

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

②

**N° 80 08414**

⑤

**Nouveau vaccin contre la rage.**

⑤

Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). **A 61 K 39/205.**

②

Date de dépôt..... 15 avril 1980.

③③ ③② ③①

Priorité revendiquée :

④

Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 42 du 16-10-1981.

⑦

Déposant : INSTITUT DÈ BIOLOGIE ANIMALE, résidant en France.

⑦

Invention de : Jacques Vittoz.

⑦

Titulaire : *Idem* ⑦

⑦

Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,  
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

La présente invention concerne un vaccin antirabique inactivé à usage vétérinaire, préparé à partir d'une souche originale, sur lignée cellulaire spéciale.

La souche virale utilisée pour la préparation du vaccin selon l'invention a été obtenue par fixation d'une souche de virus rabique sauvage, en circuit naturel en France, isolée à partir de glandes salivaires de renard.

Cette souche constitue la caractéristique essentielle du vaccin selon l'invention ; elle réalise l'adéquation totale théorique entre le vaccin et le virus éventuellement contaminant.

Son originalité se fonde, dans le cadre du même sérotype I des souches rabiques européennes actuelles et des souches ou sous-souches vaccinales, sur des différences entre les souches sauvages et les souches vaccinales fixes.

15 A) Isolement de la souche

Les glandes salivaires de 4 renards morts de rage sauvage - renards A, B, C, D - ont été broyées, mises en suspension à 10 % en milieu de Eagle (contenant 2 % de sérum foetal bovin) additionné d'antibiotiques. Le broyat a été centrifugé et le surnageant inoculé, à des dilutions variables, à des lots de 10 souris blanches de 4 semaines, sous un volume de 0,03 ml. La suspension des glandes salivaires du renard A a été retenue parce qu'elle a donné les résultats les plus homogènes dans la virulence (voir tableau I)

25

TABEAU I

Dilution de la suspension de virus	Souris		Totaux cumulatifs		
	survivantes	mortes	souris protégées	souris mortes	% mortalité
$10^{-2}$	0	10	0	4	100
$10^{-3}$	2	8	2	14	87,5
$10^{-4}$	4	6	6	6	50
$10^{-5}$	10	0	16	0	0

35

$$\text{Donc } DL_{50} = 10^{-4}/0,03 \text{ ml} = 10^{-5,5}/\text{ml}$$

Une souris inoculée avec la suspension virale provenant du renard A, à la dilution  $10^{-2}$  a été sacrifiée après avoir montré, pendant deux jours, des symptômes de paralysie, et son cerveau a été divisé en deux parties. Une des parties a été utilisée pour l'épreuve d'immunofluorescence directe, parallèlement à un cerveau de souris inoculée avec le virus d'épreuve standard (C.V.S.).

Les calques du cerveau de la souris inoculée avec la suspension provenant du renard A présentaient des corpuscules comparables aux corps de Négri apparaissant en lumière U.V., de couleur jaune verdâtre. Ceux de la souris inoculée avec le C.V.S. présentaient des points de fluorescence correspondant à de petites inclusions. L'encéphale de la souris inoculée avec la suspension de virus du renard A contient donc du virus rabique sauvage.

#### B) Fixation de la souche

L'autre partie de l'encéphale de la souris inoculée avec la suspension de virus de renard diluée à  $10^{-2}$ , et sacrifiée après deux jours de paralysie, a été utilisée pour des passages successifs, par voie intra-cérébrale sur souris de 10 à 12 grammes. Lors de chaque passage, on broyait un demi-encéphale de souris, le mettait en suspension à 10 % en milieu de Eagle et centrifugeait. Le surnageant dilué était inoculé à trois souris sous un volume de 0,03 ml, par voie intra-cérébrale.

Pendant les dix premiers passages, la période d'incubation était de 10 à 12 jours, la paralysie apparaissait du 10e au 12e jour.

Entre le 30e et 40e passage, la période d'incubation était de 8 à 10 jours.

Après le 50e passage, en employant de faibles dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) les souris mouraient en sept à huit jours avec un titre final en virus de  $10^8$   $DL_{50}/ml$ .

TABLEAU II

Dilution de la suspension de virus	Souris		Totaux cumulatifs		% mortalité
	survivantes	mortes	souris protégées	souris mortes	
$10^{-3}$	0	10	0	39	100
$10^{-4}$	0	10	0	29	100
$10^{-5}$	0	10	0	19	100
$10^{-6}$	4	6	4	9	69
$10^{-7}$	7	3	11	3	21

Calcul du titre :

$$\frac{50 - 21}{69 - 21} \cdot \frac{29}{48} = 0,6$$

$$7 - 0,6 = 6,4$$

$$\text{Titre (DL}_{50}) = 10^{-6,4} / 0,03 \text{ ml} = 10^{7,9} / \text{ml} \text{ à } 10^8 / \text{ml}$$

On a considéré alors que le virus était fixé quant à son titre et à son temps d'incubation.

C) Culture de la souche de virus fixée

La seconde caractéristique du procédé de préparation du vaccin selon l'invention réside dans le fait qu'on cultive la souche de virus fixée en monocouches sur une nouvelle lignée cellulaire provenant de poumon de hamster nouveau-né et obtenue par un procédé qui sera décrit ci-après.

Le matériel de départ de la culture est constitué par une suspension à 10 % de deux encéphales de souris, mortes huit jours après l'inoculation d'une dilution de virus  $10^{-3}$  après le 50e passage.

Le surnageant de la suspension, filtré sur membrane  $0,2 \mu$  après centrifugation, est pipeté sur un Falcon contenant un tapis mono-cellulaire de la lignée cellulaire de poumon de hamster

nouveau-né du 61e passage.

Après un contact d'une heure, la suspension virale est éliminée et remplacée par un milieu de maintien. Ce milieu est retiré le 5e jour, les cellules trypsinisées sont remises en culture dans deux Falcons contenant le même tapis cellulaire. Dès les premiers passages l'immunofluorescence permet de constater l'infection de 20 % à 30 % des cellules. Toutes les cellules sont infectées à partir du 6e passage, mais il n'y a pas de virions libérés dans le milieu. Ceux-ci sont libérés à partir du 8e passage ; le virus produit uniquement des foyers d'immunofluorescence cellulaire, mais n'entraîne pas la formation de plages et le titre déterminé par immunofluorescence est alors  $10^2$ /ml.

A partir du 9e passage le virus titre  $10^{4,2}$ /ml (titre déterminé par l'immunofluorescence).

A partir du 10e passage apparaissent de très petites plages décelables sur cellules BHK 13 S en suspension d'agarose.

A partir du 7e jour seulement apparaissent des plages dans les boîtes de Pétri contenant des cellules BHK 13 S en suspension d'agarose. C'est à partir du 8e jour que la lecture est la plus facile.

Au 12e passage, le virus cultivé sur cellules de poumon de hamster (65e passage) titre  $10^{7,2} \text{DL}_{50}$ /ml.

Ce virus (souche virale initiale : SVI) est utilisé pour la production de vaccin.

Dans le tableau III (ci-après) figurent les caractéristiques différentielles du virus sauvage et de la souche S.V.I. utilisée pour la préparation du vaccin selon l'invention.

5

TABLEAU III

	:	Virus sauvage	:	S.V.I.	
10	( Corps de Négri	:	+	:	0
	( Incubation	:	10 à 12 jours	:	7 jours
15	( Paralysie et mort des souris inoculées par voie intra-cérébrale	:	10e au 21e jour	:	7 au 9e jour selon la dose
20	( Titre du virus en milieu de culture cellulaire	:	pas de virus dans le milieu	:	$10^{7,2}$ DL <sub>50</sub>
	( Présence du virus dans la salive	:	+	:	0
	( la cornée	:	+	:	0

25

Ces caractéristiques différentielles entre le virus sauvage et S.V.I. permettraient, dans l'éventualité d'une infection rabique post-vaccinale, de vérifier l'identité du virus en cause.

Culture cellulaire utilisée pour la prolifération du virus

30

L'utilisation de la lignée cellulaire spéciale qui est l'une des caractéristiques de l'invention permet d'obtenir une prolifération très importante du virus, au moins égale à celle procurée par d'autres lignées cellulaires issues de hamster (BHK 21 par exemple) et, parallèlement, une haute antigénicité.

35

Pour obtenir cette culture cellulaire originale, on utilise des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre contenant du milieu de Stoker (additionné de 10 pour cent de bouillon tryptose phosphate et 10 pour cent de sérum foetal de bovin décomplémenté).

A l'intérieur de ces boîtes sont placés des plateaux stériles munis de grilles en acier inoxydable (S : 1,5 cm<sup>2</sup>, H : 0,33 mm). Sur ces plateaux sont posés des carrés de papier Joseph dont les bords trempent dans le milieu de Stoker. Deux fragments de poumon de hamster nouveau-né découpés aux ciseaux sont étalés sur le papier, et mis à l'étuve à CO<sub>2</sub> à 36°C. A partir du 8e jour, les premiers fibroblastes apparaissent sur le fond des boîtes. Le tapis cellulaire est complet à partir du 21e jour dans une des boîtes : celle-ci a été utilisée, le 25e jour, pour le premier passage (2 boîtes).

Le deuxième passage a été effectué, quatorze jours après, dans une boîte plastique appelée falcon. Les passages suivants ont été réalisés entre le 10e et le 14e jour.

Lors du 26e passage un début de dégénérescence cellulaire a été observé. Le 27e passage a été réalisé en six jours, mais beaucoup de cellules étaient mortes.

Le 28e passage a été réalisé à partir des cellules vivantes du 27e passage. A partir de celui-ci en utilisant 200.000 cellules par ml et par boîte, on a réalisé un passage tous les cinq jours.

A partir du 60e passage, les cellules ont montré une réceptivité très élevée, aussi bien pour le virus rabique sauvage que pour le virus fixé, et la culture cellulaire ainsi obtenue a été utilisée pour la production du virus vaccinal.

On a vérifié pour cette culture cellulaire l'absence de contamination par le virus de Carré, en la comparant à une culture de cellules Véro que l'on infectait par une souche avianisée de virus de Carré. Après mise en contact des deux cultures avec un sérum hyperimmum, puis avec un conjugué anti-sérum, on les observait en immunofluorescence : les cellules Véro présentaient de petites inclusions fluorescentes qui se développaient peu à peu, et finalement les cellules étaient totalement détruites par l'effet cytopathique du virus au bout de la 96e heure ; par contre, les cellules de poumon de hamster ne présentaient aucune modification décelable en immunofluorescence, même au bout de 96 heures.

D) Préparation du vaccin

La souche virale initiale titrant  $10^{7,2}$  DL 50/ml subit au plus, cinq passages supplémentaires sur cellules de poumon de hamster pour la production industrielle du virus.

5 Le tapis cellulaire est complet après un séjour de 3 à 4 jours à l'étuve à 37°C. Il est alors infecté avec le virus et mis à l'étuve à 34°C. La lyse des cellules, par le virus, est contrôlée au microscope à partir du 6e jour, la récolte du virus est faite lorsque le tapis cellulaire est lysé en totalité, généralement  
10 7 jours après l'infection.

La récolte est alors congelée progressivement, d'abord à -20°C, puis à -70°C, pour obtenir l'éclatement des cellules et la libération du virus. Après une congélation de 4 à 5 jours, à -70°C, le virus est décongelé progressivement, filtré sur membrane  
15 de 0,45 afin d'éliminer les débris cellulaires. L'inactivation est effectuée par addition de  $\beta$ -propiolactone en dilution finale à 1 pour 4.000. L'action de la  $\beta$ -propiolactone se poursuit pendant une nuit à +40°C. Un séjour à l'étuve à 37°C pendant 2 heures, provoque l'hydrolyse de la  $\beta$ -propiolactone.

20 On contrôle l'inactivation du virus, à la fois par un test in-vivo sur souris (aucune souris inoculée par voie intracérébrale avec le vaccin non dilué ne présente de symptôme de rage) et par un test in-vitro par la méthode des plages (on n'observe aucune plage avec le vaccin non-dilué).

25 Pour évaluer l'antigénicité du vaccin inactivé selon l'invention, on a vacciné des chiens et des bovins (une seule inoculation) et titré sur souris les anticorps dans le sérum de ces animaux avant et quatre semaines après la vaccination. Les résultats sont donnés dans le tableau IV ci-après.

30 On a vérifié également l'absence d'oncogénicité du vaccin inactivé, préparé selon l'invention par culture sur la lignée cellulaire de poumons de hamsters :

Un groupe de 5 hamsters âgés de moins de 24 heures a reçu 0,1 ml de culture cellulaire vivante ( $10^5$  cellules par ml-témoins)  
35 et un groupe de 25 hamsters âgés de moins de 24 heures a reçu dans

les mêmes conditions 0,1 ml du vaccin concentré 10 fois dans la région scapulaire.

Les témoins ont développé des tumeurs 10 à 11 jours après l'inoculation.

5           Aucune tumeur n'a été décelée sur les animaux vaccinés, ni au point d'inoculation, ni sur aucun organe.

TABLEAU IV

Résultats sérologiques avant et quatre semaines après vaccination

Espèce animale	Dose du vaccin	Titre des sérums	
		avant vaccination	4 semaines après vaccination (1)
Chien 1	2 ml i.m.	0	2,1
Chien 2	2 ml i.m.	0	2,8
Chien 3	2 ml i.m.	0	5,0
Chien 4	2 ml i.m.	0	2,0
Chien 5	2 ml i.m.	0	3,0
Bovin 1	5 ml s.c.	0	3,6
Bovin 2	5 ml s.c.	0	3,0
Bovin 3	5 ml s.c.	0	4,5
Bovin 4	5 ml s.c.	0	2,8
Bovin 5	5 ml s.c.	0	3,0

(1) 1 injection.

REVENDEICATIONS  
-----

1. Procédé de préparation d'un vaccin inactivé contre la rage, caractérisé en ce qu'on utilise une souche fixe de virus obtenue à partir d'un virus sauvage provenant de salive de renards morts de rage et fixée par passages successifs par voie intra-cérébrale sur  
5 souris jusqu'à obtenir un temps d'incubation de 7 à 8 jours et un titre de  $10^8$  DL 50/ml.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fixation du virus sauvage est obtenue après 50 passages, les souris recevant à chaque passage, par voie intra-cérébrale, des dilutions  
10 de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  du surnageant obtenu, pour le premier passage à partir d'un broyat des glandes salivaires de renard, et pour les passages suivants à partir d'un broyat d'encéphale de souris du passage précédent.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé  
15 en ce que la souche de virus fixée est adaptée à la culture sur monocouches d'une lignée cellulaire de poumons de hamster par une dizaine de passages jusqu'à obtenir un titre de  $10^{7,2}$  DL 50/ml, la souche virale initiale ainsi obtenue servant à la culture industrielle par au plus cinq passages supplémentaires sur la lignée cellulaire  
20 de poumons de hamster.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la lignée cellulaire utilisée pour la culture du virus est obtenue à partir de fragments de poumon de hamster nouveau-né étalés dans un milieu de culture et étuvés jusqu'à formation d'un tapis  
25 cellulaire de fibroblastes, ceux-ci subissant des passages successifs dans le même milieu, de façon à obtenir, au 60<sup>e</sup> passage, des cellules présentant une réceptivité très élevée au virus rabique.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la suspension virale obtenue après culture est inactivée  
30 par la bêta-propiolactone.
6. Vaccin antirabique caractérisé en ce qu'il est préparé par le procédé selon l'une des revendications 1 à 5.