

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610104676.0

[51] Int. Cl.

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月11日

[11] 公开号 CN 1944462A

[22] 申请日 2006.9.29

[21] 申请号 200610104676.0

[71] 申请人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市咸宁路28号

[72] 发明人 杨军 张明娟 陈晓黎 苏宝山

王一理 司履生

[74] 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司

代理人 李郑建

权利要求书3页 说明书19页 附图1页

[54] 发明名称

抗 PV IgY 抗体制备及其用于 PV 诊断试剂和
预防药物用途

[57] 摘要

本发明公开了一种抗 PV IgY 抗体的制备及其该抗 PV IgY 在制备 PV 相关疾病免疫诊断试剂和预防药物中的用途。抗 PV IgY 抗体是通过分子生物学方法获得不同类型的 PV 病毒蛋白或能表达上述蛋白的真核表达载体,将其作为 PV 病毒蛋白抗原或基因疫苗免疫雌性禽类动物,通过常规方法分离并纯化相应的抗 PV IgY 抗体,用于制备 PV 感染及相关疾病诊断试剂和预防药物。实验证明特异性抗 PV IgY 抗体具有特异性结合相应 PV 抗原的能力,可用于制备 PV 感染及相关疾病诊断试剂、分离和纯化相应 PV 抗原,用于预防 PV 感染药物的制备,并具有安全、副作用小、疗效显著等特点。

1. 一种抗 PV IgY 抗体的制备方法，其特征在于，具体包括下列步骤：

(A)、PV 抗原的制备：

(a) 选择 PV 即乳头瘤病毒感染所引起的乳头状瘤瘤体组织，通过物理、化学、生物方法进行破碎，分离 PV 病毒蛋白，并将上述一种或一种以上的相应 PV 病毒蛋白以任意比例混合，组成抗原混悬液；

(b) 上述 PV 病毒蛋白采用分子生物学方法通过常规的真核表达系统、原核表达系统、酵母表达系统、病毒表达系统即可获得 PV L1、L2、E6、E7、E4、E5、E1 或 E2 蛋白，并将上述一种或一种以上的相应 PV 病毒蛋白以任意比例混合，组成抗原混悬液；

(c) 上述 PV 病毒蛋白采用分子生物学方法制备可表达一种或一种以上 PV L1、L2、E6、E7、E4、E5、E1、E2 蛋白的真核表达载体，并将上述一种或一种以上的真核表达载体以任意比例混合，组成混悬液，作为基因免疫疫苗，通过基因免疫的方式产生相应 PV 抗原；

(B)、免疫方法：

(a) 初次免疫用弗氏完全佐剂乳化的 A (a) 或 A (b) 步骤制备的抗原混悬液在雌性禽类动物胸部上的 4 个点分布式肌内注射，2 周后，用弗氏不完全佐剂乳化的 A (a) 或 A (b) 步骤制备的抗原混悬液进行第二次免疫，以后每隔 30 天左右加强免疫一次，免疫量同前；在初次免疫一周后，收集雌性禽类动物蛋，4℃ 下保存备用；

(b) 采用肌肉注射、基因枪的方法直接将 A (c) 步骤制备的可表达一种或一种以上 PV L1、L2、E6、E7、E4、E5、L1、L2 蛋白及其基因的真核表达载体注入雌性禽类动物体内，免疫雌性禽类动物，2 周后，进行第二次免疫；以后每隔 30 天左右加强免疫一次，免疫量同前，在初次免疫一周后，收集雌性禽类动物蛋，4℃ 下保存备用；

(C)、IgY 的纯化:

IgY 的分离和纯化采用水稀释法或聚乙二醇法或葡聚糖硫酸盐法或黄原胶法或超滤法进行;

(I) 水稀释法分离纯化 IgY 的方法是:

收集的雌性禽类动物蛋取其蛋黄,加水稀释,水:蛋黄=9:1,4℃孵育6h,4℃下离心25min,取上清液,加入19%硫酸钠沉淀,经乙醇沉淀,凝胶过滤/离子交换即可获得抗PVIgY抗体;

(II) 聚乙二醇法分离纯化 IgY:

收集的雌性禽类动物蛋取其蛋黄,加水稀释,水:蛋黄=4:1,加入3.5%的PEG,室温孵育20min,4℃下离心25min,取上清液,加入12%PEG沉淀,PBS溶解后加12%的PEG再次沉淀,加预冷50%乙醇沉淀,-5℃下离心25min,取沉淀物,以PBS溶解后滤膜分析,即可获得抗PVIgY抗体;

(III) 葡聚糖硫酸盐法分离纯化 IgY:

收集的雌性禽类动物蛋取其蛋黄,加水稀释,水:蛋黄=9:1,4℃孵育6h,4℃下离心25min,取上清液,加入6ml葡聚糖硫酸盐,15ml 1M氯化钙孵育30min取上清,将加入100ml PBS离心后取上清,将上清液混合加入PBS至200M,加入19%硫酸钠沉淀,离心后加入PBS再次溶解,加入14%硫酸钠再次取沉淀物,PBS溶解后滤膜分析,即可获得抗PV IgY抗体;

(IV) 黄原胶法分离纯化 IgY:

收集的雌性禽类动物蛋取其蛋黄,加水稀释,水:蛋黄=1:1,与黄原胶溶液混合孵育;所述的黄原胶溶液的配比为:双蒸水/黄原胶=80ml/120mg,20℃下离心15min,取上清液加入19%硫酸钠沉淀,PBS溶解后加入14%硫酸钠并离心取沉淀物,以PBS溶解后滤膜分析,即可获得抗PVIgY抗体。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的雌性禽类动物为母鸡。

3. 根据权利要求1所述的一种抗PV IgY抗体的制备方法,其特征在于,所述的PV是目前所发现的所有感染动物和人的PV亚型,包括BPV-1, CRPV, HPV1、HPV2、HPV4、HPV3、HPV10、HPV16、HPV18、HPV31、HPV45、HPV6、HPV11、HPV42、HPV43、HPV44、HPV33、HPV35、HPV39、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68其中之一;PV病毒蛋白是指PV结构蛋白L1、L2或功能蛋白E1、E2、E5、E6、E7;PV病毒抗原是指PV结构蛋白L1、L2蛋白或其基因和功能蛋白E1、E2、E5、E6、E7蛋白或其基因。

4. 权利要求1所述的方法制备的抗PV IgY抗体用于制备PV感染及其相关疾病免疫诊断试剂和预防药物用途。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于:所述的PV感染及其相关疾病免疫诊断试剂用于ELISA、免疫细胞学和免疫组织细胞学、抗体芯片方法的免疫诊断检测。

6. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述的抗PV IgY抗体以0.1~90%的浓度与10~99.9%的辅料按照常规制剂方法,配制成不同药物制剂,药物制剂包括乳膏剂、喷雾剂、盥洗液、凝胶制剂、干粉制剂、泡腾片剂或胶囊,直接或间接使用于PV传播/感染途径的各个环节或PV易感部位或感染部位,预防PV的感染或传播。

7. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述的抗PV IgY抗体以0.1~90%的浓度与10~99.9%的辅料混合,按照常规的方法配制成乳膏剂、喷雾剂、凝胶制剂、或干粉制剂,直接涂抹于各种外用性传播疾病预防器具上,在性活动过程中直接阻断PV经性行为传播,用于预防PV的传染。

8. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述的抗PV IgY抗体作为亲和配基用于相应PV抗原的亲和纯化。

抗 PV IgY 抗体制备及其用于 PV 诊断试剂和预防药物用途

技术领域

本发明属于生物技术领域中的一种特异性卵黄抗体 (yolk immunoglobulin, IgY) 的制备和应用, 特别涉及抗 PV IgY 抗体的制备方法及其该抗 PV IgY 抗体用于制备 PV 感染及其相关疾病免疫诊断试剂和预防药物中的用途。

背景技术

乳头瘤病毒 (papillomaviruses, PV) 是一类自然界广泛存在的嗜上皮性病毒群 (epitheliotropic viruses), 属乳多空病毒科 (Papovaviridae) 乳头瘤病毒属的无包膜小 DNA 病毒, 包括多种动物乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒 (humanpapillomavirus, HPV), PV 可感染 20 多种禽类动物、爬行类动物及包括人类在内的哺乳类动物, 引起皮肤、粘膜良恶性增生性病变, 严重影响包括牛、兔、人在内不同物种, 对农牧业及人民生命健康造成严重威胁。

由于医学研究的重要性, HPV 倍受重视。HPV 仅感染人的皮肤和粘膜上皮, 引起上皮增生性改变, 与人皮肤粘膜的病变相关。目前已发现的 HPV 有 200 多型, 还有许多新的型别正在被检测和分离中, 其中 100 多型的基因组已经被分离并完成全基因组测序 (Hans-Ulrich Bernard. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clinical Virology 2005; 32S:S1 - S6)。

根据所感染上皮的不同可将 HPV 分为皮肤型和粘膜型。皮肤型如 HPV1, 感染足底引起跖疣, HPV2、4、7 感染手部皮肤上皮, 引起上皮高度增生性软疣; 粘膜型 HPV 感染肛生殖器粘膜上皮。根据 HPV 的致癌性可将其分为低

危型和高危型。低危型以 HPV6 和 11 型最为常见，可引起生殖器乳头状瘤或尖锐湿疣；高危型 HPV（HPV16、HPV18、HPV31、HPV45、HPV39、HPV58 和 HPV59 等）与尿生殖道、子宫颈癌在内的人体多种上皮性肿瘤的发病有关，可引起子宫颈上皮内瘤的发生和恶变以及其它上皮性肿瘤的发生，已确认 HPV16、18 是宫颈癌的致癌因子。在我国子宫颈癌的发病率很高，每年死于子宫颈癌的妇女总数约占全世界子宫颈癌死亡者的几近半数。近十几年来，包括 HPV 在内的性传播疾病迅速蔓延，75%性活跃期人群在其一生中均会感染 HPV（Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102:3 - 8.）。而与高危型 HPV 感染所致的宫颈癌等恶性肿瘤的发生将在 10~30 年之后急剧增加。因此，预防 HPV 感染迫在眉睫，对于保证我国国民经济持续高速发展有重大意义。

但是，PV 病毒基因的表达受宿主细胞向上皮表层迁徙过程的调控，并依赖细胞的分化完成自身的生活周期（virus life cycle）（Stubenrauch, F. and Laimins, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* 9 (6), 379 - 386; John Doorbar. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S7 - S15)。因此，具有高度嗜宿主和组织细胞特异性，不同 PV 具有其特异的宿主动物群，HPV 只能感染和侵袭人的皮肤粘膜，在人体上皮组织中复制、增殖而又不能在体外繁殖，为 HPV 的免疫生物学研究，预防和治疗 HPV 相关的人类肿瘤疫苗的研究带来了巨大的障碍。尽管，近年来，利用 HPV 病毒样颗粒的预防性疫苗迅猛发展，并已经正式投入临床使用，但是，这一类疫苗价格昂贵，并不能在发展中国家大面积推广和使用，因此，探索新的途径进行 HPV 感染的诊断和预防意义重大。

HPV 通过皮肤或黏膜的微小损伤进入皮肤黏膜基底层干细胞并黏附其表面成为病毒感染的初始事件，HPV L1 蛋白与特异性受体（如整合素、硫

酸肝素等)的结合触发了病毒生活周期的开始,在某种程度上决定了 HPV 的嗜组织特异性。可见,在 HPV 通过皮肤或黏膜的微小损伤进入皮肤黏膜基底层干细胞之前,特异性阻断 HPV 病毒黏附宿主细胞将会从根本上阻断 HPV 感染的发生。

综上所述,研制能特异性阻断 HPV 黏附宿主细胞的制剂,对于大幅度降低 HPV 感染率,进而降低包括宫颈癌在内的各种人体 HPV 相关恶性肿瘤的发生率均具有十分重要的意义,同时这一策略显然也是用于除 HPV 外的其它 PV 感染的预防。

已有研究证实,生物大分子的结合主要通过配体-受体和抗原-抗体两种方式进行特异性的结合,其中抗原-抗体之间的结合属于免疫结合,具有极高的特异性和亲和力,因此,通过制备相应抗原的特异性抗体。正是基于这一原理,许多免疫学诊断技术和试剂以及生物靶向治疗方法和药物应运而生,并广泛应用于几乎所有人 and 动物相关疾病的诊断和治疗当中。

鸟类与哺乳动物一样具有将母体免疫力传递给子代的能力。早在二十世纪 60 年代,就发现母鸡受免疫刺激后,产生免疫反应,在卵泡中生成卵黄和输卵管内卵黄成熟的过程中,血液中 IgG 可被选择性地转移到卵黄中,并在此大量富集,而且是卵黄中唯一的免疫球蛋白,由此得名 IgY (Leslie, G.A. and Clem, L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. J. EXP. Med. 1969 ; 130:1337-1352; Zhang WW. The use of gene-specific IgY antibody for drug target discovery[J]. Research Focus. 2003; 8 (8) :364-371)。母鸡易于饲养,费用低;免疫方法简单,鸡产卵量大,收集方便,纯化简单,抗体产量高,符合现代动物保护规则。可从同一个体来源的鸡卵中大量制备出均一性很好的多克隆抗体。免疫一只鸡可获得高产的特异性 IgY 长达 9 周~28 周,卵黄中 IgY 的含量高达 10 g/L~20g/L,从鸡蛋中即可十分方便

地分离、纯化相应抗体，每个卵黄可提取到 10mg 的 IgY 纯品抗体，每只母鸡一年可以获得 30g 以上的均一性 IgY，远远超过一只兔血清制备的抗体量，且抗体活性高。因此，认为母鸡是一种高产、优质、经济的免疫球蛋白“加工厂”。同时，母鸡易于饲养、费用低，免疫简单、产量大、收集方便、无须抽血、纯化简单、抗体产量高，符合动物保护规则。特别是在近十多年来，随着提取方法的建立，有关这方面的研究便如雨后春笋般大量涌现，从卵黄中分离纯化抗体是一种高效、经济、优质的多克隆抗体制备方法。

从免疫学上讲，IgY 与血清 IgG 同源，是一种 7S 免疫球蛋白，与哺乳动物 IgG 略有不同，该蛋白质分子量约为 180kDa，含两个亚单位，即 67~70kDa 的重链和 22~30 kDa 的轻链，具有耐酸、耐热、性能稳定、便于分离、纯化的特点 (Janson AK, Smith CI, Hammarstrom L. Biological properties of yolk immunoglobulins. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 371A:685-90.)。

近来发现，IgY 具有不同于哺乳类动物 IgG 的生物学特性 (Krief A, Letessonb JJ, Billena D, et al. Comparison between ‘IgY technology’ from chickens and ‘IgG technology’ from mice for production of tailor-made antibodies. *Tetrahedron Letters.* 2002; 43: 1843 - 1846):

如 IgY 对哺乳类动物的补体成分无固定作用，也不与 Fc 受体结合，不与血清成份发生反应，有效避免哺乳类动物源性抗体所引起的假阳性 / 假阴性结果，而且，鸡抗体耐酸、耐热、性能稳定，鸡作为免疫宿主制备抗体已引起广泛关注，并已在 ELISA 检测试剂盒中广为应用，目前，IgY 已经被广泛应用于包括免疫沉淀、免疫电泳、ELISA、免疫电镜、免疫印迹等一系列免疫诊断技术，并大有替代哺乳动物源性的 IgG 之势，IgY 用于疾病的免疫学诊断已经成为免疫诊断方法学的发展趋势。(Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies[J]. *Immunology*

Today. 1995; 16 (8) : 392-39)。

此外, IgY 稳定性好, 作为亲和层析柱的配基可反复使用, 并显著提高亲和层析的分离效率。成为具有良好的研究及应用前景的亲和层析配基, 而用于靶物质的迅速、高效分离, 尤其对于一些采用其他方法很难分离纯化的目的产品具有很高的应用潜力 (Shelver WL, Larsen GL, Huwe JK. Use of an immunoaffinity column for tetrachlorodibenzo-p-dioxin serum sample cleanup. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998 Feb 13; 705 (2) :261-8; Kim HO, Durance TD, Li-Chan EC. Reusability of avidin-biotinylated immunoglobulin Y columns in immunoaffinity chromatography. *Anal Biochem.* 1999 Mar 15; 268 (2) :383-97)。以特异性 IgY 为配基偶联到溴化氰活化的 Sepharose 4B 介质上, 亲和分离胎牛血清中的 BSA, 所得产品纯度明显高于 ROCHE 公司的 BSA 产品, 且洗脱条件简单, 仅用 0.1mol/L Gly-HCl (pH2.8) 作为洗脱剂, 一步即达得到预期的分离效果。整个操作过程快速简单, 仅需数小时即可完成上样、洗脱分离以及柱的再生。同时, 由于卵黄免疫球蛋白性质较为稳定, 处理好亲和填料可在 4℃ 条件下保存半年以上, 且分离能力几乎不变。经数次使用后, 层析柱仍能保持较好的分离能力。

再者, 在药物应用方面, 口服 IgY 可获得被动免疫保护, 目前已经用于预防或治疗年幼动物或人类的肠道传染病, 如婴幼儿肠道疾病防治食品, 龋齿预防, 新生乳猪致死性大肠杆菌感染的预防, 以及鱼病治疗等, 特别是抗生素或其他药品的使用存在问题时, IgY 成为首选 (Lee SB, Mine Y, Stevenson RM. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *J Agric Food Chem.* 2000 Jan; 48 (1) :110-5; Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-Gonzalez D, et al. Oral administration of specific yolk

antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: A phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol.* 2003 Jun; 35 (6) :433-40; de Almeida CM, Quintana-Flores VM, Medina-Acosta E, et al. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. *Scand J Immunol.* 2003 Jun; 57 (6) :573-82; Shin JH, Yang M, Nam SW, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Sep; 9 (5) :1061-6.)。

总之，20 世纪 80 年代后，利用卵黄中的特异性抗体 (IgY) 进行被动免疫来预防和治疗人的一些疾病受到了世界各国的重视，现已广泛用于免疫学诊断、医药、保健品、养殖等领域。我国自 20 世纪 90 年代后开始了这一方面的研究，并取得了一定的成果。

因此，应用制备抗 PV 的 IgY 抗体，将会在 PV 的诊断、抗原的纯化及 PV 感染的预防中发挥重要作用。

中国专利 (申请号为 03139687.9) 公开了一种《抗性病特异性复合卵黄抗体及其在性病治疗上的应用》，其权利要求中 1 “(A) 优选引致病性的主要病原菌，制备两种或两种以上的单一致病性的病原体；权利要求 2 显示所述病原体为苍白密螺旋体、淋病双球菌、人乳头瘤病毒及单纯疱疹病毒。”在其说明书中“其中，步骤 A 根据流行病学调查情况，筛选导致性病的病原体，分别制备单一致病性的病原体作为抗原，进行大量繁殖，收集培养物，提纯，稀释分装；将各种单一的致性病病原体加入福氏佐剂，粉碎并制成乳状浆液，制得单一的性病致病原体抗原”。由于从 PV 感染的特异性宿主动物体内可获得较大量的乳头瘤瘤体用于分离乳头瘤病毒，例如牛乳头瘤中可分离出牛乳头瘤病毒 (BPV) 抗原，用于动物的免疫，但是，人乳头瘤病毒

(humanpapillomavirus, HPV) 包括 200 多个型, HPV 基因的表达受宿主细胞向上皮表层迁徙过程的调控, 并依赖细胞的分化完成自身的生活周期 (virus life cycle), HPV 具有严格的种属特异性和嗜上皮组织特性, 并不能感染除人以外的其它物种。(Stubenrauch, F, and Laimins, L. A. Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* 1999; 9 (6), 379 - 386; John Doorbar. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 32S (2005) S7 - S15)。到目前为止, 从自然损伤部位 (Crawford and Crawford, 1963)、感染的免疫缺陷小鼠的异种移植物 (Bonnez et al., 1993; Brown et al., 1998; Kreider et al., 1987)、筏样培养系统 (Meyers et al, 1992, 1997; Ozbun, 2002) 均不能获得足够的 HPV 病毒数量进行 HPV 感染的研究 (Clinical and Applied Immunology Reviews 5 (2005) 65 - 76. The road to new antiviral therapies. Keith R. Jerome), 因此, 该专利公开的权利要求和技术方案并不能获得足够的乳头瘤病毒的病原体作为抗原免疫母鸡制备抗性病特异性复合卵黄抗体, 实现其目的。因而, 该专利不具有可实施性。

中国专利 (申请号: 03153633.6) 公开了一种抗性病特异性 IgY 的制备方法及其组合制剂, 其权利要求中“1 优选引致病性的主要病原菌, 分别制备引致性病的各种病原体的单一或复合抗原; 制备免疫蛋……”; 权力要求 2 中“筛选引致性病的病原体, 按照这些病原体的培养特性和最适培养条件, 分别选择适宜的培养基, 进行培养繁殖, 收集培养物、提纯、稀释分装, 分别将各种病原体一定数量加入福氏佐剂, 置高速匀浆机中以 10000r/min~30000r/min 匀化, 使成油包水乳状液, 即制得各种性病病原体抗原”。权利要求书 3 中“引致性病的病原体包括苍白米螺旋体 (TP)、淋病双球菌 (GC)、人类乳头瘤病毒 (HPV) 和 II 型单纯疱疹病毒 (HSV-2)”, 权利要求 6 中“抗原制备: 选取 TP、GC、HPV、HSV-2 标准株, 分别按照他们的培养特性和最

适培养条件，选择适宜的培养基，以常规方法进行大量培养与繁殖，收集培养物，然后提纯、稀释分装；”由于上述同样理由，HPV并不能在体外培养获得。因此，这一专利同样不具有可实施性。

中国专利（申请号：03104002.0）公开了一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备及应用，但在其权利要求书中并不包括引起尖锐湿疣和乳头状瘤及宫颈癌的人乳头瘤病毒。此外，该专利说明书中实施例6中描述“通过对36例乙肝患者（其中慢性乙肝26例，活动性乙肝12例，乙肝病毒携带者8例）分别给予单独药物（干扰素300万单位）、乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体IgY-氧化苦参碱导向治疗、乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体IgY-氧化苦参碱和乙肝重组表面抗体特异性蛋黄抗独特型抗体ab2 β 联合治疗并进行疗效观察和比较。实验结果表明：乙肝病毒表面抗原HBsAg转阴率联合治疗组（71.2%）明显高于导向治疗组（67.5%）和单独药物组（12.4%）；乙肝病毒HBeAg转阴率联合治疗组（89.4%）明显优于单独药物组（42.5%）；乙肝病毒HBV DNA转阴率后两组（59.2%）明显优于单独药物组（6.5%）；后两组患者血清ALT、DBIL及TNF- α 水平明显低于单独药物组。表面乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体IgY-氧化苦参碱导向治疗具有特异性强、毒副作用小等优点；乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体IgY-氧化苦参碱和乙肝重组表面抗体特异性蛋黄抗独特型抗体ab2 β 联合治疗具有激活体细胞体液免疫的作用，从而达到对抗乙肝病毒保护肝脏组织细胞的目的。”该专利虽然未明确指出乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体IgY-氧化苦参碱和乙肝重组表面抗体特异性蛋黄抗独特型抗体ab2 β 是通过口服或者是注射途径给药，通过其作为生物靶向治疗的目的而言，显然是通过注射途径给药的（且应该是静脉注射）。但是，到目前为止，我国和世界上其它国家均未批准将IgY及其相关制剂作为注射制剂直接用于人体实验。因此，这一专利的可实施性也同样值得怀疑。

发明内容

本发明的一个目的在于，提供一种抗 PV IgY 抗体的制备方法。

本发明的第二个目的是提供方法制备的抗 PV IgY 抗体用于制备 PV 感染及其相关疾病免疫诊断试剂和预防药物用途。

本发明的第三个目的是提供上述抗 PV 抗原的 IgY 抗体在 PV 抗原纯化中的用途。

本发明的第四个目的是提供上述抗 PV 抗原的 IgY 抗体在预防和治疗 PV 感染中的用途。

为了实现上述任务，本发明采取如下的技术方案：

一种抗 PV IgY 抗体的制备方法，其特征在于，具体包括下列步骤：

(a) 选择 PV 即乳头瘤病毒感染所引起的乳头状瘤瘤体组织，通过物理、化学、生物方法进行破碎，分离 PV 病毒蛋白，并将上述一种或一种以上的相应 PV 病毒蛋白以任意比例混合，组成抗原混悬液；

(b) 上述 PV 病毒蛋白采用分子生物学方法通过常规的真核表达系统、原核表达系统、酵母表达系统、病毒表达系统即可获得 PV L1、L2、E6、E7、E4、E5、E1 或 E2 蛋白，并将上述一种或一种以上的相应 PV 病毒蛋白以任意比例混合，组成抗原混悬液；

(c) 上述 PV 病毒蛋白采用分子生物学方法制备可表达一种或一种以上 PV L1、L2、E6、E7、E4、E5、E1、E2 蛋白的真核表达载体，并将上述一种或一种以上的真核表达载体以任意比例混合，组成抗原混悬液；作为基因免疫疫苗，通过基因免疫的方式产生相应 PV 抗原；

(B)、免疫方法：

(a) 初次免疫用弗氏完全佐剂乳化的 A (a) 或 A (b) 步骤制备的抗原混悬液在每只雌性禽类动物，尤其是母鸡胸部上的 4 个点分布式肌内注射，2 周后，用弗氏不完全佐剂乳化的 A (a) 或 A (b) 步骤制备的抗原混

悬液进行第二次免疫，以后每隔 30 天左右加强免疫一次，免疫量同前；在初次免疫一周后，收集雌性禽类动物蛋（鸡蛋），4℃下保存备用；

(b) 采用肌肉注射、基因枪的方法直接将 A (c) 步骤制备的可表达一种或一种以上 PV L1、L2、E6、E7、E4、E5、L1、L2 蛋白及其基因的真核表达载体注入雌性禽类动物体（母鸡）内，免疫雌性禽类动物（母鸡），2 周后，进行第二次免疫；以后每隔 30 天左右加强免疫一次，免疫量同前，在初次免疫一周后，收集雌性禽类动物蛋（鸡蛋），4℃下保存备用；

(C)、IgY 的纯化：

IgY 的分离和纯化采用水稀释法或聚乙二醇法或葡聚糖硫酸盐法或黄原胶法或超滤法进行；

(I) 水稀释法分离纯化 IgY 的方法是：

收集的雌性禽类动物蛋（鸡蛋）取其蛋黄，加水稀释，水：蛋黄=9:1，4℃孵育 6h，4℃下离心 25min，取上清液，加入 19%硫酸钠沉淀，经乙醇沉淀，凝胶过滤 / 离子交换即可获得抗 PVIgY 抗体；

(II) 聚乙二醇法分离纯化 IgY：

收集的雌性禽类动物蛋（鸡蛋）取其蛋黄，加水稀释，水：蛋黄=4:1，加入 3.5%的 PEG，室温孵育 20min，4℃下离心 25min，取上清液，加入 12%PEG 沉淀，PBS 溶解后加 12%的 PEG 再次沉淀，加预冷 50%乙醇沉淀，-5℃下离心 25min，取沉淀物，以 PBS 溶解后滤膜分析，即可获得抗 PVIgY 抗体；

(III) 葡聚糖硫酸盐法分离纯化 IgY：

收集的雌性禽类动物蛋（鸡蛋）取其蛋黄，加水稀释，水：蛋黄=9:1，4℃孵育 6h，4℃下离心 25min，取上清液，加入 6ml 葡聚糖硫酸盐，15ml 1M 氯化钙孵育 30min 取上清，将加入 100ml PBS 离心后取上清，将上清液混合加入 PBS 至 200M，加入 19%硫酸钠沉淀，离心后加入 PBS 再次溶解，加

入 14%硫酸钠再次取沉淀物，PBS 溶解后滤膜分析，即可获得抗 PV IgY 抗体；

(IV) 黄原胶法分离纯化 IgY:

收集的雌性禽类动物蛋（鸡蛋）取其蛋黄，加水稀释，水：蛋黄=1:1，与黄原胶溶液混合孵育；所述的黄原胶溶液的配比为：双蒸水/黄原胶=80ml/120mg，20℃下离心 15min，取上清液加入 19%硫酸钠沉淀，PBS 溶解后加入 14%硫酸钠并离心取沉淀物，以 PBS 溶解后滤膜分析，即可获得抗 PV IgY 抗体。

上述方法制备的抗 PV IgY 抗体用于制备 PV 感染及其相关疾病免疫诊断试剂和预防药物用途。

PV 感染及其相关疾病免疫诊断试剂用于 ELISA、免疫细胞学和免疫组织细胞学、抗体芯片方法的免疫诊断检测。

抗 PV IgY 抗体以 0.1~90%的浓度与 10~99.9%的辅料按照常规制剂方法，配制成不同药物制剂，药物制剂包括乳膏剂、喷雾剂、盥洗液、凝胶制剂、干粉制剂、泡腾片剂或胶囊，直接或间接使用于 PV 传播/感染途径的各个环节或 PV 易感部位或感染部位，预防 PV 的感染或传播。

所述的抗 PV IgY 抗体以 0.1~90%的浓度与 10~99.9%的辅料混合，按照常规的方法配制成乳膏剂、喷雾剂、凝胶制剂、或干粉制剂，直接涂抹于各种外用性传播疾病预防器具上，在性活动过程中直接阻断 PV 经性行为传播，用于预防 HPV 的传染。

所述的抗 PV IgY 抗体作为亲和配基用于相应 PV 抗原的亲和纯化。

本发明通过从动物（牛等）PV 感染灶分离 PV 抗原或通过基因工程技术通过原核表达系统或真核表达系统（包括杆状病毒表达系统）或酵母表达系统获得上述 PV 蛋白，并将上述一种或一种以上的相应抗原以任意比例混合所组成的混合物；还可构建表达上述一种或一种以上 PV 抗原的真核表达载

体，通过基因免疫的方式产生相应 PV 抗原。免疫禽类动物，尤其是母鸡，获得特异性抗 PV IgY 抗体，将会在 PV 的诊断、抗原的纯化及 PV 感染的预防中发挥重要作用。

本发明提供的 IgY 抗体较其它抗病毒药物和制剂而言，具有安全、无毒，使用方便效果可靠，成本低廉的特点，特别适合发展中国家在较大的范围内使用。

附图说明

图 1 是抗 HPV16 L1 IgY 抗体抑制 HPV16L1VLP 引起的小鼠红细胞：其中，(A) 为 HPV16L1 VLP 引起小鼠红细胞凝集；(B) 为抗 HPV16 L1 IgY 抗体抑制 HPV16L1 VLP 引起小鼠红细胞凝集；(C) 为阴性对照。

图 2 是抗 HPV16 L1 IgY 抗体检测 CHO 细胞中表达的 HPV16L1 蛋白：其中 (A) 为 HPV16 L1 蛋白在 CHO 细胞中的表达；(B) 为阴性对照。

以下结合附图和发明人给出的实施例对本发明作进一步的详细说明。

具体实施方式：

本申请的实施例给出了雌性禽类动物为母鸡的例子，但所有雌性禽类动物均能够按本发明的方法制备抗原，如鸭、鹅等等，限于篇幅，本申请不一一给出。

本发明的特异性抗 PV IgY 抗体可通过下述方法制备：

(A)、PV 抗原的制备：

(a) 选择 PV 感染所引起的乳头状瘤组织，通过物理、化学、生物方法进行破碎，分离 PV 病毒抗原；

(b) 采用分子生物学方法通过真核表达系统、原核表达系统、酵母表达系统、病毒表达系统获得 PV L1 或 (和) L2 或 (和) E6 或 (和) E7 或 (和) E4 或 (和) E5 或 (和) E1 或 (和) E2 抗原；

(c) 上述抗原采用分子生物学方法制备可表达一种或一种以上 PV L1

或 (和) L2 或 (和) E6 或 (和) E7 或 (和) E4 或 (和) E5 或 (和) E1 或 (和) E2 蛋白的真核表达载体。

(B)、免疫方法:

(a) 初次免疫用弗氏完全佐剂乳化的 A (a) 或 A (b) 法制备的抗原悬浮液在每只鸡胸部上的 4 个点分布式肌肉注射。2 周后, 用弗氏不完全佐剂乳化的 A (a) 或 A (b) 法制备的抗原悬浮液进行第二次免疫。以后每隔 30 天左右加强免疫一次, 免疫量同前。在初次免疫一周后, 收集鸡蛋, 4℃ 下保存备用。

(b) 采用肌肉注射、基因枪等方法直接将 A (c) 法制备的可表达一种或一种以上 PV L1 或 (和) L2 或 (和) E6 或 (和) E7 或 (和) E4 或 (和) E5 或 (和) E1 或 (和) E2 蛋白的真核表达载体注入母鸡体内免疫母鸡, 2 周后, 进行第二次免疫。以后每隔 30 天左右加强免疫一次, 免疫量同前。在初次免疫一周后, 收集鸡蛋, 4℃ 下保存备用。

(C)、IgY 的纯化:

IgY 的分离和纯化可采用水稀释法 (WD) 或聚乙二醇法 (PEG) 或葡聚糖硫酸盐法 (DS) 或黄原胶法 (Xan) (白晓丽, 梁候明. 四种鸡卵黄免疫球蛋白纯化方法的研究. 广州食品工业科技. 2003; 19 (4) :72-74.) 或超滤法。

(a) 水稀释法 (WD) 分离纯化 IgY:

收集的鸡蛋取蛋黄, 加水稀释 (水: 蛋黄=9:1), 4℃ 孵育 6h, 离心 (10000g, 25min, 4℃) 取上清液 (WD-SN), 加入 19% 硫酸钠沉淀 (WD-SS), 经乙醇沉淀, 凝胶过滤 / 离子交换获得 IgY。

(b) 聚乙二醇法 (PEG) 分离纯化 IgY:

收集的鸡蛋取蛋黄, 加水稀释 (水: 蛋黄=4:1), 加入 PEG (3.5%), 室温孵育 20min, 离心 (10000g, 25min, 4℃) 取上清液 (PEG-SN), 加入 12% PEG 沉淀, PBS 溶解后加 PEG (12%) 再次沉淀, 加预冷 50% 乙醇沉淀,

离心 (10000g, 25min, -5°C) 取沉淀 (PEG-Alc), PBS 溶解后滤膜分析, 获得 IgY。

(c) 葡聚糖硫酸盐法 (DS) 分离纯化 IgY:

收集的鸡蛋取蛋黄, 加水稀释 (水: 蛋黄=9:1), 4°C 孵育 6h, 离心 (10000g, 25min, 4°C) 取上清液, 加入 6ml 葡聚糖硫酸盐, 15ml 1M 氯化钙孵育 30min 取上清, 将加入 100ml PBS 离心后取上清 (DN-SN), 将上清液混合加入 PBS 至 200ml, 加入 19% 硫酸钠沉淀 (DS-SS), 离心后加入 PBS 再次溶解, 加入 14% 硫酸钠再次取沉淀 (DS-As2), PBS 溶解后滤膜分析, 获得 IgY。

(d) 黄原胶法 (Xan) 分离纯化 IgY:

收集的鸡蛋取蛋黄, 加水稀释 (水: 蛋黄=1:1), 与黄原胶溶液 (双蒸水/黄原胶=80ml/120mg) 混合孵育, 离心 (10000g, 15min, 20°C) 取上清液 (Xan-SN), 加入 19% 硫酸钠沉淀 (Xan-SS), PBS 溶解后加入 14% 硫酸钠并离心取沉淀 (Xan-As2), PBS 溶解后滤膜分析, 获得 IgY。

本发明通过上述抗原制备和免疫程序, 并经分离并纯化之后即可获得特异性抗 PV 抗原的 IgY 抗体。

抗 PV IgY 抗体在相应 PV 抗原纯化和分离中的用途:

本发明通过上述抗原制备和免疫程序之后, 分离并纯化的 IgY 抗体可作为亲和层析柱的配基用于相应 PV 抗原的分离纯化。可显著提高亲和层析的分离效率, 且可以反复使用。

抗 PV IgY 抗体在制备免疫检测试剂中的用途:

本发明通过上述抗原制备和免疫程序之后, 分离并纯化的 IgY 抗体可广泛应用于包括 ELISA, 免疫沉淀、免疫电泳、ELISA、免疫印迹、抗体芯片免疫细胞学和免疫组织细胞学、抗体芯片等一系列免疫诊断技术, 用以检测相应的 PV 抗原。

抗 PV IgY 抗体在制备预防 PV 感染药物中的用途：

本发明通过上述抗原制备和免疫程序之后，分离并纯化的 IgY 抗体可以以 0.1~90% 的浓度加入到含 10~99.9% 的辅料，而配制成乳膏剂、喷雾剂、盥洗液、凝胶制剂、干粉制剂、泡腾片剂（胶囊）等直接或间接使用的预防 HPV 感染的预防药物剂型；还可以将 IgY 抗体或包含 IgY 抗体的上述不同制剂涂抹于避孕套、子宫帽等避孕工具之上，在性生活中的是用，可最大限度达到阻断 PV 在不同个体之间传播的目的。按照 PV 的感染途径，直接或间接将 IgY 或包含 IgY 的上述不同制剂涂抹或喷涂于相关易感部位和 PV 感染部位，通过被动免疫的方式，提高局部特异性抗体的滴度，特异性与 PV 抗原免疫结合，阻断 PV 黏附宿主细胞，减少 PV 在不同个体之间或同一个体不同部位之间的传播，达到预防 PV 感染的目的。

发明人给出的以下实施例仅用于理解、描述本发明，本发明并不限于这些实施例。

在实施例中所涉及的质粒、菌种、噬菌体随机肽库、宿主菌、细胞、实验动物及主要试剂分别表述如下：

pT-L1 质粒（重组 pGEM-T 质粒，含 HPV16L1 基因）（郑滨，王健伟，姜惠英，等，利用昆虫-杆状病毒表达系统表达人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白。《中华实验和临床病毒学杂志》2001；15（4）：314-316.）和 pCDNA-HPV16L1 质粒（包含 HPV16L1 基因。孙向乐，司履生，曹瓚孙等，《人乳头瘤病毒 16 型-L1 真核表达质粒的构建和表达以及实验动物对裸 DNA 的免疫反应。病毒学报》，1999；15（3）：270-274.）。杆状病毒表达系统的穿梭载体 pFastBac-™HTb、DH10Bac 感受态细胞、Sf-9 细胞，购自 Invitrogen 公司。Grace`s 培养基、cellfectin 转染试剂，购自 GIBCO 公司。25 周~30 周龄蛋鸡，体重 1.5 Kg~2.0Kg，由西安市长安县强坡村养鸡场提供；新西兰大白兔、C57BL/6 小鼠、Balb/C 小鼠由西安交通大学医学动物实验中心提供；

Protein G MagneticBeads, 购自 New England BioLabs 公司; HPV-16 L1 单克隆抗体, 购自 Neomarker 公司; HRP-IgG, 购自 DAKO 公司; PCR beads, 购于 phamasia 公司。

本实施例中涉及到的各种试剂的配置和方法参见《分子克隆》、《GIBCO 公司 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册》、《ProBond™ 纯化系统说明书》。

实施例 1: 抗 PV IgY 抗体的制备

1) PV 抗原的制备:

PV 抗原可通过以下三种不同的途径获得:

(a) 选择 PV 感染所引起的乳头状瘤瘤体组织, 通过物理、化学、生物方法进行破碎, 分离 PV 病毒抗原;

(b) 采用分子生物学方法通过真核表达系统、原核表达系统、酵母表达系统、病毒表达系统获得 PV L1 或 (和) L2 或 (和) E6 或 (和) E7 或 (和) E4 或 (和) E5 或 (和) E1 或 (和) E2 抗原;

(c) 采用分子生物学方法制备可表达一种或一种以上 PV L1 或 (和) L2 或 (和) E6 或 (和) E7 或 (和) E4 或 (和) E5 或 (和) E1 或 (和) E2 蛋白的真核表达载体。

本实施例仅采用 (b) 方法通过昆虫杆状病毒表达系统表达 HPV16 L1 蛋白, 以其说明 PV 抗原的获取方式, 需要说明的是, 本发明不限于该实施例。

利用重组 Bac/B-HPV16L1 杆状病毒毒株感染 Sf9 细胞 27℃ 培养 72h, ProBond™ Column 非变性条件纯化 HPV16L1 蛋白 (方法见 ProBond™ 纯化系统说明书); 双缩尿法定量 HPV16L1 蛋白, Western blot 检测纯化蛋白。

2) 免疫程序:

初次免疫原为 HPV16L1 蛋白 (400μg) 加等体积弗氏完全佐剂 (Freunds

complete adjuvant, FCA) 充分混匀成乳剂, 常规碘酒、酒精消毒鸡胸部和翅膀下的 4 个点分布式肌肉注射 1ml 乳化液进行免疫。随后加强免疫的抗原为 HPV16L1 蛋白(200 μ g)加弗氏不完全佐剂(Freunds incomplete adjuvant, FIA) 充分混匀间隔 2 周加强免疫。在初次免疫一周后, 收集鸡蛋, 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

3) IgY 的分离及纯化 (本实施例以聚乙二醇法为例予以说明)

用磷酸缓冲液以 4:1 的比例 (v/v) 稀释卵黄液, 在稀释后的混合液中加入 3.5%(w/v)的聚乙二醇 6000 (PEG-6000), 离心(10 $^{\circ}$ C、5000g、20min); 脱脂棉过滤上清液, 向其中加入 8.5% (w/v) 的 PEG-6000, 静置 10min, 离心 (4 $^{\circ}$ C、10000g、25min); 在沉淀中加入 2.5 倍初始卵黄液体积的磷酸缓冲液, 在溶解液中加入 12% (w/v) 的 PEG-6000, 离心 (4 $^{\circ}$ C、10000g、25min); 沉淀溶解于 0.25 倍初始鸡蛋黄液体积的磷酸缓冲液, 在冰上放置 10min, 再加入等体积 50%(v/v)的乙醇(预冷至-20 $^{\circ}$ C), 离心(0 $^{\circ}$ C、10000g、30min), 用磷酸缓冲液溶解沉淀, 在 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存备用。

实施例 2: 抗 PV IgY 抗体活性检测

1) IgY 抗体效价的测定

用酶联免疫吸附法检测, 方法如下: 用含 10 μ g/ml 的 HPV16L1 蛋白水溶液 150 μ L/孔包被微滴板及封闭洗板后, 加入不同稀释倍数的纯化 IgY, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, TBST 洗板, 3 \times 5min; 加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP) 标记的兔抗鸡 IgG 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h, TBST 洗板, 3 \times 5min; 加底物显色, 1mol H₂SO₄ 终止反应。酶标自动分析仪 450nm 波长测定其光吸收值 (OD 450nm), 以未免疫鸡蛋的蛋黄液为对照。结果显示: 初次免疫后 1 周, 鸡蛋黄中可检测出抗 HPV16L1IgY 抗体, 加强免疫 2 次后, 鸡蛋黄中 IgY 的效价迅速升高, 最高效价达到 1: 10240, 并且在此水平达到一个平台期, 持续 4 周以上。

2) 小鼠红细胞凝集抑制试验

C57BL/6小鼠眼球后取血，肝素钠抗凝，PBS洗涤细胞 3×5 min， $500 \times g$ 离心， 3×5 min，再按1:100体积比悬浮细胞。在96孔圆底平板A行、B行中加入倍比稀释的HPV16L1 VLP蛋白 $50 \mu l$ /孔，C行中加入PBS $50 \mu l$ /孔；在B行中加1:200稀释的抗HPV16L1 IgY抗体 $50 \mu l$ /孔，A、C行中加入PBS $50 \mu l$ /孔， 37°C 共育30min；分别加入 $100 \mu l$ 小鼠红细胞悬液，混匀， 4°C 共育3h，结果：抗HPV16L1 IgY抗体可以抑制HPV16 L1蛋白引起的小鼠红细胞凝集反应（图1）。

实施例 3：抗 PV IgY 抗体作为亲和配基用于相应 PV 抗原的纯化和分离

对溴化氰活化的 Sepharose 4B 进行处理，以 7.2mg 蛋白/ml 胶的浓度将抗 HPV16 L1 蛋白的 IgY 抗体与 Sepharose 4B 进行交联，装柱（XK16）10ml。非变性法裂解表达 HPV16L1 蛋白的 Sf-9 昆虫细胞，离心后取上清，以 25mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.0）为上样缓冲液和平衡缓冲液，0.1mol/L Gly-HCl(pH2.8)为洗脱液，TA explorer 100 蛋白层析仪上亲和分离 HPV16L1 蛋白。一步即达得到预期的分离效果。整个操作过程快速简单，仅需数小时即可完成上样、洗脱分离以及柱的再生。同时，由于卵黄免疫球蛋白性质较为稳定，处理好亲和填料可在 4°C 条件下保存半年以上，且分离能力几乎不变。经数次使用后，柱仍能保持较好的分离能力。

实施例 4：抗 PV IgY 抗体在免疫学试剂中的应用

可作为 PV 相关疾病免疫诊断试剂而用于 ELISA，免疫沉淀、免疫电泳、ELISA、免疫印迹、抗体芯片免疫细胞学和免疫组织细胞学、抗体芯片等。

利用重组 pcDNA-HPV16L1 质粒转染 CHO 细胞（包含 HPV16L1 基因，孙向乐，司履生，曹瓚孙，等. 人乳头瘤病毒 16 型-L1 真核表达质粒的构建和表达以及实验动物对裸 DNA 的免疫反应. 病毒学报. 1999；15（3）：270-274），常规方法制备细胞爬片，经 $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 处理 10min，5% 正常山羊血

清室温封闭 10min, 加抗 HPV16L1 IgY 抗体作为一抗, 4℃过夜, TBST 洗板, 3×5min; 加兔抗鸡 IgG 抗体 37℃孵育 1h, TBST 洗板, 3×5min; 生物素标记的第二抗体, 37℃孵育 1h, 加辣根过氧化物酶复合物 37℃孵育 1h, TBST 洗板, 3×5min; DAB 显色, 苏木素复染, 酒精脱水、二甲苯透明、树胶封片。以 TBS 替代一抗作为阴性对照。显微镜下观察。抗 HPV16L1 IgY 抗体可与表达于 CHO 细胞内的 HPV16L1 蛋白发生特异性结合反应, 棕黄色阳性颗粒位于细胞核内和细胞浆内, 阴性对照片无着色 (图 2)。

此外, 还可选择 HPV16 感染的人宫颈粘膜组织, 常规福尔马林固定、石蜡包埋, 切片, 脱蜡至水, 经 3% H_2O_2 处理 10min, 5% 正常山羊血清室温封闭 10min, 加抗 HPV16L1 IgY 抗体作为一抗, 4℃过夜, TBST 洗板, 3×5min; 加兔抗鸡 IgG 抗体 37℃孵育 1h, TBST 洗板, 3×5min; 生物素标记的第二抗体, 37℃孵育 1h, 加辣根过氧化物酶复合物 37℃孵育 1h, TBST 洗板, 3×5min; DAB 显色, 苏木素复染, 酒精脱水、二甲苯透明、树胶封片。以 TBS 替代一抗作为阴性对照。显微镜下观察。结果发现宫颈粘膜上皮细胞核内出现棕黄色阳性颗粒, 阴性对照片无着色, 说明抗 HPV16 L1 IgY 抗体可与表达于宫颈粘膜上皮细胞核内 HPV16L1 融合蛋白发生特异性结合反应。

实施例 5: 抗 PV IgY 抗体在不同制剂中的应用

抗 PV IgY 抗体可以 0.1~90% 的浓度加入到含 10~99.9% 的辅料, 而配制成直接或间接使用的预防 PV 感染的预防药物剂型, 如乳膏剂、喷雾剂、盥洗液、凝胶制剂、干粉制剂、泡腾片剂 (胶囊) 等。

实施例 6: 抗 PV IgY 抗体在不同外用避孕器具中的应用

按照实施例 5 所描述的方法, 将抗 PV IgY 抗体可以 0.1~90% 的浓度加入到含 10%~99.9% 的辅料, 而配制成如乳膏剂、喷雾剂、凝胶制剂、干粉制剂等, 将其涂抹到外用避孕器具上, 可在性生活进行的过程中直接阻断 PV 的传播。

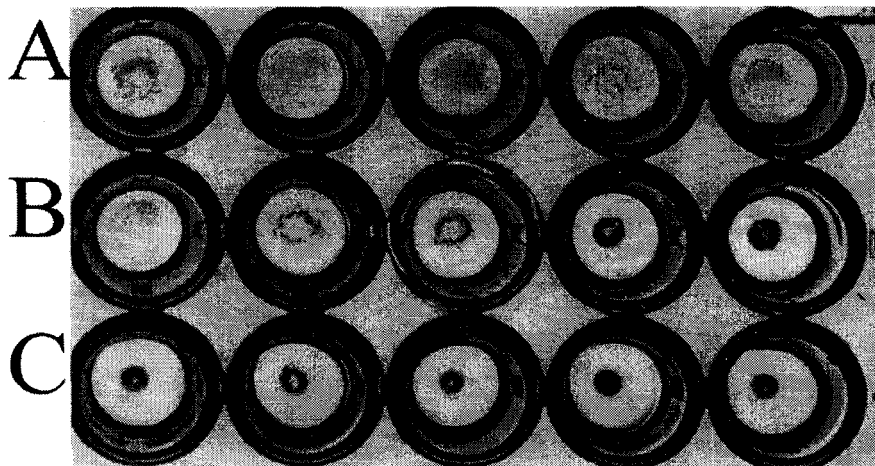


图 1

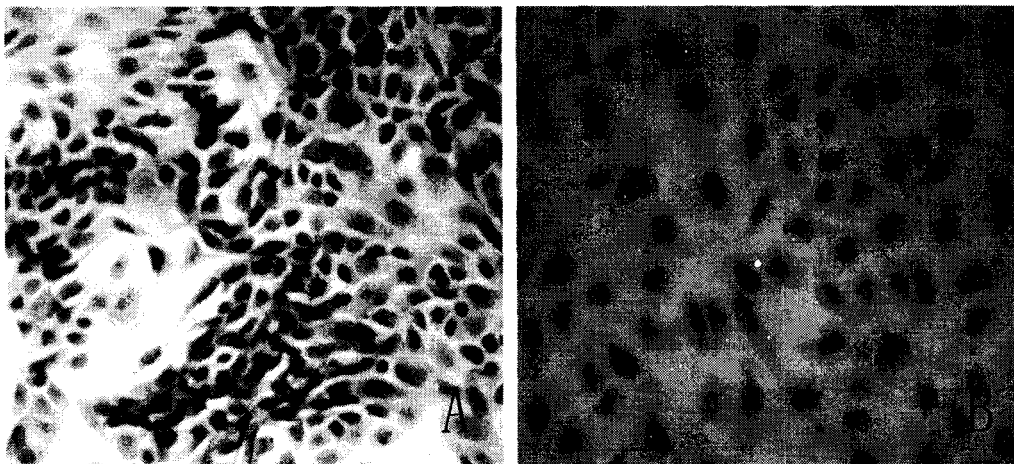


图2

专利名称(译)	抗PV IgY抗体制备及其用于PV诊断试剂和预防药物用途		
公开(公告)号	CN1944462A	公开(公告)日	2007-04-11
申请号	CN200610104676.0	申请日	2006-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
[标]发明人	杨军 张明娟 陈晓黎 苏宝山 王一理 司履生		
发明人	杨军 张明娟 陈晓黎 苏宝山 王一理 司履生		
IPC分类号	C07K16/02 C07K16/08 G01N33/53 A61K39/395 A61P31/18		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗PV IgY抗体的制备及其该抗PV IgY在制备PV相关疾病免疫诊断试剂和预防药物中的用途。抗PV IgY抗体是通过分子生物学方法获得不同类型的PV病毒蛋白或能表达上述蛋白的真核表达载体，将其作为PV病毒蛋白抗原或基因疫苗免疫雌性禽类动物，通过常规方法分离并纯化相应的抗PV IgY抗体，用于制备PV感染及相关疾病诊断试剂和预防药物。实验证明特异性抗PV IgY抗体具有特异性结合相应PV抗原的能力，可用于制备PV感染及相关疾病诊断试剂、分离和纯化相应PV抗原，用于预防PV感染药物的制备，并具有安全、副作用小、疗效显著等特点。

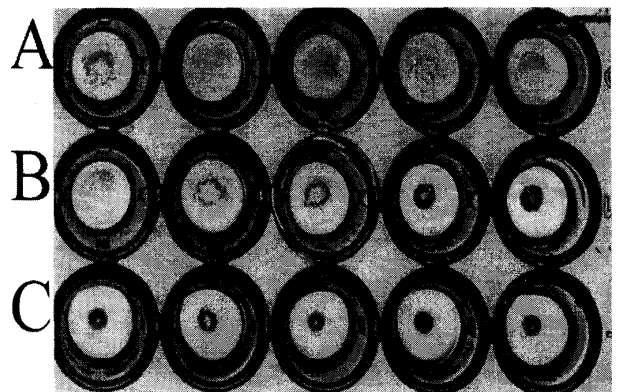


图 1