

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 06076

(54) Vaccin contre la brucellose, maladie du bétail.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 39/10.

(22) Date de dépôt..... 26 mars 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : EUA, 28 mars 1980, n° 134,767 et 11 mars 1981, n° 06/239507.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 40 du 2-10-1981.

(71) Déposant : Société dite : RESEARCH CORPORATION, résidant aux EUA.

(72) Invention de : Lynn F. Woodard.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet A. Thibon-Littaye,
11, rue de l'Etang, 78160 Marly-le-Roi.

La présente invention a pour objet un vaccin contre la brucellose, maladie du bétail.

De récentes recrudescences de brucellose bovine ont soulevé de sérieux doutes en ce qui concerne les possibilités d'éradication de la maladie par mise en oeuvre de techniques présentement connues. Bien que l'utilisation classique d'un vaccin obtenu à partir de souche 19 vivante de Brucella abortus ait permis de diminuer énormément l'incidence de la maladie au cours des quelques dernières décennies, il apparaît maintenant que soit des vaccins perfectionnés, soit des techniques d'épreuve perfectionnées pour l'établissement du diagnostic peuvent être nécessaires pour mener à bonne fin le processus d'éradication.

On sait maintenant qu'il existe deux types d'immunité permettant de conférer une résistance à la maladie. Le premier type de protection (l'immunité humorale) est conféré par des anticorps apparus dans la circulation et dans des sécrétions du corps. Un second type d'immunité est conféré par l'intermédiaire de cellules entières du sang (les lymphocytes) et est donc, pour cette raison, considéré comme étant une "immunité conférée par l'intermédiaire de cellules". De récentes études ont montré que c'est ce second type d'immunité, plutôt que l'immunité humorale, qui est responsable de la résistance à la brucellose.

Bon nombre des problèmes concernant l'éradication de la brucellose résultent du fait que des taux d'anticorps persistants provenant du vaccin normal de la souche 19 originaire du veau interfèrent avec les techniques de laboratoire utilisées pour établir le diagnostic sur des animaux naturellement infectés. Des tests normalisés d'agglutination dans des tubes et sur des plaques, qui permettent d'enregistrer des titres d'anticorps accrus et qui rendent très indésirables les techniques d'immunisation de bestiaux adultes dans des troupeaux infectés, ne sont pas avantageux car il n'est pas facile de distinguer des animaux immunisés des animaux infectés.

Il convient aussi de souligner que la protection résultant d'une vaccination à partir de souche 19 n'est efficace qu'à 65 à 75 % seulement.

Une souche 19, qui stimule aussi bien l'immunité
5 humorale que l'immunité conférée par l'intermédiaire de
cellules (en anglais : cell-mediated immunity, que les
spécialistes désignent par l'abréviation CMI), est tout
particulièrement désavantageuse et son utilisation est à
proscrire sur des veaux dans des zones reconnues saines,
10 et il ne convient pas non plus pour lutter contre la brucellose sur des vaches dans des troupeaux fortement infectés, et ce en raison de titres faussement positifs.

Des tests sérologiques ordinairement utilisés
permettent de déceler la présence d'anticorps humoraux.
15 Il serait donc très avantageux d'ajouter, à l'arsenal du
vétérinaire, un vaccin qui stimulerait la portion CMI de
la réponse d'immunisation sans stimuler aussi des anticorps qui réagissent lors de la mise en oeuvre de tests
sérologiques normalisés présentement utilisés. En sti-
20 mulant seulement la CMI, qui est responsable de l'élimi-
nation de parasites intracellulaires tels que des Brucella,
des tests sérologiques présentement en usage indiqueraient une exposition à (ou une infection par) B. abortus
observable dans la nature, mais n'indiqueraient ni une
25 souche 19, ni d'autres souches vaccinales. Un tel vaccin
serait utilisable aussi sur des bestiaux adultes afin de
se rendre maître de la maladie sévissant dans des troupeaux.

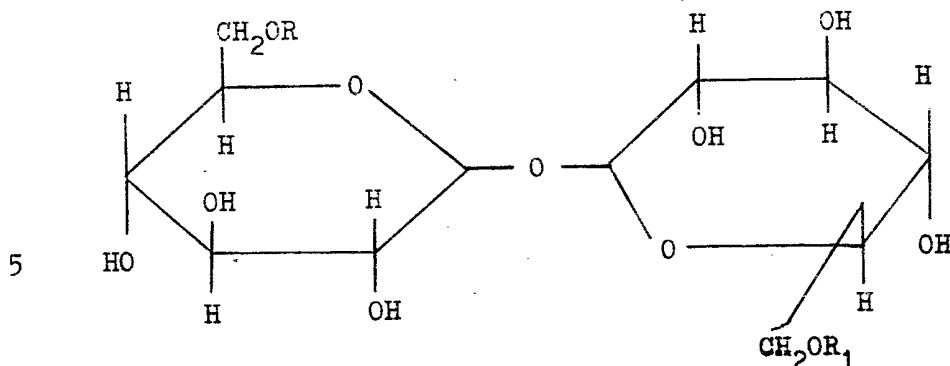
Des vaccins comprenant des cellules entières,
30 tuées, de la souche 45/20 de Brucella abortus (en abrégé
BA 45/20), qui est une souche robuste, dans des huiles
inertes telles que de l'huile de paraffine ou une huile
minérale, ont été utilisés hors des Etats-Unis. Ces
vaccins ne sont pas complètement satisfaisants pour
35 d'assez nombreuses raisons, et principalement parce qu'
ils nécessitent deux doses initiales suivies d'une injection
de rappel annuelle [McDiarmid, Ann. Inst. Pasteur
102:792-800, et Hendricks et al., U.S. Department of

Agriculture, Animal Health Division Staff Report, 1966]. En outre, on observe communément des réactions nuisibles, dans la région où l'on a pratiqué l'inoculation, avec certains vaccins disponibles dans le commerce (du type émulsion eau dans l'huile).

Des vaccins à base de cellules vivantes, de cellules atténuées, de cellules tuées et d'antigènes cellulaires sont communément utilisés ou ont été signalés. Aucun n'est complètement satisfaisant. Il existe donc un réel besoin d'un vaccin perfectionné, utilisable en toute sécurité et donnant des résultats réguliers, et qui soit dépourvu des inconvénients susmentionnés.

La découverte se trouvant à la base de la présente invention a permis la production de vaccins ne soulevant pas les problèmes décrits ci-dessus. Ils confèrent la CMI et n'interfèrent donc pas avec des modes opératoires ayant recours à des tests sérologiques normalisés qui aboutissent à des réponses faussement positives à cause des anticorps circulants apparus à la suite de vaccinations du type de celles pratiquées sur des veaux. Les vaccins selon l'invention comprennent des cellules entières, tuées, d'une souche 45/20 de Brucella abortus (BA 45/20) accompagnées d'un adjuvant particulier et dans un véhicule immunologiquement acceptable. BA 45/20 est une souche robuste. Le rapport en poids des cellules à l'adjuvant est de préférence compris entre 1/1 et 20/1.

Les adjuvants présentement préférés sont au moins un mono- ou di-mycolate de tréhalose. Ces esters constituent une classe bien connue de composés comprenant des 6-mono- et des 6,6-di-esters d' α, α -D-tréhalose dans lesquels le radical estérifiant contient de 30 à 60 atomes de carbone. On peut les obtenir à partir de sources naturelles telles que des mycobacteria, des corynebacteria et des nocardia, ou bien on peut en réaliser la synthèse. Ces composés sont représentables par la formule suivante :



dans laquelle R et R₁ peuvent être identiques ou différents et sont choisis parmi le groupe constitué par hydrogène et $R_2C=O$ qui est une portion acide mycolique

10

dans laquelle R₂ contient de 30 à 90 atomes de carbone, avec cette condition que R et R₁ ne peuvent pas être tous deux de l'hydrogène dans une molécule particulière donnée.

15 Les acides mycoliques sont une classe bien connue et caractérisée de composés qui sont des acides gras à longue chaîne β-hydroxy-α-ramifiée [Asselineau et al., Prog. Chem. Fats Other Lipids 16, 59 (1978) ; Asselineau et al., Ann. Microbiol. (Paris) 129A, 49 (1978) ; Lederer E., Pure and Applied Chemistry 25, 135 (1971) ; Lederer E., Springer Semin. Immunopathol. 2, 133 (1979)].

20

Les esters qui sont obtenus à partir de sources naturelles, telles que celles mentionnées ci-dessus, et des souches d'Arthrobacter et de Brevibacterium sont des glycolipides et sont normalement des mélanges dans lesquels les composés sont caractérisés par des acides mycoliques différents. La nomenclature utilisée pour identifier ces substances naturelles est quelque peu imprécise. Généralement, les spécialistes qui connaissent le mieux ces substances admettent qu'il s'agit de mélanges naturels relativement impurs de dimycolates de tréhalose obtenus à partir des sources susmentionnées, et les désignent comme étant un "facteur cord". Normalement, un facteur cord contient environ 90 % d'ester du type dimycolate et 10 % d'ester du type monomycolate avec une pe-

25

30

35

tite proportion de substance étrangère. Des substances du type "facteur cord" isolées à partir de Mycobacteria spp. telles que M. tuberculosis, M. bovis ou M. avium et purifiées chromatographiquement par mise en oeuvre de la méthode de Ribí et al., J. Nat. Cancer Inst., 52, 95 (1974) et Cell Immunol., 16, 11 (1975), sont désignées sous la dénomination P3. Cette catégorie de substances purifiées contient de 95 % à 99 % de dimycolates.

Un P3 particulier dont l'utilisation est présentement plus particulièrement préférée en vue de la mise en oeuvre de l'invention est isolé chromatographiquement à partir de parois cellulaires de Mycobacteria spp. et correspond au troisième pic des lipides libres chromatographiés, Ribí et al., Annual of N.Y. Acad. of Sci. 277, 228 (1976). On peut se procurer cette substance en s'adressant au Rocky Mountain Laboratory à Hamilton (Montana), Etats-Unis d'Amérique.

Les initiales TDM sont à peu près universellement utilisées comme référence générique pour désigner des dimycolates de tréhalose.

Il a été montré qu'un facteur cord provenant de diverses sources manifeste une certaine variété d'activités physiologiques. Toutefois, antérieurement à la présente invention, le facteur cord n'a été ni connu, ni suggéré comme adjuvant dans des vaccins entiers tués.

Des tentatives en vue d'utiliser des antigènes solubles provenant de BA 45/20 se sont soldées par des échecs.

Au cours des recherches qui ont abouti à la mise au point de la présente invention, des cobayes femelles Hartley pesant entre 550 g et 750 g ont été divisés au hasard en groupes principaux et en groupes témoins de cinq animaux chacun. Des cellules entières de BA 45/20 ont été inactivées par la chaleur à 80°C pendant une heure, et on a rompu ces cellules entières par application d'ultra-sons dans de l'eau. On sépare, par centrifugation, et on élimine les débris cellulaires et des matières insolubles, et on fait précipiter la

substance antigène en établissant une concentration finale de 10 % d'acide trichloroacétique. On soumet le précipité à une dialyse avec de l'eau distillée, puis on le lyophilise.

- 5 On prépare des vaccins contenant 300 μ g de substance antigène conjointement avec 150 μ g de P3 dans 0,1 ml d'émulsions à 1 % du type huile dans l'eau.

- On inocule les animaux d'essais par voie intradermique dans le cou. Huit semaines plus tard, on injecte à tous les animaux, par voie intramusculaire, des doses unitaires de B. abortus 2308 capables de former $1,04 \times 10^4$ colonies ; deux semaines après une telle injection, on sacrifie tous les animaux et on réalise des cultures de Brucella à partir de leurs rates. Pour cela, on pèse les rates homogénéisées, puis on en prépare une dilution au 1:5 (poids/volume) avec une solution à 1 % de peptone dans du sérum salin à 0,5 %. On prépare des dilutions en série de chaque rate sur des plaques coulées à l'agar de soja/trypticase. On incube les plaques dans une atmosphère à 10 % de CO_2 à 37°C pendant cinq jours avant de compter les colonies de Brucella. On constate que quatre des animaux d'essais sur cinq sont infectés et que tous les animaux-témoins sont infectés. On observe aussi, par comparaison avec les animaux-témoins non vaccinés, qu'aucune des préparations antigènes n'est capable de diminuer l'infection d'une manière significative.

- Par contre, avec les vaccins selon l'invention, on observe une diminution significative de l'infection.
- 30 Au cours de ces dernières expériences, on utilise des cobayes femelles Hartley (350 g - 550 g). On fait croître une souche BA 45/20 pendant cinq jours à 37°C dans un bouillon de soja/trypticase, et on inactive les bactéries par chauffage à 80°C pendant une heure. On recueille les cellules entières (CE) par centrifugation, on les lave deux fois dans du sérum physiologique (solution saline), on les dialyse contre de l'eau et on les lyophilise. On prépare des vaccins comprenant des émuls-

sions huileuses de CE et le P3 préféré décrit ci-dessus (CE-P3) dans une solution saline contenant du "Tween" et 1 % d'huile, de façon telle que ces vaccins contiennent 300 µg de CE et 150 µg de P3 par dose de 0,2 ml. On
 5 prépare aussi des suspensions, dans une solution saline, de CE exemptes de P3, à la même concentration.

On inocule, dans le cou, les animaux appartenant à deux groupes de cinq cobayes, respectivement avec du vaccin aux CE et avec du vaccin aux CE-P3. Un autre
 10 groupe de cinq animaux sert de témoin. Six semaines après ces inoculations de vaccins, on injecte à tous les animaux, par voie intramusculaire, des doses unitaires de B. abortus 2308 capables de former 5880 colonies ;
 15 deux semaines après, on sacrifie tous les animaux et on réalise, à partir de leurs rates, des cultures en opérant de la manière décrite ci-dessus.

On obtient ainsi les résultats présentés dans le Tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

20	<u>Capacité immunogène de cellules entières de</u>			
	<u>BA 45/20 dans divers adjuvants</u>			
	Vaccin	Nombre d'animaux infectés	Nombre moyen de <u>Brucella</u> par rate	Taux de diminution %
25	CE dans une solution saline	5/5	$2,8 \times 10^3$	52,5
	CE-P3 dans de l'huile	3/5	$3,60 \times 10^1$ *	95,1
	Témoins	5/5	$5,89 \times 10^3$	-
30	* $P < 0,05$			

Bien que ces données prouvent qu'il se produit une notable diminution de l'infection avec des CE dans une solution saline, on constate que le taux de diminution est beaucoup plus élevé quand on utilise une émulsion
 35 huileuse de CE-P3.

Le Tableau 2 ci-après montre les résultats d'une expérience similaire au cours de laquelle on a utilisé diverses doses d'adjuvant. Le résultat indiqué

pour une dose d'adjuvant de 300 μ g est dû bien évidemment à une erreur d'expérimentation. Il est cependant donné pour que le compte-rendu soit complet. Le résultat pour 1000 μ g est lui aussi quelque peu anomal. Il convient de noter que l'infection est d'un ordre de grandeur assez bas.

Tableau 2

Comparaison de la protection conférée par
des vaccins à base de B. abortus 45/20,
 avec différentes doses d'adjuvant,
 sur des cobayes *

	Vaccin	Dose d'adjuvant (μ g)	Poids moyen de rate (grammes)	Nombre moyen de Brucella par rate	Animaux infectés
15	CE/P3 **	50	1,33	$8,25 \times 10^3$	1/5
		150	1,55	0	0/4
		300	2,87	$8,83 \times 10^5$	5/5
		500	1,87	0	0/5
20		1000	1,25	$2,41 \times 10^3$	3/5
	(témoins)		9,54	$1,8 \times 10^6$	20/20

* Ayant reçu, par voie intramusculaire, une injection de $3,0 \times 10^4$ B. abortus 2308 sept semaines avant d'être sacrifiés.

** Dans de l'huile.

Bien que les agents d'addition utilisés lors de la mise en oeuvre de l'invention soient, pour plus de commodité, désignés par le terme général de "adjuvants", il apparaît qu'ils exercent un effet d'immunostimulation bien supérieur à celui constaté lorsqu'on utilise des adjuvants normalisés tels que des huiles minérales ou huiles de paraffine qui sont réputées "immunologiquement inertes".

Le mode de réalisation présentement préféré de l'invention comprend des vaccins qui contiennent depuis 0,1 mg/ml jusqu'à 5 mg/ml, et de préférence depuis 0,1

mg/ml jusqu'à 1 mg/ml, de cellules entières tuées de BA 45/20 tuée et un P3 selon un rapport en poids compris entre 1:1 et 20:1, de préférence entre 1,0:1 et 2,25:1, dans une émulsion d'eau et d'huile contenant en poids
5 jusqu'à 2 % d'une huile inerte dans de l'eau. Il existe plusieurs mono- et di-esters d'acides mycoliques et de tréhalose, et des mélanges de telles substances, qui sont aussi utilisables.

On peut administrer le vaccin sous la forme
10 de doses posologiques unitaires, immunologiquement efficaces, dont le volume est habituellement compris entre 0,1 et 5 ml. Il convient normalement d'utiliser des émulsions du type huile dans l'eau, mais avec des adjuvants possédant des poids moléculaires plus bas on peut
15 utiliser aussi, comme adjuvants, des compositions aqueuses isotoniques. L'huile peut être d'origine soit végétale, soit minérale. On peut administrer les vaccins en injections sous-cutanées, intradermiques, ou intramusculaires. On peut aussi les administrer par d'autres
20 voies, par exemple oralement ou rectalement, ou sous la forme d'aérosols destinés à parvenir au contact de membranes muqueuses, plus spécialement les muqueuses oculaires, nasales, respiratoires, ou vaginales. Typiquement, une dose peut conférer une immunité suffisante pour protéger contre l'infection. Il peut toutefois être prudent
25 de procéder à un deuxième, voire même à un troisième traitement de rappel à des intervalles de un à douze mois.

On donne ci-après différents exemples, bien
30 entendu non limitatifs, destinés uniquement à illustrer les modalités de mise en oeuvre de la présente invention.

Exemple 1

1. Préparation de cellules entières.
 - a. On inocule un bouillon de soja/trypticase avec des bactéries de Brucella abortus 45/20.
35
 - b. On incube (à 37°C) pendant de 4 à 6 jours et on fait une culture pour assurer la pureté.
 - c. On tue par la chaleur (80°C pendant 1 heure).

d. On recueille les bactéries par centrifugation (10 000 fois g pendant 30 minutes).
e. On lave deux fois dans une solution saline.
f. On dialyse contre de l'eau pendant 24 heures.
g. On réalise une cryodessiccation (lyophilisation).

2. Préparation d'un vaccin du type CE-P3.

On place 1,5 mg de cellules entières séchées (approximativement 5×10^9 bactéries) dans un broyeur de tissus "Corning 7725". On ajoute 0,75 mg de P3 (dissous dans un mélange 95:5 de chloroforme:méthanol, C:M). On évapore le C:M sous une hotte à écoulement laminaire ou dans N_2 gazeux. On réchauffe le récipient jusqu'à $65^\circ C$ dans un bain-marie et on ajoute 10 μl (0,01 ml) d'une huile minérale raffinée. On broie le mélange de CE, de P3 et d'huile pendant une minute en utilisant un pilon en "Teflon". On ajoute 0,99 ml d'une solution saline normale (à 0,9 % de NaCl) qui contient aussi 0,2 % de "Tween 80" (un émulsifiant). On broie pendant encore 3 autres minutes.

Exemple 2

On répète le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on remplace le P3 par le monoester de tréhalose obtenu en estérifiant du tréhalose avec un acide nocardomycolique préparé en recourant au mode opératoire décrit dans le brevet US N° 4 101 536. On utilise le vaccin, ainsi obtenu, en doses posologiques unitaires de 3 ml administrées par injection intramusculaire pour immuniser des bestiaux contre des infections par Brucella abortus.

Exemple 3

On répète le mode opératoire de l'exemple 1, mais en remplaçant le P3 par un dinocardomycolate de tréhalose obtenu de la manière décrite dans le susdit brevet US N° 4 101 536.

REVENDICATIONS

1. Vaccin contre la brucellose caractérisé en ce qu'il comprend de 0,1 mg/ml à 5 mg/ml de cellules entières tuées de Brucella abortus 45/20 conjointement avec un mono-ou un di-ester de tréhalose, la portion estérifiante dérivant d'un acide mycolique contenant de 30 à 90 atomes de carbone, dans un véhicule immunologiquement acceptable, le rapport en poids des cellules à l'adjuvant étant compris entre 1:1 et 20:1.
2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'adjuvant est du P3.
3. Vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'ester est un monoester, et le radical estérifiant dérive de l'acide nocardomycolique.