



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

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 39/21	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/00105 (43) Date de publication internationale: 10 janvier 1991 (10.01.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00456 (22) Date de dépôt international: 22 juin 1990 (22.06.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/08368 23 juin 1989 (23.06.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE MERIEUX [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : PORTETELLE, Da- niel, Georges, Joseph, Ghislain [BE/BE]; 11, rue de la Motte, B-5854 Meux-la-Bruyère (BE). BURNY, Arsène, Léon, Ghislain [BE/BE]; 65, chaussée de Namur, B-5800 Gembloux (BE). VONECHE, Véronique, Josette, Jac- queline, Marie [BE/BE]; 12B14, allée des Marronniers, B-5800 Gembloux (BE).		(74) Mandataires: LEMOINE, Michel etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet euro- péen)*, DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet euro- péen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: VACCINE AGAINST BOVINE LEUKEMIA VIRUS (54) Titre: VACCIN CONTRE LE VIRUS DE LA LEUCEMIE BOVINE (57) Abstract <p>The vaccine against bovine leukemia virus (BLV) contains a peptide fraction, or a recombinant virus which express it, which includes the envelope glycoprotein gp51 of BLV virus and which leads to a high degree of neutralizing antibody formation. The gp51 glycoprotein is associated with a transmembrane glycoprotein or a specific monoclonal antibody of one of the epitopes of gp51, so that the gp51 glycoprotein is restored to its native configuration in which epitopes F, G and H are present, these epitopes being responsible for the biological activity of BLV virus, in a pharmaceutical vehicle or excipient such as those which are used to constitute vaccines.</p> (57) Abrégé <p>Le vaccin contre le virus de la leucémie bovine (BLV), comprend une fraction peptidique, ou un virus recombinant l'exprimant, qui inclut la glycoprotéine d'enveloppe gp51 du virus BLV et qui induit à un degré élevé la formation d'anticorps neutralisants. La glycoprotéine gp51 est associée à une glycoprotéine transmembranaire ou à un anticorps monoclonal spécifique de l'un des épitopes de la gp51, de manière à restituer à la glycoprotéine gp51 sa configuration native où sont présents les épitopes F, G et H responsables de l'activité biologique du virus BLV, dans un véhicule ou excipient pharmaceutique du type de ceux utilisés pour la constitution de vaccins.</p>		

* Voir au verso

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

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	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Fasso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

Vaccin contre le virus de la leucémie bovine.

La présente invention a trait à un vaccin contre le virus de la leucémie bovine (BLV), notamment à un vaccin recombinant ou obtenu par recombinaison.

5 La leucémie bovine ou leucose bovine enzootique est une maladie hautement contagieuse due à un rétrovirus, le virus de la leucémie bovine (BLV). Cette maladie, qui sévit principalement dans les pays de l'Europe de l'Est et en Amérique du Nord et du Sud, touche essentiellement les ovins
10 et les bovins, conduisant à une infection quasi généralisée des troupeaux. Il s'agit d'une maladie dont l'évolution est relativement lente, mais qui, dans de nombreux cas, induit des tumeurs, entraînant la mort de l'animal infecté. Le développement de cette maladie est d'autant plus préoccupant
15 que l'on ne dispose à l'heure actuelle pratiquement d'aucun moyen pour la combattre et pour éviter la propagation du virus. La solution consistait jusqu'ici à isoler les animaux infectés et à les abattre.

Le mouton est l'animal expérimental par excellence pour
20 les études de transmission de la maladie (voir notamment Mammerickx, M. et al. cité ci-après et Mammerickx , M. et

al. dans *Leukemia Research*, 11, 353-358 (1987) dans lequel il est montré que l'injection en quantité minime de lymphocytes provenant d'animaux infectés (926 lymphocytes) provoque l'apparition des symptômes de la maladie chez le mou-
5 ton).

On a cherché depuis de nombreuses années à mettre au point un vaccin qui puisse apporter une certaine protection contre la leucémie bovine.

J. MILLER et M. VAN DER MAATEN ont mentionné dans *Ann. Recherche Vét.*, p. 871 à 877, 9 (1978) la possibilité d'utiliser des glycoprotéines de l'enveloppe du virus BLV inactivé, comme principe actif d'un vaccin.

L.V. PATRASCU et al. ont décrit, dans *Rev. Méd. Virologie*, p. 995 à 1002, 31 (1980), la préparation d'un
15 vaccin dénommé BL-VACC-RO contre le virus de la leucémie bovine, obtenu à partir d'un virus BLV inactivé.

M. MAMMERICKX, D. PORTETELLE, A. BURNY et J. LEUEN rapportent, dans *Zbl. Vet. Med. B27*, p. 291 à 303 (1981), les résultats d'études qui montrent que des anticorps passifs
20 acquis par le colostrum protègent les animaux contre une infection.

M. ONUMA et al. signalent dans *Am. J. Vet. Res.* 45, p. 1212 à 1215 (1984) que les anticorps contre la glycoprotéine d'enveloppe de poids moléculaire 51 000 du virus BLV,
25 désignée par l'abréviation gp51, montrent une activité neutralisante contre le virus BLV. Dans cet article, il est fait état de vaccins réalisés à partir de la glycoprotéine gp51, de la protéine p24 et de cellules de reins d'agneau foetal (FLK) infectées et qui, administrés au mouton, appor-
30 tent une certaine protection.

PARFANOVICH et al. décrivent dans *Br. Vet. J.* 139, p. 137 à 146 (1983) la préparation d'un virus BLV inactivé à l'aide de composés aminométhylés provenant de la réaction entre le formaldéhyde et un amino-acide tel que la leucine
35 ou la lysine.

G. H. THEILEN et al. dans *Current Topics in Veterinary*

Medicine and Animal Science 15, p. 547 à 559 (1982) indiquent avoir vacciné des bovins avec des cellules vivantes provenant d'une lignée cellulaire BL-3, obtenue à partir de moelle osseuse et de thymus d'un cas sporadique de leucose
5 bovine.

E. RISTAU et al. dans Arch. Exper. Vet. Med. Leipzig 41, p. 185 à 196, et p. 323 à 331 (1987) font de leur côté état d'expériences de vaccination utilisant ces cellules
BL-3.

10 KONO et al. dans Jpn. J. Vet. Sci. 48, p. 117 à 125 (1986) rapportent les résultats d'une étude montrant que des anticorps acquis passivement ou après injection de la glycoprotéine d'enveloppe gp51 purifiée protègent d'une surinfection ultérieure, à condition que les taux
15 d'anticorps anti-gp51 soient suffisants avant la surinfection par BLV.

Tous ces vaccins ne confèrent toutefois qu'une protection de très courte durée et aucun n'a reçu une application à grande échelle.

20 Il est connu que, dans certaines conditions, la glycoprotéine gp51 induit des anticorps neutralisants.

C. BRUCK et al. dans Virology 122, 342-352 (1982) ont mis en évidence huit régions antigéniques indépendantes sur la glycoprotéine gp51 par compétition d'anticorps monoclonaux anti-BLV.
25

D. PORTETELLE et al. dans Comm. Eur. Communities (REP) EUR (1984), EUR 8471, Agriculture, 45-51 précisent que trois de ces épitopes, F, G, H, situés sur un fragment apparemment non glycosylé, de poids moléculaire d'environ 15 000,
30 obtenu par digestion par une solution d'urokinase de la glycoprotéine gp51, sont impliqués dans la neutralisation du virus, et envisagent la possibilité de préparer un vaccin anti-BLV par insertion du gène d'enveloppe gp51 ou d'une région correspondant aux sites biologiquement actifs dans un
35 système d'expression autorisant la glycosylation.

D. PORTETELLE et al. dans J. CELL. Biochem. Suppl. 10A

(1986) (abrégé) et dans *Virology*, 169, 27-33 (1989) estiment que les trois épitopes F, G, H peuvent jouer un rôle important dans la conception d'un vaccin de sous-unité anti-BLV. Ces trois épitopes sont sensibles à la présence d'un agent
5 de réduction, sont localisés sur un fragment faiblement glycosylé sur la partie NH₂ terminale de la glycoprotéine et sont les seuls épitopes reconnus sur le virion non dégradé.

Il a été décrit dans la demande de brevet FR-A-87-03881 déposée par le demandeur le 20 mars 1987 des fractions pep-
10 tidiques induisant la formation d'anticorps protecteurs contre le virus de la leucémie bovine (BLV) qui sont caractérisées par le fait qu'elles comportent une séquence peptidique reproduisant tout ou partie de la séquence du fragment de l'enveloppe glycoprotéique gp51 du virus de la
15 leucémie bovine portant au moins l'un des épitopes F, G, H responsables de l'activité biologique du virus.

Enfin, K. OHISHI et al., dans *Vaccine* (1988), 7, 428-432, ont essayé d'exprimer gp51 par le gène env en entier.

S'il est donc connu que, dans certaines conditions, la
20 glycoprotéine gp51 peut induire la formation d'anticorps neutralisants, et si l'on a pu identifier et localiser sur cette glycoprotéine les épitopes responsables de l'activité biologique du virus, il n'a cependant pas été jusqu'ici possible de développer un vaccin qui puisse conférer une bonne
25 protection contre la leucémie bovine sur une longue période. Les difficultés rencontrées dans la mise au point d'un vaccin, résident dans l'immunogénicité insuffisante de la glycoprotéine ou de son fragment qui porte les épitopes F, G, H responsables de l'activité du virus, due à la confi-
30 guration spatiale fragile de ces épitopes.

La présente invention a pour objectif de fournir un vaccin dans lequel la gp51 se retrouve dans sa configuration native où les épitopes F, G, H sont présents et bien exposés, comme à la surface d'une particule virale, permet-
35 tant aux propriétés immunogènes de ces épitopes de pleinement se manifester.

Le vaccin conforme à l'invention comprend une fraction peptidique qui inclut la glycoprotéine d'enveloppe gp51 du virus BLV et qui induit à un degré élevé la formation d'anticorps neutralisants, caractérisé en ce que la
5 glycoprotéine gp51 est associée à une glycoprotéine transmembranaire, de manière à restituer à la glycoprotéine gp51 sa configuration native où sont présents les épitopes F, G et H responsables de l'activité biologique du virus BLV, dans un véhicule ou excipient pharmaceutique du type de
10 ceux utilisés pour la constitution de vaccins.

Ces épitopes sont alors reconnus par les anticorps monoclonaux dirigés contre eux-mêmes sur la particule virale.

La glycoprotéine transmembranaire associée à la
15 glycoprotéine d'enveloppe gp51 est avantageusement constituée par la glycoprotéine gp30 du virus BLV, laquelle interagit avec la glycoprotéine gp51 pour restituer à celle-ci sa configuration native où les épitopes F, G, H sont présents. Ces épitopes retrouvent la configuration
20 native observée à la surface de la particule virale BLV et présentent, alors, une très grande réactivité avec les anticorps monoclonaux dirigés contre eux.

La glycoprotéine transmembranaire gp30 est un polypeptide fortement glycosylé comportant 214 acides aminés et qui
25 est, en particulier, responsable de la bonne fixation des protéines d'enveloppe dans la membrane de la cellule infectée.

Les deux protéines glycosylées gp51 et gp30, de poids moléculaires apparents 51000, respectivement 30000 daltons,
30 sont codées par le gène env du virus. La séquence en acides aminés de la gp30 est typique des protéines transmembranaires de retrovirus : deux régions très hydrophobes dont celle située à l'extrémité -COOH terminale est probablement celle qui traverse la membrane virale. Voir N.R. RICE et
35 al., Virology (1984) 138, 82-93.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on

synthétise les glycoprotéines gp51 et gp30 dans un système d'expression qui exprime ensemble, en une molécule unique, la gp51 et la gp30 et qui peut être, par exemple, un virus recombinant ou une levure.

5 Le molécule comprenant gp51 et gp30 ainsi exprimée comprend un site de clivage naturel.

Toutefois, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, on pourra, selon toute méthode connue, induire une mutation du gène codant pour ladite molécule avant son
10 insertion dans le plasmide, de façon que la molécule contenant gp51 et gp30 soit dépourvue de son site de clivage naturel. Dans ce mode de réalisation, les glycoprotéines gp51 et gp30 resteront donc liées par liaison covalente.

Ceci peut être réalisé par exemple en induisant une
15 mutation de la séquence en acides aminés 268-269 de façon à obtenir Gln-Thr au lieu de Arg-Ser, avec la méthode de Eckstein, pratiquée avec un kit commercial du type Amersham "In vitro Mutagenesis System", code RPN 2322.

Grâce à la technique des virus recombinants, de nom-
20 breux gènes étrangers ont pu être insérés et exprimés.

L'insertion des gènes codant pour la gp51 et la gp30, dans le génome du virus s'effectue par les techniques, maintenant bien connues, de construction de recombinants et qui comportent la série d'étapes suivante :

- 25 - insertion du gène env (gène codant pour la gp51 et la gp30) dans un vecteur plasmidique convenable,
- introduction du plasmide recombinant dans une cellule préalablement infectée par une souche du virus,
- les séquences nucléotidiques étant identiques, une
30 recombinaison in vitro intervient entre les régions homologues du plasmide recombinant et de l'ADN viral ; par cette recombinaison, le gène env se trouve intégré dans le génome du virus dans lequel il est propagé et exprimé.

L'insertion du gène codant pour la gp51, en même temps
35 que du gène codant pour la gp30, dans le génome du virus, peut être, bien entendu, réalisée encore sous des formes

très diverses :

- gène env provenant d'un variant BLV, par exemple dépourvu de l'un ou de deux des trois sites F, G, H,
- insertion d'un morceau seulement du gène codant pour la gp51, par exemple provenant d'un variant BLV,
- insertion d'une séquence nucléotidique pouvant provenir d'un provirus BLV cloné ou bien d'une copie d'ADNc résultant de la transcription inverse de l'ARN viral,
- ou d'un oligonucléotide synthétique codant pour tout ou partie de la gp51.

Parmi les virus utilisables, on peut citer notamment les adénovirus, les herpèsvirus, le virus de la vaccine, le virus Fowlpox, le virus Canarypox et les baculovirus. (Pour un vecteur Fowlpox, voir par exemple J. Taylor et E. Paoletti dans Vaccine (1988), 6, p 466-467 et J. Taylor et al. dans Vaccine (1988), 6, p 497-503).

Les virus recombinants peuvent être utilisés tels quels comme agents vaccinaux contre la leucémie bovine ou pourront être utilisés pour infecter une culture cellulaire et produire in vitro la fraction peptidique, que l'on récupérera et que l'on utilisera comme agent vaccinant.

Bien entendu, dans le cas de vaccins comprenant des virus recombinants, le virus recombinant peut avantageusement exprimer une molécule unique, comprenant gp51 et gp30, dépourvue ou non de site de clivage.

Les vaccins ainsi préparés peuvent être administrés par des voies variées ; en particulier, on peut procéder par voie intradermique, sous-cutanée ou intramusculaire. Ils peuvent être administrés avec des supports pharmaceutiques connus et comporter, en outre, des adjuvants.

Pour la préparation de vaccins, si les virus recombinants constituent un moyen particulièrement commode pour que soient exprimées ensemble la gp51 et la gp30, de nombreux autres systèmes d'expression peuvent être également utilisés tels que les levures, notamment la levure S. cerevisiae.

La présente invention s'étend donc aussi, d'une façon générale, à tout vaccin comprenant un système d'expression qui permet d'exprimer ensemble la gp51 et la gp30.

On peut également obtenir des préparations vaccinales selon l'invention à base de liposomes dans lesquels la fraction gp51 et gp30 serait insérée dans les couches lipidiques.

Les glycoprotéines gp51 et gp30 peuvent être également insérées dans des préparations type ISCOM ("Immunostimulating complex") telles que celles qui ont été décrites par B. MOREIN et al. dans Immunology Today, Vol. 8, n° 11, p. 333 à 338 (1987).

Les glycoprotéines gp51 et gp30 peuvent être encore insérées dans des polyélectrolytes (copolymère d'acide acrylique et de N-vinylpyrrolidone), servant notamment d'adjuvant à gp51 et gp30 (voir Petrov et al., Immunology Letters (1986), 12, 237-242).

L'invention concerne encore des vaccins contre la leucémie bovine obtenus à partir de ces préparations ISCOM ou de ces polyélectrolytes.

Les inventeurs ont constaté que l'on pouvait également, dans une certaine mesure, redonner à la gp51 sa configuration native, en fixant sur cette glycoprotéine un anticorps monoclonal spécifique de l'un des épitopes.

Une variante de réalisation de l'invention consisterait donc en un vaccin contre le virus de la leucémie bovine (BLV) comprenant une fraction peptidique comportant la glycoprotéine d'enveloppe gp51 du virus BLV et induisant à un degré élevé la formation d'anticorps neutralisants, caractérisé en ce que la glycoprotéine gp51 est associée à un anticorps monoclonal spécifique de l'un des épitopes de la gp51, de manière à restituer à la glycoprotéine gp51 sa configuration native où sont présents les épitopes F, G et H responsables de l'activité biologique du virus BLV, dans un véhicule ou excipient pharmaceutique du type de ceux utilisés pour la constitution de vaccins.

L'anticorps monoclonal que l'on fixe à la gp51 est avantageusement constitué par l'anticorps monoclonal dirigé contre le site E ou contre le site A.

Une variante de réalisation de l'invention consisterait donc à fixer sur la glycoprotéine gp51 un anticorps monoclonal dirigé contre le site E ou contre le site A.

L'anticorps monoclonal dirigé contre le site E ou contre le site A interagit avec la gp51, à la manière de la gp30, restituant à la gp51 sa configuration native.

La gp51 sur laquelle on a fixé un anticorps monoclonal dirigé contre les épitopes E ou A, est reconnue par les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes F, G, H.

La gp51 et l'anticorps monoclonal dirigé contre le site E ou A peuvent être exprimés dans un système d'expression.

Un tel système d'expression peut être constitué par un virus recombinant dans lequel on a inséré le gène codant pour la gp51 et des gènes codant pour l'anticorps monoclonal dirigé contre le site E ou le site A.

On peut aussi envisager d'insérer dans des préparations type "ISCOM" l'anticorps monoclonal dirigé contre le site E ou le site A et qui capte, ensuite, l'antigène gp51 à sa surface.

L'invention s'étendrait, également, aux vaccins obtenus à partir d'un, ou contenant un virus recombinant exprimant la gp51 liée à son anticorps monoclonal E ou A, ou encore réalisés à partir des préparations type ISCOM dans lesquelles est inséré l'anticorps monoclonal qui captera, ensuite, la gp51.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de l'exemple de mise en oeuvre de l'invention donné, ci-après, à titre non limitatif.

Sur les figures annexées :

- la figure 1 représente la courbe de titration des anticorps gp51 de lapins qui ont reçu des virus recombinants qui expriment d'une part la gp51 seule, et d'autre part la gp51 et la gp30 ensemble;

- les figures 2, 3 et 4 représentent les courbes de compétition des anticorps anti-gp51 de lapins qui ont reçu des virus recombinants qui expriment d'une part la gp51 et d'autre part la gp51 et la gp30 ensemble, avec respectivement les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes F, G et H liés à l'enzyme peroxydase.

EXEMPLE

On dispose notamment :

- d'un recombinant vaccine exprimant la gp51 seule : VP391;
- 10 - de recombinants vaccine exprimant la gp51 et la gp30 : VP392 et VP459;
- d'un recombinant vaccine exprimant la gp51 et la gp30, en l'absence du site de clivage naturel entre ces deux glycoprotéines : VP482 ; et
- 15 - d'un recombinant obtenu à partir du plasmide pGS20 et exprimant la gp51 et la gp30 : VV-ENV1 (voir construction ci-après).

CONSTRUCTION DU RECOMBINANT OBTENU A PARTIR DU PLASMIDE pGS20 (gp51 + gp30)

20 a) Obtention d'une banque d'ADNc dans λ gt10

Les ARNs totaux ont été extraits de cellules de poumon de chauve-souris produisant de façon chronique du virus BLV. Les ARNs poly A+ ont été sélectionnés sur une colonne d'oligo-dT-cellulose afin d'être copiés en ADNc bicaténaires et liés au site EcoRI de l'ADN du phage λ gt10.

25 b) Recherche d'ADNc correspondant à l'ARN messager de l'enveloppe

Des bactéries C600 HFL sont infectées par les bactériophages de la banque d'ADNc et étalées sur boîtes de Petri. Chaque phage recombinant produit une plage de lyse. Une empreinte de la boîte de Petri est réalisée sur un filtre de nitrocellulose. Après dénaturation et neutralisation, l'ADN fixé sur le filtre est hybridé avec une sonde "BLV provirale" marquée au ³²P par la technique de "déplacements de coupures" (Nick-translation). Le filtre est ensuite autoradiographié.

La sonde "BLV provirale" permet de repérer les clones renfermant de l'ADNc du BLV. Les phages contenant une information provirale sont ensuite purifiés, digérés par l'enzyme de restriction EcoRI ; les fragments sont séparés par électrophorèse, transférés sur filtre en nitrocellulose, selon la méthode de "Southern".

L'hybridation moléculaire réalisée avec une sonde spécifique de la région env du virus BLV et une analyse par enzymes de restriction permettent de repérer et purifier les phages recombinants porteurs de l'information complète pour le gène env.

c) Clonage dans le plasmide pGS20

Le plasmide pGS20 a été décrit dans Mackett et al. J. of Virology (1984) 49, 857-863. Il est constitué d'une partie du plasmide pBR328 et du gène de la thymidine kinase du virus de la vaccine (gène TK). Le promoteur 7,5 K de ce Poxvirus, suivi de deux sites de clonage, est inséré dans le gène TK.

Pour obtenir l'insert de 2,3 kb contenant la phase de lecture des 2 glycoprotéines, l'ADN d'un phage recombinant intéressant est digéré par l'endonucléase de restriction Xho I. Les produits de la digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Le fragment de 2,3 kb est récupéré par électrophorèse et ses extrémités 5' en saillie sont rendues franches par un traitement par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I.

Le vecteur pGS20 est linéarisé par l'endonucléase de restriction Sma I et traité à la phosphatase alcaline.

L'insert "ENV" de 2,3 kb est lié au site Sma I du plasmide pGS20. Des bactéries E. coli (souche MM294) rendues compétentes sont transformées. La sélection des bactéries transformées est réalisée sur ampicilline.

Un clone renfermant l'insert, dans le sens 5'-3' derrière le promoteur P7,5K, est choisi. Le sens de l'insert est vérifié par la double digestion Eco RI-Pvu II.

On obtient le plasmide pGS20-ENV. La suite des

opérations est résumée avantageusement dans le schéma I ci-joint.

d) Infection de cellules CV1 par le virus de la vaccine sauvage et transfection avec le plasmide recombinant pGS20-
5 ENV.

Des cellules CV1 (fibroblastes de singe) sont cultivées en couche monocellulaire. D'autre part, des particules de virus de la vaccine sauvage sont produites sur cellules confluentes.

10 Les fibroblastes sont infectés, à raison d'une particule virale par cellule. Le plasmide recombinant pGS20-ENV est précipité en présence de phosphate de calcium sur les fibroblastes infectés. Après 48 heures de culture, le virus est libéré des cellules par une alternance gel-dégel.

15 e) Sélection et purification d'un virus recombinant de la vaccine contenant le gène env.

Des cellules confluentes dépourvues de l'activité thymidine kinase (TK^-) sont infectées par le virus obtenu après transfection. Après 48 heures d'infection, les cellules sont
20 recouvertes de gélose contenant de la bromodésoxyuridine. Le phénotype TK^+ est létal en présence de bromodésoxyuridine. Seules des plages constituées par du virus TK^- (ayant inséré un gène étranger lors de la recombinaison homologue à l'étape de transfection) se forment.

25 Après 2 ou 3 jours, les plages de lyse sont visualisées après coloration des cellules vivantes au rouge neutre. Le virus correspondant aux plages observées est prélevé, multiplié ; l'ADN des clones isolés est extrait et hybridé à la sonde "ENV".

30 Seuls le ou les clones hybridant à la sonde "ENV" sont conservés pour les clonages ultérieurs et les tests d'expression de gp51 et de gp30.

Nous avons ainsi sélectionné le virus recombinant VV-ENV1 exprimant à la fois gp51 et gp30.

35 PREPARATION ET CARACTERISATION DES ANTICORPS MONO-CLONAUX DIRIGES CONTRE LES EPITOPES DE LA GP51

Immunisation des souris

On a injecté à des souris Balb/c par voie sous-cutanée et intrapéritonéale 50 μ g de gp51 en présence d'adjuvant complet de Freund. Cette injection a été répétée 2 semaines après en présence d'adjuvant incomplet de Freund, puis 4 semaines après sans adjuvant. On a procédé, deux mois après, à une dernière injection par voie intrapéritonéale et par voie intraveineuse.

Fusion des cellules

10 On a préparé les hybrides par fusion de cellules de myélome de souris avec les splénocytes des souris immunisées selon la technique décrite par HERZENBERG L.A. et al. dans Handbook of Experimental Immunology (D. WEIR, ed.) 25.1-25 (Blackwell, London).

15 Les hybrides obtenus ont été répartis en plaques de 96 puits et sélectionnés sur milieu HAT en présence de thymocytes et de macrophages de souris. Les hybrides producteurs d'anticorps anti-gp51 ont été détectés à l'aide d'un radio-immuno-essai en phase liquide avec l'antigène gp51 marqué à l'iode 125 ou à l'aide d'un radio-immuno-essai en phase solide avec du virus BLV adsorbé dans les puits des microplaques. Dans ce dernier cas, les anticorps spécifiques adsorbés sur le virus ont été détectés avec une anti-immunoglobuline de souris marquée à l'iode 125. Après 20 lavage, la radioactivité adsorbée sur les complexes spécifiques est révélée par autoradiographie.

Les clones producteurs sélectionnés ont été transférés sur des plaques de 24 puits et sous-clonés en milieu semi-solide d'agarose.

30 Les cellules hybrides obtenues ont été injectées dans la cavité intrapéritonéale de souris préalablement traitées au pristane. Après 10 à 15 jours, on a récolté les ascites qui contenaient des quantités importantes des anticorps monoclonaux recherchés.

35 Purification et caractérisation des anticorps monoclonaux

On a purifié ces anticorps monoclonaux par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Affigel Blue selon la méthode décrite par Bruck et al. dans J. Immunological Methods 53, 313-319 (1982).

5 Ces anticorps monoclonaux ont été marqués par l'iode 125 par le procédé à la chloramine T décrit par GREENWOOD F.C. et al. dans Biochemical Journal, 89, 114-123 (1963).

La spécificité des différents anticorps monoclonaux obtenus pour des épitopes donnés a été déterminée par des
10 essais de compétition entre les anticorps pour de l'antigène gp51 adsorbé dans les puits des plaques de microtitration.

A cet effet, un microgramme d'anticorps monoclonal purifié non marqué radioactivement est incubé, pendant une nuit à 4°C, dans un volume de 50 µl dans les puits d'une
15 plaque de microtitration en matière plastique contenant la gp51 adsorbée (50 ng).

De l'anticorps marqué radioactivement à l'iode 125 (10 ng-100.000 cpm) est alors ajouté et l'incubation se poursuit 6 heures de plus à 4°C.

20 Les microplaques sont alors lavées intensivement et la radioactivité accrochée à la matière plastique de chaque puits est mesurée dans un compteur de type δ .

On interprète les résultats en sachant que, si deux sites antigéniques sont très proches ou identiques, la
25 liaison de l'un des anticorps (non marqué) à son épitope, va gêner ou empêcher la liaison du second anticorps (marqué) à son épitope.

Les essais de compétition entre les anticorps monoclonaux purifiés permettent de définir sur la molécule de
30 gp51 huit sites antigéniques indépendants désignés par les lettres A, B, C, D, E, F, G, H.

CARACTERISATION DES RECOMBINANTS A L'AIDE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La mise en évidence des épitopes F, G, H à la surface
35 des cellules infectées par les recombinants est effectuée par l'une ou l'autre des deux méthodes suivantes :

1. IMMUNOFLUORESCENCE

Des cellules sensibles (cellules VERO) sont ensemencées dans des tubes de Leighton. Après croissance, elles sont infectées dans un ordre de multiplicité de 5 à l'aide des différents recombinants VP391, VP392, VV-ENV1 et de VTK79 (vaccine sauvage). Après 20 heures d'infection, les lames sont récupérées et incubées avec chacun des anticorps monoclonaux anti-gp51, dirigés respectivement contre les sites définis A, B, B', C, D, D', E, F, G et H.

10 Après 1 heure d'incubation, les lames sont lavées plusieurs fois avec du tampon isotonique PBS, puis incubées avec le conjugué anticorps anti-immunoglobulines murines marquées à la fluorescéine.

Après 1 heure d'incubation, les cellules sont lavées, 15 puis les lames sont montées pour être examinées avec un microscope avec lampe U.V., à l'aide de l'objectif à immersion.

Les résultats sont interprétés comme négatifs (-) si aucune fluorescence n'est observée. Une fluorescence est 20 signalée par +/- (lorsque le cas est douteux) ou par + ou +++ (lorsqu'ils sont positifs) selon l'intensité observée.

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le Tableau I.

On note une très bonne immunofluorescence sur les sites 25 F, G, H sur le recombinant VV-ENV1.

On note que l'on obtient une très bonne immunofluorescence pour les sites F et H sur le recombinant VP392 alors que le recombinant VP391 présente une immunofluorescence très faible pour ces mêmes épitopes. L'immunofluorescence 30 sur VP391 et VP392 est d'intensité égale pour tous les sites A, B, B', D, D', E.

On observe l'absence du site G sur les recombinants VP391 et VP392. L'absence de cet épitope s'explique par le fait que le clone T 15-2 à partir duquel le gène codant pour 35 la gp51 a été introduit dans le virus est un variant G-, non reconnu par l'anticorps monoclonal MONO G.

Ces résultats montrent donc que, pour présenter au système immunitaire des animaux un antigène gp51 à l'aide d'un virus recombinant, il importe que la gp30 soit associée à la gp51, de façon à avoir un antigène gp51 possédant la configuration native observée sur une particule virale BLV, où les sites F, G, H sont les mieux exposés.

2. TEST ELISA

Le test permet de mettre en évidence la présence des sites A, B, B', C, D, D', E, F, G et H définis par les anticorps monoclonaux sur la gp51.

Un extrait cellulaire ou de surnageants de culture de cellules infectées par un virus recombinant ou bien par le virus BLV est pris en sandwich entre l'anticorps monoclonal capteur anti E et un anticorps monoclonal de révélation conjugué à la peroxydase. La présence finale d'une coloration est le signe de la présence du site antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal de révélation.

Cette technique montre bien, par exemple, que le site G est absent sur les préparations VP391 et VP392 obtenues avec le variant provirus BLV T15-2 ; mais qu'il est, par contre, présent lorsque le recombinant est obtenu en insérant l'information codant pour la gp51 et la gp30 à partir de l'ADNc copié sur l'ARN viral du virus BLV produit par les cellules de chauve-souris BL.

25 ADAPTATION DES RECOMBINANTS VACCINE SUR CELLULES OVINES

On a mené une expérience d'adaptation du recombinant VP392 (gp51 + gp30), par passages répétés sur une lignée cellulaire d'origine OVK (ovine kidney cells).

L'expérience a été conduite du 17 avril 1987 au 21 juin 1987 en subcultivant deux fois par semaine les cellules OVK et les cellules VERO (utilisées comme contrôle), en boîtes de Roux 25 cm². Arrivées à confluence, les cellules étaient lavées et infectées avec VP392 provenant de l'infection du passage antérieur (55 µl prélevées du ml de suspension virale provenant de la boîte de Roux 25 cm²). Par boîte de Roux 25 cm², on dénombre à confluence 3 x 10⁶ cellules OVK

contre 9×10^6 cellules VERO.

Les différentes suspensions virales ont été conservées à -20°C . On a déterminé leur titre en virus par titration en boîtes de 24 puits, selon la méthode des dilutions limites (quatre répétitions par dilution, table de calcul de DL 50 selon Read-Muench). Lors des titrations, le recombinant a été, à chaque fois, testé sur cellules VERO et sur cellules OVK.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau II. Les titres en virus (DL50) rapportés ont été obtenus après respectivement 30 jours (16/5), 35 jours (21/5), 45 jours (1/6) et 60 jours (15/6) d'adaptation sur cellules OVK.

Ces résultats montrent que les titres observés sur OVK sont plus faibles que ceux obtenus sur VERO. Cette différence s'explique par le fait que la quantité de cellules OVK mise en oeuvre est trois fois moindre par boîte de Roux 25cm².

On note que, si le virus recombinant VP392 se réplique un peu moins bien sur cellules OVK que sur cellules VERO, sa répllication sur cellules OVK reste, néanmoins, bonne.

IMMUNISATION DE LAPINS A L'AIDE DE RECOMBINANTS VACCINE

Plusieurs lapins ont été immunisés à l'aide de suspensions de recombinants vaccine, soit par voie intradermique (ID) seule, soit par voie intraveineuse (IV) (50 % de la dose) et par voie intradermique (50 % de la dose). Les doses de virus infectieux par immunisation étaient de l'ordre de 10^7 pfu/ml. Un rappel a été effectué dans les mêmes conditions six semaines après le premier traitement.

Des prélèvements de sérum sanguin ont été effectués à plusieurs moments. Plusieurs tests ont été effectués sur ces sérums.

1. TEST ELISA

Ce test, utilisé pour la détection des anticorps dans le sérum sanguin, a été réalisé dans les conditions suivantes:

- fixation de 100 ng d'anticorps monoclonal MONO E purifié sur les parois des puits d'une plaque de microtitration ; incubation pendant 16 heures à 4°C;

5 - après lavage et saturation avec une protéine inerte, la sérumalbumine bovine, introduction (en présence de la protéine inerte) d'une préparation de protéines virales traitée au détergent Tween 80 2 % (la préparation et le sur-nageant de culture des cellules FLK productrices de façon chronique du virus BLV);

10 - après incubation de 48 heures minimum à 4°C et lavages, introduction dans les puits de 200 µl des dilutions progressives d'antisérum à tester (8 dilutions de 3 en 3 à partir de la dilution 20) ; incubation pendant 16 heures à 4°C;

15 - après lavage, addition de 100 µl par puits de tampon contenant 200 ng de fragment Fab d'immunoglobulines de chèvre purifiés par chromatographie d'affinité, dirigés spécifiquement contre les immunoglobulines de lapin et couplés à l'enzyme peroxydase ; incubation pendant 1 heure à
20 4°C;

- après lavage, révélation de l'activité enzymatique associée aux parois, à l'aide de substrat H_2O_2 + tétraméthylbenzidine;

25 - après 20 mn, arrêt de la réaction avec H_2SO_4 2 N et lecture des densités optiques D.O. à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques de titration.

2. TEST ELISA DE COMPETITION

Le test permet de déterminer la présence d'anticorps de lapins entrant en compétition avec les anticorps monoclonaux
30 conjugués à la peroxydase.

Le test a été réalisé dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites à propos du test ELISA, avec cette différence que l'enzyme peroxydase est couplée avec des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre les
35 épitopes A à H de la gp51.

A cette fin, on additionne, par puits, 100 µl de tampon

contenant 200 ng d'anticorps purifiés par chromatographie d'affinité et dirigés spécifiquement contre les sites antigéniques A, B, B'.....F, G, H.

3. TEST D'INHIBITION DES PSEUDOTYPES VSV/BLV

5 Ce test, décrit par ZAVADA J. et al. dans J. Natl. Cancer Inst., p. 95 à 101 (1979), a été utilisé afin de déterminer la capacité qu'ont les sérums de lapins auxquels ont été injectés des recombinants, de neutraliser l'activité biologique du virus BLV.

10 Le test d'inhibition de pseudotypes est basé sur des observations de J. ZAVADA et al. montrant que l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) de cellules chroniquement infectées par le virus BLV fournit des particules virales dont le génome est constitué de celui du virus
15 VSV et dont l'enveloppe est celle du virus BLV (pseudotype).

Ces pseudotypes VSV/BLV possèdent les propriétés spécifiques liées à la glycoprotéine d'enveloppe gp51 du virus BLV comme la neutralisation et la spécificité d'hôte. Le génome VSV inclus dans ces pseudotypes rend les parti-
20 cules capables de former rapidement (24-36 heures) des plages de lyse sur les cellules de singe qu'on a infectées par ces pseudotypes.

Brièvement, pour la neutralisation des pseudotypes avec les sérums à tester, on mélange 1 ml d'une préparation de
25 pseudotypes pouvant former 200 plages de lyse sur les cellules à tester (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et d'autres dilutions intermédiaires). Ces sérums ont été préalablement inactivés à la chaleur (56°C) pendant 30 minutes.

Après une heure d'incubation à 20°C, on inocule 0,5 ml
30 de chaque mélange sur un tapis de cellules de singe se trouvant dans une boîte de Petri. Après 90 mn d'incubation, l'inoculum est enlevé par lavage avec du tampon isotonique stérile et les cellules sont recouvertes d'une couche d'agar.

35 Après 24-36 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont colorées au rouge neutre et les plages de lyse

résiduelles sont comptées.

Le titre en anticorps neutralisants contre le virus BLV est obtenu en déterminant la dilution de sérum avec laquelle on n'obtient seulement que 50 % des plages de lyse obtenues en l'absence de sérum à tester.

4. TEST D'INHIBITION DE SYNCYTIA

Ce test repose sur la constatation faite que des anticorps neutralisants peuvent empêcher la fusion des membranes cellulaires, mais non des membranes nucléaires, entre cellules ayant reçu BLV par injection et cellules indicatrices de chat CC81 (le test a été utilisé pour caractériser les anticorps monoclonaux par BRUCK et al. dans Virology (1982) 122 p. 353-362). Les résultats représentent la dilution maximale de sérum pour laquelle on observe une diminution de 50 % du nombre de syncytia.

Brièvement, pour obtenir l'inhibition des syncytia avec les sérums à tester, on incube dans les puits d'une plaque de microtitration les dilutions de sérum (2, 4, 8, 16 ...) avec les cellules FLK productrices de virus BLV. Ces sérums ont été préalablement inactivés à la chaleur (56°C) pendant 30 minutes.

Après trois heures d'incubation à 37°C, le milieu de culture est enlevé et les noyaux de cellules adhérentes sont colorés à l'aide du réactif de Giemsa.

Les cellules contenant plus de 5 noyaux sont considérées comme syncytia. Les dilutions de sérum neutralisant au moins à 50 % la formation de syncytia sont considérées comme positives.

5. RESULTATS

Dans le Tableau III, on a rassemblé les résultats, de ces 4 tests, obtenus avec VP391, VP392, VV-ENV1, VP459 (gp51 + gp30) et VP482.

On a représenté sur la figure 1 des courbes de titration des anticorps anti-gp51, obtenues par la méthode ELISA précédemment décrite. On a porté en abscisses les dilutions du sérum et en ordonnées la densité optique D.O. mesurée à

460 nm.

Les courbes référencées 4-4 et 5-5 sont les courbes obtenues avec les lapins qui ont reçu le virus recombinant VP391 (gp51 seule) - lapins n° 4 et 5.

5 Les courbes référencées 7-7, 8-8 et 10-10 sont les courbes obtenues avec les lapins qui ont reçu le virus recombinant VP392 (gp51 et gp30)-lapins n° 7, 8 et 10.

La courbe référencée 11-11 est la courbe obtenue avec un lapin qui a reçu la gp51 purifiée dans l'adjuvant complet
10 de Freund (ACF) - lapin n° 2670.

La courbe référencée 12-12 est la courbe obtenue avec un lapin normal.

Sur les figures 2, 3 et 4, on a représenté les courbes de compétition des anticorps anti-gp51 de lapin respective-
15 ment avec les anticorps monoclonaux F, G et H couplés à la peroxydase.

L'ensemble des résultats obtenus montre donc que, lorsque l'on administre à un lapin le virus recombinant qui exprime la gp51 et la gp30 (VP392, VP459, VP482, VV-ENV1),
20 les anticorps formés

- présentent une activité neutralisante ; les anticorps du lapin n° 10 ont même un pouvoir neutralisant supérieur à celui des anticorps de lapin n° 2670 ayant reçu la gp51 purifiée ;

25 - entrent très bien en compétition avec les anticorps monoclonaux dirigés contre les sites biologiques F, G, H.

On constate, par contre, qu'aucune compétition avec les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes F, G, H n'est apparente avec les anticorps des lapins 4 et 5 qui ont
30 reçu le recombinant qui exprime la gp51 seule (VP391).

De plus, aucune activité neutralisante et protectrice des anticorps de ces lapins n'a pu être mise en évidence.

Il apparaît dans le tableau III que seules les associations gp51 et gp30 sont capables d'induire les hauts taux
35 d'anticorps neutralisants dans les deux tests pratiqués. Les tests de compétition ELISA montrent que ces associations ont

conservé les sites biologiques F, G, H décrits précédemment et impliqués dans la neutralisation du BLV.

IMMUNISATION DE MOUTONS A L'AIDE DE RECOMBINANTS

Un lot de moutons a été vacciné à l'aide des virus recombinaux VP459, VP482 ainsi que la vaccine sauvage VP452. Ces moutons ont reçu deux fois par injection des recombinaux avant d'être surinfectés par BLV à l'aide des cellules sanguines infectées provenant d'un animal leucémique.

10 Les moutons sont des moutons d'un an maximum dont le statut sérologique a été vérifié négatif pour le BLV. Les moutons 44 et 99 servent ici de contrôle à l'expérience de surinfection BLV.

15 Les recombinaux de la vaccine ont été inoculés lors de la première injection par voie intradermique (ID) et par voie sous-cutanée (SC) lors de la deuxième injection. Chaque mouton a reçu à chaque fois 2 doses de 10^8 recombinaux vaccine le long de la colonne vertébrale.

20 L'intervalle de temps entre les injections de recombinaux et la surinfection par BLV est chaque fois de 6 semaines.

On a réalisé la surinfection à l'aide de sang entier d'un animal bovin (31700 globules blancs par mm^3 dont 86 % de lymphocytes). Le sang, d'abord recueilli sur EDTA, a été dilué 10 fois en citrate ; 0,5 ml de cette solution, soit l'équivalent de $50 \mu\text{l}$ de sang entier, a été injecté en 4 points intradermiques. Le virus BLV produit à partir des cellules sanguines mises en culture "short-term" s'est avéré être un variant G^- , tous les autres sites étant conservés.

30 On a effectué des prises de sang toutes les semaines, parfois même à une fréquence plus grande, par exemple dans les jours suivant une inoculation du virus recombinant. On a réalisé des comptages de globules blancs et des formules sanguines. On a recueilli à chaque fois du sérum qui a été conservé à -20°C .

La recherche des anticorps anti-gp51 a été effectuée

par des tests ELISA. Ces tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites ; toutefois, dans la recherche des anticorps, les anti-immunoglobulines bovines ou ovines ont été couplées à l'enzyme β -galactosidase. Dans le test ELISA de compétition, utilisé également pour la recherche des anticorps, la compétition a lieu avec l'anticorps monoclonal contre l'épitope G, couplé à l'enzyme peroxydase.

Du sang a été prélevé sur EDTA deux à trois mois après la surinfection par les cellules infectées par le virus BLV. Les lymphocytes ont été recueillis par lyse différentielle et placés en culture in vitro pour une période de 96 heures. Le surnageant de culture a été dès lors recueilli et la présence des protéines virales gp51 et p24 a été recherchée par test ELISA.

Les moutons ont été suivis après la surinfection par BLV pendant une période de 6 mois après celle-ci pour la détection d'anticorps anti p24, signe de l'infection par le virus BLV, les animaux n'ayant vu avant la surinfection que les protéines gp51 et gp30.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV.

Ces résultats montrent :

- que des anticorps anti gp51 ont été détectés à haut titre chez les moutons ayant reçu les recombinants VP459 et VP482.

Ces anticorps ont été détectés dans un test de compétition avec l'anticorps monoclonal G couplé à la peroxydase. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans l'article de Portetelle, D. et al. dans J. Virol. Methods, 23, 211-222 (1989) où la compétition existe avec l'anticorps monoclonal contre G, même si l'animal testé a été infecté par un variant BLV G⁻.

Dans des expériences préliminaires chez les moutons avec le recombinant VP391 (gp51 seule), aucune compétition n'avait pu être montrée avec l'anticorps monoclonal contre G

(ou F ou H), comme cela est d'ailleurs décrit pour les lapins dans le tableau III ;

- que le virus BLV est détectable uniquement à partir des lymphocytes de moutons contrôles ou ayant reçu la vaccine sauvage VP452 ;

- que les recombinants exprimant gp51 et gp30 (VP459 et VP482) diminuent fortement le nombre de cellules infectées ou empêchent l'infection lors d'une surinfection par BLV : la méthode utilisée (culture in vitro des lymphocytes) ne permet pas d'identifier le virus BLV dans ces cas ;

- que des anticorps antip24, signe d'infection par BLV, sont observés chez tous les contrôles et tous ceux ayant reçu VP452 ;

- qu'un seul mouton, ayant reçu VP459, présente un taux élevé persistant en anticorps antip24 et semble donc infecté;

- qu'un pouvoir neutralisant est observé chez les moutons ayant reçu VP459 ou VP482 ;

- qu'après surinfection, un pouvoir neutralisant élevé et ne décroissant pas est signe de l'infection par BLV ; un pouvoir neutralisant faible ou qui décroît dans le temps est signe d'une protection.

TABLEAU I

	VTk79	VP391 gp51	VP392 (gp30 + gp51)	VV-ENV1
MONO A	2,2 mg/ml dil. 1/50	+	+	+
MONO B	1,97 mg/ml	+	+	+
MONO B'	1,8 mg/ml	+	+	+
MONO C	1,6 mg/ml	+/-	+	+/-
MONO D	1,51 mg/ml	+	+	+
MONO D'	1,80 mg/ml	+	+	+
MONO (E)	2,2 mg/ml	+	+	+
MONO F	1,95 mg/ml	+ T.F.	+++	+++
MONO G	1,3 mg/ml	-	-	+++
MONO H	2,83 mg/ml	+ T.F.	+++	+++

T. F. = très faible

TABLEAU II

	Titre en virus (DL50) au			
	16/5	21/5	1/6	15/6
<u>VP392 cultivé sur VERO</u>				
Titre sur cellules VERO	7,87	7,53	8,08	
Titre sur cellules OVK	6,55	6,53		
<u>VP392 cultivé sur OVK</u>				
Titre sur cellules VERO	7,02	7,02	7,33	7,08
Titre sur cellules OVK	6,08	6,08		6,33

Tableau III

Lapin	Numéro du recombinant injecté	Antigènes exprimés	Mode d'inoculation	Titre anti-gp51 15 jours après 2 injections	Compétition ELISA avec MONOS anti gp51 pseudotypes	Neutralisation pseudotypes	Inhibition syncytia
						Titre	Titre
2670 contrôle		gp51 purifié	ID/ACF	++++	A B B' C D D' F G H très prononcée	7900	>16
4	VP391	gp51 seule	ID	+++	A faible, FH très faible G nulle	200	-
5	VP391	gp51 seule	IV + ID	+++	A faible, H très faible F,G faible	-	-
7	VP392	gp51 et gp30	ID	++++	A faible, H très faible, F, G prononcée	630	2
8	VP392	gp51 et gp30	ID	++++	A prononcée, FGH très prononcée	1250	8
10	VP392	gp51 et gp30	ID + IV	++++ (+)	A, F, G, H très prononcée	12600	>16
29	VV-ENV1	gp51 et gp30	ID + IV	+++	A prononcée F, G, H prononcée	390	4
30	VP459	gp51 et gp30	ID + IV	++++	A, F, G, H très prononcée	660	8
34	VP482	gp51 solidaire de gp30	ID + IV	++++	A, F, G, H très prononcée	700	8

Tableau IV

Moulon N°	Souche vaccine	Antigènes exprimés	ANTI-gp51		ANTI-p24		Présence BLV après culture	Neutralisation des pseudotypes			CONCLUSION	
			Au moment de 2ème inoculation	Au moment surinfection	3 mois après surinfection	Au moment surinfection		3 mois après surinfection	3 sem. après 1ère inoc.	2ème inoc.		3 sem. après 3ème surinfection
44	-	-	-	-	+++++	+++++	+	0	0	1600	1800	INFECTE
99	-	-	-	-	+++++	+++++	+	NT	NT	NT	NT	INFECTE
45	VP452	-	-	-	+++++	+++++	+	0	0	550	1500	INFECTE
74	VP452	-	-	-	+++++	+++++	+	0	0	1000	6000	INFECTE
47	VP452	-	-	-	+++++	+++++	+	0	0	600	2600	INFECTE
90	VP452	-	-	-	+++++	+++++	+	0	0	390	630	INFECTE
40	VP459	gp51	-	+++	+	-	-	0	350	5	0	PROTEGE
50	VP459	el	-	+++++	+++++	-	-	0	6100	790	670	PROTEGE
29	VP459	gp30	-	+	++++	++++	-	5	5	650	1000	INFECTE
68	VP459	séparées	+	+++	+++	-	-	0	90	40	20	PROTEGE
41	VP482	gp51	+++	+++++	++++	-	-	5	1860	190	110	PROTEGE
43	VP482	el	+++	+++++	+++++	-	-	5	710	320	90	PROTEGE
30	VP482	gp30	+	+++	+++++	-	-	10	980	4400	50	Pbl. PROTEGE
31	VP482	solitaires	+	+++	+++	-	-	0	360	390	60	PROTEGE

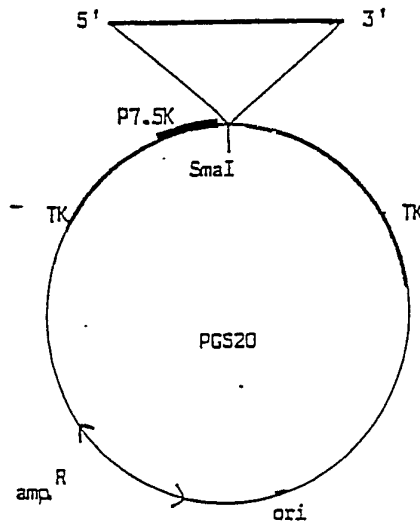
5' ————— 3'

insert XhoI du phage λ 42



Schéma 1

traitement par le fragment Klenow
de la DNA polymérase I



amplification et purification sur gradient CsCl



digestions des endonucléases de restriction



électrophorèse en gel d'agarose



transfert selon "Southern"



hybridation à la sonde "ENV"



autoradiographie

30

REVENDEICATIONS

1. Vaccin contre le virus de la leucémie bovine (BLV),
comprenant une fraction peptidique qui inclut la
glycoprotéine d'enveloppe gp51 du virus BLV et qui induit à
5 un degré élevé la formation d'anticorps neutralisants,
caractérisé en ce que la glycoprotéine gp51 est associée à
une glycoprotéine transmembranaire, de manière à restituer à
la glycoprotéine gp51 sa configuration native où sont
présents les épitopes F, G et H responsables de l'activité
10 biologique du virus BLV, dans un véhicule ou excipient phar-
maceutique du type de ceux utilisés pour la constitution de
vaccins.

2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce
que la glycoprotéine transmembranaire est la glycoprotéine
15 gp30 du virus BLV.

3. Vaccin selon la revendication 2, caractérisé en ce
que les glycoprotéines gp51 et gp30 sont exprimées en une
molécule unique dans un système d'expression.

4. Vaccin selon la revendication 3, caractérisé en ce
20 que la molécule comprenant gp51 et gp30 est dépourvue de
site de clivage.

5. Vaccin selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en
ce que les glycoprotéines gp51 et gp30 sont exprimées à
l'aide d'un virus recombinant.

25 6. Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce
que le virus recombinant est choisi parmi le virus de la
vaccine, le virus Fowlpox, le virus Canarypox, les
adénovirus, les herpèsvirus et les baculovirus.

7. Vaccin selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en
30 ce que les glycoprotéines gp51 et gp30 sont exprimées dans
une levure.

8. Vaccin selon la revendication 7, caractérisé en ce
que la levure est Saccharomices cerevisiae.

9. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à
35 8, caractérisé en ce que les glycoprotéines gp51 et gp30
sont insérées dans des liposomes.

10. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que les glycoprotéines gp51 et gp30 sont insérées dans des polyélectrolytes.

11. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que les glycoprotéines gp51 et gp30 sont insérées dans une préparation de type ISCOM.

12. Vaccin recombinant contre le virus de la leucémie bovine, caractérisé en ce qu'il comprend des virus recombinants exprimant une fraction peptidique qui associe la glycoprotéine gp51 et la glycoprotéine transmembranaire gp30 qui restitue à la glycoprotéine gp51 sa configuration native où sont présents les épitopes F, G et H responsables de l'activité biologique du virus BLV, dans un véhicule ou excipient pharmaceutique du type de ceux utilisés dans la constitution de vaccins.

13. Vaccin recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il exprime une molécule unique, comprenant gp51 et gp30, dépourvue ou non de site de clivage.

14. Vaccin recombinant selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que le virus recombinant est obtenu en insérant dans le virus correspondant tout ou partie des gènes codant pour les glycoprotéines gp51 et gp30 provenant du virus BLV ou d'un variant BLV.

15. Vaccin recombinant selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que le virus recombinant est obtenu en insérant dans le virus correspondant la séquence provenant d'un provirus BLV cloné.

16. Vaccin recombinant selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que le virus recombinant est obtenu en insérant dans le virus correspondant une copie ADNc ou un oligonucléotide codant pour tout ou partie de la gp51 et de la gp30.

17. Vaccin contre le virus de la leucémie bovine (BLV) comprenant une fraction peptidique comportant la glycoprotéine d'enveloppe gp51 du virus BLV et induisant à

32J

un degré élevé la formation d'anticorps neutralisants, caractérisé en ce que la glycoprotéine gp51 est associée à un anticorps monoclonal spécifique de l'un des épitopes de la gp51, de manière à restituer à la glycoprotéine gp51 sa configuration native où sont présents les épitopes F, G et H responsables de l'activité biologique du virus BLV, dans un véhicule ou excipient pharmaceutique du type de ceux utilisés pour la constitution de vaccins.

18. Vaccin selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope E est fixé sur la glycoprotéine gp51.

19. Vaccin selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope A est fixé sur la glycoprotéine gp51.

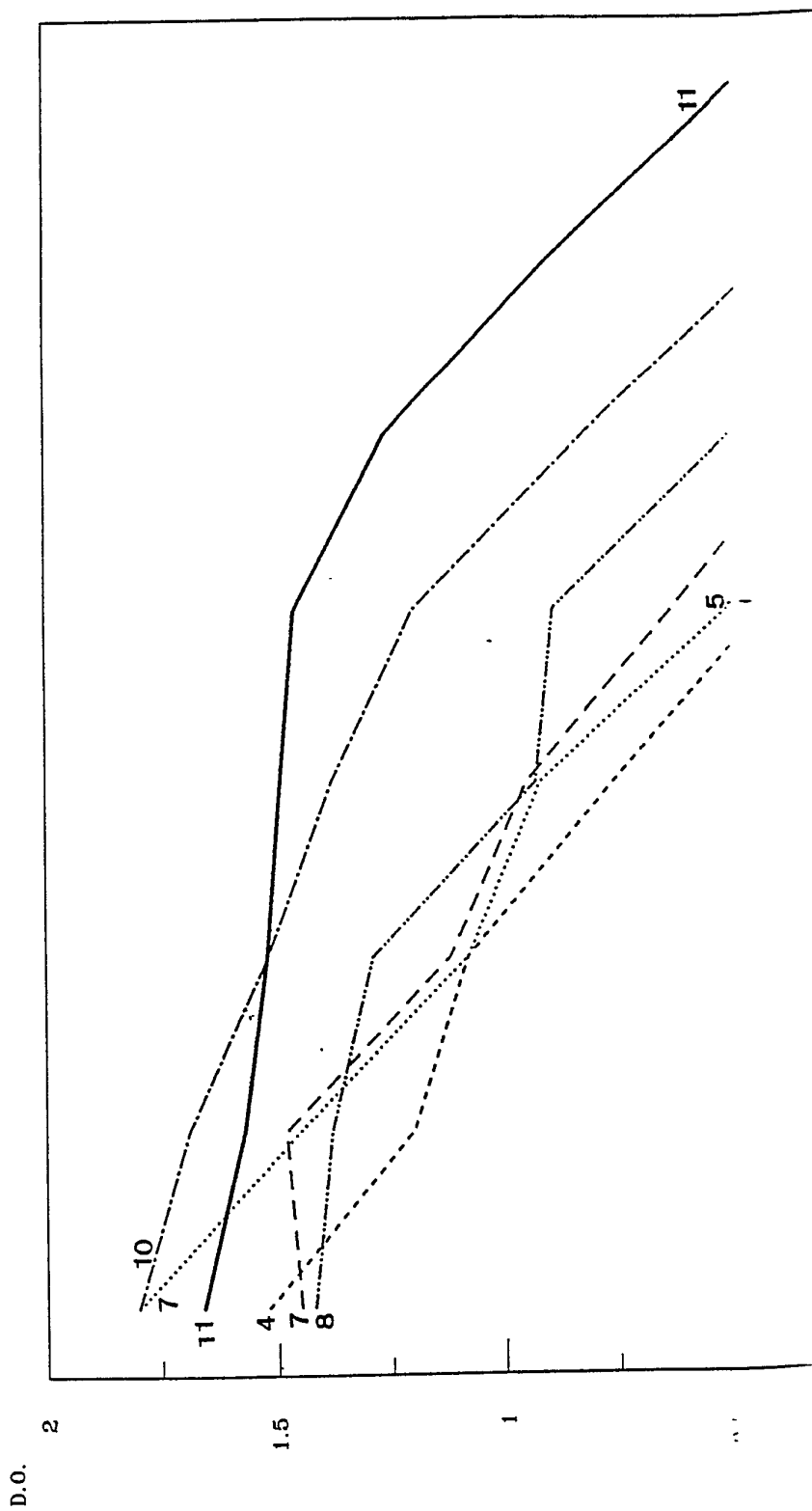
20. Vaccin selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que la glycoprotéine gp51 et l'anticorps monoclonal E ou A sont exprimés dans un système d'expression.

21. Vaccin selon la revendication 20, caractérisé en ce que la glycoprotéine gp51 et l'anticorps monoclonal E ou A sont exprimés à l'aide d'un virus recombinant, dans lequel sont insérés le gène codant pour la gp51 et des gènes codant pour l'anticorps monoclonal contre l'épitope E ou A.

22. Vaccin selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'on insère dans une préparation de type ISCOM l'anticorps monoclonal E ou A, ledit anticorps captant ensuite la glycoprotéine gp51.

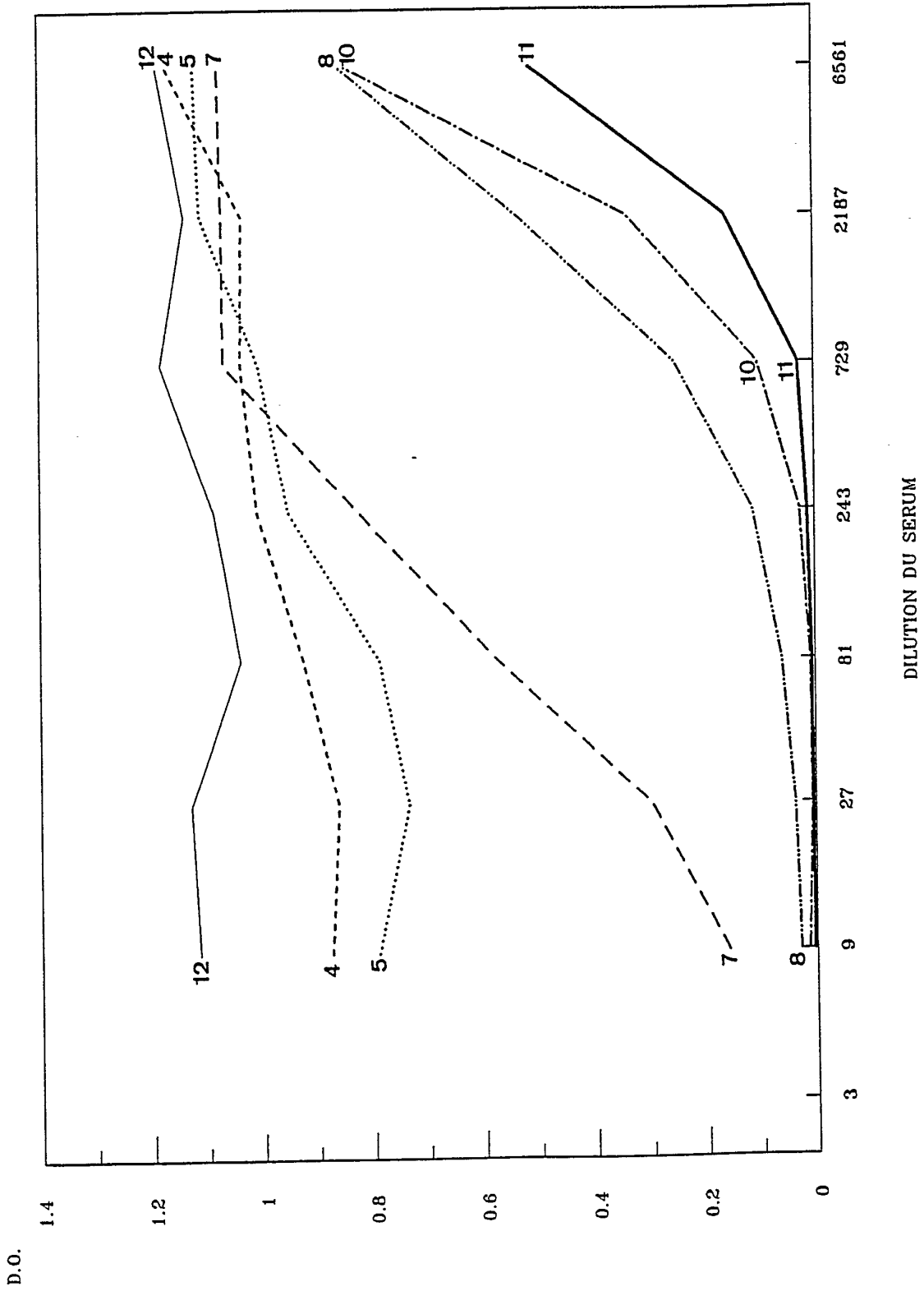
23. Vaccin contre la leucémie bovine, caractérisé en ce qu'il contient des virus recombinants tels que définis dans la revendication 21.

Fig.1 TITRATION DES ANTICORPS ANTI-GP51



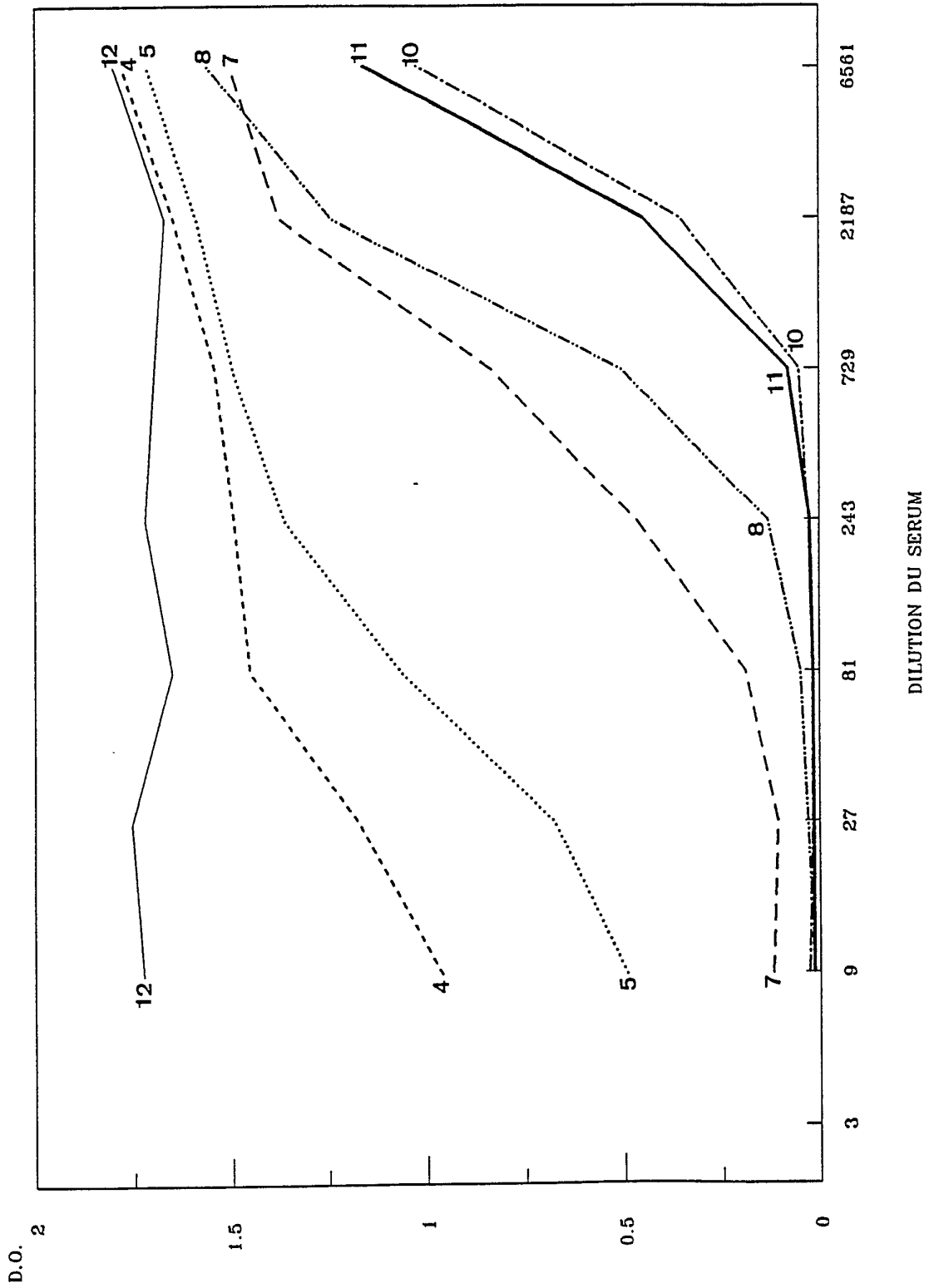
COMPETITION AVEC MONO F-POD

Fig. 2



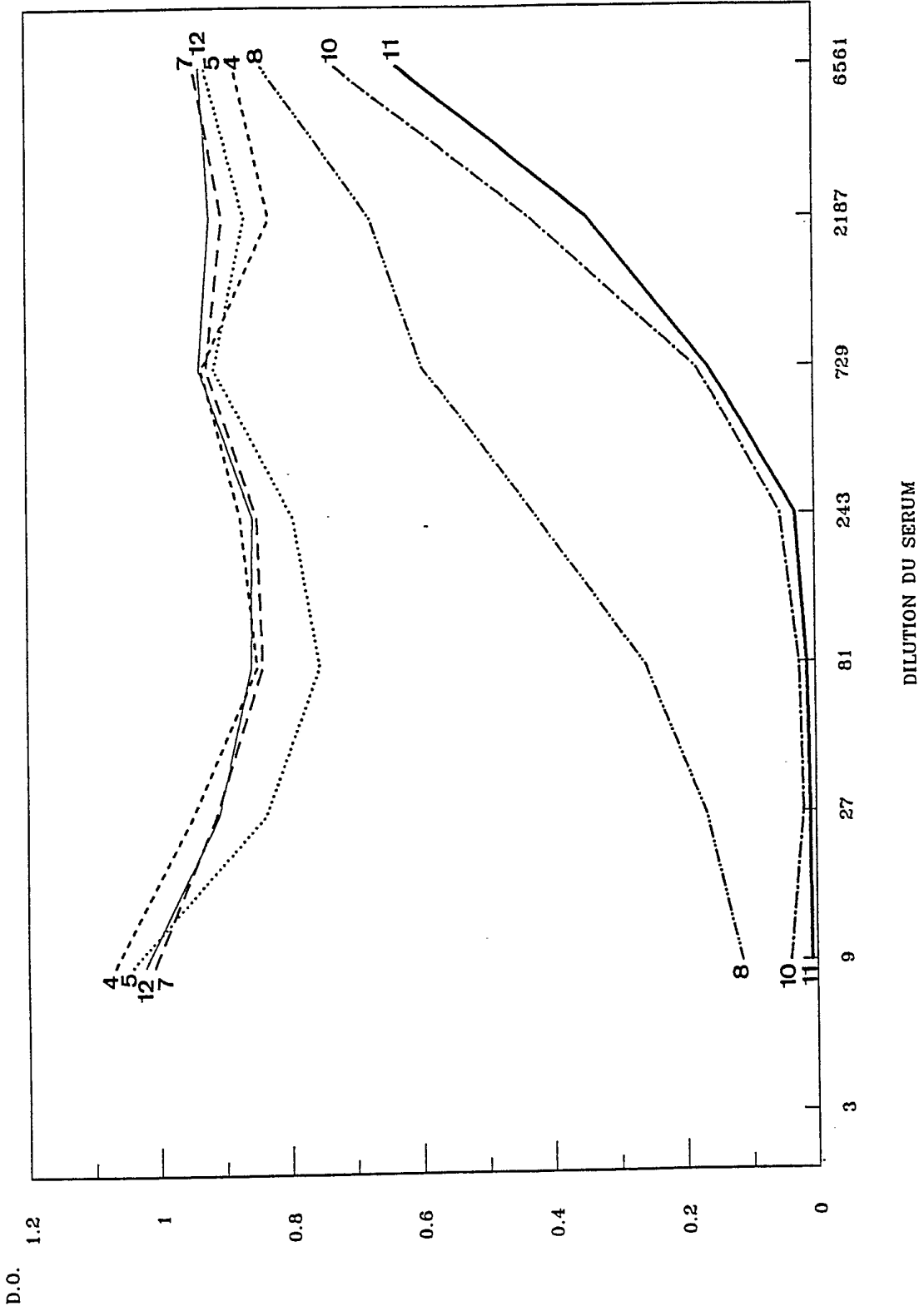
COMPETITION AVEC MONO G-POD

Fig. 3



COMPETITION AVEC MONO H-POD

Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00456

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ A 61 K 39/21		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	A 61 K, C 12 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	Medline, abstract 89349070 H. Bossmann et al.: "A radioimmunoassay detecting the bovine leukaemia virus transmembrane protein GP30 and anti-GP30 antibodies in the serum of cattle" & Acta Virol, 3/1989, 33(2), p113-20 see the abstract --	1-23
Y	Medline, abstract 89073944 S. Brantl et al.: "Expression of ENV sequences of the bovine leukemia virus (BLV) in the yeast saccharomyces cerevisiae" & Yeast, 3/1988, 4(1), p47-59 see the abstract --	1-23
./.		
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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.</p> <p>"g" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
02 October 1990 (02.10.90)		06 November 1990 (06.11.90)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	Vaccine, volume 7, No. 1, February 1989, (Guildford, GB), M.S. Merza et al.: "Bovine leukaemia virus ISCOMs: biochemical characterization", pages 22-28 see the whole document --	1-23
Y	Gene, volume 79, No. 2, 1989, (Amsterdam, NL), J. Dumont et al.: "High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in saccharomyces cerevisiae", pages 219-226 see the whole document --	1-23
Y	Gene, volume 79, No. 2, 1989, (Amsterdam, NL), M. Legrain et al.: "Biochemical and immunological characterization of the bovine leukaemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in saccharomyces cerevisiae" pages 227-237 see the whole document --	1-23
Y	Vaccine, volume 6, No. 5, October 1988, (Guildford, GB), K. Ohishi et al.: "Immunogenicity of a recombinant vaccinia virus expressing envelope a glycoprotein of bovine leukaemia virus", pages 428-432 see the whole document (cited in the application) --	1-23
Y	EP, A, 0284492 (RHONE MERIEUX) 28 September 1988 see the whole document & FR, A, 2612529 (cited in the application) --	1-23
Y	WO, A, 88/06182 (TOA NENRYO KOGYO) 25 August 1988 see the whole document --	1-23
A	EP, A, 0051216 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 May 1982 see the whole document ----	1-23

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000456
SA 38413

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/10/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0284492	28-09-88	FR-A, B 2612519	23-09-88
		JP-A- 63264600	01-11-88

WO-A- 8806182	25-08-88	None	

EP-A- 0051216	12-05-82	US-A- 4323555	06-04-82
		AU-B- 546515	05-09-85
		AU-A- 7668181	13-05-82
		CA-A- 1175744	09-10-84

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 90/00456

Demande internationale N°

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : A 61 K 39/21		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	A 61 K, C 12 N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	Medline, abrégé 89349070 H. Bossmann et al.: "A radioimmunoassay detecting the bovine leukaemia virus transmembrane protein GP30 and anti-GP30 antibodies in the serum of cattle" & Acta Virol, 3/1989, 33(2), p113-20 voir l'abrégé	1-23
Y	Medline, abrégé 89073944 S. Brantl et al.: "Expression of ENV sequences of the bovine leukemia virus (BLV) in the yeast saccharomyces cerevisiae" & Yeast, 3/1988, 4(1), p47-59 voir l'abrégé	1-23
./.		
<p>* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« 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)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« 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.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
2 octobre 1990	06 NOV. 1990	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé MISS T. TAZELAAR	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
Y	Vaccine, volume 7, no. 1, février 1989, (Guildford, GB), M.S. Merza et al.: "Bovine leukaemia virus ISCOMs: biochemical characterization", pages 22-28 voir le document en entier --	1-23
Y	Gene, volume 79, no. 2, 1989, (Amsterdam, NL), J. Dumont et al.: "High yield synthesis of the bovine leukemia virus (BLV) p24 major internal protein in saccharomyces cerevisiae", pages 219-226 voir le document en entier --	1-23
Y	Gene, volume 79, no. 2, 1989, (Amsterdam, NL), M. Legrain et al.: "Biochemical and immunological characterization of the bovine leukaemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in saccharomyces cerevisiae" pages 227-237 voir le document en entier --	1-23
Y	Vaccine, volume 6, no. 5, octobre 1988, (Guildford, GB), K. Ohishi et al.: "Immunogenicity of a recombinant vaccinia virus expressing envelope a glycoprotein of bovine leukaemia virus", pages 428-432 voir le document en entier (cité dans la demande) --	1-23
Y	EP, A, 0284492 (RHONE MERIEUX) 28 septembre 1988 voir le document en entier & FR, A, 2612529 (cité dans la demande) --	1-23
Y	WO, A, 88/06182 (TOA NENRYO KOGYO) 25 août 1988 voir le document en entier --	1-23
A	EP, A, 0051216 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 mai 1982 voir le document en entier -----	1-23

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000456
SA 38413

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/10/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0284492	28-09-88	FR-A, B 2612519 JP-A- 63264600	23-09-88 01-11-88
WO-A- 8806182	25-08-88	Aucun	
EP-A- 0051216	12-05-82	US-A- 4323555 AU-B- 546515 AU-A- 7668181 CA-A- 1175744	06-04-82 05-09-85 13-05-82 09-10-84

EPO FORM P0472