



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105073982 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201480017256. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 03

C12N 7/01(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/12(2006. 01)

10-2013-0029891 2013. 03. 20 KR

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/000897 2014. 02. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/148738 KO 2014. 09. 25

(71) 申请人 致优制药有限公司

地址 韩国忠清北道

(72) 发明人 金贤一 申城浩 韩范久

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理

有限公司 11291

代理人 黄志华 石磊

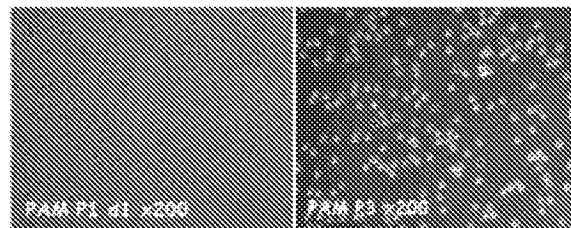
权利要求书1页 说明书21页 附图5页

(54) 发明名称

新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒

(57) 摘要

本发明涉及作为在韩国国内进行分离的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) 病毒的 JW-PRRSV(KCTC12096BP)、利用上述韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗组合物及猪繁殖与呼吸综合征的预防方法。本发明的登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒作为区别于北美及欧洲的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒,具有可针对韩国国内猪繁殖与呼吸综合征生产特殊的疫苗组合物来预防韩国国内猪繁殖与呼吸综合征或以特殊方式诊断出是否感染韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的效果。



1. 一种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒,其特征在於,登录号为 KCTC12096BP。
2. 一种疫苗组合物,其特征在於,包含登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒为有效成分。
3. 根据权利要求 2 所述的疫苗组合物,其特征在於,上述韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒为通过 3 次至 120 次的传代培养来获得的病毒。
4. 根据权利要求 2 所述的疫苗组合物,其特征在於,上述疫苗组合物还包含佐剂、赋形剂或载体。
5. 根据权利要求 2 所述的疫苗组合物,其特征在於,上述疫苗组合物还包含保护剂。
6. 根据权利要求 5 所述的疫苗组合物,其特征在於,上述保护剂为海藻糖。
7. 一种猪繁殖与呼吸综合征的预防方法,其特征在於,包括向猪投用权利要求 2 至 6 中任一项所述的疫苗组合物的步骤。
8. 根据权利要求 7 所述的猪繁殖与呼吸综合征的预防方法,其特征在於,上述疫苗组合物接种于肌肉或鼻腔。
9. 根据权利要求 7 所述的猪繁殖与呼吸综合征的预防方法,上述疫苗组合物包含  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$  PFU/ml 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒。
10. 一种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的诊断试剂盒,其特征在於,包含登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗原。
11. 一种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测方法,其特征在於,通过利用登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗原的抗原 - 抗体反应,从将被感染或已被感染的细胞内检测出登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒。
12. 根据权利要求 11 所述的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测方法,其特征在於,利用选自由组织免疫染色、放射免疫分析法、酶联免疫吸附实验、免疫印迹法、免疫沉淀分析法、免疫扩散分析法、补体结合分析法、荧光激活细胞分选术及蛋白质芯片分析法组成的组中的一种以上的方法来分析上述抗原 - 抗体反应。

## 新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus)、利用上述韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗组合物及猪繁殖与呼吸综合征的预防方法。

### 背景技术

[0002] 自 1987 年起,以美国的养猪地区为中心,开始传播原因不明的新型的猪疾病,该疾病复合性地表现为繁殖障碍和呼吸感染,并在 1988 年和 1989 年的夏天暴增。由于出现得突然,该疾病给美国养猪业带来重大损失,初期被称为猪神秘病,此后,随着分离原因病毒,并陆续进行相关的临床症状、病原性等研究,根据与繁殖障碍和呼吸感染一同呈现出的临床症状,当前在国际上被命名为猪繁殖与呼吸综合征 (P RRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)。

[0003] 在韩国国内虽然没有与该疾病类似的症状的流行报告,然而从 1992 年开始,对该疾病进行了研究并确立了诊断方法,而且对韩国国内养猪场进行流行病学研究,确认出韩国国内也流入该疾病,并在韩国国内被感染的农场对原因病毒进行了分离。在亚洲地区,除了韩国国内之外,还有日本和台湾也有报告指出确认发生原因病毒的分离。

[0004] 在出现疾病发生报告之后,由于不知其准确原因,使养猪业更陷入混乱,在 1991 年 6 月,荷兰中央兽医研究所的 Wensvoort 博士第一次利用猪肺泡巨噬细胞分离了原因病毒。该病毒取自荷兰中央兽医研究所所在的地名,被命名为莱利斯塔德 (Lelystad) 病毒,紧接着包括美国在内的许多国家也分离出了原因病毒,并调查其特点和病原性,结果发现以前在美国和欧洲发生过的复合性地引起繁殖障碍和呼吸感染的新型猪疾病都是由该病毒引起的。

[0005] 猪繁殖与呼吸综合征病毒在欧洲经常被称为莱利斯塔德病毒,在美国则被称为 SIRS 病毒,猪繁殖与呼吸综合征病毒为具有外膜且直径为 45 ~ 80nm 的小球形病毒,在其表面突出有小突起。基因所在的部位中有直径为 25 ~ 35nm 的单链核糖核酸 (RNA) 基因。因耐外部环境的能力不太强,在 5 以下或 7 以上的酸度环境下,病毒感染效价减少 90% 以上,若在 37℃ 下经过 10 ~ 24 小时、在 20℃ 下经过 6 天左右,则感染效价减少 10 倍以上。当感染该病毒时,引起疾病的程度有很多种,其中有的仅仅通过血清检测就可以判断感染程度且没有临床症状及经济损失的情况,也有给农场的生产带来 20% 左右的损失的严重程度的情况。

[0006] 从病名也可知,繁殖障碍和呼吸疾病复合性地出现。由猪繁殖与呼吸综合征病毒感染引起的繁殖障碍的特征在于,主要集中于妊娠 107 天至 113 天之间的妊娠末期流产、早分娩产胎儿、死产、木乃伊仔猪的发生、仔猪的断奶前死亡率激增、断奶后死亡率激增、发情周期的延迟等,这些症状主要集中于被感染的母猪和从其母猪出生的仔猪。众所周知,由猪繁殖与呼吸综合征病毒感染引起的繁殖障碍大部分从感染初期经过 6 个月左右恢复感染前的状态。由猪繁殖与呼吸综合征病毒感染引起的呼吸疾病可以出现在整个日龄,尤其集

中出现在哺乳仔猪和断奶仔猪。在这种情况下,可以观察到急促的腹式呼吸、眼睑浮肿、结膜炎、喷嚏、腹泻等,还可出现短期间的体温上升或罕见地出现神经症状。呼吸疾病的特征在于,与猪繁殖与呼吸综合征病毒单独感染的情况相比,细菌性、病毒性病原体的二次感染及复合感染的情况为多,且这种情况的病原性更加增幅。此外,还有在耳朵、腹部、外阴部等部位出现蓝色斑点的情况,因此在英国还被称为蓝耳病 (Blue ear disease)。

[0007] 以上的临床症状均为可在急性症状严重发展的情况下清楚地观察到的症状,准临床型感染或慢性的情况下几乎观察不到清楚且有特征的临床症状。慢性感染主要在断奶仔猪和育肥期中发生,在受到猪繁殖与呼吸综合征病毒攻击的呼吸系统中,被细菌及病毒感染后引起鼻炎和肺炎。结果,每天的平均体重增加量降低、饲料需求率进而增加,断奶后死亡率与感染猪繁殖与呼吸综合征病毒前的平均死亡率相比增加 2 倍。染上猪繁殖与呼吸综合征病毒呼吸疾病的肺在病理学上的所见表现为特征性的间质性肺炎。

[0008] 当前,猪繁殖与呼吸综合征病毒被分为在欧洲最初分离的莱利斯塔德病毒 (Wensvoort et al.,1991)、在北美州分离的 VR-2332[0004] 病毒 (Benfield et al.,1992), 欧洲株 (European strain) 和北美株 (North American strain) 的原形 (prototype), 它们之间的碱基序列同源性约为 55 ~ 70% 左右且相当低 (Gagnon and Dea,1998 ;Kwang et al.,1994 ;Murtaugh et al.,1995)。如今猪繁殖与呼吸综合征病毒与马动脉炎病毒 (EAV, equine arteritis virus)、乳酸脱氢酶升高病毒 (LDV, lactate dehydrogenase-elevating virus)、猴出血热病毒 (SHFV, simian hemorrhagic fever virus) 一同属于巢状病毒目 (order Nidovirales)、动脉炎病毒科 (family Arteriviridae) (Cavanagh,1997)。猪繁殖与呼吸综合征病毒为具有磷脂质的很小的包膜病毒 (enveloped virus), 正多面体形状的核衣壳内具有约 15kb 左右的阳性极性的单链核糖核酸基因组 (Collins et al.,1992)。复制酶 (replicase) 为非结构蛋白质,其包含病毒的自体复制所需的酵素,对上述复制酶进行编码的基因从基因组核糖核酸的 5' - 末端约占 80%, 并且由开放阅读框 ORF1a 和 ORF1b 组成,上述 ORF1a 和 ORF1b 具有从基因组核糖核酸发现的相互重叠的部位。有报告指出,其中的 ORF1b 由核糖体移码机能 (ribosomal frameshift) 表达 (Brierley et al.,1989)。病毒的结构蛋白质从基因组核糖核酸的 3' - 末端约占 20%, 从 ORF2a、ORF2b 的 ORF7 的 7 个基因中表达。ORF2、ORF3 及 ORF4 分别形成作为 GP2, GP3 及 GP4 糖化的膜蛋白质, ORF5 生成猪繁殖与呼吸综合征病毒的中和力起到最重要的作用的糖蛋白质 GP5 包膜蛋白, ORF6 生成基质 (M, matrix), ORF7 生成核壳体 (N, nucleocapside) (Meulenberg et al.,1995 ;Bastos et al.,2004)。这些都从被感染细胞内的单顺反子基因组 (monocistronic subgenomic) 核糖核酸的 5' - 末端中表达 (Meulenberg et al.,1993 ;Snyder et al.,1999)。对猪繁殖与呼吸综合征病毒的结构蛋白质及包含非结构蛋白质的大部分蛋白质的功能及分子生物学特性相关研究结果还处于渺茫的状态。若猪感染猪繁殖与呼吸综合征病毒,则表现出临床症状为严重的繁殖障碍和呼吸障碍。尽管证明不了猪繁殖与呼吸综合征病毒的北美株和欧洲株在疾病症状上的明确差异,然而它们不管从抗原性,还是从遗传性都具有显著的差异 (Allende et al.,1999 ;Halbur et al.,1995 ;Wootton et al.,1998)。并且,北美株和欧洲株内也表现出分离株之间的差异。例如,属于北美株的多个分离株之间的碱基序列的变异可源于核糖核酸聚合酶或核糖核酸重组的本质上的错误,有报告指出,这些遗传性变异可以对病毒的病原性表现

出重要差异 (Andreyev et al., 1997 ;Halbur et al., 1996 ;Ward et al., 1988)。

[0009] 然而在对韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒进行分离后,适用于韩国国内的变异株的疫苗及利用其疫苗的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒预防方法至今还没有实用化,需要对最适合于韩国国内的疫苗进行研究。

## 发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明人员在从韩国国内的猪分离出猪繁殖与呼吸综合征病毒后进行研究过程中,确认被分离的病毒为新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒,并完成了本发明。

[0012] 本发明的目的在于,提供新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒、利用其的疫苗组合物及猪繁殖与呼吸综合征的预防方法。

[0013] 解决问题的手段

[0014] 为了实现如上所述的目的,本发明提供登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒。

[0015] 并且,本发明提供包含登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒为有效成分的疫苗组合物。

[0016] 并且,本发明提供包括向猪投用上述韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗组合物的步骤的猪繁殖与呼吸综合征的预防方法。

[0017] 并且,本发明提供登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒或包含其抗原的猪繁殖与呼吸综合征病毒的诊断试剂盒。

[0018] 并且,本发明提供猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测方法,其特征在于,通过利用登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗原的抗原-抗体反应,从将被感染或已被感染的细胞内检测出登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒。

[0019] 发明的效果

[0020] 本发明的登录号为 KCTC12096BP 的猪繁殖与呼吸综合征病毒具有如下效果:上述猪繁殖与呼吸综合征病毒区别于北美型及欧洲型的猪繁殖与呼吸综合征病毒,生产针对韩国国内猪繁殖与呼吸综合征特殊的疫苗组合物来预防韩国国内猪繁殖与呼吸综合征或可以特异地诊断出是否感染猪繁殖与呼吸综合征病毒。

## 附图说明

[0021] 图 1 为示出从无菌猪分离出的猪肺泡巨噬细胞的图 ( $2 \times 10^8$  cells/ml)。

[0022] 图 2 为表示在向猪肺泡巨噬细胞接种猪繁殖与呼吸综合征病毒后,通过间接免疫荧光染色法判断是否感染病毒的结果的图。

[0023] 图 3 为利用韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒 (JW-PRRSV) 的 O RF5 的碱基序列分析结果的系统分析图。

[0024] 图 4 为在接种分离后的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒后,测定 (传代 5、传代 91) 抗体效价的结果的图。

[0025] 图 5 为在接种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒后,测定 (传代 3、传代 120) 血液

内抗体效价的结果的图。

[0026] 图 6 为在接种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒后,测定(传代 3、传代 120)个体的血液内白细胞和和淋巴细胞值的结果的图。

[0027] 图 7 为在接种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒后,分析(传代 3、传代 120)个体的临床症状的结果的图。

[0028] 图 8 为在接种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒后,利用聚合酶链式反应(PCR)来确认(传代 3、传代 120)病毒排出的结果的图(A组:接种鼠白血病病毒(MLV)常用疫苗的组,B组:接种传代 3 JW-PRRSV 的组,C组:接种传代 120 JW-PRRSV 的组,D组:阳性对照组,E组:阴性对照组)。

### 具体实施方式

[0029] 本发明提供猪繁殖与呼吸综合征病毒(登录号 KCTC12096BP)。

[0030] 上述韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒(JW-PRRSV)(登录号 KCTC12096BP)为从野外农场中分离的病毒,可以在从猴子的肾脏细胞 MARC-145 细胞或从猪直接分离培养的猪肺泡巨噬细胞(PAM, Porcine alveolar macrophage)中进行增殖,本病毒可以不受限制地在可增殖的细胞或培养基中进行增殖。

[0031] 并且,本发明提供包含韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒(登录号 KCTC12096BP)为有效成分的疫苗组合物。

[0032] 上述疫苗组合物可以包含对韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒进行 3 次至 120 次的传代培养来获得的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒,只要可以维持本病毒的活性传代培养的次数,就可以无限制地进行,然而优选地,可以包含通过 3 次、5 次、91 次及 120 次的传代培养来获得的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒作为有效成分。

[0033] 本发明的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒因抗体可在临床症状分析结果中诱导与作为常用疫苗的鼠白血病病毒疫苗相同程度的病毒防御能力,因而可以有效成为猪繁殖与呼吸综合征病毒的新型疫苗候补物质。并且,由于本发明的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒因在接种时,在个体内不诱导炎症反应,呈现出无注射部位的化脓坏死、发热等副作用的安全性,并与以往的猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗相比,病毒排出时间缩短,因而具有改善以往疫苗存在的问题的效果,可以有效利用为新型猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗用的组合物。

[0034] 上述“疫苗”为包含抗原物质的兽医学用疫苗,以对猪繁殖与呼吸综合征诱导特殊且主动或手动的免疫性为目的进行注射。

[0035] 上述组成疫苗组合物的过程中,除了可以包含作为有效成分的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒(登录号 KCTC12096BP)之外,还可以包含用于组成疫苗组合物的适当的一个以上的佐剂、赋形剂或载体。

[0036] 用于增进免疫反应的追加成分为通常被称为佐剂的组成物质,例如氢氧化铝、矿物油、其他油或向疫苗添加或由这些追加成分诱导后由身体发生的辅助分子,例如,虽然不受限制,但可以为干扰素、白细胞介素或成长因子。

[0037] 在本发明中所使用的佐剂包含增大所注射的动物的免疫反应的物质。多个不同的佐剂公知于本领域中。本说明书所使用的佐剂可以包含完全佐剂、不完全佐剂、维生素 E、非

离子型阻断聚合物、胞壁酰二肽、Quil A、矿物油、无矿物油及卡波普 (Carbopol)。作为优选的一例,本发明的疫苗可以包含油包水型乳剂佐剂。

[0038] 适合于疫苗的载体公知于本发明所属技术领域的普通技术人员,虽然包含蛋白质、糖等,但并不局限于此。上述载体可以为水溶液或非-水溶液、悬浮液及乳液。非-水溶液载体可以例举出丙二醇、聚乙二醇、食用油,例如,橄榄油及可以注射的有机酯,例如,油酸乙酯。水溶液载体包括含有盐水及缓冲培养基的水、酒精/水溶液、乳剂或悬浮液。非口服载体包含氯化钠溶液、葡萄糖输液、葡萄糖及氯化钠、乳酸处理输液或固定油。静脉注射载体包括例如以葡萄糖输液为基本的电解质补充剂、液体及营养补充剂等。还可以存在防腐剂及其他添加剂,例如,抗微生物制剂、抗氧化剂、螯合剂、非活性气体等。优选的防腐剂包括福尔马林、硫汞撒、新霉素、多粘菌素 B 及两性霉素 B。

[0039] 并且,本发明的疫苗可以包含一个以上的适当的乳化剂,例如,司盘 (Span) 或吐温 (Tween)。

[0040] 并且,本发明的疫苗组合物可以包含保护剂,可以无限制地使用公知于本技术领域的保护剂,优选地,可以为乳糖 (LPGG, Lactose) 或海藻糖 (TPGG, Threhalose),更优选地,可以利用海藻糖。

[0041] 并且,本发明提供利用韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的猪繁殖与呼吸综合征的预防方法,通过向猪投用韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗组合物来实现上述猪繁殖与呼吸综合征的预防方法。

[0042] 向猪投用疫苗组合物的方法可以为普通的疫苗注射方法,虽然并不局限于此,但可以进行通过肠内或非口服路径、口服、鼻腔内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内或其他适当的路径给药,优选地,可以通过肌肉或鼻腔进行接种。

[0043] 优选地,上述疫苗组合物包含  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$  PFU/ml 的猪繁殖与呼吸综合征病毒。

[0044] 并且,本发明提供猪繁殖与呼吸综合征病毒 (登录号 KCTC12096BP) 或包含其抗原的猪繁殖与呼吸综合征病毒的诊断试剂盒。

[0045] 上述诊断试剂盒可以利用在本发明所属技术领域通常使用的方法来制备。

[0046] 这些诊断试剂盒不仅包括猪繁殖与呼吸综合征病毒 (登录号 KCT C12096BP),还包括使用于免疫学分析的本技术领域通常所使用的工具、试剂等。这些工具/试剂包括适当的载体、可以生成可检测信号的标志物、溶解剂、清洗剂、缓冲剂、稳定剂等,但并不局限于此。当标志物为酵素时,可以包括可以测定酵素活性的基质及反应停止剂。适当的载体为,虽然并不局限于此,但其中可溶性载体可以为例如公知于本技术领域的生理学上允许的缓冲液,例如磷酸盐缓冲液 (PBS)、不溶性载体,例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚丙烯腈、氟塑料、交联葡聚糖、多糖、乳胶上镀金的磁性微粒等的高分子、其他纸、玻璃、金属、琼脂糖及它们的组合物。

[0047] 并且,本发明提供韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测方法,其特征在于,通过利用登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗原的抗原-抗体反应,从将被感染或已被感染的细胞内检测出登录号为 KCTC12096BP 的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒。

[0048] 抗原-抗体反应可以利用组织免疫染色、放射免疫分析法 (RIA)、酶联免疫吸附

实验 (ELISA)、免疫印迹法 (Western Blotting)、免疫沉淀分析法 (Immunoprecipitation Assay)、免疫扩散分析法 (Imm unodiffusion Assay)、补体结合分析法 (Complement Fixation Assay)、FACS、蛋白质芯片 (protein chip) 等进行分析,且并不局限于此。

[0049] 以下,通过实施例对本发明进行详细说明。然而,以下实施例仅用于例示本发明,本发明的内容并不受以下实施例限制。

[0050] 实施例 1. 分离猪繁殖与呼吸综合征病毒

[0051] 1.1 分离猪肺泡巨噬细胞

[0052] 用于使将要分离的病毒增殖的猪肺泡巨噬细胞分离而使用的猪为 4~8 周的无菌猪,使用了本公司的在无特定病原体 (SPF, Specific p athogen Free) 饲养环境下饲养的 (Optifarm-Medipig) 个体。在对猪实施麻醉后,以不留伤痕的方式小心地分离包括肺气管的整个肺组织。向肺气管的内侧连接插入管,并通过气管向肺组织的内侧注入预先准备的磷酸盐缓冲液 (pH7.2)。若确认肺组织的膨胀,则倾斜插入管来收集肺组织内的磷酸盐缓冲液,并对所收集的磷酸盐缓冲液进行离心分离,使细胞沉淀,将预先准备好的添加有 10% 的胎牛血清 (fetal bo vine serum)、非必需氨基酸 (nonessential amino acid) 及青霉素/链霉素的培养基中进行悬浮。将细胞悬浮液放入培养容器,并在 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 浓度中进行培养。进行第一次分离的猪肺泡巨噬细胞为共计 2×10<sup>8</sup> cells/ml,并在 -80℃ 条件下进行保管。在图 1 中示出所培养的猪肺泡巨噬细胞的形状。

[0053] 1.2 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离及确认猪繁殖与呼吸综合征病毒的猪肺泡巨噬细胞的感染

[0054] 本实验所使用的病毒使用了从 JW 农场饲养猪中呈现病态的感染猪分离出的猪繁殖与呼吸综合征病毒。粉碎疑似感染猪的血液、肺、淋巴、扁桃体的组织后,在磷酸盐缓冲液进行悬浮,利用聚合酶链式反应 (PCR, Polymerase Chain Reaction) 技术从被判断为病毒培养的样品中进行病毒分离实验。

[0055] 将上述实施例 1.1 中分离的猪肺泡巨噬细胞以 2×10<sup>6</sup> cells/ml 方式分注于 T-25 烧瓶,并在确认细胞附着后,通过聚合酶链式反应将判断为培养的试样血液、肺、淋巴、扁桃体等的样品分别以 10~100 μl 进行接种。此后,若出现细胞病理效应 (CPE, Cytopathic effect),则收获并在 -80℃ 条件下进行保管。将收获后的病毒分别以 100 μl 接种于猪肺泡巨噬细胞所存在的 T-25 烧瓶中,利用间接免疫荧光染色法 (IFA, immuno fluorescence assay) 确认病毒,并持续进行暗室传代培养。更具体地,使用 4% 的多聚甲醛固定液使被确认感染猪繁殖与呼吸综合征病毒的细胞固定 5 分钟之后,在 10 分钟内利用缓冲溶液清洗三次。此后,为了防止抗体的非特异结合,在 2% 的牛血清白蛋白 (BSA, bovi ne serum album) 溶液中处理 1 小时后,在 5 分钟内清洗三次。使用鼠抗 (mouse anti)-PRRSV Mab 4A5 (JBT Cat#9041) 作为一次抗体,并使用山羊抗小鼠 (goat anti-mouse) IgG FITC (Santacruz) 作为二次抗体。

[0056] 在图 2 中示出结果。

[0057] 如图 2 所示,可在被分离的猪肺泡巨噬细胞中接种病毒,并经过 96 小时后,在猪肺泡巨噬细胞内确认荧光。通过这种方式可以确认猪肺泡巨噬细胞有效地感染了猪繁殖与呼吸综合征病毒。

[0058] 1.3 通过血小板分离方法的病毒的克隆分离

[0059] 将猪肺泡巨噬细胞以  $3 \times 10^5$  cells/孔浓度接种于 6-孔板并经过 12 小时后,将分离后的猪繁殖与呼吸综合征病毒从 MOI = 1 开始稀释 10 倍,并分别接种于各个孔中。经过 1 小时的培养后,去除培养基,在形成病毒感染细胞层上覆盖 0.5% 的琼脂糖和含有 10% 的胎牛血清的 D MEM 培养基,并在 37°C、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下进行培养。经过约 72 小时之后,肉眼确认血小板的形成,并将各个血小板独立性地分离精制,并分离猪繁殖与呼吸综合征病毒的克隆。

[0060] 实施例 2. 通过分析猪繁殖与呼吸综合征病毒基因来分离 JW-PRR SV (KCTC12096BP)

[0061] 2.1 猪繁殖与呼吸综合征病毒基因的增幅

[0062] 从分离后的猪繁殖与呼吸综合征病毒的 ORF5 部分的基因信息起进行系统分析并分类病毒。从猪繁殖与呼吸综合征病毒培养液 1501 中利用病毒 (Viral) 核糖核酸提取试剂盒 (Extraction kit) (内含子 (Intron), 韩国国内), 并根据制造商的使用方法, 来提取猪繁殖与呼吸综合征病毒的基因组核糖核酸。为了合成与各个基因分节相应的病毒的互补脱氧核糖核酸 (cDNA) 而进行了反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)。在所提取的核糖核酸 10  $\mu$ l 中加入 10pmol ORF5 反向引物 2  $\mu$ l, 在 80°C 条件下加热 3 分钟后重新进行冷却, 并加入核糖核酸抑制剂 (普洛麦格公司 (Promega), 美国) 1  $\mu$ l、5X RT 缓冲液 (50mM Tris-HCl (Ph 8.3)、75mMKCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT)、10mM dNTP (普洛麦格公司, 美国) 2  $\mu$ l、M-MLV 逆转录酶 (普洛麦格公司, 美国) 1  $\mu$ l, 并在 37°C 条件下增幅 1 小时 30 分钟。以合成后的互补脱氧核糖核酸为株型进行聚合酶链式反应。聚合酶链式反应以在预混合管 (Intron) 中加入 16  $\mu$ l 的灭菌蒸馏水、2  $\mu$ l 的互补脱氧核糖核酸、1  $\mu$ l 的引物后, 在 94°C 温度中进行 5 分钟的改性, 在 94°C 温度中进行 20 秒钟的改性, 在 60°C 温度中进行 30 秒钟的解脱, 在 72°C 温度中进行 45 秒钟的伸长等进行一系列反应的循环来反复实施 34 次, 最后在 72°C 温度中进行 5 分钟的培养。实验所使用的引物参照为了分析 ORF5 基因的碱基序列而已经报告出的碱基序列的 VR2332 (美国株 (US strain), 基因银行登录号 (Genbank accession number). U87382), 并使用正向引物 (CCA TTC TGT TGG CAA TTT GA), 反向引物 (C AC CTT TAG GGC ATA TAT CAT)。

[0063] 2.2 分离后的猪繁殖与呼吸综合征病毒的系统分析

[0064] 在 1% 琼脂糖凝胶中对聚合酶链式反应产物进行电泳后, 利用凝胶萃取试剂盒 (gel extraction kit, 马歇雷 - 纳格尔公司 (Macherey-Nagel), 德国) 进行纯化分离, 将这些聚合酶链式反应产物连接与 pGEM-T 质体载体的 lac Z 基因的的多克隆部位相连接, 并将大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞 (E. coli DH5  $\alpha$  competent cell) 作为宿主细胞来对各个细胞进行克隆。更具体地, 在冰中融化保管于 -70°C 的大肠杆菌 DH5  $\alpha$  (E. coli DH5  $\alpha$ ) 后, 向已连接的具有质体脱氧核糖核酸 (DNA) 的试管中注入 50 ~ 70  $\mu$ l。在冰中放置 20 分钟后, 在 42°C 温度中施加 90 秒钟的热冲击, 并重新放置于冰块 3 分钟。在试管中加入 1ml 的 LB (Luria-Bertani) 培养基, 并在 37°C 培养仪中培养 1 小时后, 均匀分注于包含氨苄西林 (300mg/ml)、5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-gal)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 等的 LB 琼脂培养基中, 之后在 37°C 温度中培养一夜。在进行培养后, 选择白色菌群来用于分析碱基序列的质体脱氧核糖核酸的提取。分别在包含氨苄西林的 5ml 的 LB 琼脂平板加入一个所选择的白色菌群, 并在 37°C 培养仪中培养一夜后, 在 3000rpm 条件下进行 10 分钟

的离心分离。在进行离心分离后,使用质粒小量质粒提取试剂盒 (QIAprep Spin Miniprep kit, 凯杰公司 (Qiagen), 美国) 提取质体脱氧核糖核酸。利用 Workbench Version 4 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) 软件对精制后的质体脱氧核糖核酸的基因信息进行分析, 来制成系统分析图, 并对病毒原种的核苷酸序列和传代培养的序列进行比较来分析遗传变异。

[0065] 在图 3 中示出结果。

[0066] 如图 3 所示, 确认出分离后的猪繁殖与呼吸综合征病毒为与北美型相比, 有 18% 的核苷酸不同的新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒。新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒被命名为 JW-PRRSV, 并于 2011 年 12 月 2 日寄托为 KCTC12096BP。

[0067] 实施例 3. 利用韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒 (JW-PRRSV) 确认开发疫苗的免疫原性 (传代 5、传代 91)

[0068] 3.1 接种 JW-PRRSV 后的临床测定

[0069] 为了将重新分离的 JW-PRRSV 开发为疫苗, 向猪接种传代 5 及传代 91 的 JW-PRRSV 后, 观察了其效果。更具体地, 以猪繁殖与呼吸综合征病毒呈阴性且无特定病原体 (SPF, Specific-Pathogen-Free) 的 12 只未给予初乳 (Colostrum-Derived) 的猪为对象, 构成包括传代 5 的 JW-PRRSV、传代 91 的 JW-PRRSV、鼠白血病病毒 (MLV) 疫苗 (常用生疫苗) 及阴性对照组的共计 4 个组来确认免疫原性 (表 1)。

[0070] 表 1

[0071]

CD-Pig 个体序号	内容
B09-011	接种 2ml 的传代 5 JW-PRRSV 的组
B09-012	
B09-013	
H10-002	接种 2ml 的传代 91 JW-PRRSV 的组
H10-004	
B09-014	
B09-008	接种鼠白血病病毒疫苗的组
B09-009	
B09-010	
H10-005	阴性对比
H10-006	
H10-007	

[0072] 分别以  $1 \times 10^5$  PFU/ml 向各组接种 2ml 的病毒, 并在接种后的第 1 天、第 3 天、第 6 天、第 10 天、第 15 天、第 21 天、第 28 天、第 35 天观察了体温 / 运动性 / 饲料摄取量等临床症状。在接种后的第 37 天以  $1 \times 10^4$  PFU/ml 的规格攻击接种原种毒 JW 野外病毒, 对与上述项目相同的项目实施监测。更具体地, 在实验期间内, 每天在相同时间内测定两次体温及运动性, 而运动性以通过个体观察来以 0.5 分的间隔差异赋予从 0 分 ~ 4 分的分数的方式进行监测 (0 分: 无运动性, 1 分: 运动性弱, 2 分: 运动性一般, 3 分: 运动性良好, 4 分: 运动性非常良好)。并且, 根据体重来限制给予饲料摄取量, 而当在 10 分钟内摄取所有饲料时, 判断为非常良好 (4 分), 根据摄取所有饲料的时间, 以 0.5 分的间隔差异赋予 0 分 ~ 4 分的分

数。通过如上所述的方式的分数合算,来评价综合性的运动性和饲料摄取量。

[0073] 在表 2 中示出结果。

[0074] 表 2

[0075]

实验组	运动性	饲料摄取量
接种传代 5JW-PRRSV 的组	直到实验结束,饲料摄取及运动性以良好的状态得到管理	
接种传代 91JW-PRRSV 的组	直到实验结束,饲料摄取及运动性以良好的状态得到管理	
接种鼠白血病病毒的组	直到实验结束,饲料摄取及运动性以良好的状态得到管理	
对照组	<p>攻击接种当天:经过接种后经过 10~15 分钟,H10-005 个体的呕吐及饲料摄取量减少; H10-006 个体的运动性减少(接种后,当给饲料时,无摄取意志,然而摄取了给予饲料的全量)</p> <p>攻击接种,第一天:饲料摄取及运动性良好,在接种后,当经过 15 小时时,体温与接种当天相比上升 1.6 度,经过接种后经过 24 小时时,体温上升 0.96 度。</p> <p>攻击接种第二天:饲料摄取及运动性良好</p>	

[0076] 如表 2 所示,分析对应分数的结果如下:直到实验结束为止,接种传代 5JW-PRRSV、传代 91JW-PRRSV 及鼠白血病病毒的组在饲料摄取及运动性方面均良好。由此确认出传代 5JW-PRRSV、传代 91JW-PR RSV 均诱导与市面上销售的鼠白血病病毒疫苗相同程度的病毒防御能力。

[0077] 3.2 在接种韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒接种后测定抗体效价

[0078] 为了评价韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗效果,以与上述实施例 3.1 相同条件接种病毒后,实施抗体效价测定。在接种后的第 37 天,以  $1 \times 10^4$  PFU/ml 攻击接种原种毒 JW 野外病毒,并对与实施例 3.1 相同的项目进行监测。在攻击接种后的第 14 天后,对所有个体进行尸检,并对肺、淋巴、扁桃体、脾、肝、脑及肾脏进行定量聚合酶链式反应。为了诱导疫苗病毒对野外病毒的防御能力,在第一次血清检查中,抗体应判定为阳性,并且应具有病毒中和能力。利用酶联免疫吸附实验 (HerdChek :PRRS 2XR ELISA kit (IDEXX laboratories, Westbrook, ME, USA)) 方法来测定接种动物中的抗体是否转换为阳性。是否具有猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体以 S/P 比率表示,当 S/P 比率为 0.4 以上时,判定为阳性。

[0079] 在表 3 及图 4 中示出结果。

[0080] 表 3

[0081]

个体区分	猪繁殖与呼吸综合征 S/P 比率 (ratio)										
	0DPI	1DPI	3DPI	6DPI	10DPI	15DPI	21DPI	28DPI	35DPI	攻击 7	攻击 14
	9/16	3/17	3/19	3/22	3/26	3/31	4/6	4/13	4/20	4/29	5/6
B09-011	-0.02	-0.01	-0.02	0.43	2.39	2.46	2.87	2.27	2.37	1.63	1.05
B09-012	-0.07	-0.09	-0.05	0.25	0.88	0.20	0.33	0.35	0.51	0.55	0.06
B09-013	-0.07	-0.09	-0.05	0.14	1.59	1.32	1.23	0.79	0.67	0.68	0.13
传代 5 JW-PRRSV 平均	-0.09	-0.06	-0.04	0.27	1.62	1.33	1.48	1.14	1.18	0.96	0.41
H10-002	0.01	-0.03	0.00	0.00	0.05	0.27	2.34	2.82	2.29	2.17	1.86
H10-004	0.00	-0.02	-0.02	-0.07	0.09	0.66	0.99	1.72	2.16	2.27	0.62
B09-014	-0.01	-0.02	-0.01	-0.06	0.67	0.44	0.51	0.66	0.70	0.65	1.78
传代 91 JW-PRRSV 平均	0.00	-0.02	-0.01	-0.04	0.27	0.46	1.28	1.73	1.72	1.70	1.42
B09-008	0.02	-0.02	-0.04	-0.07	0.75	1.52	1.72	1.50	1.56	2.14	1.76
B09-009	-0.06	-0.09	-0.07	-0.09	1.02	1.34	1.52	1.39	1.35	2.04	1.59
B09-010	-0.04	-0.04	-0.06	-0.05	1.10	1.13	1.55	1.28	1.00	0.97	0.78
鼠白血病毒平均	-0.03	-0.05	-0.06	-0.00	0.96	1.23	1.60	1.39	1.30	1.72	1.38
H10-005	-0.02	-0.04	-0.02	-0.04	-0.08	-0.07	-0.08	-0.06	-0.03	0.43	1.43
H10-006	-0.03	-0.03	-0.04	-0.05	-0.06	-0.09	-0.03	-0.04	0.00	1.03	1.47
H10-007	-0.11	-0.09	-0.08	-0.07	-0.10	-0.07	-0.06	-0.05	-0.02	0.86	1.27
N/C 平均	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.00	-0.08	-0.06	-0.05	-0.02	0.77	1.39

[0082] 如表 3 及图 4 所示,从接种后的第 10 天开始,在除了对照组之外的接种传代 5JW-PRRSV、传代 91JW-PRRSV 及鼠白血病毒病的组的实验组中表现出抗体效价的上升,在接种后的第 35 天可以确认所有实验组中的抗体效价转换为阳性。

[0083] 3.3 基于韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的病毒效价的测定

[0084] 为了评价韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗效果,与上述实施例 3.1 相同的条件接种病毒后,测定血液及尸检后组织内的猪繁殖与呼吸综合征病毒。在接种后的第 37 天,以  $1 \times 10^4$  PFU/ml 攻击接种原种毒 JW 野外病毒,并对与实施例 3.1 相同的项目进行监测。

[0085] 在表 4 中示出结果。

[0086] 表 4

[0087]

接种病毒	个体	NA ORF7 Log TCID 50/ml									
		0DPI	1DPI	3DPI	6DPI	10DPI	15DPI	21DPI	28DPI	35DPI	攻击 7DPI
P5	B09-011	ND	2.627	2.812	3.265	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B09-012	ND	2.762	3.331	3.417	1.394	ND	ND	ND	ND	ND
	B09-013	ND	2.414	3.166	2.338	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P91	B09-014	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	H10-002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	H10-004	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MLV	B09-008	ND	ND	ND	0.612	0.412	ND	ND	ND	ND	ND
	B09-009	ND	ND	ND	0.677	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B09-010	ND	ND	ND	0.606	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N/C	H10-005	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.794
	H10-006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.213
	H10-007	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.22

[0088] 如表 4 所示,在接种传代 5JW-PRRSV 的组中,直到第 10 天为止,血液内存在检测出病毒的个体,在接种传代 91JW-PRRSV 的组中,在接种后和攻击接种后的血液内均未检测出病毒。常用生疫苗鼠白血病病毒中,在接种后的第 6 天检测出若干的病毒,攻击接种后未检测出病毒。在阴性对照组中,在攻击接种后的第 7 天,从血液内检测出相当量的病毒。

[0089] 实施例 4. 利用韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的开发疫苗的安全性及免疫原性的确认(传代 3、传代 120)

[0090] 以猪繁殖与呼吸综合征病毒为阴性且无特定病原体的 20 只未给予初乳的猪为对象,包括鼠白血病病毒疫苗(常用生疫苗:G-A)、传代 3JW-PRRSV(G-B)、传代 120JW-PRRSV(G-C)、阴性对照组 1(相对于攻击接种的阴性对照组:G-D)、阴性对照组 2(相对于整个实验的阴性对照组:G-E),来构成共计 5 个组。分别以  $1 \times 10^5$  PFU/ml 向各组接种 2ml 的病毒,在接种后的第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天、第 35 天观察体温/运动性/饲料摄取量等临床症状,并分别进行采血来测定血液内的病毒效价和抗体效价、血球分析、临床症状分析。而且,在第 42 天以  $1 \times 10^4$  PFU/ml 攻击接种原种毒 JW 野外病毒,并对与上述项目相同的项目进行监测。为了使疫苗病毒生成对野外病毒的防御能力,在第一次血清检查中,抗体应判定为阳性,并且具有病毒中和能力。利用酶联免疫吸附实验方法来测定接种动物中的抗体是否转换为阳性,并利用病毒中和试验(VN, Virus neutralization)来测定是否诱导中和抗体。

[0091] 4.1 利用反转录聚合酶链式反应测定血液内的病毒效价

[0092] 为了测定猪繁殖与呼吸综合征病毒的量,参考已知的碱基序列 V R2332(US strain,基因银行登录号,U87382)制备引物(ORF7)(正向引物 ATG ATG RGC TGG CAT TCT、反向引物 ACA CGG TCG CCC TAA TTG)。在  $150 \mu\text{l}$  的猪繁殖与呼吸综合征病毒培养液中利用病毒的核糖核酸提取试剂盒(Extraction kit,内含子,韩国国内),根据试剂盒生产公司的使用方法,来提取猪繁殖与呼吸综合征病毒的基因组核糖核酸,并执行了用于合成与各个基因分节相对应的病毒的互补脱氧核糖核酸的反转录聚合酶链式反应。在所提取的  $10 \mu\text{l}$  的核糖核酸中加入  $2 \mu\text{l}$  的  $10 \text{pmol}$  ORF5 反向引物,在  $0^\circ\text{C}$  条件下加热 3 分钟后进行冷却,并加入核糖核酸抑制剂(普洛麦格公司,美国)  $1 \mu\text{l}$ 、5X RT 缓冲液( $50 \text{mM}$  Tris-HCl(pH8.3)、 $75 \text{mM}$  KCl、 $3 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $10 \text{mM}$  DTT)、 $10 \text{mM}$  dNTP(普洛麦格公司,美国)  $2 \mu\text{l}$  及 M-鼠白血病病

毒逆转录酶（普洛麦格公司,美国）1 μ l,并在 37℃ 条件下增幅 1 小时 30 分钟。聚合酶链式反应以在 2 μ l 的合成互补脱氧核糖核酸、10ul 的 Sybr 荧光染料 (Sybr green dye,韩国国内伯乐生物公司 (Bio-R ad Korea))、6 μ l 的灭菌蒸馏水及各 1 μ l 的引物,在 95℃ 温度中进行 3 分钟的包括变性步骤 95℃ (20 秒钟)、解开步骤 60℃ (20 秒钟)、伸长步骤 72℃ (30 秒钟) 的一系列反应作为一个循环,反复进行 40 次,并反复进行 71 次在 55℃ 温度中进行 1 分钟的反应,在 60℃ 温度中进行 10 秒钟的反应后结束。反转录聚合酶链式反应以已知连续稀释的量的脱氧核糖核酸为标准来进行聚合酶链式反应,因而在基本以指数性方式引起增幅的区域中,将成为规定增幅产物量的循环数 (Ct 值, threshold cycle) 作为横轴,将初始脱氧核糖核酸量作为纵轴,来制作检量线,未知浓度试样也在相同条件下进行反应来求得 Ct 值,从而测定目的脱氧核糖核酸量。

[0093] 在表 5 示出结果。

[0094] 表 5

[0095]

区分		免疫						攻击						
		OPI-0	OPI-7	OPI-14	OPI-21	OPI-28	OPI-35	OPI-0	OPI-7	OPI-14	OPI-21	OPI-28	OPI-35	OPI-42
		NA ORF7 JW(PRRS-NA TYPE)						NA ORF7 JW(PRRS-NA TYPE)						
MLV 接种 (G-A)	A-1	N.D	1.813	-1.74	-0.173	-0.273	-0.161	-1.681	0.27	-0.633	-1.285	N.D	N.D	N.D
	A-2	N.D	1.892	0.337	0.536	-0.241	0.112	N.D	-0.281	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	A-3	N.D	1.232	-1.316	0.096	0.416	-0.171	0.441	1.804	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	A-4	N.D	1.915	0.982	1.303	1.529	1.365	0.651	0.722	N.D	-0.312	-0.128	N.D	N.D
P-3 接种 (G-B)	B-1	N.D	3.795	2.450	0.096	0.016	-2.173	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B-2	N.D	3.747	3.412	2.171	0.762	-0.665	N.D	N.D	N.D	-0.701	-0.774	-0.774	N.D
	B-3	N.D	3.228	0.824	0.826	0.151	-0.659	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B-4	N.D	2.609	3.155	1.932	2.754	0.121	N.D	N.D	N.D	-0.283	N.D	N.D	N.D
P-120 (G-C)	C-1	N.D	-0.318	0.975	0.110	N.D	-0.168	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	C-2	N.D	-0.779	-2.033	-0.903	-1.174	-0.039	N.D	-0.11	N.D	0.077	-1.456	N.D	N.D
	C-3	N.D	N.D	1.156	0.887	-1.459	-0.787	N.D	2.001	0.111	N.D	-0.774	N.D	N.D
	C-4	N.D	0.025	N.D	0.550	-1.054	-0.443	N.D	0.183	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
P/C (G-D)	D-1	N.D	-0.662	N.D	-0.273	N.D	-2.393	N.D	2.567	N.D	N.D	-1.687	N.D	N.D
	D-2	N.D	-1.356	N.D	N.D	-1.004	-0.82	N.D	2.032	2/22 特死				
	D-3	N.D	-1.672	N.D	N.D	-1.045	-2.064	N.D	0.263	0.349	0.104	N.D	N.D	N.D
	D-4	N.D	-1.173	-0.288	N.D	N.D	-0.881	N.D	0.048	0.619	0.345	N.D	N.D	N.D
N/C (G-E)	E-1	N.D	-0.468	N.D	-0.311	N.D	-0.438	N.D	N.D	N.D	-1.240	N.D	N.D	N.D
	E-2	N.D	-0.192	N.D	-0.270	-0.337	-0.341	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	E-3	N.D	-0.376	N.D	N.D	-1.215	-0.07	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	E-4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

[0096] 如表 5 所示,在接种鼠白血病毒疫苗 (G-A) 的组中,接种后的第 7 天,在所有个体检测出病毒,有些个体还持续至第 35 天。在接种传代 5JW-PRRSV 的组 (G-B) 中,接种后的第 7 天,在所有个体检测出高效价的病毒,之后确认出持续检测到第 28 天,还存在在第 35 天检测出的个体。在接种传代 120JW-PRRSV (G-C) 的组中,接种后第 14 天从 2 个体检测数病毒,保持至接种后的第 21 天后,从第 28 天开始未检测到病毒。通过这种结果可知,与作为常用疫苗的鼠白血病毒疫苗 (G-A) 相比,表现出低 6 倍左右的病毒效价,且在血液内的残留日也短。并且,在接种鼠白血病毒疫苗 (G-A) 的组,从所有接种个体中检测出病毒,然而在接种传代 120JW-PRRSV (G-C) 的组中只有从 2 只个体确认了病毒。在攻击接种第 42 天,在接种鼠白血病毒疫苗 (G-A) 的组中,接种后的第 7 天,从 3 只个体检测出血液内病毒,在接种传代 5JW-PRRSV 的组 (G-B) 中,在 4 个体均未检测出病毒。这被视为对相同

攻击接种的同源攻击作用 (homologous challenge protection) (Report: Colloquium on Prospects for Development of an Effective PRRS Virus Vaccine, August 13, 2007-D. L. Rock, PhD, University of Illinois)。在接种传代 120JW-PRRSV 的组 (G-C) 中, 在攻击接种后的第 7 天, 从 2 个体中检测到病毒。在阴性对照组 (G-D) 中, 在攻击接种的第 7 天, 从 2 个体的血液内检测到相当量的病毒, 其中一个体在接种后的第 14 天出现肺死。对该个体进行尸检, 并对肺、淋巴、扁桃体、肾脏、气管及肝进行病毒效价测定。

[0097] 在表 6 中示出结果。

[0098] 表 6

[0099] 对 G-D 个体 -2 的组织内病毒效价测定

[0100]

尸检血液	阴性 (Log TCID <sub>50</sub> /ml)
肺	2.767
肝	-0.171
肾脏	-0.366
气管	0.681
淋巴球	0.107
扁桃体	2.685

[0101] 如表 6 所示, 可以确认在肺死的阴性对照组的肺和扁桃体中检测出相当量的病毒。

[0102] 4.2 血液内抗体效价的测定结果

[0103] 利用酶联免疫吸附实验对在各接种组采取的血液试样进行测定, 测定了对猪繁殖与呼吸综合征病毒的血液内抗体效价。利用 S/P 比率表示是否形成猪繁殖与呼吸综合征病毒的抗体, 当 S/P 比率为 0.4 以上时, 判定为阳性。

[0104] 在表 7 及图 5 中示出结果。

[0105] 表 7

[0106]

区分		免疫						攻击						
		DPI-0	DPI-7	DPI-14	DPI-21	DPI-28	DPI-35	cha-0	cha-7	cha-14	cha-21	cha-28	cha-35	cha-42
MLV 接种 (G-A)	A-1	-0.18	-0.11	0.75	1.50	1.72	1.63	2.23	2.15	2.73	2.22	2.67	2.21	1.96
	A-2	-0.14	-0.17	0.81	1.50	1.91	1.70	2.65	2.55	2.84	2.63	2.82	2.39	2.01
	A-3	-0.17	-0.19	0.03	0.37	1.18	1.55	2.12	1.82	1.80	1.41	1.82	1.55	1.29
	A-4	-0.13	-0.12	0.24	0.38	1.14	1.03	1.38	1.28	1.34	1.31	1.35	1.44	1.15
	平均	-0.16	-0.15	0.46	0.64	1.19	1.18	2.10	1.95	2.18	1.88	2.24	1.00	1.62
P-3 接种 (G-B)	B-1	-0.17	0.01	0.75	1.39	1.69	1.68	2.47	2.30	2.61	2.45	2.86	2.31	2.38
	B-2	-0.11	0.60	1.30	1.85	2.16	1.93	2.56	2.37	2.53	2.15	2.67	2.09	2.24
	B-3	-0.18	-0.04	0.45	0.78	0.85	1.03	2.13	2.12	2.05	2.15	2.55	1.06	2
	B-4	-0.13	-0.03	0.53	1.78	1.77	1.44	1.89	2.05	2.46	2.04	2.46	2.03	2.06
	平均	-0.17	0.19	0.78	1.48	1.62	1.48	2.26	2.15	2.52	2.20	2.44	2.10	2.17
P-120 (G-C)	C-1	-0.22	-0.39	-0.31	-0.28	1.13	1.17	2.18	2.23	2.76	2.32	2.77	2.21	2.23
	C-2	-0.16	19	0.12	0.52	1.06	1.00	2.02	1.87	2.04	1.94	2.37	2.12	2.06
	C-3	-0.14	-0.17	-0.03	0.48	1.01	0.87	1.66	1.66	2.18	2.11	2.51	2.39	2.11
	C-4	-0.20	-0.14	-0.04	0.07	1.19	1.12	1.63	1.68	2.15	1.91	2.4	2.19	2.2
	平均	-0.18	-0.21	-0.07	-0.18	1.10	1.04	1.92	1.84	2.28	2.07	2.31	2.10	2.15
P/C (G-D)	D-1	-0.13	-0.17	-0.10	-0.17	-0.23	-0.11	-0.17	0.97	2.48	2.40	2.64	2.1	2.02
	D-2	-0.06	-0.02	-0.09	-0.07	-0.09	-0.11	-0.09	0.48	2.22 种死				
	D-3	-0.10	-0.07	-0.04	-0.15	-0.18	-0.13	-0.20	0.24	0.40	0.06	0.5	0.9	0.95
	D-4	-0.27	-0.23	-0.22	-0.18	-0.18	-0.14	-0.10	0.07	0.12	0.19	0.12	0.34	0.74
	平均	-0.14	-0.12	0.12	-0.14	0.17	-0.12	-0.14	0.44	1.00	0.88	1.09	1.11	1.24
N/C (G-E)	E-1	-0.06	-0.11	-0.13	-0.10	-0.02	-0.09	-0.15	-0.07	-0.09	-0.04	-0.08	-0.06	-0.1
	E-2	-0.04	-0.05	-0.02	-0.05	0.16	0.35	-0.02	-0.02	0.01	-0.04	-0.06	-0.05	0
	E-3	-0.02	-0.05	0.01	-0.07	-0.07	-0.03	-0.10	-0.08	-0.01	-0.06	-0.08	-0.07	-0.03
	E-4	-0.03	-0.06	0.01	-0.04	-0.05	-0.10	-0.10	-0.08	0.00	-0.05	-0.04	-0.06	-0.02
	平均	-0.04	-0.07	-0.06	-0.07	-0.01	0.02	-0.09	-0.06	-0.02	-0.05	-0.07	-0.06	-0.04

[0107] 如表 7 及图 5 所示,在接种鼠白血病毒疫苗 (G-A) 的组中,在接种后的第 14 天开始,2 只个体的抗体转换为阳性,第 28 天,4 只个体均转换为阳性。在接种传代 5JW-PRRSV 的组 (G-B) 中,在接种后的第 7 天,1 只个体转换为阳性,第 14 天,4 只个体均转换为阳性。在接种传代 120JW-PRRSV (G-C) 组中,在接种后的第 21 天,2 只个体开始进行阳性转换,直到第 28 天,有 4 只个体均转换为阳性。通过这些可以确认,接种传代 120JW-PRRSV (G-C) 的组为既安全又可以充分诱导抗体效价的候补物质。

[0108] 4.3 血球分析结果

[0109] 使用自动血球计测仪,在从各个接种组中采集的血液试样中测定血液内存在的各种血液细胞的数量。

[0110] 在图 6 中示出结果。

[0111] 如图 6 所示,在接种传代 3JW-PRRSV 的组 (G-B) 中,白细胞略微增加,然而其他实验组中,直到实验结束为止,白细胞数值变化不大 (图 6 的 a 部分)。并且,血液内淋巴细胞的测定结果,疫苗候补组在接种后表现出 4.3 至 13600cells/ $\mu$ l 的正常淋巴球数值 (图 6 的 b 部分)。这是本发明的疫苗候补物质为在个体内不引发炎症的安全物质的结果。

[0112] 4.4 临床分析结果

[0113] 在进行疫苗攻击接种后,观察了在猪中表现出的临床症状。在实验期间内,每天在相同时间内测定两次体温及运动性,而运动性则通过个体观察来以 0.5 分的单位赋予 0 分至 4 分的分数 (0 分:无运动性,1 分:运动性弱,2 分:运动性一般,3 分:运动性良好,4 分:运动性非常良好)。根据体重来限制给予饲料摄取量,而当在 10 分钟内摄取所有饲料时,判断为非常良好 (4 分),根据摄取所有饲料的时间,以 0.5 分的间隔差异赋予 0 分~4 分的分

数。

[0114] 在表 8 及图 7 中示出结果。

[0115] 表 8

[0116]

区分	2/08 (周二)~2/15 (周二)	2/16 (周三)~2/22 (周二)	2/23 (周三)~3/1 (周二)	3/2 (周三)
G-A (MLV)	—P3 攻击鼻腔、肌肉各 2 mL 接种后未发生饲料摄取及运动性减少症状	—饲料摄取及运动性良好	—饲料摄取及运动性良好 —左侧耳朵分离为蓝色 A-1 号饲料摄取从慢变良好, 从 16 日龄开始好转	—饲料摄取及运动性良好 —A-1 号与同组隔离单独管理中, 饲料摄取及运动性良好
G-B (P-3)	—攻击后, 与进行免疫时相比, 饲料摄取及运动性无差异 —因关节异常运动性弱, 饲料摄取一般	—饲料摄取及运动性良好 —B-4 号攻击从 12 日龄开始渐渐恢复饲料摄取及运动性	—饲料摄取及运动性良好 —B-4 号从 16 日开始饲料摄取及运动性恢复正常	—饲料摄取及运动性良好
G-C (P-120)	—1 日龄: 与同组仔猪相比, 3 次饲料摄取及运动性有些减少 —2 日龄: 饲料摄取及运动性恢复正常	—饲料摄取及运动性良好 —C-3 号攻击从 12 日龄开始, 运动性及饲料摄取减少直到 14 日龄恢复, 然而现在与同组相比, 饲料摄取速度较慢	—饲料摄取及运动性良好 —C-3 号活动性及饲料摄取良好, 而与同实验组相比, 摄取速度慢	—饲料摄取及运动性良好
G-D (P/C)	—6 日龄: 与同组仔猪相比, 2 次饲料摄取及运动性有些减少 —7 日龄: 饲料摄取及运动性恢复正常	—10 日龄: 2 号全身发生红色斑点 (与表皮炎相似) —13 日龄: D-2 号下午进行管理时, 突然状态变差 —14 日龄: D-2 号肺死 (尸检结果、检测结果参照资料)	—饲料摄取及运动性良好	—饲料摄取及运动性良好
G-E (N/C)	—饲料摄取及运动性良好	—饲料摄取及运动性良好	—饲料摄取及运动性良好	—饲料摄取及运动性良好

[0117] 如表 8 及图 7 所示, 观察到接种传代 3JW-PRRSV 的组 (G-B) 的运动性和饲料摄取量整体上微弱, 但确认到整体上无特异事项且饲料摄取及运动性良好。

[0118] 实施例 5. 韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗的制备

[0119] 5.1 传代方法及保管

[0120] 在动静实验和免疫原性实验中确认到的  $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 以上的猪繁殖与呼吸综合征原种毒病毒 (120 传代株) 接种于 MARC-145 细胞, 在 37℃ 条件下培养 4~5 天后, 进行采毒, 并进行冻结干燥或在 -80℃ 条件下进行冻结保管。采集与原种毒相同的方法增殖的组织培养驯化猪繁殖与呼吸综合征病毒作为种毒后, 进行冻结干燥或在 -80℃ 条件下冻结保管, 且在原种毒中不传代 3 代以上, 使病毒效价成为  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 以上。

[0121] 5.2 批量生产及病毒含量试验

[0122] 在细胞增殖用培养基中, 对 MARC-145 或猪肺泡巨噬细胞进行 850cm<sup>2</sup>滚瓶培养之后, 以 3~5 天间隔进行传代培养。当形成 850cm<sup>2</sup>滚瓶培养细胞的单层时, 去除细胞增殖用培养基, 并以充分盖住细胞的量对制备用病毒进行接种后, 在 37℃ 条件下吸附 1 小时。去除

接种液,添加细胞增殖用培养基,并在 37℃ 条件下旋转培养 4~5 天。对进行离心分离的病毒培养液进行 10 倍连续稀释,并接种于培养有 MARC-145 或猪肺泡巨噬细胞的 96 孔板,在 37℃ 条件下,培养 7 天,并观察细胞病变 (CPE)。培养病毒后,当细胞病变表现为 80~90% 以上时,以无菌方式进行收获,并在 -80℃ 条件下进行冻结保管。

[0123] 5.3 试验疫苗的制备

[0124] 将分离后的病毒作为抗原,添加保护剂来制备试验疫苗。加入灭菌磷酸缓冲液,利用冻干干燥仪来制备 3 种试验用疫苗 (制备号:60P RRS 01、60PRRS 02、60PRRS 03)。所制备的试验用疫苗的含量如表 9、表 10 及表 11 所示。

[0125] 表 9

[0126] 60PRRS 01

[0127]

原料药品	含量	批量
猪繁殖与呼吸综合征	$10^{6.5}$ TCID <sub>50</sub> /ml	600ml
海藻糖		150ml
合计		750ml

[0128] 表 10

[0129] 60PRRS 02

[0130]

原料药品	含量	批量
猪繁殖与呼吸综合征	$10^{6.6}$ TCID <sub>50</sub> /ml	620ml
海藻糖		156ml
合计		776ml

[0131] 表 11

[0132] 60PRRS 03

[0133]

原料药品	含量	批量
猪繁殖与呼吸综合征	$10^{6.4}$ TCID <sub>50</sub> /ml	640ml
海藻糖		160ml
合计		800ml

[0134] 与以往用作保护剂的乳糖相比,使用海藻糖作为保护剂,从而将以往因保护剂而可在制备疫苗时发生的污染最小化,且提高稳定性。表 12 示出各保护剂的病毒含量比较表。

[0135] 表 12

[0136] 根据不同的乳糖及海藻糖保护剂的病毒含量比较表

[0137]

原料药品	病毒含量	冻结干燥后的含量
猪繁殖与呼吸综合征	$10^{6.5}$ TCID <sub>50</sub> /ml	
海藻糖		$10^{5.8}$ TCID <sub>50</sub> /ml
乳糖		$10^{5.6}$ TCID <sub>50</sub> /ml

[0138] 5.4 试验疫苗的稳定性试验

[0139] 为了对在上述实施例 5.3 中制备的试验疫苗的稳定性进行试验,在制备当时、在制备 3 个月后及制备 6 个月后执行了特性、真空度、氢离子浓度、含湿量、无菌试验、支原体验证试验、迷入病毒试验、含量试验、效价试验。

[0140] 在表 13 中示出稳定性试验的结果。

[0141] 表 13

[0142]

区分	基准	试验结果								
		制备当时			3 个月后			6 个月后		
		01	02	03	01	02	03	01	02	03
特性试验	形状均匀	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当
真空度试验	有放电	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当
氢离子浓度试验	6.0~8.0	7.15	7.05	7.20	7.13	7.10	7.17	7.14	7.17	7.15
含湿量试验	4% 以下	2.60	2.62	2.70	2.61	2.60	2.63	2.62	2.63	2.62
无菌试验	无菌增殖	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当
支原体验证试验	聚合酶链式反应阴性	—	—	—	—	—	—	—	—	—
迷入病毒试验	不认定 CPE 血球融集	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当	适当
含量试验	猪繁殖与呼吸综合征 $10^{4.0}$ /头以上	5.8	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5
效价试验	猪繁殖与呼吸综合征 4 倍以上	32	45	45	45	45	45	32	45	32

[0143] 如表 13 所示,可以确认所制备的试验疫苗 60PRRS 01、60PRRS 02 及 60PRRS 03 在制备当时、制备 3 个月后及制备 6 个月后就适合所有稳定性试验项目。由此可知,利用本发

明的作为新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的 JW-PRRSV 的疫苗为在稳定性方面也为适当的疫苗。

[0144] 实施例 6. 试验疫苗的安全性的确认

[0145] 为了确认在生疫苗中最为重要的安全,向作为实验动物的小鼠和作为豚鼠科目的动物的仔猪接种试验疫苗后,观察 7 天或 21 天内的生存率。接种的试验疫苗使用了在上述实施例 5.3 中制备的 60PRRS 01、60PRRS 02、60PRRS 03,向实验动物及目的动物接种制备当时、制备后 3 个月及制备后 6 个月的试验疫苗,并确认其生存率。

[0146] 6.1 在小鼠中确认试验疫苗的安全性

[0147] 公示 8 只体重为 15 ~ 20g 的小鼠,分别腹腔接种 0.5ml 的试验疫苗(制备当时、制备后 3 个月及制备后 6 个月),并观察 7 天。

[0148] 在表 14 中示出结果。

[0149] 表 14

[0150]

		品种	公示数	接种量	接种路径	生存数/ 接种数	结果 (生存率)
制备当时		ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 02	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 03	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
制备后 3 个月	60 PRRS 01	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 02	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 03	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
制备后 6 个月	60 PRRS 01	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 02	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 03	ICR	8 只	0.5ml	腹腔	8/8	100%

[0151] 如表 14 所示,由于向小鼠接种试验疫苗时,所有个体都生存,因此确认了可以成为安全的疫苗候补组。

[0152] 6.2 在豚鼠中的试验疫苗的安全性试验

[0153] 公示 4 只体重为 300 ~ 350g 的豚鼠,其中,2 只豚鼠在肌肉或皮下接种 2 头份,其他 2 只在腹腔接种 2 头份(制备当时、制备后 3 个月及制备后 6 个月疫苗),并观察 7 天。

[0154] 在表 15 中示出结果。

[0155] 表 15

[0156]

	试验疫苗	品种	公示数	接种量	接种路径	观察期间	结果

[0157]

制备当时	60 PRRS 01	Hartley	2 只	2 头份	肌肉	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
	60 PRRS 02	Hartley	2 只	2 头份	皮下	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
	60 PRRS 03	Hartley	2 只	2 头份	肌肉	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
制备后 3 个月	60 PRRS 01	Hartley	2 只	2 头份	肌肉	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
	60 PRRS 02	Hartley	2 只	2 头份	皮下	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
	60 PRRS 03	Hartley	2 只	2 头份	肌肉	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
制备后 6 个月	60 PRRS 01	Hartley	2 只	2 头份	肌肉	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
	60 PRRS 02	Hartley	2 只	2 头份	皮下	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		
	60 PRRS 03	Hartley	2 只	2 头份	肌肉	7 天	无异常
			2 只	2 头份	腹腔		

[0158] 如表 15 所示,在所有的试验疫苗接种组中,确认在 7 天内已无任何异常的方式生存,由此确认了制备的试验疫苗在豚鼠中也为安全的疫苗。

[0159] 6.3 仔猪中的试验疫苗的安全性试验

[0160] 从作为目的动物的仔猪中确认试验疫苗(制备当时、制备后 3 个月及制备后 6 个月疫苗)的安全性。给 18 只体重为 8~10kg(4~6 周龄)的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阴性的健康猪分别进行 10 头份的肌肉接种疫苗之后,观察 21 天。

[0161] 在表 16 中示出结果。

[0162] 表 16

[0163]

实验疫苗		公示数	接种量	接种路径	观察时间	结果
制备当时	60 PRRS 01	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
	60 PRRS 02	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
	60 PRRS 03	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常

[0164]

制备后 3 个月	60 PRRS 01	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
	60 PRRS 02	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
	60 PRRS 03	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
制备后 6 个月	60 PRRS 01	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
	60 PRRS 02	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常
	60 PRRS 03	2 只	10 头份	肌肉	21 天	无异常

[0165] 如表 16 所示,在接种后的 1~2 小时之内,仔猪未表现过敏反应,且确认了在观察 21 天内无注射部位的化脓、坏死、发热、腹泻等副作用而全部生存。由此可知本发明的试验疫苗作为猪的猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗具有适合的安全性。

[0166] 实施例 7. 对试验疫苗的 SPF 猪的安全性确认

[0167] 当在上述实施例 5 中制备的试验疫苗使目的动物高浓度感染时,确认血液和组织内的病毒感染程度,当在目的动物内进行连续传代接种时,确认了病毒的病原性是否恢复原来的野生型或其以上的病原性。以向 2 只 SPF 状态的猪进行 1 次接种为开始,将  $2 \times 10^6$  PFU/ml 的毒性衰减的 120 传代 JW-PRRSV 在肌肉和鼻腔分别接种 2ml 后,在第 1 天、第 3 天、第 7 天确认了血液、尸检后的肺、扁桃体及淋巴中的病毒感染程度。在表 17 中示出接种个体的日龄、体重、病毒明细和试验日程,在表 18 中示出基于试验日程的病毒感染程度的确认结果。

[0168] 表 17

[0169]

区分	个体	日龄(日)	体重(kg)	接种病毒	试验日期
1 次	100-2	145	23.4	P120 6.3 TCIO <sub>50</sub> /ml	2010.9.1~2010.9.7
	100-4		26.6	P120 6.3 TCIO <sub>50</sub> /ml	
2 次	100-1	164	18.7	1 次接种个体的可检物	2010.9.20~2010.9.27
	100-5		17.3	1 次接种个体的可检物	
3 次	H10-009	212	34.1	2 次接种个体的可检物	2010.10.13~2010.10.21
	H10-011		38.2	2 次接种个体的可检物	
4 次	H10-013	227	36.5	3 次接种个体的可检物	2010.10.27~2010.11.03
	H10-014		26.1	3 次接种个体的可检物	
5 次	104-3	127	19.8	4 次接种个体的可检物	2010.11.25~2010.12.01
	104-4		16.7	4 次接种个体的可检物	

[0170] 表 18

[0171]

1 次	个体	0 天	1 天	3 天	7 天 (尸检)	2 次	个体	0 天	1 天	3 天	7 天 (尸检)	3 次	个体	0 天	1 天	3 天	7 天 (尸检)
血液	个体 w-2	N.D	N.D	N.D	-0.20	血液	个体-1	N.D	N.D	-0.99	N.D	血液	个体-1	N.D	N.D	N.D	N.D
	个体 w-4	N.D	N.D	N.D	0.000		个体-5	N.D	N.D	-0.89	N.D		个体-2	N.D	N.D	N.D	N.D
淋巴	个体 w-2	-	-	-	0.956	淋巴	个体-1	-	-	-	1.109	淋巴	个体-1	-	-	-	-0.27
	个体 w-4	-	-	-	0.576		个体-5	-	-	-	0.96		个体-2	-	-	-	-
扁桃体	个体 w-2	-	-	-	0.607	扁桃体	个体-1	-	-	-	0.964	扁桃体	个体-1	-	-	-	0.316
	个体 w-4	-	-	-	0.642		个体-5	-	-	-	1.128		个体-2	-	-	-	-
肺	个体 w-2	-	-	-	0.309	肺	个体-1	-	-	-	0.84	肺	个体-1	-	-	-	N.D
	个体 w-4	-	-	-	0.776		个体-5	-	-	-	0.72		个体-2	-	-	-	-

[0172]

4次	个体	0天	1天	3天	7天(尸检)	5次	个体	0天	1天	3天	7天(尸检)
血液	个体-1	N.D	N.D	-2.25	N.D	血液	个体-1	N.D	N.D	N.D	-1.313
	个体-2	-2.326	-0.723	N.D	-1.295		个体-2	N.D	N.D	N.D	N.D
淋巴	个体-1	-	-	-	-0.034	淋巴	个体-1	-	-	-	-0.574
	个体-2	-	-	-	0.365		个体-2	-	-	-	-0.116
扁桃体	个体-1	-	-	-	-0.098	扁桃体	个体-1	-	-	-	0.115
	个体-2	-	-	-	-0.069		个体-2	-	-	-	0.068
肺	个体-1	-	-	-	-0.609	肺	个体-1	-	-	-	N.D
	个体-2	-	-	-	-0.542		个体-2	-	-	-	N.D

[0173] 如表 18 所示,在 1 次~5 次的目的动物中进行逆传代培养后,在血液和组织内进行病毒效价测定,结果,直到 5 次接种为止,血液中未检测出病毒,且在组织内呈现出低的病毒效价,在 5 次传代期间未呈现出病毒的增幅或转移及临床症状(未呈现(\*N.D; nondetection))。并且,观察接种时至尸检为止的结果,确认了无注射部位的化脓、坏死、发热、腹泻等副作用而全部生存。

[0174] 实施例 8. 确认病毒的排出

[0175] 通常,在初次接种生毒疫苗的情况下,可以在 3~5 周之间观察疫苗病毒的病毒排出(shedding)。由于疫苗病毒不引发任何异常症状,因而生毒疫苗病毒的病毒排出的副作用可成为问题。确认本发明的疫苗候补物质的病毒排出时间,来与以往的常用疫苗进行了比较。实验组分为接种鼠白血病病毒疫苗 A 的组、接种 5 传代 JW-PRRSV 的组 B、接种 120 传代 JW-PRRS 病毒 C 的组,以接种疫苗后的第 7 天、第 12 天、第 15 天、第 19 天、第 22 天、第 26 天、第 29 天、第 33 天、第 36 天、攻击接种当日、第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天、第 35 天、第 42 天的日程,分别采取各组的个体的鼻腔试样,并使用病毒特殊的引物,来进行聚合酶链式反应,并确认各实验组的病毒排出程度。引物序列利用了表 19 中示出的序列。与以往相同的方法进行聚合酶链式反应,并在 1% 的琼脂糖凝胶中确认。

[0176] 表 19

[0177]

引物名称	序列(5' → 3')
Common EU&NAJ230_F	ATGGCCAGCCAGTCAATCA
Common EU&NAJ068_R	TCGCCCTAATTGAATAGGTGA

[0178] 在图 8 中示出结果。

[0179] 如图 8 所示,在接种鼠白血病病毒疫苗(G-A)的组中检测出直到疫苗接种后的第 12 天排出的病毒,攻击接种后至第 28 天确认了病毒的排出。相反,在接种 120 传代 JW-PRRSV(G-C)的组中,在接种期间和野外病毒感染后的期间内均未确认到病毒排出。这意味着与以往在市场上销售的猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗相比,呈现出快的病毒排出。长时间的病毒排出需要经过多次的复制过程,而在这些过程中,通过重组重新恢复毒性来出现新型病毒,之后重新回归为病原性株的可能性高,因此,本发明的疫苗基于快速的病毒排出来期待可以改善以往的猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗的问题。

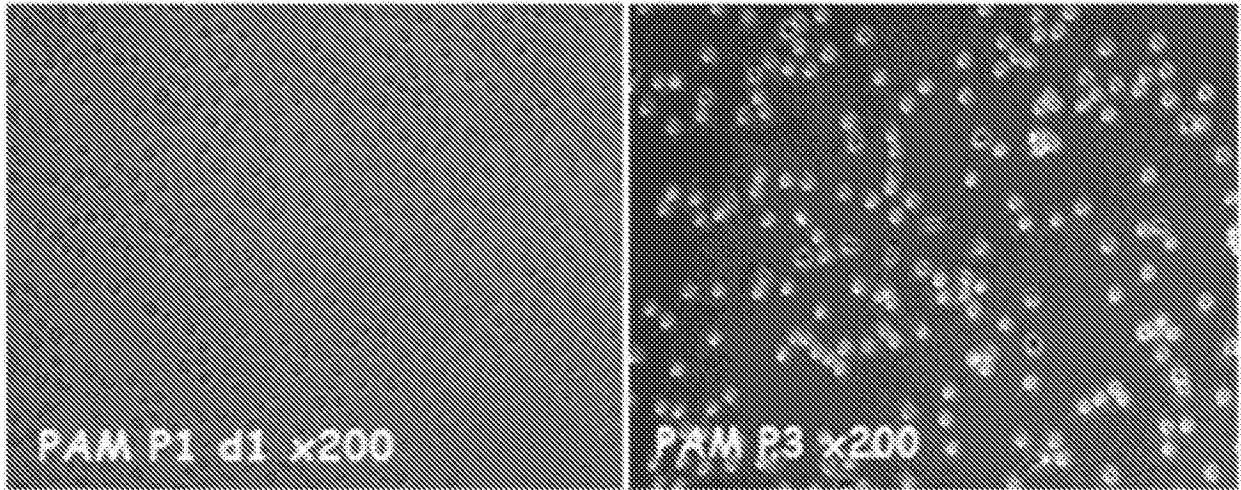


图 1

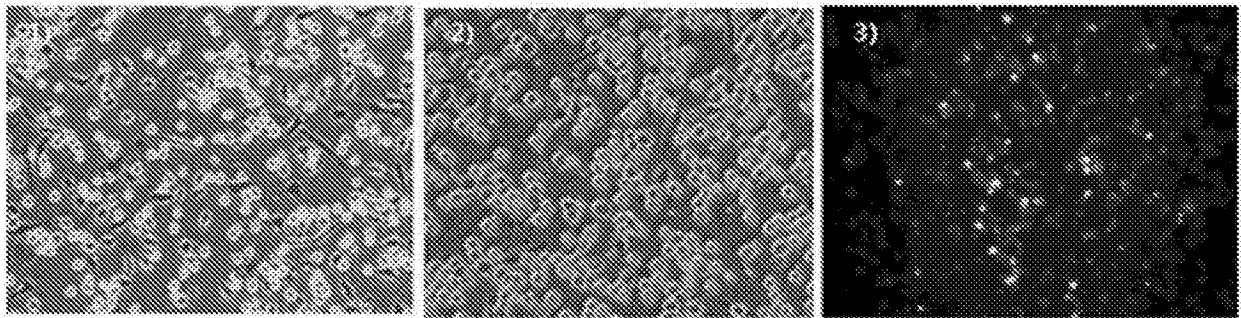


图 2



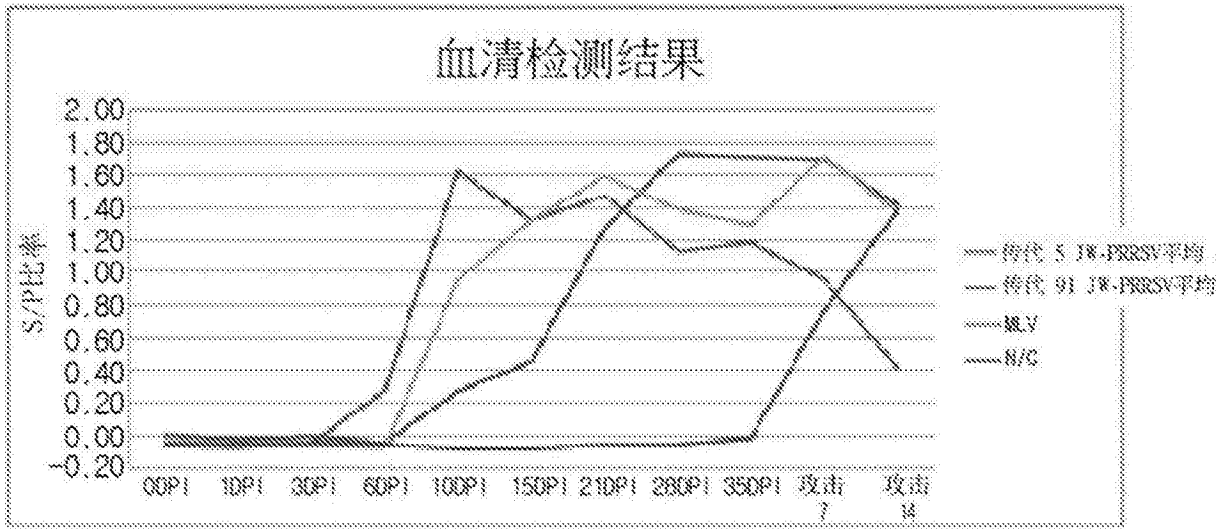


图 4

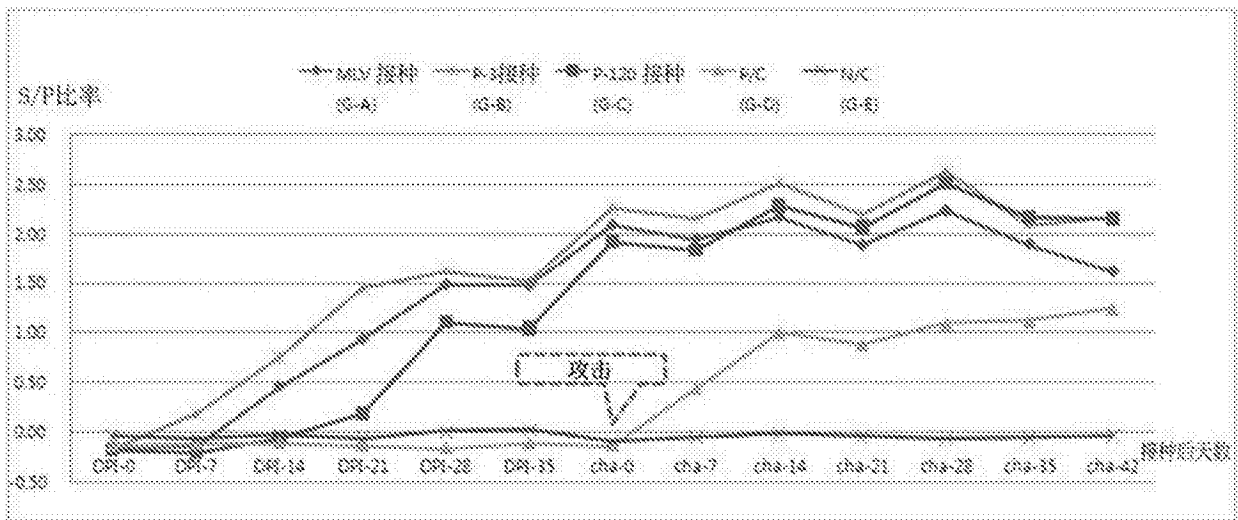
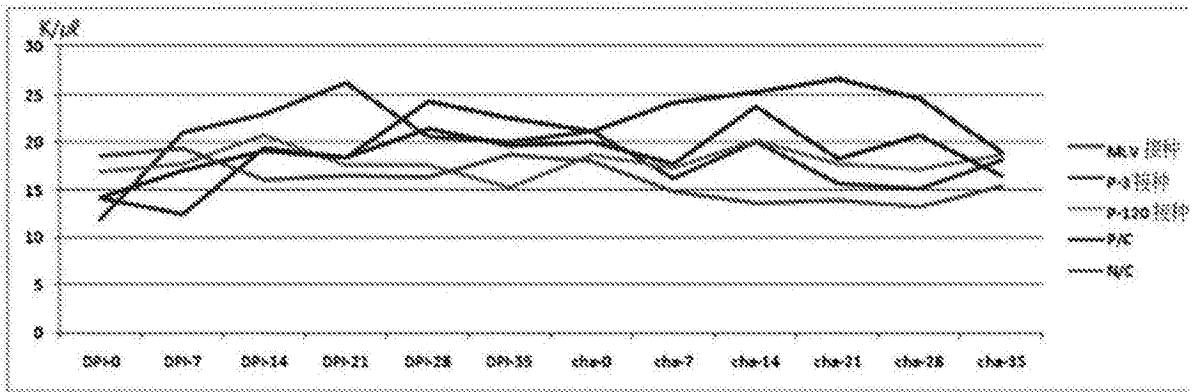


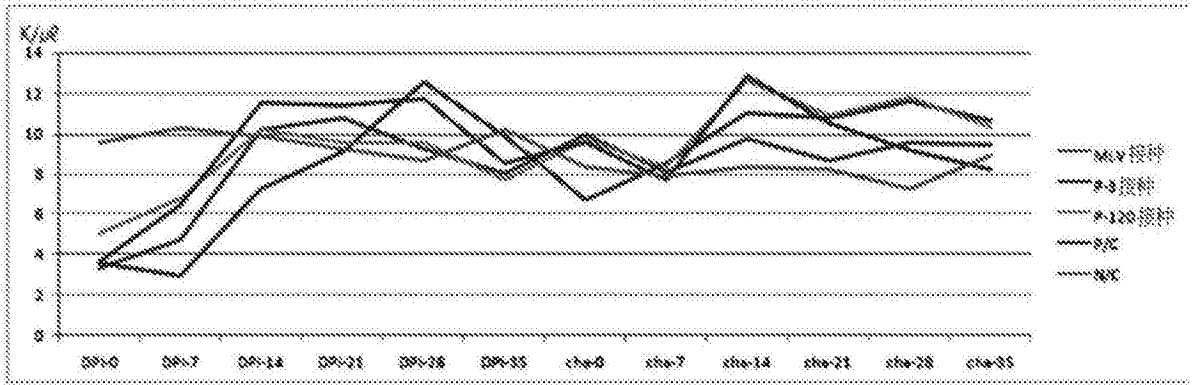
图 5

a) 总白细胞数



\* 普通范围 (11.0~22.0 k/μl)

b) 淋巴球



\* 普通范围 (4.3~13.6 k/μl)

图 6

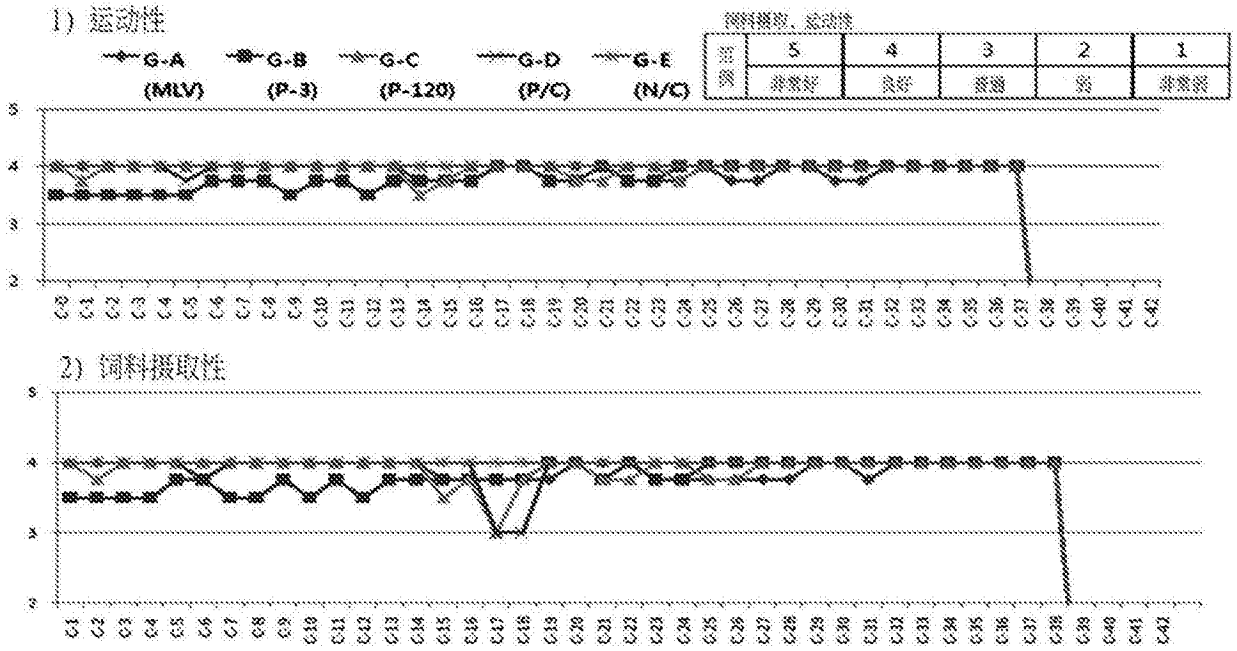


图 7

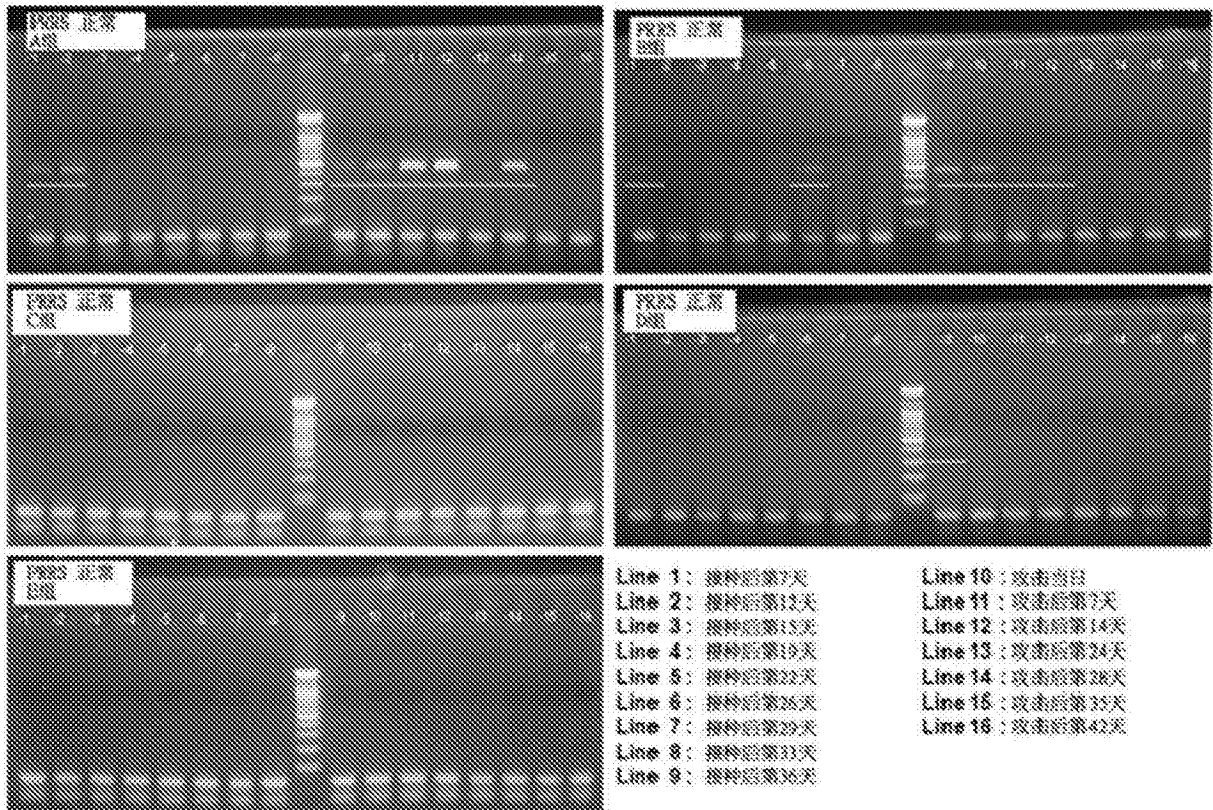


图 8

专利名称(译)	新型韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒		
公开(公告)号	<a href="#">CN105073982A</a>	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201480017256.1	申请日	2014-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	致优制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	致优制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	致优制药有限公司		
[标]发明人	金贤一 申城浩 韩范久		
发明人	金贤一 申城浩 韩范久		
IPC分类号	C12N7/01 A61K39/12 G01N33/53		
CPC分类号	C12N7/00 C12N2770/10021 C12N2770/10034 G01N33/56983 G01N2333/08 A61K39/12 A61K2039/525 A61K2039/54 A61K2039/543 G01N2469/20		
代理人(译)	黄志华 石磊		
优先权	1020130029891 2013-03-20 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及作为在韩国国内进行分离的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征(PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)病毒的JW-PRRSV(KCTC12096BP)、利用上述韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的疫苗组合物及猪繁殖与呼吸综合征的预防方法。本发明的登录号为KCTC12096BP的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒作为区别于北美及欧洲的韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒,具有可针对韩国国内猪繁殖与呼吸综合征生产特殊的疫苗组合物来预防韩国国内猪繁殖与呼吸综合征或以特殊方式诊断出是否感染韩国国内猪繁殖与呼吸综合征病毒的效果。

