



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103212069 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201310175664. 7

(22) 申请日 2013. 05. 13

(71) 申请人 上海赛伦生物技术有限公司
地址 201707 上海市青浦区华青路 1288 号

(72) 发明人 柏伟 李晓 范铁炯 杨涛
孙九如 范志和

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002
代理人 王洁 顾小伟

(51) Int. Cl.
A61K 39/39 (2006. 01)

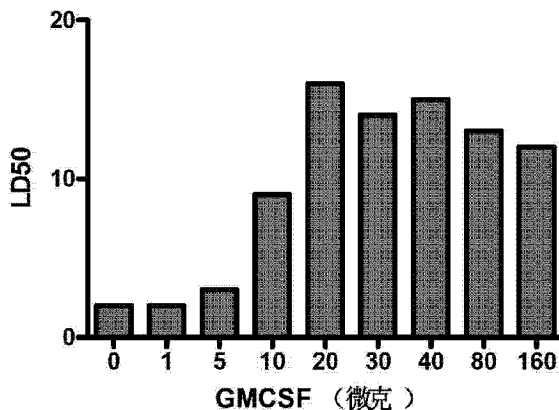
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

可提高抗体滴度的免疫佐剂、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种可提高抗体滴度的免疫佐剂,每份免疫剂量的免疫佐剂含有 0.4 毫升羊毛脂、1.56 毫升精制花生油和 0.04 毫升马 GMCSF 溶液,其中马 GMCSF 的含量为 1 微克至 160 微克。较佳地,马 GMCSF 的含量为 10 微克至 80 微克。还涉及上述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的制备方法和在免疫马匹中的应用。本发明的可提高抗体滴度的免疫佐剂设计巧妙,应用方便,使用后可以较大幅度提高被免疫动物的抗体水平,具有很大的实用价值,适于大规模推广应用。



1. 一种可提高抗体滴度的免疫佐剂,其特征在于,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂含有 0.4 毫升羊毛脂、1.56 毫升精制花生油和 0.04 毫升马 GMCSF 溶液,其中所述马 GMCSF 的含量为 1 微克至 160 微克。

2. 根据权利要求 1 所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂,其特征在于,所述马 GMCSF 的含量为 10 微克至 80 微克。

3. 根据权利要求 2 所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂,其特征在于,所述马 GMCSF 的含量为 20 微克至 40 微克。

4. 一种根据权利要求 1 所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的制备方法,其特征在于,将 0.4 毫升羊毛脂、1.56 毫升精制花生油和 0.04 毫升马 GMCSF 溶液经混匀而成乳状液体,其中所述马 GMCSF 的含量为 1 微克至 160 微克,所述乳状液体即为所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,所述马 GMCSF 的含量为 10 微克至 80 微克。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于,所述马 GMCSF 的含量为 20 微克至 40 微克。

7. 根据权利要求 1 至权利要求 3 任一所述的或根据权利要求 4 至权利要求 6 任一所述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂在免疫马匹中的应用。

8. 一种根据权利要求 1 至权利要求 3 任一所述的或根据权利要求 4 至权利要求 6 任一所述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂的使用方法,其特征在于,将所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂和抗原混匀呈乳胶状后注射于马匹的颈部或臀部皮下,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的体积与所述抗原的体积的比在 10 :1 和 1 :10 之间。

9. 根据权利要求 8 所述的使用方法,其特征在于,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的体积与所述抗原的体积的比在 4 :1 和 1 :4 之间。

10. 根据权利要求 9 所述的使用方法,其特征在于,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的体积与所述抗原的体积的比为 1 :1。

11. 一种免疫马匹的免疫方法,其特征在于,至少在第一次免疫时使用根据权利要求 1 至权利要求 3 任一所述的或根据权利要求 4 至权利要求 6 任一所述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂。

12. 根据权利要求 11 所述的免疫方法,其特征在于,在每次免疫时均使用根据权利要求 1 至权利要求 3 任一所述的或根据权利要求 4 至权利要求 6 任一所述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂。

13. 根据权利要求 12 所述的免疫方法,其特征在于,每次免疫的间隔时间为 10 天。

可提高抗体滴度的免疫佐剂、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫技术领域,特别涉及免疫佐剂技术领域,具体是指一种可提高抗体滴度的免疫佐剂、其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 抗蛇毒血清是治疗毒蛇咬伤时能用的唯一有特效的解毒药物。抗蛇毒血清通常是用大型家畜免疫相关的蛇毒,待蛇毒抗体达到一定滴度时采取血浆提取抗体成份制备而成。当这些抗蛇毒血清注射入蛇伤病人体内时,抗毒素可以很快中和相应的蛇毒。在蛇伤治疗中,马抗蛇毒血清发挥了无可替代的作用。马抗蛇毒血清是治疗蛇伤的最快速、最有效的药物。在我国每年有10万余人被毒蛇咬伤,临床上使用的抗蛇毒血清高达5万人份。但是蛇毒的毒性成份复杂,有血液毒、细胞毒、神经毒等。神经毒素的毒性相当强烈,有些神经毒素低至1微克即可毒死一只小鼠。神经毒素是小分子多肽,分子量在6000-8000道尔顿之间,抗原性非常弱,此类毒素免疫动物很难获得高滴度的抗血清。眼镜蛇毒就是这种类型的毒素,其毒性成分有10多种,主要的一种神经毒素的分子量为6949,毒力强(1MLD=0.0014mg/mouse),用常规的免疫方法很难获得高滴度的抗血清,以致经常无法满足社会的需求。为了获得高效价的抗眼镜蛇抗体,本专利申请人尝试了很多方法,如提高免疫的蛇毒剂量,增加超免次数和延长免疫时间,甚至采用日本田中氏的方法(Tanaka T. Studies on the immunization of horses with snake venom. Zikken Igaku Zasshi 1941;25:159-77)。用未灭活的眼镜蛇毒从低剂量逐步提高到高剂量进行免疫长达半年等多种方法,也未能获得高滴度抗眼镜蛇毒中和抗体的目的。为此我们开展免疫佐剂的研究工作。

[0003] 免疫佐剂也称佐剂或抗原佐剂,是一类单独使用时一般无免疫原性,但是与抗原物质合并使用时能增强抗原物质免疫原性,增强机体免疫应答,或改变机体免疫应答反应类型的物质。免疫佐剂的生物作用包括:抗原物质混合佐剂注入机体后,改变了抗原的物理性状,可使抗原物质缓慢地释放,延长了抗原的作用时间;佐剂吸附了抗原后,增加了抗原的表面积,使抗原易于被巨噬细胞吞噬;佐剂能刺激吞噬细胞对抗原的处理;佐剂可促进淋巴细胞之间的接触,增强辅助T细胞的作用;可刺激致敏淋巴细胞的分裂和浆细胞产生抗体。故免疫佐剂的作用可使无免疫原性物质变成有效的免疫原;可提高机体初次和再次免疫应答的抗体滴度;改变抗体的产生类型以及产生迟发型变态反应,并使其增强。

[0004] 细胞因子(cytokine)是一类机体在免疫反应时产生的免疫调节物质。机体的免疫系统在受到抗原和各种免疫佐剂的刺激后,产生的应答性物质,这类物质统称为细胞因子。天然的细胞因子为哺乳动物产生的蛋白质,多数为分子量较小的单体(1×10^4 - 2.5×10^4),也有天然状态为二体或三体的。免疫反应通常是由多种细胞因子参与调节的。细胞因子对抗原递呈细胞(APC)的作用有增加APC的数量和活化APC的功能两个方面。

[0005] 细胞因子(Cytokine, CK)是由细胞分泌的具有生物活性的小分子蛋白物质的统称,细胞因子介导多种免疫细胞间的相互作用。天然的细胞因子由抗原、丝裂原或其他刺激物活化的细胞分泌;且多以单体形式存在;以非特异性方式发挥作用。参与免疫应答与

免疫调节,如 IFN- γ 刺激 APC 表达 MHC-II ;IL-1 辅助 T 细胞活化 ;IL-2、4、5、6、GM-CSF 等促进 T、B 细胞的增殖与分化。;TNF- α 、IL-1、IFN- γ 等激活巨噬细胞,增强吞噬杀伤活性,TNF- α TNF- β 具有细胞毒性并刺激中性粒细胞,IFN- γ 抑制病毒复制。为了提高马匹免疫后机体免疫水平,以增强马的抵抗力,本发明人试用几种不同马细胞因子的佐剂,配合抗原免疫马匹。发现含有 GMCSF 的佐剂可以明显提高被免疫动物的抗体滴度。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服了上述现有技术中的缺点,提供一种可提高抗体滴度的免疫佐剂、其制备方法及应用,该可提高抗体滴度的免疫佐剂设计巧妙,应用方便,使用后可以较大幅度提高被免疫动物的抗体水平,具有很大的实用价值,适于大规模推广应用。

[0007] 为了实现上述目的,在本发明的第一方面,提供了一种可提高抗体滴度的免疫佐剂,其特点是,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂包括 0.4 毫升羊毛脂、1.56 毫升精制花生油和 0.04 毫升马 GMCSF 溶液,其中所述马 GMCSF 的含量为 1 微克至 160 微克。

[0008] 较佳地,所述马 GMCSF 的含量为 10 微克至 80 微克。

[0009] 更佳地,所述马 GMCSF 的含量为 20 微克至 40 微克。

[0010] 所述马 GMCSF 溶液可以是重组马 GMCSF 溶液,例如可以根据中国发明专利申请 CN201110090267.0 所公开的方法制备,按此发明制备得到的重组马 GMCSF 溶液的浓度在 0.01 毫克/毫升和 50 毫克/毫升之间,较佳地,所述的重组马 GMCSF 溶液的浓度在 0.1 毫克/毫升和 10 毫克/毫升之间。更佳地,重组马 GMCSF 溶液的浓度在 1 毫克/毫升和 3 毫克/毫升之间。

[0011] 在本发明的第二方面,提供了一种上述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的制备方法,其特点是,将 0.4 毫升羊毛脂、1.56 毫升精制花生油和 0.04 毫升马 GMCSF 溶液经混匀而成乳状液体,其中所述马 GMCSF 的含量为 1 微克至 160 微克,所述乳状液体即为所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂。

[0012] 较佳地,所述马 GMCSF 的含量为 10 微克至 80 微克。

[0013] 更佳地,所述马 GMCSF 的含量为 20 微克至 40 微克。

[0014] 在本发明的第三方面,提供了上述的或上述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂在免疫马匹中的应用。

[0015] 在本发明的第四方面,提供了一种上述的或上述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂的使用方法,其特点是,将所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂和抗原混匀呈乳胶状后注射于马匹的颈部或臀部皮下,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的体积与所述抗原的体积的比在 4:1 和 1:4 之间。

[0016] 较佳地,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的体积与所述抗原的体积的比在 2:1 和 1:2 之间。

[0017] 更佳地,所述的可提高抗体滴度的免疫佐剂的体积与所述抗原的体积的比为 1:1。

[0018] 在本发明的第五方面,提供了一种免疫马匹的免疫方法,其特点是,至少在第一次免疫时使用上述的或上述的制备方法制备的可提高抗体滴度的免疫佐剂。

[0019] 较佳地,在每次免疫时均使用上述的或上述的制备方法制备的可提高抗体滴度的

免疫佐剂。

[0020] 更佳地,每次免疫的间隔时间为 10 天。

[0021] 本发明的有益效果具体在于:本发明的可提高抗体滴度的每份免疫佐剂包括 0.4 毫升的羊毛脂、1.56 毫升精制花生油和 0.04 毫升重组马 GMCSF 溶液,其中每份免疫佐剂所述马 GMCSF 的含量为 1 微克至 160 微克,用于免疫马匹时可以成倍提高动物的抗体滴度,从而使抗体的产品质量明显提高,表现在抗毒素产品时其中的抗毒素的比活性高,杂蛋白减少,相应的副作用也可以降低,因此,设计巧妙,应用方便,使用后可以较大幅度提高被免疫动物的抗体水平,具有很大的实用价值,适于大规模推广应用。

附图说明

[0022] 图 1 是大肠杆菌重组表达和纯化后的马 GMCSF 在还原条件下的 SDS-PAGE 电泳结果,从左到右 1-6 泳道为纯化的马 GMCSF,最右泳道是蛋白分子量标准。

[0023] 图 2 是不同量的马 GMCSF 佐剂对动物的免疫效果。不含 GMCSF 的佐剂免疫效果较差,随着佐剂中 GMCSF 含量的增加,动物的中和抗体滴度随之增加,在 GMCSF 含量为 20-40 微克/体积之间,免疫效果最佳,超过 40 微克/体积,抗体滴度有所下降。

具体实施方式

[0024] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容,特以含重组马 GMCSF 的免疫佐剂的制备、眼镜蛇毒素免疫为例,特举以下实施例详细说明。然而,具体实施例仅仅是用于举例说明,而不是对本发明的限制。

[0025] 实施例 1:重组马 GMCSF 制备

[0026] 根据中国发明专利申请 CN201110090267.0 所述,用基因工程的方法,在大肠杆菌中表达,获得的包涵体经变性、复性、层析、透析等方法制备而成,用此方法得到的重组马 GMCSF 的纯度大于 95%,蛋白浓度在 0.01-50 毫克/毫升范围,比活性等于或大于 4×10^6 unit/mg。

[0027] 实施例 2:免疫佐剂和含重组马 GMCSF 的免疫佐剂的配制

[0028] 免疫佐剂:于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 2 毫升羊毛脂、7.8 毫升精制花生油、0.2 毫升 PBS,置冰浴上,用超声波细胞破碎仪处理,使之充分混匀。

[0029] 含重组马 GMCSF 的免疫佐剂:于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 2 毫升羊毛脂、7.8 毫升精制花生油、0.2 毫升重组马 GMCSF 溶液,置冰浴上,用超声波细胞破碎仪处理,使之充分混匀。

[0030] 实施例 3:眼镜蛇毒素灭活

[0031] 眼镜蛇毒冻干粉(购自浙江义乌市蛇类研究所)加入 PBS,使之溶解配成 20 毫克/毫升浓度,滤纸过滤除去不溶性颗粒后用 0.22 微米孔径的除菌过滤膜过滤除菌。除菌后的眼镜蛇毒溶液边搅拌边滴加甲醛溶液,甲醛溶液加至最终甲醛浓度为 0.2%,充分搅拌混匀后室温放置 7 天,使蛇毒完全灭活。使用前,稀释至蛋白浓度为 5 毫克/毫升。

[0032] 实施例 4:抗原佐剂混合液的配制

[0033] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入等体积的含重组马 GMCSF 佐剂和眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分

层。

[0034] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 1 体积的含重组马 GMCSF 佐剂和 4 体积眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层。

[0035] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 4 体积的含重组马 GMCSF 佐剂和 1 体积眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层。

[0036] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 2 体积的含重组马 GMCSF 佐剂和 1 体积眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层。

[0037] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 1 体积的含重组马 GMCSF 佐剂和 2 体积眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层。

[0038] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 8 体积的含重组马 GMCSF 佐剂和 1 体积眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层,但是液体粘稠无法注射。

[0039] 于 50 毫升 Falcon 试管内先后加入 1 体积的含重组马 GMCSF 佐剂和 8 体积眼镜蛇毒素溶液,试管置冰浴,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置出现分层。

[0040] 实施例 5:重组马 GMCSF 促进马抗体效价试验

[0041] 本实验分 3 组,每组各 5 匹马,第一组使用不含重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第二组在第一次免疫时用实施例 2 所配制的含有重组马 GMCSF 的免疫佐剂,其后的免疫中使用不含重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第三组全程使用含重组马 GMCSF 的免疫佐剂。本实施例中所提的免疫佐剂是指实施例 2 中所制备的 1 体积羊毛脂、3.9 体积精制花生油和 0.1 体积 PBS 经充分混匀后液体;本实施例中所提的含重组马 GMCSF 免疫佐剂是指实施例 2 中所制备的 1 体积羊毛脂、3.9 体积精制花生油和 0.1 体积 GMCSF 溶液经充分混匀后液体;每份免疫剂量为 2 毫升,其中所用的重组马 GMCSF 的量为 20 微克。按实施例 4 制备的佐剂和抗原的混合物为 2 毫升佐剂加蛋白浓度为 5 毫克/毫升的甲醛灭活眼镜蛇毒素 2 毫升,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层。免疫方案为每匹马每次注射佐剂与眼镜蛇抗原混悬乳状液 4 毫升,注射部位为马颈部或臀部皮下,分 4 点注射。共免疫 5 次,每次间隔 10 天,第 5 次免疫注射后第 10 天采血进行抗血清中和活性试验(ED_{50})。

[0042] 实施例 6:重组马 GMCSF 免疫剂量与抗体效价的量效实验

[0043] 本实验分 9 组,每组各 5 匹马,第一组使用不含重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第二组全程使用每剂 2 毫升,含 1 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第三组全程使用每剂 2 毫升,含 5 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第四组全程使用每剂 2 毫升,含 10 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第五组全程使用每剂 2 毫升,含 20 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第六组全程使用每剂 2 毫升,含 30 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第七组全程使用每剂 2 毫升,含 40 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第八组全程使用每剂 2 毫升,含 80 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;第九组全程使用每剂 2 毫升,含 160 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂;本实施例中所提的

免疫佐剂是指 1 体积羊毛脂、3.9 体积精制花生油和 0.1 体积 PBS 经充分混匀后液体。如实施例 4 所述,佐剂和抗原的配制为 2 毫升佐剂加蛋白浓度为 5 毫克 / 毫升的甲醛灭活眼镜蛇毒素 2 毫升,用超声波细胞破碎仪处理至抗原与佐剂充分混匀呈乳胶状,放置后不分层。免疫方案为每匹马每次注射佐剂与眼镜蛇抗原混悬乳状液 4 毫升,注射部位为马颈部或臀部皮下,分 4 点注射。共免疫 5 次,每次间隔 10 天,第 5 次免疫注射后第 10 天采血进行抗血清中和活性试验(ED_{50})。

[0044] 实施例 7 :抗血清中和活性试验(ED_{50})

[0045] 抗血清 ED_{50} 范围初步测定试验 :

[0046] 抗血清的效价测定按国际通用的中和试验法进行动物试验,其方法是把抗原和特异性抗体作用一定时间后,再给动物注射,借助动物体的反应情况来判定抗血清的效价。本发明所用的动物试验方法是以动物死亡为反应指征,以小白鼠注射抗蛇毒血清与蛇毒混合液后,动物的生存死亡情况,确定血清的效价。

[0047] 为了确定抗血清的中和剂量范围,5 LD_{50} 的眼镜蛇蛇毒与不同浓度的抗血清混合成 1 毫升体积后在 37° C 水浴箱中放置 1 小时,取 0.4 毫升这种混合液体注射到小鼠的腹腔内,每个浓度注射一只小鼠,观测小鼠在 48 小时内存活状态。通过这种预初试验获得小鼠 100% 存活和 100% 死亡所用的抗血清的浓度范围。

[0048] 中度有效剂量试验(The medium effective dose, ED_{50}) 试验 :

[0049] 根据抗血清 ED_{50} 范围初步测定试验获得的小鼠 100% 存活和 100% 死亡所用的抗血清的浓度,将 ED_{50} 所用的抗血清浓度在这个范围进行分组,每组试验的小鼠为 5 只,体重在 18-20 克之间。免疫血清效价的测定采用固定蛇毒剂量、改变血清剂量的方法,即取 1 毫升浓度眼镜蛇毒溶液(蛇毒以 LD_{50} 为单位)加入 1 毫升含不同血清,混合后置 37° C 1 小时,取 0.4 毫升注射小白鼠腹腔内作中和反应测定之,以含抗血清最低浓度量动物不死亡为中和终点,计算 1 毫升血清中和蛇毒数量。

[0050] 在实施例 5 的实验中,第一组使用不含重组马 GMCSF 的免疫佐剂,经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED_{50} 为 2 LD_{50} 。第二组在第一次免疫时用含有 20 微克重组马 GMCSF 的佐剂,其后的免疫中使用不含重组马 GMCSF 的免疫佐剂,经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED_{50} 为 4 LD_{50} 。第三组全程使用含 20 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂,经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED_{50} 为 16 LD_{50} 。

[0051] 结果可见表 1,其是不同佐剂免疫效果比较,不含马 GMCSF 的免疫氏佐剂免疫动物,抗体的滴度很低;第一次免疫注射时使用含 20 微克 GMCSF 佐剂,随后的免疫使用不含马 GMCSF 的免疫佐剂,动物的免疫反应较前者高;全程使用含 20 微克 GMCSF 的佐剂,免疫效果最佳。

[0052] 表 1. 不同佐剂免疫效果比较

[0053]

组别	第一次免疫	第二次免疫	第三次免疫	第四次免疫	第五次免疫	抗体滴度 (LD ₅₀)
1	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	2
2	含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	不含 GMCSF 的免疫佐剂	4
3	含 GMCSF 的免疫佐剂	含 GMCSF 的免疫佐剂	含 GMCSF 的免疫佐剂	含 GMCSF 的免疫佐剂	含 GMCSF 的免疫佐剂	16

[0054] 本发明实施例 6 的实验中, 第一组使用不含重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 2 LD₅₀。第二组全程使用含 1 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后 2 LD₅₀。第三组全程使用含 5 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后 3 LD₅₀。第四组全程使用含 10 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 9 LD₅₀。第五组全程使用含 20 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 16 LD₅₀。第六组全程使用含 30 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 14 LD₅₀。第七组全程使用含 40 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 15 LD₅₀。第八组全程使用含 80 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 13 LD₅₀。第九组全程使用含 160 微克重组马 GMCSF 的免疫佐剂, 经 5 次免疫后获得的抗血清混合后测得的 ED₅₀ 为 12 LD₅₀。这两个实验表明在佐剂中添加重组马 GMCSF 可以提高动物对抗原的免疫反应, 使得抗体的滴度增高。全程使用 GMCSF 的效果比仅第一次使用 GMCSF 的效果明显。在 GMCSF 和抗血清滴度的量效关系上, 显示在每次佐剂添加 5-160 微克 GMCSF 时都能使动物的抗体滴度提高, 但是 GMCSF 的最佳用量为每剂佐剂添加 20-40 微克。

[0055] 综上, 本发明的可提高抗体滴度的免疫佐剂设计巧妙, 应用方便, 使用后可以较大幅度提高被免疫动物的抗体水平, 具有很大的实用价值, 适于大规模推广应用。

[0056] 在此说明书中, 本发明已参照其特定的实施例作了描述。但是, 很显然仍可以作出各种修改和变换而不背离本发明的精神和范围。因此, 说明书和附图应被认为是说明性的而非限制性的。

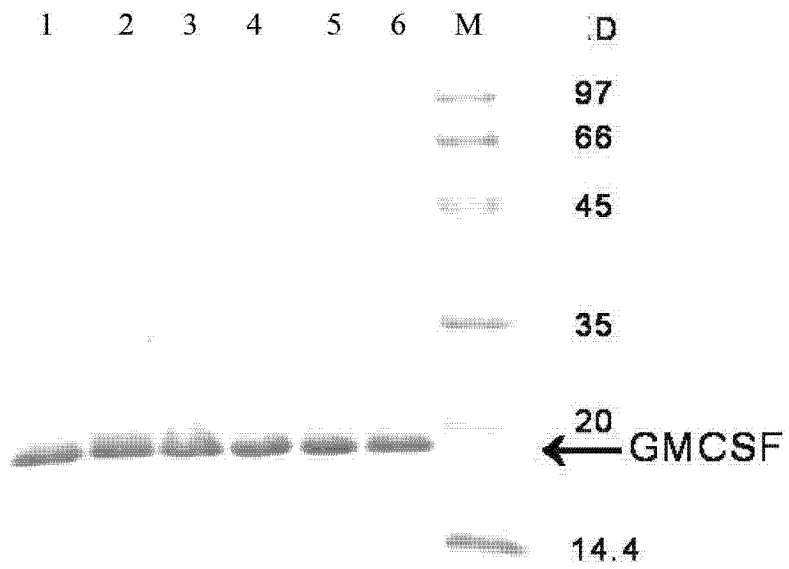


图 1

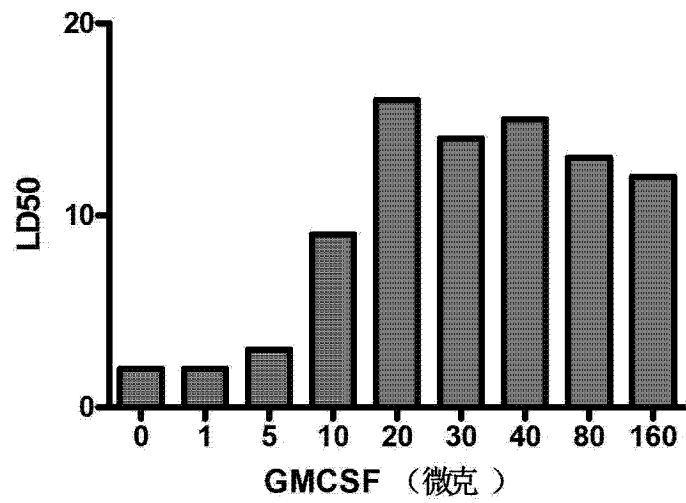


图 2