



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109232734 B

(45) 授权公告日 2021.10.22

(21) 申请号 201710555874.7

A61K 39/42 (2006.01)

(22) 申请日 2017.07.10

A61P 31/20 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109232734 A

(56) 对比文件

CN 105891491 A, 2016.08.24

CN 104928258 A, 2015.09.23

(43) 申请公布日 2019.01.18

CN 105695420 A, 2016.06.22

(73) 专利权人 洛阳普泰生物技术有限公司

WO 9940438 A1, 1999.08.12

地址 471003 河南省洛阳市中国(河南)自

WO 2006106424 A2, 2006.10.12

由贸易试验区洛阳片区高新区华夏路  
6号

CN 104237512 A, 2014.12.24

钟志宏 等. “犬腺病毒1型和2型的差异”.

(72) 发明人 田克恭 王莹 郝丽影

《中国畜禽传染病》.1990, (第5期), 第59-62页.

(74) 专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11017

C.A. WHETSTONE. “Monoclonal Antibodies  
to Canine Adenoviruses 1 and 2 that are  
Type-Specific by Virus Neutralization and  
Immunofluorescence”.《Veterinary  
Microbiology》.1988, 第16卷第1-8页.

代理人 韩登营

审查员 赵二双

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

权利要求书2页 说明书18页

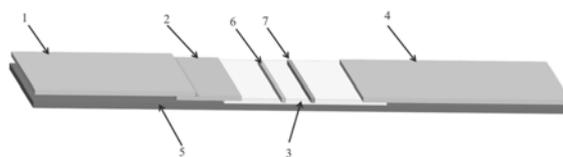
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

特异性结合犬腺病毒的单克隆抗体、药物组  
合物、试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了具有特异性结合犬腺病毒的  
鼠单克隆抗体的可变区序列、特异性结合犬腺病  
毒的抗体,该抗体可以用于制备试剂盒和药物组  
合物。本发明的试剂盒克服了现有技术检测灵敏  
度低的问题,避免了漏检、假阴性现象发生,可检  
测多种靶标,且具有快速、简便、准确的优势;本  
发明的药物组合物能有效预防和治疗CAV-1、  
CAV-2导致的疾病。



1. 一种特异性结合犬腺病毒的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段重链可变区氨基酸序列为SEQ.ID No.2所示的氨基酸序列;以及所述抗体或抗体片段轻链可变区氨基酸序列为SEQ.ID No.4所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体为单克隆抗体、基因工程抗体;其中,所述基因工程抗体包括单链抗体、嵌合单克隆抗体、改形单克隆抗体、犬源单克隆抗体或所述抗体的片段;所述抗体或所述抗体的片段仍保持特异性结合犬腺病毒的能力。

3. 根据权利要求2所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体为单克隆抗体1A1。

4. 一种特异性结合犬腺病毒的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段重链可变区氨基酸序列为SEQ.ID No.6所示的氨基酸序列;以及所述抗体或抗体片段轻链可变区氨基酸序列为SEQ.ID No.8所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求4所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体为单克隆抗体、基因工程抗体;其中,所述基因工程抗体包括单链抗体、嵌合单克隆抗体、改形单克隆抗体、犬源单克隆抗体或所述抗体的片段;所述抗体或所述抗体的片段仍保持特异性结合犬腺病毒的能力。

6. 根据权利要求5所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体为单克隆抗体5G4。

7. 一种药物组合物,其中,所述药物组合物中包含免疫量的权利要求6所述的单克隆抗体5G4,以及药学上可接受的载体。

8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含免疫量的所述单克隆抗体5G4和权利要求3所述单克隆抗体1A1。

9. 一种药物组合物,其中,所述药物组合物包含免疫量的所述单克隆抗体1A1的重链可变区和所述单克隆抗体5G4的轻链可变区序列制备的单链抗体,以及药学上可接受的载体。

10. 一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的权利要求3所述的单克隆抗体1A1、有效量的权利要求6所述的单克隆抗体5G4,以及对犬腺病毒抗原抗体反应进行检测的检测试剂;其中,所述试剂盒包括胶体金检测试纸条,所述胶体金检测试纸条包括部件:底板(5),所述底板(5)具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向上依次有样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4),所述硝酸纤维素膜(3)与金标垫(2)接触或与样品垫(1)、金标垫(2)接触使得犬腺病毒抗原与所述单克隆抗体5G4的结合体能在其上向底板第二端迁移;所述金标垫(2)上含有胶体金标记的所述单克隆抗体5G4,所述硝酸纤维素膜上包括一条检测线(6)和一条质控线(7),所述检测线(6)上固定化有权利要求3所述的单克隆抗体1A1,所述质控线(7)上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗;其中,所述有效量的所述单克隆抗体1A1为1.0-2.2mg/ml,所述有效量的所述单克隆抗体5G4为15-80 $\mu$ g/ml。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒,其中,沿所述第一端向第二端的方向上依次排列的样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4)相邻的部件相互接触,而不相邻的部件之间不接触。

12. 一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的权利要求3所述单克隆抗体1A1、单克隆抗体10B11和/或6E11,有效量的权利要求6所述单克隆抗体5G4、单克隆抗体10H4和/或1G5,和对犬腺病毒、犬细小病毒、犬瘟热病毒抗原抗体反应进行检测的检测试剂;其中,所述试剂盒包括胶体金检测试纸条,所述胶体金检测试纸条包括底板(5),所述底板(5)具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向上依次有样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4),所述硝酸纤维素膜(3)与金标垫(2)接触或与样品垫(1)、金标垫

(2) 接触使得与犬腺病毒抗原、犬细小病毒抗原和/或犬瘟热病毒抗原分别与所述单克隆抗体5G4、10H4和/或1G5的结合体能在其上向底板第二端迁移;所述金标垫(2)上含有胶体金标记的所述单克隆抗体5G4、10H4和/或1G5,所述硝酸纤维素膜(3)上包括二条或三条检测线和一条质控线(7),所述二条或三条检测线上分别固定化有所述单克隆抗体1A1、10B11和/或6E11,所述质控线(7)上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗;

其中,所述单克隆抗体1A1含量为1.0-2.2mg/ml,所述单克隆抗体5G4胶体金标记时含量为15-80 $\mu$ g/ml,所述相邻的所述检测线之间、离所述质控线最近的检测线与质控线之间的距离 $>4$ mm。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒,其中,从所述底板(5)第一端向第二端的方向上仅有二条检测线6A、6B,所述单克隆抗体1A1固定在所述检测线6A或6B上,另一所述固定单克隆抗体10H4或1G5则固定在所述检测线6B或6A上。

14. 根据权利要求12所述的试剂盒,其中,从所述底板(5)第一端向第二端的方向上有三条检测线6A、6B、6C,所述单克隆抗体1A1、10H4和1G5可以任一排列方式分别固定在所述检测线6A、6B、6C上。

15. 根据权利要求10-14任一项所述试剂盒在用于非诊断目的的犬腺病毒检测中的应用;其中,所述非诊断目的的犬腺病毒检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测。

16. 根据权利要求7或8所述药物组合物在制备预防和/或治疗犬腺病毒感染相关疾病的药物中的应用。

17. 根据权利要求9所述药物组合物在制备预防和/或治疗犬腺病毒感染相关疾病的药物中的应用。

## 特异性结合犬腺病毒的单克隆抗体、药物组合物、试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及犬腺病毒单克隆抗体,以及使用该单克隆抗体制备的药物组合物、试剂盒及其应用,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 犬腺病毒(Canine adenovirus,CAV)是哺乳动物腺病毒属中致病性最强的一种病毒,包括2个血清型即犬腺病毒1型(Canine adenovirus type I,CAV-1)和犬腺病毒2型(Canine adenovirus type II,CAV-2),其中CAV-1主要引发犬传染性肝炎及熊、狐的脑炎,CAV-2主要引起犬传染性喉气管炎和幼犬肺炎。犬腺病毒病呈全球分布,且不同品种、年龄和性别的犬均可感染,一年四季均可发生,以刚离乳到一岁以内的幼犬的感染率和死亡率最高(高达25%~40%),于犬中的阳性率高达40%。感染犬的临床表现较为复杂,包括呕吐、腹痛、腹泻、体温升高甚至突然死亡、眼睛损伤,或持续性高热、咳嗽、浆液性至粘液性鼻漏、扁桃体炎、喉气管炎和肺炎等呼吸道症状,若与其它病毒如犬瘟热病毒、犬细小病毒、犬副流感病毒,或细菌如犬波氏杆菌混合感染或继发感染,则会加重上述疾病,并导致临床诊断困难,是养犬业、毛皮动物养殖业危害最大的疫病之一。另外,犬作为一种与人类接触最为亲密的、与人类相处时间最长的宠物之一,与人类的日常生活已密不可分,其健康状况往往与人类自身的健康状况息息相关,因此,关注犬的健康对于动物福利和人类健康具有重要的公共卫生意义。

[0003] 目前,CAV的检测方法包括病毒分离、聚合酶链式反应PCR等方法,但这些方法各有缺点,病毒分离鉴定试验过程繁琐,耗时过长,通过肉眼观察较为主观;以聚合酶链式反应PCR为主的分子生物学方法对技术和设备要求均较高,这些检测方法难以在兽医临床现场应用。

[0004] 免疫胶体金技术自问世以来得到迅速发展,在动物疫病检测领域应用广泛,特别是该技术具有操作简单、检测快速灵敏、结果清晰易于判断、无需仪器设备等优点,适合临床的快速诊断和基层流行病学调查的大规模应用。而目前商品化的CAV胶体金检测试纸条价格昂贵且灵敏度低,导致检测结果存在假阳性,使得检测对象未及时得到医治,存在散毒、群发感染的危险。因此,急需研制一种快速简便的产品以用于临床诊断。

[0005] 另外,犬只特别是幼犬发病时,即使免疫现有疫苗也难以在短时间产生较高的抗体使得发病犬获得保护,而中和活性良好的单抗可以大大提高该病的治愈率,因此,治疗性单抗对该病的治疗和控制具有重要的意义。

### 发明内容

[0006] 为解决现有技术的不足,本发明提供了一对犬腺病毒单克隆抗体,以及含单克隆抗体的试剂盒、药物组合物及其应用。

[0007] 本发明涉及一种特异性结合犬腺病毒的鼠单克隆抗体1A1的可变区序列,该序列

能使得抗体特异性结合犬腺病毒。并对CAV-2具有高的中和活性。

[0008] 本发明还涉及具有上述可变区序列的抗体或其片段,所述抗体或其片段保持特异性结合犬腺病毒的能力。

[0009] 本发明还涉及一种特异性结合犬腺病毒的鼠单克隆抗体5G4的可变区序列,该序列能使得抗体特异性结合犬腺病毒。并对CAV-1具有高的中和活性。

[0010] 本发明还涉及具有上述可变区序列的抗体或其片段,所述抗体或其片段仍保持特异性结合犬腺病毒的能力。

[0011] 本发明还涉及一种药物组合物,其中,所述药物组合物包含有效量的含有所述的抗体或所述抗体的片段,以及药学上可接受的载体。本发明的药物组合物,弥补现有疫苗单一的预防和治疗作用,能同时预防和治疗CAV1、CAV2,可用于紧急治疗该病,减少了发病率、降低了死亡率。

[0012] 本发明还涉及所述药物组合物在制备预防和/或治疗犬腺病毒感染相关疾病的药物中的应用。

[0013] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的单克隆抗体1A1,和/或有效量的单克隆抗体5G4,用于和犬腺病毒进行抗原抗体反应进行检测的检测试剂。本发明的试剂盒能快速、准确地对CAV-1、CAV-2进行检测,大大降低了假阴性。

[0014] 本发明的含有所述单克隆抗体对的试剂盒,能使用同一样本进行CAV-1、CAV-2两种病毒的检测,方便省时;本发明的试剂盒克服了现有技术检测灵敏度低的问题,避免了漏检、假阴性现象发生,可检测多种靶标,且具有快速、简便、准确的优势。

[0015] 本发明还涉及所述试剂盒在用于非诊断目的的犬腺病毒检测中的应用。

## 附图说明

[0016] 图1为本发明胶体金试纸条的第一种实施方式的示意图;

[0017] 图2为本发明胶体金试纸条的第二种实施方式的示意图;

[0018] 图3为本发明胶体金试纸条的第三种实施方式的示意图;

[0019] 附图标记:样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4、底板5、检测线6、检测线6A、检测线6B、检测线6C、质控线7。

## 具体实施方式

[0020] 以下,对本发明的实施方式进行说明。

[0021] 本发明涉及一种特异性结合犬腺病毒的单克隆抗体1A1的可变区序列,其中,1)重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No.2所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变体;2)轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No.4所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变体。

[0022] 术语“犬腺病毒”(Canine adenovirus)属于腺病毒属(Adenovirus),是哺乳动物腺病毒属中致病性最强的一种病毒,包括2个血清型即犬腺病毒1型(Canine adenovirus type I,CAV-1)和犬腺病毒2型(Canine adenovirus type II,CAV-2),其中CAV-1又称为犬传染性肝炎病毒(Infectious canine hepatitis virus,ICHV)感染犬、熊、狐狸等并引发

犬传染性肝炎及熊、狐的脑炎,CAV-2感染可引起犬的传染性喉气管炎及幼犬肺炎,临床症状主要包括呕吐、腹痛、腹泻、体温升高甚至突然死亡、眼睛损伤,或持续性高热、咳嗽、浆液性至粘液性鼻漏、扁桃体炎、喉气管炎和肺炎等呼吸道症状等。

[0023] 术语“单克隆抗体”是指获自基本上同源的抗体群的抗体,即组成该群体的抗体个体都相同,除了可能存在少量可能的自发突变。因此,修饰语“单克隆”是指该抗体的性质不是离散抗体的混合物。优选地,所述单克隆抗体包括单价的或是单链抗体、双链抗体、嵌合抗体、人源化抗体以及上述抗体的衍生物、功能等同物和同源物,也包括抗体片段和含有抗原结合结构域的任何多肽。抗体为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任意特异性结合因子,因而,这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物、人源化抗体以及抗体的功能等同物和同源物,也包括含有抗原结合结构域的任何多肽,无论是天然的还是合成产生的。抗体的实例是免疫球蛋白亚型(如IgG,IgE,IgM,IgD和IgA)及其亚型亚类;也可以是包含抗原结合结构域的片段如Fab、scFv、Fv、dAb、Fd;和双链抗体(diabodies)。融合至另一多肽的、包含抗原结合结构域的嵌合体分子或者等同物也包括在其中。嵌合抗体的克隆与表达在EP.A.0120694和EP.A.0125023中描述。抗体可以通过许多方式修饰,可用DNA重组技术来产生保留原来抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。这种技术可以包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补性决定区(CDRs)的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区,参见EP.A.184187,GB2188638A或EP.A.239400。还可以对杂交瘤细胞或产生抗体的其它细胞进行遗传突变或其它改变,这可以改变或者不改变所产生抗体的结合特异性。用于本发明的“单克隆抗体”也可用杂交瘤方法制得,因为编码本发明鼠源化抗体的DNA序列可用本领域技术人员熟知的常规手段,如根据本发明公开的氨基酸序列人工合成核苷酸序列或用PCR法扩增得到,因而也可用重组DNA方法,可用本领域熟知的各种方法将该序列连入合适的表达载体中。最后,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞,然后本领域技术人员应用熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的单克隆抗体。抗体包含通过二硫桥连接在一起的多肽链几何体,称为轻链和重链的两条多肽主链构成抗体的所有主要结构类别(同型物)。重链和轻链都进一步可分为称作可变区和恒定区的一些亚区。重链包括单个的可变区和三个不同的恒定区,轻链则包括单个可变区(不同于重链的可变区)和单个恒定区(不同于重链的恒定区)。重链和轻链的可变区负责抗体的结合特异性。

[0024] 术语“重链可变区”是指一种多肽,其长度为110至125个氨基酸,其氨基酸顺序相应于本发明单克隆抗体从重链N末端氨基酸开始的重链氨基酸顺序。同样,术语“轻链可变区”是指一种多肽,其长度为95至115个氨基酸,其氨基酸顺序相应于本发明单克隆抗体从轻链N末端氨基酸开始的轻链氨基酸顺序。本领域普通技术人员显然知晓,在本发明所具体公开的单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列基础上,可以通过常规基因工程和蛋白质工程方法进行一个或多个氨基酸的添加、删除、替换等修饰,获得保守性变异体,而仍能够保持与犬腺病毒特异性结合。本发明中的单克隆抗体还包括其活性片段或保守性变异体。

[0025] 术语“保守性变异体”是指基本上保留了其母本的特性,如基本的免疫学生物特性、结构特性、调节特性或生化特性的变异体。一般地,多肽的保守性变异体之氨基酸序列不同于母本多肽,但是差异是有限的,以使与母本多肽之序列与保守性变异体总体上非常相似,并且在许多区域是相同的。保守性变异体和母本多肽氨基酸序列上的差异可以是例

如：一个或多个氨基酸残基及其任意组合的替换、添加和删除。替换或插入的氨基酸残基可由遗传密码编码，也可不由遗传密码编码。多肽的保守性变异体可以自然产生，或者它可以是非自然产生的变异体。多肽之非自然产生的保守性变异体可通过诱变技术或直接合成而产生。

[0026] 本发明涉及一种特异性结合犬腺病毒的抗体或抗体片段，其中，所述抗体或抗体片段重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 2所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变异体；以及所述抗体或抗体片段轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 4所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变异体。

[0027] 作为本发明的一种实施方式，所述抗体为单克隆抗体、基因工程抗体；其中，所述基因工程抗体包括单链抗体、嵌合单克隆抗体、改形单克隆抗体、犬源单克隆抗体或所述抗体的片段；所述抗体或所述抗体的片段仍保持特异性结合犬腺病毒的能力。

[0028] 作为本发明的一种实施方式，所述抗体为单克隆抗体1A1，所述单克隆抗体1A1重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 2所示的氨基酸序列，其轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 4所示的氨基酸序列。

[0029] 所述单克隆抗体1A1，重链可变区的氨基酸序列为SEQ. ID No. 2，轻链可变区的氨基酸序列为SEQ. ID No. 4；对CAV-1、CAV-2的HI效价均 $\geq 1:5120$ ，IPMA效价均 $\geq 1:1280$ ，与CAV-1、CAV-2均具有良好的反应性；对CAV-1、CAV-2的中和效价分别为1:160、1:20480，对于CAV-2具有很高的中和活性。

[0030] 本发明涉及一种特异性结合犬腺病毒的单克隆抗体5G4的可变区序列，其中，1) 重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 6所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变异体；2) 轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 8所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变异体。

[0031] 本发明涉及一种特异性结合犬腺病毒的抗体或抗体片段，其中，所述抗体或抗体片段重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 6所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变异体；以及所述抗体或抗体片段轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 8所示的氨基酸序列或该序列经过一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰保守性突变获得的保守性变异体。

[0032] 作为本发明的一种实施方式，所述抗体为单克隆抗体、基因工程抗体；其中，所述基因工程抗体包括单链抗体、嵌合单克隆抗体、改形单克隆抗体、犬源单克隆抗体或所述抗体的片段；所述抗体或所述抗体的片段仍保持特异性结合犬腺病毒的能力。

[0033] 作为本发明的一种实施方式，所述抗体为单克隆抗体5G4，所述单克隆抗体5G4重链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 6所示的氨基酸序列，轻链可变区氨基酸序列为SEQ. ID No. 8所示的氨基酸序列。

[0034] 所述单克隆抗体5G4，重链可变区的氨基酸为SEQ. ID No. 6，和/或轻链可变区的氨基酸序列为SEQ. ID No. 8；对CAV-1、CAV-2的HI效价均 $\geq 1:5120$ ，IPMA效价均 $\geq 1:1280$ ，与CAV-1、CAV-2均具有良好的反应性；对CAV-1、CAV-2的中和效价分别为1:10240、1:160，对于CAV-1具有很高的中和活性。

[0035] 本发明还涉及一种药物组合物,其中,所述药物组合物中包含免疫量的所述单克隆抗体5G4,以及药学上可接受的载体。

[0036] 本发明的药物组合物能有效预防和治疗CAV1感染,实现对犬只的完全保护和治疗。

[0037] 本发明还涉及一种药物组合物,其中,所述药物组合物中包含免疫量的所述单克隆抗体1A1和所述单克隆抗体5G4,以及药学上可接受的载体。

[0038] 本发明还涉及一种药物组合物,其中,所述药物组合物包含免疫量的所述单克隆抗体1A1的重链可变区和所述单克隆抗体5G4的轻链可变区序列制备的单链抗体,以及药学上可接受的载体。

[0039] 本发明的药物组合物能同时有效预防和治疗CAV1、CAV2感染,实现对犬只针对两种病毒的完全保护和治疗。

[0040] 术语“免疫量”当理解为“预防有效量”时,是指能够在接种的个体中足以引发免疫保护反应的量。本领域技术人员知晓,所述“预防有效量”随免疫接种的方式、时机、给药对象以及所述单克隆抗体或其片段的不同而不同,结合本领域已知的文献和教导以及相应的临床规范,本领域技术人员应当能够通过有限的试验得出所用单克隆抗体的“预防有效量”。

[0041] 术语“免疫量”当理解为“治疗有效量”时,是指能够对受试个体产生有效保护以及中和病毒的量。本领域技术人员知晓,所述“治疗有效量”随治疗方案、病程、治疗对象的状况以及所用单克隆抗体或其片段的不同而不同。结合本领域已知的文献和教导以及相应的临床规程,临床技术人员应当能够凭借其经验得出所用单克隆抗体的“治疗有效量”。

[0042] 术语“药学上可接受的载体”是指不刺激机体不阻碍使用化合物的生物学活性和特性的载体或者稀释剂。

[0043] 作为本发明的一种优选实施方式,所述药物经肌肉注射给药。

[0044] 作为本发明的一种优选实施方式,所述药物包括但不限于粉末剂、颗粒剂、丸剂、片剂、胶囊剂。

[0045] 术语“预防和/或治疗”在涉及犬腺病毒感染时是指抑制犬腺病毒的复制、抑制犬腺病毒的传播或防止犬腺病毒在其宿主体内定居,以及减轻犬腺病毒感染的疫病或病症的症状。若病毒荷载量减少、病症减轻和/或摄食量和/或生长增加,那么就可以认为所述治疗达到了治疗效果。

[0046] 本发明的药物组合物能够同时对CAV-1、CAV-2病毒有效中和,能有效治疗和预防两种病毒导致的疾病。

[0047] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的所述单克隆抗体1A1、有效量的所述单克隆抗体5G4,以及对犬腺病毒抗原抗体反应进行检测的检测试剂;其中,所述试剂盒包括胶体金检测试纸条,所述胶体金检测试纸条包括部件:底板(5),所述底板(5)具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向上依次有样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4),所述硝酸纤维素膜(3)与金标垫(2)接触或与样品垫(1)、金标垫(2)接触使得犬腺病毒抗原与所述单克隆抗体5G4的结合体能在其上向底板第二端迁移;所述金标垫(2)上含有胶体金标记的所述单克隆抗体5G4,所述硝酸纤维素膜上包括一条检测线(6)和一条质控线(7),所述检测线(6)上固定化有所述单克隆抗体1A1,所

述质控线(7)上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗;其中,所述有效量的所述单克隆抗体1A1为1.0-2.2mg/ml,所述有效量的所述单克隆抗体5G4为15-80 $\mu$ g/ml。

[0048] 作为本发明的一种实施方式,所述试剂盒中沿所述第一端向第二端的方向上依次排列的样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4)相邻的部件相互接触,而不相邻的部件之间不接触。

[0049] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的所述单克隆抗体1A1、10B11和/或6E11,有效量的所述单克隆抗体5G4、10H4和/或1G5,和对犬腺病毒、犬细小病毒、犬瘟热病毒抗原抗体反应进行检测的检测试剂;其中,所述试剂盒包括胶体金检测试纸条,所述胶体金检测试纸条包括底板(5),所述底板(5)具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向上依次有样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸水垫(4),所述硝酸纤维素膜(3)与金标垫(2)接触或与样品垫(1)、金标垫(2)接触使得与犬腺病毒抗原、犬细小病毒抗原和/或犬瘟热病毒抗原分别与所述单克隆抗体5G4、10H4和/或1G5的结合体能在其上向底板第二端迁移;所述金标垫(2)上含有胶体金标记的所述单克隆抗体5G4、10H4和/或1G5,所述硝酸纤维素膜(3)上包括二条或三条检测线和一条质控线(7),所述二条或三条检测线上分别固定化有所述单克隆抗体1A1、10B11和/或6E11,所述质控线(7)上固定化有羊抗鼠多抗或羊抗鼠二抗;其中,所述单克隆抗体1A1含量为1.0-2.2mg/ml,所述单克隆抗体5G4胶体金标记时含量为15-80 $\mu$ g/ml,所述相邻的所述检测线之间、离所述质控线最近的检测线与质控线之间的距离 $>4$ mm。

[0050] 所述犬细小病毒单克隆抗体10B11由小鼠骨髓杂交瘤细胞10B11株分泌,所述小鼠骨髓杂交瘤细胞10B11株保藏号为CCTCC No:C201578;所述犬细小病毒单克隆抗体10H4由小鼠骨髓杂交瘤细胞10H4株分泌,所述小鼠骨髓杂交瘤细胞10H4株保藏号为CCTCC No:C201579;公开于专利申请CN104928258A。

[0051] 所述犬瘟热病毒单克隆抗体6E11由小鼠骨髓杂交瘤细胞6E11株分泌,所述小鼠骨髓杂交瘤细胞6E11株保藏号为CCTCC No:C2015202;所述犬瘟热病毒单克隆抗体1G5由小鼠骨髓杂交瘤细胞1G5株分泌,所述小鼠骨髓杂交瘤细胞1G5株保藏号为CCTCC No:C2015201;公开于专利申请CN105695420A。

[0052] 作为本发明的一种实施方式,从所述底板(5)第一端向第二端的方向上仅有二条检测线6A、6B,所述单克隆抗体1A1固定在所述检测线6A或6B上,另一所述固定单克隆抗体10H4或1G5则固定在所述检测线6B或6A上。

[0053] 作为本发明的一种实施方式,从所述底板(5)第一端向第二端的方向上有三条检测线6A、6B、6C,所述单克隆抗体1A1、10H4和1G5可以任一排列方式分别固定在所述检测线6A、6B、6C上。

[0054] 本发明还涉及所述试剂盒的检测方法,其中,所述方法包括:将采集的样品插入到样品处理管中,使样品尽可能溶解在样品处理液中,将处理后的样品滴加至胶体金检测试纸条加样孔中心,10分钟后判定结果。

[0055] 本发明还涉及所述抗体或抗体片段用于犬腺病毒抗原表位鉴定研究以及定性和定量鉴别检验含犬腺病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中的犬腺病毒抗原的检测;所述抗体或抗体片段为单克隆抗体1A1或5G4。

[0056] 本发明还涉及所述试剂盒在用于非诊断目的的犬腺病毒检测中的应用。其中,所

述非诊断目的的犬腺病毒检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测。

[0057] 本发明还涉及所述药物组合物在制备预防和/或治疗犬腺病毒感染相关疾病的药物中的应用。

[0058] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0059] 本发明实例中所用的样品保存液为PBS缓冲液(pH7.4,0.01mol/L),其1L体积配方为:NaCl 8.0g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g,但该实施方式无论在任何情况下均不构成对本发明的限定。

[0060] 本发明中所用的化学试剂均为分析纯,购自国药集团。

[0061] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于本发明而不用于限制本发明的范围。本发明所述的实验方法,若无特殊说明,均为常规方法;所述的生物材料,若无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0062] 实施例1现有产品检测临床样品结果分析

[0063] 将收集的193份临床犬、狐狸病料经世纪元亨CAV PCR检测试剂盒按照说明书检测后发现124份阳性含95份CAV-1阳性及29份CAV-2阳性,69份阴性,同时经商品化韩国安捷CAV-CDV胶体金试纸条、美国艾博CAV胶体金检测试纸条按照各自试剂盒说明书进行检测,结果见表6。发现:商品化试纸条检测与PCR的阳性符合率仅为12%~19%,总符合率仅为44%~48%,存在严重的漏检、假阴性现象,从而误导医者或养殖者使其放松警惕、不能及早预防和治疗。通过跟踪调查发现,漏检、假阴性犬、狐狸,随后感染更为严重患病,并且其排泄物或分泌物作为传染源导致群发感染,严重者因未给予及时治疗从而导致死亡。基于此,本发明人开展研究犬腺病毒单克隆抗体及相关产品。

[0064] 实施例2犬腺病毒单克隆抗体的制备、纯化、鉴定及检验

[0065] 2.1犬腺病毒单克隆抗体的制备和纯化

[0066] 培养犬腺病毒并按照马志勇等(马志勇等.犬传染性肝炎病毒单克隆抗体的研究.中国畜禽传染病,1991,3(58):56-58)中的方法纯化病毒,将其与弗氏佐剂乳化,按终含量 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 免疫小鼠,四免后将小鼠进行细胞融合。用HI方法(将购自ATCC的CAV-1Utrecht株、CAV-2Toronto A26/61株用人“O”型红细胞按照《中国兽药典》2015版进行红细胞凝集试验即HA试验,根据结果制备8单位抗原,之后分别将待检样品进行红细胞凝集抑制试验即HI效价检测,按照《中国兽药典》2015版进行)进行亚克隆筛选,获得10株阳性杂交瘤细胞。同时,为避免筛选的阳性杂交瘤细胞存在假阳性、筛选方法单一造成所筛选杂交瘤细胞所针对的抗原谱单一、漏筛等现象发生,同时将以CAV-1Utrecht株、CAV-2Toronto A26/61株引发病变的MDCK细胞包被于玻片进行免疫过氧化物酶单层细胞试验即IPMA方法复筛,共获得5株阳性杂交瘤细胞,并对其细胞上清进行HI、IPMA评价。结果见表1。

[0067] 表1CAV-1、CAV-2通用型单克隆抗体上清评价信息

序号	细胞株	HI 效价			IPMA 效价	中和活性	
		CAV-1	CAV-2	CAV-2(Toronto)	CAV-1(Urtecht)	CAV-1(Urtecht)	CAV-21(40724)
1	1A1	1:80	1:256	1:256	1:20	无	有
2	3C12	1:40	1:2	1:2	1:10	无	无
3	5E8	1:40	1:32	1:32	1:20	无	有
4	5B2	1:40	1:256	1:256	1:20	无	有
5	2H10	1:80	1:2	1:4	1:40	有	无
6	2A3	1:20	1:16	1:16	1:10	有	有
7	1D9	1:40	1:32	1:32	1:20	有	有
8	2G4	1:20	1:160	/	1:20	有	有
9	5F2	1:32	1:128	1:128	1:40	有	有
10	4D10	1:128	1:256	1:256	1:40	有	有
11	5F12	1:64	1:128	1:34	1:80	无	有
12	5G4	1:20	1:160	1:256	1:80	有	无
13	1H3	1:160	1:320	1:256	1:160	有	有

[0068] 根据表1结果,从10株中挑选HI、IPMA效价均高的5株即1A1、2G4、5F2、5F12、5G4于小鼠体内制备腹水,制备腹水过程中发现1株2G4所对应的小鼠未产生腹水,1株5F2所产腹水较快且腹水量仅为1.5ml,3株即1A1、5F12、5G4所产腹水相当均为10ml,经HI、IPMA评价发现1株5F12对CAV-1、CAV-2的HI效价均 $\leq 1:160$ 、IPMA效价均 $\leq 1:40$ ,而2株1A1、5G4对CAV-1、CAV-2的HI效价均 $\geq 1:5120$ 、IPMA效价均 $\geq 1:1280$ ,表明2株1A1、5G4与CAV-1、CAV-2均具有良好的反应性。故用辛酸-硫酸铵联合沉淀法纯化单克隆抗体1A1、5G4的腹水,之后用SDS-PAGE凝胶电泳进行鉴定,结果:单克隆抗体1A1、5G4的纯度均不低于85%;用BCA蛋白定量试剂盒按照说明书分别进行定量分析,结果:单克隆抗体1A1、5G4的浓度分别为5.8、5.0mg/ml。

[0070] 2.2犬腺病毒单克隆抗体特性的鉴定

[0071] 亚型:用Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit并参照说明书对抗体的亚型进行鉴定。结果:单克隆抗体1A1、5G4的重链亚型分别为IgG1、IgG2a,轻链亚型均为kappa。

[0072] 特异性:按照罗国良等(李晓叶,刘颖等.抗犬1型腺病毒单克隆抗体的制备及生物学特性鉴定.中国农学通报,2011,27(11):31-34)文献的操作方法,将CAV-1、CAV-2、犬瘟热病毒CDV、犬细小病毒CPV、犬副流感病毒CPIV、猫细小病毒FPV、猫杯状病毒FCV以及培养CAV用MDCK细胞分别包被于玻片上进行IPMA检测,用于测定单克隆抗体的特异性。结果:单克隆抗体1A1、5G4与犬常见病毒CDV、CPV、CPIV、FPV、FCV及MDCK细胞均无交叉反应,仅与CAV-1、CAV-2呈阳性反应,表明:单克隆抗体1A1、5G4均为犬腺病毒的特异性单克隆抗体。

[0073] 中和活性:按《中国兽药典》2015版所述中和试验法中的固定病毒稀释血清法分别测定单克隆抗体1A1、5G4对CAV-1、CAV-2的中和效价,具体为:将实施例1.1制备的纯化后的2株单克隆抗体自1:100开始2倍倍比稀释,用含100个TCID<sub>50</sub>的病毒与稀释后的腹水等量混

合,每个滴度重复4孔;同时设健康细胞、阳性对照。置37℃作用1h后,再将细胞消化后计算,用含8%血清的培养基稀释至 $2 \times 10^4$ 个细胞/ml,100 $\mu$ l/孔加入以上96孔细胞培养板,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养5d,观察细胞病变情况。结果:对照均成立,根据细胞病变情况计算腹水的中和效价,发现单克隆抗体1A1对CAV-1、CAV-2的中和效价分别为1:160、1:20480,对CAV-2的中和特性好于CAV-1的;单克隆抗体5G4对CAV-1、CAV-2的中和效价分别为1:10240、1:160,对CAV-1的中和特性好于CAV-2的。表明:2株单克隆抗体所对应的CAV抗原表位不同,可用于开发制备预防和治疗犬腺病毒病的药物。

[0074] 2.3单克隆抗体1A1、5G4可变区序列的测定

[0075] 根据鼠源单克隆抗体的序列特征,设计重链可变区引物序列:

[0076] P1:5' -ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAA-3'

[0077] P2:5' -ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGRTYAT-3'

[0078] 设计轻链可变区引物序列:

[0079] P3:5' -ACTAGTCGACATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKW-3'

[0080] P4:5' -ACTAGTCGACATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKW-3'

[0081] 按照张爱华等(张爱华,闭兰,王志友等.系列鼠抗CD分子单克隆抗体轻、重链可变区基因的克隆和序列分析.中国生物制品学杂志,2001,15(2):65-68)建立的可变区序列测定方法,通过分子克隆技术分别获得单克隆抗体1A1、5G4的可变区序列,选取对应的克隆质粒送至苏州金维智生物科技有限公司进行测序。测定单克隆抗体1A1的重链可变区、轻链可变区的基因序列分别如SEQ.ID No.1、SEQ.ID No.3所示,由其推导的氨基酸序列分别为SEQ.ID No.2、SEQ.ID No.4;单克隆抗体5G4的重链可变区、轻链可变区的基因序列分别如SEQ.ID No.5、SEQ.ID No.7所示,由其推导的氨基酸序列分别为SEQ.ID No.6、SEQ.ID No.8。

[0082] 实施例3单克隆抗体预防、治疗CAV感染的评价

[0083] 3.1单克隆抗体治疗病毒感染的评价

[0084] 将32只CAV-1、CAV-2抗原、抗体阴性的2-12月龄幼犬随机分成A、B组2大组,将32只CAV-1、CAV-2阴性的18月龄以上的犬随机分成C、D组2大组,16只/组,A、C组分别按5ml/只的剂量口鼻接种CAV-1Utrecht株病毒液( $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml),B、D组分别按5ml/只的剂量口鼻接种CAV-2SY株(公开于范泉水,邱薇,张富强等.我国CAV-2分子流行病学调查与疫苗选择.第十三次全国养犬学术研讨会论文集,2009)病毒液( $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)。接种后连续观察临床症状。试验犬于出现呕吐、腹痛、腹泻、体温升高、眼等犬传染性肝炎症状或持续性高热、咳嗽、浆液性至粘液性鼻漏、扁桃体炎、喉气管炎和肺炎等呼吸道症状判为发病,取每只犬的粪便用商品化PCR试剂盒按说明书所述方法进行检测,结果为犬腺病毒感染阳性。

[0085] 4大组每组将16只发病犬随机分为4小组进行试验,按照每1kg体重注射1ml的量肌肉注射,1组注射单克隆抗体5G4,2组注射单克隆抗体1A1,3组注射单克隆抗体1A1、5G4 1/1(V/V)混合液,4组注射生理盐水作为对照。注射后连续观察10天,计算病犬治愈率及治愈情况,并用PCR检测排毒情况,结果见表2。

[0086] 表2发病犬治愈及排毒情况汇总

[0087]

大组	组别	注射物	治愈情况	排毒情况
A组 2~12月 龄幼犬	1组	5G4	4/4, 注射1天后全部健活	2-10天均为阴性
	2组	1A1	0/4, 注射2天后4只均发病、5-7天全部死亡	1-10天均为阳性
	3组	1A1、5G4	4/4, 注射2天后全部健活	1-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 注射后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性
B组 18月龄 以上的犬	1组	5G4	2/4, 注射3天后2只健活、2只发病	健活犬4-10天均为阴性, 发病犬4-10天均为阳性
	2组	1A1	4/4, 注射3天后全部健活	1-10天均为阴性
	3组	1A1、5G4	4/4, 注射2天后全部健活	1-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 注射后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性
C组 2~12幼 犬	1组	5G4	4/4, 注射4天后全部健活	4-10天均为阴性
	2组	1A1	1/4, 注射2天后1只健活, 3只于注射后5天死亡	健活犬2-10天均为阴性, 发病犬4-10天均为阳性
	3组	1A1、5G4	4/4, 注射2天后全部健活	1-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 注射后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性
D组 18月龄 以上的 犬	1组	5G4	2/4, 注射3天后2只健活、2只发病	健活犬3-10天均为阴性, 发病犬4-10天均为阳性
	2组	1A1	4/4, 注射3天后全部健活	3-10天均为阴性
	3组	1A1、5G4	4/4, 注射2天后全部健活	1-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 注射后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性

[0088] 由表2可知:当CAV-1感染时,犬只单独注射单克隆抗体1A1几乎无效果,而单独注射单克隆抗体5G4或混合注射单克隆抗体1A1、5G4后治疗效果良好,且单克隆抗体5G4单独或单克隆抗体1A1、5G4混合治疗均能完全保护且对幼犬的治疗效果早于大龄犬的;当CAV-2感染时,单克隆抗体5G4单独治疗效果不佳,而单克隆抗体1A1单独或单克隆抗体1A1、5G4混合治疗均能全愈且对幼犬的治疗效果早于大龄犬的。

[0089] 3.2单克隆抗体预防病毒感染的评价

[0090] 将32只CAV-1、CAV-2抗原、抗体阴性的2-12月龄幼犬随机分成E、F组2大组,将32只CAV-1、CAV-2阴性的18月龄以上的犬随机分成G、H组2大组,将16只/大组犬随机分为4小组进行试验。按照每1kg体重肌肉注射1ml,1组注射单克隆抗体5G4,2组注射单克隆抗体1A1,3组注射单克隆抗体1A1、5G4 1/1 (V/V) 混合液,4组注射生理盐水作为对照。1天后,E、G大组犬只分别按5ml/只的剂量口鼻接种CAV-1Utrecht株病毒液( $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml);F、H大组犬只分别按5ml/只的剂量口鼻接种CAV-2SY株病毒液( $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)。连续观察10天,每日观察犬的临床症状,通过临床死亡率、发病情况及用PCR方法检测肛拭子中的病毒,监测排毒天数来评价该单克隆抗体的预防犬腺病毒感染的效果,结果见表3。

[0091] 表3犬只预防及排毒情况汇总

[0092]

大组	组别	注射物	健活率	排毒情况
E组 2~12月龄 幼犬	1组	5G4	4/4, 接种2天后全部健活	2-10天均为阴性
	2组	1A1	1/4, 接种2天后1只犬健活, 3只犬均发病并于5-8天全部死亡	健活犬3-10天均为阴性 发病犬1-10天均为阳性
	3组	1A1、5G4	4/4, 接种2天后全部健活	3-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 接种后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性
F组 18月龄以 上的犬	1组	5G4	2/4, 接种3-4天后2健活、2只发病	健活犬5-10天均为阴性, 发病犬3-10天均为阳性
	2组	1A1	4/4, 接种3天后全部健活	2-10天均为阴性
	3组	1A1、5G4	4/4, 接种2天后全部健活	2-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 接种后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性
G组 2~12月龄 幼犬	1组	5G4	4/4, 接种4天后全部健活	5-10天均为阴性
	2组	1A1	1/4, 接种4天后1只健活, 3只于接种后5天死亡	健活犬5-10天均为阴性, 发病犬4-10天均为阳性
	3组	1A1、5G4	4/4, 接种3天后全部健活	2-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 接种后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性
H组 18月龄以 上的犬	1组	5G4	2/4, 接种3天后2只健活、2只发病	健活犬4-10天均为阴性, 发病犬3-10天均为阳性
	2组	1A1	4/4, 接种3天后全部健活	4-10天均为阴性
	3组	1A1、5G4	4/4, 接种2天后全部健活	2-10天均为阴性
	4组	生理盐水	0/4, 接种后1-4天全部死亡	1-4天均为阳性

[0093] 由表3可知:当遭遇CAV-1侵袭时,犬只单独注射单克隆抗体1A1效果较差,而单独注射单克隆抗体5G4或混合注射单克隆抗体1A1、5G4后均能保护;当遭遇CAV-2侵袭时,单克隆抗体5G4单独预防效果不佳,而单克隆抗体1A1单独或单克隆抗体1A1、5G4混合预防时均能获得完全保护,且对幼犬的预防效果早于大龄犬的。

[0094] 综上所述,2株单克隆抗体联合施用能够减轻由犬腺病毒引起的临床症状,减少死亡率以及减少排毒天数,具有较好的治疗和/或预防作用。

[0095] 实施例4试纸条的制备及应用

[0096] 4.1单克隆抗体的配对

[0097] 采用抗体相加试验进行测定。将纯化后的CAV-1Utrecht株、CAV-2Toronto A26/61株抗原分别包被于微孔板后用封闭液进行封闭,然后加入第一株饱和浓度的单克隆抗体与之反应,洗涤,拍干,再加入另一株饱和浓度的单克隆抗体与之反应。两株单克隆抗体反应完毕后,再加入HRP标记的羊抗鼠IgG与之反应,洗涤,显色,测定其吸光度A值。按公式 $AI = [(A_{1.2} - A_1) / A_2] \times 100\%$ ,分别计算单克隆抗体两两叠加的增值指数AI。其中,A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>分别为单抗1和2的A值,A<sub>1.2</sub>为单抗1叠加单抗2的A值;当AI大于50%即可初步断定两种单抗对应不同的抗原结合位点。结果见表4。

[0098] 表4单克隆抗体两两叠加的增值指数AI

[0099]	第二抗体	CAV-1 抗原包被		CAV-2 抗原包被	
		1A1	5G4	1A1	5G4
	1A1	0.9%	59.6%	1.6%	78.2%
	5G4	78.2%	2.7%	80.6%	2.3%

[0100] 由表4可知:无论是CAV-1抗原包被还是CAV-2抗原包被,单克隆抗体1A1、5G4抗体相加指数AI值均>50%,表明两株单克隆抗体识别不同的抗原表位,可用于建立双抗体夹心方法。

[0101] 选择CAV-1Utrecht株( $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)、CAV-2Toronto A26/61株( $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)病毒液、稀释液、PCR检测为阴性的粪便,对单克隆抗体配对试验进行检测,结果见表5:

[0102] 表5单克隆抗体搭配结果汇总

[0103]	标记单克 隆抗体	固定单克 隆抗体	检测靶标			
			CAV-1	CAV-2	稀释液	PCR 检测阴性粪便
	1A1	5G4	-	-	-	+
	5G4	1A1	+	+	-	-

[0104] 注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0105] 结果:标记单克隆抗体1A1、固定单克隆抗体5G4后检测CAV-1、CAV-2病毒液为阴性而检测阴性粪便为阳性,表明此搭配模式导致存在假阳性、假阴性结果;而标记单克隆抗体5G4和固定单克隆抗体1A1检测CAV-1、CAV-2病毒液均为阳性,检测稀释液、阴性粪便均为阴性,因此选择这一搭配模式进行后续研究。

[0106] 4.2胶体金检测试纸条的制备及检测

[0107] 4.2.1试纸条1-4的制备及检测

[0108] 将HAuCl<sub>4</sub>先配制成0.01%水溶液,取100ml加热至沸,搅动下准确加入1.0ml的1%柠檬酸三钠(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O)水溶液,继续加热煮沸15min。此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变灰色,续而转成黑色,随后逐渐稳定成红色,全过程约2~3min。冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积100ml,置于4℃保存,用0.2mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液的pH至7.4,匀速搅拌30min,将1/10体积的单克隆抗体5G4溶液(工作浓度为15-80 μg/ml)加于胶体金溶液中,匀速搅拌30min,逐滴加入适量的10%BSA,匀速搅拌30min。置于4℃2小时后,4℃2000r/min离心30min,弃去沉淀,上清于10000r/min继续离心30min,弃去上清,沉淀即为金标单克隆抗体5G4,用喷涂或浸泡使金标单克隆抗体5G4包被做成金标垫2;将单克隆抗体1A1(包被浓度为1.0-2.2mg/ml)和羊抗鼠二抗(包被浓度为2-3mg/ml)喷涂在硝酸纤维素膜上分别作为检测线6和质控线7。将样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫4粘贴于底板5上,即为犬腺病毒胶体金检测试纸条(作为试纸条1)。样品处理管内含磷酸盐缓冲液制备的样品处理液。

[0109] 将标记单克隆抗体5G4、固定单克隆抗体1A1,结合专利CN104928258A中犬细小病毒单克隆抗体10H4、10B11以及CN105695420A中犬瘟热病毒单克隆抗体1G5、6E11,制备胶体金溶液并分别标记10H4和1G5,用喷涂或浸润使金标单克隆抗体10H4和1G5包被做成金标垫

2;将单克隆抗体10B11、6E11和羊抗鼠二抗喷涂在硝酸纤维素膜上分别作为检测线6B、检测线6C和质控线(C)。将样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫4粘贴于底板5上,即为胶体金检测试纸条。样品处理管内含磷酸盐缓冲液制备的样品处理液。有三种组合方式:①金标垫2包被标记后的5G4、10H4,硝酸纤维素膜上2条检测线6A、6B分别为单克隆抗体1A1、10B11,质控线为羊抗鼠二抗,作为试纸条2。②金标垫2包被标记后的5G4、1G5,硝酸纤维素膜上2条检测线6A、6B分别为单克隆抗体1A1、6E11,质控线为羊抗鼠二抗,作为试纸条3。③金标垫2包被标记后的5G4、10H4、1G5,硝酸纤维素膜上3条检测线6A、6B、6C分别为单克隆抗体1A1、10B11、6E11,质控线为羊抗鼠二抗,作为试纸条4。

[0110] 检测时,将待检样品置于样品处理管中,使样品尽可能溶解在溶液中,将含有待检样品的样品处理管盖子头部折断,滴加2-4滴混匀后的样品至试纸条加样孔中心;10分钟后在检测试纸条的检测区观察记录结果,并依据判定标准进行判定。结果判定标准:质控线显色即试验成立,则检测线显色即为阳性、不显色即为阴性;质控线未显色即试验不成立,无论检测线是否显色均判定为无效结果,需重测。

[0111] 4.2.2试纸条中单克隆抗体工作浓度的优化

[0112] 将金标单克隆抗体5G4、固定单克隆抗体1A1按表4的工作浓度,将羊抗鼠二抗按2mg/ml进行包被,制备试纸条1A~1H。将CAV-1Utrecht株 $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml、CAV-2Toronto A26/61株 $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml病毒液用制备的试纸条1A~1H进行检测,结果见表6,结果显示:金标单克隆抗体5G4、固定单克隆抗体1A1(包被浓度为1.0-2.2mg/ml)结果良好,这一范围之外的检测结果为假阴性、背景模糊或棕红,无法准确地进行离体动物病料的临床检测和流行病学调研。

[0113] 表6试剂条1中单克隆抗体工作浓度

试纸条编号	金标单克隆抗体 5G4 (μg/ml)	固定单克隆抗体 1A1 (mg/ml)	检测结果	
			CAV-1 Utrecht 株	CAV-2 Toronto A26/61 株
[0114] 1A	10	1.0	阴性, 本底干净	阴性, 本底干净
1B	15	1.0	阳性, 本底干净	阳性, 本底干净
1C	80	1.0	阳性, 本底干净	阳性, 本底干净
1D	100	1.0	阳性, 本底棕红	阳性, 本底棕红
1E	50	0.5	阴性, 本底干净	阴性, 本底干净
1F	50	1.0	阳性, 本底干净	阳性, 本底干净
[0115] 1G	50	2.2	阳性, 本底干净	阳性, 本底干净
1H	50	3.0	阴性, 本底模糊	阳性, 本底模糊

[0116] 另从成本角度考虑用试纸条1F用于后续评价。

[0117] 4.3胶体金检测试纸条的应用

[0118] 4.3.1试纸条1-4特性研究

[0119] 按照实施例4.2.1中所述的检测方法,用试纸条1-4分别检测不同病毒含量CAV-

1Utrecht株、CAV-2Toronto A26/61株、犬细小病毒CPV CVCC AV298株、犬瘟热病毒CDV AV299株病毒液,以及经商品化PCR试剂盒(购自世纪元亨)检测的犬副流感CPIV阳性病料及犬冠状病毒CCV阳性病料、商品化CDV、CPV、CAV PCR试剂盒(均购自世纪元亨)检测的阴性病料,结果见表5。同时,样品用商品化韩国安捷CAV-CDV胶体金试纸条、美国艾博CAV胶体金检测试纸条按照各自试剂盒说明书进行检测,结果见表7。

[0120] 表7试纸条1-4及商品化产品检测样品结果比对

[0121]

样品		试纸条 1	试纸条 2	试纸条 3	试纸条 4	安捷试纸条	艾博试纸条	CAV CR 试剂盒
CAV-1( TCID <sub>50</sub> / ml)	10 <sup>8.3</sup>	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>7.3</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>6.3</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>6.0</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>5.4</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>4.8</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>4.2</sup>	-	-	-	-	-	-	+
CAV-2( TCID <sub>50</sub> / ml)	10 <sup>6.5</sup>	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>5.5</sup>	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>4.5</sup>	+	+	+	+	-	+	+
	10 <sup>3.5</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>2.5</sup>	+	+	+	+	-	-	+
	10 <sup>1.5</sup>	-	-	-	-	-	-	+

[0122]	CPV(H A)	6.4	-	+	-	+	-	-	-
		0.64	-	+	-	+	-	-	-
		0.06	-	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-
		0.00	-	-	-	-	-	-	-
	CDV(T CID <sub>50</sub> / ml)	10 <sup>4.5</sup>	-	-	+	+	+	-	-
		10 <sup>3.5</sup>	-	-	+	+	+	-	-
		10 <sup>2.5</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	CPIV PCR 检测 CPIV 阳性病料	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCV PCR 检测 CCV 阳性病料	-	-	-	-	-	-	-	-
CAV PCR 检测 CAV 阴性病料	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPV PCR 检测 CPV 阴性病料	-	-	-	-	-	-	-	-	
CDV PCR 检测 CDV 阴性病料	-	-	-	-	-	-	-	-	

[0123] 注：“+”表示检测结果为阳性，“-”表示检测结果为阴性。

[0124] 由表6可知：试纸条1-4对CAV-1的灵敏度为 $10^{4.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml，对CAV-2的灵敏度为 $10^{2.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml，且不与犬常见传染病如犬冠状病毒病、犬副流感病毒病发生交叉反应，特异性良好，而商品化的安捷试纸条、艾博试纸条灵敏度远远低于试纸条1-4的灵敏度，极易造成临床检测假阴性，使得发病动物错过最佳治疗时间而导致不必要的损失。特别地，试纸条2-4还可同时鉴别检测CDV和/或CPV，使得混合感染病例确诊，可及早开展治疗。

[0125] 4.3.2临床应用

[0126] 对收集的临床犬、狐狸病料用世纪元亨CAV PCR检测试剂盒按照说明书检测后获得193份临床样品(包括124份阳性含90份CAV-1阳性、24份CAV-2阳性、10份CAV-1与CAV-2阳性,69份阴性),用试纸条1-4按实施例3.2.1中所述的检测方法进行检测,同时用商品化韩

国安捷CAV-CDV胶体金试纸条、美国艾博CAV胶体金检测试纸条按照各自试剂盒说明书进行检测,结果见表8。

[0127] 表8临床检测结果比较

[0128]

动物靶标 总份数		试纸条1		试纸条2		试纸条3		试纸条4		安捷试纸条		艾博试纸条		CAV PCR 试剂盒	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
犬	眼鼻拭子 40份	28	12	29	11	28	12	29	11	2	38	3	37	32*	8
犬	肛拭子 12份	6	6	6	6	6	6	6	6	2	10	3	9	7*	5
犬	粪便 15份	7	8	7	8	7	8	7	8	3	12	3	12	8*	7
犬	血液 13份	7	6	7	6	7	6	7	6	1	12	1	12	7	6
犬	尿 10份	7	3	9	1	9	1	9	1	3	7	3	7	9	1
犬	肝 9份	7	2	7	2	7	2	7	2	4	5	5	4	7	2
犬	肠或肠淋巴结 8份	5	3	5	3	5	3	5	3	0	8	2	6	7	1
犬	脾 10份	7	3	6	4	6	4	6	4	0	10	1	9	7	3
犬	肺 11份	7	4	7	4	7	4	7	4	0	11	2	9	6	5
狐	眼鼻拭子 10	5	5	5	5	5	5	5	5	0	10	0	1	6	4

[0129]	狸 份												0			
	狐狸	肛拭子 12 份	4	8	4	8	4	8	4	8	0	12	0	1 2	7	5
	狐狸	粪便 13 份	3	10	5	8	3	10	4	9	0	13	0	1 3	4	9
	狐狸	血液 12 份	6	6	6	6	6	6	6	6	0	12	0	1 2	7	5
	狐狸	尿 10 份	5	5	5	5	5	5	5	5	0	10	0	1 0	7	3
	狐狸	脑 8 份	2	6	2	6	2	6	3	5	0	8	0	8	3	5
		总计	1 0 6	87	11 0	8 3	1 0 7	86	11 0	83	1 5	17 8	23	1 7 0	12 4	69
	阳性符合率(%)	85		89		86		89		12		19		/		
	总符合率(%)	91		93		92		93		44		48		/		

[0130] 注：“+”表示检测结果为阳性所对应的份数，“-”表示检测结果为阴性所对应的份数；阳性符合率、阴性符合率表示与PCR检测结果一致的比率。

[0131] 由表7可知：试纸条1-4检测与PCR方法的阳性符合率为85%~89%，总符合率为91%~93%，而商品化试纸条检测与PCR的阳性符合率为12%~19%，总符合率为44%~48%。表明本发明所制备的试纸条不仅可以检测CAV-1，还可以检测CAV-2，且与经典方法PCR较为接近，检测结果较为准确、可靠，而商品化试纸条存在严重的漏检、假阴性现象，从而误导医者或养殖者使其放松警惕、不能及早预防和治疗，导致犬、狐狸等感染对象严重患病甚至死亡。

[0132] 综上所述，本发明所制备的试纸条1-4，克服了现有技术检测犬腺病毒(包括CAV-1、CAV-2)灵敏度低的问题，避免了漏检、假阴性现象的发生；解决了现有技术不能检测狐狸病料的问题，为该经济动物提供了技术支持；解决了现有技术不能检测多种靶标的缺陷；具有快速、简便、准确的优势，便于非诊断目的的犬腺病毒检测中的临床应用，特别是流行病学调查、健康体检及排查等研究。

[0133] 实施例5基因工程抗体的制备及应用

[0134] 按照李越等(李越.A型流感病毒单链抗体基因的克隆及抗病毒活性研究.新疆农业大学硕士学位论文,2014)建立的单链抗体制备的操作方法,分别用单克隆抗体1A1、5G4的可变区序列制备相对应的单链抗体1和单链抗体2,用单克隆抗体1A1的重链可变区和单克隆抗体5G4的轻链可变区制备单链抗体3,用单克隆抗体5G4的重链可变区和单克隆抗体1A1的轻链可变区制备单链抗体4。

[0135] 按照实施例1.2所述方法对单链抗体1-4分别进行HI效价检测,结果:单链抗体1-4对CAV-1、CAV-2的HI效价均 $\geq 1:2560$ ,表明单链抗体1-4与CAV-1、CAV-2均具有良好的反应

特性。

[0136] 按照实施例1.2所述方法,测定单链抗体1-4对CAV-1、CAV-2的中和效价,结果见表9,表明单链抗体1-4均可以和CAV-1、CAV-2发生特异性的中和反应,但单链抗体1对CAV-2的中和特性较低,单链抗体2对CAV-1的中和特性较低,单链抗体4对CAV-1、CAV-2的中和特性均较低。

[0137] 表9基因工程抗体的中和效价检测结果

CAV 血清型	抗体			
	单链抗体 1	单链抗体 2	单链抗体 3	单链抗体 4
CAV-1	1:10240	1:320	1:10240	1:640
CAV-2	1:160	1:10240	1:5120	1:1280

[0139] 以上结果显示SEQ.ID No.1、SEQ.ID No.3、SEQ.ID No.5和SEQ.ID No.7可用于犬腺病毒基因工程抗体的制备,也可将其用于制备预防和/或治疗犬腺病毒相关疾病的药物组合物。

[0140] 本实施例制备的单链抗体3针对CAV-1、CAV-2均具有很高的中和效价,能有效治疗和预防CAV-1、CAV-2导致的疾病。

[0141] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司

[0003] <120> 特异性结合犬腺病毒的单克隆抗体、药物组合物、试剂盒及其应用

[0004] <160> 8

[0005] <170> PatentIn version 3.3

[0006] <210> 1

[0007] <211> 360

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 杂交瘤细胞

[0010] <400> 1

[0011] gtttttgcgt ctggtgctca cggagaaggt gtgatgatcc gaactaccaa attcggaaaa 60

[0012] aggtcgccag gcgttcatct agtcgacatg aagatgtggg tgaactgggt gaaggaggct 120

[0013] ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggccgg ataaacacca acaatgaagt gtcaacatat 180

[0014] gctgaagagt tcaagggacg gtttgccctc tctttggaag cctctgccag cactgcctat 240

[0015] ttacagatca atgacctcac aatgaagac tcggctacat atttctgtgc aagaatggac 300

[0016] agttcgggct acgtctggtt tacttactgg ggccaaggga ctcttgtcac tgtctctgca 360

[0017] <210> 2

[0018] <211> 120

[0019] <212> PRT

[0020] <213> 杂交瘤细胞

[0021] <400> 2

[0022] Val Phe Ala Ser Gly Ala His Gly Glu Gly Val Met Ile Arg Thr Thr

[0023] 1                    5                    10                    15

[0024] Lys Phe Gly Lys Arg Ser Pro Gly Val His Leu Val Asp Met Lys Met

[0025]                    20                    25                    30

[0026] Trp Val Asn Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

[0027]                    35                    40                    45

[0028] Gly Arg Ile Asn Thr Asn Asn Glu Val Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

[0029]                    50                    55                    60

[0030] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0031] 65                    70                    75                    80

[0032] Leu Gln Ile Asn Asp Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys

[0033]                    85                    90                    95

[0034] Ala Arg Met Asp Ser Ser Gly Tyr Val Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

[0035]                    100                    105                    110

[0036] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

[0037]                    115                    120

[0038] <210> 3

[0039] <211> 321  
 [0040] <212> DNA  
 [0041] <213> 杂交瘤细胞  
 [0042] <400> 3  
 [0043] gacactgtta tgaccagtc tcaaaaattc atatccacat caataggaga cagggtcagc 60  
 [0044] gtcacctgca cggccagtca gaatgtgggt acttttggtg tctggtatca acggaaatca 120  
 [0045] gggcaatctc ctaaagcact gatttattcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180  
 [0046] cgcttcacag gcagtggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgaagtct 240  
 [0047] gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tatgacagct atcctctgac gttcgggtgga 300  
 [0048] ggtaccaagc tggaaatcaa a 321  
 [0049] <210> 4  
 [0050] <211> 107  
 [0051] <212> PRT  
 [0052] <213> 杂交瘤细胞  
 [0053] <400> 4  
 [0054] Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Ile Ser Thr Ser Ile Gly  
 [0055] 1 5 10 15  
 [0056] Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Thr Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe  
 [0057] 20 25 30  
 [0058] Val Val Trp Tyr Gln Arg Lys Ser Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile  
 [0059] 35 40 45  
 [0060] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 [0061] 50 55 60  
 [0062] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Lys Ser  
 [0063] 65 70 75 80  
 [0064] Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Leu  
 [0065] 85 90 95  
 [0066] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0067] 100 105  
 [0068] <210> 5  
 [0069] <211> 351  
 [0070] <212> DNA  
 [0071] <213> 杂交瘤细胞  
 [0072] <400> 5  
 [0073] gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag gttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60  
 [0074] tctgcacaa tttctggctt aaacattaag gacacctata tccactgggt gaagcagagg 120  
 [0075] cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg tttgatcctg tgaatgttaa tagtaaatat 180  
 [0076] gaccgaaat accagggcaa ggccactata acatcagaca catcctccaa cacagcctac 240  
 [0077] ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaggaggt 300

[0078] aactctgcta tggactactg gggtaagga agctcagtc a cgtctcctc a 351  
 [0079] <210> 6  
 [0080] <211> 117  
 [0081] <212> PRT  
 [0082] <213> 杂交瘤细胞  
 [0083] <400> 6  
 [0084] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala  
 [0085] 1 5 10 15  
 [0086] Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ile Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr  
 [0087] 20 25 30  
 [0088] Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0089] 35 40 45  
 [0090] Gly Arg Phe Asp Pro Val Asn Val Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Tyr  
 [0091] 50 55 60  
 [0092] Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 [0093] 65 70 75 80  
 [0094] Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0095] 85 90 95  
 [0096] Ala Arg Gly Gly Asn Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Ser  
 [0097] 100 105 110  
 [0098] Val Thr Val Ser Ser  
 [0099] 115  
 [0100] <210> 7  
 [0101] <211> 321  
 [0102] <212> DNA  
 [0103] <213> 杂交瘤细胞  
 [0104] <400> 7  
 [0105] gatgttgta tgaccccgac tcccaaattc ctgcttgtgt cgccaggaga cagggttacc 60  
 [0106] ataacctgca aggccagtca gagggtgagt aatgatgtcg cttggtacca gcagaagcca 120  
 [0107] gggcagtctc ctaaattact gatatactat gcatccatc gctacactgg agtccctggt 180  
 [0108] cgcttactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 240  
 [0109] gaagacctgg caattttatt ctgtcagcag gattttgect ctccgctcac gttcgggtgt 300  
 [0110] gggaccaagc tggagctgaa a 321  
 [0111] <210> 8  
 [0112] <211> 107  
 [0113] <212> PRT  
 [0114] <213> 杂交瘤细胞  
 [0115] <400> 8  
 [0116] Asp Val Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Pro Gly

[0117]	1	5	10	15															
[0118]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp			
[0119]			20						25						30				
[0120]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile			
[0121]			35						40						45				
[0122]	Tyr	Tyr	Ala	Ser	His	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Thr	Gly			
[0123]		50							55					60					
[0124]	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Ala			
[0125]	65								70					75					80
[0126]	Glu	Asp	Leu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Phe	Ala	Ser	Pro	Leu			
[0127]					85					90						95			
[0128]	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys								
[0129]					100														105

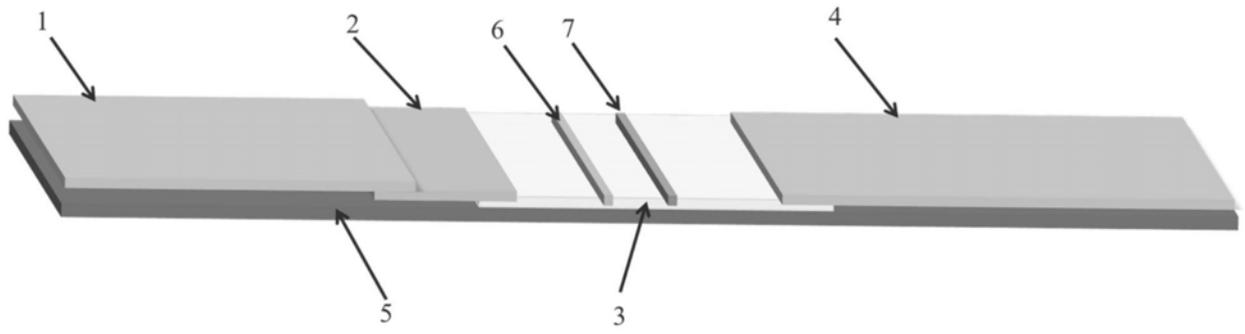


图1

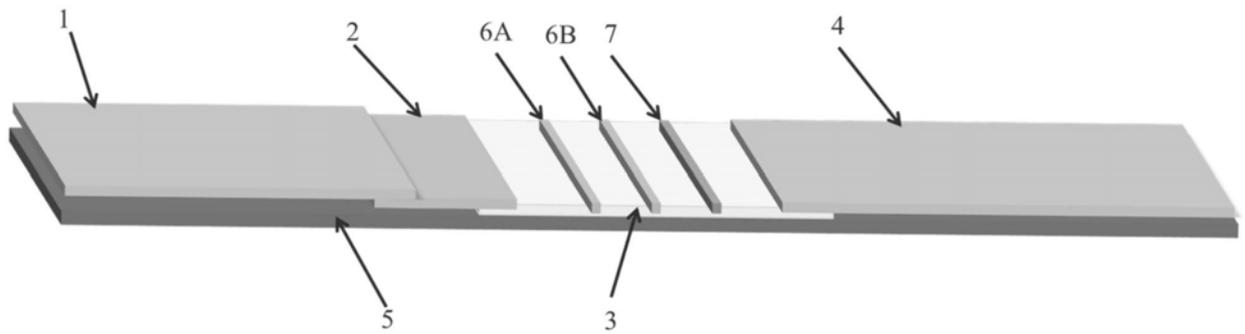


图2

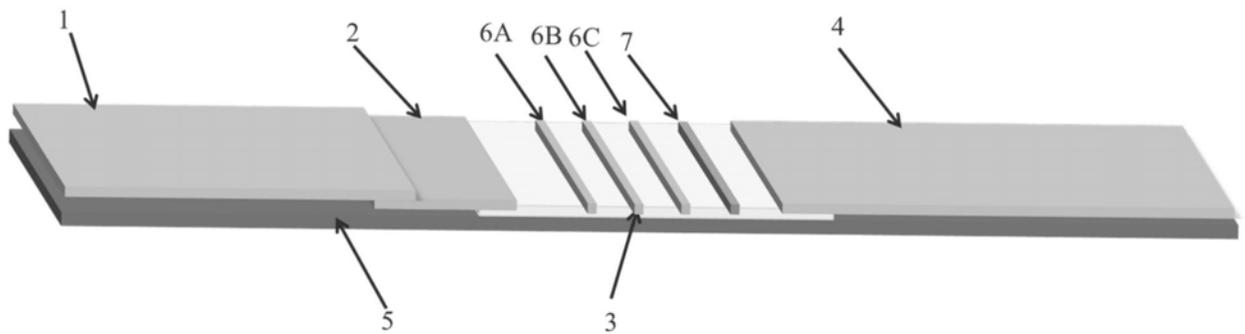


图3