

Brevet N° **81687**
 du **14 septembre 1979**
 Titre délivré :

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Industrielle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite : GIST-BROCADES N.V., 1 Wateringsweg, Delft, Pays-Bas (1)

représentée par E. Meyers & E. Freylinger, Ing. cons. en propr. ind., 46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires (2)

dépose ce quatorze septembre mil neuf cent soixante dix-neuf (3)
 à 15⁰⁰ heures, au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
Vaccin combiné contre la maladie de Newcastle et la chute de ponte provoquée par des virus Adeno-like. (4)

déclare, en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :

1. - Peter APONTOWEIL, Burg, Martenslaan 39, 3956 EK Leersum, Pays-Bas (5)
2. - Johannes A. G. KOK, Frins Bernhardlaan 10, 3761 AB Soest, Pays-Bas

2. la délégation de pouvoir, datée de Delft le 9 août 1979

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires ;

4. une planches de dessin, en deux exemplaires ;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
 le 16 août (seize) mil neuf cent soixante dix-neuf

revendique pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en (7) Pays-Bas

le quatorze septembre mil neuf cent soixante dix huit sous le No 78 09 364 (8)
et le vingt-six avril mil neuf cent soixante dix neuf sous le No 79 03 300

au nom de la déposante (9)

élit domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
46 rue du Cimetière, Luxembourg (10)

sollicite la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes
 susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à — mois.

L'un des mandataires

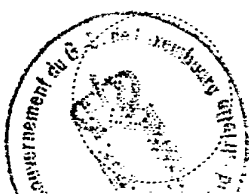
II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Industrielle à Luxembourg, en date du :

14 septembre 1979

à 15⁰⁰ heures

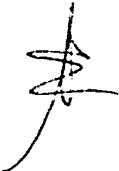
Pr. le Ministre
 de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes,
 p. d.



A 68007

(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) s'il y a lieu «représenté par...» agissant en qualité de mandataire — (3) date du dépôt en toutes lettres — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité — (7) pays — (8) date — (9) déposant original — (10) adresse — (11) 6, 12 ou 18 mois.

BL-2705/EM/BM
LUX-2094

 Revendication de la priorité des demandes de
brevet déposées aux Pays-Bas le 14 septembre 1978
sous le No 78 09 364 et le 26 avril 1979 sous le
No 79 03 300.

B R E V E T D ' I N V E N T I O N

*Vaccin combiné contre la maladie de Newcastle et la
chute de ponte provoquée par des virus*

Adeno-like

*La société dite :
GIST-BROCADES N.V.
1 Wateringseweg
Delft, Pays-Bas*



La présente invention concerne un vaccin combiné prêt à l'administration contre les infections de la volaille et plus particulièrement contre la maladie de Newcastle et la maladie caractérisée par une chute soudaine de ponte provoquée par des virus adeno-like. L'invention concerne en outre la préparation de ce vaccin combiné et le procédé de préparation du constituant actif contre la chute de ponte que comprend ce vaccin.

La maladie de Newcastle ou pseudopeste aviaire, qui est l'une des affections respiratoires les plus importantes de la volaille, est provoquée par un virus et peut être la cause d'une mortalité importante dans la volaille à tout âge.

Différents vaccins contre la maladie de Newcastle ont été mis au point et il est apparu que ces vaccins sont de préférence administrés sous leur forme inactivée parce que celle-ci assure un haut degré de sécurité. De plus, l'administration du vaccin vivant a parfois pour conséquence que le virus inoculé se répand de la volaille vaccinée à de la volaille qui est susceptible d'infection ou qui n'est pas en état d'immunité.

Malgré la mise au point de vaccins vivants relativement sûrs et conférant une bonne immunité contre la maladie de Newcastle, par exemple comme il ressort du brevet anglais n° 1.510.100, il subsiste un besoin évident de vaccins inactivés contre la maladie de Newcastle.

Du fait que les affections respiratoires de la volaille sont souvent la conséquence de plus d'une source d'infection, on a préparé des vaccins combinés, comme celui du brevet des Etats Unis d'Amérique n° 2.798.835, qui consiste en une combinaison d'un vaccin contre la bronchite infectieuse et d'un vaccin contre la maladie de Newcastle, ces deux constituants dérivant de virus vivants.

De plus, la demande publiée de brevet des Pays-Bas n° 71 17873 (entre-temps publiée pour opposition sous le n° 157209) décrit un procédé de préparation d'un vaccin combiné contre les maladies respiratoires de la volaille qui comprend une combinaison d'un vaccin mort contre le coryza infectieux, obtenu par culture d'une souche d'*Haemophilus gallinarum* dans un milieu nutritif naturel, puis inactivation des bactéries, avec un vaccin mort contre la bronchite infectieuse et un vaccin mort contre la maladie de Newcastle.

Il convient de remarquer que différents articles, par

exemple, Avian Dis. 7 (1963) pages 106 à 122, Am. J. Vet. Res. 17 (1956) pages 294 et 298, Avian Dis. 11 (1967) pages 399 à 406 et Virology 33 (1967) pages 598 à 608, indiquent que l'activité de chacun de ces constituants peut diminuer ou disparaître entièrement par mélange avec des virus vivants en raison d'une inhibition mutuelle.

Une relation entre la présence de virus adeno-like et, pour partie, la chute de ponte soudaine et/ou l'augmentation de la ponte d'oeufs à coquille molle et/ou sans coquille, qu'on a observées de plus en plus fréquemment ces dernières années, en particulier chez les femelles jeunes et poules de races à ponte moyenne à forte, a déjà été relevée dans Avian Pathology, 5 (1976) pages 261 à 272. Ces symptômes sont parfois appelés "chute de ponte". On trouve dans Avian Pathology 6 (1977) pages 405 à 413 aussi une relation qui a été observée entre le développement d'anticorps à l'égard d'un virus hémagglutinant, dit virus 127, et les symptômes économiquement très désavantageux décrits ci-dessus. La relation présumée entre la présence d'un virus adeno-like et la chute de ponte soudaine décrite ci-dessus est confirmée dans Avian Pathology 7 (1978) pages 35 à 47. De plus, différentes propriétés caractéristiques du type de virus en question sont décrites, par exemple l'agglutination caractéristique des érythrocytes de poulet et l'impossibilité de neutraliser des antisérums des adeno-virus de types connus.

Le brevet luxembourgeois n° 79154 décrit un procédé pour la préparation d'un vaccin contre le syndrome de la chute de ponte à partir d'un virus adeno-like qui est caractérisé par une réaction d'hémagglutination et une réaction d'antisérums spécifiques. Dans la description et les exemples, ce virus est appelé virus EDS-76 et BC-14. Ce vaccin est préparé par culture du nouveau virus dans une culture de tissu, qui est de préférence une culture du tissu d'oiseau, par exemple des fibroblastes d'embryon de poulet et des cellules hépatiques ou rénales embryonnaires, ou bien dans des oeufs de cane embryonnés.

Il ressort de manière évidente d'Avian Pathology 5 (1976) page 262, second paragraphe, d'Avian Pathology 6 (1977) page 406 et du brevet luxembourgeois n° 79154, page 1, lignes 7 à 11 également, que la chute de ponte peut être provoquée par la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse, l'encéphalomyélite infectieuse des poulets, les virus de la variole aviaire et leurs

combinaisons.

Par conséquent, d'un point de vue pratique, la volaille doit souvent être vaccinée simultanément ou en succession rapide avec deux ou plusieurs vaccins contre les maladies à virus précitées les plus fréquentes. En particulier, la volaille doit être vaccinée simultanément contre la maladie de Newcastle et la chute de ponte provoquée par des virus adeno-like. Le mode opératoire jusqu'à présent habituel pour une telle administration simultanée consistait à mélanger des volumes normaux des deux vaccins distincts prêts à l'usage et à administrer une dose de vaccin composée sur place, la dose ayant par conséquent un volume sensiblement double de celui des vaccins administrés séparément, mais contenant les virus respectifs à l'état dilué. De plus, un mélange exact est difficile à garantir et des difficultés dues à des infections étrangères peuvent se manifester.

L'invention a donc pour but de procurer un vaccin combiné prêt à l'administration qui soit efficace tant contre la maladie de Newcastle que contre la chute de ponte provoquée par des virus adeno-like et qui satisfasse de plus aux critères sévères actuels des autorités vétérinaires dans la plupart des pays intéressés.

La Demanderesse a découvert avec surprise qu'il est possible de préparer un vaccin combiné prêt à l'administration en combinant un liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle inactivé et un liquide contenant du virus adeno-like inactivé.

Il convient de noter que l'invention concerne aussi les vaccins combinés inactivés dérivant d'au moins un liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle et d'au moins un liquide contenant du virus adeno-like inactivé et dérivant éventuellement de plus que ces deux types de virus précités.

Pour l'exécution du procédé de l'invention, le liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle inactivé est préparé de manière connue en principe, par exemple par culture du virus désiré dans des oeufs de poule embryonnés, collecte du virus cultivé dans un liquide d'un titre habituel pour ce genre de vaccin, inactivation du virus, mise en suspension du virus dans une solution tamponnée convenable et homogénéisation de la suspension, puis la suspension est mélangée avec un liquide contenant un virus adeno-like inactivé s'obtenant par culture du virus dans des oeufs de cane fécondés ou dans une culture de cellules de

canard, collecte du virus produit dans un liquide d'un titre habituel pour un vaccin de ce genre et inactivation du liquide contenant le virus de façon classique.

Pour la préparation du liquide contenant le virus de la
5 maladie de Newcastle, on peut utiliser différents virus de la maladie de Newcastle qui sont peu virulents ou pratiquement avirulents (lentogènes ou vélogènes), mais qui ont de bonnes propriétés d'immunisation, par exemple le virus La Sota ou Hitchner (lentogène) ou le virus Herts 33/56 (vélogène).

10 Des exemples spécifiques de souches de virus appropriées sont les souches P/76/5, P/76/4 et P/76/3 de l'Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenmedizin der Ludwig Maximilians Universität, Munich (République Fédérale d'Allemagne), les souches VR-108, VR-107, VR-109, VR-699 et VR-623 de l'Améri-
15 can Type Culture Collection, Rockville, Maryland (Etats-Unis d'Amérique), la souche Queensland V 4 du Centr. Vet. Labs., Weybridge (Grande Bretagne) et le virus L/Z 258 P déposé sous le n° I.O. 91 de la Collection de l'Institut Pasteur à Paris (France).

Pour la préparation du constituant qui est le liquide
20 contenant le virus adeno-like inactivé, on utilise de préférence une souche du virus 127 ayant subi des passages, déposée sous le n° I.O.90 à l'Institut Pasteur à Paris, bien que d'autres types de virus adeno-like provoquant la chute de ponte antigéniquement assez semblables, puissent être utilisés avec succès. Cette
25 souche de virus I.O. 90 est de préférence cultivée dans des oeufs de cane.

La préparation du liquide contenant le virus adeno-like inactivé commence de préférence à partir d'un virus provenant d'une souche de virus 127 ayant subi des passages, comme indiqué
30 dans les références précitées d'Avian Pathology, bien que d'autres types de virus adeno-like provoquant la chute de ponte puissent être utilisés également avec succès.

Pour la préparation du vaccin combiné, on inactive 150 à 250 ml d'un liquide tamponné contenant du virus de la maladie de
35 Newcastle, on homogénéise éventuellement le liquide et on l'ajoute avec 100 à 200 ml de liquide tamponné contenant du virus adeno-like préalablement inactivé et éventuellement homogénéisé à 600-700 ml d'une phase huileuse. Les constituants essentiels de la phase huileuse sont au moins un des constituants choisis parmi les huiles
40 minérales paraffiniques légères (de qualité satisfaisant aux cri-



tères de la Food and Drug Administration des Etats-Unis d'Amérique), les huiles végétales et les huiles minérales naphténiques, en association avec un ou plusieurs émulsionnants appropriés, comme des composés non ioniques tensio-actifs issus d'oxydes d'alkylène et/ou d'alcools hexahydroxylés et/ou d'acides gras naturels supérieurs (en C_{10} à C_{20}), par exemple des esters et ester-éthers. Des exemples en sont le monooléate de mannide (Span[®] 80, Arlacel A[®] et Arlacel 80[®]) et le monolaurate de polyoxyéthylène(20) sorbitan (par exemple le Tween[®] 80).

10 Le rapport volumique du liquide tamponné contenant le virus de la maladie de Newcastle au liquide tamponné contenant le virus adeno-like peut varier de 3:4 à 5:1 et est de préférence d'environ 3:2.

15 Le rapport volumique de la phase aqueuse formée par les deux liquides contenant les virus à la phase huileuse peut varier de 1:1 à 3:7 et est de préférence d'environ 7:13.

La Demanderesse a découvert que la phase aqueuse doit être ajoutée à la phase huileuse sous vive agitation et/ou homogénéisation pour la formation de l'émulsion finale liquide stable 20 et fluide.

La phase huileuse contient 2 à 20% en poids (sur la base du poids de la phase huileuse) d'un émulsionnant et de préférence 2 à 15% en poids d'Arlacel[®] 80 ou d'Arlacel 80[®] ou bien de Span[®] 80 et 0,2 à 4% de Tween[®] 80. Les constituants de la phase 25 huileuse sont de préférence chauffés séparément à au moins 110°C à l'autoclave ou stérilisés par filtration à l'état de mélange.

L'inactivation des deux constituants liquides de départ contenant les virus peut être effectuée à l'aide des agents d'inactivation habituels, par exemple au moyen de β -propiolactone, 30 éventuellement en mélange avec un stabilisant, ou au moyen de formaldéhyde. De préférence, la β -propiolactone est ajoutée en une concentration de 0,05 à 0,25% en poids (sur la base du poids de la phase aqueuse) à un liquide tamponné contenant du virus de la maladie de Newcastle et le liquide est mis à incuber à environ 35 37°C pendant 1 à 2 heures et de préférence 90 minutes, tandis que le liquide tamponné contenant le virus adeno-like est inactivé au moyen de formaldéhyde, de préférence à environ 20°C pendant environ 20 heures, en concentration de 0,02 à 0,5% en poids. Ensuite, si la chose est nécessaire, les liquides contenant les virus sont 40 homogénéisés de la manière habituelle. Un agent de conservation,

comme du thiomersal ou du formaldéhyde en solution tamponnée, peut ensuite être ajouté à la phase aqueuse.

Pour la formation du vaccin combiné conduisant aux titres favorables désirés après administration, il convient d'utiliser une solution de départ de virus de la maladie de Newcastle d'un titre de $10^{9,8}$ à $10^{10,5}$ doses infectieuses pour l'embryon de poulet et de préférence supérieur ou égal à 10^{10} doses infectieuses pour l'embryon de poulet et un liquide contenant du virus adeno-like d'une activité d'au moins 10^2 unités d'hémagglutination et de préférence 10^3 unités d'hémagglutination.

Il est évident que les propriétés favorables des vaccins antiviraux combinés faisant l'objet de l'invention étaient totalement imprévisibles pour le spécialiste en raison de différentes réactions indésirables que le spécialiste ne peut exclure avec certitude, par exemple que les activités de l'un des constituants viraux ou des deux dans le vaccin final peuvent baisser jusqu'à une valeur indésirable à cause d'une interaction mutuelle non désirée entre les constituants liquides contenant du virus ou à cause d'une interaction de ces constituants liquides avec l'un des auxiliaires chimiques utilisés. Par exemple, le spécialiste ne peut certainement pas exclure que la β -propiolactone ajoutée puisse inactiver trop fort l'un des constituants viraux en agissant trop longtemps, alors que cette durée est nécessaire pour l'inactivation de l'autre constituant viral.

L'administration du vaccin combiné conforme à l'invention est plus avantageuse que celle des vaccins connus préparés par mélange des vaccins constitutifs sur place, du fait qu'un volume plus petit (par exemple 0,5 ml au lieu de 1 ml) suffit pour l'administration et provoque donc moins d'irritation locale. De plus, une quantité plus faible d'agents chimiques étrangers à l'organisme doit être administrée. En outre, les inconvénients précités résultant du mélange et de l'introduction d'agents infectieux étrangers sont évités.

Les vaccins ainsi préparés sont d'habitude administrés à des oiseaux âgés de 10 à 20 semaines, avant la saison de ponte.

L'invention a en outre pour objet un procédé de préparation d'un liquide de départ convenable contenant du virus adeno-like, suivant lequel on cultive un virus adeno-like dans des oeufs de cane ou sur une culture de fibroblastes d'embryon de canard, par exemple une culture en monocouche dans des bouteilles animées

d'un mouvement de roulement ou une culture de cellules fixées à des véhicules inertes solides.

Suivant une forme de réalisation préférée de l'invention, on forme une culture de fibroblastes d'embryon de canard en monocouche dans des bouteilles animées d'un mouvement de roulement en mettant les cellules de départ en suspension dans un milieu de culture consistant en au moins 70 à 90 parties de milieu d'Eagle et éventuellement en 5 à 15 parties de sérum de veau, avec addition d'une solution de bicarbonate de sodium à 2 - 4% et de 1 à 5 parties d'une solution ou suspension d'un ou plusieurs antibiotiques à choisir parmi la pénicilline G, la streptomycine et la natamycine, le liquide de culture étant séparé lorsque la culture des cellules est pratiquement confluyente. La culture de cellules est infectée au moyen d'une suspension du virus, mise à incubation à 37°C pendant 30 à 120 minutes pour la fixation du virus, puis additionnée d'un milieu d'entretien consistant en milieu d'Eagle, augmenté de 2 à 10% de sérum de veau, de 2 à 10 parties de bouillon au tryptose phosphate (à 30 g par litre), de 10 à 20 parties de liquide amniotique de vache et des additifs ci-dessus, la récolte du milieu et des cellules contenant le virus étant effectuée 12 à 48 heures après manifestation des effets cytopathogènes.

La culture de cellules est inoculée d'une suspension de virus adeno-like ayant une activité supérieure ou égale à 30×10^6 doses infectieuses pour la culture de tissu par bouteille animée d'un mouvement de roulement. Sous ce rapport, la Demanderesse a découvert que les cultures de cellules en suspension ne conviennent pas pour le procédé ci-dessus.

Pour la préparation du vaccin, il est préférable d'utiliser une souche de virus 127 ayant subi des passages tel qu'elle est déposée à la Collection de l'Institut Pasteur à Paris sous le n° I.O. 90, et cette souche est de préférence cultivée dans des oeufs de cane.

Le brevet luxembourgeois n° 79154 décrit en effet de manière générale la préparation de vaccins contre le syndrome de chute de ponte, mais le procédé de production proposé conformément à l'invention, qui est préféré à l'échelle industrielle pour ces vaccins liquides d'un titre élevé acceptable, n'y est nullement décrit ni même suggéré.

Il convient de se rapporter à ce propos à la page 2, li-

gnes 28 à 30 de ce brevet luxembourgeois qui mentionne nettement que le virus peut notamment être cultivé dans des fibroblastes d'embryon de poulet. La Demanderesse a toutefois découvert que ce mode opératoire ne conduit certainement pas au résultat désiré qui est économiquement requis. Il ressort de la page 6, lignes 29 à 35 qu'on utilise une culture de cellules hépatiques embryonnaires de poulet, qui ne conduisent pas non plus au résultat désiré économiquement requis parce que la culture à l'échelle industrielle sur des cellules hépatiques embryonnaires est encore considérée comme étant un procédé de production très délicat et donc fort onéreux.

L'invention est illustrée par les exemples suivants.

EXEMPLE 1.-

a) Culture du virus adeno-like (souche 127 ayant subi des passages)

On prépare des cultures de cellules dans des bouteilles animées d'un mouvement de roulement (Bellco) au départ d'oeufs de cane incubés pendant 12 à 13 jours en utilisant des fibroblastes d'embryon de canard dans du milieu d'Eagle à 10 % de sérum de veau contenant 0,22% en poids de bicarbonate de sodium et 2% en volume d'une solution antibiotique contenant de la pénicilline G, de la streptomycine et de la natamycine.

On sépare le milieu par aspiration lorsque les cultures de cellules sont pratiquement confluentes. On inocule les cultures alors au moyen d'une suspension de la souche du virus 127 ayant subi des passages, puis on les met à incuber à 37°C pendant 1 heure et on y ajoute du milieu d'entretien d'Eagle contenant 5% de sérum de veau, 10% en volume de bouillon au tryptose phosphate (à 30g par litre), 10% en volume de liquide amniotique de vache, 0,22% en poids de bicarbonate de sodium et 2% en volume de la solution antibiotique précitée.

On récolte le milieu et les cellules contenant le virus adeno-like un jour après la manifestation de l'effet cytopathogène et du décollement des cellules de la paroi de verre. On congèle la suspension de virus à -20°C et on la conserve pour la préparation du vaccin. On estime le titre par hémagglutination et la dose infectieuse 50 pour la culture de tissu de la suspension.

b₁) Culture du virus de la maladie de Newcastle

On met à incuber des oeufs exempts d'agents pathogènes spécifiques pendant 11 jours, puis on les inocule avec du virus L/Z 258 P. On met la culture à incuber à 37°C pendant 72 heures

et on recueille le liquide amnio-allantoïque. Ce liquide amnio allantoïque contient environ 10^{10} doses infectieuses ₅₀ pour l'embryon de poulet par ml. On congèle la suspension de virus à -20°C ou à une température plus basse et on la conserve pour la production du vaccin.

b₂) Après 11 jours d'incubation d'oeufs exempts d'agents pathogènes spécifiques, on les inocule avec du virus Herts 33/56 d'ensemencement. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C , on recueille le liquide amnio allantoïque qui contient environ 10^{10} doses infectieuses ₅₀ pour l'embryon de poulet. On congèle la suspension de virus à -20°C ou à une température plus basse et on la conserve pour la production du vaccin.

c) Traitement de la suspension de virus

On fait dégeler les suspensions congelées de virus et on les inactive au moyen de 0,05 à 0,25% de β -propiolactone au bain-marie à 37°C pendant 90 minutes. On conserve les suspensions jusqu'au lendemain à $+4^{\circ}\text{C}$. On vérifie l'inactivation en observant l'apparition des effets cytopathogènes sur des fibroblastes d'embryon de canard ou des fibroblastes d'embryon de poulet, puis en effectuant un essai d'hémabsorption. On met des oeufs de poule préalablement couvés exempts d'agents pathogènes spécifiques à incubation avec le liquide contenant le virus inactivé et on les contrôle ultérieurement.

On homogénéise les suspensions de virus à l'aide d'un homogénéiseur Ultra Turrax. Si la chose est désirée, on dilue la suspension avec de la solution physiologique tamponnée au phosphate additionnée de 0,3% de solution de formaldéhyde en fonction de la dose infectieuse ₅₀ pour l'embryon de poulet du liquide amnio-allantoïque et du titre d'hémagglutination de la suspension de virus adeno-like. On mélange le liquide amnio allantoïque contenant le virus de maladie de Newcastle et la suspension de virus adeno-like ensuite dans un rapport de 6:4 et on utilise le mélange pour la préparation de l'émulsion.

d) Préparation de l'émulsion

On mélange les suspensions de virus avec la phase huileuse dans un rapport de 6,5 parties d'huile pour 3,5 parties de liquide contenant du virus et on émulsionne le tout de façon que la dimension moyenne des gouttelettes de la phase aqueuse soit d'environ 0,05 à 0,5 micron, par exemple par injection de la suspension de virus dans la phase huileuse avec homogénéisation simultanée dans

un homogénéiseur Ultra Turrax.

La constitution de la phase huileuse est la suivante :
 Marcol[®] 52 (huile paraffinique blanche

	Société Esso)	93,6% en volume
5	Arlacel [®] A ou Arlacel [®] 80 ou bien	
	Span 80 (monooléate de mannide)	6,0% en volume
	Tween [®] 80 (monooléate de polyoxy- éthylène(20)sorbitan)	0,4% en volume

On chauffe les constituants de la phase huileuse séparément jusqu'à 110°C à l'autoclave ou on les stérilise par filtration à l'état de mélange.

On obtient une émulsion stable qu'on essaye :

- 1) en pipetant directement, après la mise en émulsion, des gouttelettes de l'émulsion sur une surface aqueuse, auquel cas les gouttelettes ne s'étalent pas et restent intactes,
- 2) en laissant reposer l'émulsion à 37°C pendant 4 heures, auquel cas une phase aqueuse ne se sépare pas.

Les concentrations finales des émulsions ainsi obtenues sont de 21% de liquide tamponné contenant du virus de la maladie de Newcastle et 14% de liquide tamponné contenant du virus adeno-like 127.

On administre le vaccin résultant par doses de 0,5 ml par animal par voie intramusculaire dans les muscles de la patte ou à la poitrine ou par voie sous-cutanée dans le cou. Au huitième jour après la vaccination, les anticorps inhibant l'hémagglutination sont observables.

EXEMPLE 2.-

On répète les opérations de l'exemple 1 avec les modifications suivantes.

- a) Au lieu de préparer le liquide contenant le virus adeno-like comme précisé en a) de l'exemple 1, on le prépare en inoculant des oeufs de cane préalablement incubés pendant 9 jours au moyen de la souche du virus 127 ayant subi les passages. Après 7 jours d'incubation à 37°C, on recueille le liquide amnio-allantoïque. Celui-ci a un titre d'hémagglutination d'environ 1:1024. On congèle ensuite la suspension de virus à -20°C et on la conserve pour la préparation du vaccin.
- b) Après traitement de la suspension du virus de la maladie de Newcastle comme décrit en c) de l'exemple 1 et inactivation de la suspension de virus adeno-like au moyen de 0,02 à 0,5% de formal-

déhyde pendant 20 heures à 22°C, on mélange le liquide contenant le virus de la maladie de Newcastle et celui contenant le virus adeno-like dans un rapport de 4:1, après quoi on utilise le mélange pour préparer l'émulsion comme décrit en d) de l'exemple 1.

5 EXEMPLE 3.-

a) On prépare du liquide contenant le virus adeno-like comme décrit au stade correspondant de l'exemple 2.

b) On prépare du liquide contenant le virus de la maladie de Newcastle comme décrit au stade correspondant de l'exemple 1.

10 c) On exécute le traitement de la suspension de virus de la maladie de Newcastle comme dans l'exemple 1 et le traitement de la suspension de virus adeno-like comme dans l'exemple 2.

On mélange dans le rapport de 5:1 le liquide amnio-allantoïque contenant le virus de la maladie de Newcastle et le liquide de amnio-allantoïque contenant le virus adeno-like qui ont subi le traitement.

d) On ajoute et on incorpore le mélange des suspensions de virus à la phase huileuse à raison de 6,5 parties de phase huileuse pour 3,5 parties de liquide contenant du virus, dont on prépare 20 une émulsion par passage au broyeur colloïdal.

La phase huileuse utilisée a la composition suivante :

Marcol [®] 52	91,4% en volume
Arlacel [®] A ou Arlacel [®] 80 ou bien	
Span [®] 80	8,0% en volume
25 Tween [®] 80	0,6% en volume

EXEMPLE 4.-

On prépare un liquide contenant du virus adeno-like et un liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle comme décrit aux stades correspondants de l'exemple 1. Après traitement des suspensions de virus comme décrit au stade c) de l'exemple 1, on mélange le liquide contenant le virus de la maladie de Newcastle et celui contenant le virus adeno-like dans le rapport de 4:3 et on en prépare une émulsion comme décrit en d) de l'exemple 1. On mélange toutefois la phase huileuse et la combinaison de liquides 35 contenant les virus dans le rapport de 6:4, la phase huileuse ayant la constitution indiquée à l'exemple 1 au stade d).

EXEMPLE 5.-

On vérifie comme décrit ci-après le vaccin combiné préparé comme dans l'exemple 4.

40 On vaccine au moyen du vaccin combiné des poulets âgés de

Handwritten signature/initials

8 semaines et exempts d'agents pathogènes spécifiques qui n'ont pas été vaccinés antérieurement. Le titre d'inhibition de l'héماغglutination et le nombre d'unités d'inhibition d'héماغglutination dans le sérum provenant des animaux vaccinés ne diffèrent pas sensiblement des taux d'anticorps relevés sur des animaux qui ont été vaccinés à l'aide des vaccins simples correspondants d'une composition comparable et dans les mêmes conditions.

La figure du dessin annexé, portant en abscisses la durée depuis la vaccination en semaines et en ordonnées le nombre d'unités (virus de Newcastle) et le titre (virus adeno-like 127) d'inhibition d'héماغglutination, comprend les courbes expérimentales du nombre d'unités d'inhibition d'agglutination et du titre d'inhibition d'héماغglutination sous la forme 2^x sur une échelle logarithmique.

On observe un nombre d'unités d'inhibition d'héماغglutination dues au virus de la maladie de Newcastle qui est sensiblement supérieur sur les animaux qui ont déjà été vaccinés antérieurement avec du vaccin de virus vivant de la maladie de Newcastle (ainsi qu'il est habituel de la faire en pratique).

Chez ces animaux, on trouve, par exemple, $10^{16,0}$ à $10^{17,0}$ unités d'inhibition d'héماغglutination dues au virus de la maladie de Newcastle quatre à huit semaines après la vaccination au moyen du vaccin combiné du virus de la maladie de Newcastle et de virus adeno-like.

REVEN DICATIONS

1.- Vaccin inactivé combiné prêt à l'administration actif au moins contre la maladie de Newcastle et la chute de ponte provoquée par des virus adeno-like.

5 2.- Vaccin inactivé combiné suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il dérive d'au moins un liquide contenant du virus adeno-like obtenu par culture d'une souche de virus 127 ayant subi des passages.

3.- Vaccin inactivé combiné suivant les revendications 1
10 et 2, caractérisé en ce qu'il contient une phase huileuse contenant, comme constituants essentiels, au moins l'un des constituants choisis parmi les huiles minérales paraffiniques légères (de qualité satisfaisant aux critères de la Food and Drug Administration, Etats-Unis d'Amérique), les huiles végétales et les
15 huiles minérales naphéniques et un ou plusieurs agents émulsionnants convenables, par exemple des composés tensio-actifs non ioniques issus d'oxydes d'alkylène et/ou d'alcools hexahydroxylés et/ou d'acides gras naturels supérieurs (en C₁₀ à C₂₀), comme des esters et ester-éthers.

20 4.- Vaccin inactivé combiné suivant les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le rapport volumique du liquide tamponné contenant du virus de la maladie de Newcastle et du liquide tamponné contenant du virus adeno-like peut varier de 3:4 à 5:1 et est de préférence d'environ 3:2.

25 5.- Vaccin inactivé combiné suivant les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le rapport volumique de la phase aqueuse formée par les deux liquides contenant des virus à la phase huileuse peut varier de 1:1 à 3:7 et est de préférence d'environ 7:13.

30 6.- Vaccin inactivé combiné suivant les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la phase huileuse contient 2 à 20% en poids d'un émulsionnant et de préférence 2 à 15% en poids d'Arlacel[®] A, d'Arlacel[®] 80 ou de Span 80[®] et 0,2 à 4% du Tween 80[®].

35 7.- Procédé de préparation d'un vaccin inactivé combiné prêt à l'administration actif contre la maladie de Newcastle et la chute de ponte provoquée par des virus adeno-like, caractérisé en ce qu'on inactive un liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle, on l'homogénéise éventuellement et on l'ajoute, en
40 même temps qu'un liquide contenant du virus adeno-like préalable-

ment inactivé et éventuellement homogénéisé, à une phase huileuse contenant, comme constituants essentiels, au moins un des constituants choisis parmi les huiles minérales paraffiniques légères (de qualité satisfaisant aux critères de la Food and Drug Administration, Etats-Unis d'Amérique), les huiles végétales, les huiles minérales naphténiques et un ou plusieurs émulsionnants appropriés, par exemple des composés tensio-actifs non ioniques dérivant d'oxydes d'alkylène et/ou d'alcools hexahydroxylés et/ou d'acides gras naturels supérieurs (C_{10} à C_{20}), comme des esters et ester-éthers, avec addition éventuelle d'un agent de conservation à la phase aqueuse.

8.- Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on utilise de la β -propiolactone, éventuellement en combinaison avec un stabilisant, comme inactivateur pour le liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle.

9.- Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on utilise du formaldéhyde comme inactivateur pour le liquide contenant du virus adeno-like.

10.- Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce qu'on utilise la β -propiolactone en concentration de 0,05 à 0,25% en poids (sur la base du poids de la phase aqueuse) dans le liquide tamponné contenant du virus.

11.- Procédé suivant les revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'on exécute l'incubation à 37°C pendant 1 à 2 heures.

12.- Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on part d'un liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle ayant un titre de $10^{9,8}$ à $10^{10,5}$ doses infectieuses pour l'embryon de poulet par ml.

13.- Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce qu'on part d'un liquide contenant du virus de la maladie de Newcastle ayant un titre supérieur ou égal à 10^{10} doses infectieuses pour l'embryon de poulet par ml.

14.- Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on part d'un liquide contenant du virus adeno-like ayant une activité d'au moins 10^2 unités d'hémagglutination.

15.- Procédé de préparation d'un liquide de départ contenant du virus adeno-like pour la préparation d'un vaccin inactivé combiné prêt à l'administration suivant les revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on cultive un virus adeno-like dans des oeufs de cane ou dans une culture de cellules, par exemple une culture

en monocouche dans des bouteilles animées d'un mouvement de roulement ou une culture de cellules fixées sur des véhicules solides inertes, consistant en fibroblastes d'embryon de canard.

16.- Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce qu'on forme la culture de cellules en monocouche en mettant les cellules de départ en suspension dans un milieu de culture consistant en au moins 70 à 90 parties de milieu d'Eagle, additionné éventuellement de 5 à 15 parties de sérum de veau, d'une solution à 2 - 4% en poids de bicarbonate de sodium et de 1 à 5 parties d'une solution ou suspension d'un ou plusieurs antibiotiques tels que la pénicilline G, la streptomycine et la natamycine, on sépare le milieu de culture lorsque la culture de cellules est presque confluyente, on inocule les cellules au moyen d'une suspension du virus, on met les cellules en incubation à 37°C pendant 30 à 120 minutes pour fixer le virus et on y ajoute du milieu d'entretien consistant au moins en milieu d'Eagle additionné de 2 à 10% de sérum de veau, de 2 à 10 parties de bouillon au tryptose phosphate (à 30 g par litre) et de 10 à 20 parties de liquide amniotique de vache, outre des autres additifs précités, puis on recueille les cellules et le milieu contenant le virus 12 à 48 heures après manifestation des effets cytopathogènes.

17.- Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce qu'on utilise la souche de virus 127 ayant subi des passages.

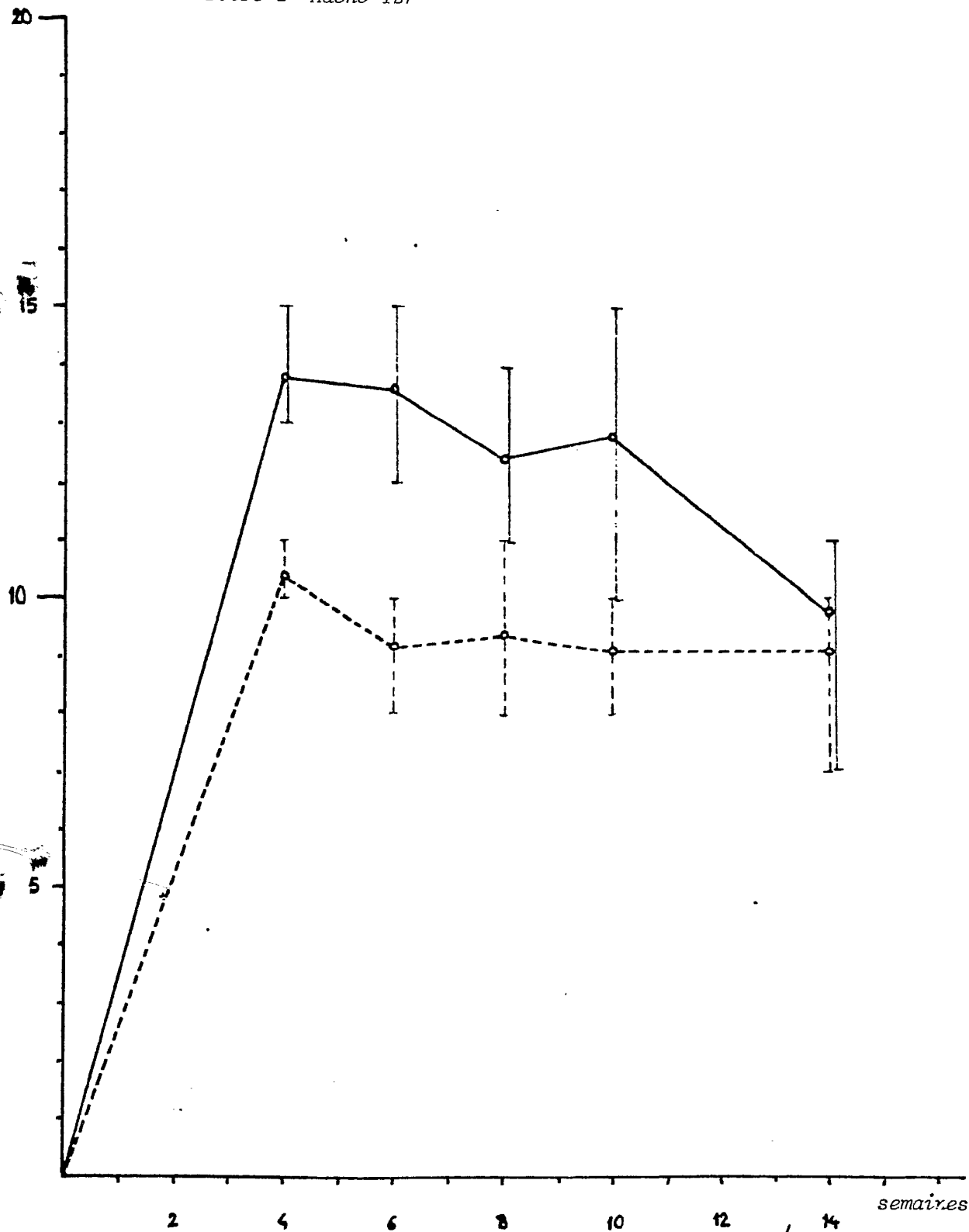
18.- Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce qu'on inocule la culture de cellules au moyen d'une suspension de virus adeno-like ayant une activité supérieure ou égale à 30×10^6 doses infectieuses pour la culture de tissu par bouteille de culture animée d'un mouvement de roulement.

19.- Souche de virus adeno-like 127 ayant subi des passages déposée sous le n° I.O.90 à la Collection de l'Institut Pasteur à Paris.

20.- Souche de virus de la maladie de Newcastle L/Z 258 P déposée sous le n° I.O.91 à la Collection de l'Institut Pasteur à Paris.

---- Unités 2^x Newcastle

— Titre 2^x Adeno 127



[Handwritten signature]