

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 80 14845

⑤4 Vaccin contre la rhinotrachéite bovine infectieuse.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 39/265; C 12 N 7/06.

⑫ Date de dépôt..... 3 juillet 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : *EUA, 9 juillet 1979, n° 55,821.*

④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 30-1-1981.

⑦1 Déposant : IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC., résidant aux EUA.

⑦2 Invention de : Harold Wayne Lupton et David Ellsworth Reed.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

- 1 -

La rhinotrachéite bovine infectieuse (IBR) a été reconnue pour la première fois comme une maladie distincte du bétail dans les années 50. En accord avec les caractéristiques d'autres virus de l'herpès, le virus de l'IBR (IBRV) se reproduit dans une grande variété de types de cellules et entraîne différents troubles tels que des troubles des voies respiratoires, la conjonctivite, la vulvovaginite, l'avortement, la balano-posthite, la méningo-encéphalite, des troubles des voies digestives et une infection systémique fatale.

10 Mais l'IBR est surtout connue comme une maladie des voies respiratoires, caractérisée par une trachéite, une rhinite et de la fièvre. L'infection par l'IBR est la cause la plus couramment diagnostiquée de l'avortement chez les vaches gravides. Voir Kirkbride et al, J. Am. Vet. Med. Assoc.,

15 162, 556-560 (1973). Le virus se transmet facilement et est distribué dans le monde entier. Certains bovins développent une infection latente qui peut être réactivée.

La lutte contre l'IBR est surtout basée sur la vaccination et à cet effet on a mis au point plusieurs vaccins

20 différents contre l'IBR. Voir Kahrs, J. Am. Vet. Med. Assoc. 171, 1055-1060 (1977). Ces vaccins comprennent des vaccins par voie parentérale et intranasale, utilisant tous les deux l'IBRV atténué. Les vaccins parentéraux qui sont ordinairement administrés par voie intramusculaire, peuvent provo-

25 quer l'avortement chez les bovins gravides et sont donc contraindiqués pour les bovins gravides. En outre, la vaccination de veaux encore à la mamelle qui sont nourris par des vaches gravides, peut provoquer l'avortement par suite de la transmission du virus par les veaux vaccinés. Les

30 vaccins intranasaux sont plus sûrs à cet égard, et sont capables de produire des anticorps humoraux à des titres comparables à ceux des vaccins intramusculaires. Toutefois, l'administration des vaccins intranasaux entraîne certains problèmes. Il faut immobiliser la tête et avoir soin d'administrer le

35 vaccin profondément dans les deux naseaux. Les animaux vaccinés ont tendance à expulser le vaccin lorsqu'ils

- 2 -

reniflent après la vaccination.

Le degré d'efficacité des vaccins de la technique antérieure est variable et la durée de protection est limitée. De façon générale, on pense qu'une vaccination intramusculaire donne une protection de plus longue durée qu'une vaccination intranasale. Avec la vaccination intranasale, la pratique préservatrice dicte une revaccination annuelle, alors qu'au moins une revaccination occasionnelle est recommandée avec les vaccins intramusculaires. On a également développé des vaccins contre l'IBR inactivés, mais leur efficacité est controversée. Une revaccination annuelle est recommandée. Les vaccins inactivés présentent d'autres inconvénients tels qu'une réaction d'hypersensibilité fatale (anaphylaxie) et un urticaire non-mortel.

Jusqu'à présent, on ne connaît pas de sous-unité de vaccin contre l'IBR. Mais, on a envisagé la possibilité de sous-unités pour la préparation d'autres virus vaccins. Voir, par exemple, Rubin et al, Progr. Med. Virol., 21, 144-157 (1975). Cappel a rapporté des expériences avec une sous-unité de vaccin du virus herpes simplex chez les lapins. Arch. Virol. 52, 29-35 (1976). On a trouvé que la sous-unité de vaccin était aussi efficace que l'immunisation avec le virus herpes simplex vivant ou inactivé aux U V. De même, Cox et al ont rapporté des expériences avec une sous-unité de vaccin pour la rage humaine. Infect. and Immun. 16, 753-754 (1977). Cappel et Cox et al ont travaillé avec des extraits des virus par un détergent non-ionique, car on sait que des détergents nonioniques sont capables de solubiliser l'enveloppe des glycoprotéines des virus. Voir Helenius et al. "Solubilisation des membranes par les détergents", Biochem. et Biophys. Acta 415, 29-79 (1975). Cependant, Sokal a constaté en règle générale que les sous-unités de vaccin contenant des antigènes solubles fourniraient une immunogénicité spécifique ou une action protectrice spécifique nettement inférieure à celle des virus vaccins.

- 3 -

Sokal, Vaccines of the Future: Immunogenicity of Viral Components, 2, pp. 129-135, dans "Viruses and Immunity", Koproski, 1975, Academic Press, Inc.

L'invention est basée en partie sur la découverte des
5 moyens de production des vaccins contre l'IBR donnant des
réponses d'anticorps nettement supérieures à celles des
vaccins antérieurs contre l'IBR, qu'ils soient expérimentaux
ou commercialisés. De plus, les vaccins préparés selon
l'invention sont capables de produire des réponses d'anti-
10 corps supérieures à celles trouvées dans le bétail après
des infections IBR naturelles.

Les vaccins selon l'invention sont préparés à partir
d'IBRV virulent, tel que des isolats naturels d'IBRV ou un
IBRV substantiellement non-atténué. Le virus d'IBR dans sa
15 forme naturelle ou virulente est propagé dans un mélange
cellule-milieu capable de promouvoir la multiplication du
virus. Après la propagation, les cellules infectées sont
séparées du mélange et sont extraites avec une solution
aqueuse d'un détergent nonionique afin d'obtenir une solu-
20 tion aqueuse de la protéine antigénique. Le résidu non-
solubilisé est séparé de la solution surnageante qu'on
utilise alors comme ingrédient antigénique du vaccin.
L'antigène soluble en solution aqueuse est combiné de
préférence avec un adjuvant approprié pour fournir un vaccin
25 parentéral sous forme de doses injectables. On préfère des
adjuvants de type huile tels que l'Adjuvant Incomplet de
Freund.

A un taux de dose efficace en combinaison avec un adju-
vant approprié, on peut obtenir un taux de réponse d'anti-
30 corps qui confère l'immunité à la maladie et également
empêche le développement d'une infection IBR. Ceci est indi-
qué par le fait que des animaux vaccinés ne transmettent pas
le virus lorsqu'ils sont confrontés avec l'IBRV vivant
virulent. Cette découverte est presque inattendue, car on
35 observe toujours la transmission du virus dans le cas de

- 4 -

veaux exposés, ayant été vaccinés avec tout vaccin existant, et on ne connaît pas de références de la littérature qui suggèrent que la prévention de la transmission du virus d'IBR soit possible par une vaccination. Le bétail vacciné
5 ne développe pas de lésions, ni de signes cliniques d'IBR.

Les vaccins selon l'invention peuvent être utilisés chez les animaux gravides, les vaches encore à la mamelle et les veaux avec des anticorps maternels. Les vaccins ne contiennent pas le virus IBR actif, et ne peuvent donc
10 pas provoquer une infection ou un transfert d'IBRV. De plus, étant donné que les vaccins ont une composition antigénique limitée, des tests sérologiques peuvent être effectués pour distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. Ceci n'est pas réalisable avec les vaccins contre l'IBR d'usage
15 courant. Plus précisément, le vaccin selon l'invention pourrait être utilisé dans un programme d'éradication local ou national, car la lutte contre le transfert du virus est essentielle pour lutter contre la transmission du virus. Les vaccins contre l'IBR actuellement disponibles
20 n'empêchent pas un transfert du virus ou l'établissement d'infections latentes.

Toute souche virulente du virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse (IBRV) peut être utilisée dans la pratique de l'invention. Par exemple, on peut utiliser la souche
25 Cooper qui est fournie comme virus provoquant l'IBR par le "Veterinary Services Laboratory", U.S.D.A., Ames, Iowa. Des souches d'IBRV virulentes peuvent être obtenues à partir d'autres sources, telles que "l'American Type Culture Collection". Par exemple, le ATCC n° VR-188 convient très bien.
30 On peut également recueillir les isolats naturels sur du bétail infecté par l'IBRV, garantissant ainsi que ces isolats sont totalement virulents. Cependant, ces souches virulentes peuvent être soumises à un certain nombre de passages sur des cellules, in vitro, tout en retenant leur
35 virulence, tel qu'indiqué par l'aptitude à infecter le

- 5 -

bétail et à provoquer des signes cliniques d'IBR, par exemple une élévation moyenne de la température à plus de 39,7°C.

L'IBRV virulent est propagé par une culture de cellules. On utilise de préférence des cellules bovines qui sont

5 capables de propager le virus d'IBR à un titre élevé, telles que des cellules de poumon de bovin, des cellules de rein, des cellules de testicule, etc. On peut utiliser des lignées, établies, de cellules bovines adaptées pour une culture in vitro, bien que de bons résultats soient également possibles

10 avec des cellules fraîchement collectées. Pour obtenir la propagation du virus, les cellules sont combinées avec un milieu nutritif approprié qui est adapté pour promouvoir la multiplication du virus jusqu'à un titre élevé. Par exemple, le milieu basal peut comprendre un milieu essentiel minimal

15 d'Eagle (MEM). Pour favoriser la multiplication virale, il est souhaitable d'ajouter un sérum foetal de veau (FCS). Par exemple, on peut utiliser 10 % de FCS pour la prolifération des cellules et un taux de 5 % de FCS pour l'entretien des cellules après l'infection lorsque le virus se multiplie.

20 Dans les 24 heures après l'inoculation avec l'IBRV, les cellules sont tuées et la propagation du virus est totale. La protéine de l'enveloppe virale désirée est associée aux membranes des cellules où elle est recueillie avant d'être formée en particules virales d'IBR.

25 Lorsque la propagation est terminée, les cellules sont de préférence séparées des milieux liquides. Dans un mode opératoire, ceci peut être réalisé par centrifugation. Par exemple, les cellules sont rassemblées en un culot séparé du milieu de culture des cellules par centrifugation à

30 100 000 g pendant 60 minutes. Les cellules séparées sont alors extraites avec un détergent nonionique qui solubilise la protéine de l'enveloppe virale associée aux membranes et inactive le virus IBR. Le culot de cellules peut être remis en suspension dans de l'eau contenant le détergent nonionique

35 utilisé pour la solubilisation. On peut se servir de solutions

- 6 -

de détergent à 0,5 à 5 %. Les détergents nonioniques qui se sont avérés efficaces pour solubiliser la glycoprotéine de l'enveloppe virale sont avantageux. Par exemple, on peut utiliser le Triton X-100 (octyl phénoxy polyéthoxyéthanol).

5 Ce détergent nonionique est fabriqué par Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pennsylvania et est distribué dans le commerce par Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri. Le Nonidet P 40 est un autre détergent nonionique qui a été rapporté dans la littérature comme avantageux pour la dissolution sélective de

10 la protéine de l'enveloppe virale. Le Nonidet P 40 est fabriqué par BDH Chemical Ltd., Poole, G.B. et distribué aux Etats Unis par Gallard-Schlesinger Chemical Mfg. Corp., Carle Place, New York. Ces détergents nonioniques solubilisent la protéine de l'enveloppe virale sans provoquer une détério-

15 ration appréciable de la protéine.

La mise en contact de la solution aqueuse du détergent avec les membranes cellulaires peut être activée par une rupture mécanique ou une dispersion des cellules. Par exemple, les cellules remises en suspension peuvent passer dans un

20 homogénéiseur ou être soumises à un traitement aux ultrasons, pour favoriser le contact du détergent nonionique avec les membranes cellulaires et le virus IBR. Une très faible quantité de la protéine de l'enveloppe virale désirée est obtenue à partir des particules virales d'IBR elles-mêmes, mais une

25 inactivation complète du virus IBR est désirable. Il est souhaitable d'effectuer le contact à un pH neutre ou légèrement alcalin, tel qu'un pH de l'ordre de 6,0 à 9,0. Un tampon approprié peut être ajouté à la solution aqueuse pour maintenir le pH désiré. L'eau utilisée pour l'extraction est

30 de préférence une eau déionisée stérile. L'extraction peut être effectuée en une à deux heures. Par exemple, avec une homogénéisation et/ou un traitement aux ultrasons, et une agitation continue de la suspension de cellules dans le détergent aqueux, l'extraction peut être terminée en une heure.

35 De préférence, la suspension est maintenue à une température

- 7 -

d'environ 4°C. Lorsque l'extraction est terminée, on sépare le résidu de matériau solide de la solution surnageante de protéine solubilisée. Par exemple, la séparation peut se faire par centrifugation. Les débris de cellules peuvent être
5 rassemblés en un culot par centrifugation à 100 000 g pendant 60 minutes.

L'extrait de protéine sous-virale ainsi obtenu peut être utilisé pour préparer des vaccins où, si l'on préfère, il contient une concentration suffisante de protéine pour lui
10 permettre d'être mélangé avec un adjuvant afin de préparer des doses injectables de vaccin. La quantité utilisée par dose doit être efficace pour empêcher une IBR, soit en une simple injection, soit en une série de deux injections. Par exemple, l'extrait peut contenir de 3 à 6 mg de solides
15 de protéine extraits par ml. La forme de dose injectable du vaccin peut être préparée en mélangeant des parties égales d'un adjuvant approprié et de l'extrait de protéine sous-virale tel qu'obtenu (sans concentration). Bien que le vaccin (extrait de protéine avec adjuvant) puisse contenir
20 de 0,5 à 10 mg/ml de protéine totale (sur une base solide), il contient ordinairement une quantité de l'ordre de 1 à 6 mg/ml de la protéine extraite. Par exemple, lorsque la dose de vaccin doit correspondre à 2 ml, la dose totale contiendra de 2 à 12 mg de protéine totale, soit, par exemple une dose
25 totale de 4 à 8 mg.

Si cela s'avère nécessaire, la protéine antigénique peut être concentrée ou recueillie avant la préparation du vaccin, par relargage ou ultrafiltration. Lorsque la protéine antigénique est recueillie sous forme solide, elle est de
30 préférence remise en suspension dans l'eau à la concentration désirée pour l'incorporation dans le vaccin. Puis, comme indiqué ci-dessus, la solution de la protéine de l'enveloppe virale est combinée avec un adjuvant approprié. Etant donné que l'antigène est en solution, il est préférable de combiner
35 la solution aqueuse avec un adjuvant de type huile. Par

- 8 -

exemple, on peut utiliser un Adjuvant Incomplet de Freund. Cet adjuvant est commercialisé par Difco Laboratories, Detroit, Michigan, par exemple, ou bien il peut être préparé en mélangeant du monooléate de mannitol avec de l'huile de paraffine dans les proportions (en volume) de 1,5:8,5. Le vaccin résultant est une émulsion eau dans huile, l'antigène étant dans la phase aqueuse dispersée. Bien que les proportions de l'adjuvant par rapport à l'extrait de protéine puissent varier considérablement, des proportions approximativement égales sont désirables.

Les vaccins selon l'invention sont particulièrement désignés pour être utilisés pour le bétail et peuvent être administrés à des veaux et à des vaches gravides. Les vaccins peuvent également être utilisés avec d'autres espèces bovines, telles que le buffle aquatique. Le volume de la dose injectable peut varier entre 1 et 4 ml par exemple. Mais une dose de 2 ml est commode. L'administration du vaccin peut se faire en une seule injection, mais il est préférable de procéder à une série de deux injections par animal. Par exemple, une dose de 2ml contenant de 4 à 8 mg de protéine totale peut être administrée deux fois à 30 jours d'intervalle. La maladie est évitée et le transfert du virus IBR par dispersion virale est également évité, rendant ainsi plus efficace la lutte contre l'infection par l'IBR.

Pour le développement et l'essai des vaccins préparés conformément à l'invention, on a utilisé les matériaux et les procédés suivants.

Virus - On a recueilli la souche virulente Cooper d'IBRV au huitième passage, provenant du "National Veterinary Services Laboratory", Ames, Iowa. La souche Cooper est utilisée de façon classique comme souche "de provocation". Elle était passée deux fois dans des cellules de poumon de bovin (BLU) et on a congelé à -70°C une masse de base contenant $1,0 \times 10^8$ unités formant des plaques (PFU) par ml.

Mode de culture des cellules - Les cultures de cellules utilisées dans cette étude ont été conduites dans un Milieu

- 9 -

Essentiel Minimal d'Eagle (MEM) auquel on a ajouté 10 % de sérum foetal de veau (FCS) irradié (inactivé à la chaleur à 56°C pendant 30 minutes), 0,5 % d'hydrolysate de lactalbumine et des antibiotiques (100 UI de pénicilline, 100 µg de sulfate de kanamycine et 100 µg de sulfate de streptomycine par ml). On a tamponné le milieu avec 0,16% de bicarbonate de sodium et 8 mM d'acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique (HEPES). On a incubé les cultures à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

- 10 Isolement du virus - On a recueilli les sécrétions nasales pour isoler le virus, en insérant sur toute sa longueur un tampon à pointe de coton de 15 cm dans le méat nasal central gauche et en manipulant le tampon avec un mouvement de rotation jusqu'à saturation. On a immergé les échantillons de tampon dans 1,0 ml de MEM contenant des antibiotiques (200 UI de pénicilline, 200 µg de sulfate de kanamycine, 200 µg de sulfate de streptomycine et 16 µg d'amphotéricine B par ml) et on a maintenu à 4°C pendant 30 minutes. On a alors retiré les tampons du milieu et congelé le milieu à -70°C.

Dans le virus contenu dans les échantillons, on a déterminé les unités formant des plaques en inoculant des cultures en double de couches monocellulaires de BLU avec des séries de dilutions d'un facteur 10 (dans le MEM) de chaque échantillon. On a laissé 60 minutes pour l'adsorption de l'inoculum, puis on a lavé les couches monocellulaires avec du MEM et on a recouvert avec 1 % de gélose contenant du MEM, 5 % de FCS et des antibiotiques. On a incubé les cultures à 37°C pendant 72 heures dans une atmosphère à 5 % de CO₂. On a fixé les cultures avec de la formaline tamponnée (10 %), on a séparé la couche de gélose et coloré la feuille de cellules avec du cristal violet. On a déterminé le titre de virus par comptage des PFU.

- 30 Essais de réduction des plaques et neutralisation - Les titres de neutralisation du sérum anti-IBR ont été déterminés par des essais de réduction des plaques et neutralisation.

- 10 -

On a mélangé une dilution au double de sérum du sérum inactivé par la chaleur (à 56°C pendant 30 minutes) avec des volumes égaux de MEM contenant 1 000 PFU d'IBRV par ml et incubé pendant 60 minutes à 37°C. On a inoculé des couches mono-cellulaires de cellules de BLU dans des plaques pour culture en tissu plastique à 6 encoches de 35 mm, avec 0,2 ml du mélange sérum-virus. Après adsorption du mélange sérum-virus pendant 60 minutes à 37°C, on a lavé les cultures au MEM et recouvert avec 1 % de gélose contenant du MEM, 5 % de FCS et des antibiotiques. On a incubé les cultures à 37°C pendant 72 heures, puis on les a fixées avec 10 % de formaline tamponnée. On a séparé la couche de gélose et on a coloré la couche de cellules avec du cristal violet. Le titre de neutralisation du sérum était l'inverse de la plus forte dilution sérique qui réduisait d'au moins 50 % le nombre de plaques.

Dosage de la protéine - On a dosé la protéine selon la méthode de Lowry et al, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951) avec de la sérum albumine bovine comme produit de comparaison. La teneur en protéine des échantillons contenant un détergent nonionique a été déterminée en utilisant une méthode de Lowry modifiée, telle que décrite dans Anal. Biochem. 86, 346-356 (1977).

La production de vaccins conformément à l'invention et les résultats obtenus dans les essais des vaccins sont illustrés par les exemples suivants.

EXEMPLE I

Production de vaccins

On fait se multiplier des cellules de poumon de bovin (BLU) dans des flacons de 490 cm² en rotation jusqu'à formation de couches monocellulaires. On infecte les couches monocellulaires en éliminant le milieu et en ajoutant 5 ml d'IBRV de base, préparé tel que décrit ci-dessus. Après 60 minutes d'adsorption, on sépare l'inoculum, on lave la couche monocellulaire avec du MEM et on ajoute 30 ml du milieu d'entretien (MEM contenant 5 % de FCS). On incube les

- 11 -

cellules à 37°C sous rotation de 1 tour/minute jusqu'à ce que l'effet cytopathique (CPE) soit total. (environ 24 heures). On détache les cellules de BLU infectées de la surface du flacon sous agitation avec une râcle en caoutchouc. On

5 centrifuge le mélange cellules-milieu à 100 000 g pendant 1 heure. On solubilise le culot résultant en utilisant le procédé de Vestergaard et al modifié, J. Virol., 24, 87-90 (1977). On met le culot en suspension dans un mélange de 0,010 M de glycine et de 0,038 M de tris(hydroxyméthyl)-

10 aminométhane (Tris) (pH 9,0) contenant 0,5 % de Triton X-100 (1 ml par flacon sous agitation). On homogénéise le mélange dans un homogénéiseur et on soumet aux ultra-sons pendant 2 cycles de 20 secondes, avec un émetteur d'ultra-sons réglé à 90 % d'efficacité. On laisse le mélange réagir pendant

15 1 heure à 4°C en agitant constamment avec un agitateur magnétique. On centrifuge le mélange à 100 000 g pendant 1 heure et on recueille la solution surnageante comme vaccin. On conserve le vaccin à -70°C jusqu'à emploi. On mélange le vaccin avec un égal volume d'Adjuvant Complet

20 de Freund ou d'Adjuvant Incomplet de Freund et on émulsifie par 200 mouvements de va et vient dans un appareil de mélange. On produit une seconde sous-unité de vaccin en modifiant le procédé ci-dessus. La solution d'extraction est dans ce cas une solution de 2,5 % de Nonidet P-40

25 (NP-40) dans l'eau distillée, préparée tel que décrit par Martin et al dans Infect. Immun. 5, 248-254 (1972).

EXEMPLE II

Détermination de l'antigénicité du vaccin

On administre des préparations de cellules témoins et

30 de sous-unité de vaccin solubilisé dans le Triton X-100 à 10 bêtes, ayant une réponse négative au sérum IBR, en deux doses intramusculaires à 20 jours d'intervalle, tel que détaillé dans le Tableau A. Pendant l'étude, on observe les animaux chaque jour pour déceler le moindre signe

35 clinique de maladie. On note les températures rectales pendant 3 jours avant la vaccination et 10 jours après la

vaccination. On recueille les sécrétions nasales pour isoler le virus, avant la vaccination et les 2ème, 3ème et 7ème jours après la vaccination. On recueille des échantillons de sérum chaque semaine.

5 Expérience 1

Détermination de l'antigénicité de la sous-unité de vaccin

Les 10 animaux étudiés dans cette expérience sont restés cliniquement normaux pendant la durée de l'étude. Les températures rectales après la vaccination sont à $\pm 1^{\circ}\text{C}$ les mêmes que celles notées avant la vaccination. On n'isole pas de virus des sécrétions nasales avant la vaccination. Les titres de neutralisation sérique sont rapportés dans le Tableau B.

TABLEAU A : Programme de vaccination pour déterminer l'antigénicité de la sous-unité
de vaccin IBR solubilisé dans le Triton X-100

Numéro du veau	Vaccin	Dose (ml) / (2) vaccination
1	Cellules témoins sans adjuvant	1
2	Cellules témoins avec adjuvant	2
3	Sous-unité de vaccin IBR sans adjuvant	1
4	"	1
5	"	2
6	"	2
7	Sous-unité de vaccin IBR avec adjuvant (1)	2
8	"	2
9	"	4
10	"	4

(1) Adjuvant complet de Freund

(2) Un ml sans adjuvant et chaque dose de ml avec adjuvant contiennent 4,4 mg d'extrait de protéine.

TABLEAU B : Titres de neutralisation du sérum après administration intramusculaire
de la sous-unité de vaccin IBR solubilisé dans le Triton X-100

Numéro du veau	Vaccin	Dose (ml) (4)	Titre de neutralisation du sérum (1)						
			Semaine après la vaccination (3)						
			1	2	3	4	5	6	7
1	Cellules témoins sans adjuvant	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
2	Cellules témoins avec adjuvant	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
3	Sous-unité de vaccin IBR sans adjuvant	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
4	"	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
5	"	2	<2	8	4	8	2	2	2
6	"	2	<2	4	4	8	8	8	4
7	Sous-unité de vaccin IBR avec adjuvant	2	<2	4	8	128	128	128	128
8	"	2	<2	8	16	1024	512	512	512
9	"	4	<2	64	128	512	512	512	512
10	"	4	<2	64	64	1024	1024	512	512

(1) Titre exprimé comme l'inverse de la plus forte dilution sérique réduisant
d'au moins 50 % le nombre de plaques

(2) Adjuvant complet de Freund

(3) Seconde dose de vaccin administrée après 3 semaines

(4) Voir Tableau A

EXEMPLE IIIDétermination de la protection immune

On divise au hasard en 5 groupes (4 dans chaque groupe) 20 veaux, séronégatifs IBR, âgés de 3 à 6 mois, et pendant la durée de l'étude on les enferme dans des chambres d'isolement séparées, closes. On vaccine les groupes de veaux, numérotés de 1 à 5, par voie intramusculaire tel que détaillé dans le Tableau C. 30 jours après la vaccination, on administre aux veaux un inoculum de virus standard pour provoquer une infection (IBR de souche Cooper avec 1×10^6 PFU, au 10ème passage). On injecte dans chaque naseau 2 ml d'inoculum au moyen d'un atomiseur à gaz.

On examine les veaux chaque jour pour déceler le moindre signe clinique de maladie, à partir du 7ème jour avant la vaccination jusqu'à la fin de l'étude. On note les températures rectales pendant 3 jours avant la vaccination et 14 jours après l'administration d'inoculum. On recueille les sécrétions nasales pour isoler le virus trois fois avant la vaccination et chaque jour, pendant 7 jours après la vaccination initiale dans chaque groupe. Après l'administration de l'inoculum, on recueille les sécrétions nasales selon le programme suivant: 5 minutes après l'administration de l'inoculum, à 15 minutes d'intervalle pendant l'heure suivant l'administration, chaque heure pendant les 15 heures après l'administration, aux 18ème, 20ème, 22ème et 24ème heures après l'administration et toutes les 24 heures pendant les 14 jours suivant l'administration. On recueille des échantillons de sérum 3 fois avant la vaccination et chaque semaine après la vaccination.

Après la vaccination, de 4 veaux témoins et 5 sur 12 des veaux vaccinés développent des boursouflures avec induration à l'endroit d'inoculation du vaccin et ont des réponses fébriles (40 à $41,1^\circ\text{C}$) qui persistent pendant 1 à 3 jours. Une inoculation intramusculaire profonde et la suppression de "toute coulée d'inoculum" évitent une réaction à la seconde vaccination.

- 16 -

Le Tableau D résume les titres de neutralisation sérique après la vaccination et l'infection provoquée.

Après l'inoculation intranasale provoquée avec l'IBRV, tous les veaux des groupes 2, 3, 4 et 5 restent cliniquement normaux à l'exception des veaux n° 5, 10 et 11 qui développent une infection modérée des voies respiratoires. Les signes cliniques de la maladie sont une température élevée, des pustules herpétiques intranasales et un exudat nasal fibrino-nécrotique. L'évolution clinique de la maladie observée chez les veaux n° 10 et 22 est caractérisée par une température élevée qui persiste au-delà de la résolution des lésions intranasales et de l'exudation nasale. La température revient à sa valeur initiale 24 heures après le début d'un traitement aux antibiotiques, le 9ème jour après l'administration d'inoculum. Le veau n°20 meurt pour des causes étrangères à l'expérience le 38ème jour après la vaccination. L'examen post mortem ne révèle aucune évidence de la maladie, ni aucune lésion à l'endroit de la vaccination. L'infection provoquée des veaux témoins se traduit par de sévères troubles respiratoires, caractérisés par une température élevée (jusqu'à 41,7°C) et la formation de plaques fibrino-nécrotiques importantes sur les muqueuses nasales.

On ne recueille pas de virus dans les sécrétions nasales avant ou après la vaccination. Dans les groupes 2 et 3, on isole le virus inoculé 5 et 15 minutes après l'inoculation provoquée, mais on ne peut pas en isoler à partir des sécrétions nasales de veaux 30 minutes après l'inoculation provoquée. On ne peut pas isoler de virus d'inoculum provoqué à partir des sécrétions nasales de veaux des groupes 4 et 5 5 minutes après l'inoculation. Après la clearance initiale de l'inoculum de virus provoqué, on isole le virus des sécrétions nasales 18 heures après l'administration provoquée dans les groupes 2 et 3 et 22 heures après dans les groupes 4 et 5. Le Tableau E résume les détails de la perte de virus dans les sécrétions nasales pendant 14 jours après

- 17 -

l'administration provoquée d'inoculum. On n'isole pas de virus chez les veaux n° 13, 14, 17, 18 ou 19 après l'administration intranasale de virus, pour provoquer une infection.

TABLEAU C : Programme de vaccination pour déterminer l'efficacité des vaccins sous-viraux IBR solubilisés dans le Triton X-100 et le NP-40

Numéro du groupe	Nombre de veaux	Vaccin	Doses de vaccin (1)
1	1 à 4	Cellules témoins solubilisés dans le Triton X-100	1
2	5 à 8	Sous-unité de vaccin IBR solubilisé dans le Triton X-100	1
3	9 à 12	Sous-unité de vaccin IBR solubilisé dans le NP-40	1
4	13 à 16	Sous-unité de vaccin IBR solubilisé dans le Triton X-100	2
5	17 à 20	Sous-unité de vaccin IBR solubilisé dans le NP-40	2

(1) Chaque dose consiste en un extrait cellulaire d'un ml et en 1 ml d'adjuvant Incomplet de Freund.

Chaque ml de l'extrait dans le Triton X-100 contient 3,5 mg de protéine et pour l'extrait dans le NP-40

Chaque ml contient 5,8 mg de protéine. La seconde dose de vaccin est administrée après 30 jours.

TABLEAU D : Titres de neutralisation du sérum après l'administration intramusculaire du vaccin sous-viral IBR solubilisé dans le Triton X-100 et le NP-40

Groupe/numéro de l'animal	Sous-unité de vaccin	Titre de neutralisation du sérum (1)								Semaine après l'infection provoquée (3)	
		Semaines après la vaccination									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Groupe 1											
	Témoin										
1		<2	<2	<2	<2	<2				<2	
2		<2	<2	<2	<2	<2				<2	
3		<2	<2	<2	<2	<2				<2	
4		<2	<2	<2	<2	<2				<2	
Groupe 2											
	Triton X-100										
5	1 dose	<2	<2	16	16	32		Non applicable		128	
6		<2	2	8	16	16				256	
7		<2	<2	8	16	16				32	
8		<2	2	4	16	32				128	
Groupe 3											
	NP-40										
9	1 dose	<2	2	64	32	64				128	
10		<2	<2	32	32	64				128	
11		<2	2	64	32	64				256	
12		<2	4	64	32	64				256	
Groupe 4											
	Triton X-100										
13	2 doses	<2	2	16	64	32	256	256	512	512	
14		<2	2	16	32	64	1024	1024	512	512	
15		<2	2	8	8	0	256	256	128	256	
16		<2	2	8	16	16	128	128	128	128	
Groupe 5											
	NP-40										
17	2 doses	<2	2	8	32	32	256	512	512	512	
18		<2	2	8	64	64	256	256	256	512	
19		<2	<2	32	32	64	256	256	256	128	
20		<2	2	16	16	16	128	(2)			

1) Titre exprimé comme l'inverse de la plus forte dilution sérique qui diminue d'au moins 50% le nombre de plaques

2) Veau mort le 58ème jour après la vaccination

(3) Infection provoquée par administration intranasale par un virus IBR de souche Cooper contenant 1,106 PFU, administré 30 jours après la dernière dose de vaccin.

**TABLEAU E : Isolement du virus après une infection intranasale
provoquée chez des veaux vaccinés avec le vaccin sous-viral
IBR solubilisé dans le Triton X-100 et le NP-40**

Groupe/ Numéro de l'animal	Sous-unité de vaccin	Titres du virus (1) après l'infection provoquée													
		Nombre de jours écoulés													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Groupe 1	Témoin														
1		3,8	5,3	7,4	7,0	6,7	5,8	5,5	3,2	2,5	(2)	-	-	-	-
2		2,3	5,0	5,7	7,2	7,3	6,0	6,2	6,0	3,0	-	-	-	-	-
3		3,0	4,8	6,8	7,0	6,8	6,3	5,9	4,0	-	-	-	-	-	-
4		3,7	5,7	7,7	7,3	7,0	6,0	5,5	3,4	3,0	-	-	-	-	-
Groupe 2	Triton X-100 1 dose														
5		-	-	3,0	5,0	5,8	4,7	5,9	-	-	-	-	-	-	-
6		-	3,0	3,7	5,5	6,0	5,3	5,0	-	-	-	-	-	-	-
7		-	2,3	2,3	4,2	6,7	5,6	5,8	4,0	-	-	-	-	-	-
8		-	-	-	-	2,9	1,8	1,5	-	-	-	-	-	-	-
Groupe 3	NP-40 1 dose														
9		-	1,0	4,6	4,8	5,0	3,2	4,3	2,5	-	-	-	-	-	-
10		-	-	1,3	1,7	4,0	3,0	4,7	4,0	1,8	-	-	-	-	-
11		-	1,0	3,4	4,7	5,2	4,5	4,5	1,6	-	-	-	-	-	-
12		1,0	3,5	5,8	6,0	6,0	4,5	2,7	-	-	-	-	-	-	-
Groupe 4	Triton X-100 2 doses														
13		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15		1,5	-	2,3	2,9	3,7	4,6	5,6	4,8	3,0	2,9	-	-	-	-
16		1,9	1,2	1,6	2,6	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groupe 5	NP-40 2 doses														
17		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Le titre du virus est exprimé par le logarithme décimal du nombre d'unités formant des plaques/tampon nasal
1, l'absence de données indique l'absence de virus.

- 21 -

Telle qu'elle est utilisée ici, l'expression "prévention de la maladie d'IBR" signifie que le vaccin protège les bovins contre le développement de signes cliniques de la maladie lorsqu'elle est provoquée par un virus IBR virulent. Chez le bétail, le principal signe clinique de la maladie est une élévation de la température à 39,7°C et plus, pendant au moins deux jours. Le bétail vacciné après avoir été en contact avec le virus, bien que ne montrant pas de signes cliniques de la maladie, peut disséminer le virus IBR virulent qui est capable de transférer l'infection à d'autres animaux non-vaccinés. En conséquence, lorsqu'on se réfère à la "prévention de l'infection par IBR", cette expression signifie que le vaccin empêche également la dissémination du virus, en prévenant également la maladie. Ce résultat est nouveau et tout à fait surprenant.

REVENDEICATIONS

1. Vaccin parentéral sous la forme d'une dose injectable pour la prévention chez les bovins de la rhinotrachéite bovine infectieuse (IBR), caractérisé en ce qu'il
5 contient une quantité efficace pour la prévention de la maladie d'IBR, de protéine de l'enveloppe virale d'IBR, la protéine de l'enveloppe virale étant obtenue en propageant le virus IBR virulent dans un mélange cellules-milieu capable de promouvoir la multiplication du virus, en
10 séparant les cellules infectées du mélange, en mettant en contact les membranes cellulaires des cellules séparées avec une solution aqueuse d'un détergent nonionique afin d'obtenir une solution aqueuse de la protéine de l'enveloppe virale et en séparant la solution aqueuse du résidu non-
15 solubilisé.

2. Vaccins parentéraux selon la revendication 1, caractérisé en ce que la dose injectable contient un adjuvant pour promouvoir la réponse immunogénique des bovins à la protéine de l'enveloppe virale.

20 3. Vaccin parentéral sous une forme de dose injectable pour l'immunisation du bétail contre la rhinotrachéite bovine infectieuse (IBR) et pour la prévention du transfert du virus infectieux IBR, caractérisé en ce qu'il comprend une solution aqueuse de la protéine de l'enveloppe
25 virale d'IBR mélangée avec un adjuvant de type huile immiscible à l'eau, la dose de vaccin contenant une quantité efficace de l'enveloppe virale pour l'immunisation contre IBR et la prévention de la dispersion du virus IBR, fournie par une administration séquentielle de deux de ces doses par animal,
30 la protéine de l'enveloppe virale ayant été obtenue en propageant le virus IBR virulent dans un mélange cellules-milieu capable de promouvoir la multiplication du virus, séparant les cellules infectées du mélange, en mettant en contact les membranes cellulaires des cellules séparées
35 avec une solution aqueuse d'un détergent nonionique afin d'obtenir une solution aqueuse de la protéine de l'enveloppe

virale et en séparant la solution aqueuse du résidu non-solubilisé.

4. Vaccin parentéral selon la revendication 3, caractérisé en ce que la solution aqueuse de la sous-unité de protéine, séparée, est utilisée dans le vaccin sans concentration de la protéine.

5. Vaccin parentéral selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que chaque dose a un volume atteignant substantiellement 2 ml et chaque dose contient de 4 à 8 mg de la protéine totale.

6. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'il ne contient pas de virus IBR actif.