ROYAUME DE BELGIQUE

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

BREVET D'INVENTION

NUMERO DE PUBLICATION : 1005908A5

NUMERO DE DEPOT : 09101066

Classif. Internat. : C12N A61K

Date de délivrance le : 08 Mars 1994

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 19 Novembre 1991 à 15H30 à l 'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : VIROGENETICS CORPORATION
Jordan Road 465, Rensselaer Technology Park, TROY, NEW YORK 12180(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)

représenté(e)(s) par : DE PALMENAER Roger, BUREAU VANDER HAEGHEN, Rue Colonel Bourg 108A,- B 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : VACCIN A POXVIRUS RECOMBINANT CONTRE LE VIRUS DE LA ROUGEOLE.

INVENTEUR(S) : Paoletti Enzo, Murray Avenue 297, Delmar, New York (US);Taylor Jill, Rose Court 22, Albany, New York (US)

PRIORITE(S) 20.11.90 US USA 621614 22.10.91 US USA 776867

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 08 Mars 1994
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L
Directeur

Vaccin à poxvirus recombinant contre le virus de la rougeole

La présente invention est relative à un poxvirus modifié et à des procédés pour le préparer et l'utiliser. Plus particulièrement , l'invention est relative à un poxvirus recombinant , virus qui exprime les produits de gène d'un gène de Morbillivirus, et à des vaccins qui impartissent une immunité protectrice contre les infections par le Mobillivirus.

On se réfère dans la présente demande à plusieurs publications énumérées avec des chiffres arabes entre parenthèses . La citation complète de ces documents se trouve à la fin de la description proprement dite , immédiatement avant les revendications . Ces documents antérieurs décrivent l'état de la technique à laquelle l'invention appartient .

Les virus de la vaccine et plus récemment d'autres poxvirus ont été utilisés pour l'insertion et l'expression de gènes étrangers . La technique de base pour insérer des gènes étrangers dans un poxvirus infectieux vivant implique la recombinaison entre des séquences de ADN de poxvirus flanquant un élément génétique étranger dans un plasmide donneur et des séquences homologues présentes dans le poxvirus de sauvetage (Piccini et al., 1987).

Spécifiquement , les poxvirus recombinants sont construits en deux étapes connues dans la technique et analogues aux procédés pour créer des recombinants synthétiques du virus de la vaccine décrits dans le brevet des Etats-Unis n° 4.603.112 , dont l'enseignement est incorporé dans la présente par référence .

En premier lieu , la séquence génétique de l'ADN à être insérée dans le virus , en particulier un cadre de lecture ouvert en provenance d'une source non-pox , est placée dans une structure construite de plasmide de E.coli dans laquelle de l'ADN homologue à une section de l'ADN du poxvirus a été introduit. Séparément , la séquence de l'ADN du gène à être insérée est réunie par ligation à un promoteur . La

liaison promoteur-gène est positionnée dans la structure construite de plasmide de sorte que la liaison promoteur-gène soit encadrée par l'ADN homologue à une séquence d'ADN flanquant une région d'ADN de pox contenant un locus non essentiel . La structure construite de plasmide résultante est ensuite amplifiée par croissance à l'intérieur de la bactérie E.coli (Clewell , 1972) et isolée (Clewell et al., 1969 ; Maniatis et al., 1982).

Ensuite , le plasmide isolé contenant la séquence de l'ADN du gène à être insérée est transfecté dans une culture de cellules , par exemple de fibroblastes d'embryons de poulets, en même temps que le poxvirus . La recombinaison entre l'ADN de pox homologue dans le plasmide et le génome viral respectivement donnent un poxvirus modifié par la présence , dans une région non essentielle de son génome , de séquences d'ADN étranger . L'expression ADN "étranger " désigne un ADN exogène , en particulier un ADN provenant d'une source non pox, qui code pour des produits de gène qui ne sont pas ordinairement produits par le génome dans lequel l'ADN étranger est placé .

La recombinaison génétique est en général l'échange de sections homologues d'ADN entre deux brins d'ADN. Chez certains virus de l'ARN peut remplacer l'ADN . Des sections homologues d'acide nucléique sont des sections d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui ont la même séquence de bases nucléotides .

La recombinaison génétique peut se produire naturellement au cours de la réplication ou fabrication de nouveaux génomes viraux à l'intérieur de la cellule hôte infectée . Ainsi , une recombinaison génétique entre des gènes viraux peut se produire au cours du cycle de réplication virale qui a eu lieu dans une cellule hôte qui est co-infectée par deux ou plusieurs virus différents ou autres structures génétiques . Une section d'ADN à partir d'un premier génome

est utilisée d'une manière interchangeable dans la construction de la section du génomène d'un second virus co-infectant dans lequel l'ADN est homologue à celui du premier génome viral .

Cependant , la recombinaison peut également se produire entre des sections d'ADN dans des génomes différents qui ne sont pas parfaitement homologues . Si une première telle section , qui appartient à un premier génome, est homologue à une section d'un autre génome, à part la présence dans la première section de , par exemple , un marqueur génétique ou un gène codant pour un déterminant antigénique inséré dans une portion de l'ADN homologue , la recombinaison peut encore se produire et les produits de cette recombinaison sont alors détectables par la présence de ce marqueur génétique ou gène dans le génome viral recombinant .

L'expression réussie de la séquence génétique de l'ADN insérée , par le virus infectieux modifié, exige deux conditions . La première condition est que l'insertion doit être présente dans une région non essentielle du virus afin que le virus modifié reste viable . La seconde condition pour l'expression de l'ADN inséré est la présence d'un promoteur en relation convenable avec l'ADN inséré . Le promoteur doit être placé de sorte que il soit disposé en amont de la séquence d'ADN à exprimer .

Le virus de la maladie des chiens (CDV) et le virus de la rougeole (MV) sont des membres du sous-groupe des Morbillivirus de la famille du genre Paramyxovirus (Diallo, 1990; Kingsbury et al., 1978) . Les virus contiennent un génome à ARN à un seul brin et non segmenté de polarité négative . La maladie des chiens est une maladie fébrile hautement infectieuse des chiens et autres carnivores . Le taux de mortalité est élevé , compris entre 30 et 80% . Les chiens qui survivent présentent une détérioration permanente du système nerveux central (Fenner et al., 1987) . De même ,

le virus de la rougeole provoque une maladie fébrile infectieuse aiguë caractérisée par une éruption macropapuleuse généralisée . La maladie affecte principalement les enfants.

Les caractéristiques des Morbillivirus ont été récemment revues par Norrby et Oxman (1990) et Diallo (1990). Comme rapporté pour d'autres Paramyxovirus (Avery et Niven, 1979; Merz et al., 1980) , deux protéines structurelles sont cruciales pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice . Celles-ci sont la glycoprotéine hémagglutinine (HA) de membrane, qui est responsable de l'hémagglutination et la fixation du virus sur la cellule hôte , et la glycoprotéine de fusion (F) , qui provoque une fusion de membranes entre le virus et la cellule infectée ou entre des cellules infectées et non infectées adjacentes (Graves et al., 1978). L'ordre des gènes dans le génome du MV a été déduit par Richardson et al. (1985) et Dowling et al. (1986) . Les séquences de nucléotides du gène de MVHA et du gène de MVF ont été déterminées par Alkhatib et Briedis (1986) et Richardson et al. (1986), respectivement.

CDV et MV sont structurellement semblables et partagent une relation sérologique étroite . Des études d'immunoprécipitation ont montré que de l'antisérum vis-à-vis de MV fait précipiter toutes les protéines du CDV (P, NP, F, HA et M) . Par contre , l'antisérum vis-à-vis de CDV fait précipiter toutes les protéines du MV excepté la glycoprotéine HA (Hall et al., 1980; Orvell et al., 1980 ; Stephenson et al., 1979) . A la lumière de cette relation sérologique étroite , il a été précédemment démontré que la vaccination au moyen de MV provoque la protection contre l'attaque par CDV chez les chiens (Gillespie et al. 1960; Moura et al., 1961 ; Warren et al., 1960). La neutralisation des anticorps contre le CDV a été rapportée dans les sérums anti-MV humains (Adams et al., 1957; Imagawa et al., 1960; Karzon, 1955; Karzon, 1962) , mais des anticorps neutralisants contre MV n'ont pas

été découverts dans les sérums anti-CDV à partir des chiens (Delay et al., 1965; Karzon, 1962; Roberts, 1965).

Les gènes de MV HA et de F ont été exprimés dans plusieurs secteurs viraux, y compris le virus de la vaccine (Drillien et al., 1988; Wild et al., 1991), le virus de la diphtérie (ou peste) ou pox aviaire (Spehner et al., 1990; Wild et al., 1990) l'adénovirus (Alkhatib et al., 1990) et le baculovirus (Vialard et al., 1990) . Dans ces études , des protéines de MV authentiques ont été exprimées et elles sont effectivement fonctionnelles dans des essais d'hémagglutination (Vialard et al., 1990), d'hémolyse (Alkhatib et al., 1990; Vialard et al.1190), ou de fusion de cellules (Alkhatib et al., 1990; Vialard et al., 1990; Wild et al., 1990) . Lorsqu'elle est insérée dans un vecteur de virus de vaccine , l'expression soit de la protéine de HA ou de la protéine de F a été capable de provoquer une réponse immunitaire protectrice chez les souris contre l'encéphalite par MV (Drillien et al., 1988) . De même , l'expression de la protéine de F dans un vecteur de virus de la diphtérie aviaire a provoqué une immunité protectrice contre l'encéphalite par MV chez les souris (Wild et al., 1990) . On n'a pas rapporté d'études de protection au moyen d'autres vecteurs .

La demande de brevet Européen n° O 314 569 est relative à l'expression d'un gène de MV dans la diphtérie aviaire .

Perkus et al. (1990) ont décrit récemment la définition de deux gènes à domaine d'hôte (host range) uniques dans le virus de vaccine . Ces gènes codent des fonctions de domaine d'hôte , c'est-à-dire de gamme d'hôtes assurant la réplication du virus de la vaccine sur différents substrats de cellule in vitro . Les gènes codent les fonctions de domaine d'hôte ou spectre d'activité pour la réplication du virus de la vaccine sur des cellules humaines aussi bien que sur des cellules d'origine lapine ou porcine . La définition de ces

gènes assure le développement d'un vecteur de virus de la vaccine qui , tout en exprimant des gènes étrangers intéressants , serait sévèrement restreint dans sa capacité à se répliquer dans des cellules définies . Ceci augmenterait grandement les caractéristiques de sécurité des recombinants de virus de la vaccine .

Un vecteur atténué a été développé par la suppression séquentielle de six régions non essentielles de la souche Copenhagen (Copenhague) du virus de la vaccine . Ces régions sont connues pour coder des protéines qui peuvent avoir un rôle dans la virulence virale . Les régions supprimées sont le gène tk , le gène hémorragique , le gène d'inclusion de type A, le gène d'hémagglutinine et le gène codant pour l'importante sous-unité de la ribonucléotide réductase, aussi bien que les séquences C7L à K1L définies précédemment (Perkus et al., 1990) . Les séquences et les emplacements génomiques de ces gènes dans la souche Copenhagen du virus de la vaccine ont été définis précédemment (Goebel et al., 1990 a, b) . La souche de vaccine atténuée résultante est désignée NYVAC .

La technologie de la production de recombinants du virus de la vaccine a été étendue récemment à d'autres membres de la famille des poxvirus qui ont un domaine d'hôte ou spectre d'activité plus restreint . Le poxvirus aviaire , la diphtérie ou peste aviaire ont été construites en tant que virus recombinant exprimant le gène G de la rage (Taylor et al., 1988b). Ce virus recombinant est également décrit dans la demande de brevet PCT publiée n°WO 89/03 429. Lors de l'inoculation du recombinant dans un certain nombre d'espèces non aviaires , une réponse immunitaire à la rage a été provoquée, qui, chez les souris, les chats et les chiens, est protectrice contre une attaque mortelle de la rage.

Tant la maladie des chiens que la rougeole sont contrôlées couramment par l'utilisation de vaccins atténués

vivants (Fenner et al., 1987; Preblud et al., 1988). L'immunisation est recommandée pour le contrôle de CDV en utilisant un vaccin atténué vivant à l'âge de huit semaines et de nouveau à l'âge de 12 à 16 semaines . Bien que l'immunité au CDV dure toute la vie , on recommande généralement une revaccination annuelle, étant donné la nature hautement infectieuse de l'agent et la sévérité de la maladie .

Un problème qui se pose avec la politique habituelle de revaccination continuelle est que les mères ayant une immunité vis-à-vis du CDV passent l'anticorps neutralisant à leurs descendants dans le colostrum . Il est difficile de déterminer lorsque les niveaux d'anticorps vont disparaître suffisamment pour que les chiots puissent être vaccinés .

Ceci laisse un créneau temporel au cours duquel les chiots peuvent être susceptibles d'être infectés par CDV . L'utilisation d'un vaccin recombinant exprimant seulement les glycoprotéines du virus de la rougeole peut fournir un moyen pour surmonter les effets inhibitoires des anticorps maternels et permettre la vaccination des nouveaux-nés . En fait , on a démontré que des anticorps spécifiques vis-à-vis du CDV chez des chiots qui ont tété des mères qui sont immunisées contre CDV n'empêchent pas le développement d'anticorps spécifiques vis-à-vis du MV lorsqu'ils sont inoculés avec un vaccin MV (Baker et al., 1966).

D'autres limitations des vaccins à CDV vivant modifié , qui sont utilisées habituellement , ont été discutées précédemment (Tizard , 1990) et sont liées à la possibilité de ces souches de vaccins de se répliquer chez les animaux vaccinés . Ces effets nuisibles sont les plus apparents lorsque la souche de vaccin à CDV est co-inoculée avec des adénovirus canins 1 et 2 chez des chiens, en provoquant une immunosuppression , une thrombocytopénie et une encéphalite (Bestetti et al., 1978; Hartley, 1974 ; Phillips et al., 1989) . Les vaccins à CDV vivant modifié ont

également été indiqués comme induisant des maladies chez d'autres animaux particuliers y compris les renards , Kinkajous, les furets et les pandas (Bush et al., 1976 ; Carpenter et al., 1976; Kazacos et al., 1981). C'est pourquoi l'utilisation de vaccin à CDV recombinant, en tant que candidat, éliminerait l'introduction continuelle de CDV vivant modifié dans l'environnement et des complications potentielles associées au vaccin et induites par le vaccin, qui se sont produites lors d'utilisation de vaccins à CDV classiques .

L'utilisation de vecteurs de poxvirus peut également fournir un moyen pour surmonter l'effet inhibitoire bien connu que les anticorps maternels ont sur la vaccination avec les souches de CDV atténuées vivantes chez les chiens . Des chiots nés de mères précédemment immunisées à l'âge jeune au moyen d'un poxvirus recombinant peuvent éviter l'interférence des anticorps maternels spécifiques vis-à-vis du CDV.

En outre , la possibilité tant pour les vecteurs de virus de la vaccine que pour les vecteurs de virus du pox du canari abritant les gènes du MV HA et du F de provoquer ces réponses et le manque de réactivité croisée sérologique entre les deux poxvirus fournit un avantage supplémentaire en ce qu'un des vecteurs peut être utilisé précocement dans la vie du chiot et l'autre vecteur plus tard, afin d'accroître l'immunité spécifique vis-à-vis du CDV. Ceci éliminerait la libération de souches de CDV atténuées vivantes dans l'environnement , un événement lié à la production de complications induites par le vaccin et associées au vaccin (Tizard , 1990).

On peut ainsi apprécier que la production d'un poxvirus recombinant de Morbillivirus et de vaccins qui impartissent une immunité protectrice contre les infections par le Morbillivirus serait un progrès hautement désirable par rapport à l'état actuel de la technologie .

C'est pourquoi l'invention a pour objet de fournir des poxvirus recombinants , virus qui expriment des produits de gène des Morbillivirus, et de fournir un procédé pour préparer de tels poxvirus recombinants .

C'est un objet supplémentaire de l'invention de réaliser le clonage et l'expression des séquences de codage du Morbillivirus , en particulier des séquences de codage du virus de la rougeole , dans un vecteur de poxvirus , particulièrement dans des vecteurs de virus de la vaccine ou de virus du pox du canari.

C'est un autre objet de l'invention de fournir un vaccin qui soit capable de provoquer la production d'anticorps neutralisant le Morbillivirus , des anticorps inhibant l'hémagglutination et de produire une immunité protectrice contre l'infection par le Morbillivirus et une attaque mortelle par le Morbillivirus , particulièrement en fournissant une protection croisée des chiens contre la maladie des chiens en utilisant un vaccin contre le poxvirus à base de virus recombinant de la rougeole .

Ces objets et d'autres objets et avantages de la présente invention apparaîtront encore davantage après la considération de la description détaillée qui va suivre .

Suivant un aspect , la présente invention est relative à un poxvirus recombinant contenant une séquence d'ADN à partir du Morbillivirus dans une région non essentielle du génomène du poxvirus . Le poxvirus qui est avantageusement un virus de la vaccine ou un virus du pox ou peste aviaire , tel que le virus du pox ou du canari . Le Morbillivirus est avantageusement le virus de la rougeole .

Selon la présente invention , le poxvirus recombinant exprime des produits de gène du gène de Morbillivirus étranger . En particulier , l'ADN étranger code pour une glycoprotéine du virus de la rougeole , de préférence la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole et

la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole . Avantageusement , plusieurs glycoprotéines du virus de la rougeole sont co-exprimées chez l'hôte par le poxvirus recombinant .

Selon un autre aspect , la présente invention est relative à un vaccin pour induire une réponse immunologique chez un animal hôte inoculé avec le vaccin , ledit vaccin comprenant un véhicule et un poxvirus recombinant contenant , dans une région non essentielle de celui-ci , de l'ADN provenant du Morbillivirus , en particulier du virus de la rougeole . Avantageusement , l'ADN code pour, et exprime, une glycoprotéine du virus de la rougeole , en particulier une glycoprotéine de l'hémagglutinine du virus de la rougeole et une glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole . Plusieurs glycoprotéines du virus de la rougeole sont avantageusement co-exprimées chez l'hôte . Le poxvirus utilisé dans le vaccin selon la présente invention est avantageusement un virus de la vaccine ou un virus du pox aviaire (ou avipox virus), tel que le virus du pox du canari .

Une meilleure compréhension de la présente invention sera également obtenue en se référant aux dessins annexés sur lesquels :

La figure 1 représente schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pSPM2LHAVC utilisé pour dériver un virus de vaccine recombinant vP557 exprimant le gène de l'hémagglutinine de MV;

La figure 2 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pSPMFVC utilisé pour dériver un virus de vaccine recombinant vP455 exprimant le gène de fusion de MV;

La figure 3 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW843 utilisé pour dériver un virus de vaccine recombinant vP756 exprimant le gène de l'hémagglutinine de MV;

La figure 4 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW850 utilisé pour dériver un virus de vaccine recombinant vP800 exprimant le gène de fusion de MV;

La figure 5 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW800 utilisé pour dériver un virus de vaccine recombinant vCP40 exprimant le gène de fusion de MV;

La figure 6 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW810 utilisé pour dériver des virus de canaripox recombinant vCP50 exprimant le gène de l'hémagglutinine de MV et vCP57 co-exprimant les gènes de fusion de MV et de l'hémagglutinine ;

La figure 7 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW852 utilisé pour dériver un virus de canaripox recombinant vCP85 exprimant le gène de l'hémagglutinine de MV;

La figure 8 représente schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW853A utilisé pour dériver le virus de canaripox recombinant vCP82 co-exprimant les gènes de l'hémagglutinine de MV et de fusion ;

La figure 9 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pSD460 pour la suppression du gène de la thymidine kinase et pour la production du virus de vaccine recombinant vP410 ;

La figure 10 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pSD486 pour la suppression de la région hémorragique et pour la production du virus de vaccine recombinant vP553;

La figure 11 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pMP494 Δ pour la suppression de la région ATI et pour la production du virus de vaccine recombinant vP618 ;

La figure 12 illustre schématiquement un procédé

pour la construction du plasmide pSD467 pour la suppression du gène de l'hémagglutinine et pour la production du virus de vaccine recombinant vP723 ;

La figure 13 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pMPCSK1 Δ pour la suppression de la grappe de gènes [C7L - K1L] et pour la production du virus de vaccine recombinant vP804 ;

La figure 14 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pSD548 pour la suppression de la sous-unité importante , la ribonucléotide réductase , et pour la production du virus de vaccine recombinant vP866 (NYVAC);

et

La figure 15 illustre schématiquement un procédé pour la construction du plasmide pRW857 utilisé pour dériver le virus NYVAC recombinant vP913 co-exprimant les gènes de l'hémagglutinine de MV et de fusion .

Les exemples qui vont suivre et qui sont donnés à titre d'illustration , sans aucun caractère limitatif permettent une meilleure compréhension de la présente invention et de ses nombreux avantages .

<u>EXEMPLE 1 - Production de virus recombinants de la vaccine contenant le gène d'hémagglutinine de la rougeole .</u>

Le virus de sauvetage utilisé dans la production des deux recombinants était la souche Copenhagen (ou Copenhague) du virus de la vaccine dont le gène de thymidine kinase a été supprimé . Tous les virus ont été cultivés et titrés (analysées) sur des monocouches de cellules de VERO.

Le promoteur H6 du virus de la vaccine précoce/tardif (Rosel et al., 1986; Taylor et al., 1988a, b) a été construit par hybridation ou circularisation de quatre oligonucléotides H6SYN A-D chevauchant . La séquencee H6 résultante est la suivante :

Promoteur H6 du virus de la vaccine (SER ID NO:1/SEQ ID

NO:2): HindIII
5'AGCTTCTTTATTCTATAXTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGT
AGAAATAAGATATGAATTTTTCACTTTTATTTATGTTTCCAAGAACTCCCAACA
GTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTT
CAATTTAACTTTCGCTCTTTATTAGTATTTAATAAAGTAATAGCGCTATAGGCAATTCAA
TGTATCGTAC-3'
ACATAGCATGAGCT-5'
XhoI

En se référant maintenant à la figure 1 , les oligonucléotides H6SYN hybridés sont réunis par ligation ou soudure en pMP2LVC, digérés au moyen de XhoI/HindIII pour donner le plasmide pSP131. Le plasmide pMP2LVC contient les 0,4kbp les plus à gauche du virus de la vaccine (souche Copenhagen) région HindIII K dans pUC18. La construction de pMP2LVC a été réalisée comme suit : un fragment HindIII/SalI de 0,4 kbp de la région HindIII K a été isolé et doté d'une extrémité franche au moyen d'un fragment de Klenow de l'ADN polimérase de E. coli en présence de 2mM dnTPs . Ce fragment a été inséré dans pUC18 qui a été digéré avec PvuIII. Le plasmide résultant est désigné pMP2VC . Le plasmide pMP2VC a été linéarisé au moyen de SspI. Les oligonucléotides synthétiques MPSYN52 (SER ID NO:3) (5'-ATTATTTTTATAAGCTTGGA-TCCCTCGAGGGTACCCCCGGGGAGCTCGAATTCT-3')et MPSYN53 (SER ID NO:4) (5'-AGAATTCGAGCTCCCCGGGGGTACCCTCGAGGGATCCAAGCTTATAAAAATAAT-3') ont été hybridés et insérés dans le plus à gauche des deux sites SspI disposées à l'intérieur des séquences du virus de la vaccine . Le plasmide résultant pMP2LVC contient une région de clonage multiple dans la région intergénique entre les cadres de lecture ouverts K1L et K2L .

Les oligonucléotides hybridés 3P1 (SEQ ID NO:5)(5'-GGGAAGATGGAACCAATCGCAGATAG-3') et 3P2 (SEQ ID NO:6) (5-AATT CTATCTGCGATTGGGGTTCCATCTTCCC-3') contenant les séquences 3' extrêmes du gène HA et une extrémité EcoRI cohésive ont été réunis par ligation à un fragment XhoI/SmaI de 1,8kbp

provenant de pMH22 contenant la partie restante du gène de HA et pSP131 a été digéré au moyen de XhoI et EcoRI. Le plasmide résultant a été désigné pSPMHA11. Le plasmide pMH22 a été déduit à partir d'un clone de CADN de longueur complète du gène HA de la rougeole en créant un site XHOI au codon d'initiation ATG (Alkhatib et al., 1986).

Le fragment HindIII/EcoRI de 1,9kbp provenant de pSPMHA11 , contenant le gène HA de la rougeole , a été isolé et doté d'une extrémité franche au moyen du fragment de Klenow de l'ADN polymérase de E. coli en présence de 2mM dNTPs. Le fragment isolé a été inséré dans pMP409DVC (Guo et al., 1989) digéré au moyen de BglII et doté d'une extrémité franche par traitement avec la nucléase de mung bean. L'insertion dans ce vecteur a donné le plasmide pSPMHA41 . Le site XhoI entre le promoteur H6 et le codon d'initiation du gène HA a été éliminé par mutagénèse de rupture de double brin dirigée par oligonucléotide (Mandecki, 1982) en utilisant l'oligonucléotide HAXHOD (SEQ ID NO:7) (5'-ATAT-CCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCACCACAACGAGACCGGAT-3'). Le plasmi- de pSPM2LHAVC a été engendré par ce procédé . Le plasmide d'insertion pSPM2LHAVC a été utilisé dans des expériences de recombinaison in vitro au moyen du virus de vaccine vP458 en tant que virus de sauvetage pour engendrer le recombinant vP557 . Le vP458 contient le gène lac Z de E.coli dans le site d'insertion m2L de vP410. Ce virus de vaccine recombinant contient le gène HA de la rougeole dans le locus M2L du génome remplaçant le gène lac Z.

EXEMPLE 2 -

En se référant maintenant à la figure 2 , des oligonucléotides hybridés 3PA (SEQ ID NO:8) (5'-CCTAAAGCCTGATCTTACGGGAACATCAAAATCCTATGTAAGGTCGCTCTGATTTTTATC-GGCCGA-3') et 3PB (SEQ ID NO:9) (5'-AGCTTCGGCCGATAAAAATCAGAG-CGACCTTACATAGGATTTTGATGTTCCCGTAAGATCAGGCTTTAGG-3') contenant l'extrémité 3' du gène de fusion de la rougeole , un signal de

terminaison de transcription précoce du virus de la vaccine (Yuen et al., 1987) et les extrémités EagI et HindIII ont été réunis par ligation à un fragment SalI/HaeIII de 1kbp à partir de pCRF2 [obtenu C. Richardson, National Research Council of Canada (Biotechnology Institute) , Montreal, Canada H3A 1A1] et pUC8 digéré au moyen de SalI et HindIII. Le plasmide résultant pMF3PR14 contient l'extrémité 3' du fragment de 1kbp du gène de fusion de la rougeole.

Les oligonucléotides hybridés 5PA (SEQ ID NO:10) (5'-GGGATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTC-3') et 5PB (SEQ ID NO:11) (5'-ATGGCAGAGACGTTCACCTTGAGACCCATCCC-3'), contenant un site 5'SmaI et un site 3'BstXI , ont été réunis par ligation à un fragment BstXI/SalI de 820bp à partir de pCRF2 et pUC8 digérés au moyen de SmaI et SalI. Le plasmide résultant pSPMF5P16 contient la portion 5' du gène de fusion de la rougeole . Le fragment SmaI/SalI de 820bp de pSPMF5P16 et le fragment SalI/EagI de 1kbp à partir de pMF3PR14 ont été réunis par ligation en pTP15 digérés par SmaI et EagI. Le plasmide pTP15 (Guo et al., 1989) contient le promoteur H6 précoce/tardif de du virus de la vaccine flanqué par des séquences du locus HA du génome du virus de la vaccine (souche Copenhagen) . Le plasmide résultant contenant le gène de fusion de la rougeole juxtapose 3' au promoteur H6 à l'intérieur du plasmide d'insertion HA a été désigné pSPHMF7.

La mutagénèse dirigée par oligonucléotide a été réalisée sur pSPHMF7 . Initialement , une réaction de mutagénèse in vitro (Mandecki, 1982) a été réalisée pour créer une liaison précise ATG:ATG du promoteur H6 avec le gène de fusion de la rougeole en éliminant le site SmaI en utilisant l'oligonucléotide SPMAD (SEQ ID NO:12)(5'TATCCGTTAAGTTTGTAT-GGTAATGGGTCTCAAGGTGAACGTCT-3'). Ceci a eu pour résultat la production de pSPMF75M20 . Ensuite, le site BglII à l'extrémité 5' du promoteur H6 a été enlevé en utilisant l'oligonucléotide SPBGLD (SEQ ID NO:13) (5'-AATAAATCACTTT-

TTATACTAATTCTTTATTCTATACTTAAAAAGT-3') suivant un procédé connu (Mandecki, 1982). Le plasmide résultant a été désigné pSPMFVC. Ce plasmide a été utilisé dans des expériences de recombinaison in vitro avec le virus de la vaccine vP410 comme virus de sauvetage pour engendrer vP455.

EXEMPLE 3 - Analyse d'immunoprécipitation.

Pour déterminer que les recombinants vP455 et vP557 expriment des protéines authentiques , des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées essentiellement comme décrit (Taylor et al., 1990). En bref , des monocouches de cellules de VERO ont été infectées au moyen de 10 pfu par cellule soit avec des virus parents soit avec des virus recombinants en présence de ^{35}S-méthionine. La protéine de fusion a été spécifiquement précipitée à partir du lysat de cellules infectées en utilisant un antisérum de lapin dirigé contre un peptide de fusion terminal (ou distal) carboxy . La protéine d'hémagglutinine a été spécifiquement précipitée à partir du lysat de cellules infectées en utilisant un sérum anti-hémagglutinine monospécifique polyclonal.

En ce qui concerne l'immunoprécipitation en utilisant un sérum spécifique de fusion, on n'a pas détecté de produits marqués radioactivement dans les cellules de VERO non infectées , dans les cellules de VERO infectées partialement ou dans des cellules infectées avec le HA recombinant vP557. Dans les cellules infectées par le recombinant de fusion vP455, le précurseur de fusion F_0, avec un poids moléculaire d'environ 60 kd, et les deux produits de coupure F_1 et F_2, avec des poids moléculaires de 44 kd et 23 kd, ont été détectés . De même , en ce qui concerne l'immunoprécipitation de la forme glycosylée de la protéine HA avec un poids moléculaire d'approximativement 75-77 kd , on n'a pas détecté de produits dans les cellules de VERO non infectées , dans les cellules infectées partialement ou les cellules de VERO infectées avec vP455.

En outre, les études d'immunofluorescence indiquaient que les deux protéines étaient exprimées à la surface des cellules infectées .

EXEMPLE 4 - Expériences de fusion de cellule

Une caractéristique de la cytopathogénéicité du Morbillivirus est la formation de syncytiums qui se produit par fusion des cellules infestées avec des cellules non infestées environnantes suivie par la migration des noyaux vers le centre du syncytium (Norrby et al., 1982). Ceci a été montré comme étant un procédé important de propagation virale, qui , pour les Paramyxovirus, peut se produire en présence de l'anticorps spécifique hémagglutinine (Merz et al., 1980). Cette possibilité a été assignée par analogie avec d'autres Paramyxovirus à la terminaison amino du peptide F_1 (Choppin et al., 1981; Novick et al., 1988; Paterson et al., 1987).

En vue de déterminer que les protéines de la rougeole exprimées dans le virus de la vaccine étaient fonctionnellement actives , des mono-couches de cellules de VERO ont été inoculées au moyen des virus parents et recombinants vP455 et vP557, respectivement , à la dose de 1pfu par cellule . Après 1 heure d'absorption à 37°C , l'inoculum a été enlevé , le milieu de recouvrement remplacé et les boîtes incubées pendant la nuit à 37°C. 18 heures après l'infection, les plaques ont été examinées au microscope et photographiées . Aucune activité de fusion de cellules n'a été visible dans les cellules de VERO inoculées avec un virus parent vP455 ou vP557. Cependant , lorsque vP455 et vP557 ont été co-inoculées , une activité de fusion de cellule efficace a été observée.

Ce résultat a été confirmé récemment par Wild et al.(1991) qui ont déterminé que la formation de syncytium dans une variété des lignées cellulaires infectées au moyen de virus recombinants rougeole/vaccine exigeait l'expression à la fois des gènes de fusion et des gènes d'hémagglutinine . Le

résultat, cependant , est en contradiction avec un rapport précédent (Alkhatib , 1990) qui décrit la fusion de cellules dans 293 cellules infectées au moyen de multiplicités élevées d'un adénovirus recombinant exprimant la protéine de fusion de la rougeole . De même , il a été rapporté (Vialard et al., 1990) qu'une fusion de cellules a été observée dans des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant exprimant la protéine de fusion de la rougeole, mais seulement lorsque il y a eu incubation à pH 5,8. Dans aucun de ces deux cas , l'activité de fusion n'a été accrue par co-infection avec le recombinant approprié exprimant la protéine d'hémagglutinine de la rougeole . Des variables qui peuvent être impliquées dans le procédé de fusion sont le type de cellule (Giraudon et al., 1984) , le pH du milieu (Vialard et al., 1990) et le niveau d'expression de la protéine de fusion (Norrby et al., 1982).

EXEMPLE 5- Essais sérologiques

La technique pour l'essai des anticorps neutralisant le virus (VN) a été décrite précédemment en détail (Appel et al., 1973) . L'essai pour les titres d'anticorps CDV-VN a été fait dans des cellules de VERO avec la souche Onderstepoort adaptée de CDV. L'essai pour les titres d'anticorps MV-VN a été fait dans des cellules de VERO avec la souche Edmonston adaptée de MV . Les résultats des essais sérologiques sont indiqués dans le tableau 1 .

Des chiens immunisés comme décrit dans l'exemple 6, soit avec le virus parent de la vaccine soit avec vP455 exprimant la protéine de fusion de la rougeole, n'ont pas développé d'anticorps neutralisant vis-à-vis de MV. Des chiens immunisés, soit avec vP557 exprimant la protéine HA ou co-inoculés avec les deux recombinants vP455 et vP557, n'ont pas développé d'anticorps neutralisant après une inoculation les niveaux d'anticorps étaient équivalent à ceux induits par l'inoculation avec la souche Edmonston atténuée de MV.

TABLEAU 1

Titre d'anti-corps neutralisant le virus de la rougeole en réponse à la vaccination

		Jours après la vaccination					
Immunisation	Chien N°	0[a]	7	14	21[b]	28	35[c]
Vacc.	4/1	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	4/2	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
vP455	4/3	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	4/4	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
vP557	4/5	<1,0	2,2[d]	2,9	2,9	3,4	3,4
	4/6	<1,0	2,7	2,9	2,9	3,9	3,4
vP455 & vP557	4/7	<1,0	2,7	3,4	3,2	3,4	3,4
	4/8	<1,0	2,5	2,9	2,9	3,6	2,9
MV	4/14				<1,0		2,9
	4/15				<1,0		3,2

a) Instant de la première immunisation
b) Instant de la seconde immunisation (première immunisation avec MV)
c) Instant de l'attaque
d) Titre exprimé en tant que log10 de la dernière dilution d'anti-corps montrant une neutralisation complète de l'infectivité dans un essai de neutralisation de microtitre comme décrit par Appel et al. (1973).

09101066

EXEMPLE 6 - Etudes de protection d'animaux

En vue de déterminer si l'expression des protéines du virus de la rougeole chez les chiens inoculés avec les recombinants était suffisante pour induire une réponse immunitaire protectrice contre une attaque par CDV , quatorze chiens bigles exempts de pathogènes spécifiques et âgés de 10 semaines, ont été étudiés . Des échantillons sanguins ont été collectés au début de l'expérimentation et d'une façon répétée ensuite. Quatre groupes , avec de deux chiens dans chaque groupe, ont été immunisés au moyen de deux injections séparées par trois semaines . Le premier groupe a reçu seulement le virus de la vaccine . Le second groupe a reçu le virus de la vaccine avec un segment d'insertion pour la protéine F du virus de la rougeole (vP455) . Le troisième groupe a reçu le virus de la vaccine avec un segment d'insertion pour l'antigène HA de MV (vP557) . Le quatrième groupe a reçu une combinaison de 2 et de 3. Chaque chien a été inoculé avec environ 4 x 10^8 pfu de virus de la vaccine en quantités de 1 ml (0,6 ml par voie sous-cutanée et 0,4 ml par voie intramusculaire). Deux chiens de contrôle ont reçu 10^5 doses infectieuses de culture de tissu à 50% ($TCID_{50}$) de la souche d'Edmonston atténuée de MV par voie intramusculaire (en une quantité de 1 ml) et deux chiens de contrôle ont reçu 10^4 doses $TCID_{50}$ de la souche de Rockborn atténuée de CDV par voie sous-cutanée deux semaines avant l'attaque avec du CDV virulent , c'est-à-dire l'exposition au CD virulent . Deux chiens de contrôle sont restés non inoculés avant l'attaque ou exposition .

Tous les chiens ont été attaqués par inoculation intranasale de 1 ml de fluide de culture de tissu contenant 10^4 $TCID_{50}$ de la souche de Snyder Hill de CDV virulent deux semaines après la dernière inoculation . Les réactions cliniques des chiens a été surveillée par des observations journalières et enregistrement de la température du corps et

par enregistrement deux fois par semaine du gain ou de la perte de poids . Les lymphocytes du sang en circulation circule ont été comptés avant l'attaque et les jours 3, 5, 7 et 10 après attaque (dpc) . L'isolation du virus à partir des cellules du caillot blanc (buffy coat par co-cultivation avec des macrophages de poumon de chien (Appel et al., 1967) a été essayée aux jours 3, 5 et 10 après attaque . Des échantillons sanguins pour des tests sérologiques ont été prélevés avant vaccination et à intervalles d'une semaine jusqu'à l'époque de l'attaque et aux jours 7, 10 et 20 après attaque .

Les résultats de l'attaque ont été illustrés dans le tableau 2 .

TABLEAU 2

Effet de l'immunisation sur les signes cliniques après exposition des chiens au CDV virulent

		Nombre de jours après inoculation avec du CDV virulent					
Immunisation	Chien N°	Dépression	Perte de poids	Elévation de temp. du corps	Lymphopenia[b]	Isolation du virus[c]	Mort
Vacc.	4/1	4-10[d]	3-10	4,5,7,10	7-10	3-7	10
	4/2	4-10[d]	3-10	4,5,8-10	3-10	3-7	10
vP455	4/3	4-8	7-10	4,5,7-10	5,7	5-7	-
	4/4	4-6	7-10	4,6	7	5-7	-
vP557	4/5	ND[e]	DN	6,7	10	7	-
	4/6	ND	ND	ND	ND	ND	-
vP455 & vP557	4/7	ND	DN	7	7	7	-
	4/8	ND	7	6	ND	7	-
MV	4/14	ND	DN	ND	7	ND	-
	4/15	ND	7	5	5	ND	-
CDV-Ro	4/16	ND	ND	ND	ND	ND	-
	4/17	ND	ND	ND	ND	ND	-
Aucune	4/18	6,14-17[d]	7-17	5,7	13-17	10	17
	4/19	4-10[d]	3-10	4,5-7	3,7,10	3-10	10

a) au-dessus de 39,5°C
b) moins que $2x10_3$ lymphocytes par mm^3
c) isolé à partir des cellules du caillot blanc co-cultivées avec des macrophages de poumon de chien
d) le chien s'est déshydraté et a été euthanasié
e) aucune détection

09101066

Des chiens de contrôle non immunisés et des chiens vaccinés avec le virus de la vaccine parent ont développé des signes cliniques de maladie sévère et ont été euthanasiés lorsque la déshydratation était évidente . Les deux chiens immunisés avec vP455 ont montré quelques signes d'infection par CDV , y compris une perte de poids , une température du corps élevée et une lymphopénie , bien que ces symptômes étaient de durée plus courte que ceux apparaissant chez les chiens de contrôle . Néanmoins , les deux chiens ont survécu à l'attaque léthale par CDV . Des chiens inoculés avec vP557 ou co-inoculés avec les deux recombinants ont montré des signes minimaux d'infection et ont survécu à l'attaque . Des chiens inoculés soit avec la souche Edmonston atténuée de MV soit avec la souche Rockborn atténuée de CDV ont également survécu à l'attaque avec des signes minimaux de maladie .

EXEMPLE 7 - Construction supplémentaire vaccine/rougeole

En se référant maintenant à la figure 3 , un second virus de vaccine recombinant contenant le gène HA de la rougeole à l'intérieur du locus tk a été engendré (vP756) en utilisant le plasmide d'insertion pRW843. Ce dernier a été construit de la manière suivante : un fragment EcoRV/SmaI de 1,8kbp contenant les 24 bp les plus 3' du promoteur H6 fusionné en une configuration précise ATG:ATG avec le gène HA, privé des 26 bp les plus 3', a été isolé à partir de pSPM2LHAVC . Ce fragment a été utilisé pour remplacer le fragment EcoRV/SmaI de 1,8 kbp de pSPMHA11 pour engendrer pRW803 . Le plasmide pRW803 contient l'entier promoteur H6 lié précisément à tout le gène HA de la rougeole.

En confirmation des structures construites précédentes avec le gène HA de la rougeole, on a noté que la séquence pour le codon 18 (CCC) a été supprimée en comparaison avec la séquence publiée (Alkhatib et al., 1986). La séquence CCC a été remplacée par mutagénèse d'oligonucléotide par la méthode de Kunkel (Kunkel, 1985) en utilisant

l'oligonucléotide RW117 (SEQ ID NO:14) (5'-GACTATCCTACTTCCCTTGGGATGGGGGTTATCTTTGTA-3').

Pro 18

La matrice constituée par un seul brin a été dérivée du plasmide pRW819 qui contient la cassette H6/HA de pRW803 dans pIBI25 (IBI, New Haven, CT). Le plasmide mutagéné contenant le CCC inséré pour coder pour un résidu de proline au codon 18 a été désigné pRW820. La séquence entre les sites HindIII et XbaI de pRW820 a été confirmée par analyse de séquence de nucléotides. Le site HindIII est situé à la bordure 5' du promoteur H6 , alors que le site XbaI est situé 230bp en aval du codon d'initiation du gène HA. Un fragment XbaI/EcoRI de 1,6 kbp de pRW803, contenant les séquences de codage de HA en aval du site XBAI et comprenant le codon de terminaison a été utilisé pour remplacer le fragment équivalent de pRW820, ce qui a résulté dans la production de pRW837 . La cassette d'expression mutagénée contenue dans pRW837 a été dérivée par digestion au moyen de HindIII et EcoRI, dotée d'une terminaison franche en utilisant le fragment de Klenow de l'ADN polymérase de E.coli en présence de 2mM dNTPs , et insérée dans le site SmaI de pSD573VCVQ pour donner pRW843. Le plasmide pRW843 a été utilisé dans des expériences de combinaison in vitro au moyen de vP618 comme virus de sauvetage pour donner vP756. Le virus parent vP618 est un virus de la souche Copenhagen à partir duquel les gènes de thymidine kinase hémorrhagiques et d'inclusion de type A ont été supprimés . Le vP756 recombinant a, comme établi par analyse d'immunoprécipitation , exprimé correctement une hémagglutinine glycoprotéine d'environ 75 kd.

En se référant maintenant à la figure 4 , un second virus de vaccine recombinant (vP800) abritant le gène de fusion de la rougeole au locus ATI du génomène a été engendré en utilisant le plasmide d'insertion pRW850. Pour construire pRW850 , les manipulations suivantes ont été effectuées : Le

plasmide pSPMF75M20 contenant le gène de fusion de la rougeole lié en une configuration précise ATG:ATG au promoteur H6 a été digéré au moyen de NruI et EagI . Le fragment à extrémité franche de 1,7 kbp, contenant les 28 bp les plus 3' du promoteur H6 et le gène de fusion en entier, a été isolé et inséré dans pRW823, digéré par NruI et XbaI et terminé par une extrémité franche . Le plasmide résultant pRW841 contient le promoteur H6 lié au gène de fusion de la rougeole dans le plasmide vecteur pIBI25 (IBI, New Haven , CT). La cassette d'expression de fusion H6/rougeole a été dérivée du pRW841 par digestion au moyen de SmaI et le fragment de 1,8kbp résultant a été inséré dans pSD494VC digéré au moyen de SmaI pour donner pRW850. Le plasmide pRW850 a été utilisé dans des expériences de combinaison in vitro avec vP618 comme virus de sauvetage pour donner vP800. On a montré, par analyse d'immunoprécipitation, que vP800 recombinant exprime une glycoprotéine de fusion authentiquement traitée .

EXEMPLE 8 - Vérification d'anticorps neutralisant la rougeole chez des cobayes ou cochons d'inde et des lapins inoculés par vP455.

Deux lapins ont été inoculés intradermiquement en cinq sites au moyen de $1x10^8$ pfu au total de vP455 recombinant exprimant la protéine de fusion de la rougeole . Les deux lapins ont été renforcés au moyen d'une inoculation de rappel identique à la douzième semaine . Des saignées en série ont été recueillies et à la quatorzième semaine , deux semaines après le renouvellement de l'injection, les lapins ont été testés pour la présence d'anticorps neutralisant le sérum .

Quatre cobayes ou cochons d'inde ont été inoculés sous-cutanément chacun au moyen de $1x10^8$ pfu chacun du vP455 recombinant. Une inoculation de rappel identique a été donnée après 21 jours . Des saignées en série ont été recueillies .

La présence d'anticorps neutralisant le sérum du virus de la rougeole a été établie en utilisant un essai de

microtitre (Appel et al., 1973) au moyen de 10 $TCID_{50}$ de virus par puits de microtitre . Les résultats sont indiqués dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Résultats des anti-corps neutralisant le sérum du virus de la rougeole chez les cochons d'inde et les lapins inoculés au moyen de vP455

	Semaines après inoculation						
	0	2	3	4	5	7	14
Animal							
Cochon d'inde							
1	N.D.[a]	N.D.	N.D.-0,8[b]	1,3-1,3	1,3-1,5	1,3	N.T.[c]
2	N.D.	N.D.	0,8-1,0	0,8-1,3	1,3-1,5	N.D.	N.T.
3	N.D.	N.D.	N.D.-0,8	0,8-1,5	1,0-1,3	1,0	N.T.
6	N.D.	N.D.	0,8-0,8	0,8-0,8	1,0-1,3	1,0	N.T.
Lapin							
W44	N.D.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T	N.T	1,5
W86	N.D.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1,5

a) non détectable

b) résultats de deux essais

c) non testés

0910106 6

EXEMPLE 9 : Production du virus de canaripox recombinant du virus de la rougeole.

Les recombinants des virus rougeole/canaripox ont été développés en utilisant une stratégie similaire à celle décrite précédemment pour le virus du pox aviaire (Taylor et al., 1988 a, b).

On a produit comme suit des plasmides pour insérer les gènes F et HA de la rougeole dans le virus du canaripox .

En se référant maintenant à la figure 5 , le fragment par BglII/EagI à extrémité franche de 1,8kbp de pSPMF75M20 contenant le gène F de la rougeole promu par H6 a été inséré dans le site EcoRI à extrémité franche de pRW764,2. Le plasmide pRW764,2 contient un fragment de pVuII de 3,4 kbp provenant du génomène du canaripox ayant un site EcoRI unique qui a été déterminé comme étant non-essentiel pour la réplication du virus . Le plasmide résultant contenant le gène F de la rougeole a été désigné pRW800 et a été utilisé dans des expériences de recombinaison avec le canaripox en tant que virus de sauvetage pour engendrer vCP40.

En se référant maintenant à la figure 6, le fragment EcoRV/SmaI de 1,8 kbp de pSPM2LHA, contenant les 28bp les plus 3' du promoteur H6 et joint en une configuration précise ATC:ATG à HA , a été inséré entre les sites EcoRV et SmaI de pSPMHA11. Le plasmide résultant a été appelé pRW803 . Un fragment HindIII/EcoRI de 2kbp de pRW803 contenant le gène HA de la rougeole promu par H6 a été doté d'une extrémité franche et inséré dans le site BglII à extrémité franche du plasmide pRW764,5 . Ce plasmide PRW764,5 contient un fragment PvuII de 800 bp du génomène du canaripox ayant un site BglII unique qui a été précédemment déterminé comme étant non essentiel pour la croissance virale . Cette insertion a créé le plasmide pRW810 qui a été utilisé dans des essais de recombinaison pour engendrer vCP50.

L'insertion des séquences F et HA de la rougeole

individuellement a conduit individuellement au développement des recombinants vCP40 et vCP50 , respectivement . Afin de créer un double recombinant , le recombinant vCP40 F seul a été utilisé comme virus de sauvetage pour l'insertion du gène HA contenu dans pRW810. Ceci a conduit au développement du double recombinant vCP57.

EXEMPLE 10 - Analyse d'immunoprécipitation

En vue de confirmer que les recombinants vCP40, vCP50 et vCP57 expriment des protéines authentiques , une analyse d'immunoprécipitation a été réalisée en utilisant des sérums mono-spécifiques dirigés contre soit les protéines HA soit les protéines F . Un polypeptide de fusion correctement traité a été spécifiquement précipité à partir de lysats de cellules infectées par vCP40 et vCP57. Le précurseur de fusion F_0 ayant un poids moléculaire d'environ 60kd et les deux produits de coupure F_1 et F_2, avec des poids moléculaires d'environ 44 et 23kd respectivement , ont été détectés. Aucun produit spécifique de fusion n'a été détectable dans les cellules CEF non infectées , les cellules CEF affectées partialement ou les cellules CEF infectées au moyen de HA recombinant vCP50 . De même , une glycoprotéine d'environ 75kd a été spécifiquement précipitée à partir de cellules CEF infectées au moyen du HA recombinant vCP50 seul et du recombinant vCP57 double . Aucun produit spécifique de HA n'a été détecté dans les cellules non infectées , les cellules infectées partialement ou les cellules infectées avec le recombinant de fusion vCP40.

EXEMPLE 11 - Expériences de fusion de cellule

En vue de déterminer que les recombinants du virus de la rougeole étaient fonctionnellement actifs , des essais de fusion de cellules ont été réalisés . Des mono-couches de cellules de VERO ont été infectées au moyen de 1 pfu par cellule de virus de CP parental ou recombinant et examinées pour effets cytopathiques 18 heures après l'infection . Aucune

TABLEAU 4

Titres (en $\log_{10}$) d'anti-corps neutralisant le virus de la rougeole

Immunisation	Chien N°	Jours après la vaccination					
		0[a]	7	14	21[b]	28	35[c]
Virus du Canaripox (CPV)	9/1	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	9/2	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
vCP50	9/3	<1,0	2,7[d]	2,9	3,2	4,4	4,1
	9/4	<1,0	1,7	2,7	2,7	3,9	3,9
vCP40	9/5	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	9/6	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
vCP57	9/7	<1,0	2,0	2,7	2,5	3,9	3,6
	9/8	<1,0	1,0	2,2	2,0	3,6	3,4
vP455	9/9	<1,0	<1,0	<1,0	1,0	1,0	1,0
vP557	9/10	<1,0	2,9	2,5	3,2	3,4	3,4
vP455 & vP557	9/11	<1,0	1,3	2,9	2,9	2,9	2,9
MV	9/12				<1,0	2,5	2,5
Contrôle	9/13						<1,0
	9/14						<1,0
CDV-Ro	9/15						<1,0

a) instant de la première immunisation
b) instant de la seconde immunisation (1ère immunisation au moyen de MV et CDV-Ro)
c) instant de l'attaque.
d) détermination des titres de neutralisation du sérum établie de la manière connue (Appel et al., 1973).

09101066

activité de fusion de cellules n'a été mise en évidence dans les cellules de VERO inoculées au moyen de virus parent , vCP40 ou vCP50 . Cependant , lorsque les cellules de VERO avaient été inoculées au moyen du recombinant vCP57 double ou lorsque des cellules avaient été co-infectées à la fois par vCP40 et vCP50 , une activité de fusion de cellules efficace à été mise en évidence .

EXEMPLE 12 - Essais sérologiques

Des chiens inoculés comme décrit dans l'exemple 13, au moyen du recombinant canaripox/HA vCP50 , le recombinant vaccine/HA vP557 , le recombinant double canaripox/HA/F/VcP57 ou co-inoculé au moyen de vP455 et vP557, ont développé des anticorps significatifs neutralisant le sérum vis-à-vis du virus de la rougeole après une inoculation. Aucun des deux chiens inoculés au moyen du recombinant canaripox/FvCP40 n'a développé d'anticorps neutralisant après une ou deux inoculations . Les résultats des essais sérologiques sont illustrés sur la figure 4.

En outre , des cochons d'inde inoculés au moyen de vCP40 recombinant ont développé des niveaux faibles mais reproductibles, d'anticorps neutralisant le sérum .

EXEMPLE 13- Etudes de protection des animaux

En vue de déterminer si les vecteurs du canaripox non répliquants exprimant les protéines du virus de la rougeole induisent une réponse immunitaire protectrice contre une attaque ou infection par CDV , des chiens Biggles exempts de pathogènes spécifiques et âgés de 10 semaines ont été inoculés au moyen de virus parentaux et recombinants du canaripox . Deux chiens ont été inoculés simultanément au moyen de deux injections sous-cutanées de 1 x 10^8 pfu de chaque recombinant à intervalles de 3 semaines . A titre de comparaison , un chien a été inoculé sous le même régime avec chacun des virus de vaccine recombinant vP455 et vP457 seuls et avec une combinaison de ceux-ci . Un chien a été également inoculé intramusculairement avec une dose 10^5 $TCID_{50}$ de la souche Edmonston atténuée de MV. Un chien a été inoculé sous-cutanément avec une dose de 10^4 $TCID_{50}$ de la souche Rockborn atténuée de CDV . Les chiens ont été soumis à l'attaque ou infection deux semaines après l'inoculation finale au moyen d'une inoculation intranasale avec une dose mortelle de 10^4 $TCID_{50}$ de la souche virulente Snyder Hill de CDV . Les réactions cliniques des chiens ont été surveillées quotidiennement . Les résultats sont illustrés dans le tableau

TABLEAU 5

Effets de l'immunisation sur les signes cliniques après exposition de chiens à du CDV virulent

	Nombre de jours après l'inoculation au moyen de CDV virulent					
Immunisation	Chien N°	Dépression	Perte de poids	Elevation de la temp. du corps	Lymphopénie[b]	Isolation du virus[c]
virus du Canaripox (CPV)	9/1	4-10[d]	3-10	4,5,7,8	5-10	3-10
	9/2	4-10[d]	7-10	4,5,7,8	3-10	3-10
vCP50	9/3	ND[e]	7-10	5-7	5-7	7
	9/4	ND	7	6,7	7	ND
vCP40	9/5	4-10	3-10	4	5-10	5-7
	9/6	4-6	3-10	4-6	5	5-7
vCP57	9/7	ND	7-10	5,6	5	ND
	9/8	ND	7-10	4,7,10	7-10	5-7
vP455	9/9	6-8	7-10	4,5,8,9	5-10	3-10
vP557	9/10	ND	3-10	ND	ND	ND
vP455 & vP447	9/11	ND	3-10	ND	5-7	ND
MV	9/12	ND	7-10	ND	5	5
aucun	9/13	4-10[d]	3-10	4-6	5-10	5-10
	9/14	4-10[d]	3-10	4-5	3-10	5-7
CDV-Ro	9/15	ND	ND	ND	ND	ND

a) au-dessus de 39,5°C
b) moins de $2x10^3$ lymphocytes par mm^3
c) isole à partir de cellules du caillot blanc co-cultivé avec des macrophases de poumon de chien de la manière connue (Appel et Al., 1967)
d) le chien est déshydraté et a été euthanasié
d) rien n'a été détecté

09101066

On n'a noté aucune réaction contraire à la vaccination dans l'un quelconque des chiens au cours de l'expérience . Les deux chiens immunisés avec du virus de canaripox parental et les deux chiens de contrôle non immunisés ont montré une maladie sévère après attaque par du CDV virulent . Tous les quatre chiens sont devenus déprimés, ont montré une température du corps élevée , une perte de poids , une lymphopénie et une déshydratation sévère . Des chiens immunisés au moyen de CDV , souche Rockborn, ont produit des anticorps neutralisant le sérum à l'encontre du CDV , mais non du MV ,avant l'attaque et ont survécu à celle-ci, sans symptômes . Des chiens immunisés au moyen de MV atténué ont produit des anticorps neutralisant le sérum à l'encontre du MV , mais non du CDV , avant l'attaque et ont survécu à celle-ci avec de faibles signes d'infection . Les chiens inoculés au moyen de vCP50, vCP57 , vP557 ou co-inoculés avec vP455 et vP557 ont produit, d'une manière significative, des anticorps neutralisant le sérum à l'encontre du MV après une inoculation et ont survécu à l'attaque avec simplement de faibles signes d'infection.

EXEMPLE 14 - Construction supplémentaire canaripox/rougeole

En se référant maintenant à la figure 7, on a crée les plasmides d'insertion ci-après pour produire un virus de canaripox recombinant exprimant le gène MV HA . Un fragment EcoRV/EcoRI de 1,8 kbp de pRW837, contenant les 26bp les plus 3' du promoteur H6 et uni précisément au HA de la rougeole , a été uni par ligation à un fragment EcoRV/EcoRI de 3,2 kbp de pRW838. Le fragment dérivé de pRW838 comprend la portion 5' du promoteur H6 et les bras flanquant le locus C5 . Les plasmides pRW838 et pRW831 (voir ci-après) sont obtenus comme suit :

Un fragment génomique de canaripox pvUII de 880 bp a été inséré entre les sites pVuII de pUC9. Le plasmide résultant a été appelé pRW764,5 . La séquence de nucléotides du fragment de canaripox de 880 bp a été déterminée en

utilisant l'enzyme T7 modifiée Sequenase™ Kit (United States Biochemical, Cleveland, Ohio) selon les spécifications du fabricant . Les réactions de séquence ont utilisé des amorçes synthétisées sur mesure (17-18 mers) préparés au moyen de Biosearch 8700 (San Rafael, Californie) ou Applied Biosystems 3800 (Foster City, Californie). Ceci a permis la définition du cadre de lecture ouverte C5.

Pour supprimer spécifiquement le cadre de lecture ouvert C5 , pRW764,5 a été partiellement coupé au moyen de RsaI et le produit linéaire a été isolé . Le fragment linéaire RsaI a été recoupé au moyen de BglII et le fragment pRW764,5 avec une suppression RsaI-BglIII à partir de la position 156jusqu'à la position 462 a été isolé et utilisé en tant que vecteur pour les oligonucléotides synthétiques suivants: RW145 (SEQ ID NO:15) :(5'-ACTCTCAAAAGCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTTTATAA-3') RW146 (SEQ ID NO:16):(5'-GATCTTTATAAAAACTAGCTAGCTAGAATTCCCGG-GAAGCTTTTGAGAGT-3'). Les oligonucléotides RW145 et RW146 ont été hybridés et insérés dans le vecteur pRW764,5 RsaI-BglII décrit ci-dessus. Le plasmide résultant est pRW831.

Le plasmide de suppression de C5 a été construit sans interruption d'autres cadres de lecture ouverts du virus du canaripox . La séquence de codage C5 a été remplacée par les oligonucléotides hybridés précédents (RW145 et RW146) qui comprennent les sites de restriction pour HindIII, SmaI, et EcoRI.

Le plasmide PRW838 , a été dérivé de pRW831 par l'insertion d'un fragment SmaI contenant le gène G de la rage (Taylor et al., 1988) juxtaposé en 3' au promoteur H6 du virus de la vaccine . La ligation du fragment EcoRV/EcoRI de 1,8 kbp de pRW837 avec le fragment EcoRV/EcoRI de 3,2 kbp de pRW838 a conduit à la construction du plasmide pRW852. Ce plasmide PRW852 a été utilisé dans des expériences de recombinaison avec un isolat de canaripox, désigné ALVAC , pour donner vCP85. ALVAC est un isolat cloné sur plaque du virus du

canaripox (CPV) dérivé de la souche Rentschler , une souche hautement atténuée de CPV utilisée pour la vaccination des canaris . La réplication de ALVAC et des recombinants dérivés est restreinte aux espèces aviaires . L'analyse d'immunoprécipitation a confirmé qu'une protéine d'approximativement 75kd reconnue par un sérum anti-HA de lapin est exprimée dans des cellules CEF infectées par le recombinant vCP85.

En se référant maintenant à la figure 8 , pour engendrer un virus de canaripox recombinant abritant à la fois les gènes MV HA et F, les constructions ci-après ont été réalisées . Des sites de restriction SmaI ont été ajoutés aux extrémités du gène de fusion de la rougeole promu par H6. Pour réaliser cette opération, pRW823, qui est pIBI25 contenant le promoteur H6 du virus de la vaccine , a été digéré en aval de la séquence de promoteur au site XbaI . Les extrémités ont été rendues franches au moyen du fragment de Klenow de l'ADN polymérase de E.coli en présence de 2mM dNTPs. L'ADN à extrémité franche a été digéré ensuite au moyen de NruI pour libérer un fragment de 3,0 kbp contenant les 100bp les plus 5' du promoteur H6. Ce fragment a été isolé et uni par ligation à un fragment EagI/NruI, à extrémité franche , de 1,7kbp de pSPMF75. Le plasmide résultant a été appelé pRW841.

Le fragment SmaI de 1,8kbp, dérivé par digestion de pRW841, a été inséré dans le vecteur de suppression C5 , à savoir pRW831 . Le plasmide pRW851 a été linéarisé au site EcoRI situé en 3' par rapport au gène de fusion et a été muni d'une extrémité franche au moyen du fragment de Klenow de l'ADN polymérase de E.coli en présence de 2mM dNTPs. Le plasmide PRW837, contenant le gène HA de la rougeole juxtaposé en 3' aux séquences du promoteur H6 , a été digéré au moyen de HindIII et EcoRI et doté d'une extrémité franche par le fragment de Klenow . Le fragment de 1,8 kbp résultant a été isolé et inséré dans pRW851 qui a été linéarisé au moyen de

EcoRI et doté d'une extrémité franche . Le plasmide résultant, qui contient les deux gènes dans une configuration queue à queue , a été désigné pRW853A et a été utilisé dans des expériences de recombinaison in vitro avec le canaripox (ALVAC), en tant que virus de sauvetage pour produire vCP82, désigne également ALVAC-MV . L'analyse d'expression utilisant l'immunoprécipitation et l'immunofluorescence a confirmé que, dans les cellules infectées au moyen de vCP82 recombinant, des protéines HA et F , authentiquement traitées , ont été exprimées . Le recombinant est également fonctionnel pour l'activité de fusion de cellules.

Résultats d'analyses sérologiques de sérums de lapins et de cochons d'inde inoculés au moyen de ALVAC-MV (vCP82).

Quatre cochons d'inde ont été inoculés par voie sous-cutanée avec ALVAC-MV (vCP82) . Deux animaux (O26 et O27) ont reçu chacun $1x10^8$ pfu et deux animaux (O28 et O29) ont reçu chacun $1x10^7$ pfu. Après 28 jours , les animaux ont été re-inoculés au moyen d'une dose identique . Deux lapins ont été inoculés au moyen de $1x10^8$ pfu de ALVAC-MV(vCP82) par voie sous-cutanée . Après 28 jours, les animaux ont été re-inoculés avec une dose identique . Des saignées en série de ces animaux ont été analysées pour l'activité neutralisant le virus de la rougeole en utilisant soit un essai de neutralisation avec microtitres décrit par Appel et Robson (1973) ou un essai de réduction neutralisation sur plaque décrit par Albrecht et al.(1981) . En outre , des sérums ont été analysés pour déterminer la présence d'anticorps capables de bloquer le virus de la rougeole induit par fusion cellule-cellule dans un essai anti-fusion comme décrit dans Merz et al.(1980).

Les résultats de l'analyse pour la présence d'anticorps neutralisant le sérum du virus de la rougeole sont illustrés sous les tableaux 6 et 7. Les deux cochons d'inde (O26 et O27) ayant reçu $1x10^8$ pfu de ALVAC-MV furent séro-

convertis après une seule inoculation et les sérums ont montré une augmentation d'anticorps après une inoculation de rappel. Un animal (029) ayant reçu $1x10^7$ pfu a été également séro-converti après une inoculation . Le quatrième animal (028) n'a pas manifesté de réponse détectable après une inoculation mais a atteint des titres équivalents après la seconde inoculation.

Les sérums de lapins ont été également analysés en utilisant une méthode de réduction neutralisation sur plaque. Les résultats sont illustrés dans le tableau 7. Les deux animaux étaient séro-convertis après une inoculation . Des sérums de lapins 063 ont été testés tant par essai de neutralisation de micro-titre que par essai de réduction neutralisation sur plaque . Les titres obtenus étaient semblables par l'utilisation des deux méthodes . On a rapporté qu'un titre de neutralisation de sérum minimal de 1,2 à 1,9 chez les enfants vaccinés est exigé pour la protection contre la maladie (Lennon and Black, 1986): Black et al., 1984. En utilisant ce critère , tous les animaux , excepté le cochon d'inde qui n'a pas été séro-converti jusqu'à la seconde inoculation, ont montré un niveau de protection par anticorps après une inoculation

TABLEAU 6

Analyse sérologique de sérums de cochons d'inde inoculés au moyen de ALVAC-MV (vCP82) : Analyse réalisée par l'essai de neutralisation de sérum (microtitre).

	Jours après inoculation						
Animal	0	14	21	28[c]	42	48	56
Cochons d'inde							
026[d]	-	N.T.[a]	1,25[b]	1,49	2,45	2,68	2,92
027	-	N.T.	1,97	1,49	2,68	2,45	2,21
028[e]	-	N.T.	-	-	1,73	2,45	1,97
029	-	N.T.	0,8	1,49	2,45	2,45	2,45

a) Non essayé

b) Titre exprimé en tant que $\log_{10}$ de l'inverse de la dernière dilution montrant la neutralisation complète de l'effet cytopathique .

c) Animaux ayant subi une inoculation de rappel 28 jours après l'inoculation.

d) Les animaux 026 et 027 ont reçu $1x10^8$ pfu.

e) Les animaux 028 et 029 ont reçu $1x10^7$pfu.

TABLEAU 7

Analyse sérologique de sérum de lapins inoculés au moyen d'ALVAC-MV (vCP82)

Animal	Jours après inoculation					
	0	14	21	28[b]	42	56
Méthode de réduction sur plaque						
063	-	1,9[a]	2,8	1,6	2,2	2,2
064	-	2,2	2,5	2,8	3,1	2,8
Méthode de neutralisation (micro-titre)						
063	-	1,5[c]	1,7	1,5	1,7	

a) Titre exprimé en tant que $\log_{10}$ de l'inverse de la dernière dilution montrant une réduction de 50% sur le nombre sur plaque tel que comparé au sérum avant inoculation .

b) Animaux ayant subi une inoculation de rappel 28 jours après l'inoculation.

c) Titre exprimé en tant que $\log_{10}$ de l'inverse de la dernière dilution montrant une neutralisation complète de l'effet cytophatique .

Des études antérieures ont montré qu'un vaccin inactivé était associé à une efficacité protectrice faible et une maladie de la rougeole accrue lors de la réexposition au virus . Ce qui ont reçu le vaccin inactivé ont montré une absence d'anticorps vis-à-vis de la protéine de fusion et on a proposé que le procédé d'inactivation a rendu la protéine non immunogène (Norrby et Gollmar, 1975; Norrby et al.1975). En outre , il a été montré pour d'autres paramyxovirus que l'anticorps vis-à-vis de la protéine F est capable d'inhiber la diffusion de cellule à cellule du virus dans des cultures de tissu alors que l'anticorps du composant hémagglutinine ne l'est pas (Merz et al., 1980).

Il est par conséquent significatif de démontrer que les animaux inoculés au moyen d'ALVAC-MV (vCP82) sont capables d'induire des anticorps vis-à-vis du composant F , qui sont capables de bloquer la transmission de cellule à cellule du virus de la rougeole . Les résultats de cet essai d'anti-fusion sont illustrés dans le tableau 8. L'activité anti-fusion a été mise en évidence dans des sérums tant de cochons d'inde que de lapins inoculés au moyen de ALVAC-MV (vCP82) . Les sérums analysés ont été prélevés deux ou trois semaines après l'inoculation de rappel . Aucune activité anti-fusion n'a pu être détectée dans les sérums de lapins inoculés avec le virus parent ALVAC.

TABLEAU 8

Analyse des sérums de cochons d'inde et de lapins inoculés au moyen d'ALVAC-MV au point de vue activité anti-fusion.

Animal	Désignation	Immunogène	Titre anti-fusion	
			Avant inoc.	après vacc.
Cochon-d'inde	026	ALVAC-MV	-	2,4 [a,b]
	027	ALVAC-MV	-	1,2
Lapin	063	ALVAC-MV	-	1,8[c]
	064	ALVAC-MV	-	1,8
Lapin	W121	ALVAC	-	-
	W123	ALVAC	-	-

a) Sérums de cochons d'inde testés 7 semaines après vaccination .

b) Titre exprimé en tant que $\log_{10}$ de l'inverse de la plus haute dilution montrant une inhibition complète de l'activité de fusion de cellule induite par le virus de la rougeole.

c) Essais de sérums de lapins 6 semaines après vaccination .

Dans des essais supplémentaires destinés à démontrer la présence d'anticorps vis-à-vis à la fois des protéines de l'MV hémagglutinine et des protéines de fusion de MV dans des sérums d'animaux inoculés au moyen d'ALVAC-MV, des expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées . Des sérums de lapins inoculés au moyen de ALVAC-MV ont montré une précipitation spécifique à la fois des protéines d'hémagglutinine et des protéines de fusion à partir de lysats marqués radioactivement de cellules de VERO infectées au moyen de la souche Edmonston de MV.

Dans une étude similaire , des groupes de cochons d'inde , de lapins et de souris ont été inoculées par voie intramusculaire au moyen d'ALVAC-MV et leur réponse sérologique au virus de la rougeole déterminée en utilisant le test d'hémagglutination -inhibition (HI) . La réponse sérologique au virus du canaripox a été déterminée par l'essai ELISA. Au cours de cette étude , cinq cochons d'inde ont été inoculés au moyen de 5,5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$, 30 souris ont été inoculées au moyen de 4,8 $\log_{10}$ $TCID_{50}$, et cinq lapins ont été inoculés au moyen de 5,8 $\log_{10}$ $TCID_{50}$. Tous les animaux ont été re-inoculés au bout de 28 jours avec une dose équivalente. Les animaux ont été saignés à intervalle régulier et leur réponse au virus de la rougeole déterminée dans un essai HI. La limite de détection dans l'essai HI correspond à un titre $\log_{10}$ de 1 et il est considéré que des enfants séropositifs (protégés) ont un titre de sérum compris entre 1,6 et 2,8. Les résultats des analyses sont illustrés sur les tableaux 9, 10 et 11.

Des sérums de souris ont été analysés par groupes de 5 animaux (tableau 9) . Tous les animaux ont montré une réponse primaire au virus du canaripox qui a été accrue après la seconde inoculation . Les souris n'ont pas manifesté une réponse à MV après une inoculation . Trois des six groupes ont montré des titres dans le domaine de protection 8 semaines

après l'inoculation . De même , tous les cochons d'inde (tableau 10) ont montré une réponse au virus du canaripox après une inoculation , qui a été améliorée après la seconde inoculation . Quatre des cinq animaux ont développé des titres anti-HI après une inoculation, un de ceux-ci étant dans le domaine de protection . Ces titres se sont maintenus pendant 8 semaines après inoculation lorsque l'expérience a été terminée. Tous les lapins (tableau 11) inoculés au moyen d'ALVAC-MV (vCP82) ont répondu sérologiquement à l'inoculation par le canaripox . Quatre des cinq animaux ont été séro-convertis au virus de la rougeole après une inoculation (un dans le domaine de protection). Les titres de sérum de tous les animaux étaient dans le domaine de protection une semaine après la seconde inoculation.

<u>Résultats d'analyses sérologiques de sérums de sagouins inoculés au moyen d'ALVAC-MV (vCP82) : Influence d'une exposition antérieure au poxvirus sur l'induction d'une réponse immunitaire spécifique vis-à-vis du virus de la rougeole.</u>

Neuf sagouins (Saimiri Scinreus) ont été inoculés au moyen d'ALVAC-MV (vCP82) . Tous les sagouins étaient naïfs vis-à-vis du virus de la rougeole . Sept parmi les singes avaient auparavant été exposés au virus de la vaccine et/ou au virus du canaripox . L'histoire de l'immunisation précédente est illustrée dans le tableau 12. Tous les sagouins ont été inoculés avec une dose de 5,8 $\log_{10}$ pfu par voie sous-cutanée. Quatre parmi les animaux (n° 39, 42, 53 et 58) ont été inoculés à nouveau au moyen d'une dose équivalente quinze semaines après la première inoculation . La quantité d'anticorps anti-rougeole a été mesurée par le test HI. Les résultats sont illustrés sur le tableau 12.

Après la première inoculation , deux des neufs sagouins ont montré une faible réponse à l'inoculation au moyen d'ALVAC-MV . Après la seconde inoculation, les quatre

singes ré-inoculés étaient tous séro-convertis au moyen de titres d'anticorps significatifs dans le domaine exigé pour l'immunité de protection . Les titres atteints étaient équivalents que les sagouins aient été soumis auparavant à l'exposition au virus de la vaccine et à l'ALVAC ou sans exposition antérieure au poxvirus.

EXEMPLE 15- Vaccin de vaccine atténué souche NYVAC

Pour développer une nouvelle souche de vaccins contre la vaccine , la souche de vaccin Copenhagen du virus de la vaccine a été modifiée par la suppression de six régions non essentielles du génome codant des facteurs de virulence connus ou potentiels . Les suppressions séquentielles sont détaillées ci-après . Toutes les désignations des fragments de restriction de la vaccine , des cadres de lecture ouverts et des positions de nucléotides sont basées sur la terminologie rapportée dans Goebel et al. (1990 a, b).

Les locus de suppression ont été également construits en tant que locus de réception pour l'insertion de gènes étrangers .

Les régions séquentiellement supprimées dans NYVAC sont énumérées ci-après . Sont également énumérées les abréviations et les désignations de cadres de lecture ouverts pour les régions supprimées (Goebel et al., 1990 a,b) et la désignation de la vaccine recombinante (vP) contenant toutes les suppressions par la suppression spécifiée :

1) gène de la thymidine kinase (TK; J2R) vP410;

2) région hémorragique (u ; B13R + B14R) vP553;

3) Une région de corps d'inclusion typique (ATI;A26L) vP618;

4) gène de l'hémagglutinine (HA; A56R) vP723;

5) région du gène du domaine de l'hôte (C7L-K1L) vP804; et

6) grande sous-unité, ribonucléotide réductase (I4L) vP866 (NYVAC).

TABLEAU 9

Réponse sérologique de souris à une inoculation au moyen d'ALVAC-MV (vCP82)

Réponse anti-canaripox

TITRE ELISA	Semaines après inoculation					
Groupe de souris	0	2	4	5	6	8
1[a]	-0,009[b]	0,364	0,193	1,821	1,616	1,123
2	-0,026	0,047	0,240	1,739	1,963	1,986
3	-0,006	0,148	0,641	1,860	1,861	1,947
4	-0,005	0,130	0,451	1,506	1,937	1,124
5		0,687	0,542			
Moyenne	-0,012	0,275	0,413	1,732	1,844	1,395

Réponse anti-rougeole

TITRE HI	Semaines après inoculation					
Groupe de souris	0	2	4	5	6	8
1	<1[c]	<1	<1	<1	1	1
2	<1	<1	<1	1	1,6	1,6
3	<1	<1	1	1	2,2	2,2
4	<1	<1	<1	1,6	1	1,8
5	<1	<1	<1	1,3	1,8	1,2
Moyenne	-	-	1	1,2	1,5	1,5

a) Des groupes de 5 souris ont été vidés de leur sang et leurs sérums mélangés.

b) Densité optique dans l'essai ELISA sur des sérums à la dilution de 1:800

c) La limite de détection dans l'essai HI correspond à un titre $\log_{10}$ de 1, c'est-à-dire une dilution de 1:10 . Le titre exprimé en tant que $\log_{10}$ de l'inverse de la plus haute dilution montrant l'inhibition de l'hémagglutinine.

TABLEAU 10

Réponse sérologique de cochons d'inde à l'inoculation avec ALVAC-MV (vCP82)

Réponse anti-canaripox

TITRE ELISA	Semaines après inoculation					
Cochon d'inde	0	2	4	5	6	8
1	0,038[a]	0,045	0,111	1,771	1,970	1,856
2	0,010	0,072	0,234	1,768	1,786	1,785
3	-0,011	0,426	0,529	1,567	1,586	1,700
4	0,016	0,045	0,076	1,583	1,696	1,635
5	-0,020	0,012	0,050	1,583	1,859	1,847

Réponse anti-rougeole

TITRE HI	Semaines après inoculation					
Cochon d'inde	0	2	4	5	6	8
1	<1[b]	1,18	1,90	3,11	3,41	3,11
2	<1	<1	1,00	2,20	2,20	2,08
3	<1	<1	1,18	2,51	2,68	2,98
4	<1	<1	<1	1,60	1,90	1,90
5	<1	<1	1,30	1,90	2,20	2,20

a) Densité optique dans un essai ELISA sur du sérum à une dilution de 1:3200 .

b) La limite de détection dans l'essai HI correspond à un titre $\log_{10}$ de 1 , c'est-à-dire une dilution de 1:10. Le titre exprimé comme dans la légende du tableau 9.

TABLEAU 11

Réponse sérologique de lapins à l'inoculation avec ALVAC-MV (vCP82)

Réponse anti-canaripox

TITRE ELISA	Semaines après inoculation					
Lapin	0	2	4	5	6	8
1[a]	-0,009[a]	0,085	0,113	1,953	1,754	1,249
2	-0,002	0,065	0,068	0,717	0,567	0,353
3	-0,003	0,090	0,079	0,921	0,692	0,481
4	-0,005	0,034	0,068	1,558	1,324	1,076
5	-0,003	0,072	0,092	1,785	1,226	0,710

Réponse anti-rougeole

TITRE HI	Semaines après inoculation					
Lapin	0	2	4	5	6	8
1	<1[b]	<1	1,00	2,81	2,51	2,20
2	<1	<1	<1	2,20	1,90	1,60
3	<1	<1	1,30	2,81	2,51	2,38
4	<1	1,30	1,60	3,11	3,11	2,51
5	<1	1,00	1,30	2,68	2,38	1,90

a) Densité optique dans un essai ELISA sur des sérums à une dilution de 1:1600

b) La limite de détection dans l'essai HI correspond à un titre $\log_{10}$ de 1, c'est-à-dire une dilution de 1:10. Le titre exprimé comme dans la légende du tableau 9.

TABLEAU 12

Inoculation de sagouins au moyen d'ALVAC-MV (vCP82) : réponse immunitaire vis-à-vis de l'immunité ALVAC préexistante.

Singe N°	Immunité antérieure aux Poxvirus	Réponse HI anti-rougeole primaire[a]	rappel[b]
36	VV, ALVAC	<1	N.B.
37	VV, ALVAC-RG	<1	N.B.
39	VV, ALVAC-RG, CP-FeLV	1	2,2
40	VV, CP-FeLV	<1	N.B.
42	Aucune	<1	2,2
52	ALVAC	<1	N.B.
53	ALVAC-RG, ALVAC-RG	<1	1,6
56	CP-FeLV	<1	N.B.
58	Aucune	1	2,2

VV : Virus de la vaccine, souche Copenhaguen
ALVAC-RG : ALVAC recombinant exprimant le gène G de la rage
CP-FeLV : Canaripox recombinant exprimant le gène FeLV env
NB : Pas de rappel d'inoculation

a) Les animaux ont reçu 5,8 $\log_{10}$ par voie sous-cutanée.

b) Les animaux 39, 42, 52 et 53 ont reçu une inoculation de rappel au moyen d'une dose identique 15 semaines après la première inoculation.

Clonage et synthèse de l'ADN

On a construit des plasmides qui ont été sélectionnés et cultivés par des procédés standards (Maniatis et al., 1986; Perkus et al., 1985; Piccini et al., 1987). On a obtenu des endonucléases de restriction à partir de GIBCO/BRL; Gaithersburg, MD, New England Biolabs, Beverly, MA; et Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, In. Le fragment de Klenow de E.coli polymérase a été obtenu chez Boehringer Mannheim Biochemicals. L'endonucléase BAL-31 et le phage T4 ADN ligase ont été obtenus à partir de New England Biolabs . Les réactifs ont été utilisés comme spécifiés par les différents fournisseurs .

On a préparé des oligodéoxyribonucléotides synthétiques sur un synthétiseur ADN Biosearch 8750 ou Applied Biosystems 380B comme décrit précédemment (Perkus et al., 1989). Le séquençage de l'ADN a été réalisé par la méthode de terminaison de chaîne didéoxy (Sanger et al., 1977) en utilisant séquanase (Tabor et al., 1987) comme précédemment décrit (Guo et al., 1989) . L'amplification de l'ADN par une réaction en chaîne de polymérase (PCR) pour la vérification de séquence (Engelke et al., 1988) a été réalisée en utilisant des amorces d'oligonucléotide synthétisées sur mesure et le Kit de réactif d'amplification d'ADN GeneAmp (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) dans un cycliseur thermique d'ADN Perkin Elmer Cetus . Les séquences d'ADN en excès ont été supprimées des plasmides par digestion au moyen d'une endonucléase de restriction suivie par une digestion limitée par l'exonucléase BAL-31 et mutagénèse (Mandecki, 1986) en utilisant des oligonucléotides synthétiques.

Cellules , virus et transfection.

Les origines et conditions de culture de la souche Copenhagen du virus de la vaccine ont été précédemment décrites (Guo et al. 1989) . La production du virus recombinant par recombinaison , hybridation in situ de filtres

en nitrocellulose et sélection pour l'activité béta-galactosidase ont été décrits précédemment par (Panicali et all., 1982 ; Perkus et al., 1989).

Construction du Plasmide pSD460 pour supprimer le gène (J2R) de la Thymidine Kinase

En se référant maintenant à la Figure 9, le plasmide pSD406 contient le vaccin HindIII J (pos. 83359 - 88377) cloné en pUC8. pSD406 a été coupé au moyen de HindIII et PvuII et le fragment de 1,7 kb de la partie gauche de HindIII J cloné dans pUC8 coupé au moyen de HindIII/SmaI, en formant pSD447. pSD447 contient le gène entier pour J2R (pos. 83855 - 84385). Le codon d'initiation est contenu dans le site NlaIII et le codon de terminaison est contenu dans le site SspI. La direction de transcription est indiquée par une flèche sur la Figure 9.

Pour obtenir le bras flanquant de gauche, on a isolé un fragment HindIII/EcoRI de 0,8 kb de pSD447 puis on l'a digéré au moyen de NlaIII et isolé un fragment de HindIII/NlaIII de 0,5 kb. Les oligonucléotides synthétiques hybridés MPSYN43/MPSYN44 (SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:18)

```
                                SmaI
MPSYN43  5'      TAATTAACTAGCTACCCGGG      3'
MPSYN44  3' GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA  5'
           NlaIII                    EcoRI
```

ont été unis par ligation avec le fragment HindIII/NlaIII de 0,5 kb en plasmide vecteur pUC18 coupé au moyen de HindIII/EcoRI en engendrant le plasmide pSD449.

Pour obtenir un fragment de restriction contenant un bras de flanc droit de la vaccine et les séquences du vecteur pUC, on a coupé pSD447 au moyen de SspI (partiel) à l'intérieur des séquences de vaccine et HindIII à la jonction pUC/vaccine, et isolé un fragment de vecteur de 2,9 kb. Ce fragment de vecteur a été uni par ligation aux oligonucléotides synthétiques hybridés MPSYN45/MPSYN46 (SEQ ID NO:19/SEQ ID NO:20)

```
                HindIII SmaI
MPSYN45  5'   AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA
MPSYN46  3'       AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT

                          NotI              SspI
            ACGATCTGTAGTTAGCGGCCGCCTAATTAACTAAT  3' MPSYN45
            TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA  5' MPSYN46
```

en engendrant pSD459.

Pour combiner les bras flanquants, de droite et de gauche, en un plasmide, on a isolé à partir de pSD449 un fragment HindIII/SmaI de 0,5 kb et on l'a uni par ligation au plasmide vecteur pSD459 coupé au moyen de HindIII/SmaI, en engendrant le plasmide pSD460. pSD460 a été utilisé en tant que plasmide donneur pour recombinaison avec le virus de la vaccine parent, type sauvage, souche Copenhagen VC-2. Une sonde marquée au phosphore32 a été synthétisée par extension d'amorçe en utilisant MPSYN45 (SEQ ID NO:19) en tant que matrice et l'oligonucléotide 20mer complémentaire MPSYN47 (SEQ ID NO:21) (5'-TTAGTTAATTAGGCGGCCGC-3') en tant qu'amorce. Le virus recombinant vP410 a été identifié par hybridation sur plaque.

Construction du plasmide pSD486 pour suppression de la région hémorragique (B13R + B14R)

En se référant maintenant à la Figure 10, le plasmide pSD419 contient la vaccine SalI G (pos. 160.744-173.351) cloné en pUC8. pSD422 contient le fragment SalI de la vaccine contigüe vers la droite, SalI J (pos. 173.351-182.746) cloné en pUC8. Pour construire un plasmide supprimé pour la région hémorragique u, B13R - B14R (pos. 172.549 - 173.552), pSD419 a été utilisé en tant que source pour le bras de flanc de gauche et pSD442 a été utilisé comme source pour le bras de flanc de droite. La direction de transcription pour la région u est indiquée par une flèche sur la Figure 10.

Pour éliminer les séquences non désirées de pSD419, on a éliminé les séquences vers la gauche du site NcoI (pos. 172.253) par digestion de pSD419 au moyen de NcoI/SmaI, puis par formation

d'une terminaison franche au moyen d'un fragment de Klenow de la E. coli polymérase et ligation, en engendrant le plasmide pSD476. Un bras flanquant droit de la vaccine a été obtenu par digestion de pSD422 au moyen de HpaI au condon de terminaison de B14R et par digestion au moyen de NruI 0,3 kb vers la droite. Ce fragment de 0,3 kb a été isolé et uni par ligation avec un fragment vecteur HincII de 3,4 kb isolé à partir de pSD476, en engendrant le plasmide pSD477. L'emplacement de la suppression partielle de la région u de la vaccine dans pSD477 est indiqué par un triangle. Les séquences de codage B13R restantes dans pSD477 ont été éliminées par digestion au moyen de ClaI/HpaI et le fragment vecteur résultant a été uni par ligation aux oligonucléotides synthétiques hybridés SD22mer/SD20mer (SEQ ID NO:22/SEQ ID NO:23).

```
                ClaI          BamHI HpaI
SD22mer 5'  CGATTACTATGAAGGATCCGTT  3'
SD20mer 3'    TAATGATACTTCCTAGGCAA  5'
```

en engendrant pSD479. pSD479 contient un codon d'initiation (souligné) suivi par un site BamHI. Pour placer E. coli béta-galactosidase dans le locus de suppression B13-B14 (u) sous le contrôle du promoteur u; on a inséré un fragment de BamHI de 3,2 kb, contenant le gène de béta-galactosidase (Shapira et al., 1983), au site BamHI de pSD479, en engendrant pSD479BG. psD479BG a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison avec le virus de la vaccine vP410. Le virus de vaccine recombinant vP433 a été isolé sous la forme d'une plaque bleue en présence de substrat X-gal chromogénique. On a supprimé dans vP533 la région B13R-B14R et on l'a remplacée par de la béta-galactosidase.

Pour enlever des séquences de béta-galactosidase de vP533, on a utilisé le plasmide pSD486, un dérivé de pSD477 contenant une région de polylinker mais aucun codon d'initiation à la jonction de suppression u. On a d'abord uni par ligation le fragment vecteur ClaI/HpaI de pSD477, mentionné ci-dessus, aux oligonucléides synthétiques hybridés SD43mer/SD40mer (SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:25)

```
            ClaI          SacI        XhoI        HpaI
SD42mer 5' CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT 3'
SD40mer 3'   TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCCGAGCTCCCTAGGCAA 5'
                BglII       SmaI        BamHI
```

en engendrant le plasmide pSD478. Ensuite le site EcoRI à la jonction pUC/vaccine a été détruit par digestion de pSD478 au moyen du fragment de Klenow de E. coli polymérase et ligation, en engendrant le plasmide pSD478E$^-$. pSD478E$^-$ a été digéré au moyen de BamHI et HpaI et uni par ligation aux oligonucléotides synthétiques hybridés HEM5/HEM6 (SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:27)

```
          BamHI  EcoRI   HpaI
HEM5 5'   GATCCGAATTCTAGCT  3'
HEM6 3'       GCTTAAGATCGA  5'
```

en engendrant le plasmide pSD486. pSD486 a été utilisé en tant que plasmide donneur pour recombinaison avec le virus de vaccine recombinant vP533, en engendrant vP533 qui a été isolé sous la forme d'une plaque claire en présence de X-gal.

Construction du plasmide pMP494A pour la suppression de la région ATI (A26L)

En se référant maintenant à la Figure 11, pSD414 contient SalI B cloné en pUC8. Pour éliminer les séquences d'ADN non désirées vers la gauche de la région A26L, on a coupé pSD414 au moyen de XbaI à l'intérieur des séquences de vaccine (pos. 137.079) et au moyen de HindIII à la jonction pUC/vaccine, puis on a réalisé une coupure franche au moyen d'un fragment de Klenow de E. coli polymérase et réalisé une ligation, ce qui a donné le plasmide pSD483. Pour éliminer les séquences d'ADN de vaccine non désirées à la droite de la région A26L, on a coupé pSD483 au moyen d'EcoRI (pos. 140.665 et à la jonction pUC/vaccine) et on a uni par ligation, en formant le plasmide pSD484. Pour éliminer la région de codage A26L, on a coupé pSD484 au moyen de NdeI (partiel) légèrement en amont de A26L ORF (pos. 139.004) et avec Hpa (pos. 137.889) légèrement en aval de A26L ORF. Le fragment vecteur de 5,2 kb a été isolé et uni par ligation avec les

oligonucléotides synthétiques hybridés ATI3/ATI4 (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:29)

```
        NdeI
ATI3 5'  TATGAGTAACTTAACTCTTTTGTTAATTAAAAGTATATTCAAAAAATAAGT
ATI4 3'    ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTTATTCA

                BglII EcoRI HpaI
  TATATAAATAGATCTGAATTCGTT  3' ATI3
  ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA  5' ATI4
```

en reconstruisant la région en amont de A26L et en remplaçant A26L ORF par une courte région de polylinker contenant les sites de restriction BglII, EcoRI et HpaI, comme indiqué ci-dessus. Le plasmide résultant a été appelé pSD485. Etant donné que les sites BglII et EcoRI dans la région de polylinker de pSD485 ne sont pas uniques, les sites non désirés BglII et EcoRI ont été eliminés du plasmide pSD483 (décrit ci-dessus) par digestion au moyen de BglII (pos. 140.136) et avec EcoRI à la jonction pUC/vaccine, suivi par formation d'une coupure franche au moyen d'un fragment de Klenow de E. coli polymérase et ligation. Le plasmide résultant a été appelé pSD489. Le fragment ClaI (pos. 137.198°EcoRV (pos. 139.048) de 1,8 kb de pSD489 contenant le A26L ORF a été remplacé par le fragment ClaI/EcoRV contenant le polylinker de 0,7 kb de pSD485 en engendrant pSD492. Les sites BglII et EcoRI dans la région de polylinker de pSD492 sont uniques.

Une cassette BglII de 3,3 kb contenant le gène E. coli béta-galactosidase (Shapira et Al., 1983) sous le contrôle du promoteur de vaccine de 11 kDa (Bertholet et Al., 1985 ; Perkus et Al., 1990) a été insérée dans le site BgII de pSD492 en formant pSD493KBG. Le plasmide pSD493KBG a été utilisé en recombinaison avec le virus de sauvetage vP553. Le virus de vaccine recombinant vP581 contenant la béta-galactosidase dans la région de suppression A26L a été isolé en tant que plaque bleue en présence de X-gal.

Pour engendrer un plasmide pour l'élimination des séquences

de béta-galctosidase du virus de vaccine recombinant vP581, la région de polylinker du plasmide a été supprimée par mutagénèse (Mandeki, 1986) en utilisant l'oligonucléotide synthétique MPSYN177 (SEQ ID NO:30) (5'-AAAATGGGCGTGGATTGTTAACTTTATATAACTTATTTTTGAATATAC-3'). Dans le plasmide résultant pMP494 , les positions (137.889 - 138.937) entourant l'ADN de la vaccine, comprenant tout le A26L ORF sont supprimées. La recombinaison entre pMP494 et la béta-galactosidase contenant la vaccine recombinante vP581 a résulté dans le mutant de suppression de la vaccine, vP618, qui a été isolé sous la forme d'une plaque claire en présence e X-gal. Construction du plasmide pSD467 pour la suppression du gène de l'hémagglutinine (A56R).

En se référant maintenant à la Figure 12, le fragment de restriction SalI G de la vaccine (pos. 160.744-173.351) traverse la jonction HindIII A/B (pos. 162.539). pSD419 contient SalI G de la vaccine cloné en pUCB. La direction de transcription pour le gène d'hémagglutinine (HA) est indiquée par une flèche sur la Figure 12. Les séquences de vaccine dérivées de HindIII B sont éliminées par digestion de pSD419 avec HindIII à l'intérieur des séquences de vaccine et la jonction pUC/vaccine, suivie par une ligation. Le plasmide résultant, pSD456 contient le gène HA, A56R, flanqué par 0,4 kb de séquences de vaccine vers la gauche et 0,4 kb de séquences de vaccine vers la droite. Les séquences de codage A56R sont éliminées par coupure de pSD456 au moyen de RsaI (partie ; pos. 161.090) en amont des séquences de codage A56R et au moyen de EagI (pos. 162.064) au voisinage de l'extrémité du gène. Le fragment vecteur RsaI/EagI de 3,6 kb de pSD456 a été isolé et uni par ligation avec les oligonucléotides synthétiques hybridés MPSYN59 (SEQ ID NO:31), MPSYN62 (SEQ ID NO:32), MPSYN60 (SEQ ID NO:33), et MPSYN61 (SEQ ID NO:34)

```
            RsaI
MPSYN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGA-
MPSYN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTCATAAACCTTTCAAAATATCCATCAACTATCT 5'

MPSYN59    -ACAAAATACATAATTT 3'

                                                      BglII
MPSYN60 5'                    TGTAAAAATAAATCACTTTTTATACTAAGATCT-
MPSYN61 3'  TGTTTTATGTATTAAAACATTTTTATTTAGTGAAAAATATGATTCTAGA-
            SmaI  PstI  EagI
MPSYN60    -CCCGGGCTGCAGC     3'
MPSYN61    -GGGCCCGACGTCGCCGG 5'
```

en reconstruisant les séquences d'ADN en amont de A56R ORF et en remplaçant le A56R ORF par une région de polylinker comme indiqué ci-dessus. Le plasmide résultant est pSD466. La suppression de la vaccine dans pSD466 comprend les positions (161.185-162.053). Le site de la suppression dans pSD466 est indiqué par un triangle sur la figure 12.

Une cassette BglII/BamHI (partiel) de 3,2 kb contenant le gène de E. coli béta-galactosidase (Shapira et Al., 1983) sous le contrôle du promoteur de la vaccine de 11 kDa (Bertholet et Al., 1985 ; Guo et Al.; 1989) a été insérée dans le site BgiII de pSD456 en formant pSD466KBG. Le plasmide pSD466KBG a été utilisé en recombinaison avec la virus de sauvetage vP618. Le virus recombinant de la vaccine, vP708, contenant la béta-galactosidase dans la suppression A56R, a été isolé en tant que plaque bleue en présence de X-gal.

Les séquences de béta-galactosidase ont été supprimées de vP708 en utilisant le plasmide donneur pSD467. pSD467 est identique à pSD466,+ excepté que les sites EcoRI, SmaI et BamHI ont été supprimés de la jonction pUC/vaccine par digestion de pSD466 au moyen d'EcoRI/BamHI suivie par la formation d'une coupure franche au moyen du fragment de Klenow de E. coli polymérase et ligation. La recombinaison entre vP708 et pSD467 a résulté dans le mutant de suppression de vaccine recombinante

vP723, qui a été isolé en tant que plaque claire en présence de X-gal.

Construction du plasmide pMPCSK1Δ pour la suppression des cadres de lecture ouverts (C7L-K1L)

En se référant maintenant à la Figure 13, les clones de vaccine ci-après ont été utilisés dans la construction de pMPCSK1Δ. pSD420 est cloné par SalI H en pUC8. pSD435 est cloné par KpnI F en pUC18. pSD435 est coupé au moyen de SphI et re-soumis à ligation en formant pSD451. Dans pSD451 les séquences d'ADN à la gauche du site SphI (pos. 27.416) dans HindIII M sont supprimés (Perkus et Al., 1990). pSD409 est cloné par HindIII M en pUC8.

Pour fournir un substrat pour la suppression de la grappe de gène (C7L-K1L) à partir de la vaccine, on a d'abord inséré l'E. coli béta-galactosidase dans le locus de suppression M2L de la vaccine (Guo et Al., 1990) comme suit. Pour éliminer le site BglII de pSD409, le plasmide a été coupé au moyen de BglII dans les séquences de vaccine (pos. 28.212) et au moyen de BamHI à la jonction pUC/vaccine, puis soumis à une ligation pour former le plasmide pMP409B. pMP409B a été coupé au site unique SphI (pos. 27.416). Les séquences de codage M2L ont été supprimées par mutagénèse (Guo et Al., 1990 ; Mandecki, 1986) en utilisant l'oligonucléotide synthétique

BglII

MPSYN82 (SEQ ID NO:35) 5' TTTCTGTATATTTGCACCAATTTAGATCTTACTCAAAA TATGTAACAATA 3'

Le plasmide résultant, pMP409D, contient un site BglII unique inséré dans le locus de suppression M2L comme indiqué précédemment. Une cassette BamHI (partiel)/BglII de 3,2 kb contenant le gène de E. coli béta-galactosidase (Shapira et Al., 1983) sous le contrôle du promoteur de 11 kDA (Bertholet et Al., 1985) a été inséré dans pMP409D coupé au moyen de BglII. Le plasmide résultant, pMP409DBG (Guo et Al., 1990), a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison au moyen du virus de la vaccine de sauvetage vP723. Le virus de vaccine recombinant, vP744, contenant la béta-galactosidase insérée dans le locus de

suppression M2L, a été isolé sous la forme d'une plaque bleue en présence de X-gal.

Un plasmide supprimé en ce qui concerne les gènes de vaccine (C7L-K1L) a été assemblé en pUC8 coupé au moyen de SmaI, HindIII et terminé par une coupure franche au moyen du fragment de Klenow de E. coli polymérase. Le bras flanquant gauche consistant en séquences HindIII C de la vaccine a été obtenu en digérant pSD420 au moyen de XbaI (pos. 18.628) suivie de la formation d'une coupure franche au moyen du fragment de Klenow de E. coli polymérase et digestion par BglII (pos. 19.706). Le bras flanquant de droite consistant en séquences HindIII K de la vaccine a été obtenu par digestion de pSD451 au moyen de BglII (pos. 29.062) et EcoRV (pos. 29.778). Le plasmide résultant, pMP5812CK, est privé des séquences de vaccine entre le site BglII (pos. 19706) dans HindIII C et le site GblII (pos. 29.062) dans HindIII K. Le site de suppression des séquences de vaccine du plasmide pMP581CK est indiqué par un triangle sur la Figure 13.

Pour enlever l'excès d'ADN à la jonction de suppression de la vaccine, le plasmide pMP581CK a été coupé aux sites NcoI dans les séquences de vaccine (pos. 18.811 ; 19.655), traité au moyen d'exonucléase Bal-31 et soumis à la mutagénèse (Mandecki, 1986) en utilisant l'oligonucléotide synthétique MPSYN233 (SEQ ID NO:36) 5'-TGTCATTTAACACTATACTCATATTAATAAAAATAATATTTATT-3'. Le plasmide résultant pMPCSKi , est débarassé des positions 18.805-29.108, de séquence de vaccine, entourant 12 cadres de lecture ouverts de la vaccine (C7L - K1L). La recombinaison entre pMPCSK1 et la vaccine recombinante contenant la béta-galactosidase, vP784, a résulté dans le mutant de suppression de la vaccine, vP804, qui a été isolé en tant que plaque claire en présence de X-gal.

Construction du plasmide pSD548 pour la suppression de l'importante sous-unité ribonucléotide réductase (IAL)

En se référant maintenant à la Figure 14, le plasmide pSD405 contient la vaccine HindIII I (pos. 63.875-70.367) clonée en pUC8. PSD405 a été digéré au moyen de EcoRV dans les séquences de

la vaccine (pos. 67.933) et au moyen de SmaI à la jonction pUC/vaccine et uni par ligation, en formant le plasmide pSD518. pSD518 a été utilisé comme source de tous les fragments de restriction de vaccine utilisé dans la construction de pSD548.

Le gène I4L de vaccine s'étend de la position 67.371 à la position 65.059. La direction de transcription pour I4L est indiquée par une flèche sur la Figure 14. Pour obtenir un fragment de plasmide vecteur débarassé d'une portion des séquences de codage I4L, on a digéré pSD518 au moyen de BamHI (pos. 65.381) et HpaI (pos. 67.001) et on a réalisé une coupure franche en utilisant un fragment de Klenow de E. coli polymérase. Ce fragment de vecteur de 4,8 kb a été uni par ligation avec une cassette de SmaI de 3,2 kb contenant le gène de E. coli béta-galactosidase (Shapira et Al., 1983) sous le contrôle du promoteur de 11 kDa de vaccine (Bertholet et Al., 1985 ; Perkus et Al., 1990) en donnant le plasmide pSD524KBG. pSD524KBG a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison avec le virus de la vaccine vP804. Le virus de vaccine recombinant, vP855, contenant la béta-galactosidase en une suppression partielle du gène I4L, a été isolé sous la forme d'une plaque bleue en présence de X-gal.

Pour supprimer la béta-galactosidase et les restant de I4L ORF de vP855, on a construit le plasmide de suppression pSD548. Les bras flanquants à droite et à gauche de la vaccine ont été assemblés séparément en pUCB comme détaillé ci-après et ceci est représenté schématiquement sur la Figure 14.

Pour construire un plasmide vecteur afin d'accepter le bras flanquant de gauche de la vaccine, pUC8 a été coupé au moyen de BamHI/EcoRI et uni par ligation avec les nucléotides synthétiques hybridés 518A1/518A2 (SE ID NO:37/SEQ ID NO:38)

```
          BamHI   RsaI
518A1 5' GATCCTGAGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT
518A2 3'     GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA

                    BglII    EcoRI
          TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG       3'  518A1
          AACTCTTATTTTTCTAGAATCCTTAA   5'  518A2
```

en formant le plasmide pSD531. pSD531 a été coupé au moyen de RsaI (partiel) et BamHI et le fragment de vecteur de 2,è kb a été isolé. pSD518 a été coupé au moyen de BglII (pos. 64.459)/RsaI (pos. 64.994) et un fragment de 0,5 kb a été isolé. Les deux fragments ont été unis par ligation entre eux, en formant pSD537, qui contient le bras de flanc complet à gauche des séquences de codage IAL.

Pour construire un plasmide vecteur pour accepter le bras de flanc de droite de la vaccine, on a coupé pUC8 au moyen de BamHI/ecoRI et on l'a uni par ligation avec les oligonucléotides synthétiques hybridés 518B1/518B2 (SQ ID NO:39/SEQ ID NO:40)

```
            BamHI BglII SmaI
518B1 5'   GATCCAGATCTCCCGGGAAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAGGGATTT
518B2 3'       GTCTAGAGGGCCCTTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATCCCTAAA
                        RsaI   EcoRI
           GACGTATGTAGCGTACTAGG      3'  518B1
           CTGCATACTACGCATGATCCTTAA  5'  518B2
```

en formant le plasmide pSD532. pSD532 a été coupé avec RsaI (partiel)/EcoRI et un fragment de vecteur de 2,7 kb a été isolé. On a coupé pSD518 au moyen de RsaI dans les séquences de la vaccine (pos. 67.436) et EcoRI à la jonction vaccine/pUC, et on a isolé un fragment de 0,6 kb. Les deux fragments ont été unis par ligation, en formant pSD538, qui contient le bras flanquant complet de la vaccine à droite des séquences de codage I4L.

Le bras flanquant de droite de la vaccine a été isolé en tant que fragment EcoRI/BglII de 0,6 kb de pSD538 et uni par ligation dans le plasmide vecteur pSD537 coupé au moyen

d'EcoRI/BglII. Dans le plasmide résultant, pSD539, le I4L ORF (pos. 65.047-67.386) a été remplacé par une région de polylinker, qui est flanquée par 0,6 kb d'ADN de vaccine à gauche et 0,6 kb d'ADN de vaccine à droite, le tout dans une base pUC. Le site de suppression à l'intérieur des séquences de la vaccine est indiqué par un triangle sur la Figure 14. Pour éviter une recombinaison possible des séquences de béta-galactosidase dans la portion dérivée du pUC de pSD539 avec les séquences de béta-galactosidase dans le virus de vaccine recombinant vP855, la cassette de suppression I4L de la vaccine a été déplacée de pSD539 à pRC11, un dérivé de pUC dont toutes les séquences de béta-galatosidase ont été supprimées et remplacées par une région de polylinker (Colinas et Al., 1990). On a coupé pSD539 au moyen de EcoRI/PstI et isolé le fragment de 1,2 kb. Ce fragment a été uni par ligation dans pRC11 coupé par EcoRI/PstI (2,35 kb), en formant pSD548. La recombinaison entre pSD548 et la béta-galactosidase contenant le recombinant de la vaccine, vP855 a résulté dans le mutant de suppression de la vaccine, vP866, qui a été isolé en tant que plaque claire en présence de X-gal.

L'ADN du virus de vaccine recombinant vP866 a été analysé par digestions de restriction suivis d'électrophorèse sur un gel d'agarose. les formes ou figures de restriction étaient telles qu'attendues. Des réactions en chaîne de polymérase (PCR) (Engelke et Al., 1988) en utilisant vP866 en tant que matrice et les amorces flanquant les six locus de suppression détaillées ci-dessus ont produit des fragments d'ADN ayant les dimensions désirées. l'analyse de séquences des fragments engendrés de PCR autour des zones des jonctions de suppression a confirmé que les jonctions étaient telles qu'attendues. Le virus de vaccine recombinant, vP866, contenant les six suppressions formées, comme décrit ci-dessus, a été désigné souche de vaccin contre la vaccine "NYVAC."

Exemples 16 - Construction de NYVAC-MV recombinant exprimant les glycoprotéines de fusion et d'hémagglutinine de la rougeole

Des copies de cADN des séquences codant les protéines HA et F du virus MV de la rougeole (souche Edmonston) ont été insérées dans NYVAC pour créer un double recombinant appelé NYVAC-MV (vP913). Le recombinant exprime authentiquement les deux glycoprotéines de la rougeole sur la surface de cellules infectées.

Une analyse d'immunoprécipitation a démontré le traitement correct des glycoprotéines tant F que HA. Le recombinant a également montré qu'il induisait la formation de syncyties.

Cellules et Virus

Le virus de sauvetage utilisé dans la production de NYVAC-MV était constitué par la souche Copenhagen modifiée du virus de la vaccine désigné par NYVAC. Tous les virus ont été cultivés et titrés sur des monocouches de cellules de Véro.

Construction de plasmide

En se référant maintenant à la Figure 15 et à Taylor et Al. (1991), le plasmide pSPM2LHA contient tout le gène HA de la rougeole uni dans une configuration précise ATG à ATG avec le virus promoteur H6 du virus de la vaccine qui a été précédemment décrit (Taylor et Al., 1988a,b, ; Guo et Al., 1989 ; Perkus et Coll., 1989). Un fragment EcoRV/SmaI de 1,8 kpb, contenant les 24 bp les plus 3' du promoteur H6 fusionné en une configuration précise ATG:ATG avec le gène HA ne comportent pas les 26 bp les plus 3', a été isolé à partir de pSMP2LHA. Ce fragment a été utilisé pour remplacer le fragment EcoRV/SmaI de 1,8 kbp de pSPMHA11 (Taylor et Al., 1991) pour engendrer pRW803. Le plasmide pRW803 contient la totalité du promoteur H6 lié précisément au gène HA entier de la rougeole.

Le plasmide pSD513CVQ a été dérivé du plasmide pSD460 par l'addition de séquences de polylinker (segment de liaison multisites). Le plasmide pSD460 a été dérivé pour permettre la suppression du gène de thymidine kinase à partir du virus de la vaccine (Figure 9).

Pour insérer le gène F du virus de la rougeole dans le plasmide d'insertion HA, on a réalisé des manipulations sur

pSPHMF7. Le plasmide pSPHMF7 (Taylor et Al., 1991) contient le gène F de la rougeole juxtaposé en 3' au promoteur H6 du virus de la vaccine décrit précédemment. En vue d'obtenir une configuration parfaite ATG à ATG et éliminer des séquences intermédiaires entre l'extrémité 3' du promoteur et l'ATG du gène F de la rougeole, on a réalisé une mutagénèse dirigée par oligonucléotides en utilisant le nucléotide SPMAD (SEQ ID NO:41).

Le plasmide résultant a été désigné pSPMF75M20.

Le plasmide pSPMF75M20 qui contient le gène F de la rougeole, maintenant lié en une configuration précise ATG à ATG avec le promoteur H6 a été digéré au moyen de NruI et EagI. Le fragment de 1,7 kbp a éxtrémité" franche conteant les 27 bp les plus 3' du promoteur H6 et le gène de fusion dans sa totalité ont été isolés et insérés dans le plasmide intermédiaire pRW823 qui a été digéré au moyen de NruI et XbaI et terminé par une coupure franche. Le plasmide résultant, pRW841, contient le promoteur H6 réuni au gène F de la rougeole dans le plasmide vecteur pIBI25 (IBI, New Haven, CT). La cassette H6/F de la rougeole a été excisée à partir de pRW841 par digestion au moyen de SmaI et le fragment de 1,8 kb résultant a été inséré dans pRW843 (contenant le gène HA de la rougeole). On a d'abord digéré le plasmide pRW843 au moyen de NotI et on l'a terminé par une coupure franche au moyen du fragment de Klenow d'E. coli ADN polymérase en présence de 2mM dNTPs. Le plasmide résultant, pRW857, contient donc les gènes F et HA du virus de la rougeole liés dans une configuration queue à queue. Les deux gènes sont liés au promoteur H6 du virus de la vaccine.

Développement de NYVAC-MV

Le plasmide pRW857 a été transfecté en cellules de Véro infectée par NYVAC (vP866) en utilisant la méthode de précipitation par phosphate de calcium précédemment décrite (Panicali et Al., 1982; Piccini et Al., 1987). Des plaques positives ont été choisies sur la base d'hybridation sur plaque in situ pour des sondes spécifiques, marquées radio-activement,

de MV F et HA et soumises à 6 étapes séquentielles de purification sur plaque jusqu'à ce qu'on ait obtenu une population pure. Une plaque représentative a été ensuite amplifiée et le recombinant résultant a été appelé NYVAC-MV (vP913).

Immunofluorescence

Une immunofluorescence indirecte a été réalisée comme décrit précédemment (Taylor et Al., 1990). Les réactifs mono-spécifiques utilisés étaient des sérums engendrés par inoculation de lapins au moyen de recombinants du canarypox exprimant soit les gènes F soit les gènes HA de la rougeole.

Immunoprécipitation

Les réactions d'immunoprécipitation ont été réalisées comme décrit précédemment (Taylor et Al., 1990) en utilisant du sérum anti-rougeole de cochon d'inde (Whittaker M.A. Bioproducts, Walkersville, MD).

Expérience de fusion de cellules

Des monocouches de cellules de Véro dans des boîtes de 60 mm ont été inoculées avec une multiplicité de 1 pfu par cellule au moyen des virus parents et recombinants. Après une heure d'absorption à 37°C, on a enlevé l'inoculum, remplacé le milieu de recouvrement et inoculé les boîtes pendant la nuit à 37°C. 20 heures après l'injection on a examiné les boîtes.

En vue de déterminer que les produits d'expression tant du gène F que du gène HA du virus de la rougeole étaient présents sur la surface cellulaire infectée, une analyse d'immunofluorescence indirecte a été réalisée en utilisant des sérums monospécifiques engendrés chez des lapins contre des canarypox recombinants exprimant soit les gènes F soit les gènes HA de la rougeole. Les résultats ont indiqué que les produits de gènes F aussi bien que HA étaient exprimés sur la surface cellulaire infectée, comme démontré par une fluorescence de surface importante avec les deux sérums monospécifiques. Aucune tache d'arrière-plan n'était évidente avec aucun des deux sérums sur des cellules inoculées au moyen de la souche NYVAC parente,

et il n'y avait pas de tache de réaction croisée lorsque les sérums monospécifiques étaient essayés contre les recombinants individuels de la vaccine exprimant soit le gène HA soit le gène F.

Pour démontrer que les protéines exprimées par NYVAC-MV étaient immuno-réactives vis-à-vis des sérums spécifiques du virus de la rougeole et étaient traités authentiquement dans les cellules infectées, une analyse d'immunoprécipitation a été réalisée. Des monocouches de cellules de Vero ont été inoculées au moyen d'une multiplicité de 10 pfu par cellule de virus parent ou recombinant en présence de ^{35}S-méthionine. L'analyse d'immunoprécipitation a révélé une glycoprotéine HA d'approximativement 76 kDa et les produits de fusion coupés F_1 et F_2 avec des poids moléculaires de 44 kDa et 24 kDa, respectivement. On n'a pas détecé de produits spécifiques de la rougeole dans les cellules de Véro non infectées ou les cellules de Véro infectées avec le virus NYVAC parent.

Une caractéristique de la cytopathologie MV est la formation de syncyties qui se produit par fusion de cellules infectées avec les cellules environnantes, infectées ou non infectées, suivie par la migration des noyaux vers le centre du syncytium (Norrby et Al., 1982). On a montré que ceci était une méthode importante de prolifération du virus qui, pour les Paramyxovirus, peut se produire en présence d'anti-corps neutralisant les virus HA spécifiques (Merz et Al., 1980). En vue de déterminer que les protéines de MV exprimées dans le virus de la vaccine étaient fonctionnellement actives, les mono-couches de cellules de Véro ont été inoculées au moyen de NYVAC et NYVAC-MV et observées pour des effets cytopathiques. Une activité de fusion de cellules importante a été mise en évidence dans les cellules de Véro infectées par NYVAC-MV approximativement 18 heures après infection. Aucune activité de fusion de cellules n'a été mise en évidence dans les cellules infectées avec NYVAC parent.

<u>Résultats d'analyse sérologique de sérums de lapin inoculés au moyen des NYVAC-MV (vP913)</u>

Dans cette étude, deux lapins ont été inoculés au moyen de $1x10^8$ pfu de NYVAC-MV (vP913) par voie sous-cutanée. Après 28 jours, les animaux ont reçu une inoculation de rappel au moyen d'une dose équivalente. Des saignées en série ont été analysées au point de vue activité de neutralisation de MV en utilisant la méthode de réduction sur plaque. Les résultats sont montrés dans le tableau 13. Ces résultats indiquent qu'aucun des lapins n'a répondu à l'inoculation initiale de NYVAC-MV. Cependant, la réponse fortement accrue après la seconde inoculation indique que les animaux étaient "amorcés" ou "initiés". Deux animaux ont obtenus des titres d'anti-corps neutralisant dans le domaine de protection.

L'analyse in vivo de l'immunogénicité de ALVAC-MV (vCP82), montrée dans l'exemple 14, indique que, lors de l'inoculation d'une gamme d'espèces, le recombinant est capable d'induire une réponse sérologique qui est mesurable par des tests sérologiques classiques. Les titres obtenus sont dans le domaine exigé pour la protection vis-à-vis de la maladie. L'inoculation de NYVAC-MV (vP913) à des lapins induit de manière semblable un niveau d'anti-corps neutralisant le virus de la rougeole qui constitue une protection.

TABLEAU 13

Titres (log_{10}) d'anti-corps neutralisant anti-rougeole dans des sérums de lapins inoculés au moyen de NYVAC-MV (vP913)

	Titre au bout de semaines après inoculation					
Animal	WO	W2	WA[c]	W5	W6	W7
Lapin a A116	1	1	1	2,8[b]	2,2	2,2
A117	1	1	1	1,9	1,9	1,9

a) Les lapins ont reçu 8,0 log_{10} pfu de NYVAC-MV (vP913) par la voie sous-cutanée.

b) Titre exprimé en tant que log_{10} de l'inverse de la dernière dilution montrant une réduction de 50ù dans le nombre sur plaque tel que comparé au sérum avant inoculation.

c) Les animaux ont reçu une nouvelle inoculation au bout de 28 jours.

L'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation décrits, mais elle en comprend les modifications et variantes à la portée de l'homme de l'art, la portée de l'invention n'étant limitée que par les revendications ci-après.

REFERENCES

1. Adams, J.M., and D.T. Imagawa, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **96**, 240-244 (1957).

2. Albrecht, P., K. Herrman, and G.R. Burns, J. Virol. Methods **3**, 251-260 (1981).

3. Alkhatib, G., and D. Briedis, Virology **150**, 479-490 (1986).

4. Alkhatib, G., C. Richardson, and S-H. Shen, Virology **175**, 262-270 (1990).

5. Appel, M.J.G., and O.R. Jones, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **126**, 571-574 (1967).

6. Appel, M.J.G., and D.S. Robson, Am. J. Vet. Res. **34**, 1459-1463 (1973).

7. Avery, R.J., and J. Niven, Infect. Immun. **26**, 795-801 (1979).

8. Baker, J.A., B.E. Sheffy, D.S. Robson, J. Gilmartin, Cornell Vet (USA) 56, 588-594 (1966).

9. Bertholet, C., R. Drillien, and R. Wittek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 2096-2100 (1985).

10. Bestetti, G., R. Fatzer, and R. Frankhauser, Acta Neuropathol. **43**, 69-75 (1978).

11. Black, F.L., L.L. Berman, M. Libel, C.A. Reichelt, F. de P. Pinheiro, A.T. da Rosa, F. Figuera, and E.S. Gonzales, Bull, W.H.O. **62**, 315-319 (1984).

12. Bush, M., R.J. Montali, D. Brownstein, A.E. James, Jr., and M.J.G. Appel, J. Am. Vet. Med. Assoc. **169**, 959-960 (1976).

13. Carpenter, J.W., M.J.G. Appel, R.C. Erickson, and M.N. Novilla, J. Am. Vet. Med. Assoc. **169**, 961-964 (1976).

14. Choppin, P.W., C.D. Richardson, D.C. Merz, W.W. Hall, and A. Scheid, J. Infect. Dis. **143**, 352-363 (1981).

15. Clewell, D.B., J. Bacteriol. **110**, 667-676 (1972).

16. Clewell, D.B., and D.R. Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **62**, 1159-1166 (1969).

17. Colinas, R.J., R.C. Condit, and E. Paoletti, Virus Research **18**, 49-70 (1990).

18. DeLay, P.D., S.S. Stone, D.T. Karzon, S. Katz, and J. Enders, Am. J. Vet. Res. **26**, 1359-1373 (1965).

19. Diallo, A., Vet. Micro. **23**, 155-163 (1990).

20. Dowling, P.C., B.M. Blumberg, J. Menonna, J.E. Adamus, P. Cook, J.C. Crowley, D. Kolakofsky, and S.D. Cook, J. Gen. Virol. **67**, 1987-1992 (1986).

21. Drillien, R., D. Spehner, A. Kirn, P. Giraudon, R. Buckland, F. Wild, and J.P. Lecocq, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 1252-1256 (1988).

22. Engelke, D.R., P.A. Hoener, and F.S. Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 544-548 (1988).

23. Fenner, F., P.A. Bachmann, E.P.J. Gibbs, F.A. Murphy, M.J. Studdert, and D.O. White, In Veterinary Virology, ed. F. Fenner, (Academic Press, Inc., New York) pp. 485-503 (1987).

24. Gillespie, J.H., and D.T. Karzon, Proc. Soc. Exp. Biol Med. **105**, 547-551 (1960).

25. Giraudon, P., Ch. Gerald, and T.F. Wild, Intervirology **21**, 110-120 (1984).

26. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, and E. Paoletti, Virology **179**, 247-266 (1990a).

27. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, and E. Paoletti, Virology **179**, 517-563 (1990b).

28. Graves, M.C., S.M. Silver, and P.W. Choppin, Virology **86**, 254-263 (1978).

29. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, and E. Paoletti, J. Virol. **63**, 4189-4198 (1989).

30. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, J. Taylor, E. Norton, G. Allen, B. Languet, P. Desmettre, and E. Paoletti, J. Virol. **64**, 2399-2406 (1990).

31. Hall, W.W., R.A. Lamb, and P.W. Choppin, Virology **100**, 433-449 (1980).

32. Hartley, W.J., Vet. Path. **11**, 301-312 (1974).

33. Imagawa, D.T., P. Goret, and J.M. Adams, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **46**, 1119-1123 (1960).

34. Karzon, D.T., Pediatrics **16**, 809-818 (1955).

35. Karzon, D.T., Annals of the N.Y. Academy of Sci. **101**, 527-539 (1962).

36. Kazacos, K.R., H.L. Thacker, H.L. Shivaprasad, and P.P. Burger, J. Am. Vet. Med. Assoc. **179**, 1166-1169 (1981).

37. Kingsbury, D.W., M.A. Bratt, P.W. Choppin, R.P. Hanson, T. Hosaka, V. ter Meulen, E. Norrby, W. Plowright, R. Rott, and W.H. Wunner, Intervirology **10**, 137-152 (1978).

38. Kunkel, T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 488-492 (1985).

39. Lennon, J.L., and F.L. Black, J. Ped. **108**, 671-676 (1986).

40. Mandecki, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7177-7181 (1982).

41. Mandecki, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7177-7181 (1986).

42. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pages (1982).

43. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 545 pages (1986).

44. Merz, D.C., A. Schied, and P. Choppin, J. Exp. Med. **151**, 275-288 (1980).

45. Moura, R.A., and J. Warren, J. Bact. **82**, 702-705 (1961).

46. Norrby, E., and Y. Gollmar, Infect. Immun. **11**, 231-239 (1975).

47. Norrby, E., G. Enders-Ruckle, and V. ter Meulen, J. Infect. Dis. **132**, 262-269 (1975).

48. Norrby, E., S.N. Chen, T. Togashi, H. Shesberadaran, and K.P. Johnson, Archives of Virology **71**, 1-11 (1982).

49. Norrby, E., and M.N. Oxman, In Fields Virology 2nd Ed., B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. (Raven Press, NY) pp. 1013-1044 (1990).

50. Novick, S.L. and D. Hoekstra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 7433-7437 (1988).

51. Orvell, C., and E. Norrby, J. Gen. Virol. **50**, 231-245 (1980).

52. Panicali, D., and E. Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4927-4931 (1982).

53. Paterson, R.G., and R.A. Lamb, Cell **48**, 441-452 (1987).

54. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas, and E. Paoletti, Science **229**, 981-984 (1985).

55. Perkus, M.E., K. Limbach, and E. Paoletti, J. Virol. **63**, 3829-3836 (1989).

56. Perkus, M.E., S.J. Goebel, S.W. Davis, G.P Johnson, K. Limbach, E.K. Norton, and E. Paoletti, Virology **179**, 276-286 (1990).

57. Phillips, T.R., J.L. Jensen, M.J. Rubino, W.C. Yang, and R.D. Schultz, Can. J. Vet. Res. **53**, 154-160 (1989).

58. Piccini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, In Methods in Enzymology, Vol. 153, eds. Wu, R., and Grossman, L., (Academic Press) pp. 545-563 (1987).

59. Preblud, S.R., and S.L. Katz, In Vaccines, eds. S.A. Plotkin and E.A. Mortimer, (W.B. Saunders Co.) pp. 182-222 (1988).

60. Richardson, C.D., A. Berkovich, S. Rozenblatt, and W. Bellini, J. Virol. **54**, 186-193 (1985).

61. Richardson, C., D. Hull, P. Greer, K. Hasel, A. Berkovich, G. Englund, W. Bellini, B. Rima, and R. Lazzarini, Virology **155**, 508-523 (1986).

62. Roberts, J.A., J. Immunol. **94**, 622-628 (1965).

63. Rosel, J.L., P.L. Earl, J.P. Weir, and B. Moss, J. Virol. **60**, 436-449 (1986).

64. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467 (1977).

65. Shapira, S.K., J. Chou, F.V. Richaud, and M.J. Casadaban, Gene **25**, 71-82 (1983).

66. Spehner, D., R. Drillien, and J.P. Lecocq, J. Virol. **64**, 527-533 (1990).

67. Stephenson, J.R. and V. ter Meulen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76**, 6601-6605 (1979).

68. Tabor, S., and C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 4767-4771 (1987).

69. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R.G. Webster, and E. Paoletti, Vaccine **6**, 504-508 (1988a).

70. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, P. Desmettre, and E. Paoletti, Vaccine **6**, 497-503 (1988b).

71. Taylor, J., C. Edbauer, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, E. Norton, S. Goebel, P. Desmettre, and E. Paoletti, J. Virol. **64**, 1441-1450 (1990).

72. Taylor, J., S. Pincus, J. Tartaglia, C. Richardson, G. Alkhatib, D. Briedis, M. Appel, E. Norton, and E. Paoletti, J. Virol. **65**, 4263-4272 (1991).

73. Tizard, I., J. Am. Vet. Med. Assoc. **196**, 1851-1858 (1990).

74. Vialard, J., M. Lalumiere, T. Vernet, D. Briedis, G. Alkhatib, D. Henning, D. Levin, and C. Richardson, J. Virol. **64**, 37-50 (1990).

75. Warren, J., M.K. Nadel, E. Slater, and S.J. Millian, Amer. J. Vet. Res. **21**, 111-119 (1960).

76. Wild, T.F., E. Malvoisin, and R. Buckland, J. Gen. Virol. **72**, 439-442 (1991).

77. Wild, F., P. Giraudon, D. Spehner, R. Drillien, and J-P. Lecocq, Vaccine **8**, 441-442 (1990).

78. Yuen, L., and B. Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6417-6421 (1987).

REVENDICATIONS

1. Poxvirus recombinant caractérisé en ce qu'il contient de l'ADN codant pour au moins deux immunogènes de Morbillivirus en une région non essentielle du génome du poxvirus .

2. Poxvirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit Morbillivirus est le virus de la rougeole .

3. Poxvirus recombinant selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'un des deux immunogènes pour lesquels ledit ADN code est la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole .

4. Poxvirus recombinant selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'un des deux immunogènes pour lesquels ledit ADN code est la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

5. Poxvirus recombinant selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit ADN code pour deux glycoprotéines du virus de la rougeole .

6. Poxvirus recombinant selon la revendication 5 , caractérisé en ce que lesdites glycoprotéines du virus de la rougeole sont la glycoprotéine d'hémagglutinine et la glycoprotéine de fusion .

7. Poxvirus recombinant selon la revendication 2 , caractérisé en ce que ledit ADN est exprimé chez un hôte et en ce que l'expression inclue la production d'une glycoprotéine du virus de la rougeole .

8. Poxvirus recombinant selon la revendication 7 , caractérisé en ce que ladite glycoprotéine du virus de la rougeole est la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole .

9. Poxvirus recombinant selon la revendication 7 , caractérisé en ce que ladite glycoprotéine du virus de la rougeole est la glycoprotéine de fusion du virus de la

rougeole .

10.Poxvirus recombinant selon la revendication 2 , caractérisé en ce que ledit ADN est exprimé chez un hôte par la production de deux glycoprotéines du virus de la rougeole .

11. Poxvirus recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce que lesdites glycoprotéines du virus de la rougeole sont la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole et la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole.

12. Poxvirus recombinant selon la revendication 1 , caractérisé en ce que le poxvirus est un virus de la vaccine .

13.Poxvirus recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que le poxvirus est un avipox virus.

14.Poxvirus recombinant selon la revendication 13 , caractérisé en ce que l'avipox virus est un canarypox virus .

15. Poxvirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit ADN est introduit dans ledit poxvirus par recombinaison .

16. Poxvirus recombinant caractérisé en ce qu'il contient de l'ADN codant pour au moins deux immunogènes de Morbillivirus et un promoteur pour exprimer ledit ADN .

17. Vaccin pour induire une réponse immunologique chez un animal hôte inoculé au moyen dudit vaccin, caractérisé en ce qu'il comprend un véhicule et un poxvirus recombinant contenant, dans une région non essentielle de celui-ci, de l'ADN codant pour au moins deux immunogènes de Morbillivirus.

18. Vaccin selon la revendication 17 caractérisé en ce que le Morbillivirus est le virus de la rougeole .

19. Vaccin selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'au moins un des deux immunogènes pour lesquels ledit ADN code et est exprimé , est la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole .

20. Vaccin selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'au moins un des deux immunogènes pour lesquels ledit ADN

code et est exprimé , est la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

21. Vaccin selon la revendication 18 caractérisé en ce que ledit ADN code pour et exprime deux glycoprotéines du virus de la rougeole .

22. Vaccin selon la revendication 21 caractérisé en ce que lesdites glycoprotéines du virus de la rougeole sont la glycoprotéine d'hémagglutinine et la glycoprotéine de fusion.

23. Vaccin selon la revendication 17 caractérisé en ce que le poxvirus est un virus de la vaccine .

24. Vaccin selon la revendication 17 caractérisé en ce que le poxvirus est un avipox virus .

25. Vaccin selon la revendication 24 caractérisé en ce que l'avipox virus est un canarypox virus .

26. Vaccin selon la revendication 17 caractérisé en ce que ledit ADN est introduit dans ledit poxvirus par recombinaison .

27. Composition pour protéger un chien contre la maladie des chiens , caractérisé en ce qu'elle comprend un poxvirus recombinant contenant de l'ADN codant pour un immunogène de Morbillivirus dans une région non essentielle du génome du poxvirus .

28. Composition selon la revendication 27 caractérisé en ce que ledit Morbillivirus est le virus de la rougeole .

29. Composition selon la revendication 28 caractérisé en ce que ledit ADN code pour la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole .

30. Composition selon la revendication 28 caractérisé en ce que ledit ADN code pour la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

31. Composition pour la protection d'un chien contre la maladie des chiens , caractérisée en ce qu'elle comprend un virus recombinant de la vaccine ou un avipox virus recombinant contenant de l'ADN d'un Morbillivirus, qui est le virus de la

rougeole , et en ce que ledit ADN code pour la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole .

32. Canarypox virus recombinant contenant de l'ADN du virus de la rougeole dans une région non essentielle du génome du canarypox virus , ledit ADN codant pour une glycoprotéine du virus de la rougeole telle que le glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole , la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole et la combinaison de la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole et de la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

33. Canarypox virus recombinant selon la revendication 32 dans lequel l'ADN code pour la glycoprotéine hémagglutinine du virus de la rougeole .

34. Canarypox virus recombinant selon la revendication 32 dans lequel l'ADN code pour la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

35. Canarypox virus recombinant selon la revendication 32 dans lequel l'ADN code pour la glycoprotéine hémagglutinine du virus de la rougeole et la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

36. Canarypox virus recombinant selon la revendication 32, caractérisé en ce que ledit ADN est exprimé dans un hôte et en ce que l'expression inclut la production de glycoprotéine du virus de la rougeole .

37. Canarypox virus recombinant selon la revendication 32 caractérisé en ce que ledit ADN est introduit dans ledit canarypox virus par recombinaison .

38. Canarypox virus recombinant selon la revendication 32 qui est le vCP82.

39. Canarypox virus recombinant contenant de l'ADN du virus de la rougeole et un promoteur pour l'expression de l'ADN , ledit ADN codant pour une glycoprotéine du virus de la rougeole telle que la glycoprotéine hémagglutinine du virus de la rougeole , la glycoprotéine de fusion du virus de la

rougeole , et la combinaison de la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole et de la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

40. Vaccin pour l'induction d'une réponse immunologique dans un animal hôte inoculé avec ledit vaccin , ledit vaccin comprenant un véhicule et un canarypox virus recombinant contenant , dans une région non essentielle de l'ADN du virus de la rougeole , ledit ADN codant pour une glycoprotéine du virus de la rougeole telle que la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole, la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole , et la combinaison de la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole et de la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

41. Vaccin selon la revendication 40 caractérisé en ce que l'ADN code pour la glycoprotéine d'hémagglutinine du virus de la rougeole .

42. Vaccin selon la revendication 40 caractérisé en ce que l'ADN code pour la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

43. Vaccin selon la revendication 40 caractérisé en ce que l'ADN code pour la combinaison de la glycoprotéine hémagglutinine du virus de la rougeole et de la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

44. Vaccin selon la revendication 40 caractérisé en ce que le canarypox virus recombinant est le vCP82.

45. Vaccin selon la revendication 40 caractérisé en ce que ledit ADN est introduit dans ledit canarypox virus par recombinaison .

46. Composition pour la protection d'un chien contre la maladie des chiens , caractérisée en ce qu'elle comprend un canarypox virus recombinant contenant de l'ADN du virus de la rougeole qui code pour la glycoprotéine de fusion du virus de la rougeole .

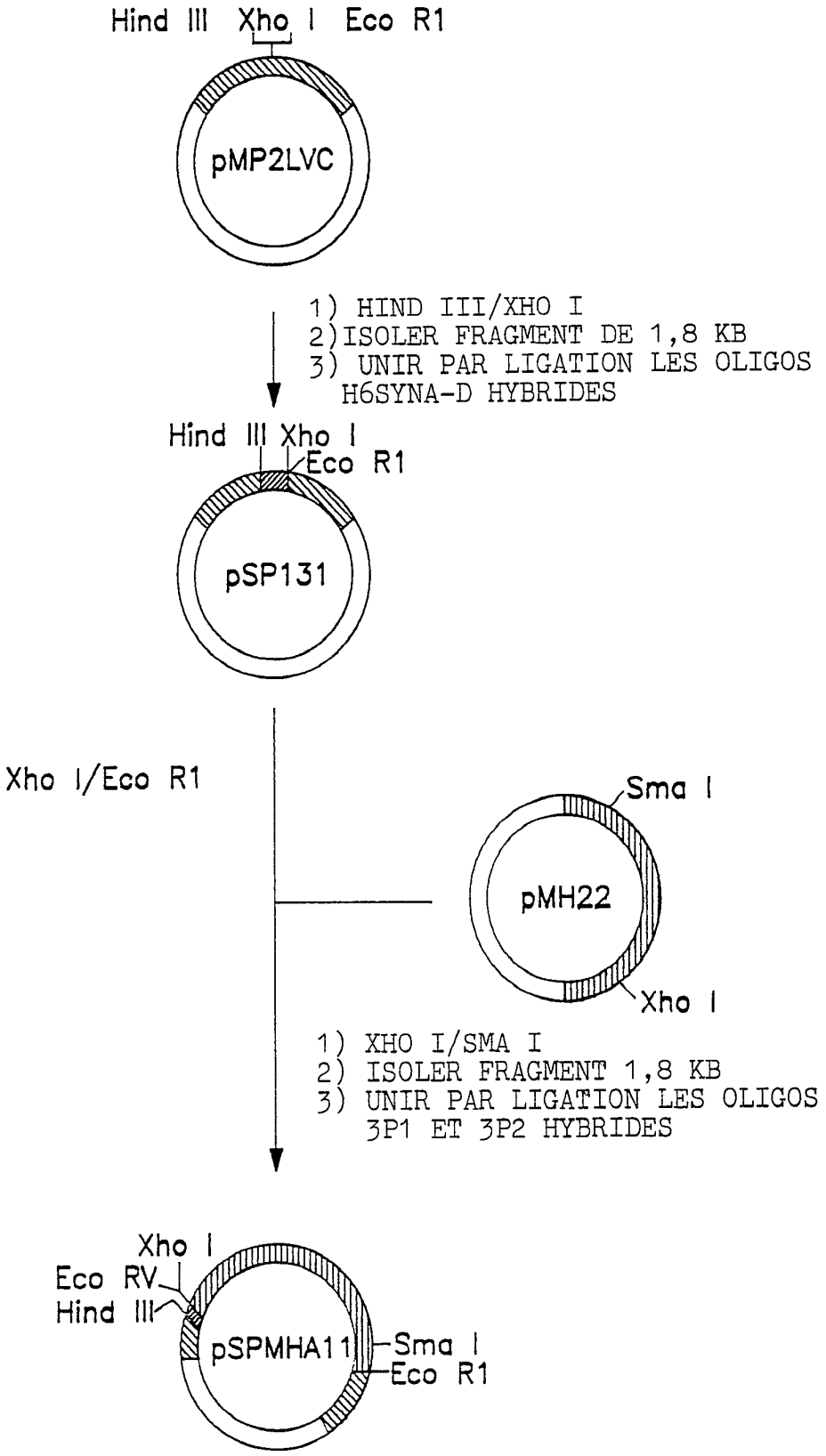
Hind III
Xho I
Eco R1
pMP2LVC
1) HIND III/XHO I
2)ISOLER FRAGMENT DE 1,8 KB
3) UNIR PAR LIGATION LES OLIGOS
H6SYNA-D HYBRIDES
Hind III
Xho I
Eco R1
pSP131
Xho I/Eco R1
Sma I
pMH22
Xho I
1) XHO I/SMA I
2) ISOLER FRAGMENT 1,8 KB
3) UNIR PAR LIGATION LES OLIGOS
3P1 ET 3P2 HYBRIDES
Xho I
Eco RV
Hind III
pSPMHA11
Sma I
Eco R1

FIG. 1A

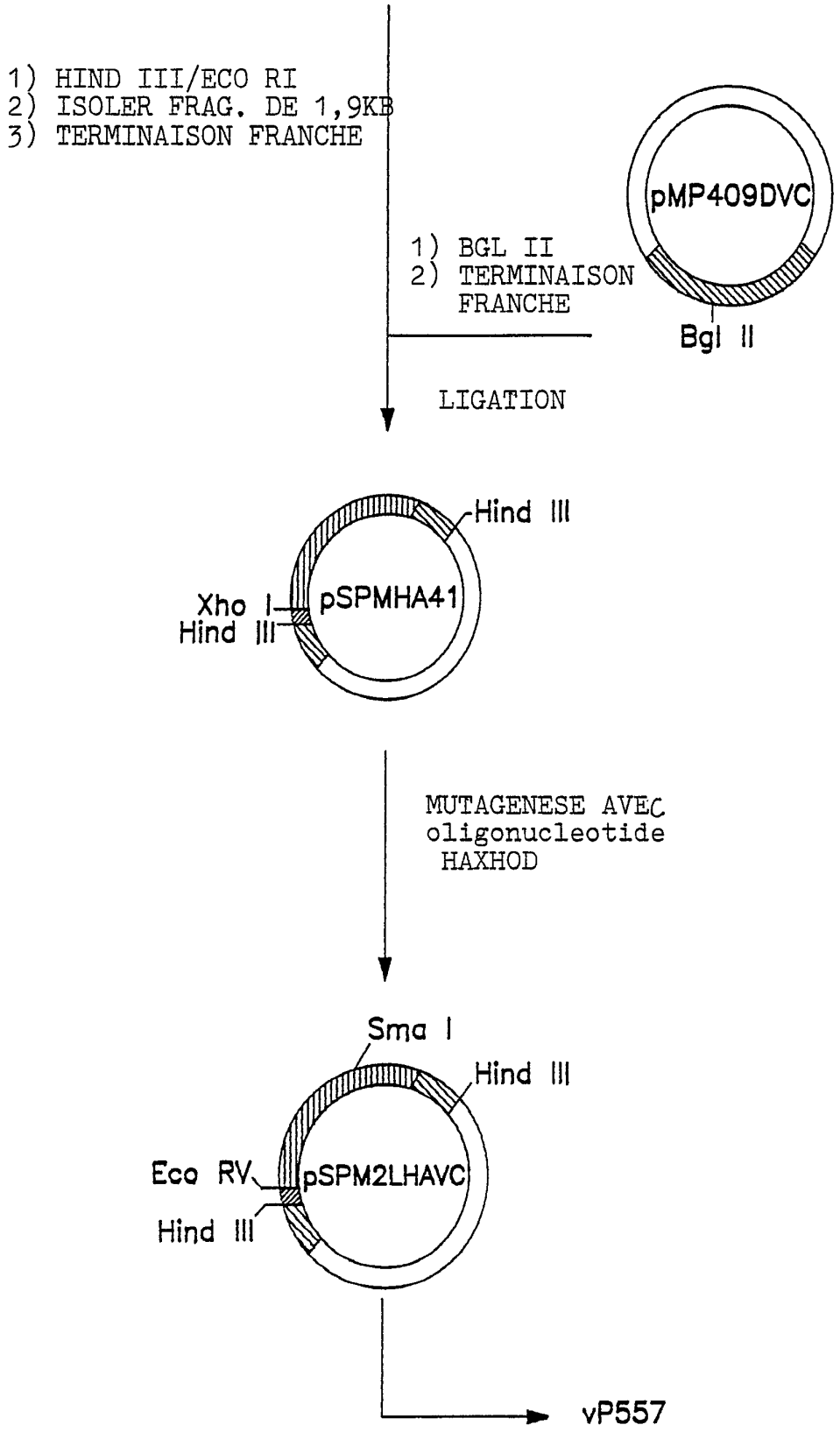
1) HIND III/ECO RI
2) ISOLER FRAG. DE 1,9KB
3) TERMINAISON FRANCHE
pMP409DVC
1) BGL II
2) TERMINAISON FRANCHE
Bgl II
LIGATION
Hind III
Xho I
Hind III
pSPMHA41
MUTAGENESE AVEC oligonucleotide HAXHOD
Sma I
Hind III
Eco RV
Hind III
pSPM2LHAVC
vP557

FIG. 1B

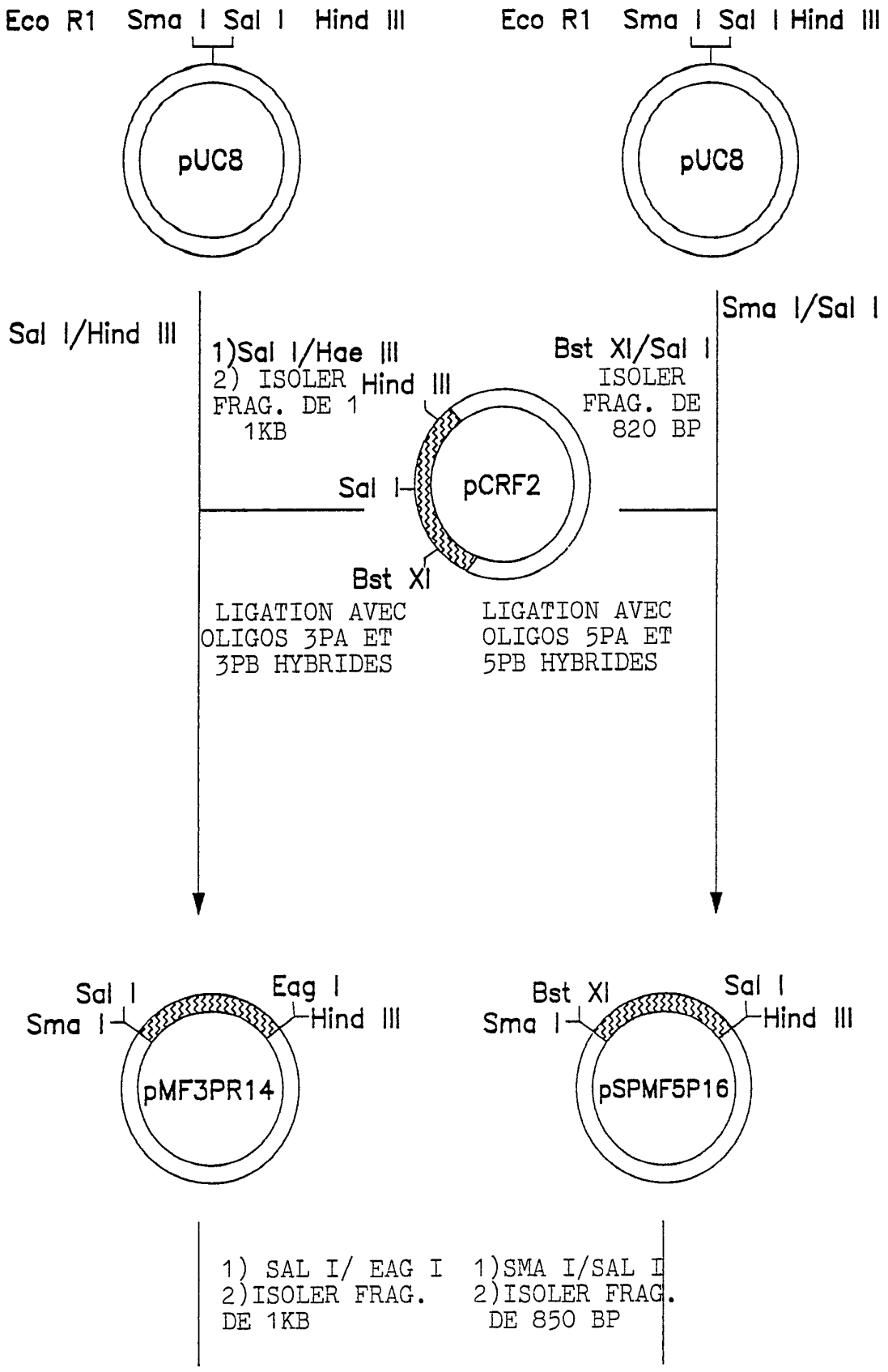
Eco R1
Sma I
Sal I
Hind III
pUC8
Eco R1
Sma I
Sal I
Hind III
pUC8
Sal I/Hind III
1)Sal I/Hae III
2) ISOLER FRAG. DE 1 1KB
Hind III
Sal I
pCRF2
Bst XI
Bst XI/Sal I
ISOLER FRAG. DE 820 BP
Sma I/Sal I
LIGATION AVEC OLIGOS 3PA ET 3PB HYBRIDES
LIGATION AVEC OLIGOS 5PA ET 5PB HYBRIDES
Sal I
Sma I
Eag I
Hind III
pMF3PR14
Bst XI
Sma I
Sal I
Hind III
pSPMF5P16
1) SAL I/ EAG I
2)ISOLER FRAG. DE 1KB
1)SMA I/SAL I
2)ISOLER FRAG. DE 850 BP

FIG. 2A

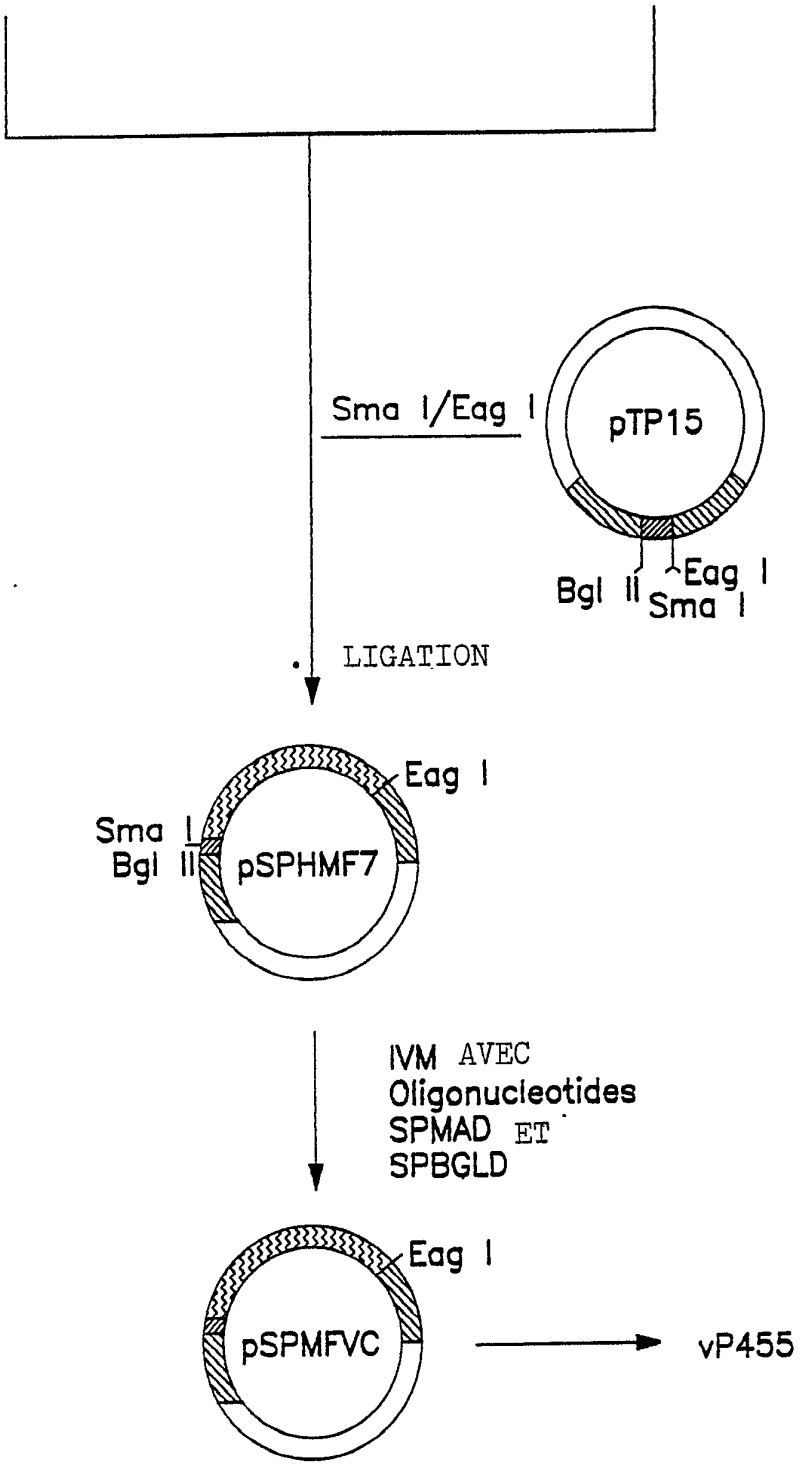
Sma I/Eag I
pTP15
Bgl II
Eag I
Sma I
LIGATION
Eag I
Sma I
Bgl II
pSPHMF7
IVM AVEC
Oligonucleotides
SPMAD ET
SPBGLD
Eag I
pSPMFVC
vP455

FIG. 2B

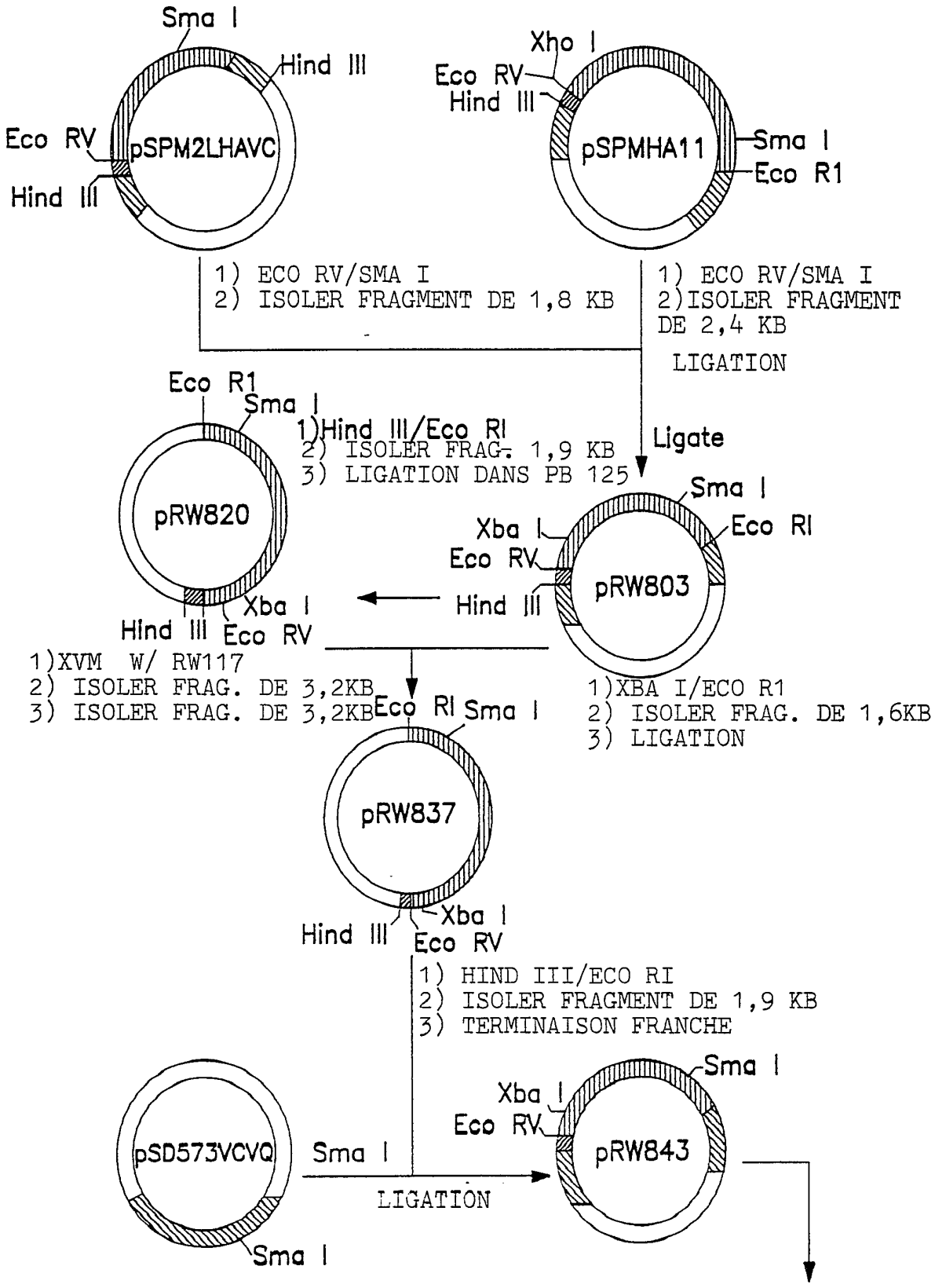
Sma I
Hind III
Eco RV
pSPM2LHAVC
Hind III
Xho I
Eco RV
Hind III
pSPMHA11
Sma I
Eco R1
1) ECO RV/SMA I
2) ISOLER FRAGMENT DE 1,8 KB
1) ECO RV/SMA I
2)ISOLER FRAGMENT DE 2,4 KB
LIGATION
Ligate
Eco R1
Sma I
pRW820
Hind III
Eco RV
Xba I
1)Hind III/Eco RI
2) ISOLER FRAG. 1,9 KB
3) LIGATION DANS PB 125
Sma I
Xba I
Eco RI
Eco RV
pRW803
Hind III
1)XVM W/ RW117
2) ISOLER FRAG. DE 3,2KB
3) ISOLER FRAG. DE 3,2KB
1)XBA I/ECO R1
2) ISOLER FRAG. DE 1,6KB
3) LIGATION
Eco RI
Sma I
pRW837
Hind III
Xba I
Eco RV
1) HIND III/ECO RI
2) ISOLER FRAGMENT DE 1,9 KB
3) TERMINAISON FRANCHE
Sma I
Xba I
Eco RV
pRW843
pSD573VCVQ
Sma I
LIGATION
Sma I
vP756

FIG. 3

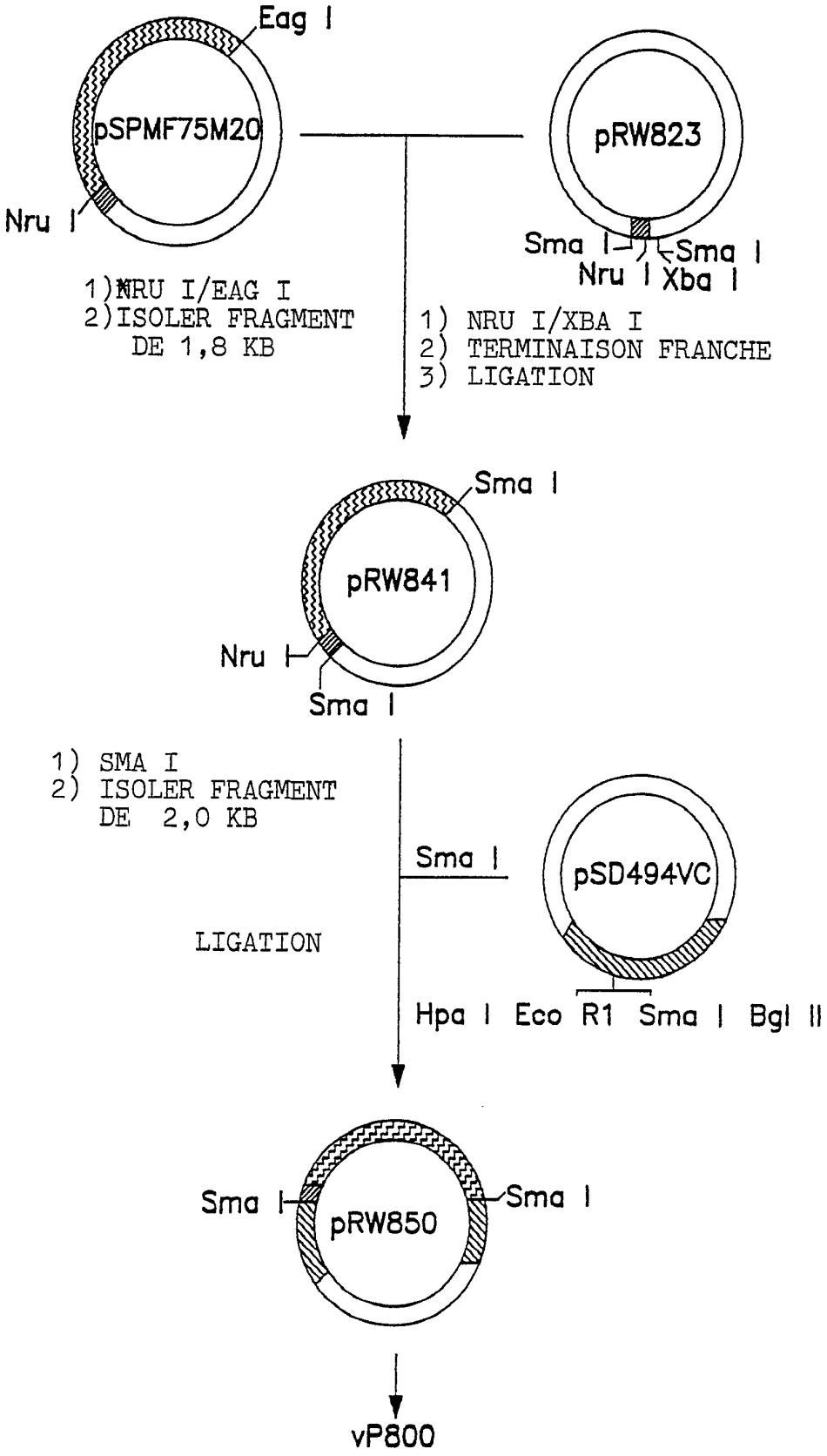
Eag I
pSPMF75M20
Nru I
1)NRU I/EAG I
2)ISOLER FRAGMENT
DE 1,8 KB
pRW823
Sma I
Sma I
Nru I
Xba I
1) NRU I/XBA I
2) TERMINAISON FRANCHE
3) LIGATION
Sma I
pRW841
Nru I
Sma I
1) SMA I
2) ISOLER FRAGMENT
DE 2,0 KB
Sma I
pSD494VC
LIGATION
Hpa I
Eco R1
Sma I
Bgl II
Sma I
pRW850
Sma I
vP800

FIG. 4

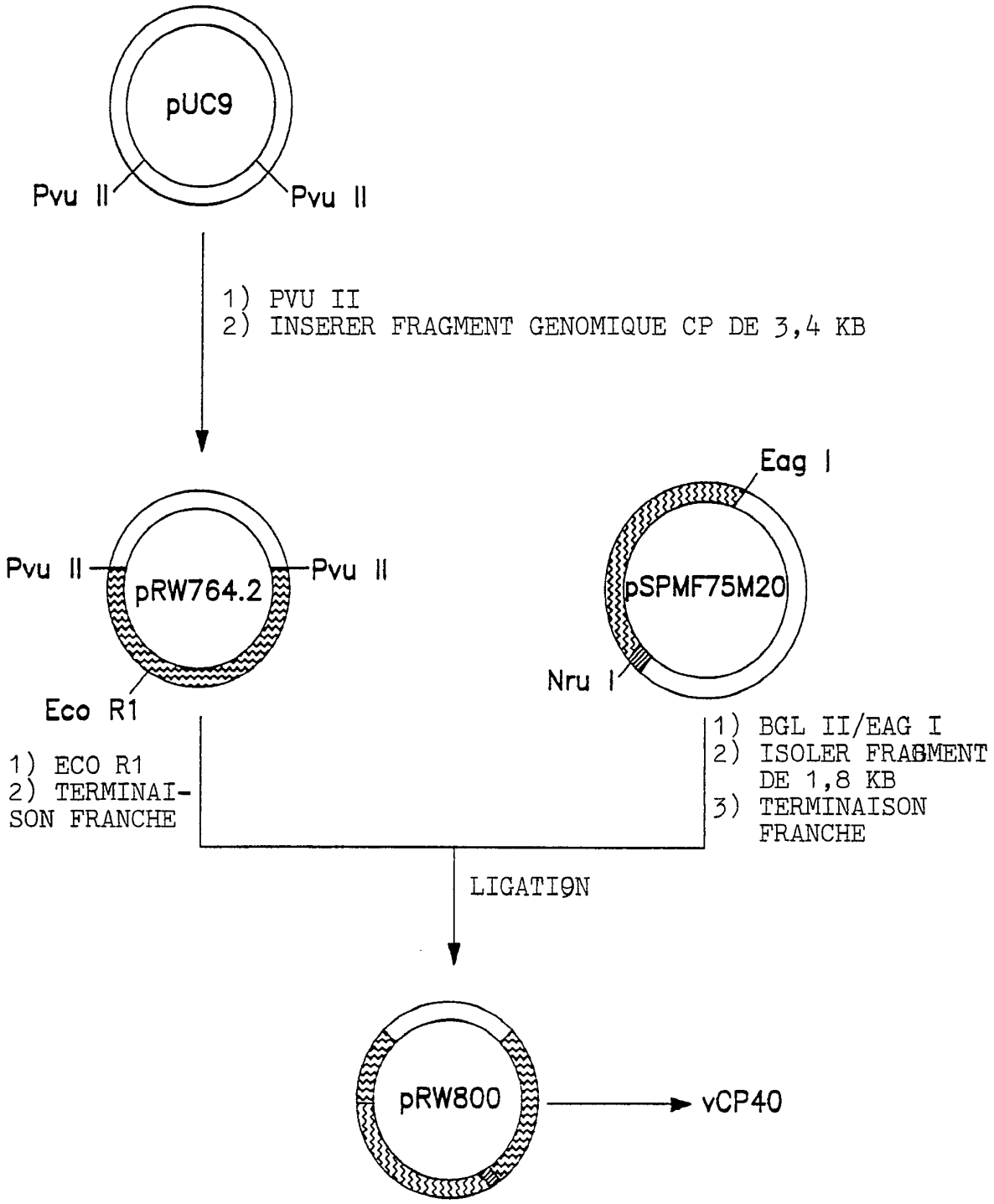
pUC9
Pvu II
Pvu II
1) PVU II
2) INSERER FRAGMENT GENOMIQUE CP DE 3,4 KB
Eag I
Pvu II
pRW764.2
Pvu II
pSPMF75M20
Nru I
Eco R1
1) ECO R1
2) TERMINAI-
SON FRANCHE
1) BGL II/EAG I
2) ISOLER FRAGMENT
DE 1,8 KB
3) TERMINAISON
FRANCHE
LIGATION
pRW800
vCP40

FIG. 5

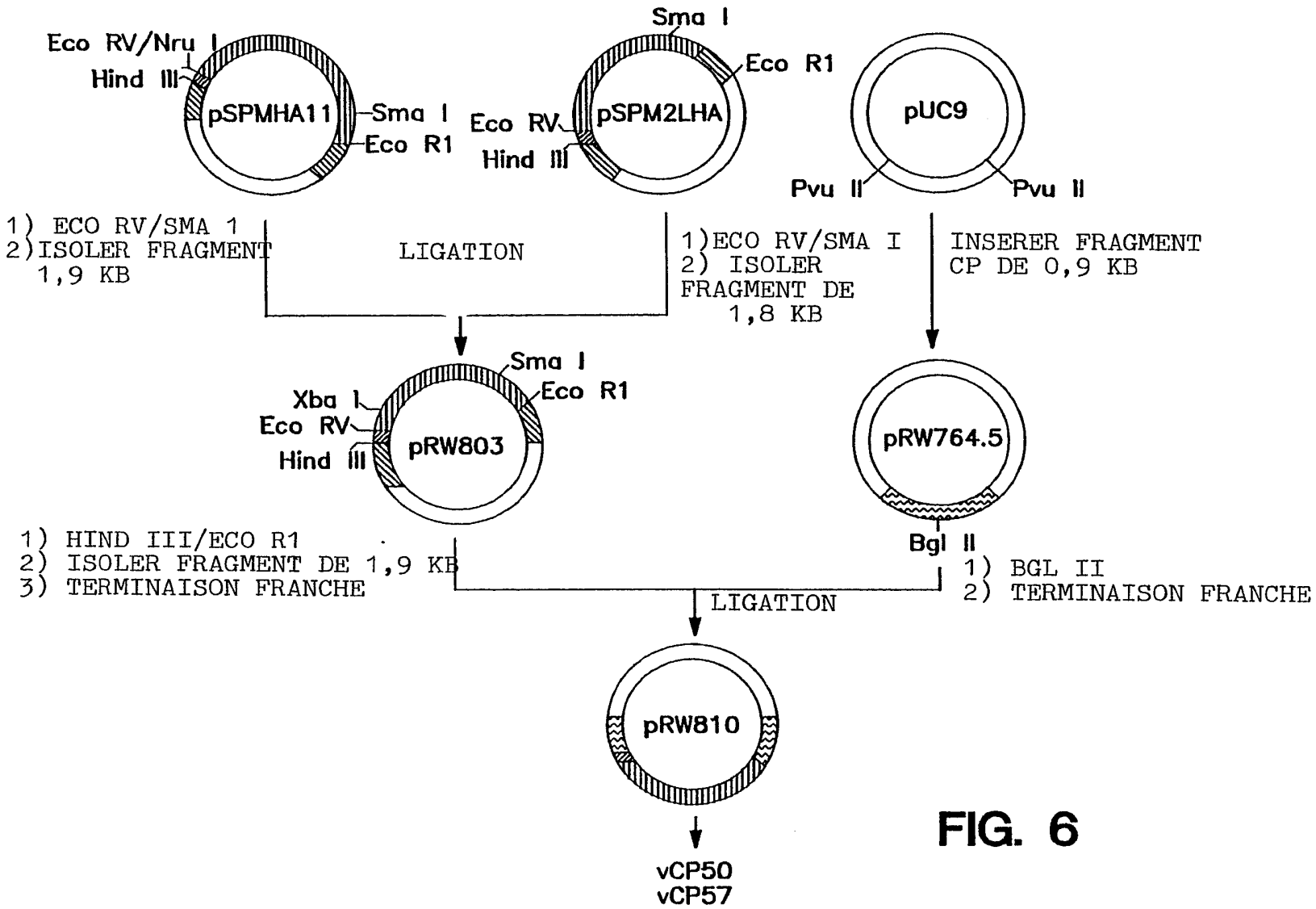
Eco RV/Nru I
Hind III
pSPMHA11
Sma I
Eco R1
Sma I
Eco R1
Eco RV
pSPM2LHA
Hind III
pUC9
Pvu II
Pvu II
1) ECO RV/SMA 1
2)ISOLER FRAGMENT
1,9 KB
LIGATION
1)ECO RV/SMA I
2) ISOLER
FRAGMENT DE
1,8 KB
INSERER FRAGMENT
CP DE 0,9 KB
Sma I
Eco R1
Xba I
Eco RV
Hind III
pRW803
pRW764.5
Bgl II
1) HIND III/ECO R1
2) ISOLER FRAGMENT DE 1,9 KB
3) TERMINAISON FRANCHE
LIGATION
1) BGL II
2) TERMINAISON FRANCHE
pRW810
vCP50
vCP57

FIG. 6

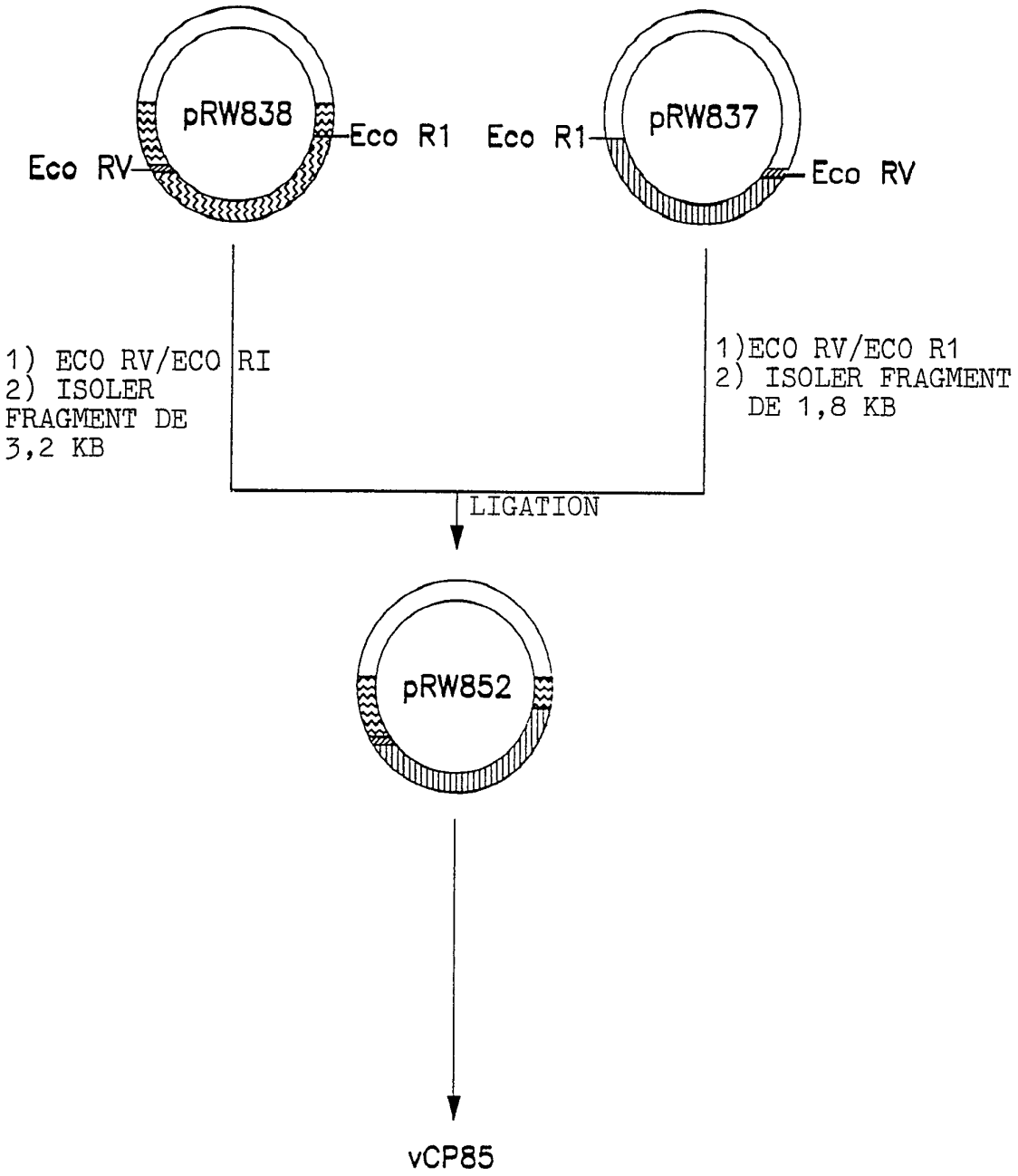
pRW838
Eco R1
Eco RV
pRW837
Eco R1
Eco RV
1) ECO RV/ECO RI
2) ISOLER FRAGMENT DE 3,2 KB
1)ECO RV/ECO R1
2) ISOLER FRAGMENT DE 1,8 KB
LIGATION
pRW852
vCP85

FIG. 7

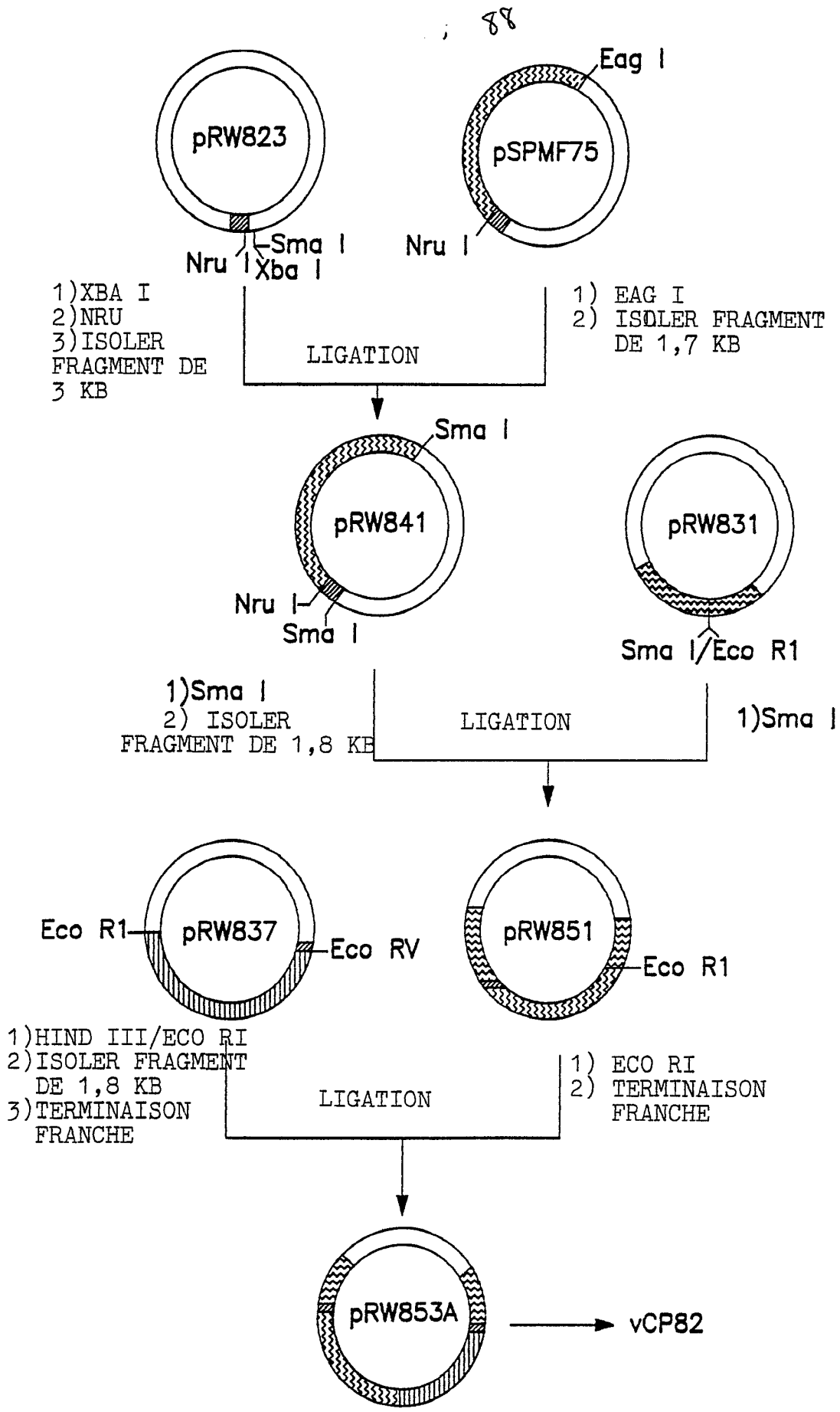
88
pRW823
Eag I
pSPMF75
Sma I
Nru I
Xba I
Nru I
1)XBA I
2)NRU
3)ISOLER
FRAGMENT DE
3 KB
LIGATION
1) EAG I
2) ISOLER FRAGMENT
DE 1,7 KB
Sma I
pRW841
pRW831
Nru I
Sma I
Sma I/Eco R1
1)Sma I
2) ISOLER
FRAGMENT DE 1,8 KB
LIGATION
1)Sma I
Eco R1
pRW837
Eco RV
pRW851
Eco R1
1)HIND III/ECO RI
2)ISOLER FRAGMENT
DE 1,8 KB
3)TERMINAISON
FRANCHE
LIGATION
1) ECO RI
2) TERMINAISON
FRANCHE
pRW853A
vCP82

FIG. 8

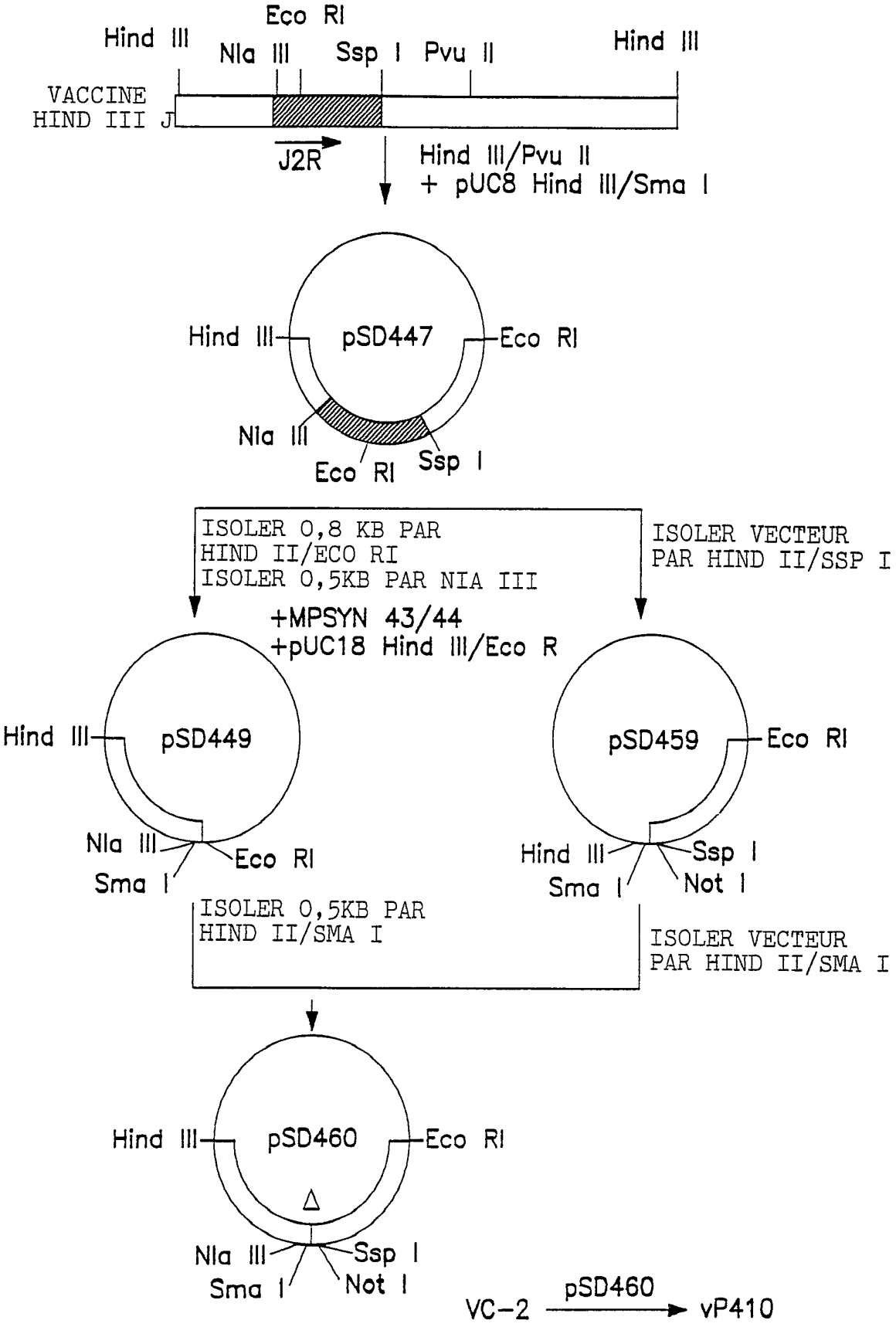
Eco RI
Hind III
Nla III
Ssp I
Pvu II
Hind III
VACCINE
HIND III J
J2R
Hind III/Pvu II
+ pUC8 Hind III/Sma I
Hind III
pSD447
Eco RI
Nla III
Eco RI
Ssp I
ISOLER 0,8 KB PAR
HIND II/ECO RI
ISOLER 0,5KB PAR NIA III
ISOLER VECTEUR
PAR HIND II/SSP I
+MPSYN 43/44
+pUC18 Hind III/Eco R
Hind III
pSD449
Nla III
Eco RI
Sma I
pSD459
Eco RI
Hind III
Ssp I
Sma I
Not I
ISOLER 0,5KB PAR
HIND II/SMA I
ISOLER VECTEUR
PAR HIND II/SMA I
Hind III
pSD460
Eco RI
Δ
Nla III
Ssp I
Sma I
Not I
VC-2
pSD460
vP410

FIG. 9

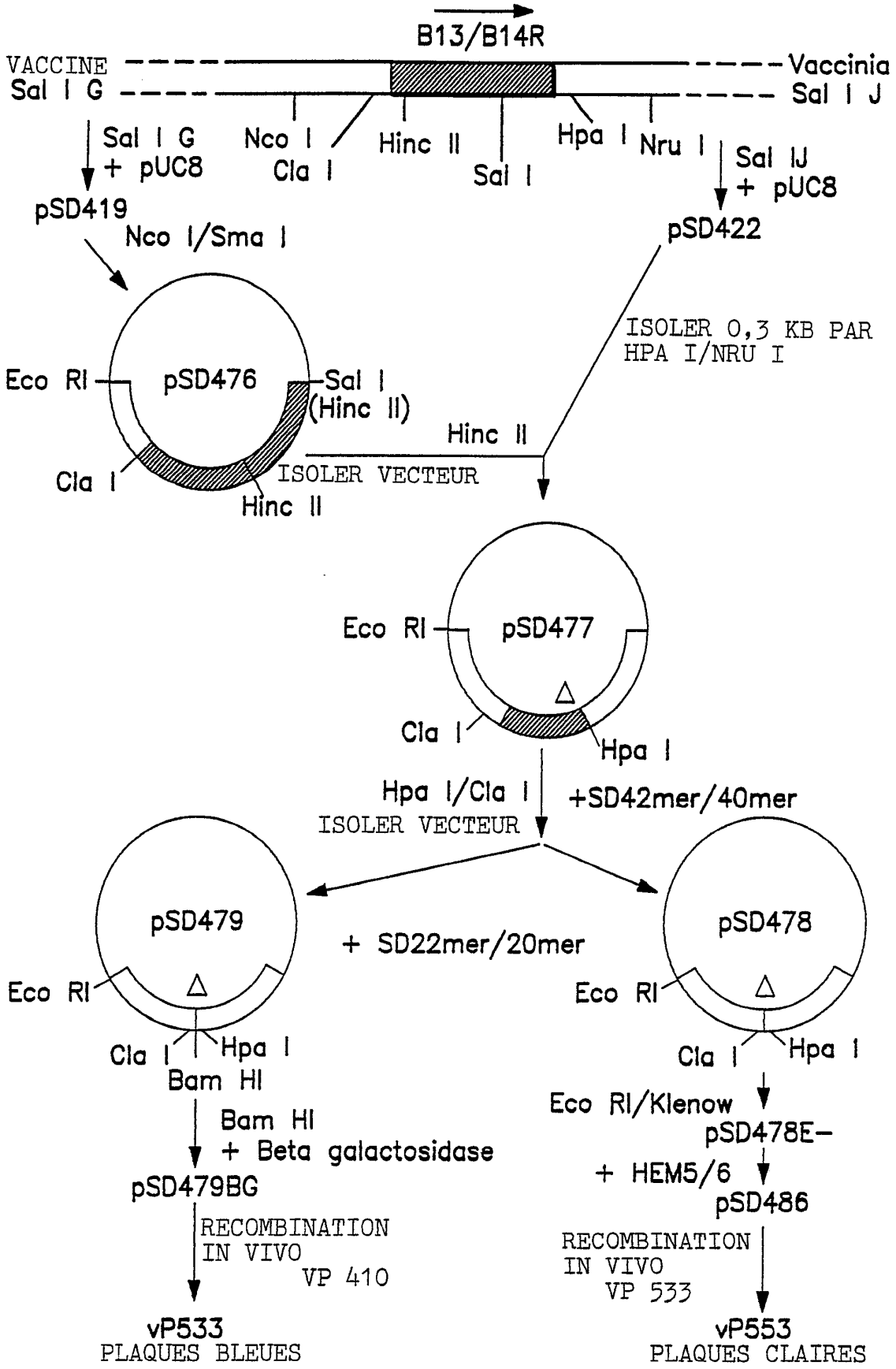
B13/B14R
VACCINE
Sal I G
Vaccinia
Sal I J
Sal I G
+ pUC8
Nco I
Cla I
Hinc II
Sal I
Hpa I
Nru I
Sal IJ
+ pUC8
pSD419
Nco I/Sma I
pSD422
ISOLER 0,3 KB PAR
HPA I/NRU I
Eco RI
pSD476
Sal I
(Hinc II)
Hinc II
Cla I
ISOLER VECTEUR
Hinc II
Eco RI
pSD477
Cla I
Hpa I
Hpa I/Cla I
ISOLER VECTEUR
+SD42mer/40mer
pSD479
+ SD22mer/20mer
pSD478
Eco RI
Eco RI
Cla I
Hpa I
Bam HI
Cla I
Hpa I
Eco RI/Klenow
pSD478E-
Bam HI
+ Beta galactosidase
pSD479BG
+ HEM5/6
pSD486
RECOMBINATION
IN VIVO
VP 410
RECOMBINATION
IN VIVO
VP 533
vP533
PLAQUES BLEUES
vP553
PLAQUES CLAIRES

FIG. 10

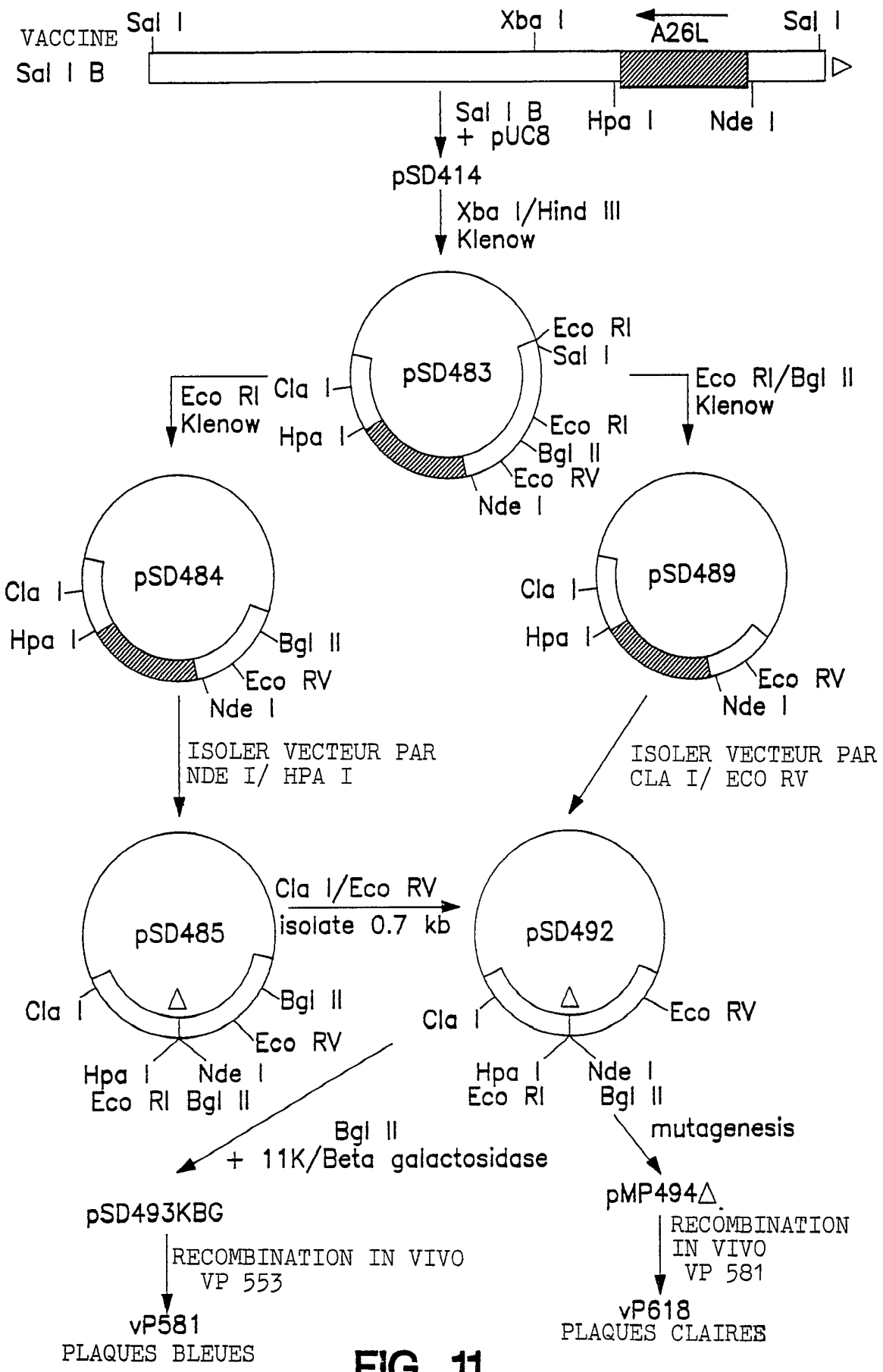
VACCINE
Sal I B
Sal I
Xba I
A26L
Sal I
Sal I B
+ pUC8
Hpa I
Nde I
pSD414
Xba I/Hind III
Klenow
pSD483
Eco RI
Sal I
Eco RI
Bgl II
Eco RV
Nde I
Cla I
Hpa I
Eco RI
Klenow
Eco RI/Bgl II
Klenow
pSD484
Cla I
Hpa I
Bgl II
Eco RV
Nde I
pSD489
Cla I
Hpa I
Eco RV
Nde I
ISOLER VECTEUR PAR
NDE I/ HPA I
ISOLER VECTEUR PAR
CLA I/ ECO RV
pSD485
Cla I
Bgl II
Eco RV
Hpa I
Nde I
Eco RI Bgl II
Cla I/Eco RV
isolate 0.7 kb
pSD492
Cla I
Eco RV
Hpa I
Nde I
Eco RI
Bgl II
Bgl II
+ 11K/Beta galactosidase
mutagenesis
pSD493KBG
pMP494Δ
RECOMBINATION IN VIVO
VP 553
RECOMBINATION
IN VIVO
VP 581
vP581
PLAQUES BLEUES
vP618
PLAQUES CLAIRES

FIG. 11

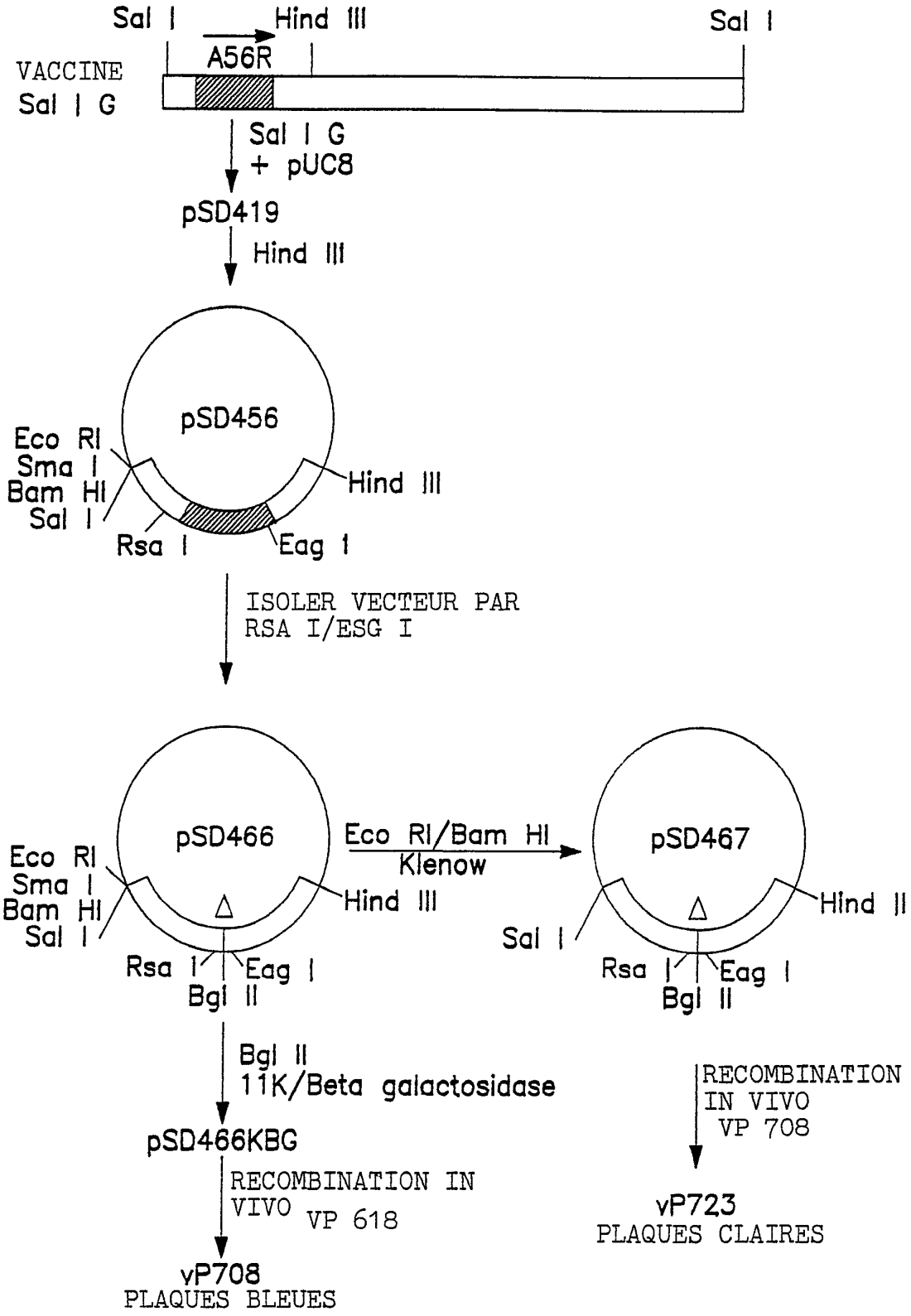
Sal I
Hind III
Sal I
A56R
VACCINE
Sal I G
Sal I G
+ pUC8
pSD419
Hind III
pSD456
Eco RI
Sma I
Bam HI
Sal I
Hind III
Rsa I
Eag I
ISOLER VECTEUR PAR
RSA I/ESG I
pSD466
Eco RI
Sma I
Bam HI
Sal I
Hind III
Rsa I
Eag I
Bgl II
Eco RI/Bam HI
Klenow
pSD467
Hind II
Sal I
Rsa I
Eag I
Bgl II
Bgl II
11K/Beta galactosidase
pSD466KBG
RECOMBINATION IN
VIVO VP 618
vP708
PLAQUES BLEUES
RECOMBINATION
IN VIVO
VP 708
vP723
PLAQUES CLAIRES

FIG. 12

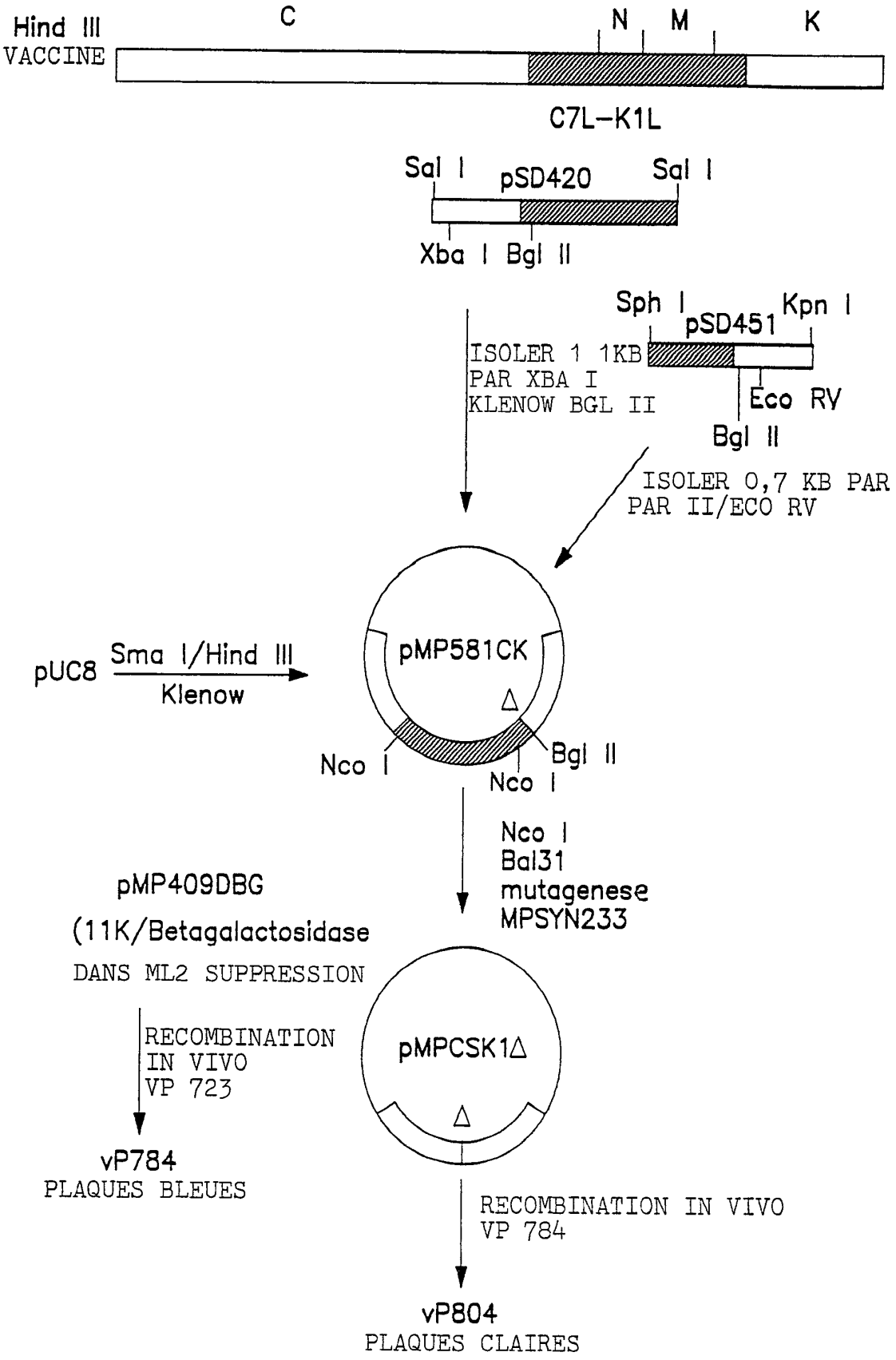
Hind III
VACCINE
C
N
M
K
C7L-K1L
Sal I
pSD420
Sal I
Xba I
Bgl II
Sph I
pSD451
Kpn I
ISOLER 1 1KB
PAR XBA I
KLENOW BGL II
Eco RV
Bgl II
ISOLER 0,7 KB PAR
PAR II/ECO RV
pUC8
Sma I/Hind III
Klenow
pMP581CK
Δ
Nco I
Bgl II
Nco I
Nco I
Bal31
mutagenese
MPSYN233
pMP409DBG
(11K/Betagalactosidase
DANS ML2 SUPPRESSION
RECOMBINATION
IN VIVO
VP 723
pMPCSK1Δ
Δ
vP784
PLAQUES BLEUES
RECOMBINATION IN VIVO
VP 784
vP804
PLAQUES CLAIRES

FIG. 13

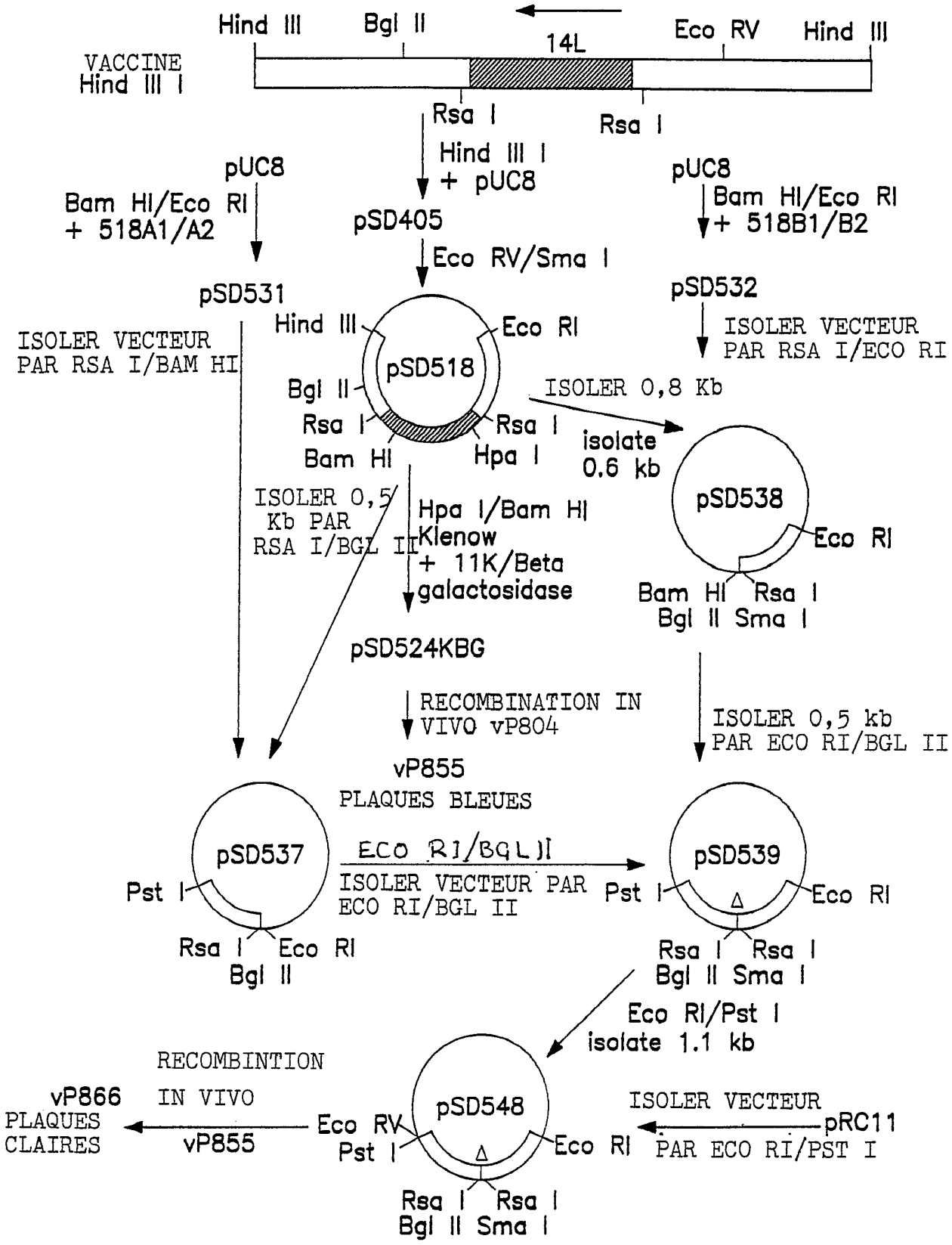
VACCINE
Hind III I
Hind III
Bgl II
14L
Eco RV
Hind III
Rsa I
Rsa I
Hind III I
+ pUC8
pSD405
Eco RV/Sma I
pUC8
Bam HI/Eco RI
+ 518A1/A2
pSD531
pUC8
Bam HI/Eco RI
+ 518B1/B2
pSD532
ISOLER VECTEUR
PAR RSA I/BAM HI
Hind III
Eco RI
pSD518
Bgl II
Rsa I
Rsa I
Bam HI
Hpa I
ISOLER VECTEUR
PAR RSA I/ECO RI
ISOLER 0,8 Kb
isolate
0.6 kb
pSD538
Eco RI
Bam HI
Rsa I
Bgl II Sma I
ISOLER 0,5
Kb PAR
RSA I/BGL II
Hpa I/Bam HI
Klenow
+ 11K/Beta
galactosidase
pSD524KBG
RECOMBINATION IN
VIVO vP804
vP855
PLAQUES BLEUES
ISOLER 0,5 kb
PAR ECO RI/BGL II
pSD537
Pst I
Rsa I
Eco RI
Bgl II
ECO RI/BGL II
ISOLER VECTEUR PAR
ECO RI/BGL II
pSD539
Pst I
Eco RI
Rsa I
Rsa I
Bgl II Sma I
Eco RI/Pst I
isolate 1.1 kb
RECOMBINTION
IN VIVO
vP866
PLAQUES
CLAIRES
vP855
pSD548
Eco RV
Pst I
Eco RI
Rsa I
Rsa I
Bgl II Sma I
ISOLER VECTEUR
PAR ECO RI/PST I
pRC11

FIG. 14

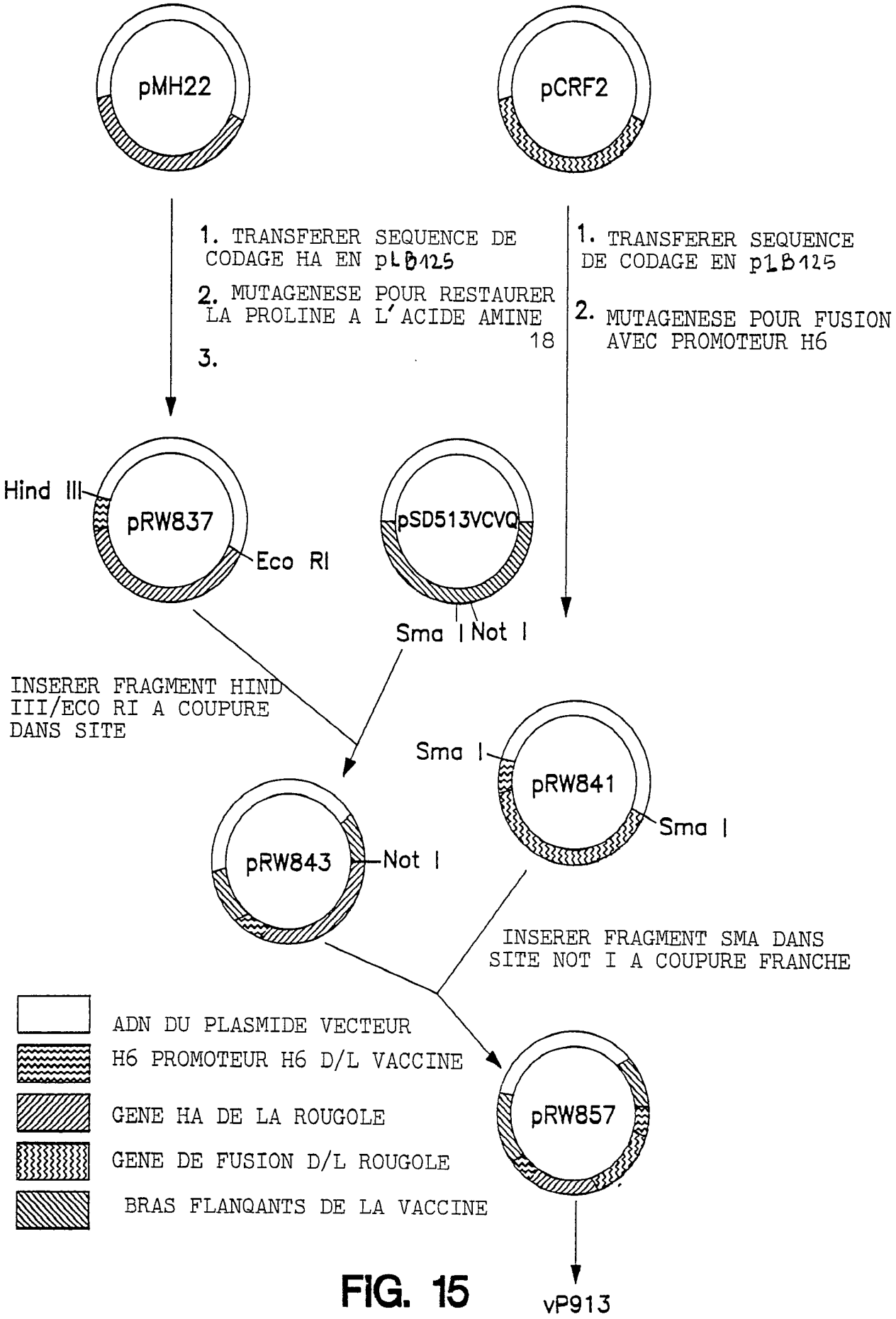
pMH22
pCRF2
1. TRANSFERER SEQUENCE DE CODAGE HA EN pLB125
2. MUTAGENESE POUR RESTAURER LA PROLINE A L'ACIDE AMINE 18
3.
1. TRANSFERER SEQUENCE DE CODAGE EN pLB125
2. MUTAGENESE POUR FUSION AVEC PROMOTEUR H6
Hind III
pRW837
Eco RI
pSD513VCVQ
Sma I
Not I
INSERER FRAGMENT HIND III/ECO RI A COUPURE DANS SITE
Sma I
pRW841
Sma I
pRW843
Not I
INSERER FRAGMENT SMA DANS SITE NOT I A COUPURE FRANCHE
ADN DU PLASMIDE VECTEUR
H6 PROMOTEUR H6 D/L VACCINE
GENE HA DE LA ROUGOLE
GENE DE FUSION D/L ROUGOLE
BRAS FLANQANTS DE LA VACCINE
pRW857
vP913

FIG. 15

Numero de la demande nationale

Office européen des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2 de la loi belge sur les brevets d'invention du 28 mars 1984

BE 9101066
BO 3360

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
T	VIROLOGY vol. 187, no. 1, 1992, pages 321 - 328 TAYLOR, J. ET AL. 'Nonreplicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canarypox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (ha) glycoproteins' * le document en entier * ---	1-30	C12N15/86 C12N15/45 C12N7/01 A61K39/165
X	SCIENCE vol. 242, 18 Novembre 1988, LANCASTER, PA US pages 1058 - 1061 YILMA, T. ET AL. 'Protection of cattle against Rinderpest with vaccinia virus recombinants expressing the Ha or F gene' ---	1,12,15, 16,17, 23,26	
X	EP-A-0 305 229 (TRANSGENE S.A.) * le document en entier * ---	1-12, 15-23, 26-30	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 314 569 (TRANSGENE S.A.) ---	1,2,4,7, 9,13, 15-18, 20,24, 26-28,30	C12N C07K
X	EP-A-0 330 781 (TOA NENRYO KOGYO KABUSHIKI KAISHA) * le document en entier * -----	1,12, 15-17, 23,26	

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
23 AVRIL 1993	CHAMBONNET F.J.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM 1503 03.82 (P0448)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.

BE 9101066
BO 3360

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/04/93
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-0305229	01-03-89	FR-A-	2617715	13-01-89
		JP-A-	1157379	20-06-89
EP-A-0314569	03-05-89	FR-A-	2622456	05-05-89
		FR-A-	2632863	22-12-89
		AU-A-	2445888	04-05-89
		JP-A-	2000430	05-01-90
		US-A-	5180675	19-01-93
EP-A-0330781	06-09-89	JP-A-	1218590	31-08-89

EPO FORM P0463

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82