[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 7/00
A61K 39/12

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94191129.2

[45]授权公告日 2002 年 3 月 6 日

[11]授权公告号 CN 1080300C

[22]申请日 1994.1.26 [24]颁证日 2002.3.6
[21]申请号 94191129.2
[30]优先权
[32]1993.2.8 [33]US [31]08/014,915
[86]国际申请 PCT/US94/00951 1994.1.26
[87]国际公布 WO94/18311 英 1994.8.18
[85]进入国家阶段日期 1995.8.8
[73]专利权人 美国拜尔公司
地址 美国宾夕法尼亚州
共同专利权人 衣阿华州立大学研究基金公司
M·C·米兹 E·C·皮尔特尔
[72]发明人 T·桑德逊 M·J·麦金利
J·J·齐默曼 H·T·希尔
M·C·米兹 E·C·皮尔特尔
S·L·施文森 G·P·希布利

[56]参考文献
WO92/21375 1992.12.10 A60K39/12
审查员 孙广秀
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 关立新 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 培养猪生殖和呼吸综合症病毒的方法及其在疫苗中的应用

[57]摘要

一种在易受感染组织培养物中使 PRRSV 生长以使病毒复制达到足 以保护动物抵御 PRRS 或用于诊断 PRRS 或为研制重组产品而鉴定 PRRSV 分子结构的数量的方法,包括将病毒接种到组织培养物上然后收集复制的病毒。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 命名为 ISU－P，保藏号为 ATCC VR 2402 的猪生殖和呼吸综合症病毒(PRRSV)分离物。

2. 命名为 9009B，保藏号 ATCC CRL 11302 保藏的非洲绿猴肾细胞系克隆。

3. 一种在易受感染的组织培养物中使权利要求 1 的 PRRSV 分离物生长，以使病毒复制达到足以保护动物抵御 PRRS 或用于诊断 PRRS 或为研制重组产品而鉴定 PRRSV 分子结构的数量的方法，包括将病毒接种到组织培养物上然后收集复制的病毒。

4. 权利要求 3 的方法，其中的组织培养物包括一种细胞系。

5. 权利要求 4 的方法，其中的组织培养物是一种非洲绿猴肾细胞系。

6. 权利要求 5 的方法，其中的细胞系是权利要求 2 的非洲绿猴肾细胞系克隆。

7. 一种含有权利要求 1 的 PRRSV 分离物的组织培养物。

8. 权利要求 7 的组织培养物，它是以＞25 升的商业规模生产的，$FAID_{50}$ 效价＞$10^{5.0}$/ml。

9. 一种制备能有效保护猪抵御 PRRS 的疫苗的方法，包括提供权利要求 1 的 PRRSV 分离物，从组织培养物中释放该病毒及通过稀释、浓缩或提取调整抗原物质以生产用于修饰了的活的（减毒的）、灭活的、亚单位或重组制剂的一种免疫学有效量的抗原物质。

10. 一种含有权利要求 1 的 PRRSV 分离物的疫苗。

11. 一种按权利要求 9 的方法制备的疫苗，其中的 PRRSV 是修饰的活的（减毒的），并且是一种液体、冷冻的或脱水形式。

12. 权利要求 10 或 11 的疫苗，其中的 PRRSV 是灭活的，并且加有佐剂及可任意选择地含有一种适当的防腐剂。

13. 权利要求 12 的疫苗，其中的佐剂是油基或水基的。

14. 权利要求 13 的疫苗，其中的佐剂选自弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂。

15. 权利要求 13 的疫苗，其中的灭活剂是二元氮丙啶、β－丙醇酸内酯或福尔马林。

16. 权利要求 11 的疫苗，其中的组织培养物是一种非洲绿猴肾细胞系。

17. 权利要求 16 的疫苗，其中的非洲绿猴肾细胞是权利要求 2 的细胞系克隆。

说　明　书

培养猪生殖和呼吸综合症病毒的方法及其在疫苗中的应用

本发明背景

发明领域：本发明涉及一种猪生殖和呼吸综合症病毒（PRRSV）分离物。本发明尤其涉及猪生殖和呼吸疾病的诊断和保护抗原及疫苗，以及获得和使用它们的方法。

现有技术的简要描述：对于美国和欧洲的猪生产者，猪生殖和呼吸综合症作为一种经济上的灾难性疾病迅速出现。该综合症于1987年首先在美国有所描述，二到三年后，在欧洲和加拿大也出现了类似的报道。这种疾病综合症有许多不同的名称，包括神秘猪病、流产胎blau、蓝耳猪病、猪流行性流产和呼吸综合症（PEARS）、猪不育和呼吸综合症（SIRS）。在下文使用“猪生殖和呼吸综合症”（PRRS）这一名称。

已鉴定出能再现此疾病综合症的病原学因子为一种小包膜的球形RNA病毒，病毒粒子平均直径为62nm并含有包膜的25－30nm的核。这种病毒初步归为外衣病毒科Arterivirus属的一种。猪生殖和呼吸综合症病毒（PRRSV）分离物，如本文所述，符合这一初步的分类，并且能再现这种疾病综合症。

与PRRSV有关的这种疾病综合症，其特征在于在成年母猪中的急性和慢性的生殖衰竭；在小猪中能使轻度呼吸疾病恶化。这种生殖衰

竭的特征是后期流产，结果增加了干瘪的、死产的及弱产猪的发生率，从而大大降低了存活率。已描述了在被感染的母猪中，具有推迟发情期等症状的慢性疾病。呼吸疾病的后遗症包括从小猪中的高热及间质性肺炎到轻度上呼吸道征兆（即打喷嚏、咳嗽、鼻涕或眼屎）不等。近年（1990）的血清学及猪群病史研究表明，至少５０％的美国猪群已接触了PRRSV或已经遭受了PRRSV感染的生殖衰竭及呼吸疾病。

由于近来出现了这种疾病综合症，对于该病发病机理、流行病学及控制该病的研究就显得非常有限。由于意识到这个问题，有效繁殖及加工含有PRRSV的抗原将促进PRRSV疫苗的发展，该疫苗有助于预防和控制猪生殖和呼吸综合症。

本发明概述

如前所述，本发明包括一种被称为ISU－P的病毒分离物，其用于制备一种抗原，该抗原可诊断猪生殖和呼吸综合症并能诱导一种对猪生殖和呼吸疾病综合症病毒（PRRSV）的保护性免疫反应。本发明同时也包括获得和使用该抗原的方法。

在本发明的一个实施例中，PRRSV分离物可通过一种方法得到，该方法包括：在３５℃共同培养１０％重量／体积（ｗ／ｖ）的来自感染猪的肺匀浆与原猪肺泡巨噬细胞或连续细胞系培养物分离PRRSV。

本发明进一步包括在特定的细胞系（如非洲绿猴肾连续细胞系（ＭＡ　104）及其特有的克隆衍生物（9009B）以繁殖高效价的该病毒。

本发明还包括制备和使用活病毒或杀死的病毒抗原（常规的或重组体）及由此通过将免疫学有效量的病毒分别与稀释剂和／（或）佐剂结合而产生疫苗的方法。

已发现用活病毒进行直接实验免疫的猪或与活病毒免疫的猪接触，用强毒力的PRRSV进行鼻内攻击后，可预防生殖衰竭。

与未接种的对照猪相比，根据在接种中无病毒复制测量的，发现灭活的加有佐剂的PRRSV可使猪免于PRRS感染后攻击。

本发明的详细描述

如上所述，本发明的目的在于分离PRRSV病毒分离物ISU - P，从而获得可用于疫苗及诊断检测的病毒抗原。ISU - P分离物是从一个弱产猪的肺组织获得。例如，为减少污染的可能性在抗生素补充的基础营养培养基（Minimal Essential Melia）（MFM + A ）中制备10% W／V的肺、脾和淋巴结组织匀浆。粗制的匀浆在4℃，1500×g离心15分钟以使之澄清。澄清上清液用MEM+ A以1 ：5稀释，然后在25 cm^3 烧瓶中将1.0ml的上清液吸附到一个48小时的汇合单层MA 104细胞上或原肺泡巨噬细胞上。在35℃吸附2小时后，用MEM + A洗涤单细胞层两次，接着加入用50%γ－照射的胎牛血清补充的5.0ml MEM + A。病毒分离烧瓶在5%CO_2大气中于35℃培养，并且每天观察是否有病毒致细胞病变作用（CPE）迹象。当5－10个细胞的小病灶开始变成圆时即开始了PRRSV ISU - P的病毒致细胞病变作用，此效应随许多细胞致密化而进一步发展，并在感染4到7天后从底物分离。

用被公称为SDOW 17的PRRSV类特异性的单克隆抗体通过荧光抗体染色证实ISU - P分离物即为一种PRRSV分离物。此外，通过透射式电子显微镜，根据病毒粒子的存在，检测负染色的病毒感染细胞。观察到的病毒粒子是球形的，并且包有平均病毒粒子直径为65nm和核直径为27nm的被膜。以此为特征的组织培养病毒被用于在怀孕的母猪

上试验性再现后期流产及生殖衰竭（表1）。表1表明，接触了 ISU - P－感染的肺匀浆（PRRS - hm）或在细胞培养生长中的ISU -P（PRRS - tc）的怀孕小母猪表现出典型的猪生殖和呼吸综合症的征兆。在PRRS - hm组中，没有一只正常猪产仔。在PRRS - tc组中，33只猪中只有4只生下了正常的小猪。相比之下，未感染的30只猪中，有29只（96.7%）正常产了仔。ISU - P，甚至在组织培养中纯化后，仍然能再现PRRS这种疾病，这一事实证实了将此分离物归为外衣病毒Arterivirus 属是正确的。同时也发现这种分离物在试验性感染的猪上可引起轻度间质性肺炎。

本发明的一个特征是，本发明的PRRSV可以在能有效地复制此病毒的特定的组织培养细胞中生长，以达到足够的水平从而供给掺入至疫苗中所必需的抗原物质，该疫苗可以保护猪和（或）怀孕小母猪或大母猪不受PRRS攻击。例如，PRRSV能够在一种被称为MA 104（由 Whittaker BioProducts得到）的组织培养细胞中生长。在相同的培养条件下，利用从三种不同来源获得的MA 104细胞进行病毒繁殖试验，结果表明，就满足PRRSV复制到高效价的能力而言，在MA 104细胞之间有着高度的可变性。一种被 Miles Inc., Agriculture Division , Animal Health Products Group 称为MA 104(M)的用于在此所述研究中的MA 104细胞培养物，可一直保证PRRSV复制至高效价。而且，一种从MA 104(M)产生的细胞系克隆(由 Miles Inc., Agriculture Division, Animal Health Products Group生产)，命名为 9009B，可以满足PRRSV复制至比亲代细胞系更高的效价。因此，适用于ISU - P生长的组织培养细胞优选地是9009B。以下进一步阐明细胞培养繁殖PRRSV ISU - P 。

组织培养细胞［MA 104(M) 和 9009B］生长并保持在Dulbecco's改性的基础营养培养基、高葡萄糖（DMEM／HG）中，用5%胎牛血清补充同时用1.3g／l的碳酸氢钠缓冲处理。由足够的细胞数进行细胞传代以在48小时内达到80－100%的汇合单细胞层。在用PIPES缓冲至pH6.8的 DMEM／Hg＋5%胎牛血清中稀释PRRSV ISU－P病毒母液。将病毒以低复合感染（MOI）接种到细胞板上并在36℃培养。每日观察被感染的培养物的CPE 4－7天。当CPE明显为90－100%时，收集被感染的培养物。在一个－70℃凝固／融化循环后，即可获得最大量的病毒抗原。从MA 104(M)细胞中繁殖得到的平均病毒效价为$10^{3.0}$到$10^{4.5}$荧光抗体感染剂量$_{50}$／ml($FAID_{50}$／ml)。在9009B细胞克隆繁殖得到的病毒效价为$10^{5.5}$到$10^{6.5}FAID_{50}$／ml。这种范围的效价有可以将足够的抗原掺入到体积远大于50L的商业规模的PRRSV疫苗制剂中。

本领域的专业人员应意识到，一旦PRRSV能增殖到高水平的抗原物质，根据本发明同样有效的这种病毒的衍生物，包括其亚单位，可以通过本领域已知的方法，如从病毒中提取来获得。此外，保护性抗原可在分子水平鉴定，并且可利用重组技术再生产和表达。

疫苗组成中的病毒液可用两种方式灭活。所选的灭活剂是福尔马林和二元氮丙啶（BEI）。通过本文更详细描述的方法进行灭活。福尔马林灭活是通过将病毒液与37%甲醛母液混合成终浓度为0.05%的福尔马林来完成的。福尔马林－病毒混合液置于室温（约25℃），持续混合24小时。在0、8、12和24小时时取样，并检测9009B细胞中的活病毒。病毒致细胞病变作用和用类特异性单克隆抗体的荧光染色法只在时间为0小时时检测活PRRSV。

用BEI进行灭活是通过将常备的0.1M BEI母液（20.5 g／l 2－溴代－乙胺 HBR于0.175N NaOH中）与病毒液混合成终浓度为1.0M的BEI来完成的。通过把BEI－病毒混合液于室温持续混和48小时而进行灭活。加入1.0M硫代硫酸钠至终浓度为0.1mM，混合2小时以终止病毒灭活。于0、2、4、8、12、24和48小时时取样，如上所述检测活病毒。仅在时间为0、2和4小时时检测活PRRSV。

在制备本发明的修饰的活的或减母疫苗中，将PRRSV修改，从而使之仍可以有限的但在宿主中不引起疾病的征兆的方式感染宿主，一般地，这种病毒的修改是使之通过一种非宿主细胞（如非洲绿猴肾细胞）传代来进行的。最初，病毒生长的不太好或甚至不生长。在后者的情况下，需要强制该病毒在细胞培养物中适应生长。可通过将该病毒以高复合或低复合感染（MOI）加到细胞培养物中来达到这一目的。或者，该病毒可随细胞一起强制传代或盲目传代直到观察到病毒致细胞病变作用，这样就表明病毒已被适应。一旦适应后，当PRRSV分离物ISU－P从MA 104（M）细胞系传代至9009B细胞系时，就可观察到病毒效价的增高。表1表明，用组织培养物传代的PRRSV ISU－P（PRRS－tc）比来自肺匀浆分离得的毒性低，这是一种典型的适应结果。表2公开的数据说明，依照本发明制备疫苗的方法在预防PRRS侵害方面尤其有效。

灭活的PRRSV ISU－P带有如下佐剂。灭活病毒液的佐剂选自弗氏完全佐剂（FCA）、弗氏不完全佐剂（FIA）、carbopol基佐剂及Diamond Scientific Adjuvant（Adj B）。这些佐剂是用于疫苗生产中的主要类型。主要成分为油的佐剂代表为FCA，FIA和ADJB。主要成分为水的佐剂代表为carbopol。灭活的PRRSV ISU－P可任意选

择地含有适当的防腐剂。

制备的，一般是用一个18规双路厄塞仪和两个注射器以等体积的灭活病毒液和佐剂，通过乳化灭活病毒制备含有FCA和FIA的疫苗制剂。通过注射器间的装置不断压出液体，直至形成一个稠的半固体乳剂。此乳剂直接装入注射器来使用。

通过将Adj B母液与等体积的灭活PRRSV ISU - P 病毒液混合制备含有Adj B的疫苗制剂。在室温下通过搅拌1小时混合佐剂和病毒。含有佐剂的疫苗无菌转移至无菌多剂量小瓶中，并且在使用前贮存于4℃。

通过将carbopol佐剂母液与灭活病毒液混合至佐剂终浓度为10% v/v来制备carbopol基的疫苗。在室温下通过搅拌4小时混合佐剂和病毒。含有佐剂的疫苗无菌转移至无菌多剂量小瓶中，并且在使用前贮存于4℃

灭活前效价为$10^{5.0}$ $FAID_{50}$／ml这样低的PRRSV ISU - P 可用于上述各种疫苗制剂。

为表明PRRSV分离物ISU - P 可以预防猪生殖和呼吸综合症，进行两项接种／攻击研究。在第一项研究中，用活PRRSV ISU - P 经直接的途径或与病猪接触，通过口鼻接触病毒免疫4只小母猪。两只同龄小母猪不被免疫（不被接触）并且分开畜棚来用作对照。在鼻内注入3.0ml的病毒接种物进行直接接种（＃57和＃58）。接触后到第14天为止，按照间接荧光抗体试验，它们发生血清转化。接触感染的小母猪（＃476和＃480）在与病猪紧密接触后，通过口鼻途径被免疫。接触后，经过90天发生血清转化。IFA效价远大于1：20时即表明发生血清转化。

被免疫的小母猪发生血清转化后，将它们的发情期进行并列对照，并且进行饲养。利用超声波证实是否怀孕。在妊娠第90天，接种和对照组的怀孕小母猪鼻内接受3.0ml效价为1×10^4 $FAID_{50}$的PRRS攻击病毒。

对照组小母猪#52和#477显示出疾病的早期征兆，因为攻击后2－3天它们食欲下降同时体温升高(103－104° F)。在ISU－P接触（接种）的小母猪中没有观察到疾病的任何临床征兆。这些结果证实了对于临床呼吸疾病综合症的保护作用。

直到断奶（产仔后4星期），一直保留所有的母猪。表2表示本实验的产仔结果。

以妊娠期（通过PRRS感染，妊娠期一般变短），死产或死胎，弱猪或干瘪猪来记录产仔结果。这些产仔障碍表明了怀孕小母猪或大母猪的PRRS感染症兆。此外，记录正常猪的数量。

对照组小母猪没有一个产下正常小猪（22只猪中0只正常）。22只小猪中，7只为死产，15只为弱产小猪。对照组小母猪的妊娠期缩短了2.5天，这在怀孕猪中为典型的PRRS。在免疫组中（n＝50），40只小猪或80%的小猪为顺产。50只小猪中，6只为死产，产仔过程中有4只显得干瘪。在接种组中没有弱产小猪。很显然，饲养然后攻击先前用活PRRSV ISU－P 接触的母猪，根据母猪中无疾病的直接临床征兆和对它们所怀胎儿的保护作用表明的保护其免于攻击。

应认识到，因为本研究中用于研究母猪血清状态的IFA试验试剂是由PRRSV ISU－P 衍生而来，并且由于母猪的血清状态与免受PRRS侵害之间有着直接的联系，PRRSV ISU－P 分离物可用于诊断性试验，

如本文所述的间接荧光抗体试验，ELISAS，血清中和试验、直接荧光抗体试验和其它本领域已知的诊断性试验。因此，由抗原（从PRRSV ISU - P 获得）衍生而来的诊断检测物可以按照本发明制备并使用。

在第二项接种／攻击研究中，用几种灭活的，含有佐剂的PRRSV ISU - P 疫苗接种小猪（年龄为 4 到 6 周）。一种疫苗抗原池是通过用先前所述的BEI将PRRSV ISU - P 灭活，并使用Carbopol，FCA/FIA或Adj B作为佐剂制备而得。第二种疫苗抗原池是用先前所述的福尔马林灭活PRRSV ISU - P ，并使用同样 3 种佐剂制备而得。制备 3 种模拟疫苗以确定佐剂和细胞不会刺激假的免疫应答。通过在未感染的组织培养细胞中加入佐剂而制备模拟疫苗。用每个疫苗接种两只猪。在第 0 、 2 1 、 4 2 和 6 4 天，皮下施用疫苗。最后一次接种后的 7 天，用 $10^{3.5}FAID_{50}$ 的毒性活PRRSV对猪进行鼻内攻击。攻击后，每天观察所有的猪是否有疾病的临床征兆。此外，取血样并在组织培养中进行病毒培养。攻击后，在血流中发现了活病毒，这表明已发生了病毒血症。

在研究的开始，攻击的当天及攻击后 1 9 天评估血清中和效价。应注意，血清中和试验不如前面研究中所使用的IFA试验灵敏。因此，不能将这些效价的结果与前面的效价结果相比较。

表 3 列出了攻击的结果。在接种过或对照组的猪中没有观察到疾病的临床征兆。此外，在接种期间，接种组或对照组都没有产生血清中和效价。这表明，在此期间没有接触到活病毒（对照组仍为阴性），同时也表明，该疫苗没有刺激体液应答达到能用血清中和试验测得的水平。攻击后血清中和效价应答很显著，这表明所有的猪均可用活PRRS病毒有效地攻击。能证实这种攻击接触是发生病毒血症的对照组

猪的百分数。除1只外，对照组的猪（87.5%）都被感染。在接种的猪中，免疫应答是如此强烈以至于能够阻止病毒血症。12只接种的猪中，只有1只（8.3%）显示了病毒血症。因此，该疫苗保护了91.7%的猪。

不受本发明任何特殊的理论的约束，应相信，通过MA 104(M)非洲绿猴细胞（9009B）的一个特异适应的克隆，进行原始PRRSV分离物的强制传代可以成功地改变一个或多个此病毒的表面抗原决定簇，结果增加了此病毒的免疫原性，从而可以在其他科学家失败的领域进行疫苗的生产。

表　1：后期流产的生殖和接触了PRRSV分离物ISU-P的猪的生殖衰竭，与未接触的对照组猪相比较

I. PRRS　接触组

猪 #	妊娠期(a)	病毒制剂	死产	弱	干瘪	正常
57	112 天	PRRS-hm[b]	6	8	0	0
54	108 天	PRRS-hm	6	1	0	0
649	112 天	PRRS-hm	3	7	0	0
58	112 天	PRRS-hm	4	4	3	0
166	112 天	PRRS-tc[c]	0	2	6	1
164	113 天	PRRS-tc[d]	2	2	5	1
80	110 天	PRRS-tc[e]	2	2	2	2
总数			23	26	16	4

a = 正常猪妊娠期是114天
b = PRRSV阳性限菌猪肺匀浆接种物
c = 由PRRSV衍生物的组织培养，每ml $10^{3.0}$荧光抗体感染量50(FAID 50/ml)
d = 由PRRSV衍生物的组织培养，$10^{4.0}$ FAID 50/ml
e = 由PRRSV衍生物的组织培养，$10^{5.0}$ FAID 50/ml

11. 未接触的对照组

猪 #	妊娠期(a)	病毒制剂	死产	弱	干瘪	正常
52	114 天	无	0	0	0	11
56	115 天	无	0	0	0	12
163	116 天	无	1	0	0	7
总数			1	0	0	30

表　2：ISU－P免疫的及非免疫的猪的产仔的结果

猪号	IFA 效价	妊娠期	死产或死胎	弱猪	干瘪	正常
57v	+	113 天	2*	0	0	7
58V	+	114 天	4	0	3	11
476V	+	113 天	0	0	1	10
480V	+	114 天	0	0	0	12
52 C	-	111 天	5	7	0	0
477	-	112 天	2	8	0	0
总数			6 vacc. 7 cont.	0 vacc. 15 cont.	4 vacc. 0 cont.	40 vacc. 0 cont.

＋：表示IFA效价＞２０
－：表示IFA效价＜２０
Ｖ：表示接种组
Ｃ：表示对照组

表　3：PRRSV灭活疫苗试验总结

疫苗组		平均SN 每次攻击	平均SN 攻击[a]后	病毒 分离[b]
BEI, PRRS-Carbopol	n = 2	<1:2	1:82	阴性／阴性
BEI,PRRS-FCA/FIA	n = 2	<1:2	1:4	阴性／阴性
BEI,PRRS- AdjB	n = 2	<1:2	1:5	阴性／阴性
福尔马林,PRRS-Carbopol	n = 2	<1:2	1:23	阴性／阴性
福尔马林,PRRS-FCA/FIA	n = 2	<1:2	1:2	阴性／阴性
福尔马林,PRRS-AdjB	n = 2	1:3	1:8	阴性／阴性
模拟疫苗组				
模拟 AG - carbopol	n = 2	<1:2	<1:2	阳性／阳性
模拟 AG - FCA/FIA	n = 2	<1:2	<1:2	阳性／阳性
模拟 AG - AdjB	n = 2	<1:2	<1:2	阳性／阳性

a = 攻击后第19天实验的终止时的SN应答
b = 在19天的攻击后试验期间内的任何时间，来自血浆的病毒分离物。通过在9009B细胞CPE检测的病毒分离物和用与PRRSV类特异性单克隆抗体SDOW17相同的FA染色法确定。

为阐明本发明的目的，尽管在前文详细描述了本发明，应理解这些细节只是为了说明该目的，本领域的技术人员可以在不偏离本发明的精神和范围内做一些变动。除非在权利要求中已被限制。