



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107432929 A

(43)申请公布日 2017. 12. 05

(21)申请号 201610373835.0

A61K 31/429(2006.01)

(22)申请日 2016.05.27

(71)申请人 华南农业大学

地址 510630 广东省广州市天河区五山

(72)发明人 罗满林 陈华良 李冰 张贺

邹舒展 翟少伦

(74)专利代理机构 桂林市华杰专利商标事务所

有限责任公司 45112

代理人 罗玉荣

(51) Int. Cl.

A61K 38/16(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 31/715(2006.01)

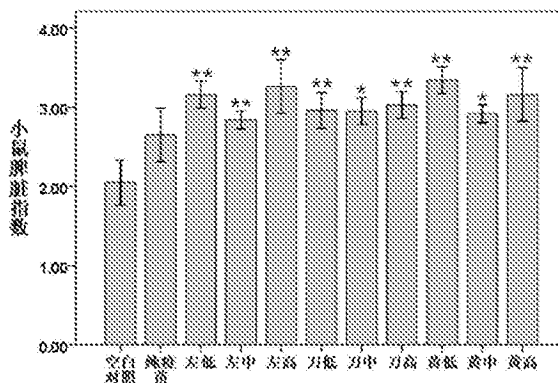
权利要求书3页 说明书17页 附图9页

## (54)发明名称

动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法

## (57)摘要

本发明公开了一种动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法,所述动物复合免疫增强剂由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20-80、刀豆素10-60、盐酸左旋咪唑7.5-30。所述的动物复合免疫增强剂在制备预防动物病毒性疾病药物中的应用,将配方中各组分按盐酸左旋咪唑:刀豆素:黄芪多糖=3:2:1的比例溶于0.9%生理盐水中,充分混匀,制得浓度为600mg/ml的注射剂;所述注射剂的剂量为60mg/kg/日,连续注射三天,腹腔或肌肉注射,以预防动物病毒性疾病。这种动物复合免疫增强剂具有安全性高、高效多能、生产成本低廉的优点。



1. 一种动物复合免疫增强剂,其特征在于,由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20-80、刀豆素10-60、盐酸左旋咪唑7.5-30。

2. 根据权利要求1所述的动物复合免疫增强剂,其特征在于,由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20、刀豆素10、盐酸左旋咪唑30。

3. 权利要求2所述的动物复合免疫增强剂在制备预防动物病毒性疾病药物中的应用,其特征在于,将配方中各组分按盐酸左旋咪唑:刀豆素:黄芪多糖=3:2:1的比例溶于0.9%生理盐水中,充分混匀,制得浓度为600mg/ml的注射剂。

4. 根据权利要求3所述的动物复合免疫增强剂在制备预防动物病毒性疾病药物中的应用,其特征是,所述注射剂的剂量为60mg/kg/日,连续注射三天,腹腔或肌肉注射,以预防动物病毒性疾病。

5. 根据权利要求3所述的动物复合免疫增强剂在制备预防猪伪狂犬病毒、圆环病毒、繁殖与呼吸综合征病毒性疾病药物中的应用。

6. 确定权利要求2所述的动物复合免疫增强剂最佳组分含量的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1)确定三种制剂组分:黄芪多糖、刀豆素和盐酸左旋咪唑;

(2)设计如表一所示的三种组分的三种不同注射剂量:

表一三种组分的三种不同注射剂量

组分	低剂量	中剂量	高剂量
盐酸左旋咪唑	7.5mg/kg	15mg/kg	30mg/kg
刀豆素	10mg/kg	30mg/kg	60mg/kg
黄芪多糖	20mg/kg	50mg/kg	80mg/kg

(3)进行不同剂量单组分的小鼠免疫试验,得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平;

(4)根据步骤(3)的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平,结合PCR技术检测小鼠组织抗原情况,综合这几项指标,得出高剂量的盐酸左旋咪唑和低剂量的黄芪多糖无论在细胞因子分泌水平或是抗体生成水平上都均比同组的其他剂量效果显著,而刀豆素的低剂量和高剂量则比中剂量效果更佳,因此选择①组即左高+黄低+刀低和②组即左高+黄低+刀高组成复方进行下一步的免疫试验,其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑,黄低为低剂量黄芪多糖,刀低为低剂量刀豆素,刀高为高剂量刀豆素;

(5)根据步骤(4)筛选出的①组和②组组合,分别再次进行小鼠免疫试验,分别比较①组、②组与单组分的免疫反应,得到最佳组分含量。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述步骤(3)包括

1)将55只SPF级雌性昆明小鼠进行随机分成如表二所示的11组:

表二小鼠随机分组情况

组别		小鼠数量/只	
空白对照组		5	
实 验 组	纯疫苗组	5	
	盐酸左旋咪唑	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	刀豆素	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	黄芪多糖	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5

2) 免疫程序: 实验组每只小鼠腹腔皮下注射200u1猪伪狂犬病毒灭活疫苗, 药物组分别腹腔注射不同剂量的药物, 连续给药三天, 空白对照组注射等量PBS, 2周后以此方式再次进行免疫; 各组小鼠分别于首次免疫后14d, 21d, 28d眼眶静脉采血, 用ELISA试剂盒检测各细胞因子浓度水平和PRV gE基因特异性抗体水平; 二免两周后攻毒, 每只小鼠腹腔注射200u1 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>), 观察小鼠生活状态以及记录死亡时间, 得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(5)包括:

a) 根据单组分药物的免疫试验结果, 筛选出每组药物的注射剂量, 进行混合组方, 如表三所示:

表三 小鼠分组情况及相应注射剂量

组别	注射疫苗量	注射药物剂量	小鼠数量/只
空白对照组	等量PBS	——	5
纯疫苗组	200μL	——	5
①组(左高+黄低+刀低)	200μL	30mg/kg+20mg/kg+10mg/kg	5
②组(左高+黄低+刀高)	200μL	30mg/kg+20mg/kg+60mg/kg	5

其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑, 黄低为低剂量黄芪多糖, 刀低为低剂量刀豆素, 刀高为高剂量刀豆素;

b) 免疫程序: 按表三所示给各组小鼠注射疫苗和药物, 药物连续注射三天, 2周后以同样的方式再次进行免疫; 各组小鼠分别于首次免疫后14d, 21d, 28d眼眶静脉采血, 用ELISA试剂盒检测各细胞因子浓度水平和PRV gE基因特异性抗体水平; 二免两周后攻毒, 每只小鼠腹腔注射200u1 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>), 观察小鼠生活状态以及记录死亡时间,

得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平；

c) 试验结果, 得到动物复合免疫增强剂最佳组分含量: 经过两组药物的免疫效果比较, 综合脾脏指数、细胞因子水平及抗体水平指标与单组分药物相比, 得到该动物复合免疫增强剂的最佳组分含量。

## 动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及兽用免疫学领域,涉及免疫增强剂的研制与应用领域,具体是动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法。

### 背景技术

[0002] 当前兽医临床上动物传染病愈演愈烈,旧的疫病未除,新的疫病又不断出现。动物疫病预防免疫用的菌苗、疫苗品种越来越多。由于疫苗质量、免疫程序、免疫剂量、免疫方法不当等原因的存在,形成免疫抑制而发病的;饲料(主要是玉米)被霉菌污染产生霉菌毒素造成猪的免疫抑制的;滥用抗生素,超量使用抗菌药物而造成免疫抑制而感染疫病的屡见不鲜。目前我国集约化养殖生产中,发现猪的多种传染病有免疫抑制作用。如猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)、猪圆环病毒病(PCV-2)、猪瘟、猪流感和伪狂犬病等病毒病,其他细菌病如大肠杆菌病、猪副伤寒、猪胸膜肺炎放线杆菌病、猪衣原体病和猪附红细胞体病及猪弓形虫病等。尤其是PRRSV和PCV-2这两种病原在我国猪群中单独或混合感染的比例特别高,导致不少养猪场的猪生长不良,并出现呼吸困难、腹泻、黄疸等多种疾患,死淘率增高,养猪经济效益下滑明显,成为我国当前养猪生产中一个突出问题。

[0003] 动物出现免疫抑制性疾病时,表现为群体中个体生长不均匀,生产性能下降,同时动物抗病力下降,免疫接种无效或效果不佳,导致发病率增高,死淘率增加、药费增大;特别是动物群体易于发生多重感染(多种病原的并发感染和继发感染),导致疫情复杂化,使用药物治疗也难以控制,造成巨大的经济损失。应当强调的是这些免疫抑制性疾病,临床上往往表现为动物群体的生长性能不良,抗病力极为低下,因此直接影响到经济效益。

[0004] 随着现代医学、细胞生物学及分子生物学的发展。人们逐渐认识到许多疾病的发生、发展与机体免疫系统功能缺陷和失调有密切的联系,治疗重点已由直接杀伤外源性病原体转向调整机体自身功能,以提高机体免疫力、抗病力,因此免疫增强剂的应用引起人们的关注。影响正常免疫系统功能的因素有各种先天、后天因素,包括自身免疫功能缺陷或各种急、慢性细菌、病毒感染等。而免疫增强剂具有抗感染及对自身免疫病的辅助治疗作用,在病毒相关性疾病控制方面有很大空间。

[0005] 生物安全是畜禽养殖业的一项最基本的工作。鉴于广泛用于各种灭活疫苗的佐剂及免疫增强剂与抗原联用后,能增强机体免疫应答,可以用于与免疫功能低下有关的疾病及免疫缺陷病的治疗。因此开展免疫增强剂的研发并实现产业化,在养殖业中具有广泛的用途和普遍的意义。通过对畜禽免疫力提升、疫苗免疫效果增强,可以大大降低动物发病率和死淘率,提高动物的生产性能和养殖业经济效益。

[0006] 佐剂(Adjuvants)是一种非特异性免疫增强剂,临床上常在疫苗免疫前单独加入或与疫苗混合注入动物体内,用以增强动物机体对抗原或免疫原的免疫应答反应或改变其免疫应答类型,特别是在再次免疫应答中,其增强作用更加明显。实践证明,疫苗与佐剂的联合应用,不仅可以显著提高疫苗的免疫效果,还可以减轻动物机体的免疫耐受。自1925年

法国免疫学家拉蒙(Gaston Ramon)首次发现在疫苗中加入某些物质可以特异性地增强机体的免疫反应以后,许多国家都不同程度地开展了这方面的研究工作,发现并合成了许多有免疫增强作用的物质,包括生物制剂(如转移因子、胸腺肽、干扰素等),化学药物(左旋咪唑、VE、亚硒酸钠等),中草药(黄芪、党参、当归、淫羊藿、女贞子等)及其提取物和蜂胶等。

[0007] 免疫增强剂主要是通过以下几个方面来达到增强机体免疫力的效果。对免疫器官的作用,免疫增强剂具有促进动物免疫器官生长代谢和修复的作用;对非特异性免疫的增强作用,某些免疫增强剂能够刺激单核巨噬细胞系统、增加吞噬细胞数量、增强吞噬异物能力、提高非特异性免疫功能;对体液免疫的增强作用,某些免疫增强剂能够促进B细胞分化及抗体的产生;对细胞免疫的增强作用,某些免疫增强剂能够提高T淋巴细胞百分率、E-玫瑰花环形成率,外周血淋巴细胞或脾细胞对植物血凝素、刀豆蛋白A或脂多糖等丝裂原刺激的转化能力。

[0008] 免疫增强剂的种类多达上百种,主要包括:矿物质类、中草药类、免疫佐剂类、微生物制剂类、维生素类、氨基酸类、激素或激素样物质类、核酸制剂类、抗寄生虫药物类,以及其他免疫增强剂,如干扰素、蜂花粉、热休克蛋白等。目前我国常用的佐剂有铝盐佐剂、氟氏佐剂(FA)、蜂胶佐剂、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(Interleukins, ILs)、多糖佐剂、油乳佐剂、微生物佐剂、免疫刺激复合物(ISCOMs)、糖苷及复方中药佐剂等。核酸佐剂、CpG佐剂、补体佐剂、纳米佐剂、脂质体(LIP)等被列入新型免疫佐剂。

[0009] 理想的免疫增强剂应能促进抗原引起体液和细胞免疫,增强弱免疫性抗原的抗原性,无毒副作用;能以不同途径免疫,也能用于不同抗原;能在免疫抑制机体中发挥作用;用于食用动物不应有药物残留;能有效提高免疫反应质量;使用稳定、便宜且容易生产。

[0010] 免疫增强剂多是注射或作为伴料用。国外对饲料药物添加剂的研究较为重视,2007年的销售收入达2095万美元,占兽药市场的11.7%。从剂型方面来看,国内外也存在较大的差异,国内以粉散剂和预混剂为主,虽然片剂、胶囊剂、针剂、透皮剂、缓释剂、长效剂我国都有,但占比偏小。这就是为什么同样一种药,进口的比国内的效果要好。由于成本和价格的原因,一些企业也不愿意在剂型选择、辅料筛选和工艺流程优化上花大的工夫,而国外在新材料和新技术的运用上十分注重技术创新,故上市的新制剂都有很好的疗效和经济效益。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法。这种动物复合免疫增强剂具有安全性高、高效多能、生产成本低廉的优点。

[0012] 实现本发明目的的技术方案是:

[0013] 一种动物复合免疫增强剂,由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20-80、刀豆素10-60、盐酸左旋咪唑7.5-30。

[0014] 优选地,动物复合免疫增强剂由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20、刀豆素10、盐酸左旋咪唑30。

[0015] 上述动物复合免疫增强剂在制备预防动物病毒性疾病药物中的应用,将配方中各组分按盐酸左旋咪唑:刀豆素:黄芪多糖=3:2:1的比例溶于0.9%生理盐水中,充分混匀,制得浓度为600mg/ml的注射剂。

[0016] 所述注射剂的剂量为60mg/kg/日,连续注射三天,腹腔或肌肉注射,以预防动物病毒性疾病。

[0017] 所述动物复合免疫增强剂在制备预防猪伪狂犬病毒、圆环病毒、繁殖与呼吸综合征病毒性疾病药物中的应用。

[0018] 确定上述动物复合免疫增强剂最佳组分含量的方法,所述方法包括以下步骤:

[0019] (1)确定三种制剂组分:黄芪多糖、刀豆素和盐酸左旋咪唑;

[0020] (2)设计如表一所示的三种组分的三种不同注射剂量:

[0021] 表一 三种组分的三种不同注射剂量

[0022]

组分	低剂量	中剂量	高剂量
盐酸左旋咪唑	7.5mg/kg	15mg/kg	30mg/kg
刀豆素	10mg/kg	30mg/kg	60mg/kg
黄芪多糖	20mg/kg	50mg/kg	80mg/kg

[0023] (3)进行不同剂量单组分的小鼠免疫试验,得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平;

[0024] (4)根据步骤(3)的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平,结合PCR技术检测小鼠组织抗原情况,综合这几项指标,得出高剂量的盐酸左旋咪唑和低剂量的黄芪多糖无论在细胞因子分泌水平或是抗体生成水平上都均比同组的其他剂量效果显著,而刀豆素的低剂量和高剂量则比中剂量效果更佳,因此选择①组即左高+黄低+刀低和②组即左高+黄低+刀高组成复方进行下一步的免疫试验,其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑,黄低为低剂量黄芪多糖,刀低为低剂量刀豆素,刀高为高剂量刀豆素;

[0025] (5)根据步骤(4)筛选出的①组和②组组合,分别再次进行小鼠免疫试验,分别比较①组、②组与单组分的免疫反应,得到最佳组分含量。

[0026] 所述步骤(3)包括

[0027] 1)将55只SPF级雌性昆明小鼠进行随机分成如表二所示的11组:

[0028] 表二 小鼠随机分组情况

组别		小鼠数量/只	
空白对照组		5	
[0029] 实验组	纯疫苗组	5	
	盐酸左旋咪唑	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	刀豆素	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	黄芪多糖	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5

[0030] 2)免疫程序:实验组每只小鼠腹腔皮下注射200u1猪伪狂犬病毒灭活疫苗,药物组分别腹腔注射不同剂量的药物,连续给药三天,空白对照组注射等量PBS,2周后以此方式再次进行免疫;各组小鼠分别于首次免疫后14d,21d,28d眼眶静脉采血,用ELISA试剂盒检测各细胞因子浓度水平和PRV gE基因特异性抗体水平;二免两周后攻毒,每只小鼠腹腔注射200u1 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>),观察小鼠生活状态以及记录死亡时间,得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平。

[0031] 所述步骤(5)包括:

[0032] a)根据单组分药物的免疫试验结果,筛选出每组药物的注射剂量,进行混合组方,如表三所示:

[0033] 表三 小鼠分组情况及相应注射剂量

[0034]

组别	注射疫苗量	注射药物剂量	小鼠数量/只
空白对照组	等量PBS	——	5
纯疫苗组	200μL	——	5
①组(左高+黄低+刀低)	200μL	30mg/kg+20mg/kg+10mg/kg	5
②组(左高+黄低+刀高)	200μL	30mg/kg+20mg/kg+60mg/kg	5

[0035] 其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑,黄低为低剂量黄芪多糖,刀低为低剂量刀豆素,刀高为高剂量刀豆素;

[0036] b)免疫程序:按表三所示给各组小鼠注射疫苗和药物,药物连续注射三天,2周后以同样的方式再次进行免疫;各组小鼠分别于首次免疫后14d,21d,28d眼眶静脉采血,用ELISA试剂盒检测各细胞因子浓度水平和PRV gE基因特异性抗体水平;二免两周后攻毒,每

只小鼠腹腔注射200u1 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>),观察小鼠生活状态以及记录死亡时间,得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平;

[0037] c)试验结果,得到动物复合免疫增强剂最佳组分含量:经过两组药物的免疫效果比较,综合脾脏指数、细胞因子水平及抗体水平指标与单组分药物相比,得到该动物复合免疫增强剂的最佳组分含量。

[0038] 黄芪多糖具有调节免疫、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、双向调节等作用,已广泛应用于兽医临床,能提高动物的抗病能力,降低发病率。

[0039] 盐酸左旋咪唑具有增强机体免疫功能、提高机体抵抗力等功能。

[0040] 刀豆素具有广谱抗病毒作用,对细菌性疾病也有治疗作用。

[0041] 因此,本发明以这三种药物为组分来研制出一种复合免疫增强剂。实验结果显示,本发明具有如下优点:

[0042] 1.随着科学技术的进步及现代畜牧业的需要,免疫增强剂的预防、保健作用日益受到重视。目前,单独使用某一种免疫增强剂或将某一类的不同种混合一起使用,亦有较多文献报道。然而单独使用抗原或仅应用某一种佐剂,对提高抗原的免疫力强度、维持免疫力时间等有所限制,很少有人将不同种类的免疫增强剂混合使用,其原因在于不同类的免疫增强剂混合使用可能会有相互的拮抗作用或甚至带来更严重的毒性相加作用。将不同类型佐剂配合研制复合免疫佐剂成为发展的新趋势。本发明将不同种类的免疫增强作用的制剂配合,组方,研发出一种高效多能的免疫增强剂;

[0043] 2.通过动物试验,将不同组分药物结合疫苗使用,以免疫动物的免疫器官指数等指标的变化、细胞因子水平变化以及特异性抗体含量水平变化综合考察了三种药物不同剂量的免疫增强效果,结果表明三种药物均具有一定的免疫增强效果,但不同剂量存在差异,为进一步择优组合提供基础;

[0044] 3.动物体内试验结果表明优化组合可显著提高试验动物的体液免疫及细胞免疫能力,效果优于各组单组分;

[0045] 4.由于本发明所采用的材料均是临床常用的药物,再经过动物试验,表明此复合免疫增强剂可以用于腹腔注射并且安全无毒。

[0046] 因此,这种动物复合免疫增强剂具有高效多能、安全性高、生产成本低廉的优点。

## 附图说明

[0047] 图1是单组份药物对小鼠免疫试验中各组小鼠的脾脏指数柱状图。其中“\*”表示差异显著(P<0.05),“\*\*”表示差异极其显著(P<0.01)(下同);

[0048] 图2是空白对照组和纯疫苗组的小鼠脏器组织病原检测琼脂糖凝胶电泳图,其中M:2000bpDNA Marker;1-5:空白对照组小鼠的心肝脾肺肾;6-10:纯疫苗组的心肝脾肺肾;P:阳性对照;N:阴性对照;

[0049] 图3是盐酸左旋咪唑组小鼠脏器组织病原检测琼脂糖凝胶电泳图,其中M:2000bpDNA Marker;1-5:左低组小鼠的心肝脾肺肾;6-10:左中组的心肝脾肺肾;11-15:左高组小鼠的心肝脾肺肾;P:阳性对照;N:阴性对照;

[0050] 图4是刀豆素组小鼠脏器组织病原检测琼脂糖凝胶电泳图,其中M:2000bpDNA Marker;1-5:刀低组小鼠的心肝脾肺肾;6-10:刀中组的心肝脾肺肾;11-15:刀高组小鼠的

心肝脾肺肾;P:阳性对照;N:阴性对照;

[0051] 图5是黄芪多糖组小鼠脏器组织病原检测琼脂糖凝胶电泳图,其中M:2000bpDNA Marker;1-5:黄低组小鼠的心肝脾肺肾;6-10:黄中组的心肝脾肺肾;11-15:黄高组小鼠的心肝脾肺肾;P:阳性对照;N:阴性对照;

[0052] 图6是单组份药物对小鼠免疫试验中各组小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量柱状图;

[0053] 图7是单组份药物对小鼠免疫试验中各组小鼠血清IL-2含量柱状图;

[0054] 图8是单组份药物对小鼠免疫试验中各组小鼠血清IL-4含量柱状图;

[0055] 图9是单组份药物对小鼠免疫试验中各组小鼠血清PRVgE抗体含量柱状图;

[0056] 图10是优化药物组合对小鼠的免疫试验中各组小鼠的脾脏指数柱状图;

[0057] 图11是优化药物组合对小鼠的免疫试验中各组小鼠脏器组织病原检测琼脂糖凝胶电泳图,M:2000bpDNA Marker;1-5:空白对照组小鼠的心肝脾肺肾;6-10:纯疫苗组的心肝脾肺肾;11-15:①组小鼠的心肝脾肺肾;16-20:②组小鼠的心肝脾肺肾;P:阳性对照;N:阴性对照;

[0058] 图12是优化药物组合对小鼠的免疫试验中各组小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量柱状图;

[0059] 图13是优化药物组合对小鼠的免疫试验中各组小鼠血清IL-2含量柱状图;

[0060] 图14是优化药物组合对小鼠的免疫试验中各组小鼠血清IL-4含量柱状图;

[0061] 图15是优化药物组合对小鼠的免疫试验中各组小鼠血清PRVgE抗体含量柱状图。

[0062] 图中,左低为低剂量盐酸左旋咪唑,左中为中剂量盐酸左旋咪唑,左高为高剂量盐酸左旋咪唑,黄低为低剂量黄芪多糖,黄中为中剂量黄芪多糖,黄高为高剂量黄芪多糖,刀低为低剂量刀豆素,刀中为中剂量刀豆素,刀高为高剂量刀豆素。

### 具体实施方式

[0063] 下面结合附图和实施例对本发明内容作进一步的阐述,但不是对本发明的限定。

[0064] 实施例:

[0065] 一种动物复合免疫增强剂,由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20-80、刀豆素10-60、盐酸左旋咪唑7.5-30。

[0066] 优选地,动物复合免疫增强剂由以下重量份配比的原料制成:黄芪多糖20、刀豆素10、盐酸左旋咪唑30。

[0067] 上述动物复合免疫增强剂在制备预防动物病毒性疾病药物中的应用,将配方中各组分按盐酸左旋咪唑:刀豆素:黄芪多糖=3:2:1的比例溶于0.9%生理盐水中,充分混匀,制得浓度为600mg/ml的注射剂。

[0068] 所述注射剂的剂量为60mg/kg/日,连续注射三天,腹腔或肌肉注射,以预防动物病毒性疾病。这种动物复合免疫增强剂可单独使用,也可以配合疫苗使用。

[0069] 所述动物复合免疫增强剂在制备预防猪伪狂犬病毒、圆环病毒、繁殖与呼吸综合征病毒性疾病药物中的应用。

[0070] 确定上述动物复合免疫增强剂最佳组分含量的方法,所述方法包括以下步骤:

[0071] (1)确定三种制剂组分:黄芪多糖、刀豆素和盐酸左旋咪唑;

[0072] (2)设计如表一所示的三种组分的三种不同注射剂量:

[0073] 表一 三种组分的三种不同注射剂量

[0074]

组分	低剂量	中剂量	高剂量
盐酸左旋咪唑	7.5mg/kg	15mg/kg	30mg/kg
刀豆素	10mg/kg	30mg/kg	60mg/kg
黄芪多糖	20mg/kg	50mg/kg	80mg/kg

[0075] (3)进行不同剂量单组分的小鼠免疫试验,得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平;

[0076] (4)根据步骤(3)的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平,结合PCR技术检测小鼠组织抗原情况,综合这几项指标,得出高剂量的盐酸左旋咪唑和低剂量的黄芪多糖无论在细胞因子分泌水平或是抗体生成水平上都均比同组的其他剂量效果显著,而刀豆素的低剂量和高剂量则比中剂量效果更佳,因此选择①组即左高+黄低+刀低和②组即左高+黄低+刀高组成复方进行下一步的免疫试验,其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑,黄低为低剂量黄芪多糖,刀低为低剂量刀豆素,刀高为高剂量刀豆素;

[0077] (5)根据步骤(4)筛选出的①组和②组组合,分别再次进行小鼠免疫试验,分别比较①组、②组与单组分的免疫反应,得到最佳组分含量。

[0078] 所述步骤(3)包括

[0079] 1)将55只SPF级雌性昆明小鼠进行随机分成如表二所示的11组:

[0080] 表二 小鼠随机分组情况

组别		小鼠数量/只	
空白对照组		5	
[0081] 实验组	纯疫苗组	5	
	盐酸左旋咪唑	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	刀豆素	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	黄芪多糖	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5

[0082] 2)免疫程序:实验组每只小鼠腹腔皮下注射200ul猪伪狂犬病毒灭活疫苗,药物组分别腹腔注射不同剂量的药物,连续给药三天,空白对照组注射等量PBS,2周后以此方式再次进行免疫;各组小鼠分别于首次免疫后14d,21d,28d眼眶静脉采血,用ELISA试剂盒检测

各细胞因子浓度水平和PRV gE基因特异性抗体水平；二免两周后攻毒，每只小鼠腹腔注射200uL 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>)，观察小鼠生活状态以及记录死亡时间，得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平。

[0083] 所述步骤(5)包括：

[0084] a)根据单组分药物的免疫试验结果，筛选出每组药物的注射剂量，进行混合组方，如表三所示：

[0085] 表三 小鼠分组情况及相应注射剂量

[0086]

组别	注射疫苗量	注射药物剂量	小鼠数量/只
空白对照组	等量PBS	——	5
纯疫苗组	200μL	——	5
①组(左高+黄低+刀低)	200μL	30mg/kg+20mg/kg+10mg/kg	5
②组(左高+黄低+刀高)	200μL	30mg/kg+20mg/kg+60mg/kg	5

[0087] 其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑，黄低为低剂量黄芪多糖，刀低为低剂量刀豆素，刀高为高剂量刀豆素；

[0088] b)免疫程序：按表三所示给各组小鼠注射疫苗和药物，药物连续注射三天，2周后以同样的方式再次进行免疫；各组小鼠分别于首次免疫后14d, 21d, 28d眼眶静脉采血，用ELISA试剂盒检测各细胞因子浓度水平和PRV gE基因特异性抗体水平；二免两周后攻毒，每只小鼠腹腔注射200uL 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>)，观察小鼠生活状态以及记录死亡时间，得到不同剂量的小鼠血清细胞因子浓度以及特异性抗体水平；

[0089] c)试验结果，得到动物复合免疫增强剂最佳组分含量：经过两组药物的免疫效果比较，综合脾脏指数、细胞因子水平及抗体水平指标，表明①组(左高+黄低+刀低)和②组(左高+黄低+刀高)并没有出现拮抗现象，而是相互促进，这说明了以这三种药物为组分的复方免疫增强剂配合疫苗使用，能够增强机体免疫功能，促进细胞因子的分泌以及特异性抗体的形成，再从脾脏指数、细胞因子水平及抗体水平变化方面来看，①组比②组效果更明显，同时从成本来考虑，显然①组更具有应用前景，与单组分药物相比，①组的脾脏指数为3.52，要高于黄低组的3.34；①组的1FN-γ浓度为1106pg/mL，高于黄低组的929pg/mL；①组的1L-2浓度为1502pg/mL，高于黄低组的1250pg/mL；①组的1L-4浓度为441pg/mL，高于刀低组的381pg/mL；①组的抗PRVgE特异性抗体OD值为1.804，高于黄低组的1.3195，由此说明，相比于单组分，复合免疫增强剂更能显著提高1FN-γ、1L-2、1L-4和PRVgE抗体分泌水平，免疫效果更佳，因此，得到该复合免疫增强剂的配方组成为：30mg/kg左旋咪唑+10mg/kg刀豆素+20mg/kg黄芪多糖。

[0090] 下面通过具体案例来说明确定动物复合免疫增强剂最佳组分含量的方法：

[0091] 1 试验材料

[0092] 1.1 实验动物

[0093] 18-22g四周龄雌性昆明小鼠：购于南方医科大学实验动物中心。

[0094] 1.2 细胞和毒株

[0095] PK15细胞和PRV强毒株为华南农业大学传染病教研室保存。

[0096] 1.3 试剂和试剂盒

[0097] DMEM低糖细胞培养液、0.25%细胞胰酶消化液、胎牛血清；氨苄青霉素；DNA Marker DL2000、DNA Marker DL5000、LA-Taq酶均为TaKaRa公司产品；琼脂糖凝胶B10WEST公司产品；25cm<sup>2</sup>、75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、6孔、12孔细胞培养板；DNA凝胶回收试剂盒购自OMEGA公司；猪伪狂犬病毒ELISA抗体检测试剂盒，购于武汉科前生物股份有限公司；小鼠白介素2(1L-2)ELISA检测试剂盒、小鼠白介素4(1L-4)ELISA检测试剂盒和小鼠干扰素- $\gamma$  ELISA检测试剂盒购于上海岚派生物科技有限公司；HRP标记羊抗鼠二抗购于B10WOLDE公司；AxyPrep体液病毒DNA/RNA小量提取试剂盒。

[0098] 1.4主要仪器设备

超净工作台	苏净集团安泰空气技术有限公司
FA1604S 电子天平	上海天平仪器厂
iCycler PCR 扩增仪	Bio-Rad 公司
高速离心机	美国 Thermo 公司
高速冷冻离心机	德国 eppendorf 公司
DY-A 型电泳仪	上海康达电子仪器厂
Hema 紫外透射分析仪凝胶成像系统	珠海市黑马医学仪器有限公司
[0099] CHA-80 恒温振荡器	金坛市富华仪器有限公司
LRH-250A-1 生化培养箱	广东省医疗器械厂
隔水式电热恒温培养箱	上海跃进医疗器械厂
DK-8D 型电热恒温水槽	上海一恒科技有限公司
光学倒置显微镜	日本 OLYMPUS 公司
CO2 细胞培养箱	美国 Forma 科技公司
Thermo MK3 酶标仪	广东东锐科技有限公司

[0100] 2试验方法

[0101] 2.1毒株的准备

[0102] 2.1.1PRV强毒株的增殖及TCID<sub>50</sub>的测定

[0103] 待PK-15细胞长成单层后，用0.25%胰蛋白酶消化下来，加入含10%犊牛血清的DMEM培养液分装于细胞培养瓶静止培养，24h贴壁形成单层后，倾去培养液。将PRV毒株用细胞维持液适当稀释后，取1mL病毒稀释液加入细胞单层上，于37℃吸附1-1.5h后弃掉病毒液，补加5mL含2%犊牛血清的DMEM，37℃继续培养，当病变达70%-80%以上时，将细胞反复冻融3次回收，保存于负80℃备用。

[0104] 待PK-15细胞长成单层后，用0.25%胰蛋白酶消化均匀吹打下来，加入含10%犊牛血清的DMEM培养液分装于96孔细胞培养板，每孔100 $\mu$ L。置于CO<sub>2</sub>细胞培养箱37℃培养，待其形成单层后，倾去培养液。分别加入100 $\mu$ L10倍倍比稀释(10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>.....10<sup>-9</sup>)的PRV强毒株病毒液，每个稀释度接种8孔，于37℃吸附1-1.5h后弃掉病毒液，加入100 $\mu$ L细胞维持液。37℃继续培养，观察其CPE情况。

[0105] 2.1.2 PRV LD<sub>50</sub>的测定

[0106] 根据TCID<sub>50</sub>的测定结果,将24只18g-22g昆明系雌性小鼠随机分成六组,每组四只。用DMEM低糖培养基把PRV病毒液倍比稀释成10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>,实验组每组小鼠分别腹腔注射0.1mL PRV病毒液,空白对照组注射0.1ml DMEM,置于相同环境下饲养。观察并记录其发病死亡情况。

[0107] 2.1.3检测引物的设计与合成

[0108] 参照GeneBank上登录的PRVgE基因序列,设计合成一对检测引物,用于检测小鼠组织PRV抗原。引物序列如下:

[0109] T1:5'-ATGCGGCCCTTTCTGCTGCG-3'; T2:5'-TGCAGCGTGTAGAGGCCCGT-3'。

[0110] 2.2单组份药物的小鼠免疫试验

[0111] 2.2.1药物的选择及剂量的确定

[0112] 黄芪多糖具有调节免疫、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、双向调节等作用,已广泛应用于兽医临床,能提高动物的抗病能力,降低发病率。

[0113] 盐酸左旋咪唑具有增强机体免疫功能、提高机体抵抗力等功能。

[0114] 刀豆素具有广谱抗病毒作用,对细菌性疾病也有治疗作用。

[0115] 因此,本发明以这三种药物为基本组分来研制出一种复合免疫增强剂。

[0116] 结合其他研究资料,分别设计高、低、中三种不同注射剂量,如表四所示:

[0117] 表四 三种组分的三种不同注射剂量

[0118]

组分	低剂量	中剂量	高剂量
盐酸左旋咪唑	7.5mg/kg	15mg/kg	30mg/kg
刀豆素	10mg/kg	30mg/kg	60mg/kg
黄芪多糖	20mg/kg	50mg/kg	80mg/kg

[0119] 2.2.2小鼠的分组与免疫

[0120] (1)将55只SPF级雌性昆明小鼠进行随机分成11组,分组情况如表五所示:

[0121] 表五 小鼠随机分组情况

组别		小鼠数量/只	
空白对照组		5	
[0122] 实验组	纯疫苗组		5
	盐酸左旋咪唑	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	刀豆素	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5
	黄芪多糖	低剂量组	5
		中剂量组	5
		高剂量组	5

[0123] (1)免疫程序:实验组每只小鼠腹腔皮下注射200 $\mu$ L猪伪狂犬病毒灭活疫苗,除纯疫苗组外分别腹腔注射不同剂量的药物,空白组注射等量PBS,2周后进行二免,各组小鼠分别于首次免疫后14d,21d,28d眼眶静脉采血,用ELISA试剂盒检测各细胞因子(IL-2、IL-4和IFN- $\gamma$ )浓度水平变化和抗PRV gE基因特异性抗体水平;二免两周后攻毒,每只小鼠腹腔注射200 $\mu$ L 100LD<sub>50</sub>PRV强毒株(LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>),观察小鼠生活状态以及记录死亡时间;

[0124] (2)小鼠眼眶静脉取血及血清的分离

[0125] ①左手拇指及食指紧紧握住小鼠颈部,压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血,但用力要恰当,防止动物窒息死亡,右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以45°刺入,刺入深度为2-3mm,若遇阻力稍后调整角度后再刺入,如穿刺恰当,血液能自然流入毛细管内,用干净无菌的1.5mLEP管装,得到足够的血后,即除去颈部压力,拔出毛细管,用干棉球压迫止血;

[0126] ②室温静置1h后,然后采用低温低速离心,1000rpm离心10分钟,小心吸取上层血清,置于新的干净无菌的1.5mL EP管中,并做好标记,置于-20℃冰箱保存待检。

[0127] 2.2.3小鼠各组织病原PCR检测

[0128] ①攻毒2周后,将存活的小鼠全部剖杀,并称重。取其心、肝、脾、肺、肾等组织,称量脾的重量,用以计算脾脏指数:脾脏指数=脾重(mg)/体重(g),各组织充分研磨后冻融三次,取上清液;

[0129] ②用AxyPrep体液病毒DNA/RNA小量提取试剂盒提取个组织病毒DNA;

[0130] ③PCR检测:

	上游引物	1 $\mu$ l
	下游引物	1 $\mu$ l
	模板 DNA	1 $\mu$ l
	LA-Taq 酶	0.25 $\mu$ l
[0131]	2 $\times$ GC	10 $\mu$ l
	Buffer	
	dNTPs	4 $\mu$ l
	DMSO	1 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	1.75 $\mu$ l
	总体积	20 $\mu$ l

[0132] 反应条件:97℃预变性5min;95℃1min、60℃40sec、72℃40sec,共35个循环;72℃延伸10min,4℃保存,反应结束后,产物经1%琼脂糖电泳观察。

[0133] 2.2.4小鼠血清细胞因子水平与抗PRV gE抗体水平检测

[0134] (1)小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量测定

[0135] ①标准品的稀释如表六所示:

[0136] 表六 标准品的稀释

[0137]	800 ng/L	5号标准品	150 $\mu$ l的原倍标准品加入150 $\mu$ l标准品 稀释液
	400 ng/L	4号标准品	150 $\mu$ l的5号标准品加入150 $\mu$ l标准品 稀释液
	200ng/L	3号标准品	150 $\mu$ l的4号标准品加入150 $\mu$ l标准品 稀释液
	100ng/L	2号标准品	150 $\mu$ l的3号标准品加入150 $\mu$ l标准品 稀释液
	50ng/L	1号标准品	150 $\mu$ l的2号标准品加入150 $\mu$ l标准品稀 释液

[0138] ②加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔,在酶标包被板上标准品准确加样50 $\mu$ l,待测样品孔中先加样品稀释液40 $\mu$ l,然后再加待测样品10 $\mu$ l(样品最终稀释度为5倍),加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;

- [0139] ③温育:用封板膜封板后置37℃温育30分钟;
- [0140] ④配液:将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;
- [0141] ⑤洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复5次,拍干;
- [0142] ⑥加酶:每孔加入酶标试剂50 $\mu$ l,空白孔除外;
- [0143] ⑦温育:操作同③;
- [0144] ⑧洗涤:操作同⑤;
- [0145] ⑨显色:每孔先加入显色剂A50 $\mu$ l,再加入显色剂B50 $\mu$ l,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15分钟;
- [0146] ⑩终止:每孔加终止液50 $\mu$ l,终止反应(此时蓝色立转黄色);
- [0147] ⑪测定:以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值),测定应在加终止液后15分钟以内进行;
- [0148] (2)小鼠血清1L-2含量测定
- [0149] 步骤与2.2.4中的(1)一致;
- [0150] (3)小鼠血清1L-4含量测定
- [0151] 步骤与2.2.4中的(1)一致;
- [0152] (4)小鼠血清PRV gE抗体水平检测
- [0153] 将武汉科前的猪伪狂犬病病毒ELISA抗体检测试剂盒中的二抗换成HRP-羊抗鼠IgG,用于测定小鼠血清中的PRV抗体,经试验,二抗最适稀释度为1:5000,具体检测步骤如下:
- [0154] ①取抗原包被板(根据样品多少,可拆分次使用),将稀释好的待检血清样品和对照血清各取100 $\mu$ l加入到抗原包被板孔中,待检样品做1孔,阴性对照和阳性对照各设2孔,轻轻振匀孔中样品(勿溢出),置37℃下温育30分钟;
- [0155] ②甩掉板孔中的溶液,每孔加入稀释好的洗涤液200 $\mu$ l,静置3分钟倒掉,再在吸水纸上拍干,共计洗涤5次;
- [0156] ③每孔加HRP-羊抗鼠IgG 100 $\mu$ L,置37℃温育30分钟;
- [0157] ④洗涤5次,方法同步骤②,切记每次在干净吸水纸上拍干;
- [0158] ⑤每孔先加底物液A50 $\mu$ l、再加底物液B50 $\mu$ l,混匀,室温(20℃~25℃)避光显色10分钟;
- [0159] ⑥每孔加终止液50 $\mu$ l,10分钟内测定其OD<sub>630nm</sub>值(测定前在振荡器上轻轻震动一下)。
- [0160] 2.3优化药物组合对小鼠的免疫试验
- [0161] (1)将20只SPF级雌性昆明小鼠进行随机分成4组,分组情况如表七所示:
- [0162] 表七 小鼠分组情况及相应注射剂量
- [0163]

组别	注射疫苗量	注射药物剂量	小鼠数量/只
空白对照组	等量PBS	——	5
纯疫苗组	200 $\mu$ L	——	5
①组(左高+黄低+刀低)	200 $\mu$ L	30mg/kg+20mg/kg+10mg/kg	5

②组(左高+黄低+刀高)	200 $\mu$ L	30mg/kg+20mg/kg+60mg/kg	5
--------------	-------------	-------------------------	---

[0164] 其中左高为高剂量盐酸左旋咪唑,黄低为低剂量黄芪多糖,刀低为低剂量刀豆素,刀高为高剂量刀豆素;

[0165] (2)其余步骤与2.2.2相同。

[0166] 3实验结果讨论

[0167] 3.1毒株的准备

[0168] 3.1.1PRV强毒株TCID<sub>50</sub>的测定

[0169]

稀释度	细胞管观察结果		累计细胞孔数		总数	CPE 孔所占%
	CPE 孔	非 CPE 孔	CPE 孔	非 CPE 孔		
10 <sup>-1</sup>	8	0	55	0	55	100(55/55)
10 <sup>-2</sup>	8	0	47	0	47	100(47/47)
10 <sup>-3</sup>	8	0	39	0	39	100(39/39)
10 <sup>-4</sup>	8	0	31	0	31	100(31/31)
10 <sup>-5</sup>	8	0	23	0	23	100(23/23)
10 <sup>-6</sup>	8	0	15	0	15	100(15/15)
10 <sup>-7</sup>	5	3	7	3	10	70.0(7/10)
10 <sup>-8</sup>	2	6	2	9	11	18.2(2/11)
10 <sup>-9</sup>	0	8	0	17	17	0 (0/17)

Reed-Muench 法计算:

高于 50%的 CPE 细胞孔所占百分数—50

[0170] 高于50%的CPE细胞孔所占百分数—低于50%的CPE细胞孔所占百分数

[0171] 计算出的每100 $\mu$ L的TCID<sub>50</sub>结果为:

[0172]  $TCID_{50} = (70.0 - 50) / (70.0 - 18.2) = 0.39$

[0173] 由上式获得的0.39加在高于50%的CPE细胞孔所占百分数的相应稀释度的对数上,因此,该病毒的滴度为100 $\mu$ L10<sup>7.39</sup>TCID<sub>50</sub>/mL,查对数表得,即经24547089倍稀释的100 $\mu$ L病毒液中含有一个TCID<sub>50</sub>。

[0174] 3.1.2PRV LD<sub>50</sub>的测定

[0175] 经测定,此PRV毒株对小鼠的LD<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>/0.1ml。

[0176] 3.2单组份药物对小鼠的免疫试验结果

[0177] 3.2.1小鼠的脾脏指数

[0178] 免疫器官指数是衡量机体免疫器官的发育情况的经典指标,从图1可知,免疫组小鼠脾脏指数均高于空白对照组;而给药组小鼠脾脏指数均高于纯疫苗组(P<0.05),但不同剂量存在差异。

[0179] 与纯疫苗组相比:盐酸左旋咪唑组均可显著提高小鼠的脾脏指数,其中以左高组

最为显著( $P < 0.01$ );刀豆素组不同剂量之间相差不大,其中刀高组最为显著( $P < 0.01$ );黄芪多糖以低剂量最为显著( $P < 0.01$ )。

#### [0180] 3.2.2小鼠各内脏组织病原PCR检测

[0181] 从图2-图5可得知,空白对照组小鼠的肝、脾及肾检测结果为PRV阳性,其余各组均为阴性,证明免疫组均产生了相应的抗体,对小鼠产生相应的免疫保护。

#### [0182] 3.2.3小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量测定结果

[0183] 小鼠血清中IFN- $\gamma$ 含量测定结果见图6,从总体上看,给药组小鼠血清中IFN- $\gamma$ 含量水平显著高于纯疫苗组( $P < 0.05$ ),在首免后21d时最高,因此以该时间点作相关性比较。

[0184] 与纯疫苗组相比较:给药组小鼠血清中IFN- $\gamma$ 含量水平显著提高( $P < 0.01$ );盐酸左旋咪唑组各剂量之间差异不明显( $P > 0.05$ );刀豆素组低剂量与高剂量差异不显著( $P > 0.05$ ),中剂量组IFN- $\gamma$ 含量最低;黄芪多糖组各剂量之间差异不显著( $P > 0.05$ ),低剂量组IFN- $\gamma$ 含量最高,可高达929pg/mL。

#### [0185] 3.2.4小鼠血清IL-2含量测定结果

[0186] 小鼠血清中IL-2含量测定结果见图7,从总体上看,给药组小鼠血清中IL-2含量水平显著高于纯疫苗组( $P < 0.05$ ),在首免后21d时最高,因此也以该时间点作相关性比较。

[0187] 与纯疫苗组相比:给药组小鼠血清中IL-2含量水平显著提高( $P < 0.01$ );盐酸左旋咪唑组各剂量之间差异不显著( $P > 0.05$ ),其中高剂量组IL-2含量最高,可高达1242pg/mL;刀豆素组各剂量之间差异不显著( $P > 0.05$ );黄芪多糖组各剂量之间差异不显著( $P > 0.05$ ),其中低剂量组IL-2含量最高,可高达1250pg/mL。

#### [0188] 3.2.5小鼠血清IL-4含量测定结果

[0189] 小鼠血清IL-4含量测定结果见图8,从总体上看,给药组小鼠血清中IL-4含量变化水平并不像IL-2等显著升高。在首免后21d时最高,因此也以该时间点作相关性比较。

[0190] 与纯疫苗组相比:盐酸左旋咪唑组IL-4含量水平显著提高( $P < 0.05$ ),其中低剂量组与高剂量组效果更加显著( $P < 0.01$ );低剂量的刀豆素能极其显著提高小鼠血清IL-4的含量( $P < 0.01$ ),中剂量效果显著( $P < 0.05$ ),高剂量效果不显著( $P > 0.05$ );低剂量和中剂量的黄芪多糖能显著提高小鼠血清IL-4的含量( $P < 0.01$ ),高剂量效果不显著( $P > 0.05$ )。

#### [0191] 3.2.6小鼠血清PRV gE抗体水平检测结果

[0192] 见图9,免疫组的PRVgE抗体水平相比于空白对照组大幅升高,在注射疫苗后不断上升,尤其在二免后上升幅度增大,于首免后28dOD值最高,因此选择此时间点作相关性比较。

[0193] 与纯疫苗组相比:除黄高组外,其余各给药组均能显著提高小鼠血清中PRV gE抗体水平( $P < 0.05$ );不同剂量的盐酸左旋咪唑均能对小鼠血清PRV gE抗体水平极其显著提高( $P < 0.01$ ),其中高剂量组OD值最高,与低剂量、中剂量组相比差异显著( $P > 0.05$ );低剂量与高剂量的刀豆素对小鼠血清中PRV gE抗体水平的提高极其显著( $P < 0.01$ ),分别可达1.384和1.354;低剂量与中剂量的黄芪多糖对小鼠血清中PRV gE抗体水平的提高极其显著( $P < 0.01$ ),低剂量组OD值最高,可达1.3195。

[0194] 结果表明,盐酸咪唑高剂量组、刀豆素低剂量组和黄芪多糖低剂量组小鼠血清PRV gE抗体OD值最高,这也表明高剂量的盐酸咪唑、低剂量的刀豆素和低剂量的黄芪多糖更有助于抗体的产生。

[0195] 3.2.7讨论

[0196] CD4<sup>+</sup>T细胞分为主要介导与细胞毒和局部炎症有关免疫应答的Th1和主要介导体液免疫的Th2两种亚群在健康动物,其体内Th1、Th2细胞亚群处于平衡状态以维持正常的免疫功能,当发生免疫机能紊乱时,这两种CD4<sup>+</sup>细胞亚群的比例及活性就会发生变化,从而反映在其分泌的细胞因子水平的变化上。目前已发现许多感染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病以及移植排斥反应等都与Th1/Th2平衡有关。Th1分泌的IL-2和IFN- $\gamma$ 对其本身有促进增殖与分化作用,而对Th2型细胞的分化有抑制作用;Th2细胞分泌的IL-4则对Th1型细胞生成有一定抑制作用;二者在免疫调节中相互拮抗以维持免疫平衡。

[0197] 从上述结果来看,盐酸左旋咪唑、黄芪多糖和刀豆素的确能免疫增强效果,增强各种细胞因子(IL-2、IFN- $\gamma$ 和IL-4)的分泌,配合疫苗使用,能明显促进抗体的生成,但不同剂量增强效果有一定的差异。综合上述几项指标,得出高剂量的盐酸左旋咪唑和低剂量的黄芪多糖无论在细胞因子分泌水平或是抗体生成水平上都均比同组的其他剂量效果显著,而刀豆素的低剂量和高剂量则比中剂量效果更佳,因此选择①组即左高+黄低+刀低和②组即左高+黄低+刀高组合配方进行下一步的免疫试验。

[0198] 3.3优化药物组合对小鼠的免疫试验

[0199] 3.3.1小鼠的脾脏指数

[0200] 从图10可知,免疫组小鼠脾脏指数均高于空白对照组。

[0201] 与纯疫苗组相比,给药组小鼠脾脏指数显著提高( $P<0.05$ ),其中①组效果更为显著( $P<0.01$ ),可达到3.52,与第一次免疫试验各给药组相比,①组效果更佳。

[0202] 3.3.2小鼠各组织病原PCR检测

[0203] 见图11,空白对照组小鼠的肝、脾及肾检测结果为PRV阳性,其余各组均为阴性,证明免疫组均产生了相应的抗体,对小鼠产生相应的免疫保护。

[0204] 3.3.3小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量测定结果

[0205] 小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量测定结果见图12,从总体上看,给药组小鼠血清中IFN- $\gamma$ 含量水平显著高于纯疫苗组( $P<0.05$ ),在首免后21d时最高,因此以该时间点作相关性比较。

[0206] 与纯疫苗组相比:①组和②组对小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量的提高极其显著( $P<0.01$ );①组中IFN- $\gamma$  OD值最高,可达到1.804,与②组相比,①组效果更佳( $P<0.01$ ),①组的小鼠血清IFN- $\gamma$ 含量要高于单组份药物试验11组中任一组小鼠。

[0207] 3.3.4小鼠血清IL-2含量测定结果

[0208] 小鼠血清IL-2含量测定结果见图13,IL-2含量变化与IFN- $\gamma$ 呈正比例,当IFN- $\gamma$ 含量上升时,IL-2也变化显著,在首免后21d时最高,因此以该时间点作相关性比较。

[0209] 纯疫苗组、①组和②组分别作两两比较,差异都极其显著( $P<0.01$ ),其中①组对小鼠血清IL-2含量的提高最为显著,可高达1042pg/mL,要高于单组份药物试验11组中任一组小鼠。

[0210] 3.3.5小鼠血清IL-4含量测定结果

[0211] 小鼠血清IL-4含量测定结果见图14,在首免后21d时最高,因此以该时间点作相关性比较。

[0212] 纯疫苗组、①组和②组分别作两两比较,差异都极其显著( $P<0.01$ ),其中①组对小鼠血清IL-4含量的提高最为显著,可高达441pg/mL,要高于单组份药物试验11组中任一组

小鼠。

[0213] 3.3.6小鼠血清PRV gE抗体水平检测结果

[0214] 小鼠血清PRV gE抗体水平检测结果见图15,①组和②组纯疫苗组相比,PRV gE抗体OD值大幅上升,这表明产生了大量的抗体,与首免后28dOD值最大,因为选择此时间点作相关性比较。

[0215] 纯疫苗组、①组和②组分别作两两比较,差异都极其显著( $P < 0.01$ ),显然①组的效果更佳,OD值可高达1.804,亦要高于单组份药物试验11组中任一组小鼠。

[0216] 3.2.7讨论

[0217] 经过两组药物的免疫效果比较,综合考虑了脾脏指数、细胞因子水平及抗体水平等指标,表明①组(左高+黄低+刀低)和②组(左高+黄低+刀高)效果相比于单组份药物,并没有出现拮抗现象,而是相互促进,能显著提高 $1FN-\gamma$ 、 $1L-2$ 、 $1L-4$ 和PRVgE抗体分泌水平,免疫效果更佳。这说明了以这三种药物为组分的复方免疫增强剂配合疫苗使用,能够增强机体免疫功能,促进细胞因子的分泌以及特异性抗体的形成。在从脾脏指数、细胞因子水平及抗体水平变化方面来看,①组比②组效果更明显。同时从成本来考虑,显然①组更具有应用前景。

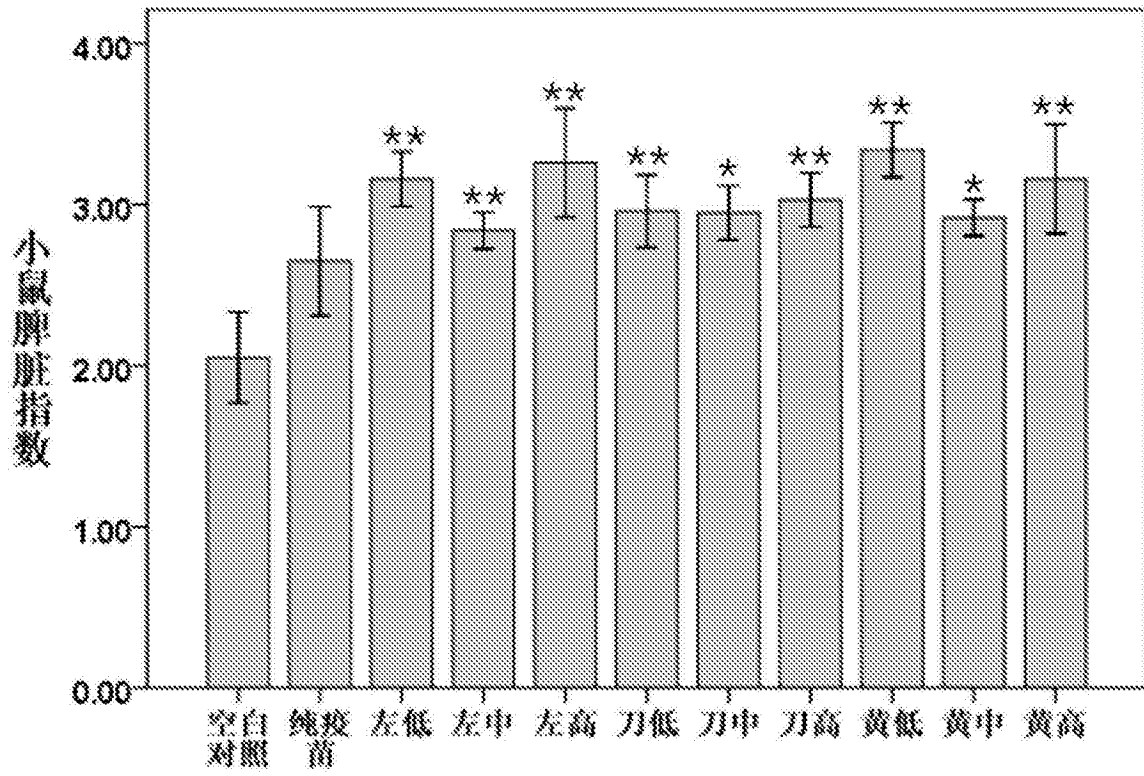


图1

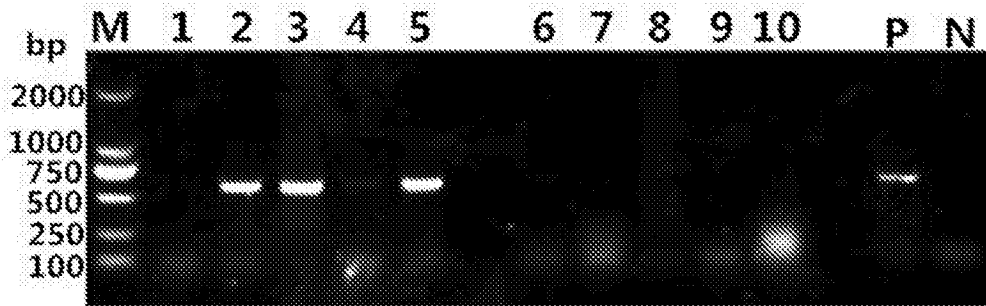


图2



图3

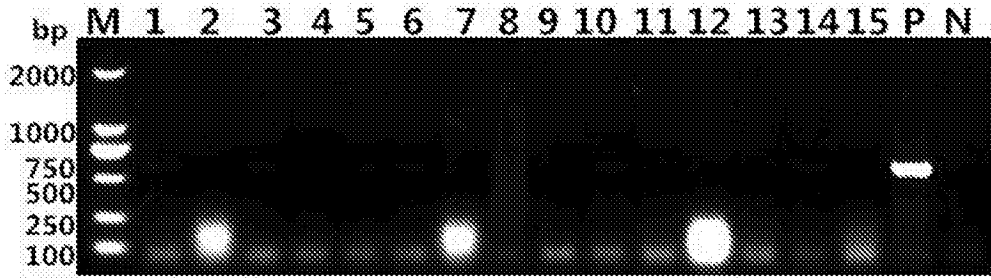


图4

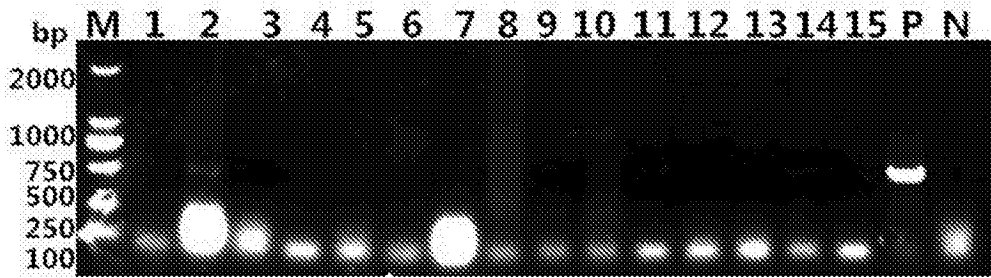


图5

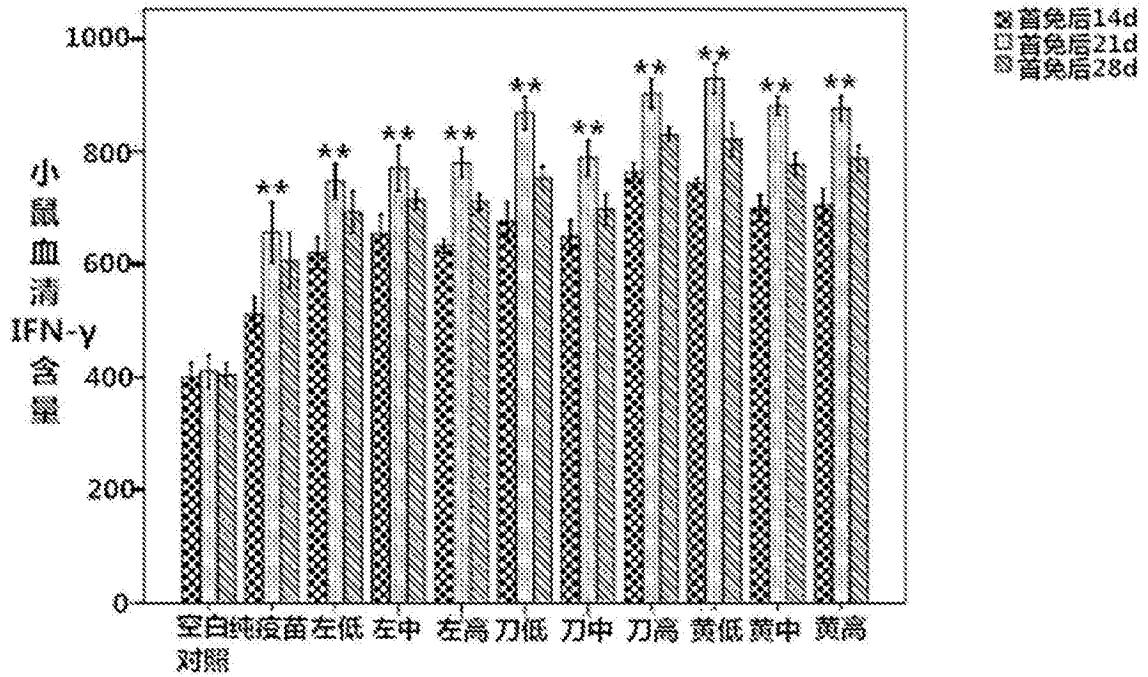


图6

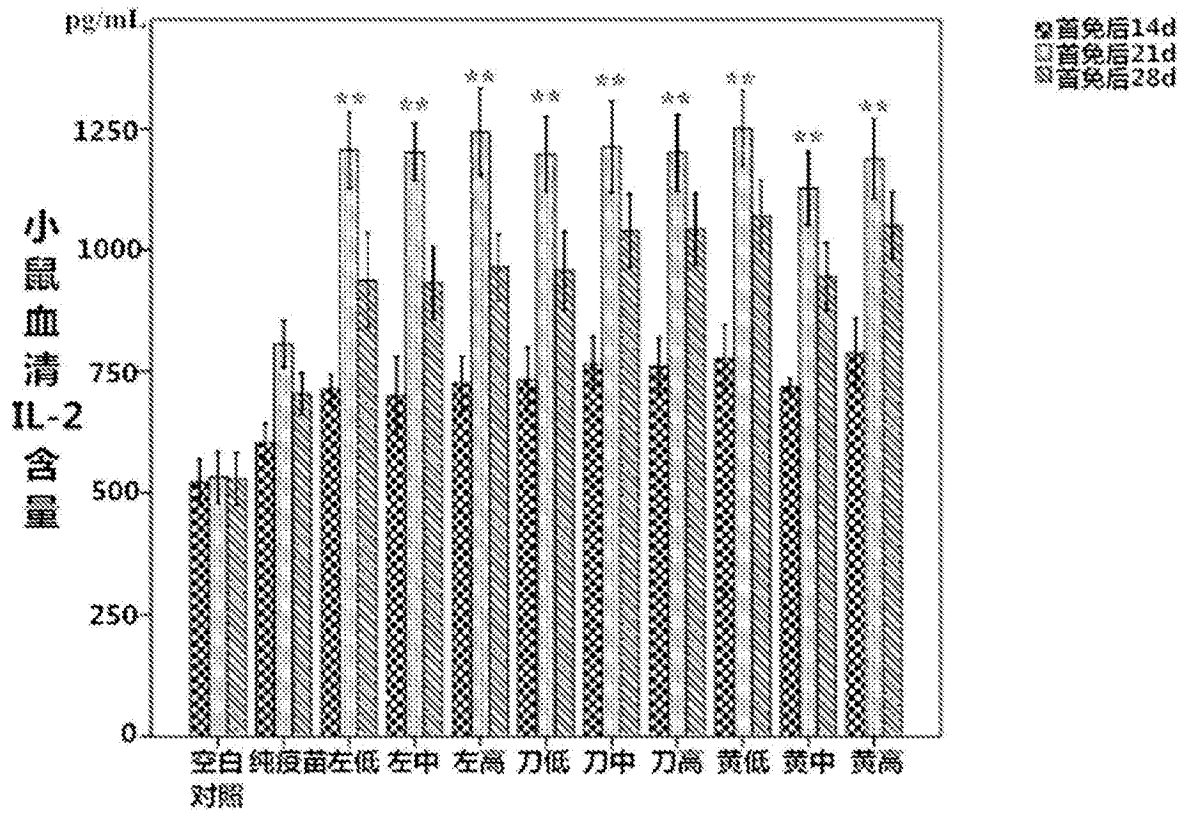


图7

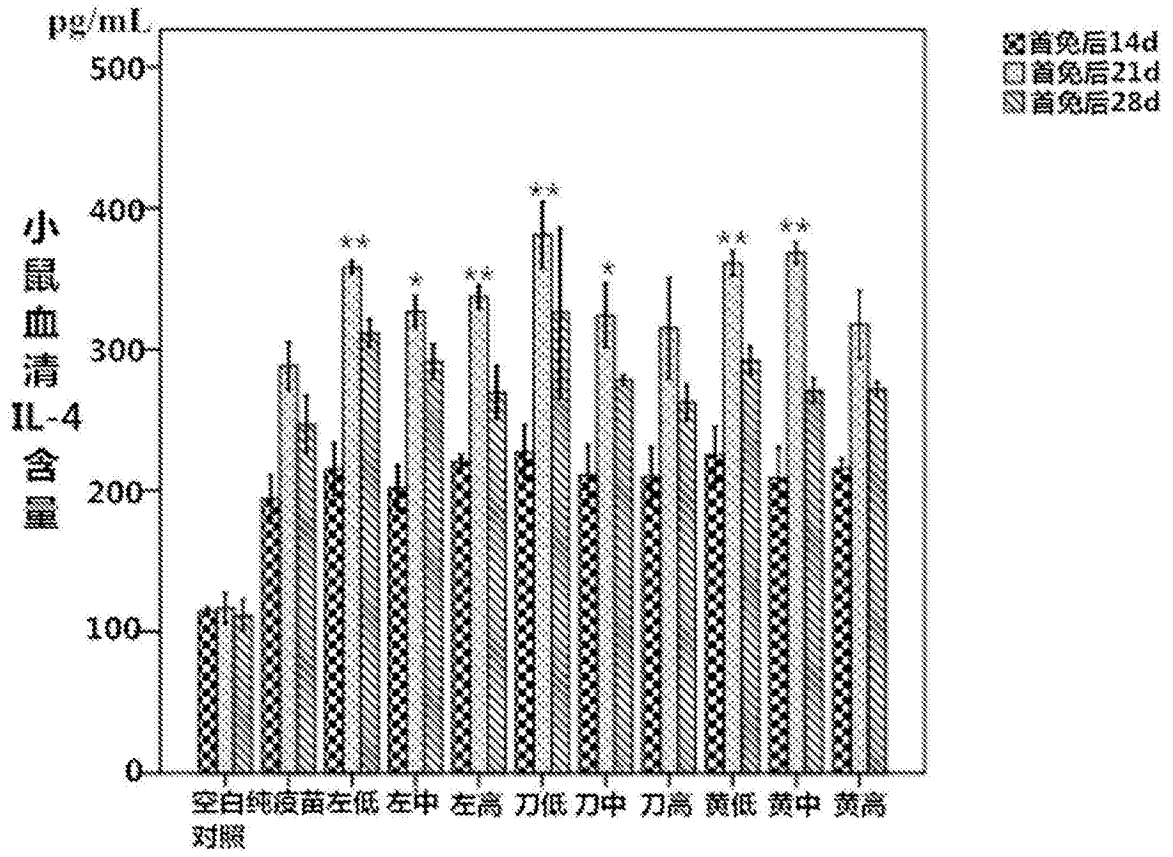


图8

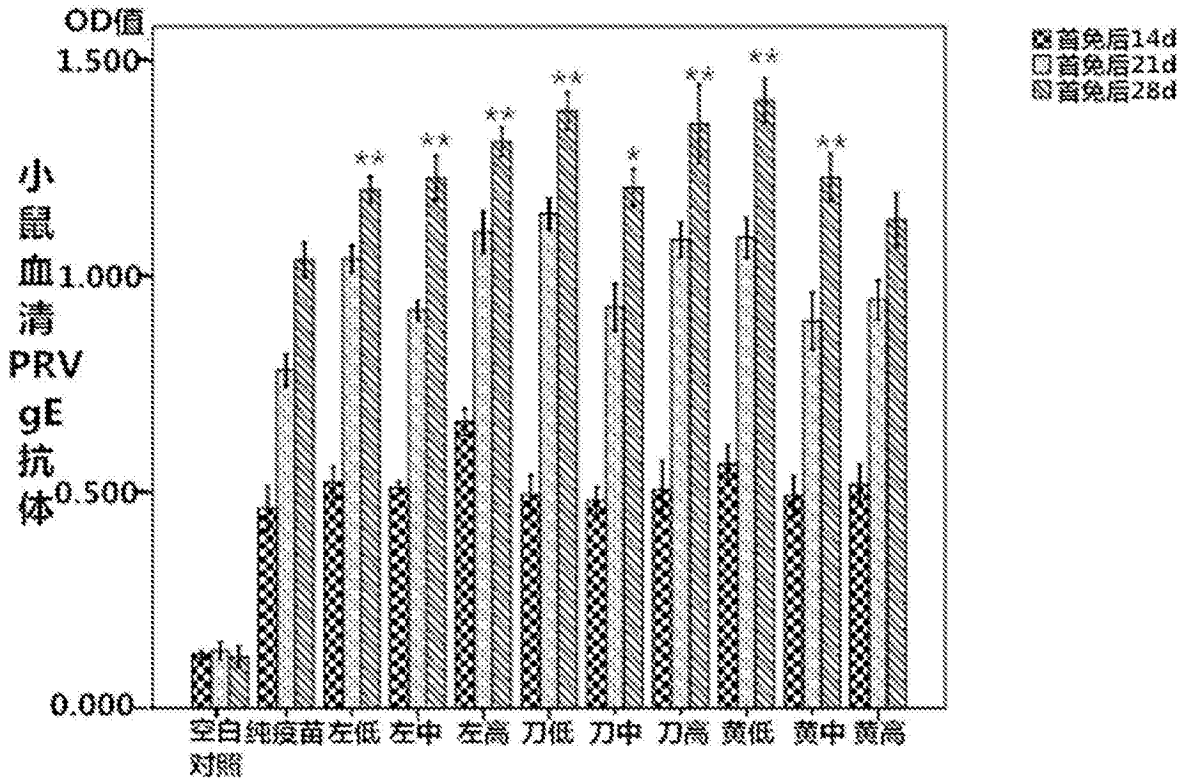


图9

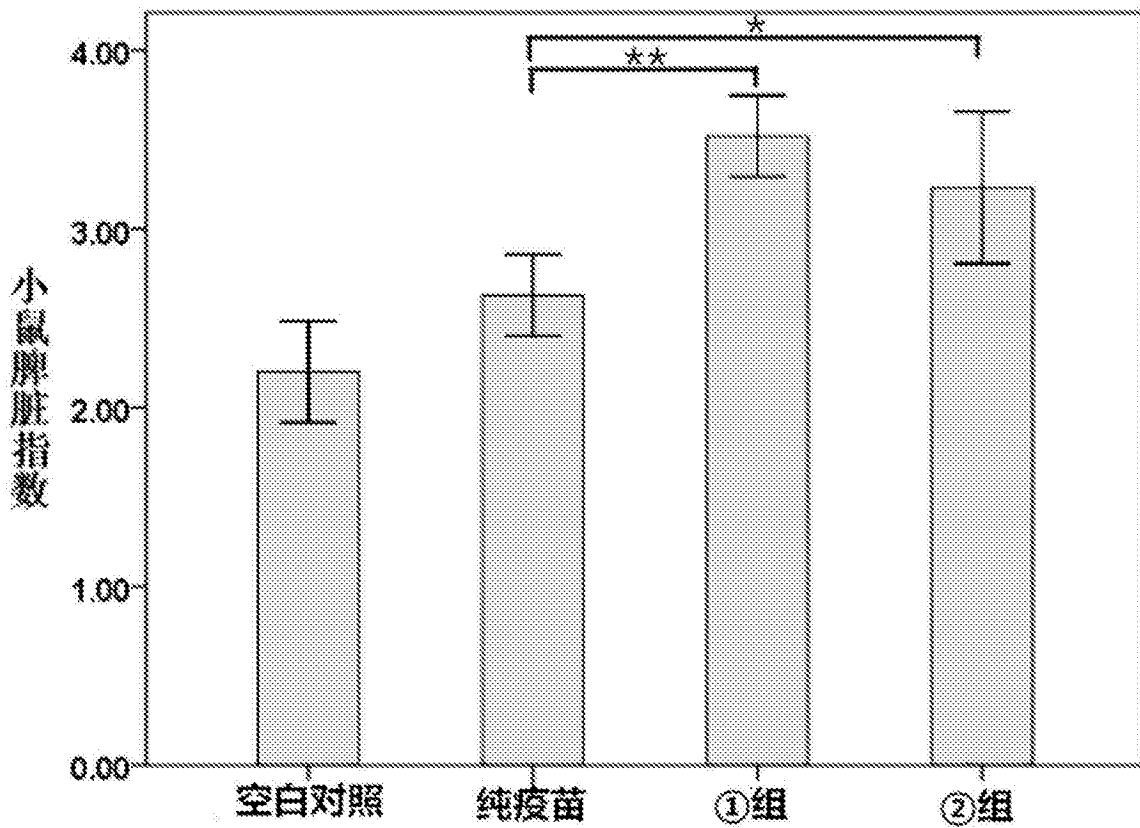


图10

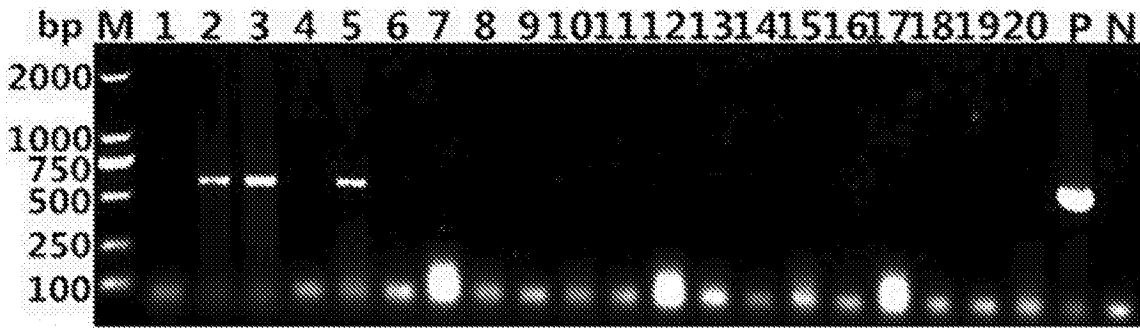


图11

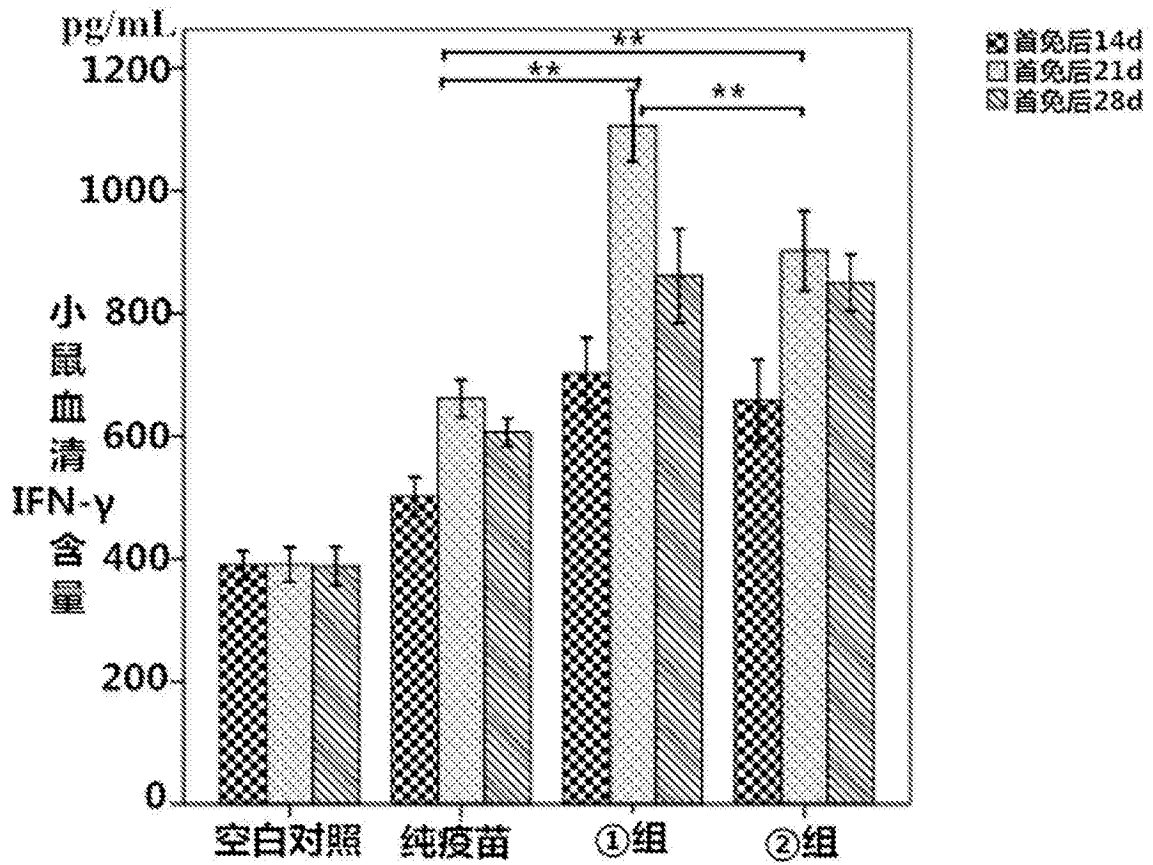


图12

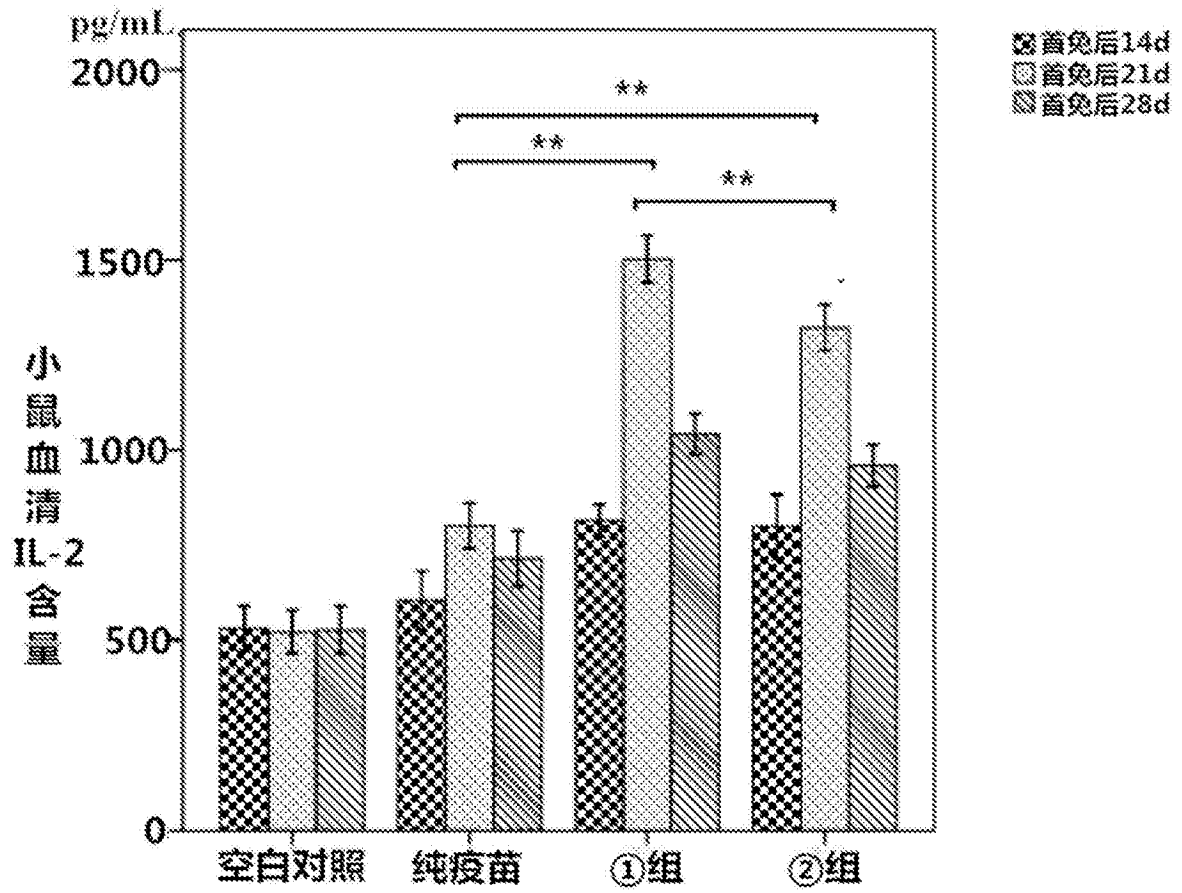


图13

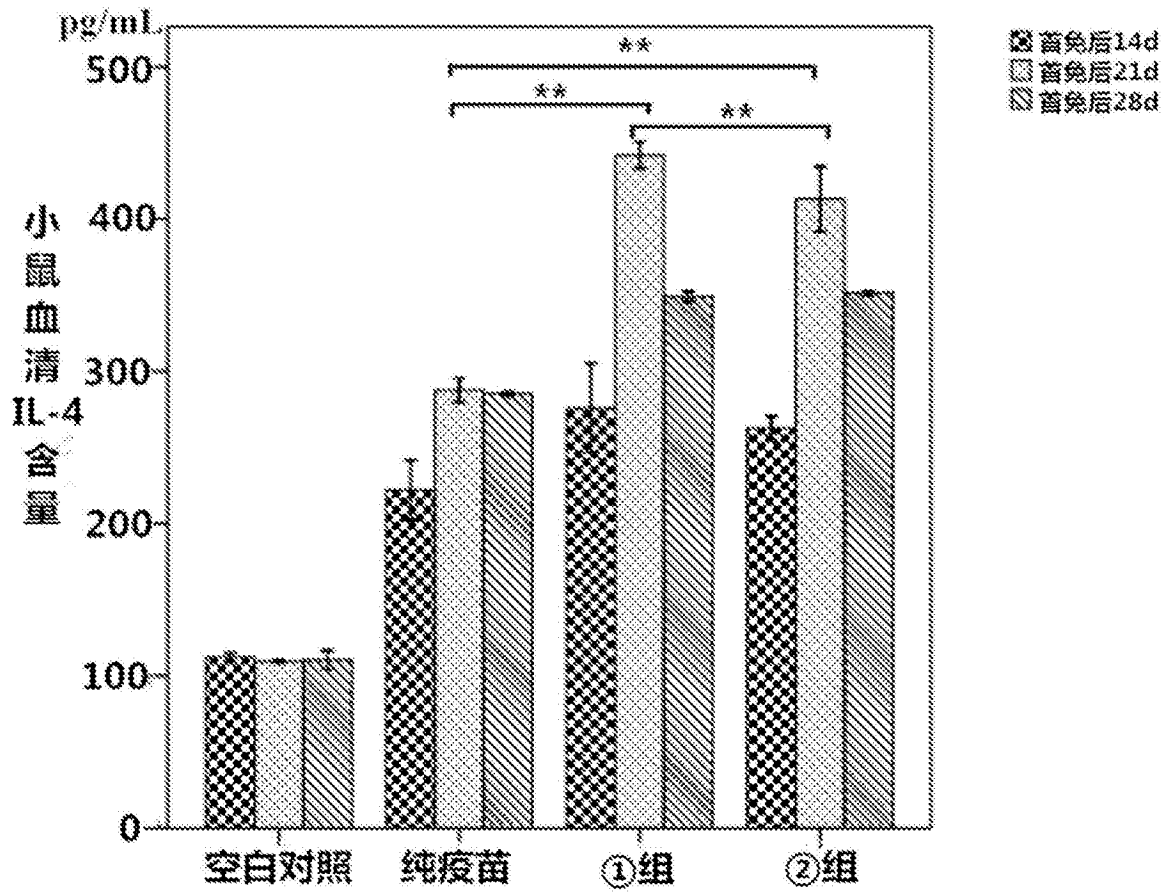


图14

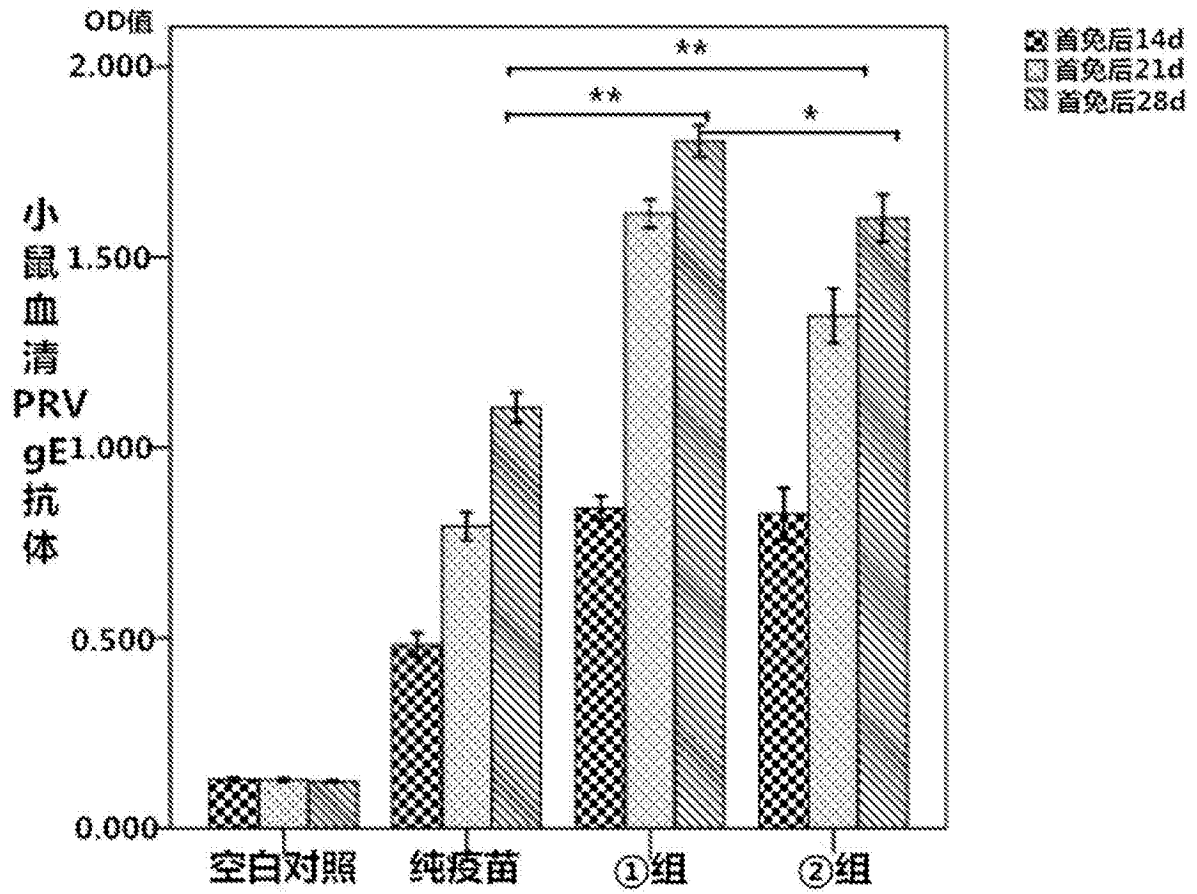


图15

专利名称(译)	动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107432929A</a>	公开(公告)日	2017-12-05
申请号	CN201610373835.0	申请日	2016-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	罗满林 陈华良 李冰 张贺 邹舒展 翟少伦		
发明人	罗满林 陈华良 李冰 张贺 邹舒展 翟少伦		
IPC分类号	A61K38/16 A61P37/04 A61P31/14 G01N33/53 A61K31/715 A61K31/429		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种动物复合免疫增强剂与应用及确定该增强剂最佳组分含量的方法，所述动物复合免疫增强剂由以下重量份配比的原料制成：黄芪多糖20-80、刀豆素10-60、盐酸左旋咪唑7.5-30。所述的动物复合免疫增强剂在制备预防动物病毒性疾病药物中的应用，将配方中各组分按盐酸左旋咪唑：刀豆素：黄芪多糖=3:2:1的比例溶于0.9%生理盐水中，充分混匀，制得浓度为600mg/ml的注射剂；所述注射剂的剂量为60mg/kg/日，连续注射三天，腹腔或肌肉注射，以预防动物病毒性疾病。这种动物复合免疫增强剂具有安全性高、高效多能、生产成本低廉的优点。

