



(10) 授权公告号 CN 108018261 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201610946235.9

(22) 申请日 2016.11.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108018261 A

(43) 申请公布日 2018.05.11

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO: C201611 2016.03.29
CCTCC NO: V201604 2016.03.29
CCTCC NO: V201634 2016.06.14

(73) 专利权人 普莱柯生物工程股份有限公司
地址 471000 河南省洛阳市高新区凌波路5号

专利权人 洛阳惠中生物技术有限公司

(72) 发明人 田克恭 刘玉秀 刘彩红 孙进忠
张许科

(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

代理人 韩登营

(51) Int.Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/175 (2006.01)

A61K 39/23 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1147769 A,1997.04.16

CN 102343088 A,2012.02.08

CN 104640566 A,2015.05.20

Oem J.-K.等.Parainfluenza virus 5 strain D277, complete genome..《EMBL-EMI》.2013,Sequence: KC237065.1.

审查员 赵彦豪

权利要求书1页 说明书15页

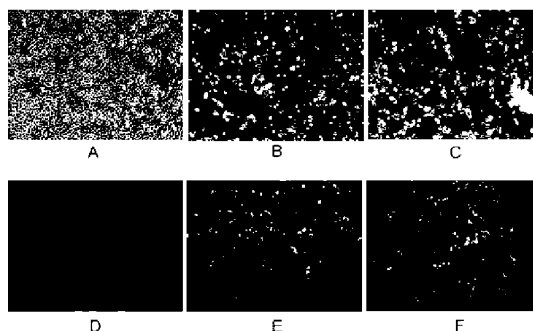
序列表7页 附图1页

(54) 发明名称

犬副流感病毒毒株及其应用

(57) 摘要

本发明涉及犬副流感病毒毒株及其应用,本发明的犬副流感病毒HeN0718株具有强毒性和良好免疫原性,使用其灭活抗原制备的疫苗组合物免疫动物后能使动物机体快速产生抗体,可有效预防和/或治疗当前犬副流感相关疾病。该疫苗组合物安全性好,能与其他抗原联用。



1. 一种犬副流感病毒毒株, 其中, 所述犬副流感病毒毒株基因组全长cDNA为SEQ ID No.1所示的序列或所述SEQ ID No.1序列中CDS替换为其简并序列后的序列。

2. 根据权利要求1所述的犬副流感病毒毒株, 其中, 所述犬副流感病毒毒株为CPIV HeN0718株, 所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株基因组全长cDNA为SEQ ID No.1所示的序列。

3. 一种疫苗组合物, 其中, 所述疫苗组合物包括免疫量的权利要求1所述的犬副流感病毒毒株或其培养物灭活抗原和兽医学上可以接受的载体。

4. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述的犬副流感病毒毒株抗原为所述的犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原, 所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原含量为灭活前 $10^{4.0}-10^{7.0}$ TCID₅₀/ml。

5. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原含量为灭活前 $10^{5.0}-10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

6. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原含量为灭活前 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

7. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述的犬副流感病毒毒株培养物为培养1~18代的培养物。

8. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述的犬副流感病毒毒株培养物为培养6~18代的培养物。

9. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述兽医学上可以接受的载体为佐剂, 所述佐剂为GelA佐剂;

所述佐剂的浓度范围是从5%到50%V/V。

10. 根据权利要求9所述的疫苗组合物, 其中, 所述佐剂的浓度5%V/V。

11. 根据权利要求3所述的疫苗组合物, 其中, 所述的疫苗组合物进一步包括犬瘟热病毒抗原、和/或犬细小病毒抗原。

12. 根据权利要求11所述的疫苗组合物, 其中, 所述疫苗组合物包括含量为灭活前 $10^{4.0}-10^{7.0}$ TCID₅₀/ml的犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株灭活抗原、含量为灭活前 $10^{4.0}-10^{6.0}$ TCID₅₀/ml的犬瘟热病毒CDV C/HN/001株灭活抗原和/或含量为灭活前 $10^{6.0}-10^{8.0}$ TCID₅₀/ml的犬细小病毒CPV S0425株灭活抗原, 以及5%V/VGEL A佐剂。

13. 根据根据权利要求12所述的疫苗组合物, 其中, 所述疫苗组合物包括含量为灭活前 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml的犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株灭活抗原、含量为灭活前 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml的犬瘟热病毒CDV C/HN/001株灭活抗原和/或含量为灭活前 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml的犬细小病毒CPV S0425株灭活抗原, 以及5%V/VGEL A佐剂。

14. 根据权利要求3~13任一项所述的疫苗组合物在制备预防和治疗犬副流感病毒感染相关疾病的药物中的应用。

犬副流感病毒毒株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品技术领域,具体涉及犬副流感病毒毒株及其疫苗组合、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 犬副流感病毒(Canine Parainfluenza virus,CPIV)为副黏病毒科,副黏病毒亚科,腮腺炎病毒属成员,是不分节段的单股负链RNA病毒,电镜下CPIV颗粒形态多变,一般呈圆形,直径80nm~200nm,但常因囊膜破损而形态不规则,呈现出多形性的病毒粒子。

[0003] CPIV的宿主谱较广,包括犬、豚鼠、仓鼠、小鼠、虎、貉、貂等,常引起犬的支气管炎和支气管肺炎,损害呼吸道上皮细胞。犬感染CPIV后,可以从呼吸道分泌物中检测到该病毒,病毒粒子通过有效的气体粒子、泡沫和空气传染给健康犬,密度较大的犬群常导致爆发,各种品种的犬均可感染,幼龄犬易感性更高,严重影响着世界各国养犬业的发展。

[0004] 疫苗是预防和控制该病的主要措施,早在1970年,Emey等研制出CPIV D-008弱毒疫苗,肌肉或皮下接种都能产生中和抗体,使用该疫苗可以减少疾病的发生率,减轻临床症状,但不能完全抵抗感染。目前国内外有多家公司在提供包含CPIV的疫苗,但在临床实践中发现,有部分CPIV感染阳性犬都曾严格接种过CPIV疫苗史。另一方面,弱毒疫苗在使用过程中存在毒力返强及散毒的风险,而现有分离的强毒株在培养过程中毒力衰减明显,制备的灭活疫苗免疫效力不高,以致目前未有相关灭活疫苗产品出现。因此,亟需分离出免疫原性良好的国内流行的CPIV野毒株,将其制备成高效的灭活疫苗以预防和/或治疗犬副流感疫情蔓延,具有深远的现实意义。

发明内容

[0005] 为解决现有技术的不足,本发明提供了一种犬副流感病毒毒株、及其制备的灭活疫苗及其制备方法以及应用,该疫苗能够有效预防犬副流感病毒的感染。

[0006] 本发明涉及一种犬副流感病毒毒株,该毒株具有强毒性和良好的免疫原性。

[0007] 本发明还涉及一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包括免疫量的所述犬副流感病毒毒株抗原和/或兽医学上可接受的载体;其中,所述犬副流感病毒抗原包括灭活的全病毒抗原。所述疫苗组合物由强毒株制备,具有良好的免疫原性,能对犬提供完全保护。且该灭活疫苗较现有技术中的弱毒苗有显著的生物安全性。

[0008] 本发明还涉及所述疫苗组合物在制备预防和/或治疗犬副流感相关疾病中的应用。

[0009] 本发明的犬副流感病毒毒株为流行的犬副流感病毒野毒株,用该毒株制备成疫苗组合物可预防和/或治疗犬副流感疫情蔓延,并且含该毒株的疫苗组合物免疫动物后能使动物机体快速产生抗体,对当前流行的犬副流感单独或混合感染有良好的预防和控制效果,生物安全性好。

附图说明

[0010] 图1为CPIV HeN0718和rCPIV在Vero细胞上产生的细胞病变及免疫荧光鉴定图;图1A为空白对照组Vero细胞图;图1B为CPIV HeN0718在Vero细胞上产生的细胞病变;图1C为重组rCPIV在Vero细胞上产生的细胞病变;图1D为空白对照组Vero细胞的免疫荧光鉴定图;图1E为CPIV HeN0718在Vero细胞上产生的免疫荧光鉴定图;图1F为rCPIV在Vero细胞上产生的免疫荧光鉴定图。

具体实施方式

[0011] 以下,对本发明的实施方式进行了说明。

[0012] 术语“犬副流感病毒”(Canine Parainfluenza virus,CPIV)属副黏病毒科,副黏病毒亚科,腮腺炎病毒属成员,是不分节段的单股负链RNA病毒,所引发的临床症状包括发热、流涕和咳嗽。病理变化以卡他性鼻炎和支气管炎为特征。

[0013] 术语“犬副流感病毒毒株(CPIV毒株)”在本发明中若无特殊说明即为犬副流感病毒野毒株(CPIV野毒株)、犬副流感病毒强毒株(CPIV强毒株)、野生型CPIV毒株,可互换使用。

[0014] 术语“CDS”全称为coding sequence,在本发明中指基因中编码一段蛋白产物的序列,为与蛋白质序列一一对应的DNA序列,且该序列中间不含其它非该蛋白质对应的序列,不考虑mRNA加工等过程中的序列变化,其与蛋白质的密码子完全对应。

[0015] 本发明涉及一种犬副流感病毒毒株,其中,所述犬副流感病毒毒株基因组全长cDNA为SEQ ID No.1所示的序列或所述SEQ ID No.1序列中CDS替换为其简并序列后的序列。

[0016] 本发明涉及一种犬副流感病毒毒株,其中,所述犬副流感病毒毒株为CPIV HeN0718株,所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株基因组全长cDNA为SEQ ID No.1所示的序列。

[0017] 所述犬副流感病毒毒株的分离包括:将感染犬副流感病毒的动物脏器病变处进行取样、研磨或处理,再将不同研磨液或处理液接种于Vero细胞进行病毒分离,稳定传至出现细胞病变即可冻融收毒。

[0018] 其中,感染犬副流感病毒毒株的动物源包括但不限于犬科(Canidae)源、猫科(Felidae)源。感染犬副流感病毒毒株的动物样本包括但不限于肺、唾液、眼睛分泌物、气管、鼻分泌物、淋巴结、脾脏。

[0019] 术语“疫苗组合物”又称免疫原性组合物,是指一种含免疫原的制剂,包括如全细胞、灭活的或减毒的、活的病毒或细菌,或者多糖,或其组合,其被施用来刺激受体对存在于免疫原性组合物中一种或多种抗原的体液和细胞免疫反应。免疫接种是施用疫苗组合物并在宿主中刺激对抗原的免疫或免疫原性反应的过程,优选宿主为动物诸如犬。

[0020] 术语“免疫量”应当理解为“免疫有效量”,又称免疫保护量或产生免疫应答的有效量,为可在接受者体内有效诱导免疫应答的抗原量,该量足以预防或改善疾病的体征或症状,包括不利的健康影响或其并发症。所述免疫应答可能足以用于诊断目的或其它试验,或可能适合用于预防疾病的征兆或症状,包括由病原体引起的感染所造成的不利的健康结果或其并发症。体液免疫力或由细胞介导的免疫力或此二者均可被诱导。动物对免疫原性组

合物的免疫应答可通过例如测量抗体效价、淋巴细胞增殖分析而间接评估,或在以野生型毒株攻击后通过监测征兆或症状来直接评估,而该由疫苗提供的保护性免疫力可通过测量例如受试者的临床征兆如死亡率、发病率的减少、温度数值、受试者总体生理状况及总体健康和表现来评估。所述免疫应答可包括但不限于诱导细胞性和/或体液免疫力。

[0021] 术语“犬副流感病毒抗原”是指至少含有一种犬副流感病毒抗原形式的任何组合,所述犬副流感病毒抗原可诱导、刺激或能抵抗犬副流感病毒感染的免疫应答,所述抗原形式包括但不限于灭活的、减毒的或亚单位的抗原。其中,灭活的抗原可通过各种方法包括化学处理、物理处理(如声处理、照射、热)或任何其它足以阻止生物体复制或生长的常用方法来实现灭活而维持其免疫原性,优选将病原体在收集后灭活且任选地接受澄清净化,通过化学处理使用例如福尔马林或甲醛、 β -丙内酯、乙烯亚胺、二元乙烯亚胺BEI、硫柳汞等;灭活的方法是本领域技术人员公知的,如通过 β -丙内酯(Plana-Duran等,Vet.Microbiol., 1997,55:361-370)或通过BEI处理(US5587164)。

[0022] 术语“兽医学上可接受的载体”是指在本发明疫苗组合中除犬副流感病毒抗原之外的其他所有成分,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,优选为佐剂。术语“佐剂”可包括铝胶佐剂;皂苷(saponin),如Quil A、QS-21(Cambridge Biotech Incorporation,Cambridge MA)、GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals Incorporation,Birmingham AL);油包水乳剂;水包油乳剂;水包油包水乳剂;丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物;顺丁烯二酸酐和链烯基(alkenyl)衍生物的共聚物选出的化合物。术语“乳剂”可尤其基于轻液体石蜡油(European Pharmacopea类型);因烯烃寡聚产生的类异戊二烯油(isoprenoid oil),如角鲨烷(squalane)或角鲨烯油(squalene oil),尤其异丁烯或葵烯;酸或醇的含线性烷基的酯,更尤其植物油、油酸乙酯、丙二醇二-(辛酸酯/葵酸酯)、甘油三-(辛酸酯/葵酸酯)或丙二醇二油酸酯;支链脂肪酸或醇的酯,尤其异硬脂酸酯。油与乳化剂组合使用以便形成乳剂。乳化剂优选非离子表面活性剂,尤其山梨聚糖的酯、二缩甘露醇(mannide)的酯(如无水甘露醇油酸酯)、脂肪族二元醇(glycol)的酯、聚甘油(polyglycerol)的酯、丙二醇的酯以及油酸的酯、异硬脂酸的酯、蓖麻油酸的酯或羟基硬脂酸的酯,它们任选乙氧基化,还有聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物,尤其Pluronic产品,特别是L121。参见Hunter等编写的《The theory and practical application of adjuvants》(Ed.by DES Stewart-Tull,John Wiley and Sons,New York,1995:51-94)和Todd等编写的《Vaccine》(1997,15:564-570)。例如,可使用Powell M和Newman M编写的《Vaccine design,the Subunit and adjuvant approach》(Plenum Press,1995)第147页描述的SPT乳剂及第183页描述的MF59乳剂。术语“丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物”优选为交联的丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物,尤其是与糖(sugar)的聚链烯基醚或聚醇交联,这些化合物已知被称为卡波姆(Carbomer,商品名Carbopol)(Pharmeuropa,1996,8(2))。本领域技术人员还可参见美国专利US2909462,其描述了这类丙烯酸聚合物,其与聚羟基化的化合物交联,所述化合物具有至少3个羟基,优选不超过8个,其中至少3个羟基的氢原子被具有至少2个碳原子的不饱和脂烃基(aliphatic radical)取代。优选的基团是那些含有2-4个碳原子的基团,例如乙烯基、烯丙基和其它烯属不饱和基团(ethylenically unsaturated group)。所述不饱和基团自身可包含其它取代基,如甲基。这些产品以卡波普的名义出售,(BF Goodrich,Ohio,USA)特别合适。它们与烯丙基蔗糖或与烯丙基季戊四醇(allyl

pentaerythritol) 交联。这其中可提及卡波普974P、934P和971P,最优选使用卡波普971P。术语“顺丁烯二酸酐和链烯基衍生物的共聚物”也可考虑顺丁烯二酸酐与乙烯的共聚物EMA (Monsanto),这些聚合物在水中溶解产生酸性溶液,经中和,优选中和至生理pH,以便产生佐剂溶液,能向其中掺入免疫原性、致免疫性或疫苗性组合物本身。术语“佐剂”还包括,但不限于,RIBI佐剂系统(Ribi Incorporation)、Block co-polymer(CytRx,Atlanta GA)、SAF-M(Chiron,Emeryville CA)、单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A)、Avridine脂质-胺佐剂、大肠杆菌不耐热肠毒素(重组或其它)、霍乱毒素、IMS 1314、胞壁酰二肽、Gel佐剂等。优选地,所述佐剂包括铝胶佐剂、皂苷、油包水乳剂、水包油乳剂、水包油包水乳剂、丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物、顺丁烯二酸酐和链烯基(alkenyl)衍生物的共聚物、RIBI佐剂系统、Block co-polymer、SAF-M、单磷酸脂质A、Avridine脂质-胺佐剂、大肠杆菌不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314、胞壁酰二肽或Gel佐剂中的一种或几种。

[0023] 本发明还涉及一种疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物包括免疫量的所述的犬副流感病毒毒株或其培养物灭活抗原和兽医学上可以接受的载体。

[0024] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述的犬副流感病毒毒株抗原为所述的犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原,所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原含量为灭活前 $10^{4.0}$ - $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml。

[0025] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原含量为灭活前 $10^{5.0}$ - $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

[0026] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株或其培养物的灭活抗原含量为灭活前 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

[0027] 作为本发明的一种实施方式,所述灭活的全病毒抗原是通过将所述犬副流感病毒毒株在细胞上增殖而获得的全病毒培养液,并经灭活剂灭活所得。

[0028] 作为本发明的一种实施方式,所述灭活剂包括但不限于β-丙内酯BPL、二乙烯亚胺BEI、福尔马林、甲醛、N-乙酰乙烯亚胺AEI、盐酸聚六亚甲基胍PHMG。

[0029] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述的犬副流感病毒毒株培养物为培养1~18代的培养物。

[0030] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述的犬副流感病毒毒株培养物为培养6~18代的培养物。

[0031] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述佐剂包括:(1) 铝胶佐剂、皂苷、阿夫立定、DDA;(2) 油包水乳剂、水包油乳剂、水包油包水乳剂;或(3) 丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物、顺丁烯二酸酐和链烯基衍生物的共聚物;以及RIBI佐剂系统、Block co-polymer、SAF-M、单磷酸脂质A、Avridine脂质-胺佐剂、大肠杆菌不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314、胞壁酰二肽、Gel佐剂中的一种或几种;

[0032] 优选地,皂苷为Quil A、QS-21、GPI-0100;

[0033] 优选地,乳剂为SPT乳剂、MF59乳剂,或乳剂由油与乳化剂组合形成,乳剂可基于轻液体石蜡油、因烯烃寡聚产生的类异戊二烯油(如角鲨烷或角鲨烯油,烯烃,特别是异丁烯或癸烯低聚化产生的油)、酸或醇的含线性烷基的酯(更尤其植物油、油酸乙酯、丙二醇二-(辛酸酯/癸酸酯)、甘油三-(辛酸酯/癸酸酯)或丙二醇二油酸酯)、支链脂肪酸或醇的酯(尤其异硬脂酸酯);乳化剂为非离子表面活性剂(尤其聚氧乙烯化脂肪酸(例如油酸)的酯、山

梨聚糖的酯、二缩甘露醇的酯(如无水甘露醇油酸酯)、脂肪族二元醇的酯、甘油的酯、聚甘油的酯、丙二醇的酯以及油酸的酯、异硬脂酸的酯、蓖麻油酸的酯或羟基硬脂酸的酯,上述酯可经乙氧基化、脂肪醇和多元醇(例如油醇)的醚、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(尤其**Pluronic®**,特别是L121));

[0034] 优选地,丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物为交联的丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物,尤其是与糖的聚链烯基醚或聚醇交联的化合物卡波姆、优选为卡波普974P、934P和971P;

[0035] 优选地,顺丁烯二酸酐和链烯基衍生物的共聚物为顺丁烯二酸酐与乙烯的共聚物EMA;

[0036] 优选地,所述佐剂为GEL A佐剂;

[0037] 所述佐剂的浓度范围是从5%到50%V/V,优选5%V/V。

[0038] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述的疫苗组合物进一步包括其他抗原,所述抗原包括由下列抗原中的一种或多种组成的组:犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus,CDV)抗原、犬腺病毒(Canine Adenovirus)I型、II型抗原、犬钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)抗原、犬冠状病毒(Canine Coronavirus,CCV)抗原、犬细小病毒(Canine Parvovirus,CPV)抗原、狂犬病病毒(Rabies virus,RV)抗原、犬流感病毒(Canine Influenza virus,CIV)抗原、犬呼肠病毒(Canine Reovirus,CRV)抗原、犬伪狂犬病毒(Pseudorabies)抗原、犬轮状病毒(Rotavirus)抗原、犬疱疹病毒(Canine Herpesvirus,CHV)抗原、犬病毒性乳头瘤病毒(Canine Viral Papillomatosis)抗原、犬微小病毒(Canine Minute Virus)抗原、犬腮腺炎病毒(Canine Mumps Virus)抗原、犬淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(Canine Lymphocytic Choriomeingitis Virus)抗原。

[0039] 作为本发明的一种优选实施方式,本发明所述的疫苗组合物中,所述抗原包括由下列抗原中的一种或多种组成的组:犬细小病毒抗原、犬腺病毒抗原、犬钩端螺旋体抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、狂犬病病毒抗原、犬流感病毒抗原。

[0040] 本发明还涉及所述疫苗组合物的制备方法,所述制备方法包括:将所述犬副流感病毒毒株在细胞上增殖并经灭活剂灭活所述扩增培养的犬副流感病毒细胞液,加入兽医学上可接受的载体混合即得。

[0041] 作为本发明的一种优选实施方式,本发明所述的疫苗组合物包括含量为灭活前 $10^{4.0}$ - $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml的犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株灭活抗原、含量为灭活前 $10^{4.0}$ - $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml的犬瘟热病毒CDVC/HN/001株灭活抗原和/或含量为灭活前 $10^{6.0}$ - $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml的犬细小病毒CPV S0425株灭活抗原,以及5%V/VGEL A佐剂。

[0042] 作为本发明的一种优选实施方式,本发明所述的疫苗组合物包括含量为灭活前 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml的犬副流感病毒毒株CPIV HeN0718株灭活抗原、含量为灭活前 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml的犬瘟热病毒CDV C/HN/001株灭活抗原和/或含量为灭活前 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml的犬细小病毒CPV S0425株灭活抗原,以及5%V/VGEL A佐剂。

[0043] 本发明的疫苗组合物中,其他抗原成分对灭活的犬副流感病毒灭活抗原产生了协同作用,使得免疫的犬只在更短时间内达到了足以抵抗强毒攻毒的中和抗体效价。

[0044] 术语“预防和/或治疗”在涉及犬副流感病毒感染时是指抑制犬副流感病毒的复制、抑制犬副流感病毒的传播或防止犬副流感病毒在其宿主体内定居,以及减轻犬副流感病毒感染的疾病或病症的症状。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。

[0045] 本发明还涉及所述的疫苗组合物在制备预防和治疗犬副流感病毒感染相关疾病的药物中的应用。

[0046] 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。

[0047] 本发明实施例中所用到的化学试剂均为分析纯,购自国药集团。

[0048] 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。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。

[0049] 实施例1犬副流感病毒的分离、鉴定

[0050] 从临床上犬副流感病毒感染的动物中分离CPIV野毒株,感染动物的临床症状为:精神沉郁、发热、鼻腔流出大量黏液性、不透明分泌物、干咳等,将其作为入选动物的标准。取感染动物肺组织,用组织匀浆机研磨得到组织匀浆液。

[0051] 用无血清DMEM培养液将病犬的肺组织匀浆液稀释为10%W/V悬液,用0.22 μ m滤膜过滤除菌,并将滤液按10%W/V比例接种Vero单层细胞(购自上海酶联检测技术有限公司)进行病毒分离,24~48小时出现胞融合病变,约96小时细胞病变达到80%以上,冻融收毒作为第1代病毒液;用同步接毒法将第1代所获得的病毒液接种Vero细胞,接种24小时后出现胞融合的细胞病变,接种72~96小时后细胞病变达到80%以上,冻融收毒作为第2代病毒液;用同步接毒法将第2代所获得的病毒液接种Vero细胞,接种24小时后出现胞融合的细胞病变,接种72~96小时后细胞病变达到80%以上,冻融收毒作为第3代病毒液。将第3代病毒液通过电镜观察来进行形态学检测,结果表明:可见具有典型的副流感病毒特征的病毒粒子。采用焦库华(焦库华,岑皓,张小荣,吴艳涛.犬副流感病毒单克隆抗体的研制及其特性鉴定[J].2009,31(12):985-987.)的间接免疫荧光法对第3代病毒液进行病毒特异性鉴定,结果显示:Vero细胞接种病毒形成细胞融合的细胞病变部位出现特异性绿色荧光,表明特异性良好。

[0052] 实施例2犬副流感病毒克隆

[0053] 1、犬副流感病毒全基因组的测序

[0054] 参照GenBank中已提交的CPIV5序列(JQ743318.1),设计13对引物,扩增片段之间部分相互重叠,连接起来可以覆盖全基因组,引物序列见表1。

[0055] 表1犬副流感病毒全基因组测序引物序列表

[0056]	P1	CPIV-1-F	5'-ACCAAGGGGAAAATGAAGTGGT-3'
		CPIV-1-R	5'-CCTATTCCCATAGCATAGCTATATAGCA-3'
	P2	CPIV-2-F	5'-GGCATTATACCAGACCCTTGGTGAGCA-3'
		CPIV-2-R	5'-GCGATAGGATTCTCTCTGGGTTCCTCG-3'
	P3	CPIV-3-F	5'-AACATTACCATCAGGATCCTATAAG-3'
		CPIV-3-R	5'-CCAGGACATTCCCTAATGATGGTAGA-3'
[0057]	P4	CPIV-4-F	5'-GACATTCGTAAATACCTATGGATTTC-3'
		CPIV-4-R	5'-GCTTGAAATTGATGTTATATTACATCCA-3'
	P5	CPIV-5-F	5'-ATTCCAACAAATGTCCGGCAACT-3'
		CPIV-5-R	5'-GCCAATTGAGTGATGGTGAATCT-3'
	P6	CPIV-6-F	5'-TGACATGTACAAATGTGTGAGTCTGCAGC-3'
		CPIV-6-R	5'-CCACGAGCAGTTCTGTCTCTAGCT-3'
	P7	CPIV-7-F	ACCAGTGACAAGCTAGAACAGAACTGC-3'
		CPIV-7-R	5'-ATGGGACAATCTGAAATTGTCCTAAG-3'
	P8	CPIV-8-F	5'-ATCAAGCGGTCAAGAAGCAGCAT-3'
		CPIV-8-R	5'-ACAGAGCAATTCAGCCGTAAGATC-3'
	P9	CPIV-9-F	5'-AGTTTCACCCAGGATGAATTAAGAAC-3'
		CPIV-9-R	5'-TTGTCTGGTACCTCCATTGTAAACA-3'
	P10	CPIV-10-F	5'-GATGACTTTGAATTGGCAGCATCTT-3'
		CPIV-10-R	5'-GTACTGAGTTCCATCAGAGCTTGT-3'
	P11	CPIV-11-F	5'-CTCAATCAATATAGAGTATCAATACC-3'
		CPIV-11-R	5'-GGTACTGTAATATGTGGCTTGACT-3'
	P12	CPIV-12-F	5'-GTGCATCATGTTGTGTCCGACCT-3'
		CPIV-12-R	5'-TGGTGCGATGGAGCATTCAACTT-3'
	P13	CPIV-13-F	5'-CCTGAGGATGATTCCAATTTCCAT-3'
		CPIV-13-R	5'-ACCAAGGGGAAAACCAAGATTAATCC-3'

[0058] 参照RNA提取试剂盒的说明书,提取实施例1分离的CPIV病毒液的总RNA,分别使用P1~P13的下游引物进行反转录反应,制备病毒的cDNA,以得到的cDNA为模板,使用设计的13对引物扩增病毒全基因组。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定条带大小与预期相符后,将PCR产物按照胶回收试剂盒说明书进行回收纯化。将回收后的DNA片段克隆至pEASY-Blunt载体,转化进E.coli DH5 α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,并进行测序分析,结果见序列1。

[0059] 2、全长感染性克隆pCMVTNT-FL的构建

[0060] 根据对犬副流感病毒基因组序列1和转录载体pCMVTNT中酶切位点的分析,将基因组成5个片段,经人工合成方法得到目的片段,分别连入到克隆载体pEasy-Blunt Simple中,再通过酶切、连接将5个片段依次连入转录载体中,最后得到含有病毒全长cDNA的转录载体pCMVTNT-FL。并对pCMVTNT-FL进行测序,引物序列见表2。经过比对序列和序列1完全一致。

[0061] 表2全长感染性克隆pCMVTNT-FL测序引物序列表

[0062] PV1-F	5' -CGACGCGTACCAAGGGGAAAATGAAGTGG-3'
PV1-R	5' -AGATAGGAGACCATCAGAAGTTG-3'
PV2-F	5' -CGACGCGT ATAGCTAGAATCACCAGCCTG-3'
PV2-R	5' -ACTGTACTGATAGAGCAGCTCTTACG-3'
PV3-F	5' -TCATTCTCGCTCACCAAGACACACTGGTG-3'
PV3-R	5' -TGACATAGCCCTTCAATTCCACCTCTGG-3'
PV4-F	5' -CTAGCTAGCTGGAGGTACCAGACAATTATCC-3'
PV4-R	5' -TGCAGCTGTTCAAGTGTGATGTAACTC-3'
PV5-F	5' -CTAGCTAGCACCGTACATTGGCTCCAGG-3'
PV5-R	5' -ATAAGAATGCGGCCGCACCAAGGGGAAAACCA-3'

[0063] 3、辅助质粒的构建

[0064] 以序列1中包含的NP、P基因序列人工合成方法得到目的片段,分别克隆至pCI-neo载体,转化进大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,酶切鉴定正确的质粒命名为pCI-NP、pCI-P,并进行测序分析。引物序列见表3。

[0065] 以序列1中包含的L基因分成L1、L2片段,经人工合成方法得到目的片段,将得到的L1片段用NheI和SalI双酶切后,回收L1片段与经过同样双酶切的pCI-neo载体进行连接、转化,得到质粒pCI-L1。将得到的L2片段用XhoI和SalI双酶切后,回收L2片段与经过同样双酶切的pCI-L1载体进行连接、转化,得到质粒pCI-L12,即pCI-L,并进行测序分析。引物序列见表3。

[0066] 表3辅助质粒测序引物序列表

[0067] NP-F	5' -TATTGAATTCGCCACCATGTCATCCGTGCTCAAGGCATATG-3'
NP-R	5' -TATAGTCGACCTAGATGTCGAGATCGCCCAGTG-3'
P-F	5' -TATTGAATTCGCCACCATGGATCCCACTGATTTGAGC-3'
P-R	5' -TATAGTCGACTCAGATTGTACTGCGGATGATTGC-3'
L1-F	5' -TATTGCTAGCGCCACCATGGCTGGGTCTCGGGAGATA-3'
L1-R	5' -TATAGTCGACAGAGTATCTCCGAATGCCAG-3'
L2-F	5' -TCCGTGTACCGTACATTGGCTCCAG-3'
L2-R	5' -TATAGTCGACTTAGATTTCCCTCGCCATCGATC-3'

[0068] 4、感染性克隆的拯救

[0069] BHK细胞以 8×10^5 /孔的浓度接种于6孔细胞板中,过夜生长至70%-80%单层时,弃上清培养液,利用FuGENE 6转染试剂将重组病毒株基因组的全长cDNA克隆pCMVTNT-FL及辅助质粒pCI-NP、pCI-P和pCI-L分别以1 μ g、1 μ g、1 μ g和0.1 μ g的量共转染BHK细胞,5%CO₂、37℃培养,具体操作按试剂盒说明书进行。转染后14~16h内,细胞板密封43℃水浴3h,5%

CO₂、37℃培养48h后,每孔转染细胞添8×10⁵Vero细胞。继续观察培养直到出现典型犬副流感细胞病变(图1C)。待到病变达到80%以上,用反复冻融法收集重组病毒,作为种毒保存于-80℃。拯救的病毒命名为rCPIV,使用CPIV HeN0718株作为阳性对照,其在Vero上形成的典型犬副流感细胞病变见图1B。图1A为空白对照组Vero细胞图。

[0070] 之后将感染性克隆rCPIV和原母毒CPIV感染Vero细胞后48h,采用间接免疫荧光法进行病毒特异性鉴定,结果分别见图1E、1F,图1E、1F显示:rCPIV感染Vero细胞形成胞融合的细胞病变部位出现特异性绿色荧光,和原母毒CPIV相比,无变化。图1D为空白对照组健康细胞的免疫荧光图。

[0071] 实施例3犬副流感病毒的致病性试验

[0072] 选取CPIV抗原抗体阴性2-3月龄的健康犬15只,随机分为3组,5只/组,第1组通过鼻腔进行病毒接种实施例1分离的CPIV病毒液2ml(病毒含量为10^{5.0}TCID₅₀/ml),第2组通过鼻腔进行病毒接种实施例2克隆的rCPIV病毒液2ml(病毒含量为10^{5.0}TCID₅₀/ml),第3组作为空白对照组,不攻毒,隔离饲养。观察14日,主要观察实验犬精神、食欲、体温、鼻部是否有流涕、咳嗽、肢体运动协调性等临床表征。结果见表4。

[0073] 表4犬副流感病毒的致病性试验结果

[0074]

组别	动物编号	接种剂量	发病数
1	1-5	2ml/只	5/5
2	6-10	2ml/只	5/5
3	10-15	2ml生理盐水	0/5

[0075] 由表4可知:实施例1分离的CPIV和实施例2克隆的rCPIV均能致实验动物发病,且致病性一致。

[0076] 通过上述CPIV分离株与克隆株在细胞病变、免疫荧光、本动物致病性、基因测序等试验对比,两者之间表型相同,可以认为同一病毒株,并命名为HeN0718株。

[0077] 实施例4犬副流感病毒HeN0718株毒力稳定性试验

[0078] 将CPIV HeN0718株在Vero细胞上连续自然传代,分别取P1代、P5代、P10代、P15代、P18代病毒液进行本动物致病性试验。选取CPIV抗原抗体阴性2-3月龄的健康犬30只,随机分为6组,5只/组,第4-8组分别通过鼻腔进行病毒接种P1代、P5代、P10代、P15代、P18代病毒液2ml(病毒含量为10^{5.0}TCID₅₀/ml),第9组作为空白对照组,不攻毒,隔离饲养。观察14日,主要观察实验犬精神,食欲,体温,鼻部是否有流涕,咳嗽,肢体运动协调性等临床表征。结果见表5。

[0079] 表5不同代次的犬副流感病毒HeN0718株致病性试验结果

	组别	动物编号	接种剂量	发病数
[0080]	4	16-20	2ml/只	5 / 5
	5	21-25	2ml/只	5 / 5

[0081]	6	26-30	2ml/只	5 / 5
	7	31-35	2ml/只	5 / 5
	8	36-40	2ml/只	5 / 5
	9	41-45	2ml 生理盐水	0 / 5

[0082] 由表5可知,不同代次的犬副流感病毒HeN0718株均能时实验动物发病,且致病性一致。

[0083] 说明本发明的犬副流感病毒HeN0718株毒力稳定,在细胞培养过程中没有发生毒力衰减情况。

[0084] 实施例5犬副流感病毒HeN0718株灭活疫苗的制备

[0085] 将CPIV HeN0718株培养物接种于Vero细胞,按照MOI=0.01接入形成单层的Vero细胞培养物中,置于37℃培养,当细胞病变达到80%时,收获含毒细胞培养液,经2次冻融后,收毒,测定毒价。加入终浓度为0.025%V/V BPL(β-丙内酯)进行灭活,并按照《中国兽药典》(中国兽药委员会,2010年版三部,中国农业出版社,2010)方法对灭活后的犬副流感病毒进行无菌检验、支原体检验、外源病毒检验,结果表明:CPIV HeN0718株灭活后,未受到细菌、霉菌的污染,也未受到支原体和外源病毒的感染,纯净性良好。

[0086] 将灭活后的病毒液与购自Seppic公司的Gel A佐剂充分混匀,即得灭活疫苗1、2、3、4。具体配比见表6。

[0087] 表6 CPIV HeN0718株灭活疫苗配比

[0088]	名称	灭活前病毒含量(TCID ₅₀ /ml)	Gel A佐剂含量(V/V%)
	疫苗1	10 ^{4.0}	5%
	疫苗2	10 ^{5.0}	5%
	疫苗3	10 ^{6.0}	5%
	疫苗4	10 ^{7.0}	5%

[0089] 实施例6犬副流感病毒HeN0718株灭活疫苗的安全性试验

[0090] 1、一次单剂量接种的安全性试验

[0091] 采用50日龄左右的健康易感犬25只,随机分成5组,5只/组,其中第10-13组分别经皮下接种1ml/只灭活疫苗1、2、3、4,第14组皮下注射1ml生理盐水,作为空白对照。相同条件下饲养,观察14天,每天观察犬的食欲、精神、体温、眼鼻是否正常,注射部分及全身是否有不良反应。结果(见表7):一次单剂量接种易感犬后,犬的精神状态良好、饮食欲正常,体温正常,无眼鼻分泌物产生,注射部位及全身未见不良反应,所有犬均健活。

[0092] 表7灭活疫苗对犬一次单剂量接种的安全性试验结果

	组别	动物编号	食欲	精神	体温	眼鼻	注射部位		全身不良反应
							肿胀	坏死	
[0093]	10	46-50	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	11	51-55	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	12	56-60	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	13	61-65	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	14	66-70	正常	正常	正常	正常	—	—	无

[0094] 2、单剂量重复接种的安全性试验

[0095] 采用50日龄左右的健康易感犬25只,随机分成5组,5只/组,其中第15-18组分别经皮下接种首次免疫1ml/只灭活疫苗1、2、3、4,并于首次免疫后第14天时加强免疫1ml/只,第19组皮下注射1ml生理盐水,作为空白对照。相同条件下饲养,观察14天,每天观察犬的食欲、精神、体温、眼鼻是否正常,注射部分及全身是否有不良反应。结果(见表8):单剂量重复接种易感犬后,犬的精神状态良好、饮食欲正常,体温正常,注射部位及全身未见不良反应,所有犬均健活。

[0096] 表8灭活疫苗对犬单剂量重复接种的安全性试验结果

	组别	动物编号	食欲	精神	体温	眼鼻	注射部位		全身不良反应
							肿胀	坏死	
[0097]	15	71-75	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	16	76-80	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	17	81-85	正常	正常	正常	正常	无	无	无
[0098]	18	86-90	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	19	91-95	正常	正常	正常	正常	—	—	无

[0099] 3、一次超剂量接种的安全性试验

[0100] 采用50日龄左右的健康易感犬25只,随机分成5组,5只/组,其中第20-23组分别经皮下接种4ml/只灭活疫苗1、2、3、4,第24组皮下注射4ml生理盐水,作为空白对照。相同条件下饲养,观察14天,每天观察犬的食欲、精神、体温、眼鼻是否正常,注射部分及全身是否有不良反应。结果(见表9):一次超剂量接种易感犬后,犬的精神状态良好、饮食欲正常,体温正常,注射部位及全身未见不良反应,所有犬都健活。

[0101] 表9灭活疫苗对犬一次超剂量接种的安全性试验结果

	组别	动物编号	食欲	精神	体温	眼鼻	注射部位		全身不良 反应
							肿胀	坏死	
[0102]	20	96-100	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	21	101-105	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	22	106-110	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	23	111-115	正常	正常	正常	正常	无	无	无
	24	116-120	正常	正常	正常	正常	—	—	无

[0103] 以上结果表明:本发明制备的灭活疫苗1、2、3、4用于免疫犬是安全的。

[0104] 实施例7犬副流感病毒HeN0718株灭活疫苗的免疫原性试验

[0105] 采用50日龄左右的健康易感犬25只,随机分成5组,5只/组,其中第25-28组分别经皮下接种1ml/只灭活疫苗1、2、3、4,第29组皮下注射1ml生理盐水,作为空白对照。相同条件下饲养,观察14天发现犬的食欲、精神、体温、眼鼻均正常,注射部分及全身均无不良反应。

[0106] 在免疫后第21天,使用CPIV HeN0718株病毒液2ml(病毒含量为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)攻击试验犬,攻毒后每天观察犬的食欲、精神、体温、眼鼻是否正常,以及注射部位及全身是否有不良反应,并计算攻毒保护率,结果见表10。

[0107] 表10灭活疫苗的免疫原性试验结果

	组别	犬编号	CPIV SN 抗体效价 (均值)			发病 数	保护 率
			免疫前	免疫后 14 天	免疫后 21 天		
[0108]	25	121-125	0	1:64	1:128	0 / 5	100%
	26	126-130	0	1:76.8	1:144	0 / 5	100%
	27	131-135	0	1:80	1:144	0 / 5	100%
	28	136-140	0	1: 89.6	1:144	0 / 5	100%
	29	141-145	0	0	0	5 / 5	—

[0109] 由表10可知:灭活疫苗1、2、3、4对50日龄左右的健康易感犬分别进行免疫,1ml/只,免疫后21天,以犬副流感病毒HeN0718株进行攻毒,疫苗1、疫苗2、疫苗3和疫苗4对犬的保护率均为100%,表明灭活疫苗1、2、3、4具有良好的保护效果。

[0110] 实施例8犬瘟热抗原的制备

[0111] 将犬瘟热病毒C/HN/001株(Canine Distemper Virus, strain C/HN/001保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO.V201604,保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2016年3月29日)在单克隆细胞系Vero/DogSLAM细胞系Vero/DongSLAM-1F5株(Vero/DogSLAM Cell line, strain Vero/DongSLAM-1F5保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO.C201611,保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2016年03月29日)上扩增,收获病毒液,经2次冻融后,收毒,测定毒价。加入终浓度为0.025%V/V BPL(β -丙内酯)进行灭活,并按照《中国兽药典》(中国兽药委员会,2010年版三部,中国农业出版社,2010)方法对CDV C/HN/001在进行无菌检验、支原体检验、外源病毒检验,结果表明:CDV

C/HN/001株灭活后,未受到细菌、霉菌的污染,也未受到支原体和外源病毒的感染,纯净性良好。

[0112] 实施例9犬细小病毒抗原的制备

[0113] 将犬细小病毒S0425株 (Canine Parvovirus, Strain S0425保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO.V201634,保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2016年6月14日)在F81细胞上扩增,收获病毒液,经2次冻融后,收毒,测定毒价。加入终浓度为0.025%V/V BPL (β -丙内酯)进行灭活,并按照《中国兽药典》(中国兽药委员会,2010年版三部,中国农业出版社,2010)方法对CPV进行无菌检验、支原体检验、外源病毒检验,结果表明:CPV S0425株灭活后,未受到细菌、霉菌的污染,也未受到支原体和外源病毒的感染,纯净性良好。

[0114] 实施例10含犬副流感病毒抗原的疫苗组合物的制备

[0115] 将实施例5制备的CPIV HeN0718株抗原、实施例8制备的CDV C/HN/001株抗原、实施例9制备CPV S0425株抗原以及Seppic公司的GEL A佐剂按照表11所示组分及含量进行配制。

[0116] 表11含犬副流感病毒抗原的疫苗组合物含量配比

编号	HeN0718 株 (TCID ₅₀ /ml)	S0425 株 (TCID ₅₀ /ml)	C/HN/001 株 (TCID ₅₀ /ml)	Gel A 佐剂含量 (V/V%)
[0117] 疫苗 5	10 ^{6.0}	10 ^{7.0}	0	5%
疫苗 6	10 ^{6.0}	0	10 ^{5.0}	5%
疫苗 7	10 ^{6.0}	10 ^{7.0}	10 ^{5.0}	5%

[0118] 实施例11含犬副流感病毒抗原的疫苗组合物的应用

[0119] 1、含犬副流感病毒抗原的疫苗组合物的安全性试验

[0120] 选取CPIV、CDV抗原、抗体阴性、CPV抗原阴性、抗体HI $\leq$ 1:4的2~3月龄健康龄比格犬15只,随机分为3组,5只/组,分别免疫实施例10制备的疫苗5-7,每只比格犬均注射10个使用剂量的疫苗,观察14日。结果:免疫接种比格犬精神、饮食均正常;体温无明显变化,均在正常38.5℃-39.5℃范围内;接种部位没有出现肿胀、坏死,无全身不良反应。表明:疫苗5-7的安全性试验均合格。

[0121] 2、含犬副流感病毒抗原的疫苗组合物的免疫原性试验

[0122] 选取CPIV、CDV抗原、抗体阴性、CPV抗原阴性、抗体HI $\leq$ 1:4的2~3月龄健康比格犬55只,随机分为11组,5只/组,第30、31组免疫疫苗5,第32、33组免疫疫苗6,第34、35、36组免疫疫苗7,1ml/只。另设第37、38、39组作为攻毒对照,第40组作为空白对照,不免疫,隔离饲养。分别于免疫前以及免疫后14天、21天采血,检测HI抗体效价(HI抗体效价的检测根据:殷震,刘景华.动物病毒学.第2版.北京:科学出版社,1997:204-437)。免疫后21天,对第30、32、34、37组所有犬分别通过通过鼻腔攻击犬副流感病毒HeN0718株病毒液2ml(病毒含量为10^{5.0}TCID₅₀/ml),观察14日。结果见表12。

[0123] 表12含CPIV抗原的疫苗组合物对CPIV攻击后动物试验结果

	组别	犬编号	CPIV SN 抗体效价 (均值)			发病数	保护率
			免疫前	免疫后 14 天	免疫后 21 天		
[0124]	30	146-150	0	1:128	1:160	0 / 5	100%
	32	156-160	0	1:144	1:160	0 / 5	100%
	34	166-170	0	1:144	1:192	0 / 5	100%
	37	181-185	0	0	0	5 / 5	0
	40	196-200	0	0	0	—	—

[0125] 由表12可知: (1) 免疫后的抗体效价, 疫苗5-7免疫犬后能产生较高的CPIV SN抗体效价, 表明犬副流感病毒灭活抗原与犬瘟热病毒、犬细小病毒弱毒抗原混合使用时, 不影响CPIV的SN抗体效价; (2) 攻毒保护, 疫苗5-7免疫后用CPIV强毒株攻毒均未出现犬副流感病毒病的典型症状, 且保护率均为100%。

[0126] 结合表10、12中组27、组30、组32、组34的数据表明, 在相同含量CPIV灭活抗原($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml)的疫苗组合物中, 为产生相同中和抗体效价, 仅含有CPIV灭活抗原的单苗较含有CPIV灭活抗原的联苗 (还含有CPV和/或CDV灭活抗原) 相比需要更长的时间; 或者是在免疫后同一时间, 较含有CPIV灭活抗原的联苗 (还含有CPV和/或CDV灭活抗原), 仅含有CPIV灭活抗原的单苗生成的中和抗体效价更低。即其他抗原成分的存在促进了CPIV HeN718灭活抗原的免疫效力, 产生了协同作用。

[0127] 免疫后21天, 对第31、35、38组所有犬分别通过口服途径攻击犬细小病毒S0425株病毒液6ml (病毒含量为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml), 观察14日。结果见表13。

[0128] 表13含CPIV抗原的疫苗组合物对CPV攻击后动物试验结果

	组别	犬编号	CPV HI 抗体效价 (均值)			发病数	保护率
			免疫前	免疫后 14 天	免疫后 21 天		
[0129]	31	151-155	< 1:4	1:1280	1:2560	0 / 5	100%
	35	171-175	< 1:4	1:1280	1:2560	0 / 5	100%
	38	186-190	< 1:4	< 1:4	< 1:4	5 / 5	0
	40	196-200	< 1:4	< 1:4	< 1:4	—	—

[0130] 由表13可知: (1) 免疫后的抗体效价, 疫苗5、7免疫犬后能产生较高的CPV HI抗体效价, 表明犬细小病毒灭活抗原与犬副流感病毒、犬瘟热病毒抗原混合使用时, 不影响CPV HI抗体效价; (2) 攻毒保护, 疫苗5、7免疫后用CPV流行的强毒株攻毒均未出现犬细小病毒病的症状, 且保护率均为100%。

[0131] 免疫21天后, 对第33、36、39组所有犬分别通过滴鼻1ml和腹腔注射2ml途径攻击犬瘟热病毒CDV C/HN/001株病毒液 (病毒含量为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml), 观察14日, 结果见表14。

[0132] 表14含CPIV抗原的疫苗组合物对CDV攻击后动物试验结果

	组别	犬编号	CDV SN 抗体效价 (均值)			发病数	保护率
			免疫前	免疫后 14 天	免疫后 21 天		
[0133]	33	161-165	0	1:128	1:160	0 / 5	100%
	36	176-180	0	1:144	1:192	0 / 5	100%
	39	191-195	0	0	0	5 / 5	0
	40	196-200	0	0	0	—	—

[0134] 由表14可知: (1) 免疫后的抗体效价, 疫苗6、7免疫犬后能产生较高的CDV SN抗体效价, 表明犬瘟热病毒灭活抗原与犬副流感病毒、犬细小病毒抗原混合使用时, 不影响CDV SN抗体效价; (2) 攻毒保护, 疫苗6、7免疫后用CDV流行的强毒株攻毒均未出现犬瘟热病毒病的症状, 且保护率均为100%。

[0135] 综上所述: 本发明制备的含犬副流感病毒抗原的疫苗组合物免疫后没有出现食欲下降、体温升高, 鼻流清涕、呕吐、咳嗽、痉挛、抽搐等犬副流感病毒病的典型的临床症状, 对疫苗组合物中所含其他抗原没有免疫干扰作用, 疫苗组合物中所含其他抗原能还对犬副流感病毒抗原发生协同增效作用。

[0136] 以上所述仅是本发明的优选实施例而已, 并非对本发明做任何形式上的限制, 虽然本发明已以优选实施例揭露如上, 然而并非用以限定本发明, 任何熟悉本专业的技术人员, 在不脱离本发明技术方案的范围内, 当可利用上述揭示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例, 但凡是未脱离本发明技术方案的内容, 依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰, 均仍属于本发明技术方案的范围内。

[0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> 普莱柯生物工程股份有限公司
[0003] <120> 犬副流感病毒毒株及其应用
[0004] <160> 1
[0005] <170> PatentIn version 3.3
[0006] <210> 1
[0007] <211> 15246
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 犬副流感病毒
[0010] <400> 1
[0011] accaagggga aaatgaagtg gtgacccaaa tcatcgaaga ccctcgagat tacataggtc 60
[0012] cggaacctat ggcccttcgtg accgacctcg agtcagagta gttcaataag gacctatcaa 120
[0013] gtttgggcaa ttttttgtct ccgacacaaa aatgtcatcc gtgctcaagg catatgagcg 180
[0014] attcacgctc actcaagaac tgcaagatca gagtgaggaa ggtacaatcc cacctacaac 240
[0015] actaaaaccg ataatcaggg tatttatact aacctetaat aaccagagc taagatcccg 300
[0016] gcttcttcta ttctgcctac ggattgttct cagtaatggc gcaagggatt ctcatcgctt 360
[0017] tggagcatta cttacaatgt tttcactacc atcagccaca atgctcaatc atgtcaaatt 420
[0018] agctgaccag tcaccagaag ccgatatcga aagggtagag atcgatggtt ttgaggaggg 480
[0019] atcattccgc ttaatcccca atgctcgctc aggcagagc cgtggagaga tcaatgccta 540
[0020] tgctgcactt gcagaagatc tacctgacac actaaaccat gaaacacctt ttgttgattc 600
[0021] cgaagtcgag gggactgcat gggatgagat tgagacttct ttagatatgt gttacagtgt 660
[0022] cttaatgcag gcatggatag tgacttgcaa gtgtatgact gcgccagacc aacctgctgc 720
[0023] ctctattgag aaacgcctgc aaaaatatcg tcagcaaggc aggatcaacc caagatatct 780
[0024] cctgcaaccg gaggtctgac gaataatcca gaatgtaatc cggaagggga tgggtggcag 840
[0025] acatttcctc accttcgaac tgcagcttgc ccgagcaca agccttgtat caaataggta 900
[0026] ttatgctatg gtaggggatg ttgggaagta tatagagaat tgtggaatgg gaggtctctt 960
[0027] tttgacacta aaatatgcat taggaaccag atggcccaca cttgccctag ctgcattttc 1020
[0028] aggagagcta acaaagctaa agtcctcat ggcatatac cagacccttg gtgagcaggc 1080
[0029] ccgatacttg gccctattgg agtcaccaca ttgatggat ttgctgcag caaactaccc 1140
[0030] actgtatac agctatgcta tgggaatagg ctatgtgtta gatgtcaaca tgaggaaacta 1200
[0031] tgctttctcc agatcataca tgaataagac atatttccaa ttaggaatgg aaactgcaag 1260
[0032] aaaacaacag ggtgcagttg acatgaggat ggcagaagat ctcggtctaa ctcaagccga 1320
[0033] acgcaccgag atggcaaata cacttgccaa attgaccaca gcaaatcgag gggcagacac 1380
[0034] caggggagga gtcaacctt tctcatctgt caccgggaca actcaggtgc ccgctgcggt 1440
[0035] aacaggtgac acattcgaga gctacatggt cgcggatcga ctgaggcaga gatatgctga 1500
[0036] tgcaagcacc cacgatgatg agatgccacc actggaagag gaggaagaag acgatacatc 1560
[0037] tgcaggtcca cgcaactggac caactctcga acaagtggcc cttgacatcc agaacacagc 1620
[0038] agttggagct ccaatccata cagatgactt gaatgccga ctgggcgac tcgacatcta 1680
[0039] gacaattcag atctcaatcc aaaatcgaca caccgaagta accagctaga tggaaccaca 1740
[0040] gtggactcca caaggttctt gccactaca cgcttttaag aaaaaaatag gcccgacgg 1800
[0041] gttagtaaca agtgatgcc gatgtcaata acacaatcca caatctacaa tggatccac 1860

[0042]	tgatttgagc ttctccccag atgagatcaa caagctcata gagacaggcc tgaacactgt	1920
[0043]	ggagtatttt acttcccagc aagtcacagg aacatcctct ctgggaaaga atacaatacc	1980
[0044]	accaggggtt acaggactac taaccaatgc tgcagaggca aagatccaag agtcagccaa	2040
[0045]	ccatcagaag gttccagttg atgggggtgc aaaatcaaag aaaccgagc caaaaattgc	2100
[0046]	cattgtgcca gcagatgaca aaacggtgcc cggaagccg atcccaaacc ctctattagg	2160
[0047]	tctggactcc accccaagca cccaaactgt gcttgatcta agtgggaaaa cattaccatc	2220
[0048]	aggatcctat aaaggggtta agcttgcgaa atttgaaaa gaaaatctga tgacacggtt	2280
[0049]	catcgaggaa cccagagaga atcctatcgc aaccagttcc ccaaccgatt ttaagagggg	2340
[0050]	cagggatacc ggagggttcc atagaaggga gtactcaatt ggatgggtgg gagatgaagt	2400
[0051]	caaggtcact gagtggtgca atccatcctg ttctccaatc accgctgcag caaggcgatt	2460
[0052]	tgaatgcact tgtcaccagt gtccagtcac ttgctctgaa tgtgaacgag atacttaata	2520
[0053]	cagtgaaaa tctggactct cggatgaate aactggagac aaaagtagat cgcattctct	2580
[0054]	catctcagtc tctaatccag accatcaaga atgacatagt tggactcaaa gcagggatgg	2640
[0055]	ctactttaga aggaatgatt acaactgtga aaattatgga cccgggagtt cccagcaatg	2700
[0056]	ttactgtgga agatgtgcgc aagaaattaa gtaacatgc tgttggtata ccagaatcat	2760
[0057]	tcaatgatag tttcttgact caatctgaag atgtaatttc acttgatgag ttggcccgac	2820
[0058]	caactgcaac aagtgttaag aagattgtca ggaaggttcc tcctcagaag gatctgactg	2880
[0059]	gattgaagat cacactagag caattggcaa aggattgcat cagtaaaccg aagatgaggg	2940
[0060]	aagagtatct ccttaaaatc aaccaggctt ccagtgaggc ccagctactt gacctcaaga	3000
[0061]	aagcaatcat ccgcagtaca atctgatcta gaaacacca attacaccac actggcatga	3060
[0062]	cactgcacca accctgaggg ctttagaaaa aacgatcgat aataaataag cccgaacact	3120
[0063]	atacaccacc cgaggcagcc atgccatcca tcagcatccc tgcagaccct accaatccac	3180
[0064]	gtcaatcaat aaaagegttc ccaattgtga ttaacagtaa tgggggtgag aaaggccgct	3240
[0065]	tagttaaaca actacgcaca acctacttga atgacctaga tactcatgag ccactggtga	3300
[0066]	cgttcgtaaa tacttatgga ttcatctacg aacagactcg gggaaatacc attgtcggag	3360
[0067]	aggatcaaca tgggaagaaa agagaggctg tgactgctgc aatggttact cttggatgtg	3420
[0068]	ggcctaactc accatcatta gggaatgtcc tgggacaact aagtgaattc caggtcattg	3480
[0069]	ttagaaagac atccagcaaa gcagaagaga tgatctttga aattgttaag tatccgagaa	3540
[0070]	tatttaggag tcatacatta atccagaaag gactagtctg tgtctccgca gaaaaatttg	3600
[0071]	ttaagtcacc agggaaagta caatctggaa tggactatct cttcattccg acatttttgt	3660
[0072]	cagtgactta ctgtccagct gcaatcaaat ttcaggtacc tggeccatg ttaaagatga	3720
[0073]	gatcaagata cactcagagc ttacaacttg aactaatgat aagaatctg tgtaagcccc	3780
[0074]	attgcceact tatgaaggtc cacatccctg acaaggaagg aagaggatgt cttgtatcag	3840
[0075]	tttggttgca tgtatgcaac atctacaaat caggaaacaa gaatggcagt gagtggcagg	3900
[0076]	aatactggat gagaaagtgt gctaacatgc aacttgaagt gtcgattgca gacatgtggg	3960
[0077]	gaccaacat cataattcat gccaggggtc acattcccaa aagtgctaag ttgtttttcg	4020
[0078]	gaaaggggtg atggagctgc catccacttc atgaagttgt tccaagtgtc accaaaacac	4080
[0079]	tatggctctgt aggcgtgag attacaaagg ctaaggcaat catacaagag agtagcatct	4140
[0080]	ctctctcgt ggagactact gacatcataa gtccaaaagt caaaatttca tctaagcatc	4200
[0081]	gtcgcttttg gaaatcaaat tggggctctgt tcaggaaaac cagatcacta cccaacctga	4260
[0082]	cgaagctgga atgactgacc tctaatcgag attacaccac ctcaaactat agatgggtgg	4320
[0083]	tacctaagtg atcaatcttg taagtactga tcgtaggcta caacacatta atattattcg	4380

[0084]	ggttagatag	ctcaattagc	tctttattaa	taataacact	actattccaa	tagctagaat	4440
[0085]	caccagcctg	atttatctcc	aaaatgattc	aaagaaaaca	agtcataatta	agactatctt	4500
[0086]	aagcacgaac	ccatategtc	cttcaaatca	tgggtactag	aattcaactt	ctgatgggtc	4560
[0087]	cctatctatt	ggcaggaaca	ggcagccttg	atccagcagc	cctcatgcaa	atcgggtgtc	4620
[0088]	ttccaacaaa	tgtccggcaa	cttatgtatt	atactgaggc	ttcatcagca	ttcattgttg	4680
[0089]	tgaagttaat	gcctacaatt	gactcgccga	ttagtgggtg	taatataaca	tccatttcaa	4740
[0090]	gctataatgc	aacaatgaca	aaacttctac	agccgatcgg	tgagaattta	gagacgatta	4800
[0091]	ggtaccagtt	gattccaact	cggaggagac	gccggtttgt	aggggtgtgt	attggatttg	4860
[0092]	ccgcattagg	agtagctact	gcagcacagg	ttactgccgc	agtagcacta	gtaaaggcga	4920
[0093]	ataaaaatgc	tgcggctata	ctcaatctca	aaaatgcaat	caaaaaaaca	aatgcagcag	4980
[0094]	ttgcagatgt	ggttcaggcc	acacaatcac	taggaacggc	agttcaagca	gttcaagatc	5040
[0095]	acataaatag	tgtggtaagt	ccagcaatta	cagcagccaa	ttgcaaagcc	caagatgcta	5100
[0096]	tcattggctc	aattctcaat	ctttatttga	ccgagttgac	aactatcttc	cataatcaaa	5160
[0097]	ttacaaaccc	cgcattgagt	cctattacaa	ttcaagcttt	aaggatccta	ctagggagca	5220
[0098]	ccttgccgac	cgtggtcaga	aaatctttca	ataccagat	aagtgcagct	gagcttctct	5280
[0099]	catcagggtt	attgacaggc	cagattgtgg	gattagattt	gacctacatg	cagatgggtc	5340
[0100]	taaaaattga	gctgccaaact	ttaactgtac	aacctgcaac	tcagatcata	gatctagtca	5400
[0101]	ccatttctgc	attcattaac	aatcgagaag	ttatggccca	attaccaaca	cgtgtttattg	5460
[0102]	tgactggcag	cttgatccaa	gcctatcccg	catcgcaatg	tactatcacc	cccaacactg	5520
[0103]	tgtattgtag	gtataatgat	gcccagtagc	tctcagataa	tacgatggct	tgcctccaag	5580
[0104]	gtaacttgac	aagatgcacc	ttctctccgg	tgggtgggag	ctttcttact	cgattcgtgc	5640
[0105]	tgtttgatgg	aatagtttat	gcaaattgca	ggtcgatggt	gtgcaagtgc	atgcagcctg	5700
[0106]	ctgctgttat	cctacagcca	agttcatccc	ctgtaactgt	cattgacatg	cacaagtgtg	5760
[0107]	tgagtctgca	gcttgacaat	ctcagattca	ccatcactca	attggccaat	ataacctaca	5820
[0108]	atagcaccat	caagcttgaa	acatctcaga	tcttgccctat	tgatccgttg	gatatatccc	5880
[0109]	agaatctagc	tgcggtgaat	aagagtctaa	gtgatgcact	acaacactta	gcacaaagtg	5940
[0110]	acacatacct	ttctgcaatc	acatcagcta	cgactacaag	tgtattatcc	ataatagcaa	6000
[0111]	tctgtcttgg	atcgttaggt	ttaatatata	tagtcttgat	cagtgtagtt	gtgtggaagt	6060
[0112]	tattgaccat	tgtcgtgct	aatcgaaata	gaatggagaa	ttttgtttat	cataattcag	6120
[0113]	catcccacca	ctcacggtct	gatctcagtg	agaaaaatca	acctgcaact	cttggaaaca	6180
[0114]	gataagacag	tcatctatta	ataattttaa	agaaaaaaac	gataggaccg	aaactagtat	6240
[0115]	tgaagaagcc	gtctcggtca	atccaggcaa	tcaagccgac	accgtctcgg	aaagctcaaa	6300
[0116]	tcattgctgc	cgatccggaa	gatccggaga	gcaaaaaaac	tacaaggaga	acaggaaacc	6360
[0117]	caatcatccg	ctttccattc	accctccctc	tatttgtaaa	cttcaactgc	ccaactccaa	6420
[0118]	gacacccact	gtcccaacac	ttgccatagg	ccatctacta	tatcatctct	cctgccatac	6480
[0119]	ttctatttca	catcatatct	atttttaaaga	aaacataggc	ccgaacacta	atcgtgccgg	6540
[0120]	cagtgccact	gcacacacaa	cactacacgt	acaatacact	acaatgggtg	cagaagatgc	6600
[0121]	ccctgttagg	ggcaettgcc	gagtattatt	tgaacaata	actttaattt	ttctatgcac	6660
[0122]	actactagca	ttaagcatct	ctatccttta	tgagagttta	ataaccaag	agcaataaat	6720
[0123]	gagccacgca	ggctcaactg	gatctaattc	tcgattagga	agtatcattg	atcttcttaa	6780
[0124]	taatattctc	tctgtcgcaa	atcagattat	atataactct	gcagtcgctc	tacctctaca	6840
[0125]	attggacact	cttgaatcaa	cactccttac	agccattaag	tctcttcaaa	caagtgacaa	6900

[0126]	gctagaacag aactgctcat ggggtgctgc actgattaat gataatagat acattaatgg 6960
[0127]	catcaatcag ttttatttct caattgctga gggtcgcaat ctggcacttg gccacttct 7020
[0128]	taatatacct agtttcattc caactgccac gacaccagag ggctgcacca ggateccatc 7080
[0129]	attctcgctc accaagacac actgggtgta tacacacaat gttatcctga atggatgcca 7140
[0130]	ggatcatgta tctctaaatc aatttgtttc catgggaatc attgagccca cttctgccgg 7200
[0131]	gtttccatcc tttegaaccc taaagactct atatctcagc gatgggggtca atcgtaagag 7260
[0132]	ctgctctatc agtacagttc cgggggggttg tatgatgtat tgtttcgtct ctactcaacc 7320
[0133]	agagagggat gactaccttt ctaccgctcc tccagaacaa cgaattatta taatgtacta 7380
[0134]	taatgataca atcgtggagc gcataattaa tccacccgga gtactagatg tatgggcaac 7440
[0135]	attgaacca ggaacaggaa gcgggggtata ttatttaggt tgggtactct ttccaatata 7500
[0136]	tggcgcgctg attaaaaaga cgagtttatg gaataatcaa gcaaataaat actttatccc 7560
[0137]	ccagatggtt gctgctctct gctcacaaaa ccaggcaact caagtcaaaa atgctaagtc 7620
[0138]	atcatactat agcagctggc tcggcaatcg aatgattcag tctggaatcc tggcatgtcc 7680
[0139]	tcttcaacag gatctaacta atgagtgttt agttctgccc ttttctaatag atcagggtgct 7740
[0140]	tatgggtgct gaaggagat tatacatgta tggtgactcg gtgtattact accaaagaag 7800
[0141]	caatagttgg tggcctatga ccatgctgta taaggtaacc ataacgttca ctaatggtca 7860
[0142]	gccatctgct atatcagctc agaatgtgcc cacacagcag gtccctagac ctgggacaag 7920
[0143]	aaactgctct gcaacaaata gatgtccggg tttttgcttg aaaggagtgt atgctgatgc 7980
[0144]	ctggttactg accaaccctt cgtctaccag cacatttgga tcggaagcaa ccttcactgg 8040
[0145]	ctcttatctc aacgcggcaa ctacagctat caatccgacg atgtatatcg cgaacaacac 8100
[0146]	acagatcata agctcacagc aatttggtatc aagcggtaaa gaagcagcat atggtcacac 8160
[0147]	aacttgtttt agggacacag gctctgttat ggtatactgt atctatatca ttgaactgtc 8220
[0148]	atcatccctc ttaggacaat ttcagatagt tccattttatc cgtcagggtga cactatcccta 8280
[0149]	aaggcaaaag catccaggtc tgaccacaga aatcaaggca ttataccaga ccatgaaatg 8340
[0150]	tataccaaac attattaaca ctaatgacac acaaaaatgg ttttaagaaa aaccaagaga 8400
[0151]	acaataggcc agaatggctg ggtctcgga gatattactc cctgaagtcc atctcaattc 8460
[0152]	gccaatgtga aagcataagc tatactatta cattctactt ggaaacctcc caaatgagat 8520
[0153]	cgacattgac gatttaggtc cattacataa tcaaaattgg aatcagatag cacatgaaga 8580
[0154]	gtctaactta gcccaacgct tggtaaatgt aagaaatttt ctaattactc acatccctga 8640
[0155]	tcttagaaag ggccattggc aagagtatgt caatgtaata ctgtggccgc gaattcttcc 8700
[0156]	cttgattccg gattttaaaa tcaatgacca attacctcta ctcaaaaatt gggacaagct 8760
[0157]	agttaaagaa tcatgttcag taatcaatgc gggctacttc cagtgtattc agaatctcag 8820
[0158]	ctatggactg acaggctcgtg ggaacctctt tacacgatca cgtgaactct ctggtgaccg 8880
[0159]	cagggatatt gatcttaaga cggttgtggc ggcatggcat gactcagact ggaaaagaat 8940
[0160]	aagtgatttt tggattatga tcaaattcca gatgagacaa ttaattgtta ggcaaacaga 9000
[0161]	tcataatgat cctgatttaa tcacatatat cgaaaacaga gaaggcataa tcatcataac 9060
[0162]	tctgaactg gtagcattat ttaacactga gaatcataca ctaacatata tgacctttga 9120
[0163]	aattgtactg atggtttcag atatgtacga aggtcgctac aacattttat cactatgcac 9180
[0164]	agttagcact tacctgaatc ccctgaagaa aagaataaca tattttattga gcctttaga 9240
[0165]	taacttggct ttccagatag gtgatgctgt atacaacata attgctttgc tagaatcctt 9300
[0166]	tgtatatgca cagttgcaaa tgtcagatcc catcccagaa ctccagaggac aattccatgc 9360
[0167]	attcgatgt tctgagattc ttgatgcact aagggaact aatagcttca cccaagatga 9420

[0168] atcaagaaat gtgacaacca atttgatata cccattccaa gatctgaccc cagatcttac 9480
 [0169] ggctgaattg ctctgtataa tgaggctttg gggacacccc atgctcactg ccagtaagc 9540
 [0170] tgcgggaaag gtacgcgagt ctatgtgtgc tggaaaggtg ttagactttc caaccattat 9600
 [0171] gaaaacacta gcctttttcc atactattct gatcaatggt tacaggagga agcatcatgg 9660
 [0172] agtatggcca cccttgaact taccgggtaa tgcttcaaag ggtctcatag aacttatgaa 9720
 [0173] tgacaatact gagataagct atgaattcac acttaagcat tggaaggaag tctctcttat 9780
 [0174] aaaattcaag aaatgttttg atgcagacgc aggtgaggaa ctcagtatat ttatgaaaga 9840
 [0175] taaagcaatt agtgcaccaa aacaagactg gatgagtgtg tttagaagaa gcctaataca 9900
 [0176] acagcgccat cagcatcatc aggtccccc acctaattca ttcaatcgac ggctattgct 9960
 [0177] aaactttctt ggcatgaca aattcgaccc gaatgtggag ctacagtatg taacatcagg 10020
 [0178] tgagtatcta catgatgaca cgttttgtgc atcatattca ctgaaagaga aggaaattaa 10080
 [0179] acctgatggt cgaatttttg caaagttgac taaaagaatg agatcatgtc aagttatagc 10140
 [0180] agaactctct ttagcgaacc atgctgggaa gttaatgaaa gagaatgggt ttgtaatgaa 10200
 [0181] tcagctatca ttaacaaaat cactattaac aatgagtcag attggaataa tatccgagaa 10260
 [0182] agctagaaaa tcgactcggg ataacataaa tcaacctggt ttccagaata tccagagaaa 10320
 [0183] taaatcacgt cactccaagc aagtcaacca gcgagatcca agtcatgact ttgaattggc 10380
 [0184] agcatctttt ttaactactg atctcaaaaa atattgttta caatggaggt accagacaat 10440
 [0185] tatcccatth getcaatcat taaacagaat gtatggttat cctcatctct ttgagtggat 10500
 [0186] tcacttacgg ctaatgcgta gtacacttta cgtgggggat ccttcaacc caccagcgga 10560
 [0187] taccagtcaa tttgatctag ataaagtgat taatggagat atctttattg tatcaccag 10620
 [0188] aggtggaatt gaagggtat gtcaaaaaggc ttggacaatg atatctatct ctgtgataat 10680
 [0189] tctatctgcc acagagtctg gcacacgagt aatgagtatg gtgcaggag ataatacagc 10740
 [0190] aattgctgtc accacacgag taccaaggag ctggccgact ctgagaaaa agactattgc 10800
 [0191] ttttagatct tgtaatctat tctttgagag gttaaaatgt aataattttg gattaggtca 10860
 [0192] ccatttgaaa gaacaagaga ctatcattag tcccacttc tttgtttata gcaagagaat 10920
 [0193] attctatcag gggaggattc taacacaagc cttaaaaaat gctagtaagc tctgcttgac 10980
 [0194] agctgatgtc ctaggagaat gtacccaatc atcatgttct aatcttgcaa ctactgtcat 11040
 [0195] gagattaact gagaatgggt ttgaaaaaga tatctgtttc tatttgaata tttatatgac 11100
 [0196] catcaaacag ctctctatg atatcatctt cctcaagtg tcaattctct gagatcagat 11160
 [0197] cacattagaa tacataaata atccacatct ggtatcacga ttggctcttc tgccatctca 11220
 [0198] gctaggaggt ctaaactacc tgtcatgtag taggctgttc aatcgaaaca taggcgaccc 11280
 [0199] ggtggtttcc gcagttgcag atcttaagag attaaataac tcaggatgta tggattactg 11340
 [0200] gatcctttat aatttattag gtagaaaacc gggaaacggc tcatgggcta ctttagcagc 11400
 [0201] tgaccegtac tcaataaaca tagagtatca ataccccca actacagtc ttaagaggca 11460
 [0202] caccacaaca gctctgatgg aactcagta aatccaatg ttacgtggca tattctctga 11520
 [0203] caatgcacag gcagaagaaa ataactctgc tagatttctc ctggataggg aggtgatctt 11580
 [0204] tccacgtgta gctcacataa tcattgagca aaccagtgtc gggaggagaa aacagattca 11640
 [0205] aggatatttg gattcaacta gategataat gaggaaatca ctagaaatta agccttgctc 11700
 [0206] caataggaag cttaatgaaa tactagatta caacatcaat tacctagctt acaatttggc 11760
 [0207] attactcaag aatgctattg aacctcgac ttatttgaag gcaatgactc ttgaaacatg 11820
 [0208] tagcatcgac attgcaagga gcctccggaa gctttcctgg gcccactct tgggtgggag 11880
 [0209] aaatcttgaa ggattagaga caccagatcc cattgaaatt actgcaggag cattaattgt 11940

[0210]	tggatcaggc tactgtgaac agtgtgtgc aggagacaat cgattcacat ggtttttctt	12000
[0211]	gccatctggt atcgagatag gaggggatcc cctgtataat cctcctatcc gtgtaccgta	12060
[0212]	cattggtcc aggactgatg agaggagggt agcctcaatg gcatacatca ggggtgcctc	12120
[0213]	gagtagccta aaagcagctc ttagactggc aggagtgtac atctgggcat tcggagatac	12180
[0214]	tctggaaaat tggatagatg cactggattt gtctcatact agagttaaca tcacacttga	12240
[0215]	acagctgcaa tccctcacc cacttccaac ctctgccaat ctaaccatc ggttggatga	12300
[0216]	tggcacaact accctaaagt ttactcctgc gagctcttat accttttcaa gtttactca	12360
[0217]	tatatcaaat gatgagcaat acctgacaat taatgacaaa actgcagatt caaatataat	12420
[0218]	ctaccaacag ttaatgatca ctggactcgg aatcttagaa acatggaata atcctccaat	12480
[0219]	caatagaaca ttcgaagaat ctaccctaca tttgcacact ggtgcatcat gttgtgtccg	12540
[0220]	acctgtggac tcctgcatca tctcagaagc attaacagtc aagccacata ttacagtacc	12600
[0221]	gtacagcaat aaatttgtat ttgatgaaga cccgtatct gaatatgaga ctgcaaaact	12660
[0222]	ggaatcgta tcattccaag ccagttagg caacattgat gctgtagata tgacaggtaa	12720
[0223]	attaacatta ttgtcccaat tcaactgaag gcagattatt aatgcaatca ctggactcga	12780
[0224]	tgagtctatc tctcttacta atgatgccat tgttgcatca gactatgtct ccaattggat	12840
[0225]	cagtgaatgc atgtatacca aattagatga attatttatg tattgtgggt gggaactact	12900
[0226]	attagaacta tcctatcaaa tgtattatct gagggtagtt gggtaggta acatagtga	12960
[0227]	ttattcttac atgactctaa gaaggatacc tgggtgcagc ttaacaatc tggcatctac	13020
[0228]	attaagtcac ccaaaacttt tccgacgggc tatcaactta gatatagttg ccccttaaa	13080
[0229]	tgctcctcat tttgcatctc tggactacat caagatgagt gtggatgcaa tactctggg	13140
[0230]	ctgtaaaaga gtcacatg tgctctccaa tggaggggac ttagaattag ttgtgacatc	13200
[0231]	tgaagatagt cttattctca gtgaccgatc catgaatctc attgcaagga aattaacttt	13260
[0232]	attatcactg attcatcata atggtttgga attaccaaag attaaggggt tctcacctga	13320
[0233]	tgagaagtgt ttcgctttga cagaattttt gaggaagtgt gtgaactcag ggttgagttc	13380
[0234]	aatagagaac ctatcaagtt ttatgtacaa ttagagaaac ccacggcttg cagcatcgc	13440
[0235]	cagcaataat tactacctga ccagaaaatt atcgaattca atacgagata ctgagtcggg	13500
[0236]	tcaagtagcg gtcacctcat attatgaatc attagaatat attgatagtc ttaagtaac	13560
[0237]	cccacatgtg cctggtacct catgcattga ggatgatagt ctatgtacaa atgattacat	13620
[0238]	aatctggatc atagagtcca atgcaaaact ggagaagtat ccaattccaa atagccctga	13680
[0239]	ggatgattcc aatttccata actttaagtt gaatgtcca tcgcaccata ccttacgcc	13740
[0240]	attagggtta tcatcaactg cttggtataa gggataagc tgttgaggt acctgagcg	13800
[0241]	attaaagcta ccacagggtg atcatttata tattgcagaa ggtagtgtg ccagtatgac	13860
[0242]	aatcatagaa tacttattcc caggaagaaa gatataattac aattctttat ttagtagtg	13920
[0243]	tgacaatccc ccacaaagaa attatgcacc aatgcctact cagttcattg agagtgtccc	13980
[0244]	atacaagctc tggcaagcac acacagatca atatcccag atttttgagg atttcatccc	14040
[0245]	tctatggaac ggaaatgccg ccatgactga cataggaatg acagcttgtg tagaatttat	14100
[0246]	catcaataga gtcggcccaa ggacttgacg tttagtacat gtagatttg agtcaagtgc	14160
[0247]	aagcttaaat caacaatgcc gtgcaaaagc gataattaat gctattatca ctgtacaac	14220
[0248]	tgttttgtgc cctcatggg tgcttattct gaaatatagt tggttgcat ttactagatt	14280
[0249]	tagtactttg atcactttct tatggtgcta ctttgagaga atcactgttc ttaggagcac	14340
[0250]	atattctgat ccagctaatc atgaggttta ttttaattgt atccttgccg acaactttgc	14400
[0251]	attccagact gtctgcagg caacaggaac ggcgatgact ttaaccgatc aagggtttac	14460

[0252]	tttgatatca cctgaaagaa taaatcagta ttgggatggt cacttgaagc aagaacgtat	14520
[0253]	cgtagecgaa gcaattgata aggtggttct aggagaaaat tctctattca attcgagtga	14580
[0254]	taatgaatta atcctcaaat gtggaggagac accaaatgca cggaatetta tcgatatcga	14640
[0255]	gccagtcgca actttcatag aatttgaaca actgatctgc acaatgttga caaccactt	14700
[0256]	gaaggaaata attgatataa caaggtcttg aaccaggat tatgaaagt tattactcac	14760
[0257]	tccttacaat ttaggtcttc ttggtaaaat cagtacgata gtgagattat taacagaaag	14820
[0258]	gattctaaat catactatca ggaattggtt gatcctccca ccttcgctcc ggatgatcgt	14880
[0259]	gaagcagaac ttggaattcg gcatattcag gattacttcc atcctcaact ctgatcgatt	14940
[0260]	cctgaagctt tctccaaata ggaaatactt gattacacaa ttaactacag gctacattag	15000
[0261]	aaaattgatt gagggggatt gtaatatcga actaactaga cctatccaaa agcaaactcg	15060
[0262]	gaaagcatta ggttgtgtag tctattgtca cgatccagta gatcaaaggg aatcaacaga	15120
[0263]	gtttattgat ataaatatta atgaagaaat agaccgctgg atcgatggcg aggaaatcta	15180
[0264]	aatatatcaa gaatcagaat tagtttaaga aaaaataaga ggattaatct tggttttccc	15240
[0265]	cttgggt	15246

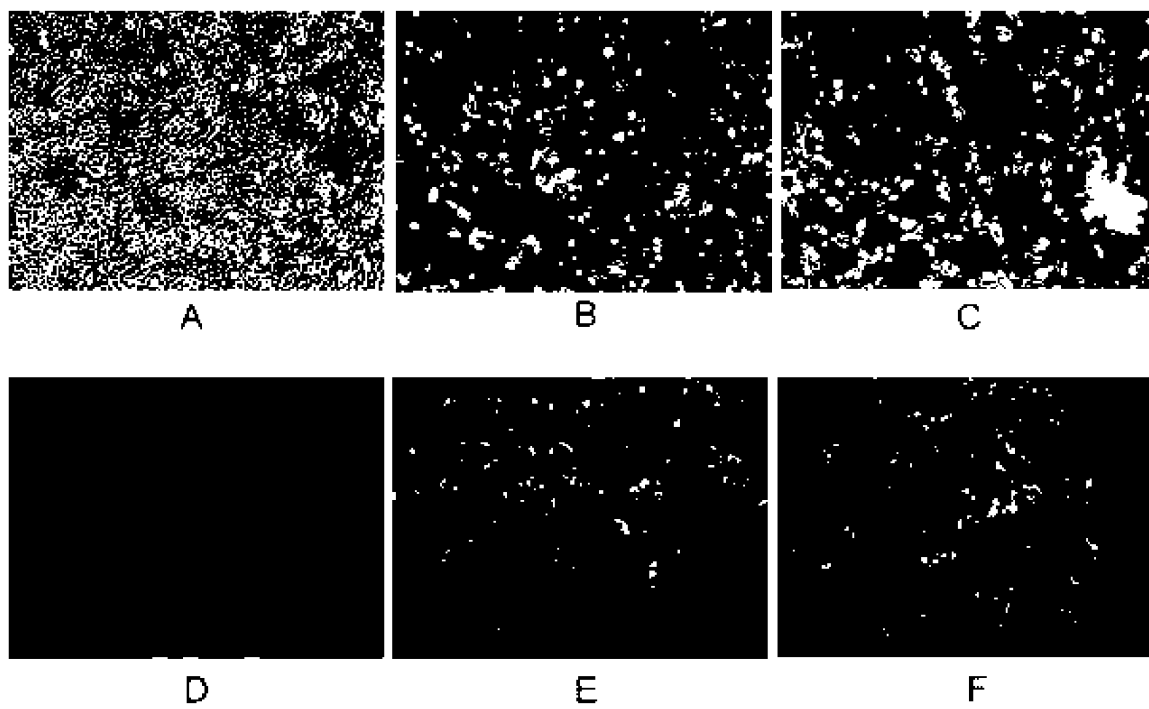


图1