

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 7/06
A61K 39/12



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99801764.7

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1160454C

[22] 申请日 1999.6.2 [21] 申请号 99801764.7
[30] 优先权
[32] 1998.10.5 [33] JP [31] 319762/1998
[86] 国际申请 PCT/JP1999/002931 1999.6.2
[87] 国际公布 WO2000/020565 日 2000.4.13
[85] 进入国家阶段日期 2000.6.5
[71] 专利权人 财团法人阪大微生物病研究会
地址 日本大阪
[72] 发明人 石川丰数 吉井洋纪 大西敏之
今川忠 石桥正英
审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用于抗日本脑炎病毒感染的灭活疫苗的增强免疫原及其生产方法

[57] 摘要

本发明提供了具有比常规疫苗高约 2 - 10 倍的效价的新的灭活病毒颗粒以及增强免疫原，及其制备方法。本发明的灭活病毒颗粒可用于由日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的诊断试剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种作为增强免疫原的灭活的病毒颗粒，是从用属于日本脑炎病毒群的病毒感染的细胞培养物制备的，其中该病毒颗粒是完全通过蔗糖密度梯度区带离心而纯化的，其中用该病毒颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价是用从鼠脑培养的病毒制备的灭活的病毒颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价的约 2—10 倍。

2. 用于生产灭活的病毒颗粒的方法，包括在一个细胞系中培养属于日本脑炎病毒群的病毒，以及灭活和纯化细胞培养物，其中该纯化是完全通过蔗糖密度梯度区带离心而进行的，其中用该病毒颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价是用从鼠脑培养的病毒制备的灭活的病毒颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价的约 2—10 倍。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述细胞系是 Vero-A 细胞。

4. 根据权利要求 2 或 3 的方法，其中灭活是在纯化之前进行的。

5. 根据权利要求 2 所述的方法，其中灭活是在约 4℃—约 10℃ 的温度范围内进行的。

6. 根据权利要求 2 所述的方法，其中属于日本脑炎病毒群的病毒是日本脑炎病毒的北京株或 ThCMAr67/93 株。

7. 含有权利要求 1 所述的灭活的病毒颗粒的灭活疫苗。

8. 用于由日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的诊断试剂，含有如权利要求 1 所述的灭活病毒颗粒作为抗原。

9. 权利要求 1 的灭活的病毒颗粒，其中根据电子显微镜分析，该颗粒结构的表面或被膜层的外观是粗糙的或是绒毛状的。

10. 权利要求 2 的方法，其中根据电子显微镜分析，该颗粒结构的表面或被膜层的外观是粗糙的或是绒毛状的。

用于抗日本脑炎病毒感染的灭活疫苗的增强免疫原及其生产方法

发明背景

发明领域

本发明涉及抗由黄病毒属的日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的灭活疫苗和其诊断试剂。具体地说，本发明涉及抗日本脑炎的灭活疫苗的一种增强免疫原或抗原，该免疫原或抗原用作疫苗的活性成分是优异而实用的，本发明还涉及生产该免疫原或抗原的方法。

相关领域的描述

下文中，作为由日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的典型例子，将描述日本脑炎，并且将描述抗该脑炎的疫苗。第一个日本脑炎疫苗是1954年投入实际使用的，该疫苗含有作为活性成分的从鼠脑培养的病毒制备的抗原，这样的疫苗的纯度低，并且含有许多污染物，以致于它可能诱导中央神经系统的过敏性神经性紊乱。此后，在1965年一种通过乙醇沉淀，用鱼精蛋白硫酸盐处理，超滤等等获得的改善的高纯度疫苗投入了实际使用。因此，显著提高了疫苗的质量。直到现在一直在利用这样的疫苗和生产技术(“疫苗手册”，第103—113页，研究者协会，国家健康研究院(日本)，Maruzen(东京)1996)。另一方面，一直在尝试开发不利用鼠脑获得灭活疫苗。更具体地说，在1965年建立了日本脑炎疫苗委员会，它们利用原代细胞组织培养开发疫苗。但是，就生产成本而言，获得大规模生产灭活疫苗抗原所需的大量原代细胞组织培养物是不可能实施的。这样的疫苗没有投入实际使用，因为在当时仅仅原代细胞培养被允许用于疫苗的生产，传代细胞系的使用被认为是危险的并且没有被允许。就利用组织培养获得的日本脑炎活疫苗而言，在中国大约在

1994 年在中国仓鼠肾脏细胞的原代培养物中生长的减毒病毒投入了实际使用。但是，没有证实活疫苗的效果和安全性，除了中国以外还未知在其它各个国家被使用。此外，1986 年以来已经有人报导通过重组基因技术(例如利用包膜(E)蛋白抗原，重组病毒等等的第二代疫苗)获得的各种日本脑炎疫苗。但是，所有这些疫苗均在实验阶段或临床前试验阶段，它们没有被投入实际使用(“疫苗”，第 2 版，第 671—713 页，S.A.Plotokin 和 E.A.Mortimer, W.B.Sauders 公司，1994；约旦报导，第 26—27 页，1998)。

此外，就利用细胞系进行大规模的用于灭活疫苗的抗原或免疫原的生产技术而言，例如已知利用 Vero 细胞进行用于抗脊髓灰质炎(美国专利 4,525,349)，狂犬病(美国专利 4,664,912)，甲型肝炎(美国专利 4,783,407)和蜱传脑炎(美国专利 5,719,051)等等的疫苗的病毒抗原的大规模生产。其中，已知前两者被投入实际使用，但是，就后两者而言，没有证实大规模生产的每种抗原作为疫苗的安全性和应用效果，并没有投入实际使用。

常规日本脑炎疫苗的活性成分是在鼠脑中培养的日本脑炎病毒的灭活颗粒。大量的小鼠，抗感染动物的生物毒害的措施等等是大规模生产用于这样的疫苗的抗原所需的，结果导致高生产成本。此外，来源于鼠脑的有害成分(例如引起脱髓鞘作用的碱性蛋白质)对产品的污染，和/或小鼠病毒的污染等等总是要考虑的因素。因此，纯化步骤和质量控制变得多样而复杂。另外，近来，获得用于疫苗生产的大量小鼠有困难，这成为有计划的疫苗生产的障碍。此外，根据动物保护和宗教的考虑牺牲小鼠的常规技术是不令人满意的。

发明概述

根据本发明，通过利用细胞系代替小鼠大规模生产病毒颗粒以便解决上述问题。因此，生产成本显著降低，就劳动成本而言，抗生物毒害

的措施,生产的操作程序,纯化步骤,质量控制,生产计划等等是显著有效的。特别是,本发明基于发现的新的病毒颗粒。更具体地说,根据本发明,提供了作为增强免疫原的新的病毒颗粒,其与包含于常规的灭活疫苗中的免疫原相比以中和抗体效价代表的免疫效力增强约 2—10 倍,本发明还提供了生产该病毒颗粒的方法。就是说,本发明提供了具有显著的免疫原性或抗原性的日本脑炎病毒颗粒,其可用作抗由日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的灭活疫苗,特别是用作灭活的日本脑炎疫苗的免疫原或用于诊断试剂的抗原,本发明还提供了用于生产该病毒颗粒的方法。这样的颗粒通过下面步骤产生:在一种细胞系中培养属于日本脑炎病毒群的病毒(例如日本脑炎病毒),和/或一系列随后的步骤,包括浓缩,纯化和灭活。基于上述情况,本文描述的发明提供了:

(1)作为增强的免疫原的灭活病毒颗粒,是从用属于日本脑炎病毒群的病毒感染的细胞培养物制备的,其中通过用该病毒颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价是通过用从鼠脑培养的病毒制备的灭活的病毒颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价的约 2—10 倍;

(2)用于生产灭活的病毒颗粒的方法,包括在一个细胞系中培养属于日本脑炎病毒群的病毒的步骤,以及灭活和纯化细胞培养物;

(3)如(2)描述的方法,其中细胞系是 Vero 细胞;

(4)如(2)或(3)描述的方法,其中灭活是在纯化之前进行的;

(5)如(2)—(4)任一项描述的方法,其中灭活是在约 4℃—约 10℃ 的温度范围内进行的;

(6)如(2)—(5)任一项描述的方法,其中纯化是采用物理手段进行的;

(7)如(2)—(6)任一项描述的方法,其中属于日本脑炎病毒群的病毒是日本脑炎病毒的北京株或 ThCMAR67/93 株;

(8)由如(2)—(7)任一项描述的生产方法生产的灭活的病毒颗粒;

(9)含有如(1)或(8)描述的灭活的病毒颗粒的灭活疫苗;

(10)用于由日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的诊断试剂，含有完整或部分如(8)描述的灭活病毒颗粒作为抗原。

附图简述

图 1 显示包含于测试疫苗的本发明的病毒颗粒(R 颗粒；图 1A)和包含于来源于鼠脑的商品疫苗的由常规技术制备的病毒颗粒(MB 颗粒；图 1B)的电子显微镜照片，两种病毒均属于北京株。

优选的实施方案的描述

通过比较本发明的日本脑炎疫苗的免疫原与作为代表性例子的常规免疫原的材料和生产方法，本发明的实施方案的特征将变得明了。考虑到这些，下文中以如下顺序描述本发明免疫原和常规免疫原的免疫原性和形态学的差别，作为免疫原的病毒颗粒，病毒培养的宿主，病毒的灭活，病毒的纯化，电子显微镜分析和效力测试。

常规日本脑炎疫苗的免疫原：

其是指抗日本脑炎的商购灭活疫苗的活性成分（免疫原）。根据“日本脑炎疫苗”或“冷冻干燥的日本脑炎疫苗”的规则生产该病毒颗粒，并且所述的病毒颗粒通过各种安全性和效力等等的测试确定其良好的性能，该规则是由日本生物产品制造者协会于 1986 出版的英语版本，其根据日本厚生省基于药事法(1960 年生效的第 145 号法)的第 42 条第 1 项的要求颁布的第 217 号告示“生物学制剂的基准”制订。该疫苗的活性成分或免疫原是日本脑炎病毒颗粒(即来源于鼠脑(MB)的灭活病毒颗粒)。通过以用于生产日本脑炎疫苗的病毒株接种鼠脑，使病毒在鼠脑中大量地繁殖，从鼠脑匀质物高度纯化该病毒，以灭活试剂使该病毒灭活获得了该病毒颗粒。下文中，将来源于鼠脑(MB)的灭活的病毒颗粒缩写为“MB 颗粒”或“MB 免疫原”。

本发明的日本脑炎疫苗的免疫原：

是指灭活的日本脑炎疫苗的活性成分(免疫原)，是根据上面提到的

“日本脑炎疫苗”规则生产的，不同的是将细胞系的细胞培养物用作为培养日本脑炎病毒的宿主，并且符合各种质量控制测试。该免疫原是日本脑炎病毒颗粒(即来源于组织培养物的灭活的病毒颗粒)，通过以日本脑炎病毒接种细胞系的细胞培养物，允使病毒大量地繁殖，从细胞培养物高度纯化该病毒，以灭活试剂使该病毒灭活获得了该病毒颗粒。该免疫原具有下列特征(1)并通常具有下列另外的特征(2)。

(1)如由下文描述的效力测试测量的，用上述颗粒免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价是通过用常规 MB 颗粒或 MB 免疫原免疫接种获得的抗血清的中和抗体效价的约 2—10 倍(下文中，将上述免疫原称之为“增强的免疫原”，缩写为“R 颗粒”或“R 免疫原”)；和

(2)关于基于电子显微镜分析的颗粒结构，MB 颗粒的包膜层的表面或表现是光滑的，而 R 颗粒是粗糙或绒毛状的。

应该注意到日本脑炎疫苗的免疫原被描述为抗由本发明的日本脑炎病毒群引起的感染性疾病的疫苗的免疫原的代表性例子。本发明的疫苗(例如日本脑炎疫苗)是以液态或干燥状态提供在密封的小管或加热密封的安瓿瓶中。对于液态制剂的情况，将其皮下注射到待接种的个体，剂量为每人约 0.1-1.0 毫升。对于干燥制剂的情况，在与溶解溶液重新溶解之后注射。

作为免疫原的病毒：

本发明的日本脑炎病毒群包括日本脑炎病毒，Kunjin 病毒，墨累山谷脑炎病毒，圣路易脑炎病毒，和西尼罗病毒等等。详细情况描述于病毒学档案，增刊 10，第 415—427 页，1995(“病毒分类学”，病毒的分类和命名；国际病毒分类委员会第 6 次报告)。在这些病毒中，就日本脑炎病毒而言，例如可以使用下面的毒株：来源于鼠脑的北京—1 毒株和由我们在鼠脑传代北京—1 获得的 JWS—P—4 毒株(Am29SmlAm5；更具体地说，由在成年小鼠(Am)传代 29 代，在乳鼠(Sm)传代 1 代和在 Am

中传代 5 代获得的病毒株), 由在 Vero 细胞中将 JWS-P-4 传 2 代获得的原种(master seed)JMSV001(下文中, 这 3 个毒株称之为“北京株”), Nakayama-Yoken 毒株(下文中, 称之为“Nakayama 毒株”), JaOArS982 毒株, JaOH0566 毒株, 和由 Igarashi 等人, 在 1990 年新分离的 ThCMAr67/93 毒株和 ThCMAr44/92 毒株(Ali 等人, 病毒学档案, 140, 1557-1575, 1995, Ali 和 Igarashi, 微生物学和免疫学, 41, 241-252, 1977)等等。

根据本发明, 日本脑炎病毒株中, 北京株和 ThCMAr67/93 毒株作为免疫原是特别优选的。当使用这些毒株时, 可以获得具有广谱抗原性的疫苗(即具有非常满意的抗除了疫苗生产使用的病毒株以外的多个毒株的保护作用)。在北京株中, JMSV001 是优选的。

根据本发明, 通过将从两个病毒株(即北京株和 ThCMAr67/93 毒株)产生的疫苗混合可以制备二价疫苗。优选的是混合比例为基于抗原蛋白质的含量为 0.5:1-1:0.5。由于这样的混合, 与常规一价疫苗相比, 可以获得具有抗感染的保护作用的更广谱的抗原性的疫苗。

通过将病毒接种合适的宿主细胞系, 以及保持培养感染的细胞而培养病毒。培养方法与后面的“细胞培养”描述的相同。下文中, 为了方便, 将通过病毒培养物的低速离心获得的上清液中的病毒称之为“胞外病毒”。将离心沉淀收集的感染的细胞悬浮于原始体积的添加了 0.2%(w/v)牛血清白蛋白的伊格尔氏基本必需培养基(MEM)中, 随后超声处理, 低速离心, 获得的上清液中的病毒称之为“胞内病毒”。从胞外或胞内病毒可以获得本发明的灭活的病毒颗粒。由于其产量高, 胞外病毒是优选的; 它是成熟的病毒粒; 由于来自细胞的成分污染少, 它易于被纯化。

用于病毒培养的宿主:

可以将已知的细胞系用作为病毒培养的宿主。例如, 可以使用二倍体细胞系例如 WI-38, MRC-5, FRhL-2 等等, 和连续传代的细胞

系例如 Vero, BHK-21, CHO 等等。连续传代细胞系是优选的,因为它们易于大规模生产和按照程序生产,并且它们特征是熟知的且被证实不含有其它病毒。此外,也可以使用常规用于生产病毒疫苗的普遍使用的 CV-1, BSC-1, MA104, MDCK, CaCO-2 等等,和 DBS-FLC-1, DBS-FLC-2, DBS-FRhl-2, ESK-4, HEL, IMR-90, WRL68 等等(“可以利用的 ATCC 微生物和细胞”,第 2 版,第 144 页,美国典型培养物保藏中心(ATCC)1991,美国)。对于上面提到的用于培养日本脑炎病毒株的宿主,优选的是选择能使病毒良好生长的准许用的细胞。例如,优选使用的是 Vero 细胞(ATCC No: CCL-81), BHK-21(C-13)(ATCC No:CCL-10), C6/36(ATCC No:CRL-1660)等等。但是,当使用这些细胞系时,需要根据世界卫生组织(WHO)推荐的用于生物制品生产的细胞使用的要求的对生物物质第 50 号要求对污染物,致瘤力等等进行各种测试,从而证实这些细胞系是否具备作为用于生产疫苗的细胞的特性(WTO 技术报导序列, No.878, 第 19-52 页, 1998)。

细胞培养:

对于上面提到的细胞系的细胞培养,可采用静止培养,灌流系统培养,振荡培养,转管培养,滚瓶培养,悬浮培养,微载体培养等等。例如,可以将各种类型的商购 Cytodex(Pharmacia Biotech,瑞典)用作为微载体,可以使用各种商购动物细胞培养装置。

病毒的灭活:

可以将灭活试剂例如福尔马林, β -丙内酯和戊二醛加入到病毒悬浮液以灭活该病毒。例如,当利用福尔马林时,加入的量约 0.005%—约 0.1%(V/V),灭活的温度是约 4℃—约 38℃,灭活的时间主要依赖于灭活的温度(例如在 38℃,约 5—约 180 小时,在 4℃约 20—90 天)。

病毒的纯化:

采用物理手段或化学手段对病毒进行纯化。物理手段利用物理特性,

例如待纯化物质的大小，密度，沉积常数等等，并且包括例如区带超离心，密度梯度离心，过滤等等。通常利用物理手段不改变周围环境的 pH 和盐浓度。化学手段利用通过化学或物理化学反应的吸附/脱附，并且包括例如离子交换柱层析，亲和层析，盐析等等。纯化是在室温下约 4℃进行。

病毒的浓缩：

在灭活和/或纯化之前，可以进行浓缩，例如通过用超滤膜进行低速离心。

根据本发明，令人满意的是在纯化之前在约 4℃—约 10℃进行 R 颗粒的灭活。此外，令人满意的是通过物理纯化方法进行纯化。与纯化之后灭活的颗粒或化学纯化的颗粒相比，由此获得的颗粒可以保持更高的免疫原性或抗原性。

电子显微镜分析：

例如，在电子显微镜(日立公司)下可以观察到由用 2%(W/V)醋酸铀酰进行的负染色方法制备的病毒样品。在约 20000 到约 100000 的放大倍数成象分析病毒颗粒。

疫苗的制备：

利用合适的稀释液可以稀释本发明的灭活病毒颗粒以便获得需要的效价。可以加入任何已知的载体或赋形剂。非强制性地，疫苗可以含有防腐剂，稳定剂等等。

效力测试：

根据上面提到的“生物制品的最低要求”中的“日本脑炎疫苗”规则制订的“效价测试”进行该测试。例如，在各个组中使用 15 只 4 周龄的 ddY 小鼠。用每种疫苗 0.5 毫升/小鼠给各个组的动物腹膜注射，所述的疫苗已经 2 倍系列稀释，7 天之后，给动物加强注射。在加强之后第 7 天从各个小鼠收集血液。之后，在各个组合并等量的血清，在约

56℃灭活 30 分钟。获得的血清作为免疫血清用于中和测试。在中和测试中，将鸡胚细胞培养物用作为病毒培养的宿主，将用作为疫苗抗原或免疫原的病毒(例如北京株，Nakayama 毒株，ThCMAr67/93 毒株等等)用作为攻击病毒。上面提到的免疫血清将由攻击病毒形成的噬斑数目降低了 50%的最大稀释度代表中和抗体效价。

在另一个方面，将本发明获得的病毒颗粒(R 颗粒)用作为诊断抗原(例如，在免疫沉淀方法，血凝集抑制(HI)测试，补体固定(CF)反应，ELISA，放射性免疫测试，免疫荧光方法等等中的抗原)。R 颗粒作为诊断抗原的特征在于，与 MB 颗粒相比，该颗粒与多克隆抗体和某些单克隆抗体的反应性高出约 2—10 倍。更具体地说，利用完整或部分本发明的灭活病毒颗粒，可以提供具有高灵敏性的用于检测日本脑炎病毒群的感染，特别是日本脑炎病毒的感染的诊断试剂。如本文所述，术语“部分”灭活病毒颗粒是指保留了来源于病毒颗粒所需的免疫原性的病毒组分，包括例如在实施例 1 描述的纯化步骤期间溶解的结构蛋白质。

下文中，本发明的实施方案，构成部分，结构和效果将通过说明性的实验和实施例进行描述，但是本发明不仅限于此。

参考实施例

北京株和 ThCMAr67/93 毒株的序列表：

为了有助于鉴定特别适用于本发明的日本脑炎病毒的北京株和 ThCMAr67/93 毒株，SEQ ID NO: 1—4 显示与两个毒株的基因组 RNA 互补的包膜蛋白基因 cDNA 的碱基序列和由该碱基序列编码的推测的氨基酸序列。SEQ ID NO: 1 和 2 对应于 ThCMAr67/93 毒株(病毒学档案，140, 1557—1575, 1995)，SEQ ID NO: 3 和 4 对应于北京株的原种 JMSV001。用于下面的实施例的“北京株”是 JMSV001。

采用上面提到的 Ali 等人的文章描述的方法测定 cDNA 的碱基序列。更具体地说，从 Vero 细胞的病毒培养物提取基因组 RNA。之后，利用

一对引物通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增编码包膜蛋白的区域,通过双脱氧链终止方法测定获得的 cDNA 片段的碱基序列。此外,利用通用密码解码由碱基序列编码的氨基酸序列。

实验 1

病毒感染效价的测定:

通过用下文描述的 Vero-M 细胞进行噬斑计数方法计算病毒感染效价 PFU(噬斑形成单位)/毫升。

病毒抗原量的测定:

利用抗日本脑炎病毒单克隆抗体 IgG(组-8 克隆 503(由东京都神经科学综合研究所 Yasui 博士惠赠, K.Yasui 等人, 普通病毒学杂志, 67, 2663-2672, 1986)进行 ELISA 测定日本脑炎病毒抗原的量。将来源于鼠脑的自制标准品(北京株)的值定义为 100 单位,通过平行线测试计算相对 ELISA 值。

HA 测试:

使用 U 形微平板。将等量的用磷酸盐缓冲液调节到最适 pH 的 0.33%(v/v)鹅红血细胞悬浮液与病毒溶液混合。之后,使其在 37℃相互反应 60 分钟。由此,测定血凝集反应的存在。血凝集反应是阳性的病毒溶液的最大稀释度代表 HA 效价。

牛血清抗原量的测定:

利用抗牛血清山羊 IgG 进行 ELISA 测定牛血清抗原的量。通过平行线测试计算牛血清标准抗原中的蛋白质含量的相对值,测定获得的值作为抗原量。

实验 2

病毒培养中细胞系的增殖:

粘着性 2-系 Vero 细胞: Vero-A(ATCC No: CCL-81), Vero-M(从国立感染症研究所获得的 Vero); 3 系 BHK-21 细胞: BHK/WI2(从大阪

府立公共卫生研究所获得的粘着性 BHK-21), BHK/JNIH(从国立家畜卫生试验场获得的悬浮的 BHK-21)和 BHK-21(C-13)(ATCC No:CCL-10),和来源于蚊子的 C6/36 细胞(ATCC No:CRL-1660)作为病毒培养的候选细胞系,观察各个细胞系中病毒的繁殖。以约 1.5×10^5 个细胞/毫升在生长培养基中制备 Vero-A, Vero-M, BHK/WI2 和 BHK-21(C-13)。在约 37°C 将它们培养 3 天,之后,分别进行细胞计数。以相同的方式,以约 2.0×10^5 个细胞/毫升制备悬浮的 BHK/JNIH,并且在 37°C 振荡培养 3 天。之后,计数细胞的数目。以约 1.0×10^5 个细胞/毫升制备 C6/36,在约 28°C 培养 7 天。之后,计数细胞的数目。使用补充了 8%(V/V)(终浓度)牛血清的 MEM 作为生长培养基。结果, Vero-A, Vero-M, BHK/WI2 和 BHK-21(C-13)的细胞数计数且测定为 7.0×10^5 个细胞/毫升至约 9.0×10^5 个细胞/毫升,悬浮的 BHK/JNIH 和 C6/36 的细胞数计数且测定为约 2.8×10^6 个细胞/毫升。

实验 3

在候选细胞系中繁殖日本脑炎病毒:

在约 28°C 将 C6/36 培养 7 天,用于实验 2 的其它细胞在 37°C 培养 3 天。之后,以 0.1 的感染复数(MOI)以北京株接种各个细胞,并且测定病毒感染效价(PFU),病毒抗原量(ELISA 效价)和 HA 效价,从而比较胞外病毒量变化的时间过程。表 1 显示其结果。各个数值是两个重复设置实验中各个细胞系的病毒生长曲线的最高值的平均值。C6/36 在培养的第 3 天显示最高病毒感染效价,并且在第 4 天显示最高 ELISA 效价和 HA 效价。其它细胞系在培养的第 2 天显示最高病毒感染效价,并且分别在第 3 和第 4 天显示最高 ELISA 效价和 HA 效价。

表 1

细胞	PFU/ml	ELISA 效价	HA 效价
粘着性			
Vero-A	1.2×10^8	58	640
Vero-M	5.7×10^7	35	320
BHK-21/WI2	1.5×10^8	27	40
BHK-21[C13]	2.3×10^8	48	320
悬浮的			
BHK-21/JNIH	7.0×10^7	37	40
C6/36	2.6×10^8	103	320

实验 4

Cytodex 的类型和 Vero-A 细胞的增殖：

将 Cytodex 1, 2 或 3 之一以约 1.5 克/升的量加入到 3 个细胞培养瓶中，每个培养瓶含有约 500 毫升的 Vero-A 细胞悬浮液，每毫升含有 1.5×10^5 个细胞。之后，将细胞在 37℃ 和约 40rpm 搅拌培养 7 天。获得如下所述的结果。对于 Cytodex 1, 2 或 3 从培养开始到第 7 天每毫升的细胞数分别为约 7.5×10^5 , 8.3×10^5 和约 9.4×10^5 。此外，当以 Cytodex 1 将细胞培养 7 天时，有 100 个或更多个细胞粘着到所有珠的表面而没有缝隙。

实验 5

Cytodex 的浓度和 Vero-A 细胞的增殖：

将 Cytodex 1 加入到细胞培养瓶 A, B, C 和 D，各培养瓶含有约 500 毫升的细胞悬浮液，浓度为约 1.5×10^5 个细胞/毫升，以使瓶 A 和 B 中最终量为约 1.5 克/升，瓶 C 中最终量为约 3.0 克/升，瓶 D 中最终量为约 4.5 克/升。之后，将细胞在 37℃ 和约 40rpm 搅拌培养 7 天。计细胞数和粘着有细胞的珠的分数(即粘着到珠上的百分数)。为计数粘着有细胞的珠的百分数，每个瓶至少观察 200 个珠，至少粘着了 5 个细胞的珠计为粘

着有细胞的珠。在加入了约 1.5 克/升的 Cytodex 1 的瓶 A 中的细胞在整个培养过程中以相同的培养基培养。在瓶 B, C 和 D 中, 在培养开始后第 3, 4 和 5 天以新鲜的培养基替代一半培养基。获得了下述结果。培养基的替代不影响细胞数(A 和 B)。在培养 7 天之后每毫升的细胞数, B 瓶约为 9.1×10^5 , C 瓶约为 7.7×10^5 , D 瓶约为 8.0×10^5 。在第一天, 瓶 A 和 B 中粘着了细胞的珠的百分数为 98%或以上, 在第 4 天达到 100%。在瓶 C 和 D 中粘着了细胞的珠的百分数较低(即分别为约 39%和约 80%)。但是, 在第 6 天, 在瓶 A, B, C 和 D 中该百分数达到 100%。

实验 6

以高密度与 Cytodex 1 培养的 Vero -A 细胞的增殖:

在 Cytodex 的浓度和细胞数分别为三倍的条件下进行高密度培养。将 Cytodex 1 加入到浓度为 4.5×10^5 个细胞/毫升的 Vero-A 细胞悬浮液中达到终浓度为约 4.5 克/升, 在用于培养动物细胞的装置中培养细胞, 所述的装置含有约 50 升的培养基。在开始的 24 小时每分钟的转速设置为约 15rpm, 在 24 小时之后设置为约 20rpm。pH 设置为 7.0, 溶解氧设置为 5ppm。在培养开始后第 3 和第 5 天以新鲜生长培养基替代一半培养基。获得下述结果。在第 5 和第 7 天的细胞数分别为约 2.0×10^6 个细胞/毫升和约 2.6×10^6 个细胞/毫升。此外, 在第 2 天粘着了细胞的珠的百分数是 100%。

实验 7

用于在 Vero-A 细胞中生产疫苗的候选病毒毒株的繁殖:

以 0.1 的 MOI 将上面提到的来源于鼠脑的日本脑炎病毒的四个候选病毒毒株(北京株, Nakayama 毒株, JaOH0566 和 JaOArS982)分别接种在培养皿中静止培养 3 天的 Vero-A 细胞。将病毒吸附到 Vero-A 上约 90 分钟。然后, 将补充了 2%(V/V)的牛血清的 MEM 加入到获得的 Vero-A 中, 随后在 37℃培养 7 天。对于胞外和胞内病毒观察该时间过程中感染

的效价和抗原量的变化。获得下述结果。就感染效价而言,除了 Nakayama 毒株以外,三个毒株的病毒效价在培养开始后第 2 天显示最高值(约 1.0×10^8 PFU/毫升或更多),胞内病毒显示的值为胞外病毒的 1/3 或更低。Nakayama 毒株的胞外病毒在第 3 天显示最高感染效价,是其它 3 个毒株的 1/5 或更低。就 ELISA 抗原效价而言,除了 Nakayama 毒株以外,三个毒株的胞外病毒在第 3—5 天显示最高值(约 70 个单位),胞内病毒显示的值为胞外病毒的 1/5 或更低。Nakayama 毒株的 ELISA 抗原效价在第 5—7 天显示达到稳定(约 30 单位)。就 HA 效价而言,在第 2—4 天, Nakayama 毒株胞外病毒显示值约为 160,其它三个毒株显示值约 640—约 1280。

实验 8

北京株在与 Cytodex 1 培养的 Vero—A 细胞中的繁殖:

以 0.1 的 MOI 将在 Vero-A 中传代 4 次的北京株病毒接种到 20 升的与 Cytodex 1 培养的 Vero—A 细胞(约 1.96×10^6 个细胞/毫升)中。将细胞在无牛血清的 MEM 中培养。获得下述结果。胞内病毒在培养开始后第 2 天显示最高感染效价(约 1.3×10^8 PFU/毫升或更多),胞外病毒在第 3 天显示最高感染效价(约 4.0×10^8 PFU/毫升),胞外病毒在第 4 天显示最高 ELISA 抗原效价(约 67 个单位),胞内病毒在第 3 天显示最高 ELISA 抗原效价(约 26 个单位)。在培养的第 3 天,胞外病毒显示 HA 效价为 320 和胞内病毒显示约为 40 的 HA 效价。

实验 9

毒株的遗传稳定性:

通过将小鼠衍生的病毒(JWS—P—4)在 Vero 细胞中传代 2 次制备原种(JMSV001)。在 Vero—A 细胞中连续传代 7 次该原种仍遗传稳定,没有发现编码核蛋白,前—M 蛋白和包膜蛋白的基因的碱基序列有突变。此外,由这些基因编码的氨基酸序列与 JWS—P—4 相同。通过参考实

施例 1 中描述的方法进行遗传分析。

实施例 1

测试疫苗的制备:

以 0.1 的 MOI 将通过在 Vero-A 中将小鼠衍生的病毒(JWS-P-4)传代 4 次制备的北京株接种到与 Cytodex 1 培养的 Vero-A 细胞,并且在没有牛血清的 MEM 中 37℃培养 4 天。收集培养上清液(即胞外病毒)。利用具有截止分子量为 100 千道尔顿的超滤膜将上清液浓缩到约 1/10 体积。之后,加入福尔马林至终浓度为 1/1500(V/V),从而使病毒灭活。在约 4℃灭活 50 天。接着,将灭活的病毒悬浮液进行两次蔗糖密度梯度区带超离心,从而纯化该病毒。利用 P35ZT 转头(Nissei Sangyo 有限公司)以约 25%到约 50%(W/W)蔗糖浓度梯度和 30000rpm 进行第 1 次和第 2 次超速离心 13 小时。收集病毒组分(蔗糖密度 41%),在磷酸缓冲盐水(PBS)中透析。透析过的组分用作为疫苗原液。根据上面提到的“生物制品的基本要求”将疫苗原液进行安全性和效果的各种测试,其作为疫苗合格。然后,将疫苗原液在 TC 培养基 199(Difco 实验室,美国)中稀释以便其中的蛋白质含量变成约 7.8 微克/毫升。将获得的经过稀释的疫苗溶液以 1 毫升的等份分配于 3 毫升小瓶。之后,密封各个小瓶获得测试疫苗。根据上面提到的“生物制品的基本要求”的常规测试方法(其中蛋白质用热三氯乙酸(TCA)沉淀并且采用 Lowry 的方法定量)测量测试疫苗的蛋白质含量。

实施例 2

主要步骤过程中测试疫苗的特性:

在生产实施例 1 所述的测试疫苗过程中完成各个主要步骤的时间点收集样品,进行实验 1 描述的各种测试。获得了下面的结果。病毒培养物的上清液(即病毒悬浮液)显示约 2.2×10^8 PFU/毫升的感染效价和约 70 单位的 ELISA 抗原效价,以及约 160 的 HA 效价。当利用超滤膜将病

毒悬浮液浓缩到 1/10 体积时,感染效价和抗原量增高(约 10 倍)。第一次区带超离心之后,在蔗糖浓度为约 41%和约 34%的两个组分中观察到病毒抗原量的峰值。电子显微镜表明蔗糖浓度为约 41%的组分含有病毒颗粒,蔗糖浓度为约 34%的组分含有病毒抗原性颗粒,该颗粒比病毒颗粒小很多。此外,在蔗糖浓度为约 28%或更低的组分中检测到来源于细胞培养物的牛血清抗原,并与病毒颗粒组分分离。将上面提到的病毒颗粒组分再次利用区带超速离心纯化,证实病毒颗粒以单峰形式存在于蔗糖浓度为约 40%的组分中。从该组分制备测试疫苗。测试疫苗显示约 45 单位的 ELISA 抗原效价,蛋白质浓度为 7.8 微克/毫升。

实施例 3

测试疫苗的电子显微镜照相:

将测试疫苗和来源于鼠脑的商购疫苗进行上面提到的电子显微镜分析(图 1)。结果,商购疫苗中 MB 颗粒的包膜层表面或表现是光滑(图 1B),而本发明测试疫苗中 R 颗粒是粗糙或绒毛状的(图 1A)。

实施例 4

基于中和反应的测试疫苗的效力:

根据上面提到的“效力测试”对含有灭活的北京株作为活性成分的三个疫苗(实施例 1 获得的测试疫苗,来源于鼠脑的商购疫苗,和效力测试的参照疫苗)的效价进行测量。更具体地说,将各个疫苗在 PBS 中 2 倍系列稀释并且接种小鼠。将抗北京株病毒血清的中和抗体效价进行比较。表 2 显示了疫苗的稀释比例和中和抗体效价的常用对数值之间的关系。

对于稀释 8—32 倍的疫苗,由免疫接种测试疫苗和商购疫苗(相等的蛋白质含量)获得的抗血清的中和抗体效价的常用对数值之间的差异分别是约 0.38 到约 1.11。就是说,由测试疫苗免疫原获得的中和抗体效价是由商购疫苗免疫原获得的中和抗体效价的约 2—约 10 倍。此外,经

平行线测试推测的这些测量值的结果是, 计算的本发明的测试疫苗的效价(中和抗体效价)对商购疫苗的值是约 3 倍。

表 2

	蛋白质含量 μg/ml	疫苗稀释度	中和抗体效价 的常用对数值	差值 (A-B)
测试疫苗(A)	7.8	8	3.87	0.64
		16	3.51	0.38
		32	3.33	1.11
商购疫苗(B)	7.5	8	3.23	
		16	3.13	
		32	2.21	
参照疫苗	5.4	16	1.87	

差值(A-B): (A 的中和抗体效价)的常用对数值-在相同稀释度的(B 的中和抗体效价)的公用对数值。例如, 疫苗稀释度为 8 时, $3.87-3.24=0.64$ 。

蛋白质含量: 采用 TCA 蛋白质定量方法测定的值(用热三氯乙酸沉淀疫苗中的蛋白质, 并通过 Lowry 方法定量测定)。

实施例 5

基于交叉中和反应的测试疫苗之间的免疫原性差异:

将三个毒株(在 Vero-A 细胞传代四次的北京株, 和来源于泰国, 在 Vero-A 细胞传代二次的 ThCMAr67/93 和 ThCMAr44/92)用作为种病毒, 含有各个毒株的灭活病毒作为活性成分的测试疫苗按照实施例 1 描述的相同方法制备。之后, 以实施例 4 描述的相同方式测量和比较从用相应的疫苗免疫接种的小鼠获得的抗血清的中和抗体效价, 从而分析毒株之间的交叉反应。为了进行比较, 使用来源于鼠脑的含有北京株和 Nakayama 毒株的灭活的病毒作为活性成分的商购疫苗和作为参照疫苗的来源于鼠脑的含有 5.4 微克/毫升的 TCA 蛋白质的疫苗(北京株)。此外, 对于小鼠免疫接种, 将五个疫苗的每一个的 TCA 含量调节到约 7.5 微克/毫升, 然后将疫苗在 PBS 中稀释 16 倍。作为中和测试的攻击病毒,

使用上面提到的 4 个病毒, 即北京株, Nakayama 株, ThCMAr67/93 和 ThCMAr44/92。表 3 显示上面提到的用 PBS 稀释 16 倍的 5 个疫苗的结果。根据交叉反应谱, 北京株和 ThCMAr67/93 毒株的病毒抗原作为灭活的日本脑炎疫苗的灭活的免疫原是优异的。

表 3

疫苗	病毒			
	北京株	Nakayama 株	Ar67	Ar44
测试疫苗 (北京株)	3.68	3.04	2.87	2.66
商购疫苗 (北京株)	3.09	2.69	1.88	1.88
商购疫苗(Nakayama 株)	0.86	2.05	1.45	1.04
测试疫苗(Ar67)	2.84	3.15	3.02	2.97
参照疫苗 (北京株)	1.85	NT	NT	NT

Ar67: ThCMAr67/93 毒株, Ar44: ThCMAr44/92 毒株

测试疫苗: 在 Vero-A 细胞中生产的灭活疫苗

商购疫苗: 来源于鼠脑的灭活疫苗

参照疫苗: 来源于鼠脑的自制标准灭活疫苗

数值: 中和抗体效价的常用对数值(log)

NT: 未试验

实施例 6

测试二价疫苗的制备:

按照实施例 1 的相同方法制备北京株和 ThCMAr67/93 毒株的疫苗原液, 之后, 将各疫苗原液在 PBS 中稀释以获得 10 微克/毫克的蛋白质含量。然后, 将获得的溶液等量互相混合, 将混合物分散到试管以获得二价疫苗。该二价疫苗具有比相应的单价疫苗更宽的交叉反应谱。

实施例 7

诊断试剂的制备:

按照实施例 1 制备的北京株疫苗原液的 R 颗粒用作为治疗抗原, 采用上面描述的“病毒抗原量的测量”相同的方法进行 ELISA 测定其效果。作为比较对照抗原, 使用商购北京株疫苗的 MB 颗粒。作为抗体, 可以使用单克隆抗体 503(MAb503: 抗所有日本脑炎病毒共有和特异性的中和表位的抗体), MAb302(抗日本脑炎病毒群的特异性表位的抗体), 和多克隆抗体(PAb: 来源于小鼠的超免疫系统)。当抗原量保持不变时(蛋白质的量 7.6 微克/毫升), 系列稀释抗体并且测量 ELISA 的值。就 R 颗粒的 ELISA 值/MB 颗粒的 ELISA 值, Mab503 显示为 53/47, Mab302 显示为 226/22, PAb 显示为 120/52。基于这些结果, 判断 R 颗粒对 Mab302 和 PAb 的灵敏度比 MB 颗粒高约 2—10 倍。此外, 根据 MAb302 的结果可以认为本发明的抗原可用作为制备性检测日本脑炎病毒群的抗原。

工业实用性

根据本发明, 通过利用易于处理和非昂贵的细胞系替代昂贵的且饲养和控制困难的小鼠可以大规模生产病毒颗粒。由于没有杀死许多小鼠, 本发明对于动物保护是令人满意的。此外, 生产成本显著降低, 并且抗生物毒害的措施, 用于生产的操作程序, 纯化步骤, 质量控制, 生产计划等等也是显著节约了劳动力。根据本发明, 提供了显示的效价比常规的灭活疫苗高 2—10 倍的可用作增强免疫原的新的病毒颗粒及其生产方法。特别是, 根据本发明, 提供了具有作为用于日本脑炎病毒疫苗的免疫原和作为诊断试剂的抗原的免疫原性或抗原性的新的日本脑炎病毒颗粒, 及其生产方法。因此, 根据本发明, 提供了优质和廉价疫苗和诊断试剂, 可改进并迅速传播对由日本脑炎病毒群引起的感染疾病的预防和诊断。

序列表

<110> 财团法人阪大微生物病研究会

<120> 日本脑炎

<130> P98AF308-2

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1500

<212> DNA

<213>

<220> 日本脑炎病毒

<221> CDS

<222> (1)..(1500)

<400> 1

```

111 aac tgt ctg gga atg ggg aat cgg gat ttc ata gaa gga gcc agt 48
Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser
   1             5             10             15

gga gcc act tgg gtg gat ttg gtg tta gaa gga gat agt tgt ttg aca 96
Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr
           20             25             30

atc atg gca aac gac aaa cca aca cta gat glc cgc atg atc aac att 144
Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile
       35             40             45

gaa gct agc caa ctt gct gaa glc agg agt tac tgc tat cac gct tca 192
Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser
       50             55             60

gtc act gac att tca acg gtg gct cga tgc ccc acg act gga gaa gcc 240
Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala
       65             70             75             80

cac aac gag aaa cgt gct gac agc agc tac gtg tgc aaa caa ggc ttt 288
His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe
           85             90             95

```

act gac cgc gga tgg gga aat gga tgt gga ctt ttc ggg aaa gga agc	336
Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser	
100 105 110	
att gac aca tgc gca aaa ttt tct tgt acc agt aag gcc att gga aga	384
Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg	
115 120 125	
atg atc caa cca gag aac atc aag tac gag gtt ggc ata ttc glg cac	432
Met Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His	
130 135 140	
ggg acc acc acc tcg gaa aac cat ggg aat tac tca gcg caa gla gga	480
Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly	
145 150 155 160	
gcg tct caa gca gca aag ttt act gla act cca aac gct ccc tca ata	528
Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile	
165 170 175	
acc ctc aag ctt ggt gat tat gga gag gtc aca ctg gat tgt gaa cca	576
Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro	
180 185 190	
agg agt gga ctg aac act gaa gcg ttc tat glc atg acc glg ggt tcg	624
Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser	
195 200 205	
aag tca ttc tta glc cat agg gaa tgg ttc cat gac ctt tct ctt ccc	672
Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His Asp Leu Ser Leu Pro	
210 215 220	
tgg acg tcc cct tca agc acg gca tgg agg aac aga gaa ctc ctc atg	720
Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met	
225 230 235 240	
gaa ttt gaa gag gca cat gcc aca aaa caa tct glc gla gcc ctt ggg	768
Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly	
245 250 255	
tca cag gag gga ggc ctc cat caa gcg ttg gca gga gcc atc glg gtg	816
Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val	
260 265 270	
gag tac tcg agc tca glg aag tta aca tca ggt cac ctg aaa tgc agg	864
Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg	
275 280 285	

cta aaa alg gac aaa clg gcl clg aag ggc acg act tat ggc atg tgt	912
Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys	
290 295 300	
aca gaa aaa ttc tgc ttc gcg aaa aat cca gcg gac aca ggc cat gga	960
Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly	
305 310 315 320	
aca gtt gtc att gag ctc aca tat tct gga agc gat ggc tcc tgt aaa	1008
Thr Val Val Ile Glu Leu Thr Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Ser Cys Lys	
325 330 335	
att ccg att gtc tca gtt gcg agc ctc aat gac alg acc cct gtg ggg	1056
Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly	
340 345 350	
agg ctg gla aca gla aac ccc ttc gtt gcg aca tct agc tcc aac tca	1104
Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ser Asn Ser	
355 360 365	
aag glg ctg gtt gag atg gaa cct ccc ttc gga gac tct tat atc gtg	1152
Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val	
370 375 380	
gtt gga aga ggg gac aag cag att aac cat cac lgg cac aaa gcl gga	1200
Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly	
385 390 395 400	
agc acg ctg ggc aaa gcc ttc tca aca act ttg aaa ggg gct cag aga	1248
Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg	
405 410 415	
tta gca gcg cta ggt gac aca gcc lgg gac ttc ggc tcc att gga ggg	1296
Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly	
420 425 430	
gta ttc aac tcc ala ggg aaa gcl gtt cac caa gla ttt ggc ggt gca	1344
Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala	
435 440 445	
ttc aga acg ctc ttt ggg gga atg tct tgg atc aca caa gga cta atg	1392
Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met	
450 455 460	
ggg gcc ttg ctt ctt lgg atg ggt gtc aac gca cga gac cgg tca atc	1440
Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile	
465 470 475 480	

```

gcc cag gct ttt ttg gcc acg gga ggt glg ctc glg ttt tta gcg acc 1488
Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr
                     485                      490                      495

```

```

aat glg cat gcc 1500
Asn Val His Ala
                     500

```

<210> 2

<211> 500

<212> PRT

<213> 日本脑炎病毒

<400> 2

```

Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser
 1              5              10              15

```

```

Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr
          20              25              30

```

```

Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile
      35              40              45

```

```

Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser
 50              55              60

```

```

Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala
 65              70              75              80

```

```

His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe
      85              90              95

```

```

Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
      100              105              110

```

```

Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg
      115              120              125

```

```

Met Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His
      130              135              140

```

```

Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly
      145              150              155              160

```

```

Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile
      165              170              175

```

Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro
 180 185 190
 Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser
 195 200 205
 Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His Asp Leu Ser Leu Pro
 210 215 220
 Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met
 225 230 235 240
 Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly
 245 250 255
 Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val
 260 265 270
 Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg
 275 280 285
 Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys
 290 295 300
 Thr Gln Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly
 305 310 315 320
 Thr Val Val Ile Glu Leu Thr Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Ser Cys Lys
 325 330 335
 Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly
 340 345 350
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ser Asn Ser
 355 360 365
 Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 370 375 380
 Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly
 385 390 395 400
 Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg
 405 410 415
 Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
 420 425 430

Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala
435 440 445

Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met
450 455 460

Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile
465 470 475 480

Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr
485 490 495

Asn Val His Ala
500

<210> 3

<211> 1500

<212> DNA

<213> 日本脑炎病毒

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1500)

<400> 3

ttc aac tgt ctg gga atg ggc aat cgt gac ttc ala gaa gga gcc agt 48
Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser
1 5 10 15

gga gcc act tgg gtg gac ttg gtg cta gaa gga gac agc tgc ttg aca 96
Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr
20 25 30

atc atg gca aac gac aaa cca aca ttg gac gtc cgc atg atc aac atc 144
Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile
35 40 45

gaa gct agc caa ctt gct gag gtc aga agt tac tgc tat cat gct tca 192
Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser
50 55 60

gtc act gac atc tgg acg gtg gct cgg tgc ccc acg act gga gaa gcc 240
Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala
65 70 75 80

cac aac gag aag cga gct gat agt agc tat gtg tgc aaa caa ggc ttc 288
His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe
85 90 95

acg gat cgt ggg tgg ggc aac gga tgt gga ctt ttc ggg aag gga agt	336
Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser	
100 105 110	
att gac aca tgt gca aaa ttc tcc tgc acc agg aaa gcg att ggg aga	384
Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Arg Lys Ala Ile Gly Arg	
115 120 125	
aca atc cag cca gaa aac atc aaa tac gaa gtt ggc att ttt gtg cat	432
Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His	
130 135 140	
gga acc acc acg tgc gaa aac cat ggg aat tat tca gcg caa gtt ggg	480
Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly	
145 150 155 160	
gcg tcc cag gcg gca aag ttt aca gta aca cct aat gct cct tgc ata	528
Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile	
165 170 175	
acc ctc aaa ctt ggt gac tac gga gaa gtc aca ctg gac tgt gag cca	576
Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro	
180 185 190	
agg agt gga cta aac acg gaa gcg ttt tac gtc atg acc gtg ggg tca	624
Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser	
195 200 205	
aag tca ttt ttg gtc cat agg gaa tgg ttt cat gac ctc gct ctc cct	672
Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro	
210 215 220	
tgg acg ccc cct tgc agc aca gcg tgg aga aac aga gaa ctc ctc atg	720
Trp Thr Pro Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met	
225 230 235 240	
gaa ttt gaa gag gcg cac gcc aca aaa cag tcc gtt gtt gct ctt ggg	768
Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly	
245 250 255	
tca cag gaa gga ggc ctc cat cag gcg ttg gca gga gcc atc glg glg	816
Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val	
260 265 270	
gag tac tca agc tca gtg aag tta aca tca ggc cac cta aaa tgc agg	864
Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg	
275 280 285	

ctg aaa atg gac aaa ctg gct ctg aaa ggc aca acc tat ggt atg tgc	912
Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys	
290 295 300	
aca gaa aaa ttc tgc ttc gcg aaa aat ccg gcg gac act ggt cac gga	960
Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly	
305 310 315 320	
aca gtt gtc att gaa ctt tca tac tct ggg agt gat ggc ccc tgc aag	1008
Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys	
325 330 335	
att ccg att gtc tcc gtt gct agc ctg aat gac atg acc ccc glc ggg	1056
Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly	
340 345 350	
ccg ctg gtg aca gtg aac ccc ttc glc gcg act tcc agc gcc aac tca	1104
Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn Ser	
355 360 365	
aag gtg ctg gtc gag atg gaa ccc ccc ttc gga gac tcc tac atc gla	1152
Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val	
370 375 380	
gtt gga agg gga gac aag cag att aac cac cat tgg tac aag gct gga	1200
Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp Tyr Lys Ala Gly	
385 390 395 400	
agc acg ctg ggc aaa gcc ttt tca acg act ttg aag gga gct caa aga	1248
Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg	
405 410 415	
ctg gca gcg ttg ggc gac aca gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg	1296
Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly	
420 425 430	
gtc ttc aac tcc ata ggg aaa gct gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc	1344
Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala	
435 440 445	
ttc aga aca ctg ttt ggg gga atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg	1392
Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met	
450 455 460	
ggg gcc cta cta ctt tgg atg ggc atc aac gca cga gac cga tca att	1440
Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile	
465 470 475 480	

gct ttg gcc ttc tta gcc aca gga ggt glg ctc glg ttc tta gct acc 1488
 Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr
 485 490 495

aat glg cat gct 1500
 Asn Val His Ala
 500

<210> 4
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 日本脑炎病毒

<400> 4
 Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr
 20 25 30
 Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile
 35 40 45
 Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser
 50 55 60
 Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala
 65 70 75 80
 His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe
 85 90 95
 Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110
 Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Arg Lys Ala Ile Gly Arg
 115 120 125
 Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His
 130 135 140
 Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly
 145 150 155 160
 Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile
 165 170 175

Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro
 180 185 190
 Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser
 195 200 205
 Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro
 210 215 220
 Trp Thr Pro Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met
 225 230 235 240
 Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly
 245 250 255
 Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val
 260 265 270
 Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg
 275 280 285
 Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys
 290 295 300
 Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly
 305 310 315 320
 Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys
 325 330 335
 Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly
 340 345 350
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn Ser
 355 360 365
 Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 370 375 380
 Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp Tyr Lys Ala Gly
 385 390 395 400
 Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg
 405 410 415
 Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
 420 425 430

Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala
435 440 445

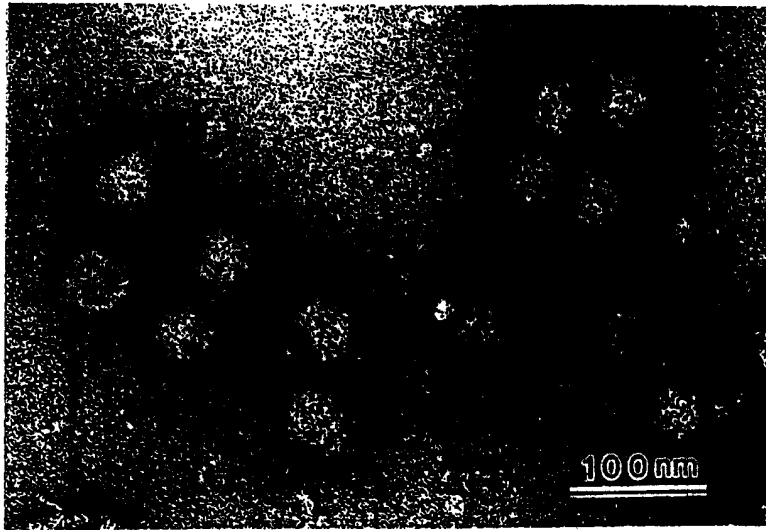
Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met
450 455 460

Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile
465 470 475 480

Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr
485 490 495

Asn Val His Ala
500

A



B

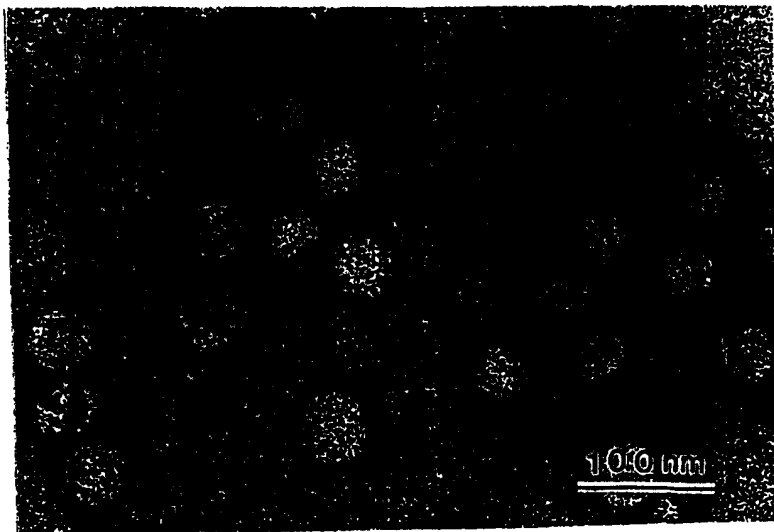


图1