[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12N 7/00
A61K 39/165

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 94194807.2

[43]公开日 1997 年 5 月 28 日

[11] 公开号 CN 1150819A

[22]申请日 94.11.15

[30]优先权

[32]93.11.19[33]GB[31]9323820.2

[32]94.3.31 [33]GB[31]9406480.5

[86]国际申请 PCT/EP94/03801 94.11.15

[87]国际公布 WO95/14083 英 95.5.26

[85]进入国家阶段日期 96.7.10

[71]申请人 史密斯克莱·比奇曼生物公司

地址 比利时里克林萨斯

[72]发明人 奈杰尔·M·哈福德

布里格特·D·A·科劳 让·迪德莱兹

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 含有JERYL-LYNN病毒株的抗流行性腮腺炎疫苗

[57]摘要

本发明提出了一种新的流行性腮腺炎疫苗，它包括从腮腺炎病毒的 Jeryl-Lynn 株衍生来的一种均一纯化分离株。本发明优选实施方案中这种疫苗产生的血清转化率和抗体滴度都比已知的商品化疫苗要高。

权　利　要　求　书

1、一种减毒 Jeryl - Lynn 腮腺炎病毒株，其特征在于，SH 基因和 HN 基因的 N - 末端包含图 1 所示的核酸序列 。

2、一种腮腺炎疫苗，它含有基本上均一免疫原性的 Jeryl - Lynn 分离株。

3、如权利要求 2 所述的腮腺炎疫苗，它包含权利要求 1 的均一分离株。

4、一种联合疫苗，它含有基本上均一免疫原性的 Jeryl - Lynn 分离株和一种或多种减毒麻疹病毒、或减毒风疹病毒或灭活的麻疹或风疹病毒，或是这些病毒的亚单位。

5、如权利要求 3 或 4 所述的疫苗，另外还含有一种药剂以提供抗水痘或带状痘疹感染的保护。

6、一种生产基本上均一免疫原性的 Jeryl - Lynn 分离株的方法，此方法包括：

在适当细胞系上对 Jeryl - Lynn 制品传代；

用以下任意一个步骤筛选纯培养物：

a)有限稀释；或

b)单个空斑分离。

7、一种均一免疫原性的 Jeryl - Lynn 分离株在医药中的应用。

8、一种在易于感染腮腺炎的哺乳动物体内诱导免疫力的方法，它包括给哺乳动物施用有效量的根据权利要求 2 - 5 中任一项的疫苗。

说　明　书

含有 JERYL - LYNN 病毒株的抗流行性腮腺炎疫苗

流行性腮腺炎基本上是一种儿童患疾病，通常只有轻微的临床症状。但某些病例中流行性腮腺炎感染的临床结果是严重的。例如，在英国流行性腮腺炎是 15 岁以下儿童患脑膜脑炎的最常见病因，也是儿童永久性感觉神经性耳聋的一个病因。尽管 30 ~ 40 %的自然腮腺炎感染不出现症状，但会累及唾液腺，而且在成年人群中，除了上面提到的神经性并发症外，流行性腮腺炎还会导致第一个三月期流产和睾丸炎，这些都是勿容置疑的事实，它使许多国家都施行了人群预防接种的计划。

属于副粘病毒科的腮腺炎病毒由一条单链基因组 RNA 构成，该 RNA 为负链，约 15.3 kb，基因顺序是：3'N - P - M - F - SH - HN - L5'(N 为核衣壳蛋白，P 为磷蛋白，M 为基质蛋白，F 为融合蛋白，SH 为有潜在表达性的一种小疏水性蛋白，HN 为血凝素神经氨酸酶，L 为大蛋白)。在众多腮腺炎病毒株中，Jeryl - Lynn(B - 水平)是一种减毒活变种，经序列分析，它携有 F，P，HN，M 基因。

到最近为止，已批准的用于抗流行性腮腺炎预防接种的腮腺炎病毒株有两种：Urabe Am 9 和 Jeryl - Lynn。但 1992 年 9 月，在报道的一个事例中其副作用达到无法接受的程度[European Journal of Pediatrics(1993)152:387]后 Urabe Am 9 被取消。

Jeryl - Lynn 病毒株多年来一直由 Merck Sharp and Dohme 以“MumpsVax”的商品名售出。它是从一例患流行性腮腺炎的病人身上取得临床标本，经鸡胚羊膜接种而得的(Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.123(3)(1966))。

Afzal 等人最近报道(J.of Gen.Virology 1993 74 917)说在英国用作腮腺炎疫苗的 Jeryl - Lynn 病毒株事实上是两种毒的混合物，这两种病毒的名称是 JL - 2 和 JL - 5。

Takeuchi 等人在 Virology(1991)181 p364 - 366 也报道说不同的腮腺炎病毒株在 SH 基因水平上会产生实质性的核苷酸序列的变异。

Afzal 等人还强调目前商品化的“MumpsVax”疫苗是在严格控制的条件下制备出的，这些条件包括一个细胞库，有传代限度，以及可能在不同批的产品之间保持两种病毒的均衡比例的条件。然而随着 Jeryl - Lynn 株的进一步传代，无法保证能继续维持两种病毒间的平衡。而且也很难估计这两种病毒在任何一批疫苗里的比例。

本发明人意外地鉴定出一种完全不同于 Afzal 等的 JL - 2 和 JL - 5 的进一步的分离物。经核苷酸序列分析测知，它们的不同之处是在 SH 基因及其周围区域，

特别是 SH 编码序列的 3'端和 NH 基因 5'端的非翻译的基因间区段。这种分离物在临床试验中能诱导出比商品化的腮腺炎有效疫苗更高的零转化，而且它诱导出的腮腺炎抗体的几何平均滴度达到了最高值。

因而本发明人提供出一种减毒 Jeryl - Lynn 腮腺炎病毒株，它包含如图 1 所示的核苷酸序列。这个序列能编码 SH 基因以及 HN 基因的 N 末端片段。这种病毒株在本文中被称为 SBB JL - 1。

在图 1 中，显示的是 JL - 1 腮腺炎病毒分离物的 cDNA 序列，它覆盖了 SH 基因编码区以及 SH - HN 基因间区段。

本发明还提供了一种腮腺炎疫苗，它包括基本上均一的免疫原性的 Jeryl - Lynn 分离株。

所谓基本上均一是指这种分离株被由上述序列区段定义的其他 Jeryl - Lynn 分离株的污染程度不超过 10 %，优选少于 5 %，更优选少于 1 %。在本发明的一个较优选实施方案中，该疫苗包含一个纯系 Jeryl - Lynn 分离株，即它没有其它 Jeryl - Lynn 腮腺炎病毒分离株的污染，该其它 Jeryl - Lynn 分离株在前面图 1 所示的基因区段内不相同。

本发明的实施方案之一提供了一种疫苗，它包含无 JL - 2 污染的纯系 SBB JL - 1。

这种纯化的分离株不会有亚毒株之间因不同批生产而潜在的差异所带来的不便，并提供一种更易保证安全性符合质量标准的产品。

根据本发明，纯系 Jeryl - Lynn 可以是通过把商品 MumpsVax 在鸡胚成纤维细胞(CEF)中传代，再经有限稀释并对所得分离物检测，或经单个空斑分离，而筛选出纯培养物才得到的。其它合适的细胞系包括 Vero 细胞和 MRC5 细胞。这就要求存在能有效检测出群体中较小比例的已知病毒变异株的方法。这类检查方法包括由 Chumakov 等人提出的针对减毒的脊髓灰质炎病毒的 Maprec 检测(WO 92/07958 和 PNAS 1991， 88; 199 - 203)，还有直接对病毒空斑进行测序和对病毒空斑的差异杂交。

本发明的疫苗其有利之处还在于它可包含其它成分，诸如减毒麻疹病毒，和/或减毒风疹病毒(或是灭活病毒或其亚单位)，从而能抗麻疹和/或风疹感染。三价的腮腺炎、麻疹和风疹疫苗在本领域已广为人知，本发明中的腮腺炎分离株也可与现有疫苗相似的方式配制成三价疫苗。另外本发明的疫苗还可包括一种减毒的话的水痘 - 带状疱疹病毒，从而提供针对水痘或带状疱疹的免疫保护。在一个优选实施方案中，水痘 - 带状疱疹病毒是由 Andre F E Postgraduate MED J.(1985)61(Suppl.4), 113 - 120 或是 Veskari T 等人于 Acta paediatr. Scand. 80:1051 - 1057， 1991 所公开的 OKa 株。优选的本发明的疫苗是四价的，能提供针对腮腺炎病毒，风疹麻疹病毒和水痘 - 带状疱疹病毒的免疫保护作用。

本发明还提供了制备全病毒疫苗的方法，例如用冻干法将病毒保存在合适的稳

定剂中，或用合适的载体、佐剂与本发明的病毒株混合。另一有利方面是可以在脂质体中或是用载体颗料配制本发明中的病毒株。此外，在配剂中还可加入免疫刺激物，如 3 －脱氧酰基化的单磷酰类脂 A(Ribi Immunochem)或是皂素衍生物 QS21 (Cambridge Biotech)。

另一方面，本发明还提供了一种治疗人类流行性腮腺感染的方法，包括给必须进行治疗的病人服用有效免疫剂量的本发明的疫苗。

施用本发明疫苗的方式可以是通过任一种合适的途径，通过该途径将免疫保护量的病毒株和其它免疫诱导成分释放给受体。不过疫苗的最好用法是非肠道式，经肌肉或深部皮下途径。当然根据需要其它用药方式也可采用，如口服或经其他非肠胃途径，即皮内、鼻内、静脉。

此种疫苗的既能提供免疫保护作用又无毒的适当剂量可以由本领域的技术人员很容易地测定出来，意即，本发明的疫苗中所含有的既引起免疫保护又无毒性的病毒量可能是在传统的全病毒疫苗所含有的有效抗原量的范围之内。不管怎样，应该可以理解到，任何一个特定病人的特定剂量水平将取决于多种因素，包括年龄，总体健康水平，性别和饮食；用药的时间，用药的途径；与服用的任何其他药物的协同效应；以及想要达到的保护反应程度。当然，如果需要的话，可以以适当的间隔重复施用。在单价疫苗中较典型的是每剂至少 3.7 log $TCID_{50}$ 的病毒，而更常用的是每剂 4.5 log $TCID_{50}$。在三价的腮腺炎、麻疹、风疹疫苗中，腮腺炎病毒成分将达到 4.8 log $TCID_{50}$ 左右，以补偿其他两种病素成分的干扰。

实施例

1)对 SH 基因的初步测序

在 25 cm^2 的培养瓶内生长的融合单层 Vero 细胞上，用 dMEM Biorich 培养基(50/50 V/V)加 0.5 % 胎牛血清，对商品 MumpsVax 病毒以约 3.0 log $TCID_{50}$ 的接种量进行传代。 34 ℃温育 7 天后收获受感染的细胞，用 Ferre'和 Garduno(Nucleic Acids Research 1989, 17； 2141)的方法提取的 RNA 置于 100 mcl 水中，用二乙基焦碳酸盐于 100 ℃处理 5 分钟。取 5 mcl 这样的提取物加入以下试剂进行逆转录：RNAsin(RNA 酶蛋白抑制剂)40 单位(Boehringer Mannheim,Germany)， 4 mcl 五倍浓缩的逆转录酶缓冲液(Bethesda Besearch Labs)， 2 mcl 四种脱氧核苷三磷酸的混合物浓度为 10 mM， 10 pmole NH2 的寡核苷酸引物， 1 mcl Moloney 鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶(Bethesda Research Labs, 每 mcl 200 单位)，最后加水使终体积为 20 mcl。寡核苷酸 NH2 与腮腺炎病毒 Urabe 株的 F 基因具有同源性。将混合物在 37 ℃温育 45 分钟后，于 95 ℃加热 5 分钟，得到的 cDNA 经连续两轮的 PCR 反应，以寡核苷酸 NH8 和 NH14 作引物进行扩增，用 1 mcl 1000 倍稀释的第一轮反应物作为第二轮反应的起始物。每轮 PCR 由 25 个循环组成，每个循环均是 94 ℃加热 1 分钟， 53 ℃加热 1 分钟， 72 ℃加热 1 分钟。在有氟二脱氧核苷酸终止物和以 NH8 或 NH14 作引物的情况下进一步进行 PCR 扩增，其产物用 Applied Biosystems 自动

测序仪(373A DNA Sequencer)按仪器配有的操作程序和说明进行分析，从而从两个方向对相应于 SH 基因的 PCR 产物进行测序。发现在基因序列中有好几处无法读出，用两条链的序列进行印证。所得序列与 Takeuchi 等人(Viroloy 1991， 181:364 - 366)从 Jeryl - Lynn 病毒株得到的基团序列相比在 361 个碱基中有 17 个不同，其中包括 4 个未确定碱基。所得基因序列与分 Afzal 等人(J.Gen.Virol. 1993, 74; 917 - 920)从他们的 JL - 5 分离株中得到的基因也有部分差别，319 个碱基中有 9 个不同，其中有 4 个未确定碱基。若不经 Vero 细胞传代，而是直接用超速离心收获 4.0 ~ 5.0 log $TCID_{50}$ 的 MumpsVax 病毒，再将这些病毒的 RNA 以随机引物逆转录出 cDNA，然后以寡核苷酸 NH 30 bis 和 NH 31 bis 作引物进行 PCR 扩增，那么对同一区段的测序还是会发现有无法读出的片段。

2)SH 基因的克隆

用 MumpsVax 病毒感染 Vero 细胞，再按上述方法制备总 RNA 。以随机引物逆转录这种 RNA，并用寡核苷酸 NH22 和 NH23 作引物进行 PCR 扩增。(NH22 内有一 Hind III 限制位点， NH23 内有一个 BamHI 限制位点，从而便于对扩增的 DNA 片段进行克隆)。将扩增的 DNA 用 HindIII 和 BamHI 这两种限制性核酸内切酶切割后克隆到载体 pUC9 上。最后得到 11 个克隆，各有一个相应于腮腺炎病毒 SH 基因区段的插入子。所有 11 个克隆所具有的序列与 Takeuchi 等的(在上述引文中)相当。此外，有 5 个克隆有一 DdeI 酶切位点，而其它 6 个克隆没有。未发现哪个插入子与 JL - 5 序列相应。这个结果，以及序列无法读出都暗示：由 Afzal 等人鉴定出的 JL - 2 病毒变异体是 MumpsVax 病毒中的一个重要或容易检测的部分。

3)直接从 MumpsVax 传代

MumpsVax 也直接在鸡胚成纤维细胞(CEF)上传代。病毒是从不同的 5 批细胞的第三代培养中回收的，这 5 批包括 1 批 MJ05，它被用来制备 MJ05A42 的冻干样品，以便注射动物。将这 5 种病毒制备物感染 Vero 细胞，回收 RNA，按上述方法以 NH8 和 NH14 作引物扩增以备 DNA 测序，唯一不同的是用随机引物启动逆转录反应。所有 5 批病毒均显示出与 JL - 2(Takeuchi 等人)相同的序列，而且没有无法读出片段。

为了更进一步调查这一点，按上述方法对病毒空斑做了直接测序。将 5 批病毒分别感染 Vero 细胞培养物，得到的空斑都用 NH30bis 和 NH31bis 作引物进行了加工处理以备测序。 5 批中测了总数为 26 个的空斑，其中 13 个空斑有与 Takeuchi 等的 JL - 2 序列相同的序列； 5 个空斑给出与 JL - 5 非常相似的序列，只有在第 270 和 279 位置上的两个碱基有差别，如图 2 所示；有 8 个空斑的序列有无法读出之处，暗示它是病毒混合物。

4)对病毒空斑的直接测序

三种 MumpsVax 病毒稀释液，分别每份每 0.50 ml 约有 100, 50 和 10 个病毒颗粒。在 5 cm 的 Petri 细菌培养皿中已长好的融合单层 Vero 细胞弃去培养液，用不

含血清的 dMEM Biorich(50:50 V/V)培养液(Biorich)洗后，用三种不同稀释度的病毒液感染。在 34 ℃进行病毒吸收 30 分钟。用保持 42 ℃温度的琼脂覆盖细胞，琼脂层包括 2.5 ml dMEM Biorich 培养液，内含 0.5 % 胎牛血清，及 2.5 ml 3 % (W/V)的低胶化温度琼脂糖。固定后，琼脂层又用 3 ml dMEM Biorich 培养液(含 0.5 % 胎牛血清)覆盖，并在 34 ℃温育。温育 7 天后，弃去表面的液体培养基，加 0.03 % (W/V)中性红溶液扩散 1 小时后，就可见到空斑。然后去掉液体和琼脂，将一张干尼龙滤纸用手指压在培养皿的底部。加数滴 2x SSC 浸湿滤纸再提起滤纸。通过将它浸泡在 2x SSC 中 5 分钟，再浸泡在含 0.2 % (W/V)SDS 的 2x SSC 中 30 分钟，然后暴露在紫外光下 3 至 5 分钟，病毒就被固定在滤纸上。从尼龙滤纸上剪下 20 个独立的空斑，将这一片片的膜浸在 100 mcl 水中，加 1 mcl RNAsin(RNA 酶蛋白质抑制剂)(Boehringer Mannheim, 40 单位)后 65 ℃加热 30 分钟。将这 100 mcl 的液体转移到新试管里，加 10 mcl 3M 的醋酸钠，再加 250 mcl 乙醇，核酸就被沉淀出来。此混合物在离心前先于 - 20 ℃过夜或于 - 70 ℃放置 1 小时。离心后的沉淀物干燥后，加入以下溶液进行逆转录： 4 mcl 5x 浓缩的逆转录酶缓冲液(Bethesda Research Labs)， 2 mcl 0.1 M 二硫苏糖醇 1 mcl 混合脱氧核苷三磷酸(Perkin Elmer - Cetus, 10 mM 浓度)， 1 mcl N_6 随机引物寡核苷酸(New England Biolabs,浓度为每 ml 100 mcg)， 11 mcl 水。然后加 1 mcl MMLV 逆转录酶， 37 ℃温育 1 小时后 95 ℃ 5 分钟。取此混合物 10 mcl，加寡核苷酸引物 NH 30 bis 和 NH 31 bis 各 500 ng 和 PCR 缓冲液，还有 1 mcl Stoffel DNA 聚合酶(Perkin Elmer - Cetus, 10 μ g/mcl 浓度)至终体积为 100 mcl 。将此混合物加热 30 个循环，每循环于 95 ℃ 1 分钟， 60 ℃ 1 分钟， 72 ℃ 1 分钟。最后的片段用 Magicprep 试剂盒(Promega Biotech A7170)照其说明进行纯化。在以 NH30bis 或 NH31bis 作引物，以氟二脱氧核苷酸为终止物对逆转录所得的 cDNA 完成不对称的 PCR 扩增,并在 Applied Biosystems(373A)自动测序仪上用厂家提供的方法和反应物进行非放射性测定，而进行测序。这 20 个空斑(MumpsVax)中，发现有 19 个与 Takeuchi 等人(上述引文)的 JL - 2 序列的 275 个碱基中的 11 个碱基不同，与 Afzal 等人(上述引文)的 JL - 5 序列上的 2 个碱基不同。有 1 个空斑无法读出其序列。该结果暗示： MumpsVax 在这个区段内可能包含一个或多个不同于 Afzal 等发现的 JL - 5 优势株的变异体。 JL - 5 与空斑序列不同的两个碱基经测序是在 279 和 290 的位置，位于 SH 和 HN 编码区之间的基因间区段。

5)空斑杂交

为了更直接测定 MumpsVax 及其衍生培养物中 JL - 5 和 JL - 2 型变异株的比例，采用了一种空斑杂交方法。以 MumpsVax 病毒和传代的 MJ05 病毒感染 Vero 单层细胞，得到空斑，印到尼龙膜上，按前述方法固定核酸。尼龙滤膜先在 200 ml 下列溶液中于 65 ℃预杂交 3 小时： 5x SSC(SSC 是 0.15 M 氯化钠 0.01 M 柠檬酸钠 pH 7.2)， 10x 浓缩的 Denhardts 溶液(它是 0.2 % W/V Ficoll 400， 0.2 % 小牛血清，

0.2 %聚氯乙烯， 0.1 %(W/V)SDS，鲑精 DNA 每 ml 50 mcg。然后在 50 ml 与前述溶液成分相同的溶液中于 65 ℃温度和轻微振荡 2.5 小时并加入预热至 65 ℃的加放射性探针和冷的竞争探针溶液，进行杂交。用作变异体特异性探针的寡核苷酸是 BC 252(能与 JL - 5 变异体杂交)和 BC 253(能与 JL - 2 变异体杂交)。它们都要在包含下列成分的溶液中激活而标记上 gamma ^{32}P - ATP： 100 ng 待标记的寡核苷酸， 3 mcl 10x 浓缩的激酶缓冲液(包括： 0.5 M Tris - HCl pH7.6, 0.1 M $MgCl_2$，50 mM 二硫苏糖醇， 1 mM 亚精胺和 1 mM EDTA pH8.0)， 3 mcl ^{32}P - ATP(Amersham International, 3000 Ci/nmole, 10 mCi/mcl)和 2 mcl T_4 多核苷酸激酶(Boehringer Mannheim)，用无菌水补足 30 mcl。此混合溶液于 37 ℃温育 30 分钟后，在 95 ℃加热 5 分钟终止反应，然后加入重量比为 100:1 的冷竞争寡核苷酸探针，即每 100 ng 标记探针要加 10 mcg 冷竞争寡核苷酸，然后将混合物加入杂交溶液中。杂交完成后，尼龙膜用 100 ml 与杂交溶液成分相同的溶液于 65 ℃ 30 分钟洗涤一次，再在 65 ℃用 100 ml 下述溶液洗 2 个 30 分钟： SSC 5x， 0.1 % SDS。然后干燥尼龙膜，用增感屏在 X - 射线胶片上曝光。当 MumpsVax 用这种技术检测时，相比较于与 BC 253 的杂交，有大大过量的空斑是与 BC 252(JL - 5 特异的)杂交的。当检查 MJ05 时，虽然与两种探针杂交的空斑数基本相等，但与 BC253 的杂交要比 BC252 的杂交相对多一点。

6)对纯 Jeryl - Lynn 分离株的纯化

为获得纯的 JL - 5 和 JL - 2 变异体分离株，将一份标明滴度为 4 - 6 log $TCID_{50}$ 感染单位的商品化 MumpsVax 样品(批号 92A06，来自 Merck Sharp and Dohme，存放在Public Heath Laboratory Services, Porton Down, Wiltshire, UK, 登记号为 Jeryl - Lynn Mumps strain: V93110585, 1993 年 11 月 5 日)进行有限稀释，然后在 96 孔微滴板上以约每孔 0.1 感染单位的接种量感染鸡成纤维细胞。96 孔板在 34 ℃温育 11 天以使病毒增殖。全部 192 个接种孔中有 17 孔出现细胞病变效应，说明有病毒生长。将这些孔进一步接种到 CEF 细胞培养物中。把滴度约为 4.9 log $TCID_{50}$ 的第二次传代后的病毒制备液经 0.8 μ m 滤膜过滤， 42,000 rpm 离心 1 小时，并将沉淀 100 mcl 水重新悬浮进行该病毒分离株的鉴定。加入 1 mcl 核酸酶抑制物(Boehringer Mannheim, 每 mcl 40 单位)， 65 ℃温育 30 分钟，再加 1/10 体积的 3M 醋酸钠(pH 4.5)，和 2.5 倍体积的乙醇。- 20 ℃沉淀过夜或 - 70 ℃沉淀 1 小时，然后在 Eppendorf 台式离心机中 4 ℃离心 30 分钟，将沉淀干燥。

所获的病毒 RNA 沉淀加入 20 mcl 下面的混合物进行逆转录： 4 mcl 5x 核心 RT 缓冲液(Bethesda Research Labs)， 2 mcl 10 nM 脱氧核苷三磷酸混合物(Perkin Elmer, Cetus)， 1 mcl 随机引物 N_6(Biolabs, 100 mcg/ml)， 11 mcl 水， 1 mcl MMLV 逆转录酶(Bethsda Research Labs)。 37 ℃温育 1 小时后， 95 ℃处理 5 分钟以抑制逆转录酶。取以上加热后的混合物 10 mcl，加引物 NH30bis 和 NH31bis，并使终体积为 100 mcl，进行 PCR 扩增。按以下程序扩增 30 个循环： 95 ℃ 1 分钟， 60 ℃

1 分钟， 72 ℃ 1 分钟。最后所得片段用 Magic Prep(Promega)按厂家提供的实验程序进行纯化。

将 6 个只与 JL - 5 探针反应的分离株接种到 Vero 细胞中以获得空斑。再转印到尼龙膜上，用已按前述方法 ^{32}P 标记的 BC 252 和 BC253 寡核苷酸作膜杂交。杂交是在 5x SSC 中，用约 100 ng 标记寡核苷酸和 10 mcg 冷竞争寡核苷酸(终体积为 50 ml)，于 65 ℃进行 2.5 小时。每种分离株测了大约 200 个空斑，无一与 JL - 2 探针(寡核苷酸 BC253)反应。所有空斑全都与 BC 252 反应。

有一株病毒分离株，源自微滴板上的 9H2A 孔，后进一步鉴定为 JL - 1 的 SBB 株，将它在 CEF 细胞上再传两代。最后一次传代后(从最初的 MumpsVax 材料算起一共传了四代)，用该病毒感染 Vero 细胞以得空斑。转印至尼龙膜上，用 ^{32}P 标记的寡核苷酸 BC 252 和 BC253 杂交检验。用 JL - 2 特异性探针 BC253 检测了 2000 多个空斑，没有一个有反应。用寡核苷酸 BC 252 测试了较少数量的空斑，所有均呈阳性反应。对 CEF 细胞上的第四代传代物中获得的 JL - 1 株的病毒集合物，经离心，乙醇沉淀，并用随机引物按前述方法逆转录之后进行直接测序。其 cDNA 用寡核苷酸 NH14 和 BC265 作引物并按下列程序： 94 ℃ 1 分钟， 60 ℃ 1 分钟，72 ℃ 1 分钟，作 30 个循环的 PCR 反应进行扩增。所得最终 DNA 片段在 Magic Prep 柱(Promega Biotech)上按厂家的说明进行纯化，再在 Applied Biosystems 373A 自动测序仪上依厂家说明并使用 NH14 ， BC265, NH30bis 和 NH31bis 作引物进行测序。于是得到如图 1 所示的序列。令人意外的是，这个序列与 Afzal 等得到的 JL - 5 分离株的序列在 SH 和 HN 基因编码区之间的基因间区段(图 2 所示)有 6 个位点不同。可见 JL - 1 分离株代表了 MumpsVax 制品中的一种更进一步的变异形式。

第二个病毒分离株，鉴定为 10 H5F ，也只与 JL - 5 探针反应，通过感染 Vero 细胞，经两次传代，将空斑转至尼龙膜上，经 NH14 和 BC265 寡核苷酸作引物进行 PCR 扩增后，来进行测序。它给出的序列与前面 9H2A 的一样，与公开的 JL - 5 分离株序列在 SH - HN 基因间区段有 6 个碱基不同。

7)免疫原性

实施例 6 中的 JL - 1 株的免疫原性是在猴身上测试的。将一种名为 MJ11A42 的 JL - 1 病毒冻干制品，它是 MumpsVax 的第四代传代物并是在 CEF 细胞上于 34 ℃生长 6 天后获得的，以 4.2 log $TCID_{50}$ 的剂量通过皮下注射方式免疫一组 4 只非洲绿猴。另三组的每组 4 只猴子注射：(a)浓度为 4.3 log $TCID_{50}$ 的 MumpsVax ；(b)MJ21A42 冻干制品，是经 32 ℃生长 9 天后收获到的并在 CEF 细胞中直接传三代而衍生出的 MumpsVax ，浓度为每剂 4.3 log $TCID_{50}$ ，(c)MJ05A42 冻干品，浓度是每剂 4.3 $TCID_{50}$ ，是在 CEF 细胞中在 34 ℃生长 7 天后收获的病毒并是在三次直接传代后衍生的 MumpsVax ，其中的传代方式不同于 MJ21A42 制品中病毒的传代方式。

注射前(第 0 天)，以及预防接种后的第 28 和 42 天分别抽取血标本，用 Behring

的商品抗腮腺炎病毒酶反应诊断试剂盒(Behringwerke AG, Marburg, Germany)以厂家提供的方法测试血标本中是否产生了腮腺炎病毒的 IgG 抗体。如表 1 所示，从纯 JL － 1 病毒株得的制品在动物体内诱导出的抗腮腺炎病毒的抗体的滴度比其他制品的高，包括高于 MumpsVax 。这些血清还用 MumpsVax 作测试病毒在空斑减少试验中，以系列倍比稀释作了测试。那些注射了 MJ11A42 的动物的血清产生的空斑减少的平均数要高于其他血清。

8)临床研究

JL － 1 病毒株被进一步用来对血清腮腺炎抗体阴性反应的 15 个月大的儿童进行临床试验。配制麻疹、腮腺炎和风疹三价疫苗，并冷冻干燥，或使用纯的 JL － 1 株作为腮腺炎疫苗成分或使用如以上实施例 6 所述的在 CEF 细胞上直接传代而得到的病毒作为腮腺炎疫苗成分。试验中还使用了 Merck 和 CoInc 生产的 M － M － R^R II 商品疫苗(它可从 Merck Frossr Inc Kirkland, Quebec, Canada 得到);它含有 Jeryl － Lynn(B －水平)株作为腮腺炎疫苗成分。

三种疫苗制品中腮腺炎病毒的滴度经测为：批号为 MJR111D42(含纯 JL － 1 株)的疫苗为每剂 4.5 log TCID ，批号为 MJR121C42(含传代的 Mumps Vax 病毒)疫苗的为每剂 4.7 logTCID ，批号为 80391 OU 商品化 M － M － R^RII 疫苗的为每剂 4.5 logTCID 。

接种前和接种后第 42 天抽取受试儿童的血标本。

针对腮腺炎病毒的 IgG 抗体的存在用与实施例 6 中相同的商品试剂盒进行测试。如表 3 所示，带纯 JL － 1 株的 MMR 疫苗诱导出最高的血清转换率和三种制品中最高的几何平均滴度。

表 1

93 年 7 月注射		腮腺炎 ELISA 试验				
说明	猴	第 0 天	第 28 天	AMT (算术平均滴度)	第 42 天	AMT (算术平均滴度)
纯 JL-1 (MJ11 A42)	KU542	<230	3300		2800	
	544	<230	4300		4100	
	547	<230	3300		3900	
	551	<230	2600	3375	2200	3250
(MJ21 A4)	545	<230	770		510	
	550	<230	2300		2100	
	552	<230	3300		2500	
	553	<230	3500	2468	2900	2003
MSD92A06 MumpVax	548	<230	3100		690	
	549	<230	890		2300	
	554	<230	600		490	
	555	<230	1700	1573	1300	1195
(MJ05A42)	556	<230	1000		1400	
	557	<230	3100		2600	
	558	<230	<230		<230	
	559	<230	750	<1270	440	<1168

表 2

所用的寡核苷酸	
代码	序列(按 5' - 3'方向)
NH 2	GTA GCA CTG GAT GGA
NH 8	TCT GTG TTG TAT TGT GAT CC
NH 14	GTC GAT GAT CTC ATC AGG TAC
NH 22	CGG TAG AAG CTT GTC GAT GAT CTC ATC AGG TAC
NH 23	CGC TGA GGA TCC TCT GTG TTG TAT TGT GAT CC
NH 30	ATC TCC TAG GGT CGT AAC
NH 31	TTT GGA TGC AGC TTG TTC
NH 30bis	AAT CTC CTA GGG TCG TAA CGT CTC GTG A
NH31bis	TTT GAA TGC AGC TTG TTC TAG CGT
BC 265	CCG ACA TTA TGA ATA GTT TCG AGG GCT CC
BC 252	ATA TCG CAC CGC CGT CTT ATA GTT AAT AGT C
BC 253	ATA CCG AAC CGC CGT ATT ATG GTT AAT GGT C

表 3

血清抗体反应阴性的受试者对腮腺炎病毒的血清转换和几何平均滴度(GMT)

5

疫苗	时间	例数	血清转换例数	几何平均滴度
MJR111D42	接种前	15	0	-
	接种后第 42 天	15	15	1434
MJR121C42	接种前	13	0	-
	接种后第 42 天	13	11	971
803910U	接种前	17	0	-
	接种后第 42 天	17	16	1247

序列表

(1) 一般资料:

(i) 申请人: Smithkline Beecham Biologicals sa

(ii) 发明题目: 疫苗

(iii) 序列数目: 13

(iv) 通讯地址:
(A) 收信人: Smithkline Beecham
Corporate Intellectual Property
(B) 街道: SB House L/5 Great West Road
(C) 城市: Brentford
(D) 州: Middlesex
(E) 国家: United Kingdom
(F) 邮编: TW8 9BD

(v) 计算机的可读形式:
(A) 介质类型: Floppy disk
(B) 计算机: IBM PC 兼容型
(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS
(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 申请资料:
(A) 申请号:
(B) 申请日:
(C) 分类号:

(viii) 代理/代理人资料:
(A) 姓名: Dalton, Marcus JW

(ix) 电讯资料:
(A) 电话: 44 181 975 4093
(B) 传真: 44 181 975 3688

(2) SEQ ID NO:1 的资料:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 393 bp

(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 假拟: 否

(iv) 反 义: 否

(vi) 来源 :
(A) 生物体: 腮腺炎病毒
(B) 株系: Jeryl lynn - 1

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:1

TGAATCTCCT AGGGTCGTAA CGTCTCGTGA CCCTGCCGTC GCACTATGCC GGCAATCCAA 60

CCTCCCTTAT ACCTAACATT TCTAGTGCTA ATCCTTCTCT ATCTCATCAT AACCCTGTAT 120

GTCTGGACTA TATTGACTAT TAACTATAAG ACGGCGGTGC GATATGCAGC ACTGTACCAG 180

CGATCCTTCT CTCGCTGGGG TTTTGATCAC TCACTCTAGA AAGATCCCCA ATTAGGACAA 240

GTCCCGATCC GTCACGCTAG AACAAGCTGC ATTCAAATGA AGCTGTGCTA CCATGAGACA 300

TAAAGAAAAA AGCAAGCCAG AACAAACCTA GGATCATAAC ACAATACAGA ATATTAGCTG 360

CTATCACAAC TGTGTTCCGG CCACTAAGAA AAT 393

(2) SEQ ID NO:2 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 15 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 假拟: 否

(iv) 反义: 否

(vi) 来源:
(A) 生物体: nh2

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:2

GTAGCACTGG ATGGA

(2) SEQ ID NO:3 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 20 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源:
(A) 生物 体: NH8

(xi) 序列说明 SEQ ID NO:3

TCTGTGTTGT ATTGTGATCC

(2) SEQ ID NO:4 的资料:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 21 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组的)

(vi) 来源:
(A) 生物体: NH14

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:4

GTCGATGATC TCATCAGGTA C 21

(2) SEQ ID NO:5 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 33 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组的)

(vi) 来源 :
(A) 生物体: NH22

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:5

CGGTAGAAGC TTGTCGATGA TCTCATCAGG TAC 33

(2) SEQ ID NO:6 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 32 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源 :
(A) 生物体: NH23

(xi) 序列说明 SEQ ID NO:6

CGCTGAGGAT CCTCTGTGTT GTATTGTGAT CC 32

(2) SEQ ID NO:7 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 18 bp

(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源:
(A) 生物体: NH30

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:7

ATCTCCTAGG GTCGTAAC 18

(2) SEQ ID NO:8 的资料:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 18 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源 :
(A) 生物体: NH 31

(xi) 序列说明 SEQ ID NO:8

TTTGGATGCA GCTTGTTC 18

(2) SEQ ID NO:9 的资料:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 28 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源 :

(A) 生物体: NH 30 BIS

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9

AATCTCCTAG GGTCGTAACG TCTCGTGA 28

(2) SEQ ID NO:10 的资料:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 24 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源 :
(A) 生物体: NH 31 BIS

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:10

TTTGAATGCA GCTTGTTCTA GCGT 24

(2) SEQ ID NO:11 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 29 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源 :
(A) 生物体: BC265

(xi) 序列说明 SEQ ID NO:11

CCGACATTAT GAATAGTTTC GAGGGCTCC 29

(2) SEQ ID NO:12 的资料:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 31 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源:
(A) 生物体: bc252

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:12

ATATCGCACC GCCGTCTTAT AGTTAATAGT C 31

(2) SEQ ID NO:13 的资料

(i) 序列特征:
(A) 长度: 31 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓朴结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 来源:
(A) 生物体: BC253

(xi) 序列说明 SEQ ID NO:13

ATACCGAACC GCCGTATTAT GGTTAATGGT C 31

申请人或代理人档案号 PDXN5236A	国际申请号 PCT/EP94/03801

关于微生物保藏的说明

（细则 13 之二）

A. 对说明书第 6 页，第 20 行所述的微生物的说明。

B. 保藏事项　　其他保藏在补充页中 ☐

保藏单位名称 PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICES

保藏单位地址
（包括邮政编码和国名）

Porton Down, Wiltshire, United Kingdom (英国)

保藏日期 1993年11月5日	保藏编号 Jeryl-Lynn 腮腺炎病毒品系: V93110585

C. 补充说明（必要时）　　本栏内容有补充页 ☐

就欧州专利申请的指定国而言，直到授予欧州专利的公告时，或直到该申请被驳回或撤回时为止，可以得到该保藏的微生物的样品．该样品仅发放给请求样品的人所指定的专家．

D. 本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）

E. 补充说明（必要时）

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如："保藏的编号"）

由受理局填写	由国际局填写
☐ 本页已经和国际申请一起收到	☐ 国际局收到本页日期：
受权官员	受权官员

PCT/RO/134 表（1992 年 7 月）

Jeryl Lynn 分离株的 SH 基因和 SH-HN 基因间区段的 cDNA

TGAATCTCCTAGGGTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTCGCACTATGCC
GGCAATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTAGTGCTAATCCTTCTCT
ATCTCATCATAACCCTGTATGTCTGGACTATATTGACTATTAACTATAAG
ACGGCGGTGCGATATGCAGCACTGTACCAGCGATCCTTCTCTCGCTGGGG
TTTTGATCACTCACTCTAGAAAGATCCCCAATTAGGACAAGTCCCGATCC
GTCACGCTAGAACAAGCTGCATTCAAATGAAGCTGTGCTACCATGAGACA
TAAAGAAAAAAGCAAGCCAGAACAAACCTAGGATCATAACACAATACAGA
ATATTAGCTGCTATCACAACTGTGTTCCGGCCACTAAGAAAAT
□

图 1