu'une protéine de la bactérie responsable de la diphtérie, de la coqueluche, d'une listériose , la toxine du tétanos.

Le promoteur porté par ce vecteur est
avantageusement le promoteur du cytomégalo virus (CMV).
Il peut néanmoins être tout autre promoteur permettant
une expression efficace du gène dans les cellules
5 musculaires.

Il peut ainsi être :

- un promoteur interne ou endogène, c'est-à-
dire un promoteur du virus dont est issu le gène; un
tel promoteur peut être complété par un élément
10 régulateur du muscle ou d'un autre tissu, en
particulier un élément activateur,

- un promoteur d'un gène d'une protéine du
cytosquelette, en particulier de la desmine tel que
décrit par BOLMONT et al. (Journal of submicroscopic
15 cytology and pathology, 1990, 22, 117-122) et ZHENLIN
et al. (Gene, 1989, 78, 243-254).

- le promoteur des gènes de surface du virus
HBV.

De manière générale , le promoteur peut être
20 hétérologue à l'hôte, c'est-à-dire qu'il n'est pas
trouvé chez l'hôte de manière naturelle, mais il est
avantageusement homologue, tout en étant actif à
l'origine dans un tissu autre que le tissu musculaire.

Outre le promoteur, le vecteur peut comprendre
25 une séquence de terminaison de la transcription,
située en aval du gène.

Un tel vecteur peut être le plasmide pCMV/HBS,
ou pRCCMV-HBS, ayant la séquence SEQ ID N°1, déposé
sous le N°I-1370 auprès de la Collection Nationale de
30 Cultures des Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM) le 21 Octobre 1993.

Il peut aussi être le plasmide pRSV/HBS déposé
sous le n°I-1371 auprès de la CNCM le 21 Octobre
1993..

Ce plasmide est de structure similaire au pCMV/HBS mais comprend le promoteur du virus du Sarcome de Rous (RSV) au lieu du promoteur du cytomégalovirus (CMV).

5 D'autres plasmides peuvent être :

- le pCMVHB-S1.S2.S qui a été construit par insertion du fragment Bgl II-Bgl II du gène S, obtenu à partir du pCP10, dans un vecteur pBlueScript modifié pour contenir des sites de clonage supplémentaires dans la partie "polylinker". Le fragment contenant le gène S a été ensuite enlevé par digestion KpnI-BssH II puis cloné dans les sites correspondants du pCDNA 3 (In vitrogen, Rad Systems Europe Ltd, Abingdon UK) afin d'obtenir le pCMVHB-S1.S2.S. Ce plasmide a été
10 déposé sous le n° I-1411 auprès de la CNCM.

- le pCMVHB-S2.S qui a été obtenu en éliminant la partie pré-S1 du gène HBS du pCMVHB-S1.S2.S par digestion KpnI/MstI, puis en ligant, après traitement par de la nucléase S1, les deux extrémités.

20 Le pCMVHB-S2.S a été déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1410.

- le pHBV-S1.S2.S, déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1409, a été obtenu par insertion du fragment Bgl II- Bgl II du gène S, obtenu à partir du pCP10, dans un vecteur pBlueScript modifié pour
25 contenir des sites supplémentaires de clonage dans la partie "polylinker",

- le pBS-SKT-S1.S2.S, code pour les trois protéines d'enveloppe S, S-préS₁ et S-préS₁-préS₂ du virus HBV.
30

La présente invention est en outre relative à des séquences nucléotidiques comprenant un promoteur homologue à l'hôte et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN complémentaire

codant pour une des protéines citées ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet un vaccin ou un médicament contenant au moins un vecteur, ou une séquence nucléotidique, tel que défini ci-

5 dessus.

Elle a de plus pour objet une composition capable d'induire une réponse cytotoxique constituée par au moins une séquence nucléotidique exprimée dans les cellules musculaires et comportant un promoteur

10 tel que défini ci-dessus.

Elle est encore relative à une composition pharmaceutique non lipidique destinée à l'immunisation à l'encontre d'une infection virale telle qu'une hépatite comprenant au moins d'une part une substance

15 capable d'induire une nécrose coagulatrice des fibres musculaires et d'autre part un vecteur tel que décrit ci-dessus ou comportant une des séquences nucléotidiques telles que décrites ci-dessus complètes ou partielles. On entend par séquence partielle ou

20 séquence codant pour au moins 6 acides aminés.

Avantageusement ladite substance est la bupivacaine.

D'une manière avantageuse, ladite composition est caractérisée en ce que le vecteur est administré

25 dans le muscle de l'individu à immuniser, au minimum 5 jours après l'administration de la bupivacaine, et sensiblement au même endroit.

Une telle pré-administration de bupivacaine permet de manière surprenante d'augmenter l'efficacité

30 de l'administration du vecteur ainsi que l'immunisation de l'individu .

Avantageusement, le vecteur est administré dix jours après administration de la bupivacaine, et sensiblement au même endroit dans le muscle de

l'individu.

La présente composition peut en outre contenir des adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

5 Une telle composition est préférentiellement administrée par injection intramusculaire. L'injection peut être effectuée à l'aide d'une seringue affectée à cet usage mais aussi à l'aide d'un pistolet à jet liquide tel que celui décrit par FURTH et al. (1992, 10 Anal. Biochem.205, 365-368).

Les quantités de bupivacaine nécessaires pour obtenir une dégénérescence suffisante du tissu musculaire afin d'obtenir une immunisation optimale sont de l'ordre de 0,10 mg à 10mg par dose de 15 composition injectable.

Les quantités de vecteurs à injecter afin d'obtenir une immunisation optimale de l'individu à l'encontre d'une hépatite varient en fonction de la protéine codée par le gène porté par le vecteur. A 20 titre indicatif, on injectera entre 0,1 et 1000 µg de vecteurs par individu.

Les vecteurs pourront être obtenus par les méthodes connues de l'homme du métier, en particulier par synthèse ou par les méthodes du génie génétique.

25 De telles méthodes sont celles décrites en particulier dans le manuel technique :

Maniatis T. et al. 1982 - Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor - Ed. New York.

La présente invention est illustrée sans 30 aucunement être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels :

La figure 1 est une représentation schématique du plasmide pRC/CMV-HBs.

— Les figures 2A à 2D sont des représentations

schématiques respectivement des plasmides pCMVHB-S, pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S et pHBV-S1.S2.S

Les figures 3, 4 et 5 sont des cartes de restriction schématiques respectivement des plasmides pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S et pRSV-HBS.

La figure 6 illustre la sécrétion de particules antigéniques HBS (HBS Ag) en ng/ml (en ordonnée) en fonction du nombre de jours (en abscisse) par des cellules portant les plasmides pCMVHB-S, pCMVHB-S1.S2.S, pHBV-S1.S2.S, pSVS ou pCMVHB-S2.S

Les figures 7A et 7B illustrent la mise en évidence sur certaines particules de la figure 6 des antigènes préS_1 et PréS_2 par respectivement des anticorps anti- préS_1 et anti- préS_2 . La formation des complexes anticorps-antigène est mise en évidence par la densité optique (en ordonnée), en fonction de la concentration en antigène.

Les figures 8A à 8D représentent les réponses anti-HBS (HBS Ab en ordonnée, exprimée en mUI/ml) et anti- préS_2 (préS_2 Ab en ordonnée, exprimée en D.O.) de souris vaccinées par respectivement le pCMVHB-S (8A), le pCMVHB-S2.S (8B), le pCMVHB-S1.S2.S (8C) et le pHBV-S1.S2.S (8D).

La figure 9 illustre la réponse anticorps, immunoglobulines Ig G et IgM (titres en ordonnée), d'une souris vaccinée par le pCMVHB-S2.S en fonction du nombre de semaines (en abscisse).

Les figures 10A à 10C représentent les réponses anti-groupe et anti-sous type ay induites par de l'ADN de pCMV-S (ADN) ou de l'antigène HBS (prot), respectivement chez des souris B10 (10A), B10S (10B) et B10M (10C).

Les figures 10D à 10F représentent les réponses anti-groupe a induites par de l'ADN de pCMV-S (ADN) ou

2174652

11

de l'antigène HBS (prot), respectivement chez des souris B10 (10D), B10S (10E) et B10M (10F).

La figure 11 représente une carte linéaire de restriction du plasmide pBS-SKT-S1.S2.S.

5 EXEMPLE 1 :

Induction d'anticorps à l'encontre d'un antigène de surface de l'hépatite B par injection séquentielle de bupivacaine et d'un plasmide portant un gène codant pour l'antigène.

10 1) Matériels et méthodes

1.1 Prétraitement par la bupivacaine.

Toutes les expérimentations ont été effectuées sur les muscles du tibia antérieur (TA) de souris C57BL/6J âgées de 5 à 7 semaines.

15 Un cycle unique de dégénération et de régénération des fibres musculaires est induit dans les muscles du tibia antérieur de souris non anesthésiées, par injection intramusculaire de 50 µl de marcaïne (bupivacaine 0,5 %, DMSO 1%) commercialisée par les Laboratoires Astra, France. La solution est injectée en utilisant une seringue à tuberculose et une aiguille insérée dans un manchon de polyéthylène, afin de limiter la pénétration à une profondeur de 2 mm.

25 La marcaïne étant un anesthésique, les injections dans les jambes droite et gauche sont espacées de 10 à 30 minutes afin d'éviter un surdosage.

1.2. Préparation de l'ADN

30 Le plasmide utilisé a été construit par clonage dans un vecteur pBluescript modifié du fragment de restriction Xho I-Bgl II du plasmide pCP10 qui contient le gène codant pour l'antigène de surface HBS et des séquences non traduites en amont et en aval

incluant le signal de poly-adénylation.

Le gène S a été ensuite récupéré par digestion à l'aide des enzymes KpnI-BssHII et le fragment a été cloné dans le site du vecteur pRC/CMV commercialisé par In Vitrogen. La construction plasmidique finale a
5 été appelée pCMV-HBS et a été déposée sous le n° I-1370 auprès de la CNCM.

Ce plasmide est représenté schématiquement sur la figure 1. Le promoteur CMV est situé entre le
10 nucléotide 228 qui est le site de coupure de la MluI et le nucléotide 896, qui est le site de coupure de la KpnI. Le fragment d'ADN comprenant le gène de structure de l'antigène HBs a été cloné entre les nucléotides 896 et 2852 (site de la BssH III).

15 Le gène HBs s'étend entre les nucléotides 911 (site XhoI) et 2768 (site Bgl II).

La séquence complète de ce plasmide est la séquence SEQ ID N°1.

L'ADN plasmidique purifié a été préparé par les
20 méthodes standard, redissous dans du tampon PBS et stocké à -20°C jusqu'à l'injection.

1.3 Injection de l'ADN

Un à cinq jours après injection de la marcaïne, on a injecté au même endroit l'ADN, la souris étant
25 anesthésiée à l'aide de pentobarbital de sodium (75mg/kg voie intrapéritonéale).

La solution d'ADN qui contient 50 µg d'ADN plasmidique et 50 µl de tampon PBS a été injectée à travers la peau dans les muscles en cours de
30 régénération du tibia antérieur par une injection unique intramusculaire.

Des injections ont été effectuées de manière bilatérale, dans les deux pattes des souris, chaque animal recevant ainsi au total 100µg d'ADN plasmidique

recombinant. Comme pour l'injection de la marcaïne, on injecte la solution d'ADN en utilisant la seringue à tuberculose et l'aiguille précédemment décrite.

5 Dans chaque patte on a effectué une seule injection intramusculaire d'ADN.

2. Résultats

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I ci-après .

10 Ils montrent de manière très claire que l'injection d'ADN après traitement par la marcaïne permet d'obtenir des taux importants d'anticorps sériques à l'encontre de l'antigène de surface de l'hépatite B.

15 Ces résultats sont surprenants, l'analyse de l'état de la technique ne permettant pas de supposer qu'un plasmide permettrait l'induction d'anticorps-anti-HBs pouvant être retrouvés dans le sérum et permettant ainsi une vaccination efficace.

20 La facilité de mise en oeuvre de la vaccination par des plasmides, et le fait qu'il ne soit pas nécessaire de faire des rappels, permet d'envisager une vaccination à grande échelle.

EXEMPLE 2 :

25 Comparaison de l'efficacité d'injection d'un plasmide en présence et en absence de lipides.

30 Une dose de 10 µg d'ADN plasmidique du vecteur SV40-Luciférase disponible dans le commerce' ("pGL2-Control Vector" de Promega, référence E1 11) dans 50 µl de solution physiologique est injectée dans un muscle prétraité avec du sucrose selon la méthode de Davis et al. (Hum. Gene Ther. 4:151-159 (1993)). L'ADN injecté est préalablement mélangé avec des lipides tels que le dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou des mélanges suivants : DOGS + spermidine, et DOGS +

polyéthylèneglycol (PEG). L'activité de la luciférase est mesurée 5 jours après l'injection.

Ces résultats figurent dans le tableau II ci-après.

5 Ils montrent que la présence de lipides (DOGS) diminue de manière très importante l'efficacité d'injection du plasmide par rapport à une composition sans lipides (témoin).

10 EXEMPLE 3:

Comparaison des réponses de souris et de lapins à l'encontre de plasmides portant divers promoteurs et gènes d'enveloppe du virus HBV.

15 Quatre plasmides ont été construits permettant l'expression de une, deux ou trois protéines d'enveloppe du virus HBV. Dans trois des constructions (pCMVHB-S, pCMVHB-S2.S, pCMVHB-S1.S2.S) les gènes codant pour les protéines d'enveloppe du virus HBV sont placés sous le contrôle transcriptionnel du promoteur des gènes précoces du virus CMV (figure 1, 20 figure 2 A à 2C , figures 3 et 4). Le quatrième plasmide (pHBV-S1.S2.S) utilise comme élément de contrôle transcriptionnel le promoteur des gènes de surface du virus HBV contenu dans la région pré-S1 de 25 ce virus (Cattaneo et al. (1983) Nature, 305, 336) (figure 2D). Dans les quatre constructions, le signal de polyadénylation utilisé est contenu dans les séquences HBV présentes en 3' du gène S.

30 1. Contrôle in vitro de l'efficacité des vecteurs.

Pour contrôler l'efficacité de ces vecteurs in vitro dans des cellules eucaryotes, des fibroblastes ou des myoblastes de souris ont été transfectés. Un plasmide exprimant les trois protéines d'enveloppe sous contrôle du promoteur SV40 (pSVS) a été utilisé 35

comme contrôle (Michel et al. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7708-7712)). La figure 6 montre la cinétique de sécrétion des particules HBs dans les surnageants de culture. Les faibles taux d'antigène produits par transfection du vecteur pCMVHB-S1.S2.S sont compatibles avec une forte synthèse de la grande protéine d'enveloppe à partir du promoteur CMV. Cette protéine étant myristillée dans sa partie amino-terminale, est retenue dans le réticulum endoplasmique (Ganem, (1991), Current Topics in Microbiology and Immunology, 168, 61-83). La rétention dans la cellule de protéines portant des déterminants pré-S1 a été confirmée par immunofluorescence.

La composition des particules sécrétées a été analysées dans un système ELISA sandwich utilisant comme anticorps de capture un anticorps monoclonal de souris spécifique des déterminants pré-S1 (figure 7A) ou pré-S2 (figure 7B) et comme second anticorps un sérum polyclonal de lapin anti-HBs. Ces expériences montrent que les particules d'AgHBs produites à partir du vecteur pCMVHB-S1.S2.S portent des déterminants pré-S1 et pré-S2 signant la présence de la grande et de la moyenne protéine d'enveloppe du virus HBV. Les particules sécrétées après transfection du vecteur pCMVHB-S2.S et pHBV-S1.S2.S portent, en plus des déterminants Hbs, des déterminants pré-S2 caractéristiques de la protéine moyenne d'enveloppe.

2) Inoculation de l'ADN

L'ADN purifié sur colonne Quiagen® a été injecté par voie intramusculaire en une seule injection de 100µg (50 µg/patte) dans le muscle antérieur du tibia de souris C57/BL6 (8 souris par groupe). Cinq jours avant l'injection, le muscle a été prétraité par la cardiotoxine afin d'induire une dégénération suivie

d'une régénération des cellules musculaires favorisant ainsi la capture de l'ADN par ces cellules.

Des expériences d'injection de l'ADN ont été également réalisées chez le lapin. Dans ce cas l'ADN pCMVHB-S a été administré dans le muscle normal sans 5 dégénération, soit au moyen d'un pistolet d'injection sans aiguille le Biojector^R, soit au moyen de seringues conventionnelles munies d'aiguilles.

10 3) Réponses anti-HBs des souris vaccinées par l'ADN

Une réponse anticorps anti-HBs est induite par une seule injection de l'un ou l'autre des quatre plasmides utilisés.

La réponse anticorps a été analysée au moyen de 15 kit commerciaux de détection des anticorps anti-HBs (Monolisa anti-HBs, Diagnostic Pasteur). Les anticorps anti-préS2 sont détectés dans un système ELISA utilisant sur la phase solide un peptide de la région pré-S2 (AA 120-145) correspondant à l'épitope B majeur 20 porté par ce domaine (Neurath et al., (1985), Nature, 315, 154).

Les figures 8A à 8D montrent la cinétique de la réponse anti-HBs (HBs-Ab) exprimée en milli-unités internationales/ml et de la réponse anti-pré-S2 25 (préS2Ab) mesurée en densité optique (492 nm) pour des sérums dilués au 1/100. La révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps anti-immunoglobuline (IgG) de souris marqué à la peroxydase.

L'injection du plasmide pCMVHB-S (figure 8A) 30 induit une synthèse constante des anticorps anti-HBs. La séroconversion est obtenue chez 100% des souris dès une semaine après l'injection avec un taux moyen d'anticorps de 48 mUI/ml (de 12 à 84 mUI/ml, écart-type (SD) =28), ce qui est 4 à 5 fois supérieur au

seuil requis chez l'homme pour conférer la protection (10 mUI/ml).

La réponse induite par une seule injection du plasmide pCMVHB-S2.S (figure 8B) se caractérise par l'apparition très précoce d'anticorps anti-HBs. Ces anticorps atteignent un taux moyen de 439 mUI/ml (de 104 à 835 mUI/ml; SD = 227) à une semaine puis diminuent pour réaugmenter et atteindre à 13 semaines le taux initial. La signification de ce pic d'anticorps sera discutée plus loin. Un pic d'anticorps IgG anti-pré-S2 est observé à deux semaines.

L'apparition des anticorps anti-HBs induits par l'injection des plasmides pCMVHB-S1.S2.S (figure 8C) et pHBV-S1.S2.S (figure 8D) est légèrement retardée puisque les souris ne séroconvertissent à 100 % qu'à partir de deux semaines. Le profil de la séroconversion est identique, il est caractérisé par une réponse initiale spécifique de l'antigène pré-S2 suivie d'une réponse anti-HBs augmentant graduellement pour atteindre des taux de 488 mUI/ml (de 91 à 1034 mUI/ml; SD=552) (pCMVHB-S1.S2.S) et 1725 mUI/ml (de 143 à 6037 mUI/ml; SD=1808) (pHBV-S1.S2.S) à 13 semaines.

4) Réponse anti-HBs des lapins vaccinés par l'ADN.

Les résultats présentés sur les tableaux III et IV montrent que les taux d'anticorps détectés à 8 semaines chez les lapins immunisés au Biojector sont significativement supérieurs à ceux obtenus par injection de l'ADN à l'aiguille.

5. Analyse qualitative de la réponse humorale.

Des systèmes ELISA portant sur la phase solide des antigènes HBs de compositions variées vis-à-vis

des déterminants présentés et utilisant comme second anticorps des anticorps spécifiques des IgM ou des IgG de souris ont permis d'analyser qualitativement la réponse anticorps obtenue.

5 Dans tous les cas, l'injection unique de l'ADN chez la souris se caractérise par l'apparition précoce d'IgM spécifiques de l'AgHBs suivie immédiatement par la conversion en anticorps d'isotypes IgG caractéristiques de la réponse mémoire induite avec
10 l'aide des cellules T auxiliaires. La réponse anticorps à l'injection de l'ADN se caractérise par sa précocité. En effet, la séroconversion est obtenue 8 à 15 jours après l'injection selon le type d'ADN utilisé et dans tous les cas le plateau est atteint en quatre
15 semaines et maintenu de façon soutenue pendant 12 semaines.

L'utilisation d'antigène HBs de sous type hétérologue (ad) fixé sur les plaques ELISA permet de mettre en évidence la présence, dans le sérum des
20 souris immunisées, d'anticorps spécifiques de groupe anti-a, et par différence de réactivité vis-à-vis d'AgHBs de même sous-type (ay), d'anticorps spécifiques de sous-type anti-y. La présence des anticorps spécifiques des déterminants de groupe de
25 l'AgHBs est très importante puisque ceux-ci sont capables de conférer la protection contre des virus de sous-type hétérologues lors d'épreuves virulentes chez le chimpanzé (Szmuness et al. (1982) N. Engl. J. Med. 307, 1481-1486).

30 L'analyse de la réponse induite par le vecteur pCMV-S2.S montre que celle-ci présente une remarquable similitude avec celle que l'on peut observer chez l'homme au cours de l'infection. Elle est caractérisée par un pic d'IgM spécifiques de la région pré-S2

extrêmement précoce (8 jours) immédiatement suivi par une conversion en IgG anti-pré-S2 (figure 9). Cette réponse est suivie par l'apparition des anticorps anti-HBs IgM puis IgG. La production des anticorps anti-HBs est constante et atteint un maximum à 4 semaines. A 13 semaines des IgG anti-HBs et anti-pré-S2 persistent à un niveau constant.

La réponse anti-sous-type (y) précède la réponse anti-groupe (a) de la même manière que cela a été décrit lors de la vaccination avec le vaccin recombinant (Tron et al., (1989) (J. Infect. Dis.160, 199-204).

La réponse obtenue avec les trois autres ADN vaccin montre la commutation de classe IgM → IgG caractéristique de la réponse secondaire. La réponse étant d'abord dirigée contre le sous-type avant de l'être contre les déterminants de groupe de l'AgHBs.

La réponse à long terme, étudiée pour l'ADN pCMVHB-S, montre que le pic d'anticorps est atteint en 3 mois et que ceux-ci persistent à taux égal 6 mois plus tard (Tableau V).

6) Vaccin génétique et non réponse

Un problème majeur de la vaccination contre l'hépatite B reste le nombre élevé de non-répondeurs à la vaccination classique (2,5 à 5%) . La non réponse chez l'homme a pu être corrélée à certains types HLA (Krustall et al., (1992) J. Exp. Med. 175, 495-502) et à un défaut de la présentation de l'antigène ou de la stimulation des cellules T auxiliaires.

Pour étudier l'impact possible de la vaccination génétique sur la non réponse à l'AgHBs , un panel de souches de souris dont la réponse aux différentes protéines d'enveloppe du virus HBV est régulée génétiquement et a été bien caractérisée par

Millich et Coll. (1986 J. Immunol. 137, 315) a été utilisé. La construction pCMVHB-S précédemment décrite a été injectée dans les muscles des souris B10(H-2^b)B10.S (H-2^S) et B10.M (H-2^f).

5 La souche B10 répond aux trois protéines d'enveloppe du virus, la souche B10.S ne répond pas à l'AgHBs mais la non-réponse peut être contournée par immunisation avec des antigènes HBsAg portant des déterminants pré-S2. La souche B10M est totalement non
10 répondeuse à l'antigène HBs et à l'antigène pré-S2. Une réponse dans cette souche a pu être obtenue par immunisation avec des AgHBs portant des déterminants pré-S1.

 Les souris immunisées par l'ADN ont reçu une
15 seule injection (100 µg) dans le muscle en régénération. Les souris témoins ont reçu la protéine en deux injections intrapéritonéales à un mois d'intervalle, la première de 2 µg AgHBs adjuvé en adjuvant complet de Freund (CFA) et la seconde de 2 µg
20 AgHBs adjuvé en adjuvant incomplet de Freund (IFA).

 Les résultats obtenus avec l'ADN pCMVHB-S sont illustrés par les figures 10A à 10F.

 - Dans la souche B10 (bonne répondeuse) la
25 réponse induite par l'ADN est plus précoce que la réponse induite par la protéine après une seule injection.

 - Dans la souche B10S (non répondeuse à l'AgHBs en l'absence de pré-S2) on observe l'apparition d'anticorps anti-HBs spécifiques de sous-
30 type puis spécifiques de groupe après immunisation par l'ADN pCMVHB-S. Des anticorps anti-HBs spécifiques de groupe ne sont obtenus chez les souris immunisées avec la protéine HBs qu'après la 2ème injection.

 - Dans la souche B10M (non répondeuse à

l'AgHBs en l'absence de pré-S1) l'immunisation par l'ADN permet d'obtenir une réponse anti-HBs spécifique de groupe et de sous-type alors que la protéine induit une réponse de sous-type seulement et nécessite deux injections.

La réponse induite par les trois types de vecteurs est comparée dans les trois souches de souris.

CONCLUSION

Il est généralement admis que la réponse humorale à l'antigène HBs est suffisante à elle seule pour conférer la protection. La présence d'anticorps dirigés contre d'autres déterminants (pré-S1 et pré-S2) portés par les protéines d'enveloppe du virus, eux-mêmes protecteurs, pourrait améliorer la qualité de cette réponse. L'ensemble des expériences rapportées ici montre que la réponse humorale induite par la vaccination génétique anti-hépatite B est dans plusieurs domaines supérieure à celle qui peut être obtenue par la vaccination classique.

En termes de taux de séroconversion: le taux de 100% est obtenu dès 8 jours pour les souris immunisées avec les ADN pCMV-HBs et pCMVHB-S2.S et cela après une seule injection.

En termes de niveau de réponse: le seuil de 10 mUI/ML considéré suffisant chez l'homme pour conférer la protection est toujours largement dépassé.

En termes de précocité de la réponse: le vecteur pCMVHB-S2.S permet d'obtenir en 8 jours un niveau très élevé d'anticorps anti-pré-S2 et l'on sait que ceux-ci sont capables, à eux seuls, de conférer la protection (Itoh et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9174-9178).

En termes de persistance de la réponse: les

anticorps anti-HBs persistent à un niveau élevé pendant plus de 6 mois.

5 En, termes de qualité de la réponse: les anticorps obtenus sont de type IgG caractéristiques d'une réponse dépendante de cellules T auxiliaires et donc d'une réponse mémoire.

10 En termes d'activité anti-virale: les anticorps sont spécifiques du sous-type viral mais surtout spécifiques de groupe et donc susceptibles de conférer une protection croisée.

15 En termes de signification biologique: le profil de la réponse obtenue par immunisation avec pCMVHB-S2.S mime complètement celui que l'on peut observer, chez l'homme, lors d'une infection virale résolue.

TABLEAU I
Induction d'anticorps à l'encontre de l'antigène de surface de l'hépatite B.

Description	Nombre de souris	Taux d'anticorps à l'encontre de l'antigène de surface de l'hépatite B dans le sérum (mIU/ml)		
		avant l'injection d'ADN	15 jours après l'injection d'ADN	35 jours après l'injection d'ADN
ADN injecté 1 jour après le traitement par la marcaine	5	0	moyenne: 56 de 5 à plus de 140	moyenne: 59
ADN injecté 5 jours après le traitement par la marcaine	5	0	moyenne : 71 de 21 à plus de 108	moyenne : 47

TABLEAU II

Groupe	RLU/sec/muscle de Luciférase (Moyenne $\pm$ SEM) RLU = Unité de. Lumière Relative	Pourcentage par rapport au témoin
Témoin	43 082 $\pm$ 5 419	100 %
4X DOGS	28 $\pm$ 7	0,06 %
DOGS -Spermidine	50 $\pm$ 23	0,12 %
PEG-DOGS	0 $\pm$ 0	0,00 %

TABLEAU III
Immunsisation au Biojector^R

pCMV-HB.S		0 semaine	2 semaines	8 semaines
N°				
2.1		0	517	380
2.2		0	374	322
3.1		0	258	418
4.1		0	400	4045
4.2		0	88	86
4.3		0	314	420
6.1		0	415	1001
6.2		0	1543	3517
6.3		0	1181	141
Moyenne		0	566 mUI/ml	1148mUI/ml
SD		0	476	1521
SEM		0	159	507
N		9	9	9
CV			84%	133%

TABLEAU IV
Immunisation par injection à l'aide d'une aiguille

pCMV-HB.S				
N°	0 semaine	2 semaines	8 semaines	
1.1	1	0	1	
5.1	0	287	186	
5.2	0	162	798	
5.3	0	305	203	
7.1	0	86	175	
7.2	0	1108	mort	
moyenne	0	325 mUI/ML	273 mUI/ml	
SD	0	401	305	
SEM	0	164	136	
N	6	6	5	
CV	245%	124%	112%	

TABLEAU V
Réponse à long terme d'une souris vaccinée par le pCMVHB-S.

	1 mois	2 mois	3 mois	6 mois
* Titre a-HBs en mUI/ml	227	662	1299	1082
* Titre a-HBs ELISA	$3,5.10^{-4}$	5.10^{-4}	$8.5.10^{-4}$	9.10^{-4}

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT PASTEUR
- (B) RUE: 28, rue du Docteur Roux
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75724

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Vecteur nucleotidique, composition le contenant et vaccin pour l'immunisation a l'encontre d'une hepatite

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5618 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: circulaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: pRCCMV-HBS

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTCGACTCT	40
CAGTACAATC TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT	80
CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG	120
CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA	160
CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG	200
CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT	240

GATTATTGAC	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	280
ATTAGTTCAT	AGCCCATATA	TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	320
CTTACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC	360
CCCGCCCAT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	400
AACGCCAATA	GGGACTTTCC	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAC	440
TATTTACGGT	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT	480
ATCATATGCC	AAGTACGCCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	520
TAAATGGCCC	GCCTGGCATT	ATGCCCAGTA	CATGACCTTA	560
TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA	600
TCGCTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	640
TGGGCGTGGA	TAGCGGTTTG	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	680
CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC	720
AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACAACTCCGC	760
CCCATTGACG	CAAATGGGCG	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG	800
GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA	840
CTGCTTAACT	GGCTTATCGA	AATTAATACG	ACTCACTATA	880
GGGAGACCCA	AGCTTGGTAC	CGGGCCCCCC	CTCGAGGATT	920
GGGGACCCTG	CGCTGAACAT	GGAGAACATC	ACATCAGGAT	960
TCCTAGGACC	CCTTCTCGTG	TTACAGGCGG	GGTTTTTCTT	1000
GTTGACAAGA	ATCCTCACAA	TACCGCAGAG	TCTAGACTCG	1040
TGGTGGACTT	CTCTCAATTT	TCTAGGGGGA	ACTACCGTGT	1080
GTCTTGGCCA	AAATTCGCAG	TCCCCAACCT	CCAATCACTC	1120
ACCAACCTCT	TGTCCTCCAA	CTTGTCTTGG	TTATCGCTGG	1160
ATGTGTCTGC	GGCGTTTTAT	CATCTTCCTC	TTCATCCTGC	1200
TGCTATGCCT	CATCTTCTTG	TTGGTTCTTC	TGGACTATCA	1240
AGGTATGTTG	CCCGTTTGTC	CTCTAATTCC	AGGATCCTCA	1280
ACAACCAGCA	CGGGACCATG	CCGGACCTGC	ATGACTACTG	1320
CTCAAGGAAC	CTCTATGTAT	CCCTCCTGTT	GCTGTACCAA	1360
ACCTTCGGAC	GGAAATTGCA	CCTGTATTCC	CATCCCATCA	1400
TCCTGGGCTT	TCGGAAAATT	CCTATGGGAG	TGGGCCTCAG	1440
CCCGTTTCTC	CTGGCTCAGT	TTACTAGTGC	CATTTGTTCA	1480
GTGGTTCGTA	GGGCTTTCCC	CCACTGTTTG	GCTTTCAGTT	1520
ATATGGATGA	TGTGGTATTG	GGGGCCAAGT	CTGTACAGCA	1560
TCTTGAGTCC	CTTTTTACCG	CTGTTACCAA	TTTTCTTTTG	1600
TCTTTGGGTA	TACATTTAAA	CCCTAACAAA	ACAAAGAGAT	1640

GGGGTTACTC TCTAAATTTT ATGGGTTATG TCATTGGATG 1680
TTATGGGTCC TTGCCACAAG AACACATCAT ACAAAAATC 1720
AAAGAATGTT TTAGAAAAC TCTATTAAC AGGCCTATTG 1760
ATTGGAAAGT ATGTCAACGA ATTGTGGGTC TTTTGGGTTT 1800
TGCTGCCCCT TTTACACAAT GTGGTTATCC TGC GTTGATG 1840
CCTTTGTATG CATGTATTCA ATCTAAGCAG GCTTTCACCT 1880
TCTCGCCAAC TTACAAGGCC TTTCTGTGTA AACAATACCT 1920
GAACCTTTAC CCCGTTGCCC GGCAACGGCC AGGTCTGTGC 1960
CAAGTGTTTG CTGACGCAAC CCCCCTGGC TGGGGCTTGG 2000
TCATGGGCCA TCAGCGCATG CGTGGAACCT TTTCGGCTCC 2040
TCTGCCGATC CATACTGCGG AACTCCTAGC CGCTTGTTTT 2080
GCTCGCAGCA GGTCTGGAGC AAACATTATC GGGACTGATA 2120
ACTCTGTTGT CCTATCCCGC AAATATACAT CGTTTCCATG 2160
GCTGCTAGGC TGTGCTGCCA ACTGGATCCT GCGCGGGACG 2200
TCCTTTGTTT ACGTCCCGTC GCGCTGAAT CCTGCGGACG 2240
ACCCTTCTCG GGGTCGCTTG GGACTCTCTC GTCCCCTTCT 2280
CCGTCTGCCG TTCCGACCGA CCACGGGGCG CACCTCTCTT 2320
TACGCGGACT CCCCGTCTGT GCCTTCTCAT CTGCCGGACC 2360
GTGTGCACTT CGCTTCACCT CTGCACGTCG CATGGAGACC 2400
ACCGTGAACG CCCACCAAAT ATTGCCCAAG GTCTTACATA 2440
AGAGGACTCT TGGACTCTCA GCAATGTCAA CGACCGACCT 2480
TGAGGCATAC TTCAAAGACT GTTTGTTTAA AGACTGGGAG 2520
GAGTTGGGGG AGGAGATTAG GTTAAAGGTC TTTGTACTAG 2560
GAGGCTGTAG GCATAAATTG GTCTGCGCAC CAGCACCATG 2600
CAACTTTTTC ACCTCTGCCT AATCATCTCT GTTTCATGTC 2640
CTACTGTTCA AGCCTCCAAG CTGTGCCTTG GGTGGCTTTG 2680
GGGCATGGAC ATCGACCCTT ATAAAGAATT TGGAGCTACT 2720
GTGGAGTTAC TCTCGTTTTT GCCTTCTGAC TTCTTTCCTT 2760
CAGTACGAGA TCTGGCCAGG ATCCACTAGT TCTAGAGCGG 2800
CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAGCTTTTGT TCCCTTTAGT 2840
GAGGGTTAAT TGCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT 2880
CGTGACCCAT GGCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG 2920
GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC 2960
TGGGTGTGGC GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC 3000
CCGTGATATT GCTGAAGAGC TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC 3040

CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTCGC 3080
AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG 3120
AGCGGGACTC TGGGGTTCGA AATGACCGAC CAAGCGACGC 3160
CCAACCTGCC ATCACGAGAT TTCGATTCCA CCGCCGCCTT 3200
CTATGAAAGG TTGGGCTTCG GAATCGTTTT CCGGGACGCC 3240
GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC ATGCTGGAGT 3280
TCTTCGCCCCA CCCCAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG 3320
TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA 3360
GCATTTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC 3400
TCATCAATGT ATCTTATCAT GTCTGGATCC CGTCGACCTC 3440
GAGAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCCTGTGT 3480
GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC 3520
CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG 3560
AGCTAACTCA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCCGCTT 3600
TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT 3640
CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC 3680
TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCG 3720
TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT 3760
AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG 3800
AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA 3840
AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC 3880
CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG 3920
TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC 3960
CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT 4000
GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA 4040
AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA 4080
GTTGCGTGTA GGTCGTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA 4120
CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT 4160
AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT 4200
CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC 4240
GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG 4280
CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT 4320
GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG 4360
TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT 4400
GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA 4440

AAGGATCTCA	AGAAGATCCT	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	4480
TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTTG	4520
GTCATGAGAT	TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	4560
TAAATTAAAA	ATGAAGTTTT	AAATCAATCT	AAAGTATATA	4600
TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	CTTAATCAGT	4640
GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	4680
TAGTTGCCTG	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA	CTACGATACG	4720
GGAGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC	AATGATACCG	4760
CGAGACCCAC	GCTCACCGGC	TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	4800
ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA	GTGGTCCTGC	4840
AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA	TTGTTGCCGG	4880
GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCGCA	4920
ACGTTGTTGC	CATTGCTACA	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	4960
GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGCTCCGG	TTCCCAACGA	5000
TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG	5040
CGGTTAGCTC	CTTCGGTCCT	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	5080
GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG	5120
CATAATTCTC	TTACTGTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	5160
CTGTGACTGG	TGAGTACTCA	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	5200
GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC	GGCGTCAATA	5240
CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	5280
TCATCATTGG	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	5320
GATCTTACCG	CTGTTGAGAT	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT	5360
CGTGCACCCA	ACTGATCTTC	AGCATCTTTT	ACTTTCACCA	5400
GCGTTTCTGG	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC	AAAATGCCGC	5440
AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG	TTGAATACTC	5480
ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG	5520
GTTATTGTCT	CATGAGCGGA	TACATATTTG	AATGTATTTA	5560
GAAAAATAAA	CAAATAGGGG	TTCCGCGCAC	ATTTCCCCGA	5600
AAAGTGCCAC	CTGACGTC			5618

REVENDICATIONS

1. Vecteur nucléotidique comprenant au moins :
 - un gène ou un ADN codant pour au moins une partie d'une protéine antigénique d'un virus pathogène chez l'homme ;
 - la séquence de terminaison non traduite dudit gène ou dudit ADN, incluant le signal de polyadénylation ; et
 - un promoteur permettant l'expression de ce gène dans des cellules musculaires.
2. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le virus est celui d'une hépatite.
- 10 3. Vecteur selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il ne se réplique pas dans les cellules.
4. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le gène code pour au moins une partie d'une protéine du virus de l'hépatite B.
5. Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine est la protéine S, S-préS₂ ou S-préS₂-préS₁.
6. Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que le gène est le gène S.
7. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le virus est celui d'une hépatite A ou d'une hépatite non-A, non-B.
- 20 8. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur du cytomégalovirus.

9. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 et 8, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pCMV-HBS déposé sous le n° I-1370 auprès de la CNCM le 21 octobre 1993.
10. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 et 8, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pCMVHB-S1.S2.S déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1411.
11. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 et 8, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pCMVHB-S2.S déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1410.
12. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pRSV-HBS déposé sous le n° I-1371 auprès de la CNCM le 21 octobre 1993.
13. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit promoteur est celui des gènes de surface du virus HBV.
14. Vecteur selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est le plasmide pHBV-S1.S2.S déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1409.
15. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur interne.
16. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur d'un gène d'une protéine du cytosquelette.
17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend le promoteur de la desmine.
18. Vecteur selon l'une des revendications 16 et 17, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur humain.

19. Vecteur selon l'une des revendications 1 et 3, caractérisé en ce qu'il comprend des gènes codant au moins en partie pour la protéine gp160 du virus HIV1 associée à au moins une protéine choisie parmi les protéines p25, p55 et p18.
20. Vecteur selon l'une des revendications 1 et 3, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un gène codant pour la protéine Rev du virus HIV1.
21. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, comprenant un promoteur humain et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN codant pour S, S-préS₂ ou S-préS₁.préS₂.
- 10 22. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, comprenant un promoteur humain et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN codant pour la protéine gp160 associée à au moins une protéine choisie parmi les protéines p25, p55 et p18.
23. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, comprenant un promoteur humain et une autre séquence de régulation pour l'expression d'un gène ou d'un ADN codant pour la protéine Rev.
24. Vaccin, caractérisé en ce qu'il contient au moins un vecteur selon l'une des revendications 1 à 23.
- 20 25. Composition capable d'induire une réponse cytotoxique constituée par au moins un polynucléotide codant pour une protéine virale antigénique ledit polynucléotide étant capable de s'exprimer dans les cellules musculaires et comportant un promoteur tel que défini dans l'une des revendications 15 à 18, et par des adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

26. Composition pharmaceutique non lipidique destinée à l'immunisation à l'encontre d'une infection virale, comprenant un vecteur selon l'une des revendications 1 à 23, et des adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

27. Composition selon la revendication 26, caractérisée en ce que l'infection virale est une hépatite.

10 28. Composition selon l'une des revendications 26 et 27, caractérisée en ce que ledit vecteur est sous forme adaptée à son administration dans le muscle d'un individu à immuniser, au minimum cinq jours après administration de bupivacaine, sensiblement au même endroit.

29. Composition selon la revendication 28, caractérisée en ce que le vecteur est sous forme adaptée à son administration dix jours après administration de la bupivacaine.

30. Composition selon la revendication 28 ou 29, caractérisée en ce que ledit vecteur est administrable par injection intramusculaire à l'aide d'un pistolet à jet liquide.

31. Vecteur selon la revendication 7, caractérisé en ce que le virus est le virus d'hépatite C, le virus d'hépatite E ou le virus d'hépatite delta.

20 32. Composition immunogène contre une infection virale comprenant :
• un vecteur nucléotidique, ledit vecteur nucléotidique étant constitué par :
(i) un gène ou un ADN codant pour au moins une partie d'une protéine antigénique d'un virus pathogène chez l'homme,
(ii) la séquence de terminaison non traduite dudit gène ou dudit ADN, incluant le signal de polyadénylation, située en aval dudit gène ou dudit ADN,

(iii) un promoteur contrôlant l'expression dudit gène ou dudit ADN dans des cellules musculaires, ledit promoteur étant choisi parmi :

- le promoteur du cytomégalo virus,
 - le promoteur RSV,
 - le promoteur des gènes de surface du virus HBV, ou HIV ou Hépatite A,
 - un promoteur humain, et
 - un promoteur d'un gène d'une protéine du cytosquelette; et
- des adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

1/9

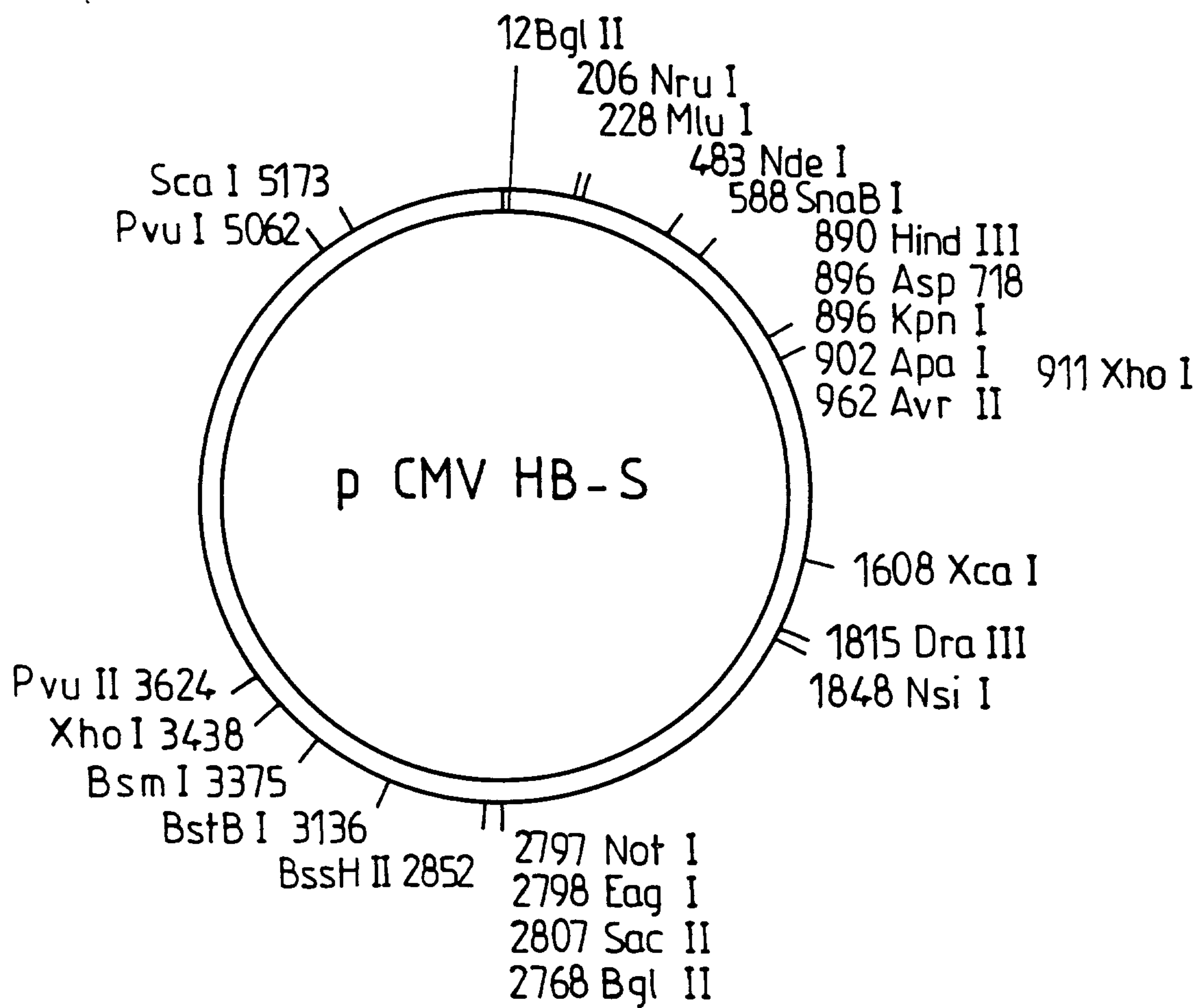


FIG.1

2/9

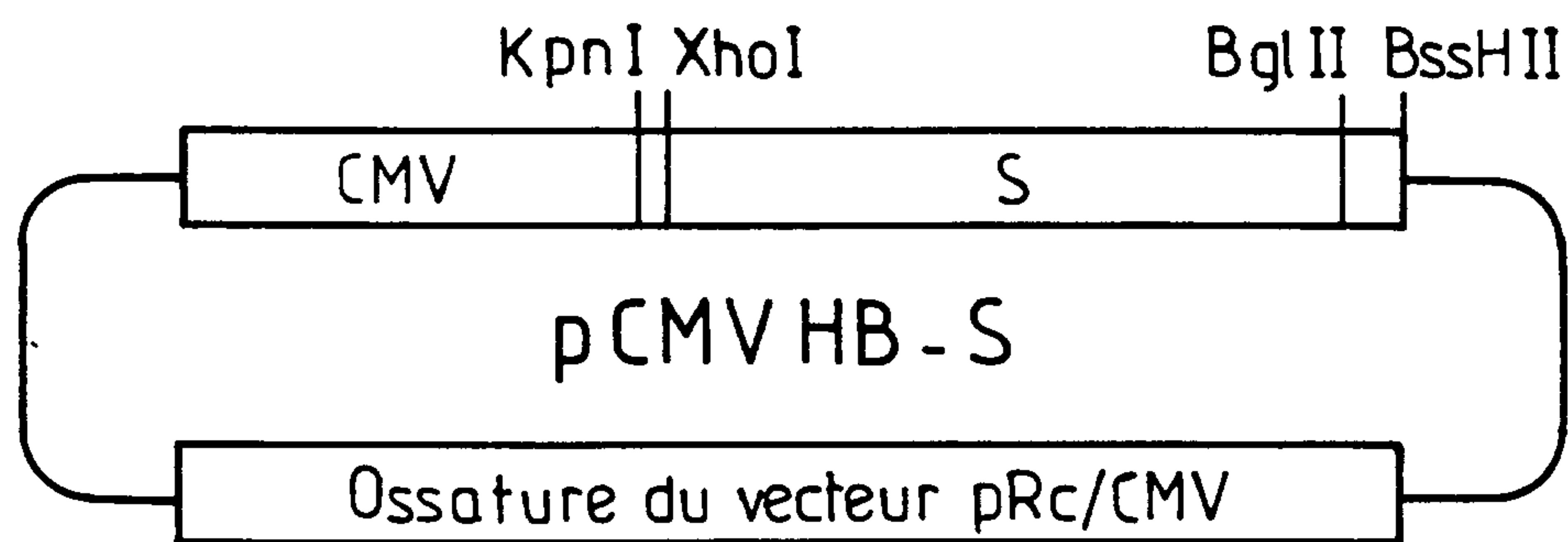


FIG.2A

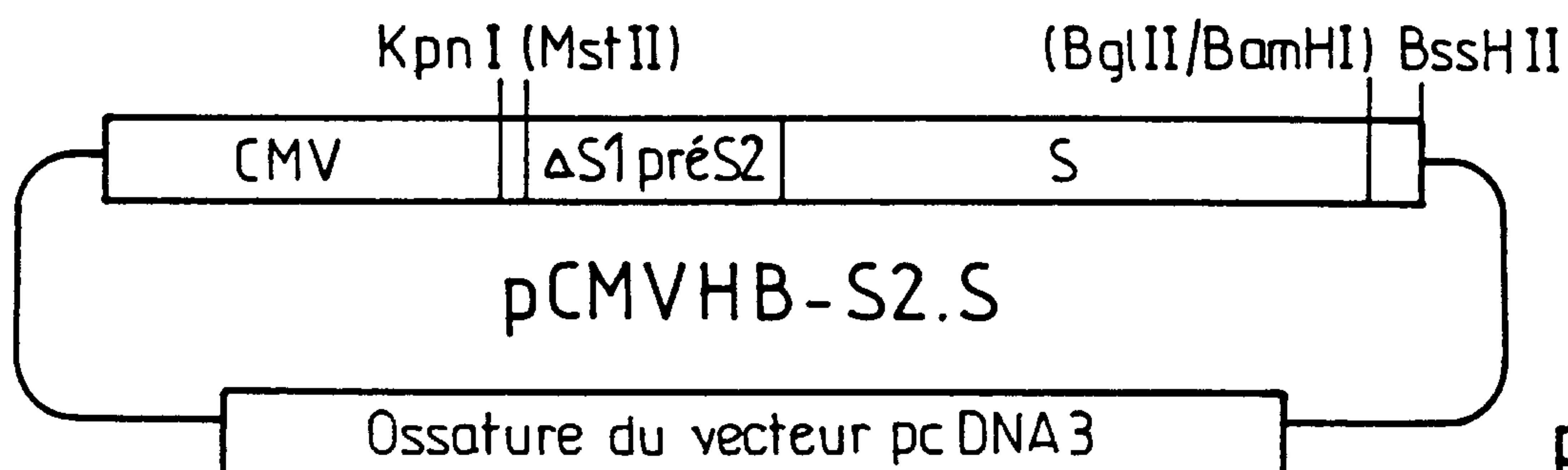


FIG.2B

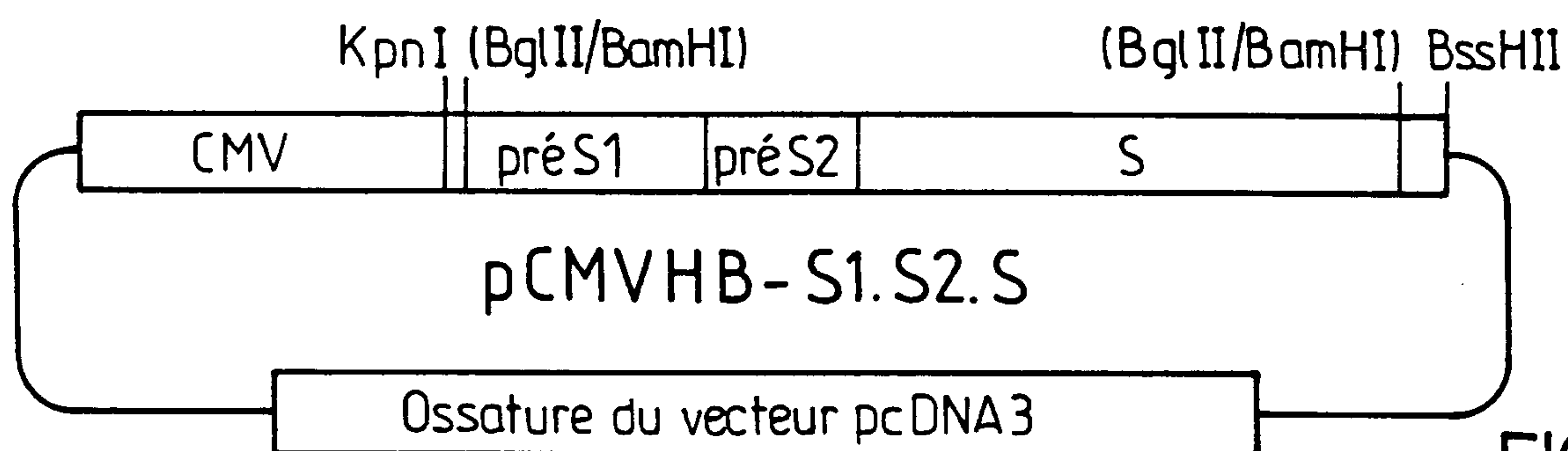


FIG.2C

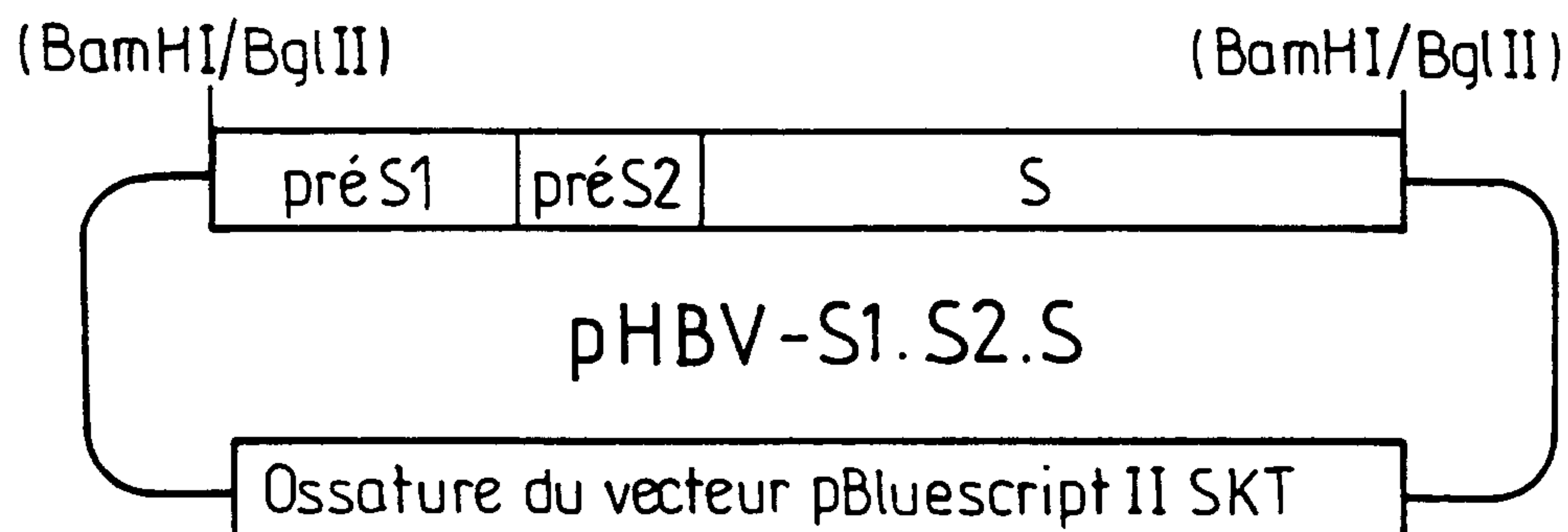


FIG.2D

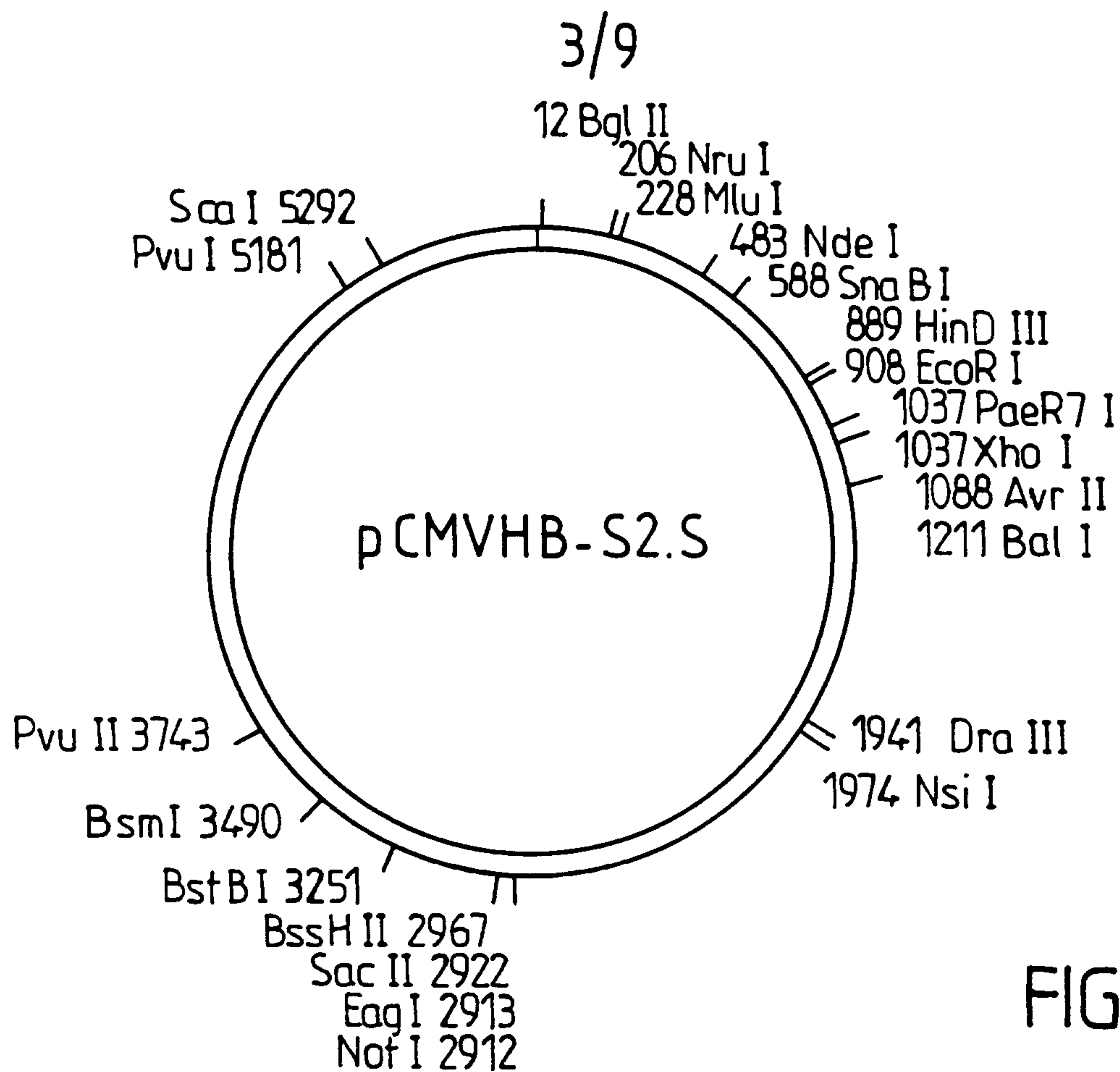


FIG. 3

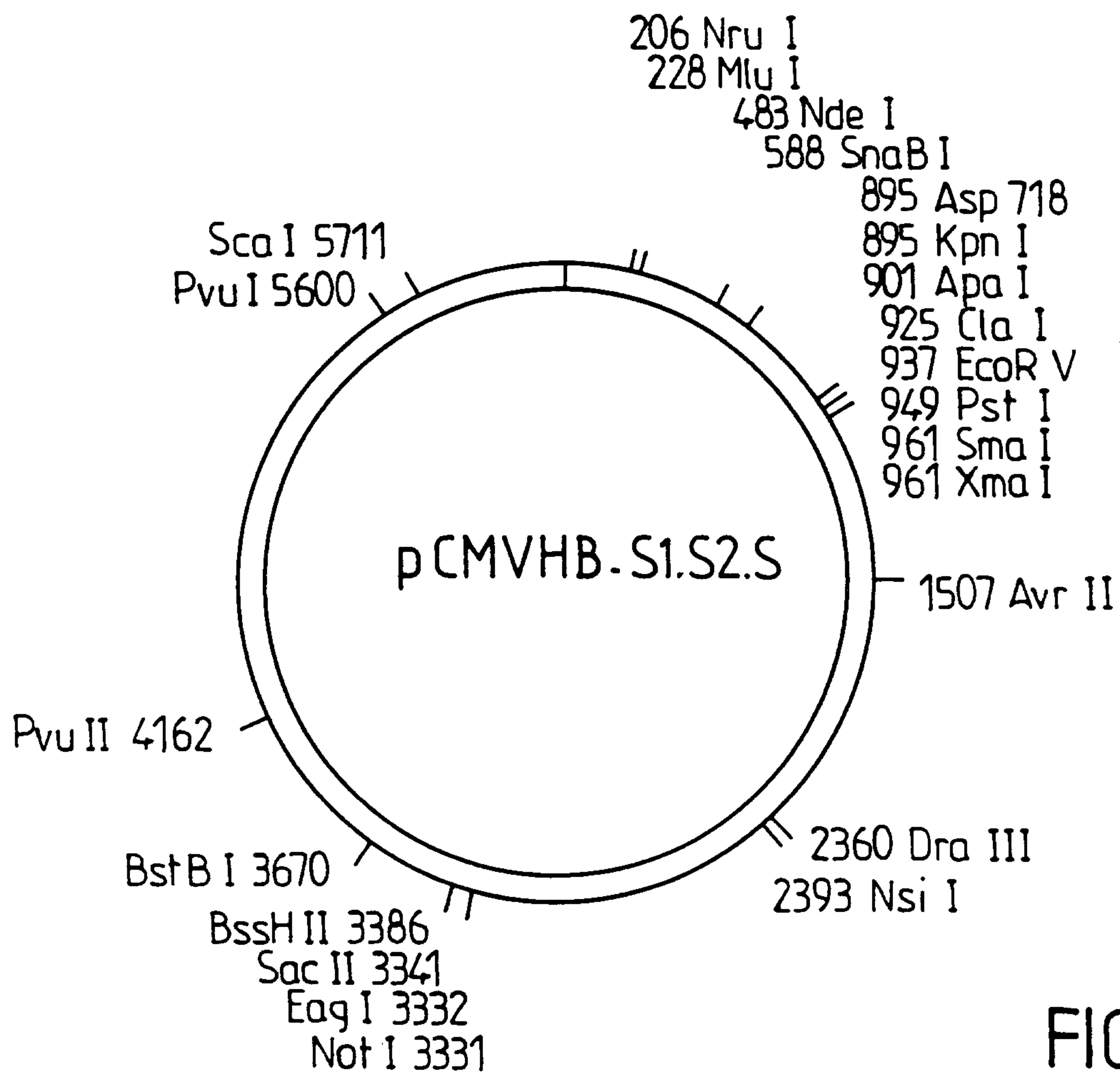


FIG. 4

4/9

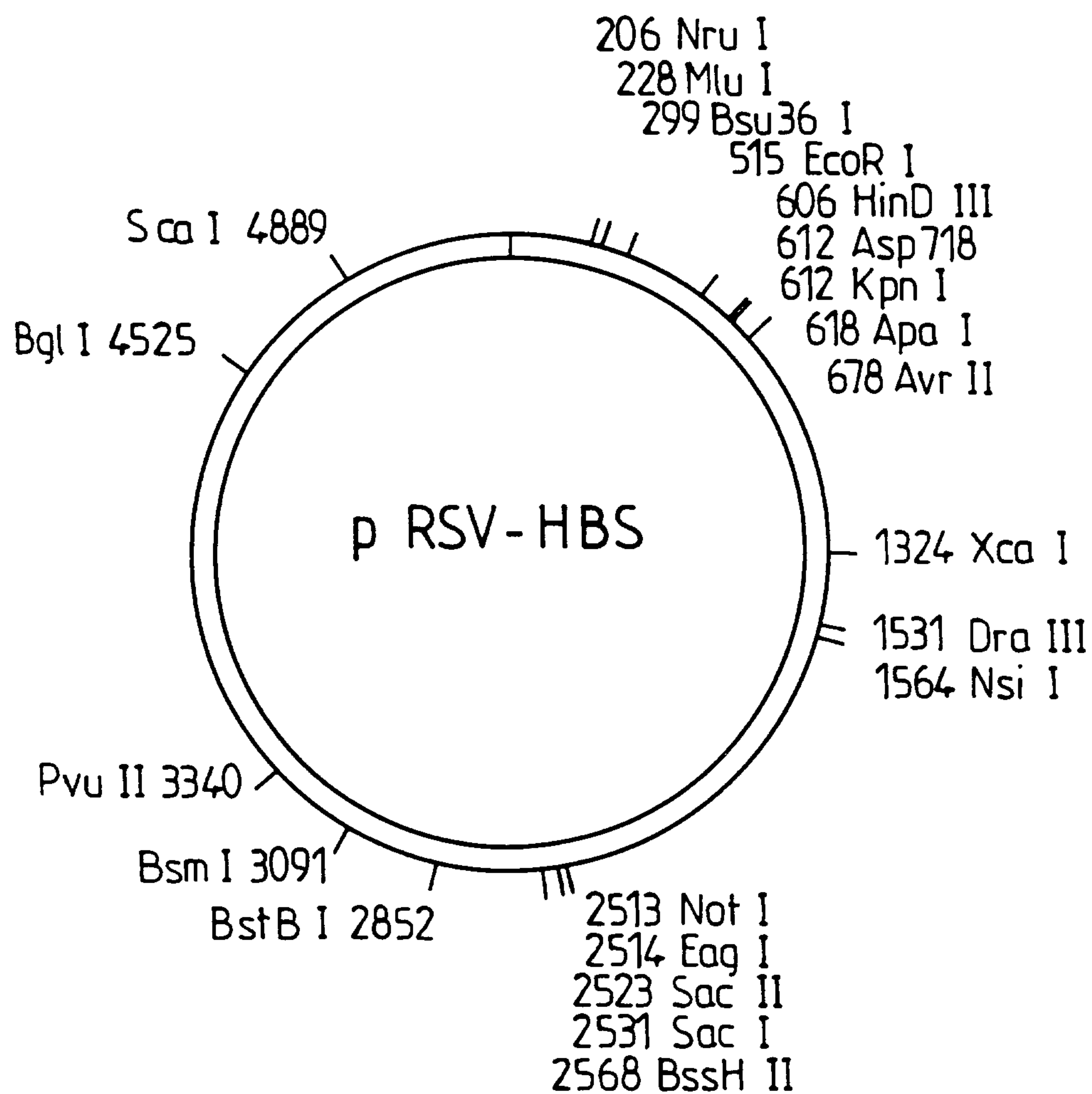


FIG. 5

5/9

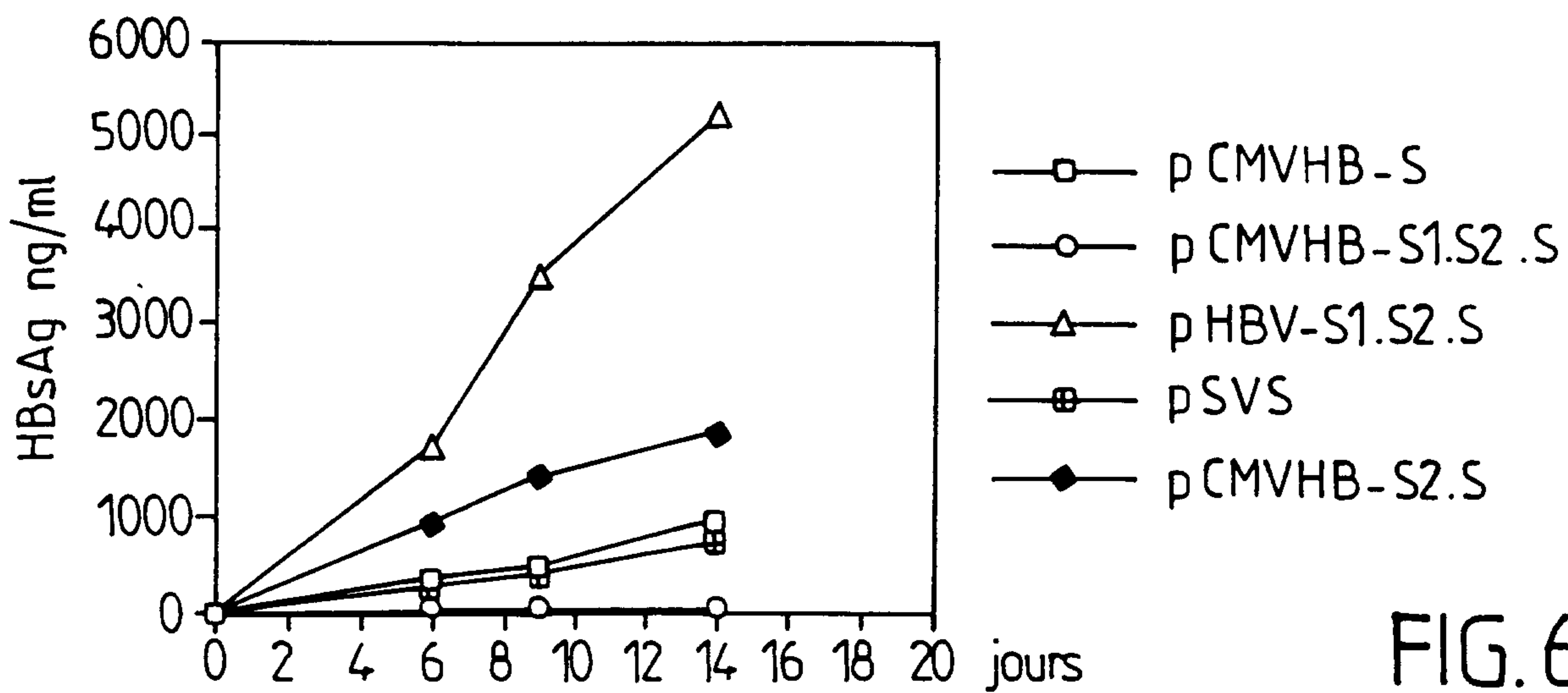


FIG. 6

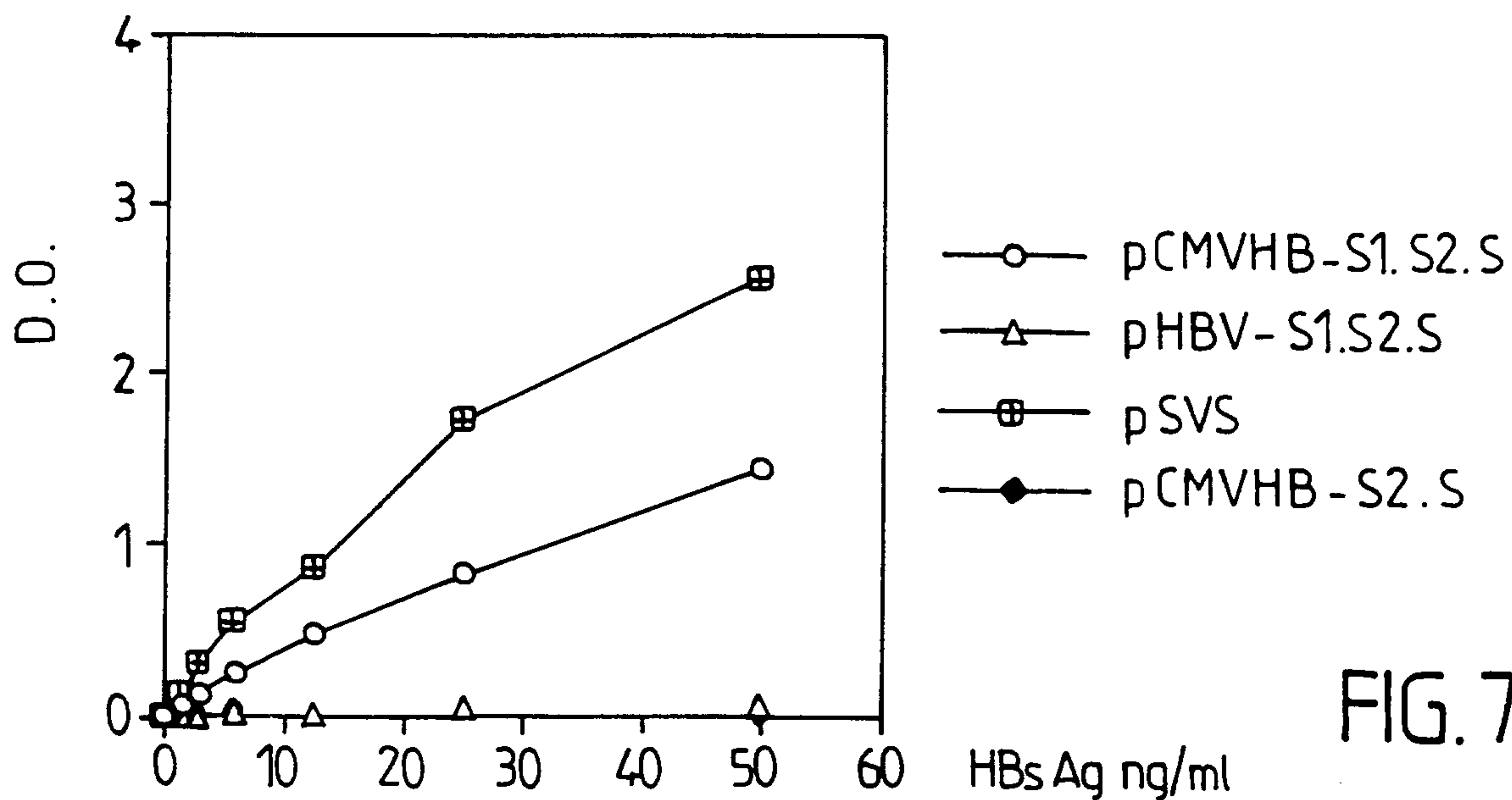


FIG. 7A

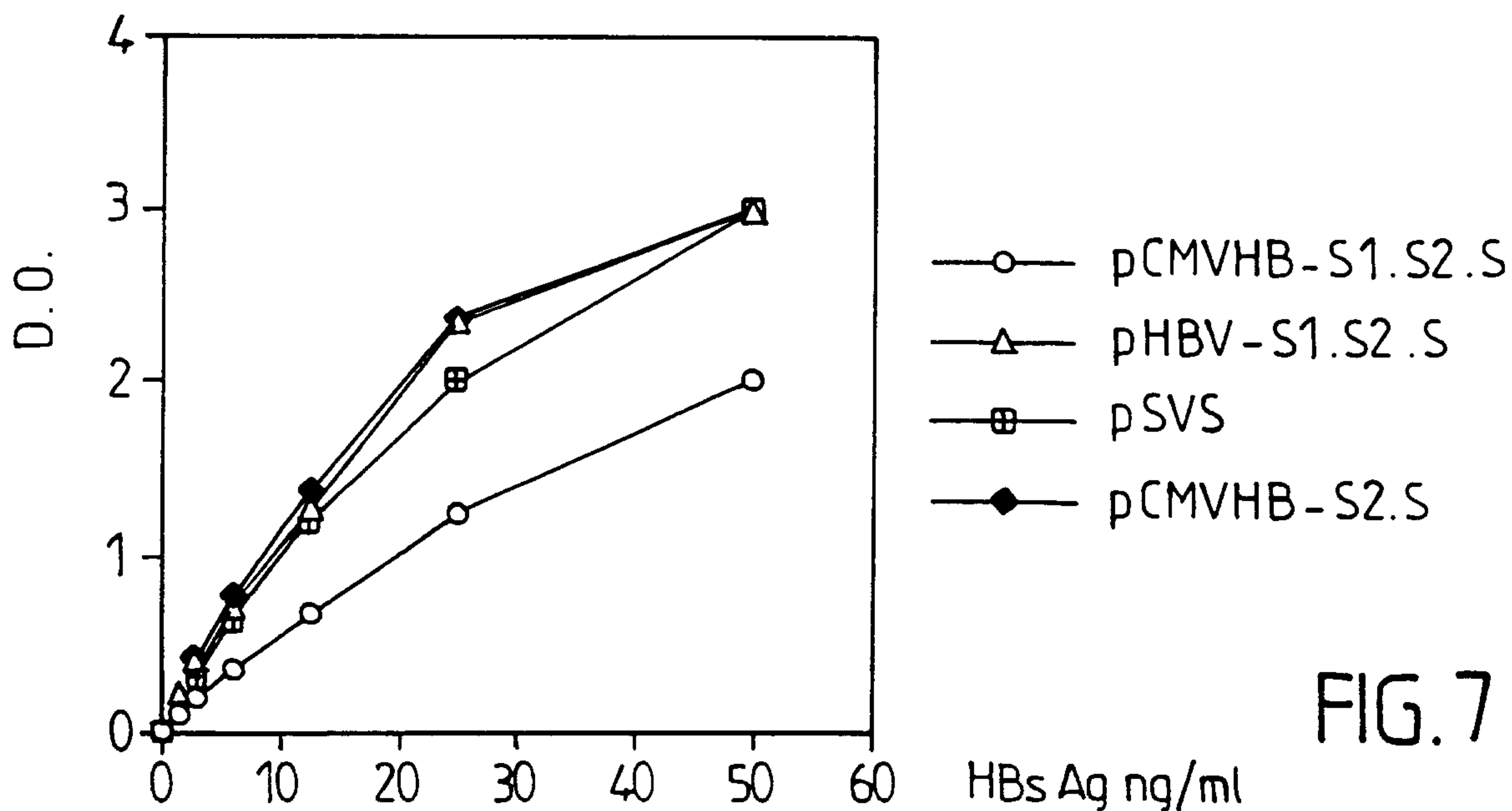


FIG. 7 B

6/9

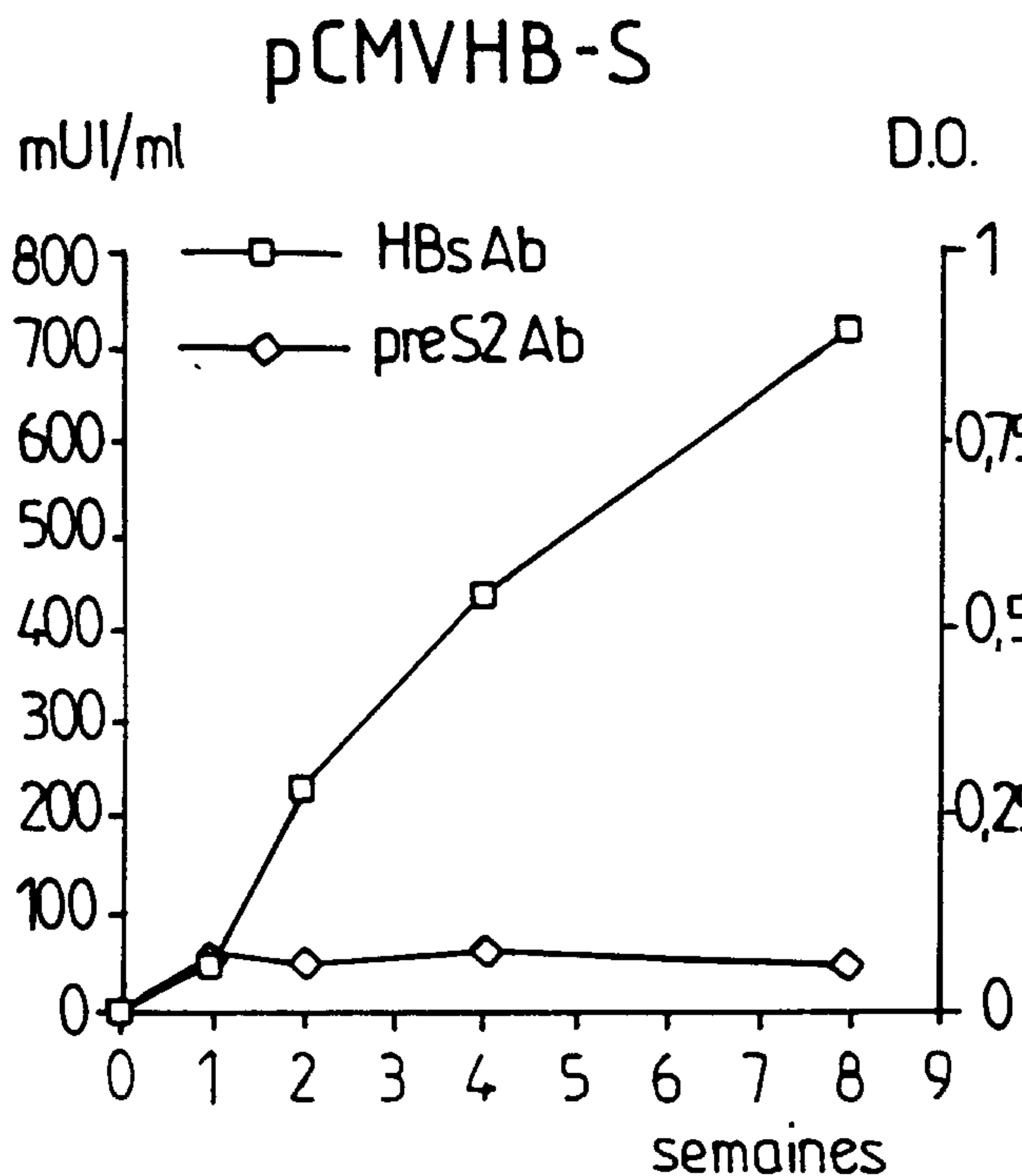


FIG.8A

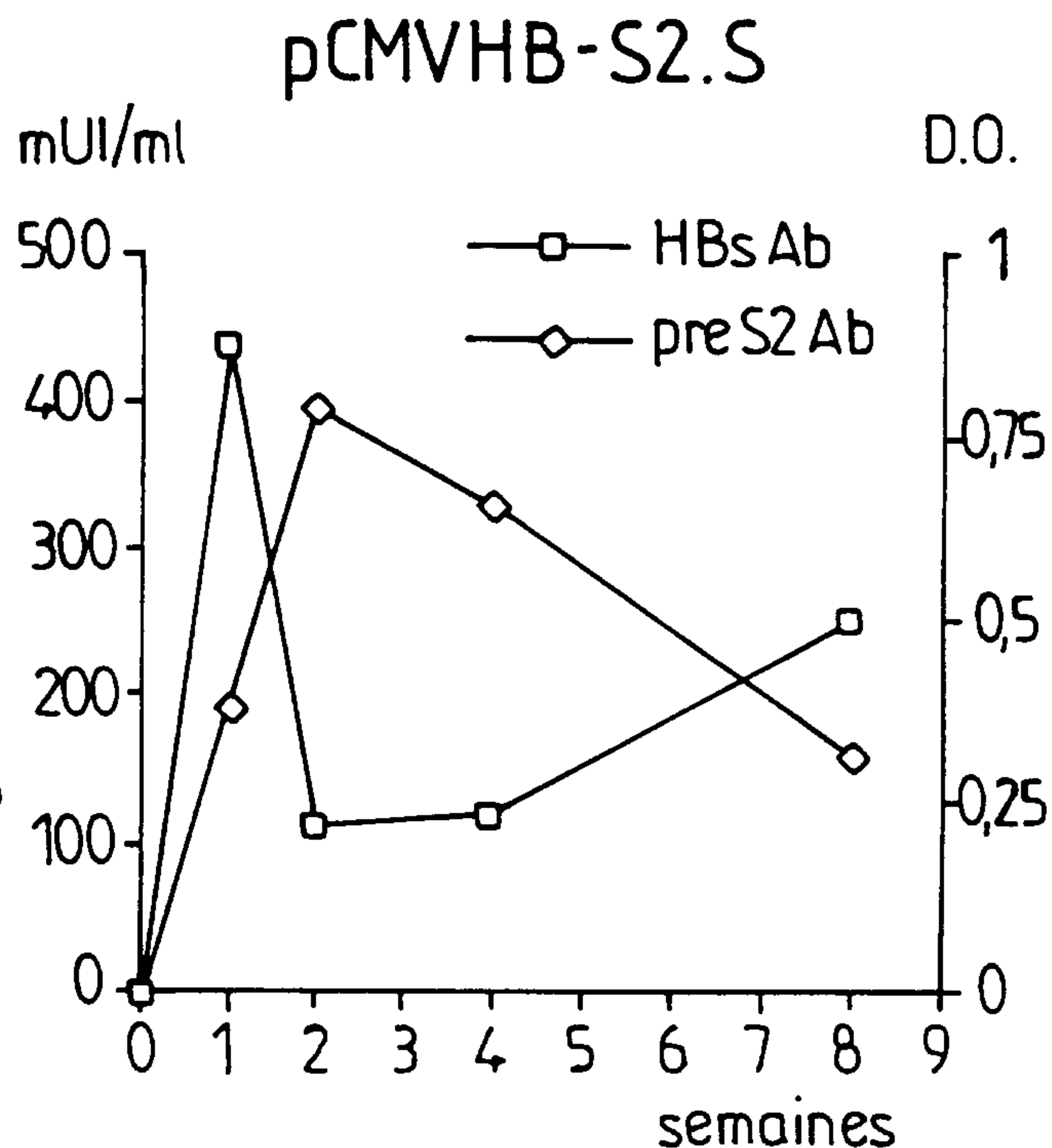


FIG.8 B

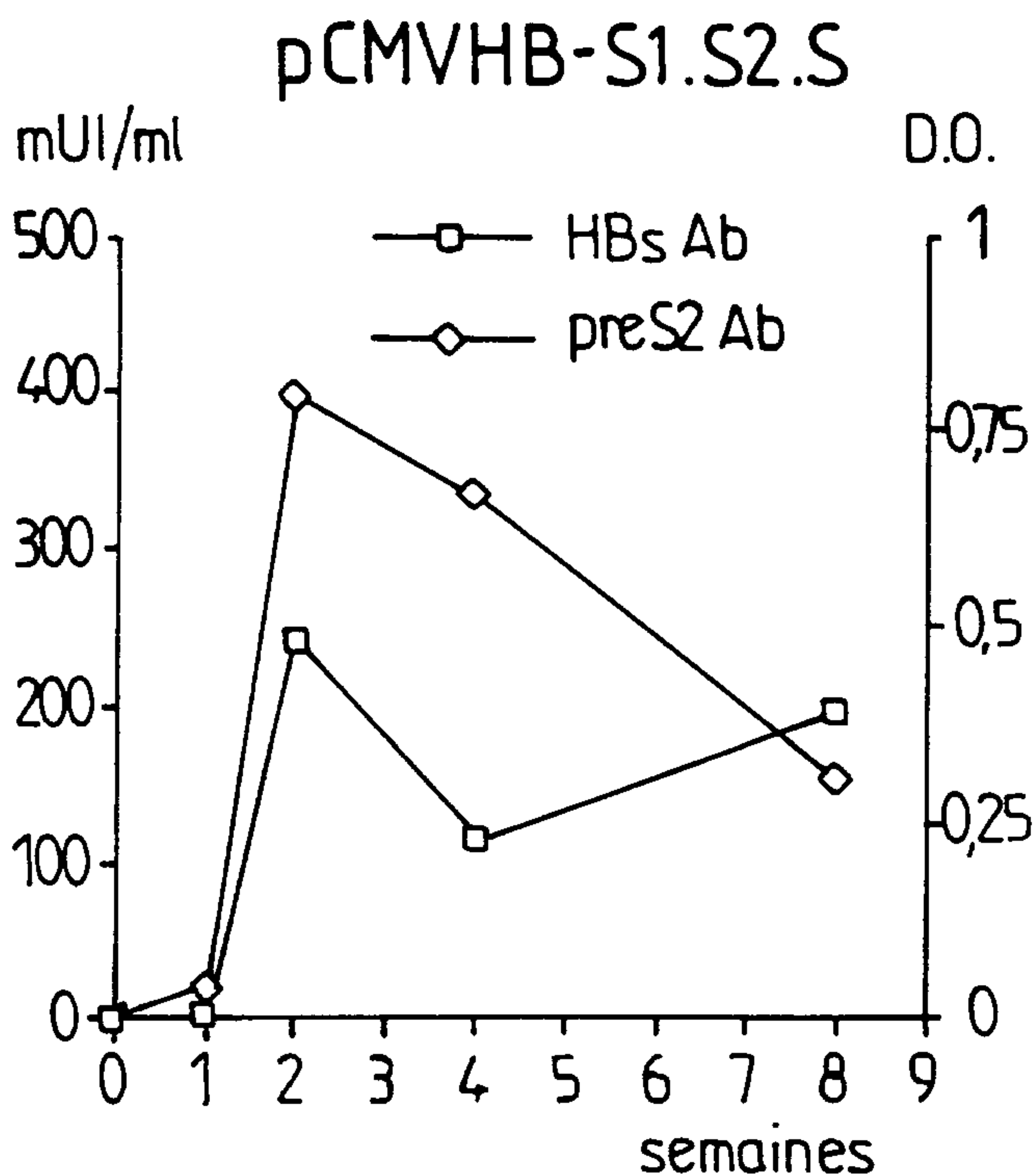


FIG.8 C

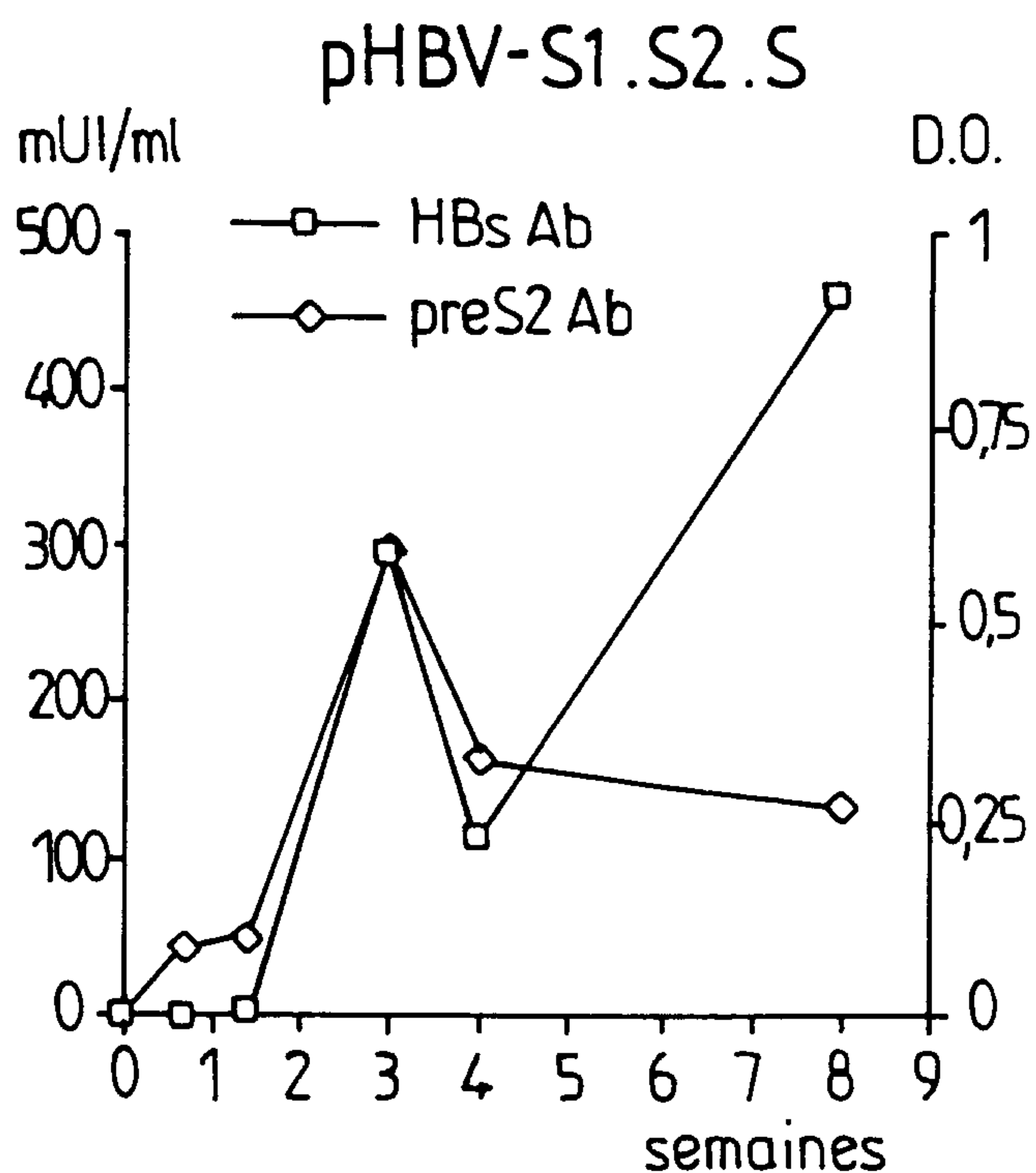


FIG.8 D

7/9

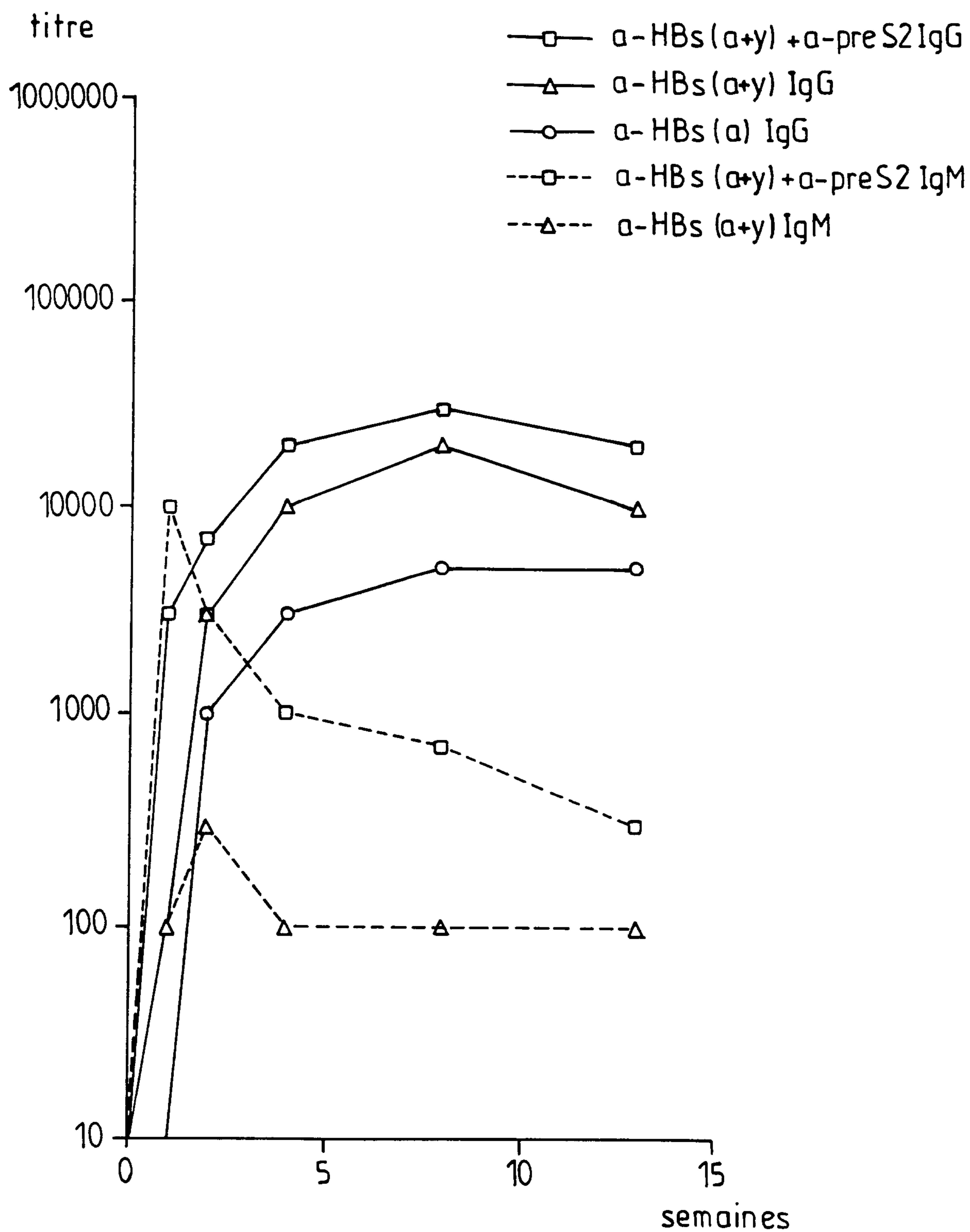
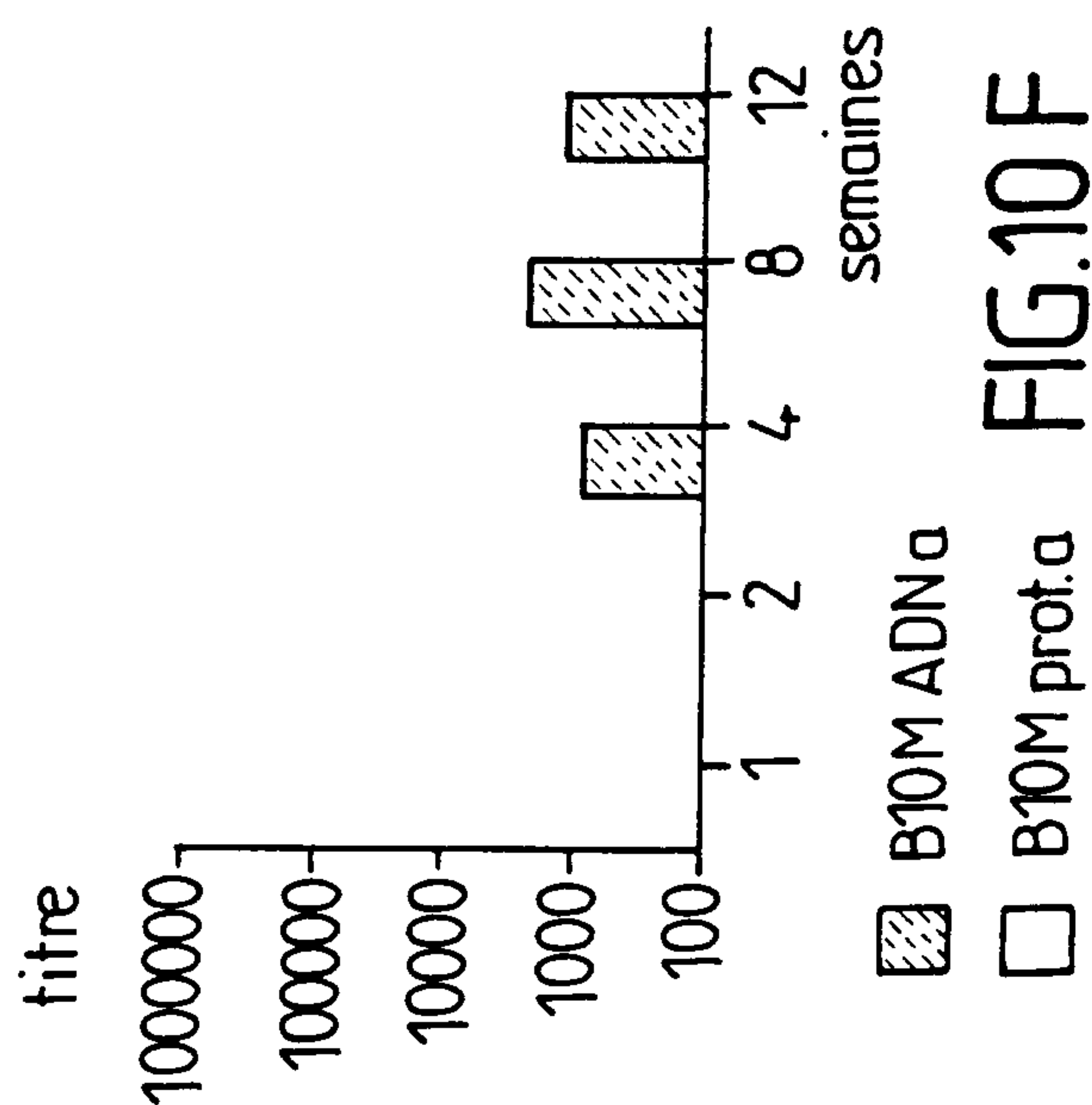
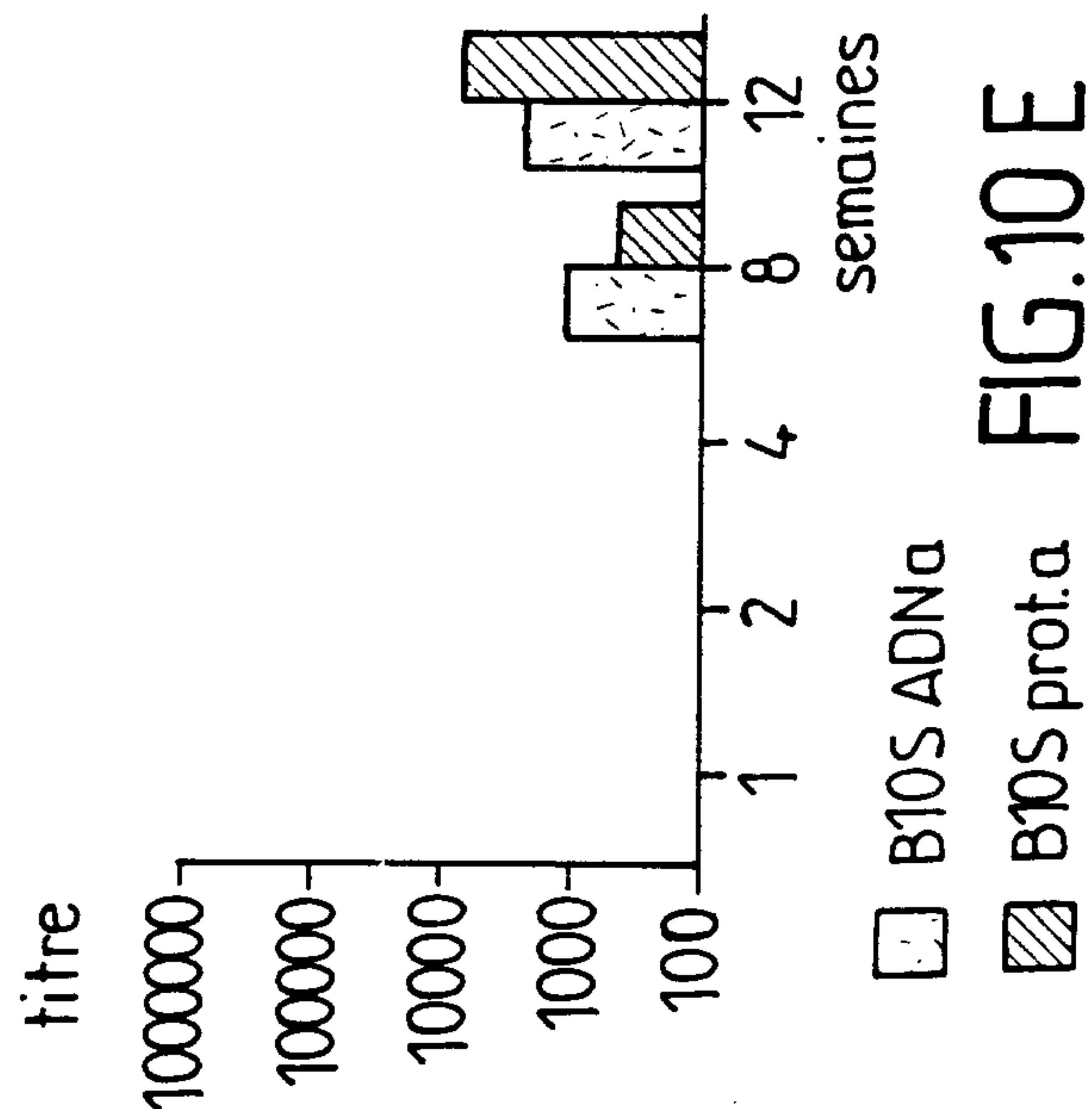
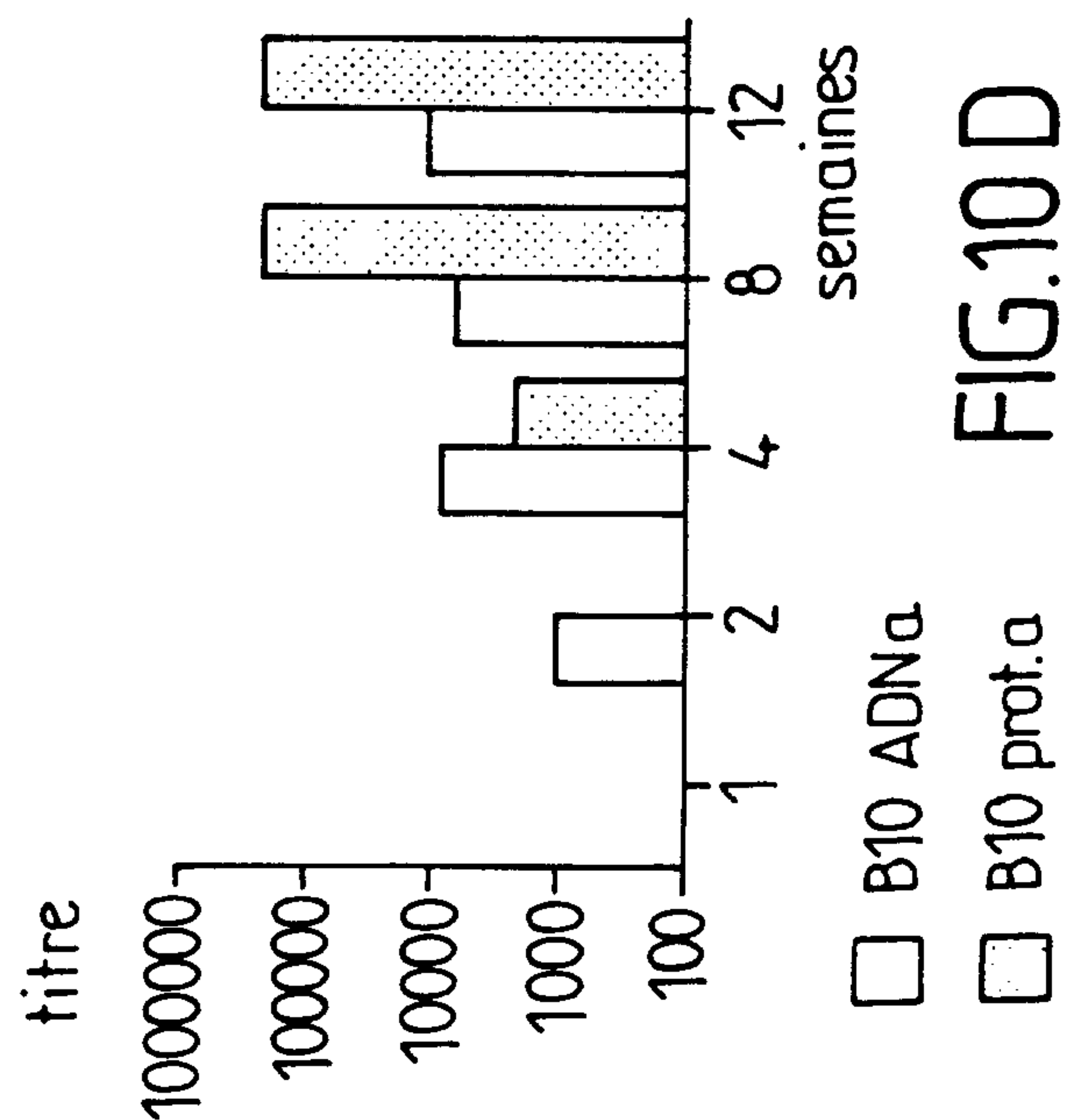
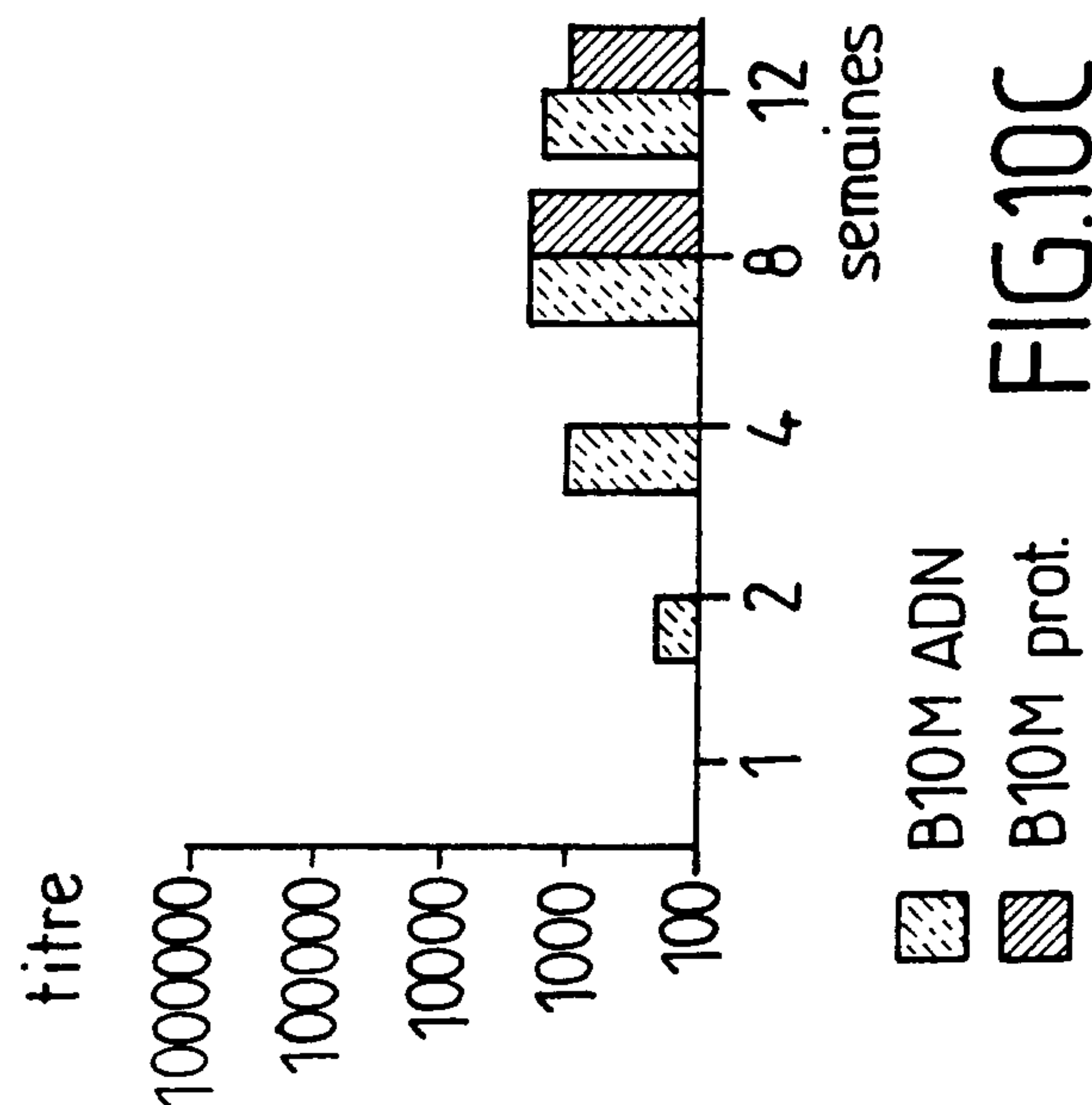
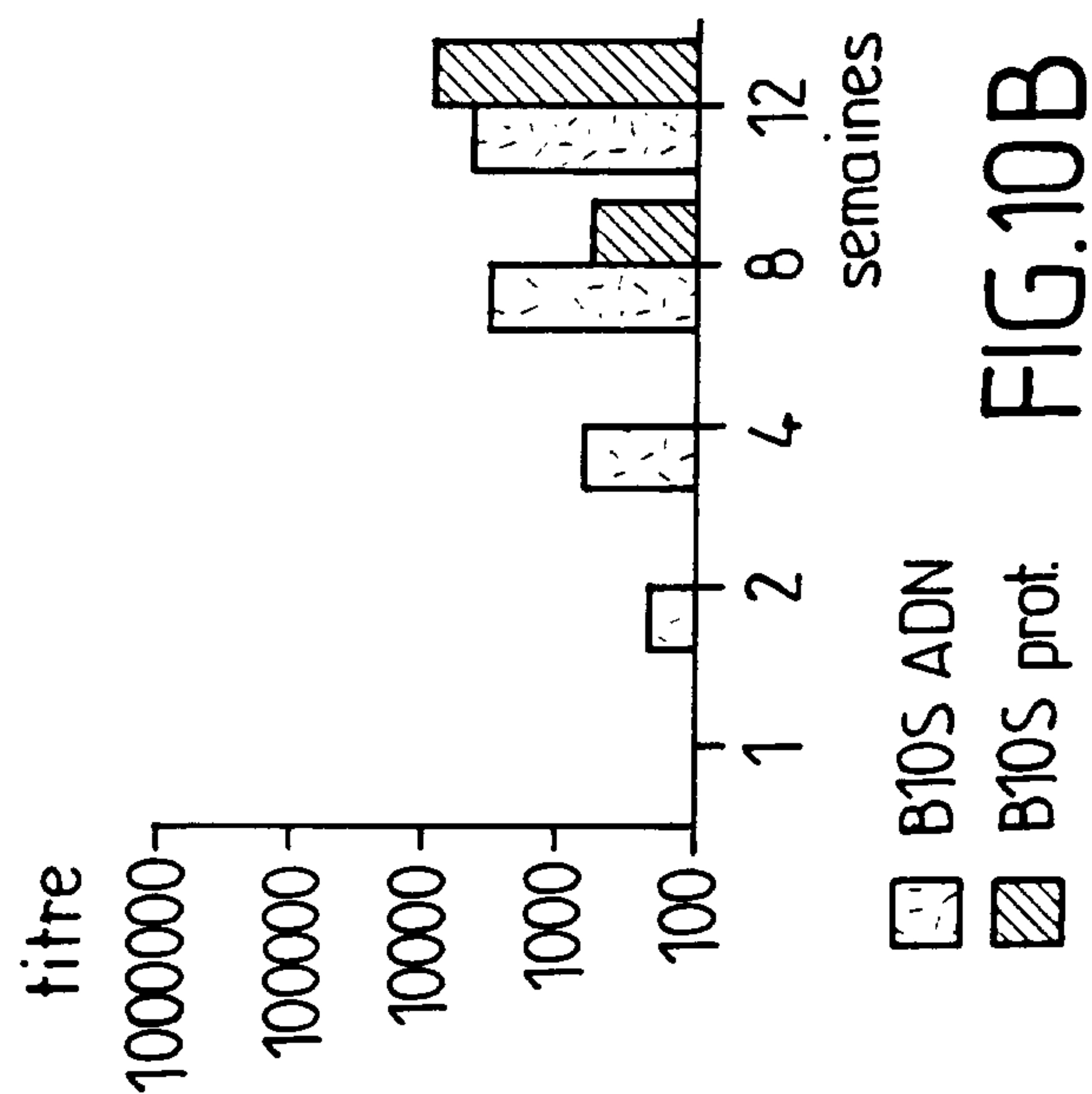
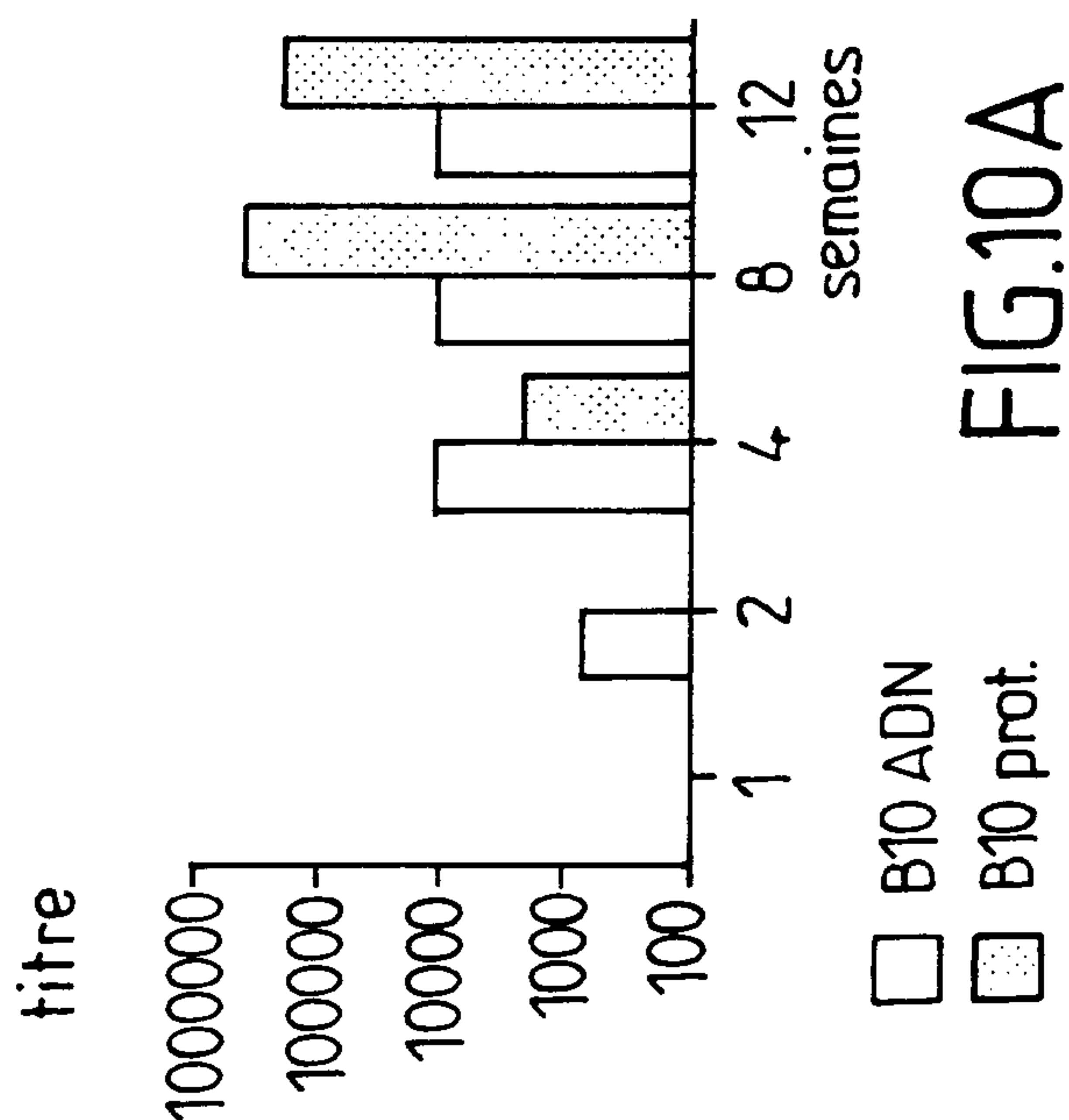


FIG. 9

8/9



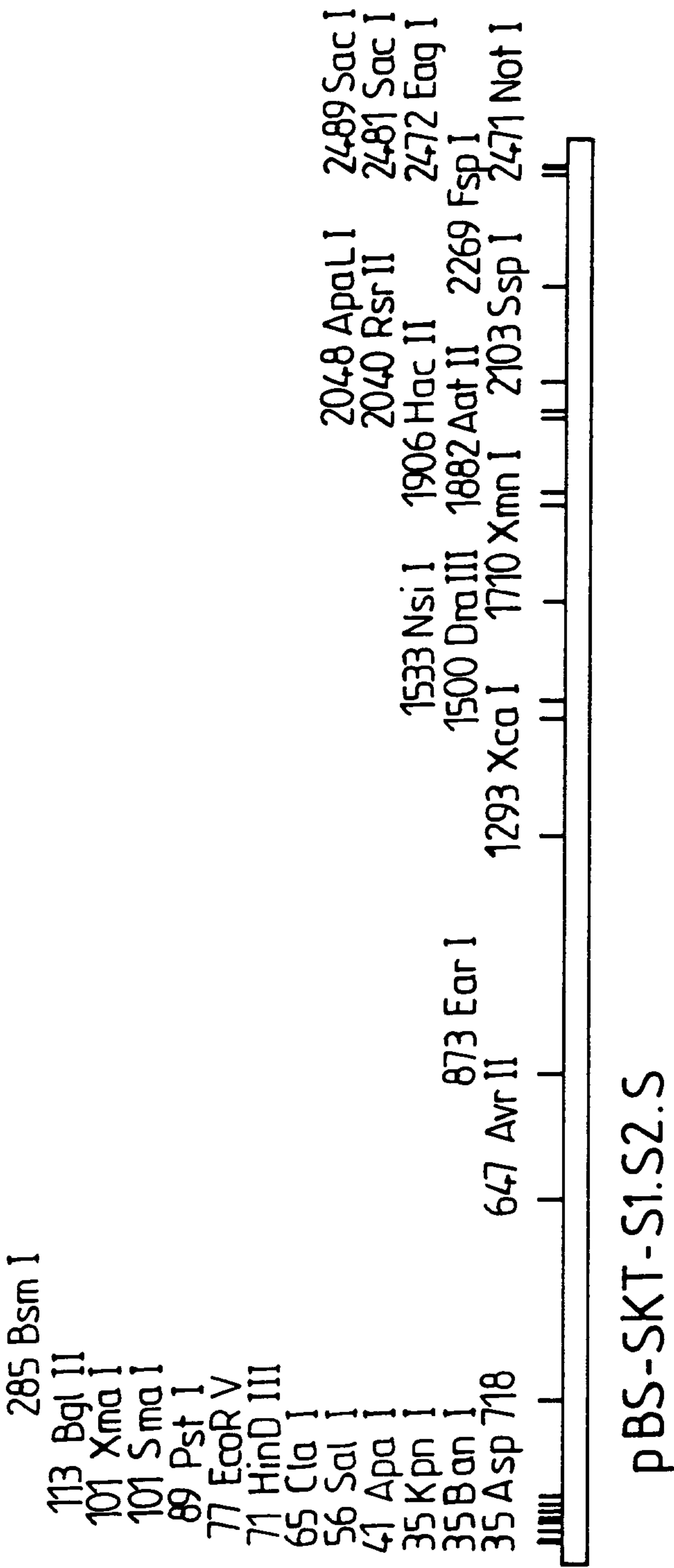


FIG.11

