(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 6 月 3 日 (03.06.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/103421 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 7/00 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01) *C12R 1/93* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/088921

(22) 国际申请日: 2020 年 5 月 7 日 (07.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911182037.X 2019年11月27日 (27.11.2019) CN

(71) 申请人: 青岛易邦生物工程有限公司 (YEBIO BIOENGINEERING CO., LTD. OF QINGDAO) [CN/CN]; 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。

(72) 发明人: 孙化露 (SUN, Hualu); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 楚电峰 (CHU, Dianfeng); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 于晓璐 (YU, Xiaolu); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 孙鹏 (SUN, Peng); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 侯玉超 (HOU, Yuchao); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 李振 (LI, Zhen); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 范根成 (FAN, Gencheng); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。 杜元钊 (DU, Yuanzhao); 中国山东省青岛市红岛经济开发区岙东南路21号, Shandong 266114 (CN)。

(74) 代理人: 青岛清泰联信知识产权代理有限公司 (QINGDAO LAWSCI INTELLECTUAL PROPERTY CO., LTD.); 中国山东省青岛市崂山区苗岭路52号巨峰创业大厦四层401, Shandong 266100 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** GENE VII TYPE NEWCASTLE DISEASE VIRUS ATTENUATED STRAIN AND USE THEREOF

(54) **发明名称**: 基因VII型新城疫病毒弱毒株及其应用

(57) **Abstract:** Provided are a naturally isolated gene VII type Newcastle disease virus attenuated strain and the use thereof, wherein the deposit number thereof is CCTCC V201968. The strain has a stable inheritance, is prepared into a live vaccine to immunize chickens, can resist an attack from a gene VII type virulent strain and can be used for preparing a vaccine.

(57) **摘要**: 提供了一种自然分离获得的基因VII型新城疫病毒弱毒株及其应用，其保藏编号为CCTCC V201968。该毒株具有稳定遗传性，做成活疫苗免疫鸡只，能够抵抗基因VII型强毒株的攻击，可用于制备疫苗。

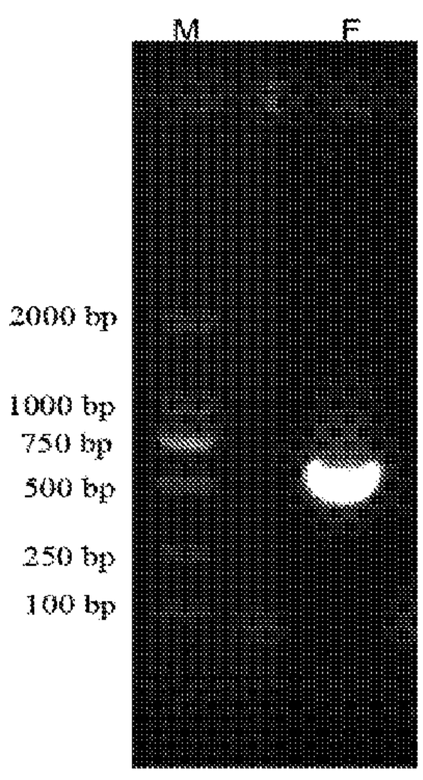


图 1

[见续页]

WO 2021/103421 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国**(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

基因 VII 型新城疫病毒弱毒株及其应用

本申请要求在 2019 年 11 月 27 日提交中国专利局、申请号为 201911182037.X、发明名称为“一种基因 VII 型新城疫病毒弱毒株及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本申请涉及兽医病毒分子生物学与免疫学领域，具体涉及一株基因 VII 型新城疫病毒弱毒株及其应用。

技术背景

新城疫（Newcastle Disease，ND）是由新城疫病毒（Newcastle Disease Virus，NDV)引起的一种高度接触性、急性烈性传染病，对世界养禽业危害严重。该病毒基因组为单股负链 RNA，宿主范围广，其中以鸡的易感性最高，且幼龄鸡的发病率和死亡率明显高于成年鸡，该病一年四季均可流行。NDV 只有一个血清型，利用 F 基因进行遗传进化分析，可分为 Class Ⅰ和 Class Ⅱ两大类群，Class Ⅰ类群分为 18 个基因型，几乎包含所有强毒株及广泛流行毒株。

疫苗是防控传染病最经济有效的手段，自 ND 流行以来，最初使用灭活疫苗，其具有生产成本高，粘膜免疫及细胞免疫效果差等局限。随着越来越多弱毒株的分离，活疫苗所占份额持续增加。当前中国对 ND 防控主要使用的 LaSota 株等多为基因 II 型毒株，与基因 VII 型毒株遗传距离较大，抗原交叉保护力较低，不能对新城疫病毒基因 VII 型流行株提供完全有效的保护。由于现有技术中分离到的基因 VII 型 NDV 流行毒株常为强毒株，虽然能够迅速产生抗体，但是免疫鸡易产生食欲不振、产蛋下降、带毒散毒等不良反应，对生态环境造成危害，因此获得基因 VII 型弱毒株是疫苗制备的关键。现有技术中获得弱毒株的手段主要是通过反向遗传技术对强毒株进行改造，

获得的重组毒经过基因改造，有毒力返强的风险，且毒力很难完全致弱等缺点。

发明内容

本申请提供了一种基因 VII 型新城疫病毒弱毒株及其应用，该毒株自然分离而得，未进行任何基因改造，保持了该病毒作为流行毒株所具备的天然的免疫原性。

本申请的第一种实施方式提供了一种基因 VII 型新城疫病毒弱毒株，以下也可简称为：NDV-VII 株，于 2019 年 10 月 15 日保藏在位于武汉大学的中国典型培养物保藏中心（CCTCC），其保藏号为 CCTCC V201968。

本申请的第二种实施方式提供了一种所述弱毒株的应用，具体地，所分离的基因 VII 型新城疫病毒弱毒株（NDV-VII 株）可用于制备疫苗。

可选地，所述的疫苗为活疫苗。

本申请的第三种实施方式提供了一种疫苗，其中抗原为上述的基因 VII 型新城疫病毒弱毒株，即 NDV-VII 株。

本申请的第四种实施方式提供了 NDV-VII 株的 F 基因，其核苷酸序列为 SEQ ID No.1；所述核苷酸序列所编码的蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID No.2。

本申请的第五种实施方式提供了 NDV-VII 株的全基因组，其核苷酸序列为 SEQ ID No.3。

所述弱毒株经过连续 20 代鸡胚传代，其 MDT 大于 120h；F 基因裂解位点氨基酸序列无突变。

本申请中的 NDV-VII 毒株是自然分离得到的，该毒株对鸡胚最小致死量的平均致死时间（MDT）为 138h，1 日龄雏鸡脑内接种致病指数（ICPI）为 0.16，6 周龄鸡翅静脉接种致病指数（IVPI）为 0。所述毒株具有稳定遗传性，在鸡胚上连续传代 20 代，其 F 基因并未发生致病力增强的突变。传统疫苗株 LaSota 株免疫保护效力比对试验

证明，本毒株制备活疫苗免疫后抗体产生水平高于对照组，免疫后攻毒实验证明该毒株能够对鸡只提供完全保护。

附图说明

图 1：NDV-VII 株 F 片段 PCR 鉴定结果；

图 2：NDV-VII 株全基因组 9 个片段 PCR 扩增电泳图；

图 3：基于 F 基因构建的系统进化发育树。

具体实施方式

以下结合具体实施例对本申请的技术方案进行详实的阐述，然而应当理解，在没有进一步叙述的情况下，一个实施例的实现也可以采用本领域技术人员能够想到的其他方式或手段来实现，例如且不限于实验参数的变动，实验试剂的替换等。本申请中疫苗的制备方法可以采用疫苗制备领域中常用的方法，而不仅限于本申请实施例的具体记载，本领域的普通技术人员可以其它常规方法来实现本申请。

本申请中所涉及的生物材料：LaSota 活疫苗和基因 VII 型新城疫病毒强毒株 JS 02/06 株由青岛易邦生物工程有限公司提供；H5、H7、H9 亚型 AI 及 ND 标准阳性血清均购自中国兽医药品监察所。

实施例 1： NDV 弱毒株的筛选及 MDT、ICPI、IVPI 的测定

2019 年 4 月份从山东某地区临床送检鸡中分离到一株疑似 NDV 毒株，命名为 NDV-VII 株。接种鸡胚收取尿囊液，测定 HA 效价。连续传代 20 代，HA 效价测定结果显示，该株病毒鸡胚尿囊液的 HA 效价在鸡胚中传代 4 代后稳定在 9log2。收获的尿囊液进行微量血凝抑制试验（HI），结果表明，尿囊液样品只与 ND 标准阳性血清反应，与 H5、H7、H9 阳性血清反应阴性。

更具体地，2019 年 4 月份从山东某养殖场送来待检测健康鸡的组织样品，取鸡的

气管、肝脏、心脏、肠道等组织，加入 pH 7.2 的四抗 PBS （Penicilin 10000 IU/mL, Streptomycin 10 mg/mL, Geamicin 250 μg/mL, Kanamycin 250 μg/mL）进行研磨。8000 r/min 离心 10 min，取上清 0.2 mL 接种于 9-10 日龄 SPF 鸡胚，24 h 内死亡的鸡胚弃掉，96 h 后收取鸡胚的尿囊液，测定 HA 效价。有效价的尿囊液倍比稀释后接种鸡胚成纤维细胞（CEF）进行蚀斑克隆纯化 3 次；再次接种鸡胚，96 h 后收取鸡胚尿囊液，测定 HA 效价，结果显示，该株病毒纯化后在鸡胚中传代 4 代，尿囊液的 HA 效价即可稳定在 9log2；得到毒株并对其进行保藏。收获的尿囊液进行微量血凝抑制试验（HI），结果表明，尿囊液样品只与 ND 标准阳性血清反应，与 H5、H7、H9 阳性血清反应阴性。

本申请中，MDT 全称为 Mean death time，ICPI 全称为 Intracephalic pathogenicity index，IVPI 全称为 Intravenous pathogenicity index。

MDT 是指最小致死量所能使鸡胚死亡的平均时间，其中，MDT 低于 60h 为 NDV 强毒株，MDT 值在 60h-90h 之间为中等毒力毒株，MDT 大于 90h 为弱毒株。用无菌生理盐水将新鲜收获的含毒尿囊液作 10 倍系列稀释，取 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} 和 10^{-9} 共 4 个稀释度，分别接种 10 日龄 SPF 鸡胚，每个稀释度接种 5 枚，每胚尿囊腔内注射 0.1mL。连续观察 7 日，每天上午和下午各照胚一次，记录每一鸡胚的死亡时间，连续观察 7 日（结果见表 1）。MDT 计算公式为：

$$MDT=\frac{\text{在 X 小时死亡胚数}\times\text{X 小时}+\text{在 Y 小时死亡胚数}\times\text{Y 小时}}{\text{死亡胚总数}}$$

1 日龄 SPF 雏鸡脑内致病指数（ICPI）测定试验：取 1 日龄 SPF 雏鸡 10 只，其中 5 只各脑内注射用 PBS（phosphate buffer saline）10 倍稀释的新鲜含毒尿囊液 0.05mL；剩余 5 只，以同样方法注射相同剂量的无菌 PBS 作为对照。接种后，连续观察 8 日，每日在相应接种的时间观察，记录雏鸡的情况，分正常（活动灵活，行动

无共济失调现象）、发病（包括麻痹、卧地不起，但不包括只表现迟钝的鸡）和死亡，结果见表 2。

$$ICPI=\frac{8\text{天累计发病数}\times1+8\text{天累计死亡数}\times2}{8\text{天累计观察鸡只总数}}$$

6 周龄 SPF 雏鸡静脉接种致病指数（IVPI）测定试验：采用 PBS 10 倍稀释新鲜感染尿囊液，取 6 周龄 SPF 小鸡 10 只，其中 5 只各翅静脉接种 0.1mL；剩余 5 只，以同样方法注射相同剂量的无菌 PBS 作为对照。接种后，连续观察 10 日，每日在相应接种的时间观察，记录雏鸡的情况，分正常（活动灵活，行动无共济失调现象）、发病（包括瘫痪、卧地不起，但不包括只表现迟钝的鸡）和死亡，结果见表 3。

$$IVPI=\frac{(10\text{天累计发病数}\times1+10\text{天累计瘫痪数}\times2+10\text{天累计死亡数}\times3)}{10\text{天累计观察鸡只总数}}$$

表 1：NDV-VII 株 MDT 的测定

稀释度 \ 时间		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
NDV-VII 株	10^{-7}	0	0	0	0	1	2	0
	10^{-8}	0	0	0	0	0	1	0
	10^{-9}	0	0	0	0	0	0	0

表 2：NDV-VII 株 ICPI 的测定

接种鸡状态		攻毒后天数								总和	权值	总分
		1	2	3	4	5	6	7	8			
NDV-VII 株	正常	10	10	10	10	10	8	6	5	69	0	0
	发病	0	0	0	0	0	2	2	2	6	1	6
	死亡	0	0	0	0	0	0	2	1	3	2	6
	观察	10	10	10	10	10	10	8	7	75		12

表 3：NDV-VII 株 IVPI 测定

接种鸡状态	攻毒后天数										总和	权值	总分
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

正常	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100	0	0
发病	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
瘫痪	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
死亡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
观察	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100		0

表 1~表 3 显示，NDV-VII 株的 MDT 为 138h，ICPI 为 0.16，IVPI 为 0，符合 NDV 弱毒特征，证明本次分离到的 NDV-VII 株为弱毒株。

对本次筛选获得的基因 VII 型新城疫病毒弱毒株 NDV-VII 株，根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约》，已于 2019 年 10 月 15 日保藏在位于武汉大学的中国典型培养物保藏中心，其保藏号为 CCTCC V201968。

实施例 2： NDV-Ⅶ株 F 基因鉴定及进化树分析

根据 NCBI 公布的 NDV 的 F 基因序列设计引物，上游引物：NDV F-F：ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAG ；下游引物：NDV F-R：AAACTGCTGCATCTTCCCAACCG，进行 NDV-VII 株的 F 片段扩增鉴定，目的片段约 550bp。取鸡胚传代收获的尿囊液 200uL 按常规方法提取 RNA，反转录，F 基因片段的核苷酸序列为 SEQ ID No.1，该核苷酸序列编码蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID No.2。核酸电泳后（结果如图 1 所示），切取阳性条带，回收，连接 T 载体测序。取 F 基因 47 nt-420 nt 之间的序列绘制系统进化发育树，结果如图 3 所示。

结果显示，所分离的 NDV-VII 株属于 Class II 亚群，基因Ⅶ型新城疫毒株，与近年中国多地流行株处于同一进化分支，同属于Ⅶd 亚型。

实施例 3：NDV-VII 株全基因组序列的测定

根据 NCBI 公布的 NDV 基因序列，设计 9 对引物，相邻扩增片段之间有部分核酸序列相互重叠。引物由上海生工生物工程有限公司合成，序列见表 4。

表 4：扩增 NDV-VII 株全基因组的引物序列

引物名称	引物序列（5' to3'）	碱基数（bp）	产物大小（bp）
NDV1-F	ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTAC	25	2227
NDV1-R	AGTTGCTTGCTCCAGTCTTG	20	
NDV2-F	CTAAGCACAGCATGGGAGAAG	21	1408
NDV2-R	AAGTCAAGACGCTGGATCCT	20	
NDV3-F	CACAGGAGATGGGAAGAAGC	20	1955
NDV3-R	ATGAGCTGAGTTGATTGTTCC	21	
NDV4-F	CAGTTGGGAAGATGCAGCAG	20	1798
NDV4-R	AGAGGGATAGAATGATGTGAC	21	
NDV5-F	CCTGTTCATGACCCAGACTAC	21	1734
NDV5-R	TCGAAGTCACATTCATCAGG	20	
NDV6-F	AGCACCAGATCATCCTACCAG	21	2263
NDV6-R	TCTGATCTTACCTCTCTCGTT	21	
NDV7-F	CAATCCAACTTGCTGCAGC	19	1888
NDV7-R	TCGAAAGGAACCGCAACAG	19	
NDV8-F	TCTTTCCAATGACAACAACC	20	2230
NDV8-R	GACCGGATAACTGTGTCAAT	20	
NDV9-F	CGTCGTGTAACAGATATCCT	20	793
NDV9-R	ACCAAACAAAGATTTGGTG	19	

常规柱提法提取病毒 RNA，随机引物进行反转录，用上述引物进行 PCR 扩增，扩增片段电泳扩增结果见图 2。将目的片段切胶回收后连接 PMD 19-T 载体，转化、测序，序列在 NCBI 网站比对，用 Lasergene 软件拼接，获得 NDV-VII 株全基因序列（SEQ ID No.3）。

F 基因全长 1662 bp，裂解位点处氨基酸序列为 ^{112}G-R-Q-G-R-L^{117}，符合弱毒株裂解位点特征。

根据序列 SEQ ID No.3 可知，NDV-VII 株基因组全长 15186 bp，与常规分离的基

因Ⅶ型 NDV 基因组全长（15192 bp）不一致，推测 NDV-VII 株在临床长期的流行过程中发生过重组，并最终稳定遗传。该病毒 F 基因裂解位点处氨基酸特征与毒力有密切的关系，根据全基因组序列可知，该毒株 F 基因裂解位点处氨基酸序列为 ^{112}G-R-Q-G-R-L^{117}，符合弱毒株裂解位点的普遍特征，说明该分离株 NDV-VII 具有弱毒的特征。

实施例 4：NDV-VII 株鸡胚传代稳定性试验

将 NDV-VII 株通过鸡胚进行连续传代试验，每隔 5 代测定病毒 MDT 及 ICPI，并对 F 基因进行测序、分析裂解位点氨基酸序列，传至 20 代。结果发现，经过连续 20 代鸡胚传代，该毒株 MDT 始终大于 120h，F 基因裂解位点氨基酸序列并无突变，证明该毒株虽然可能是自然重组毒株，但遗传性能稳定，适合作为疫苗株候选株（表 5）。

表 5：NDV-VII 株 MDT 及 F 基因裂解位点

代次	MDT	F 基因裂解位点氨基酸序列
第 5 代	138h	^{112}G-R-Q-G-R-L^{117}
第 10 代	140h	^{112}G-R-Q-G-R-L^{117}
第 15 代	135h	^{112}G-R-Q-G-R-L^{117}
第 20 代	133h	^{112}G-R-Q-G-R-L^{117}

实施例 5：NDV-VII 株保存期稳定性试验

将收获的传代 20 代 NDV-VII 株新鲜病毒尿囊液（EID_{50} 为 $10^{9.17}$/0.1mL）等量分成若干份置于-80℃保存，分别于保存期内 1 天、7 天、14 天、28 天、2 月、4 月、6 月取出，4℃溶化后测定 HA 效价，并同时接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚，0.1mL/枚，37℃培养至 120h，收取尿囊液测定 HA 效价，检验病毒的保存稳定性。

结果显示，病毒尿囊液保存至-80℃条件下 6 个月，HA 并无显著性下降，第 21 代收获的尿囊液 HA 无明显下降，说明该代次病毒在-80℃条件下较为稳定，至少能够保存 6 个月（表 6）。

表 6：NDV-VII 株保存期内 HA 测定结果

保存时间	1 天	7 天	14 天	28 天	2 月	4 月	6 月
20 代 HA	9log2	9log2	9log2	9log2	9log2	8log2	8log2
21 代 HA	9log2	9log2	9log2	9log2	9log2	9log2	9log2

实施例 6：NDV-VII 株活疫苗的制备及安全性试验、无菌检验

用 5%蔗糖脱脂乳 1:1 加入至稀释的尿囊液中，定量稀释后的病毒含量为 $10^{7.0}EID_{50}$/0.1mL，充分混匀后冻干得到冻干活疫苗，以保存疫苗；需要使用时采用 PBS 溶液稀释即可。制备的活疫苗按 2010 年版《中国兽药典》附录进行无菌检验，结果符合标准，无细菌污染。

用 1~3 日龄 SPF 鸡 10 只，分为实验组 5 只，PBS 对照组 5 只；其中实验组每只免疫 $10^{7.0}EID_{50}$ 的病毒液，对照组免疫相同体积的无菌 PBS，免疫方式为滴鼻点眼。在相同的条件下饲养，连续观察 14 日，记录试验鸡采食、饮水及临床表现。结果显示，实验组免疫后鸡只与对照组一样，没有出现精神沉郁、食欲不振、嗜睡麻痹及全身不良反应，鸡只健康，证明制备的 NDV-VII 活疫苗安全。

实施例 7：NDV-VII 株活疫苗免疫效果评价

用 21 日龄 SPF 鸡 30 只，随机分为 3 组，每组 10 只，其中，第一组为 NDV-VII 株冻干活疫苗组，第二组为 LaSota 株活疫苗组，以及第三组为 PBS 对照组，滴鼻点眼免疫，0.1mL/只，免疫后每组隔离饲养，分别于免后 14 天、21 天、28 天采血，测定抗体。28 天采血后，用基因 VII 型强毒株 JS 02/06 株攻毒，攻毒方式为滴鼻点眼，剂量为 $10^{6}EID_{50}$/只，隔离器饲养，观察 14 天，每天记录鸡的发病和死亡情况；攻毒后第 3 天及第 5 天，分别采集各免疫组鸡的喉拭子和泄殖腔拭子接胚，检测排毒情况。

结果显示，第一组和第二组免疫 14 天即可产生较高水平抗体，21 天、28 天抗体水平升高，结果如表 7 所示。免疫攻毒后，第一组和第二组均没有鸡只死亡，第三组鸡全部死亡。排毒试验显示，第一组没有出现排毒，而第二组在第五天在喉气管及泄

殖腔均有排毒，见表 8 和表 9。

表 7：免疫后抗体效价测定表

组别	编号	抗体效价测定（HI）									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NDV-VII 株	14 天	5log2	6log2	5log2	5log2	5log2	5log2	5log2	6log2	6log2	6log2
	21 天	7log2	7log2	6log2	7log2	7log2	6log2	7log2	7log2	7log2	7log2
	28 天	9log2	9log2	8log2	9log2	9log2	9log2	8log2	9log2	9log2	9log2
LaSota 活苗	14 天	5log2	5log2	4log2	5log2	5log2	5log2	5log2	5log2	5log2	5log2
	21 天	6log2	7log2	6log2	7log2	7log2	6log2	7log2	7log2	6log2	6log2
	28 天	8log2	8log2	9log2	8log2	9log2	8log2	8log2	9log2	9log2	9log2
PBS	14 天	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21 天	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	28 天	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 8：免疫效力实验结果表

组别	攻毒剂量（EID_{50}/只）	攻毒途径	发病数/总数	死亡数/总数	保护率（%）
NDV-VII 活苗	10^6	滴鼻点眼	0/10	0/10	100
LaSota 活苗	10^6	滴鼻点眼	0/10	0/10	100
PBS	10^6	滴鼻点眼	10/10	10/10	-

表 9:攻毒后第 3 天、5 天病毒分离结果

组别	病毒阳性数/总数			
	喉气管		泄殖腔	
	第 3 天	第 5 天	第 3 天	第 5 天
NDV-VII 活苗	0/10	0/10	0/10	0/10
LaSota 活苗	5/10	8/10	6/10	8/10

综上所述，本申请所构建的 NDV-VII 株，具有良好的免疫原性，做成活疫苗免疫动物发现，该疫苗对鸡只安全，能够诱导产生较高的中和抗体，并且能够保护当前流行的基因 VII 型强毒株的攻击，产生很好的保护效果，有广阔的应用前景。

所述的实施方式仅仅是对本申请的优选实施方式进行描述，并非对本申请的范围进行限定，在不脱离本申请设计精神的前提下，本领域普通技术人员对本申请的技术方案作出的各种变形和改进，均应落入本申请权利要求书确定的保护范围内。

权利要求书

1、一种基因 VII 型新城疫病毒弱毒株，其中，所述的弱毒株的保藏编号为 CCTCC V201968。

2、根据权利要求 1 所述的弱毒株，其中，所述弱毒株的 F 基因的核苷酸序列为 SEQ ID No.1。

3、根据权利要求 2 所述的弱毒株，其中，所述 F 基因编码蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID No.2。

4、根据权利要求 1 所述的弱毒株，其中，所述弱毒株的全基因组的核苷酸序列为 SEQ ID No.3。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的弱毒株，其中，经过连续 20 代鸡胚传代，所述弱毒株的 MDT 大于 120h。

6、根据权利要求 5 所述的弱毒株，其中，所述弱毒株的 F 基因裂解位点氨基酸序列无突变。

7、一种权利要求 1 所述的弱毒株在制备疫苗中的应用。

8、根据权利要求 7 所述的应用，其中，所述的疫苗为活毒疫苗。

9、一种疫苗，其中，所述的疫苗中的抗原包含有权利要求 1 所述的弱毒株。

10、根据权利要求 9 所述的疫苗，其中，所述疫苗为活疫苗。

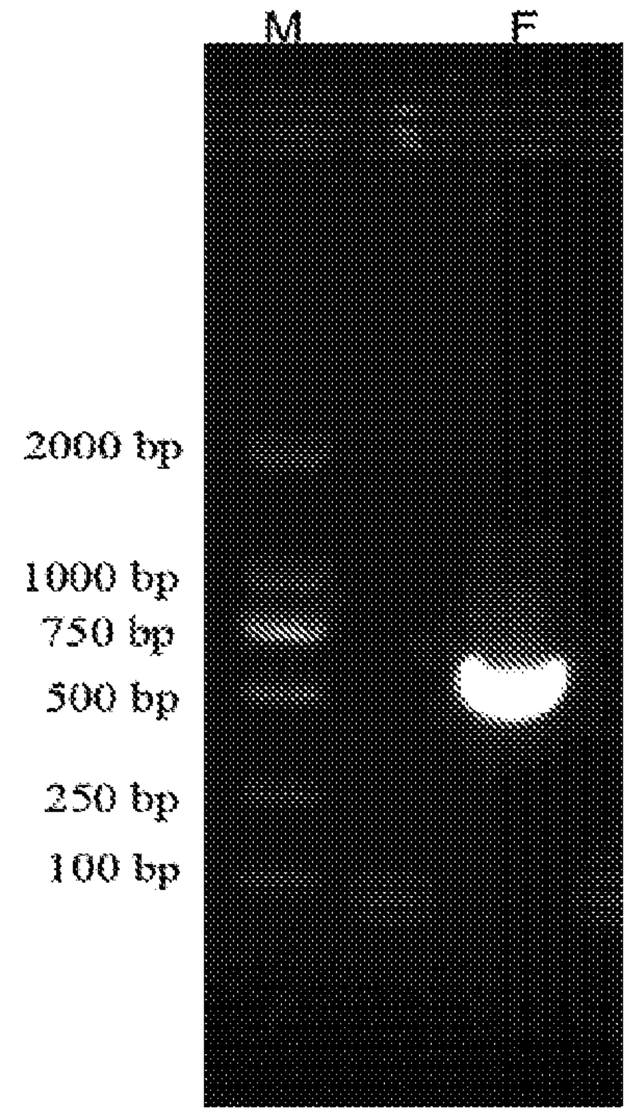

M
F
2000 bp
1000 bp
750 bp
500 bp
250 bp
100 bp

图 1

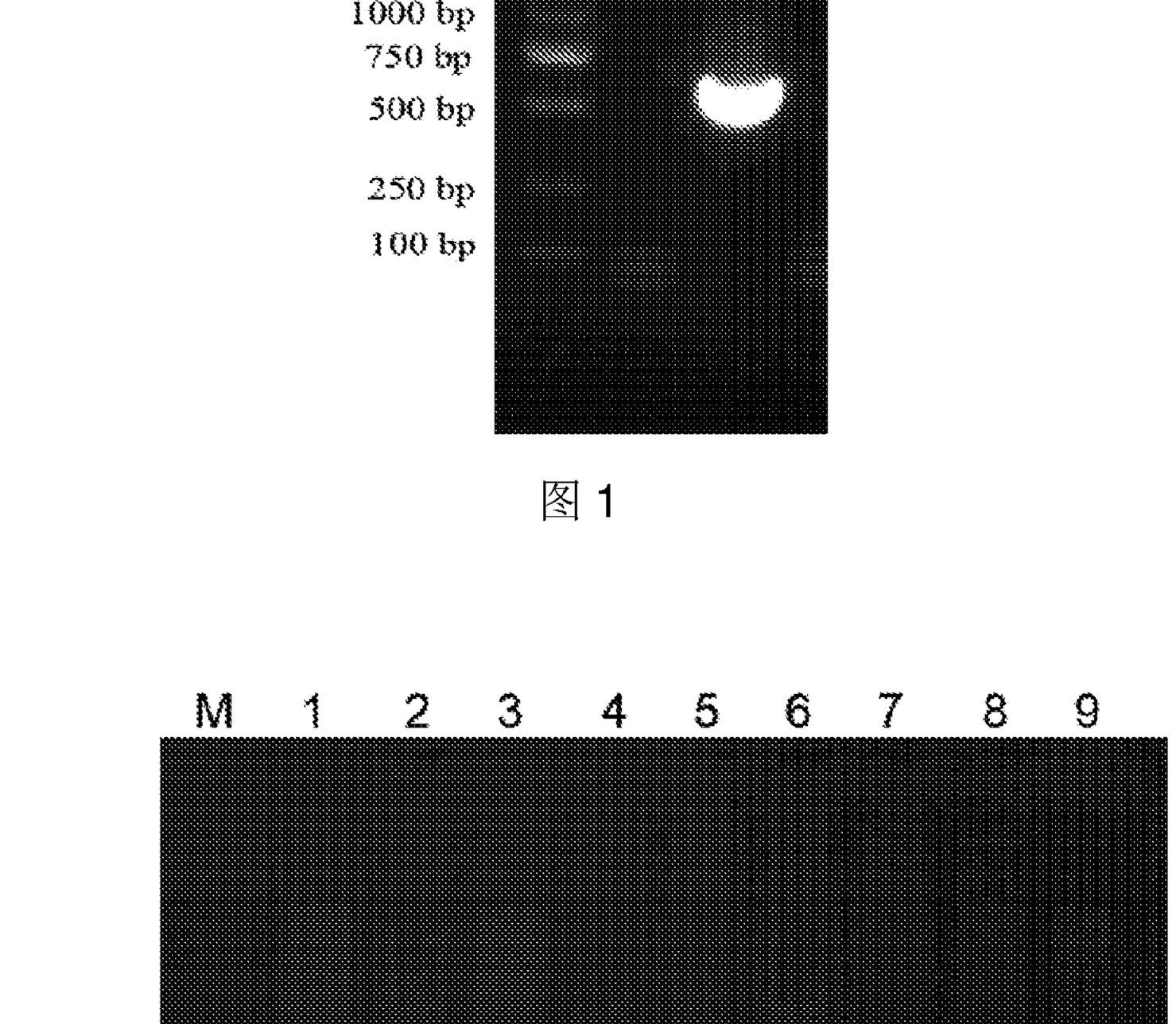

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
2000 bp
1000 bp
750 bp
500 bp
250 bp
100 bp

图 2

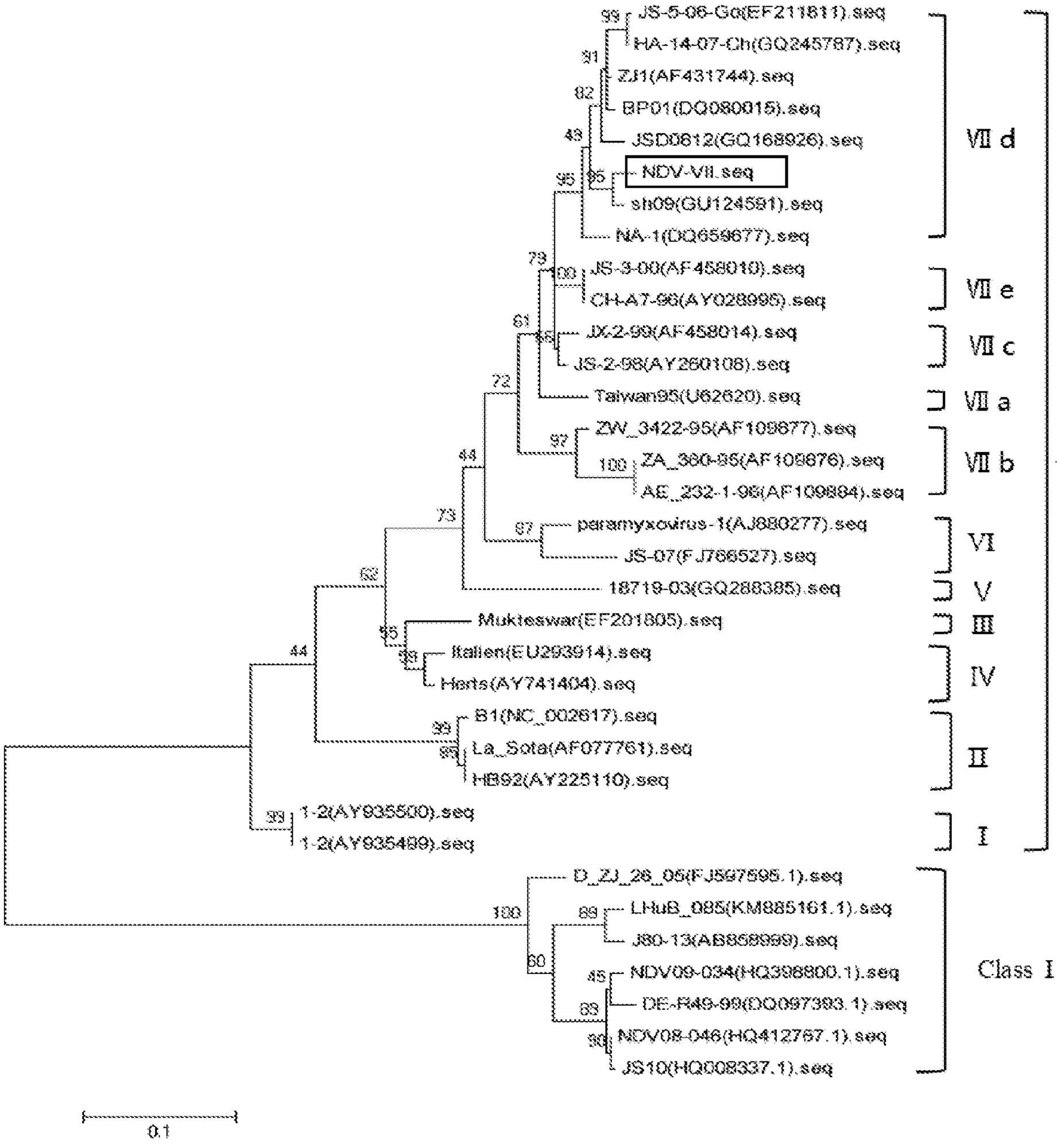

JS-5-06-Gs(EF211811).seq
HA-14-07-Ch(GQ245787).seq
ZJ1(AF431744).seq
BP01(DQ080015).seq
JSD0612(GQ168926).seq
NDV-VII.seq
sh09(GU124591).seq
NA-1(DQ659677).seq
JS-3-00(AF458010).seq
CH-A7-96(AY028995).seq
JX-2-99(AF458014).seq
JS-2-98(AY260108).seq
Taiwan95(U62620).seq
ZW_3422-95(AF109877).seq
ZA_380-95(AF109876).seq
AE_232-1-96(AF109884).seq
paramyxovirus-1(AJ880277).seq
JS-07(FJ766527).seq
18719-03(GQ288385).seq
Mukteswar(EF201805).seq
Italien(EU293914).seq
Herts(AY741404).seq
B1(NC_002617).seq
La_Sota(AF077761).seq
HB92(AY225110).seq
1-2(AY935500).seq
1-2(AY935499).seq
D_ZJ_26_05(FJ597595.1).seq
LHuB_085(KM885161.1).seq
J80-13(AB868999).seq
NDV09-034(HQ398800.1).seq
DE-R49-99(DQ097393.1).seq
NDV08-046(HQ412767.1).seq
JS10(HQ008337.1).seq
VII d
VII e
VII c
VII a
VII b
VI
V
III
IV
II
I
Class II
Class I
0.1

图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/088921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 7/00(2006.01)i; A61K 39/17(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; C12R 1/93(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPTXT; VEN; USTXT; WOTXT; CNABS; CNTXT; CNKI; 百度学术搜索; ISI-WEB of SCIENCE; PUBMED: 新城疫, 毒株, VII, CCTCC V201968, 孙化露, newcastle disease, NDV, Sun HL et al.; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: sequence search for SEQ ID NOs: 1-3.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110846287 A (QINGDAO YEBIO BIOENGINEERING CO., LTD.) 28 February 2020 (2020-02-28) see abstract, claims 1-7	1-10
X	CN 101182494 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 21 May 2008 (2008-05-21) see abstract, specific embodiments	1-10
X	CN 107281479 A (PULIKE BIOLOGICAL ENGINEERING, INC.) 24 October 2017 (2017-10-24) see abstract, embodiments 1-6	1-10
X	CN 107164335 A (SHANDONG SINDER TECHNOLOGY CO., LTD.; QINGDAO SINDER PHARMACY CO., LTD.) 15 September 2017 (2017-09-15) see embodiments 1-8	1-10
X	CN 107213460 A (SHANDONG SINDER TECHNOLOGY CO., LTD.; QINGDAO SINDER PHARMACY CO., LTD.) 29 September 2017 (2017-09-29) see embodiments 1-8	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 2020	**04 September 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	Authorized officer
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/088921

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105543180 A (INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE AND VETERINARY MEDICINE, SHANDONG ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 04 May 2016 (2016-05-04) see abstract, embodiments 3-4	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/088921

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/088921

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110846287	A	28 February 2020	None			
CN	101182494	A	21 May 2008	CN	101182494	B	08 September 2010
CN	107281479	A	24 October 2017	None			
CN	107164335	A	15 September 2017	CN	107164335	B	12 June 2020
CN	107213460	A	29 September 2017	None			
CN	105543180	A	04 May 2016	CN	105543180	B	31 May 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/088921

A. 主题的分类

C12N 7/00(2006.01)i; A61K 39/17(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; C12R 1/93(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

EPTXT;VEN;USTXT;WOTXT;CNABS;CNTXT;CNKI;百度学术搜索;ISI-WEB of SCIENCE;PUBMED:新城疫，毒株，VII，CCTCC V201968，孙化露，newcastle disease，NDV，Sun HL等; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统：对SEQ ID NOs: 1-3的序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110846287 A (青岛易邦生物工程有限公司) 2020年 2月 28日 (2020 - 02 - 28) 参见摘要、权利要求1-7	1-10
X	CN 101182494 A (扬州大学) 2008年 5月 21日 (2008 - 05 - 21) 参见摘要、具体实施方式	1-10
X	CN 107281479 A (普莱柯生物工程股份有限公司) 2017年 10月 24日 (2017 - 10 - 24) 参见摘要、实施例1-6	1-10
X	CN 107164335 A (山东信得科技股份有限公司 青岛信得药业有限公司) 2017年 9月 15日 (2017 - 09 - 15) 参见实施例1-8	1-10
X	CN 107213460 A (山东信得科技股份有限公司 青岛信得药业有限公司) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 参见实施例1-8	1-10
A	CN 105543180 A (山东省农业科学院畜牧兽医研究所) 2016年 5月 4日 (2016 - 05 - 04) 参见摘要、实施例3-4	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 8月 20日	2020年 9月 4日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 周霞 电话号码 86-10-62411098

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/088921

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/088921

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110846287	A	2020年 2月 28日		无		
CN	101182494	A	2008年 5月 21日	CN	101182494	B	2010年 9月 8日
CN	107281479	A	2017年 10月 24日		无		
CN	107164335	A	2017年 9月 15日	CN	107164335	B	2020年 6月 12日
CN	107213460	A	2017年 9月 29日		无		
CN	105543180	A	2016年 5月 4日	CN	105543180	B	2019年 5月 31日