



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Int. Cl.³: A 61 K 39/17
C 12 N 7/08

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑪

641 047

⑰ Numéro de la demande: 3870/78

⑰ Titulaire(s):
Recherche et Industrie Thérapeutiques, R.I.T.,
Rixensart (BE)

⑱ Date de dépôt: 11.04.1978

⑳ Priorité(s): 25.04.1977 BE 0/176986

⑱ Inventeur(s):
Jacqueline Gits, La Hulpe (BE)
Nathan Zygraich, Bruxelles (BE)

㉒ Brevet délivré le: 15.02.1984

㉔ Fascicule du brevet
publié le: 15.02.1984

㉔ Mandataire:
Kirker & Cie SA, Genève

㉕ **Vaccin vivant contre la pseudopeste aviaire et procédé pour sa préparation.**

㉖ L'invention est relative à un vaccin aviaire et à sa préparation.

Le vaccin suivant l'invention contient une souche du virus de la pseudopeste aviaire obtenue à partir de la souche P/76/5.

Le vaccin de l'invention est utilisable dans la prévention de la pseudopeste aviaire par administration aux poussins sous la forme d'un aérosol.

REVENDECATIONS

1. Vaccin vivant contre la pseudo- peste aviaire, caractérisé en ce qu'il comprend la souche de virus de la pseudo- peste aviaire P/77/8.

2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un diluant pharmaceutique pour l'administration en aérosol.

3. Vaccin suivant l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le vaccin comprend un stabilisateur.

4. Procédé de préparation d'un vaccin contre la pseudo- peste aviaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on soumet la souche de virus de la pseudo- peste aviaire P/76/5 à deux passages sur fibroblastes d'embryon de poulet à une température non permissive, qu'on récolte la souche obtenue au second passage et qu'on en prépare un vaccin vivant.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que le vaccin est additionné d'un stabilisateur et lyophilisé.

La présente invention concerne un vaccin vivant pour la prévention de la pseudo- peste aviaire ou maladie de Newcastle.

On connaît des vaccins contre la pseudo- peste aviaire contenant des souches lentogènes ou mésogènes, par exemple les souches La Sota ou Hitchner B1, et administrables par différentes voies. Ces vaccins sont administrés par exemple sous la forme d'une suspension dans l'eau de boisson, sous forme de gouttes oculaires ou nasales ou sous la forme d'un aérosol.

Pour la vaccination en masse contre la pseudo- peste aviaire, le vaccin est de préférence administré sous la forme d'un aérosol contenant un virus vivant lentogène, par exemple la souche La Sota ou la souche Hitchner B1, mais R.E. Gough et W.H. Allan («Vet. Rec.», 95, (12): 263-265, 1974) ont montré que l'administration de ces souches en aérosol est associée à une morbidité assez importante chez les poussins, plus particulièrement chez les très jeunes poussins.

Dans notre demande de brevet belge N° 175303 en date du 28 février 1977, nous avons décrit des vaccins améliorés contre la pseudo- peste aviaire administrables sous la forme d'un aérosol, lesdits vaccins comprenant une dose efficace (dose induisant 100% de séroconversion chez les animaux vaccinés) d'une souche atténuée froide et thermosensible obtenue par traitement mutagène réalisé par contact avec l'acide nitreux ou par exposition aux rayons ultraviolets.

L'expression souche froide désigne une souche présentant une croissance nettement plus élevée que la souche parentale à une température inférieure à la température normale de croissance du virus, et l'expression souche thermosensible désigne une souche modifiée dont la croissance à température relativement élevée (plus particulièrement à une température proche de la température interne de l'hôte) est nettement inhibée, alors que la croissance de la souche parentale n'est pas modifiée à cette même température.

Un exemple d'un tel vaccin est celui qui contient une dose efficace de la souche P/76/5 du virus de la pseudo- peste aviaire déposée le 28 janvier 1976 au WHO Collaborating Centre for Collection and Evaluation of Data on Comparative Virology à l'Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians Universität, Munich (République fédérale d'Allemagne).

Par comparaison avec le vaccin contenant la souche parentale de virus de la pseudo- peste aviaire (c'est-à-dire la souche La Sota), le vaccin contenant la souche mutée P/76/5 provoque une morbidité notablement réduite lors de l'administration sous la forme d'un aérosol à des poussins âgés de 1 à 8 d. En pratique, une dose efficace dudit vaccin est réalisée par $10^{7.5}$ DIO₅₀ (doses infectieuses dans 50% des œufs infectés) par pied cube d'air.

Dans la demande de brevet mentionnée ci-dessus, la souche P/76/5 a été décrite comme étant une souche froide et thermosensi-

ble obtenue à partir de la souche La Sota et, dans une communication intitulée «Potential as an aerosol vaccine of an improved Newcastle disease vaccine derived from the La Sota strain. I. in vitro studies», présentée au Symposium international de l'Association mondiale des vétérinaires, microbiologistes, immunologistes et spécialistes des maladies infectieuses, qui s'est tenu à Tunis du 8 août au 2 septembre 1976, nous avons davantage caractérisé la souche P/76/5 par ses propriétés infectieuses sur fibroblastes d'embryon de poulet (FEP). Un résumé de ladite communication a été publié par les organisateurs de ce symposium (AMVMI, Maisons-Alfort, France).

Ces propriétés peuvent en effet refléter le niveau d'atténuation d'une souche de pseudo- peste aviaire. Comme l'ont montré Nagai et coll. dans «Virology», 72: 494, 1976, il existe une corrélation entre le degré de pathogénicité de différentes souches de NDV et leur pouvoir infectieux sur cultures de cellules. Par définition, les souches atténuées ont un pouvoir infectieux réduit, mais ce pouvoir infectieux peut être augmenté par un traitement du virus à la trypsine.

Nous avons montré que l'infectivité sur fibroblastes d'embryon de poulet de la souche P/76/5 est significativement plus faible que celle de la souche parentale La Sota et que l'augmentation du pouvoir infectieux en présence de trypsine est significativement plus élevée pour la souche P/76/5 que pour la souche La Sota. Cette propriété peut être mise en corrélation avec la plus forte atténuation de la souche P/76/5.

Nous avons maintenant trouvé que, en faisant subir à la souche P/76/5 deux passages sur FEP à une température non permissive — plus particulièrement à 41°C —, il est possible d'isoler une souche dépourvue des caractères froid et thermosensible de la souche P/76/5, mais présentant encore le même pouvoir infectieux réduit pour les fibroblastes d'embryon de poulet et la même capacité d'activation par la trypsine.

La souche de virus de la pseudo- peste aviaire obtenue suivant le procédé de l'invention a été déposée le 30 mars 1977 sous la dénomination P/77/8 dans la collection du WHO Collaborating Centre for Collection and Evaluation of Data on Comparative Virology indiquée ci-avant.

Il s'est avéré, et cela constitue un fait surprenant, que la souche ainsi obtenue est nettement plus immunogène que la souche parentale froide et thermosensible P/76/5.

Il a en effet été constaté que la dose efficace d'un aérosol du vaccin contenant la souche de l'invention — c'est-à-dire la souche P/77/8 — est de 10^6 DIO₅₀ par pied cube d'air, c'est-à-dire une dose dix fois plus faible que la dose efficace d'un vaccin contenant la souche parentale P/76/5.

L'invention concerne donc un vaccin amélioré contre la pseudo- peste aviaire et comprenant la souche de virus de la pseudo- peste aviaire P/77/8.

Suivant l'invention, le vaccin amélioré contre la pseudo- peste aviaire est préparé par un procédé qui consiste à soumettre la souche de virus de la pseudo- peste aviaire P/76/5 à deux passages sur FEP à une température non permissive, à récolter la souche obtenue au second passage et à en préparer suivant n'importe quel procédé bien connu des spécialistes un vaccin vivant administrable en aérosol, ledit vaccin étant de préférence additionné d'un stabilisateur et lyophilisé.

Pour une production à grande échelle d'un vaccin suivant l'invention, la souche P/77/8 peut être cultivée dans des œufs embryonnés de poule EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) à une température comprise entre 34 et 37°C, et récoltée par exemple après 3 d d'incubation.

Au virus récolté on ajoute alors de préférence une solution stabilisatrice — par exemple de la peptone, de l'arginine ou du saccharose ou, de préférence, un mélange de ces substances en solution aqueuse — et le mélange est réparti dans des flacons en verre et lyophilisé. On conserve le vaccin sous forme lyophilisée dans les flacons hermétiquement bouchés et on le réhydrate avant administration.

Le vaccin amélioré suivant l'invention peut être mélangé à un ou plusieurs autres vaccins vivants contre l'une ou l'autre maladie respiratoire aviaire et administrables en aérosol, par exemple à un vaccin contre la bronchite infectieuse aviaire.

Le vaccin est réhydraté extemporanément. Il est administré aux poussins suivant la technique bien connue pour l'administration de vaccins contre la pseudo- peste aviaire sous forme d'aérosol, en doses d'au moins $10^{6,0}$ DIO₅₀ de la souche P/77/8 telle que décrite ci-dessus.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants.

Exemple 1:

Dans des tapis monocellulaires (10^6 cellules) de FEP, on inocule 0,2 ml d'une suspension contenant $10^{2,5}$ DIO₅₀ par millilitre de la souche P/76/5. Les cellules inoculées sont recouvertes de milieu minimal de Eagle additionné de 2% (v/v) de sérum fœtal de veau et incubées à 41°C pendant 4 d, et on récolte le surnageant.

Dans des tapis de FEP, on inocule 0,2 ml du surnageant récolté et titrant $10^{2,5}$ DICT₅₀ (dose infectieuse dans 50% des cultures de tissu) et on incube comme ci-dessus les cellules ainsi inoculées.

Le surnageant récolté est inoculé dans des œufs EOPS, la récolte étant clonée par dilution limite à 35°C.

Du clone obtenu et dénommé P/77/8, on prépare un lot de base en cultivant ledit clone dans des œufs EOPS à 35°C pendant 3 d.

Exemple 2:

Caractérisation de la souche du virus de la pseudo- peste aviaire P/77/8
a) Thermosensibilité

Pour différencier les souches P/77/8, P/76/5 et La Sota, on les a inoculées séparément dans des tapis de FEP et on a incubé les cellules inoculées pendant 5 d respectivement à 35 et à 41°C.

Les titres infectieux repris au tableau I montrent que la souche P/77/8 est dépourvue de la thermosensibilité de la souche P/76/5.

Tableau I

Souche	Titre infectieux* à		
	35°C	41°C	Δ 35°C/41°C
La Sota	5,1	5,0	0,1
P/76/5	5,4	3,6	1,8
P/77/8	5,4	5,3	0,1

* Exprimé en \log_{10} TCID₅₀/0,05 ml.

b) Caractère froid

Afin d'étudier la présence ou l'absence du caractère froid, on a inoculé $10^{3,5}$ DIO₅₀ de virus dans des œufs qui ont ensuite été incubés pendant 2 d à 26 ou à 35°C. Les virus ont été titrés sur FEP à 35°C en présence de trypsine (5 µg/ml). Les résultats sont indiqués au tableau II.

Tableau II

Souche	Rendement en virus* à	
	26°C	35°C
La Sota	0,5	8,4
P/76/5	1,7	5,9
P/77/8	0,7	6,6

* Le rendement est exprimé par le titre en \log_{10} TCID₅₀/0,05 ml sur FEP.

Ainsi que le montre le tableau II, la souche P/77/8 a perdu le caractère froid de la souche parentale P/76/5.

c) Evaluation de l'infectivité de la souche P/77/8 sur FEP et influence de la trypsine sur son infectivité

Le pouvoir infectieux de la souche P/77/8 a été mesuré sur FEP et comparé à celui d'autres souches dont le degré de pathogénicité est bien connu (Nagai Y. et coll., «Virology», 72: 494, 1976).

La diminution d'infectivité sur FEP est exprimée par l'augmentation de la différence entre le titre infectieux mesuré sur FEP et le titre infectieux mesuré sur œufs.

L'effet de la trypsine sur le titre infectieux de ces différentes souches sur FEP a également été déterminé. Les résultats sont indiqués au tableau III.

Tableau III

Souche	Différence entre le titre infectieux sur œufs et sur FEP*	Différence entre le titre infectieux sur FEP* en présence ou absence de trypsine
Essex	0,8 (\pm 0,1)	-0,1 (\pm 0,4)
Herts	1,1 (\pm 0,2)	0,0 (\pm 0,1)
La Sota	2,1 (\pm 0,3)	1,4 (\pm 0,2)
BI	2,1 (\pm 0,2)	1,8 (\pm 0,1)
Ulster	3,2 (\pm 0,4)	2,3 (\pm 0,1)
P/77/8	3,5 (\pm 0,2)	2,4 (\pm 0,2)

* Titre infectieux exprimé en \log_{10} DI₅₀/0,1 ml (dose infectieuse 50%); les valeurs entre parenthèses expriment la déviation standard.

Le tableau III indique clairement que les propriétés évaluées permettent de répartir les différentes souches de NDV en 3 classes distinctes et que la souche P/77/8 se différencie nettement de la souche La Sota. Son pouvoir infectieux sur FEP est significativement plus réduit et il est plus sensible à l'activation par la trypsine.

d) Thermolabilité de l'hémagglutinine

Afin de tester la thermolabilité de son hémagglutinine, on a soumis la souche P/77/8 à différentes températures pendant différentes durées. Le tableau IV montre les résultats de l'étude des souches P/77/8, Essex et La Sota.

Tableau IV

Thermolabilité de l'hémagglutinine (exprimée en inverse du titre hémagglutinant)

Exposition	température (°C)	durée (min)	Souche		
			Essex	La Sota	P/77/8
22		0	256	1024	1024
		60	128	1024	1024
50		10	256	256	512
		20	256	64	256
		30	256	8	8
		40	256	<2	<2
		60	256	<2	<2
56		2	256	256	128
		5	256	<2	<2
		10	256	<2	<2

On constate que la thermolabilité de l'hémagglutinine de la souche P/77/8 est comparable à celle de la souche La Sota.

e) Sensibilité au pH

Afin de comparer la sensibilité des souches P/77/8 et La Sota au pH, on les a soumises à divers pH à 35°C pendant 4 h.

Le tableau V montre leurs titres infectieux résiduels.

Tableau V
Sensibilité au pH

pH	Titre infectieux*	
	La Sota	P/77/8
	Titre initial 5,5	
7	5,5	5,5
5	5,4	5,2
3	0	0

* Exprimé en \log_{10} TCID₅₀/0,05 ml sur FEP.

On constate que la sensibilité de la souche P/77/8 au pH est comparable à celle de la souche La Sota.

Exemple 3:

Dans des œufs embryonnés de poule EOPS à 34-37°C et pendant 3 d, on cultive la souche de virus du lot de base obtenue à la fin de l'exemple 1 et, au surnageant récolté, on ajoute une solution stabilisatrice à base de peptone (10% p/v), arginine (3% p/v) et saccharose (5% p/v). Le mélange est réparti dans des flacons en verre de 5 ml de façon à contenir 10⁶DIO₅₀ par millilitre et lyophilisé. Les flacons sont bouchés hermétiquement et contiennent des doses multiples de vaccin à administrer sous forme d'aérosol.

Exemple 4:

Essais in vivo de la souche P/77/8

a) Etudes d'innocuité

Afin de tester l'innocuité de la souche P/77/8, on a vacciné des poussins EOPS âgés de 1 d et maintenus dans une unité d'isolement avec 50 ml de vaccin titrant 10^{7,5}EID₅₀/0,5 ml, en utilisant pour ce faire un générateur d'aérosol Turbais (fabriqué et vendu par Turbair Ltd. Britannica Works, Waltham Abbey, Essex, Grande-Bretagne).

A titre de contrôle, on a vacciné des poussins EOPS âgés de 1 d dans les mêmes conditions avec la souche La Sota.

La période d'observation était de 10 d.

Le tableau VI résume les résultats.

Tableau VI
Innocuité de la souche P/77/8

Souche	Nombre d'animaux	Index de pathogénicité*	Moyenne	Limites de confiance à 95% de la moyenne
La Sota	20	0,45	0,352	0,15-0,554
	10	0,20		
	9	0,58		
	10	0,20		
P/77/8	20	0,33	0,020	0,000-0,069
	10	0,00		
	20	0,02		
	10	0,04		
	10	0,04		

* L'index de pathogénicité (IP) est calculé pour une période d'observation postvaccinale de 10 d.

$$(IP) = \frac{\text{total des points}}{\text{nombre d'observation}}$$

avec un système de points où
 ← la morbidité = 1
 — la mortalité = 2

Ainsi que le montre le tableau VI, la souche P/77/8 est sensiblement moins pathogène que la souche La Sota lors d'une administration en aérosol à des poussins de 1 d.

b) Etude de dosage

Afin de déterminer la dose efficace de la souche P/77/8 dans le vaccin, on a vacciné des poussins âgés de 1 d avec différentes doses de vaccin à raison de 10 animaux par groupe.

Le tableau VII montre le taux de séroconversion ainsi que la moyenne géométrique du titre (MGT) inhibant l'hémagglutination (IH) chez les animaux séropositifs.

Tableau VII

Dose (log ₁₀ DIO ₅₀ /pied cube)	Pourcentage de séroconversion parmi les animaux vaccinés avec la souche			MGT (en log ₂ IH) des animaux séropositifs vaccinés avec la souche		
	La Sota	P/76/5	P/77/8	La Sota	P/76/5	P/77/8
4,5	10	NT	0	(5,0)	NT	—
5,5	90	0	20	6,6	—	(3,5)
6,0	NT	40	100	NT	4,2	4,6
6,5	100	70	100	7,8	4,1	5,7
7,0	NT	100	100	NT	4,4	6,4
7,5	100	100	100	7,9	6,6	7,3

Les valeurs entre parenthèses ont été obtenues sur moins de cinq animaux,
 NT = non testé.

Le tableau VII montre que la dose induisant 100% de séroconversion (dose efficace) pour le vaccin contenant la souche P/77/8 est de l'ordre de 10⁶DIO₅₀.