



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116143908 A

(43) 申请公布日 2023.05.23

(21) 申请号 202310098093.5

(22) 申请日 2023.02.10

(71) 申请人 武汉华美生物工程有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖开发区高新大道818号高科医疗器械园B11号
(自贸区武汉片区)

(72) 发明人 张芳 易汪雪 李晶晶 王婷
周文祥

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231

专利代理师 周双

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

(54) 发明名称

一种针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,具体为:先将VLPs类型抗原与第一佐剂复合物混合后首次免疫动物,再将VLPs类型抗原与第二佐剂复合物混合后进行增强免疫;其中,第一佐剂复合物包括弗氏佐剂,第二佐剂复合物包括水乳佐剂,第一佐剂复合物和第二佐剂复合物中还包括CPG-C和/或氯化锰。本发明基于VLPs类型抗原的结构特点和不同佐剂的特性,并结合免疫原理,通过组合免疫显著增加了目标抗原产生的效价,有效解决了现有技术中VLPs类型抗原免疫效价低或无效价免疫的问题。

1. 一种针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,包括以下步骤:
S1、将VLPs类型抗原与第一佐剂复合物混合后首次免疫动物,所述第一佐剂复合物包括弗氏佐剂;
S2、再将VLPs类型抗原与第二佐剂复合物混合后进行增强免疫,所述第二佐剂复合物包括水乳佐剂;
所述第一佐剂复合物和第二佐剂复合物还包括CPG-C和/或氯化锰。
2. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,所述动物为小鼠。
3. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,所述VLPs类型抗原与第一佐剂复合物或第二佐剂复合物按照体积比1:1混合。
4. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,在所述第一佐剂复合物或第二佐剂复合物中,CpG-C的浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
5. 根据权利要求4所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,所述CpG-C的浓度为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
6. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,在所述第一佐剂复合物或第二佐剂复合物中,氯化锰的浓度为90~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
7. 根据权利要求6所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,所述氯化锰的浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
8. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,采用皮下结合肌肉注射的方式免疫动物。
9. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,所述增强免疫的次数为1~5次。
10. 根据权利要求1所述针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,其特征在于,所述弗氏佐剂为腐蚀完全佐剂,所述水乳佐剂为武汉三鹰PR40009或博奥龙KX0210049。

一种针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种针对VLPs类型抗原的组合免疫产生高效价血清的方法。

背景技术

[0002] 病毒样颗粒(virus-like particles,VLPs)是不含病毒核酸的空壳结构,许多病毒结构蛋白都具有自动组装成VLPs的能力,其在形态结构上与天然的病毒颗粒相似,具有很强的免疫原性和生物学活性。由于VLPs不含有病毒遗传物质,因此不具有感染性,其中有些已经作为疫苗成功应用于临床。VLPs在结构上允许外源基因或基因片段的插入而形成嵌合型VLPs并将外源性抗原展示在其表面。此外,多数病毒VLPs还具有包裹核酸或其他小分子的能力。

[0003] VLPs类型抗原是一种以VLPs为载体的新型抗原,具体为:将目的抗原的基因片段插入到VLPs的外膜结构中,形成嵌合型VLPs的整体,通过培养复制VLPs来表达蛋白,最终使抗原展示在表面的整体结构的VLPs抗原。该类型的结构是不改变VLPs的表面结构,但又能让目的抗原在其表面,在免疫的过程中能充分的展示出抗原的特质,从而达到免疫的效果。

[0004] 佐剂常与抗原共同注入动物体内,以产生预期的高效价免疫血清,佐剂的选择对于免疫的效价至关重要。适当的佐剂可以提高动物机体对免疫原刺激的应答能力,还能延长抗原的半衰期,降低抗原的直接毒性作用,并使抗原在免疫部位缓慢、持久释放,从而提高巨噬细胞和免疫活性细胞的作用。市场使用最广泛的是复合佐剂中的弗氏佐剂和有机佐剂的水乳型佐剂,每种类型的佐剂都有它本身的特殊性,不能针对于不同类型的抗原产生相同的免疫效果。

[0005] 然而,目前市面上没有任何一款佐剂被指明可以针对VLPs类型抗原,并在不破坏VLPs和抗原结构的前提下能够有很强的免疫效果,其原因在于:①VLPs类型抗原是通过VLPs的表面结构来展示的,而VLPs本身有很强的免疫原性,在免疫过程中VLPs本身也会对宿主有刺激作用,产生效价,进而影响特异抗原的免疫原性,导致特异性抗原的效价很低,甚至免疫失败;②VLPs类型抗原是通过抗原表达在VLPs的膜上,本身也不稳定,如果通过物理或者过强化学方式可能会影响细胞膜从而导致特异性抗原失效。

发明内容

[0006] 针对现有技术中VLPs类型抗原免疫效价低或免疫失效的问题,本发明旨在提供一种针对VLPs类型抗原获得更高免疫效价的免疫方法,以得到具有高效价的免疫动物,从而提高免疫成功率,缩短研发周期,节约研发成本。

[0007] 为了实现上述目的,本发明的技术方案具体为:

[0008] 一种针对VLPs类型抗原免疫产生高效价抗血清的方法,包括以下步骤:

[0009] S1、将VLPs类型抗原与第一佐剂复合物混合后首次免疫动物,所述第一佐剂复合物包括弗氏佐剂;

[0010] S2、再将VLPs类型抗原与第二佐剂复合物混合后进行增强免疫,所述第二佐剂复合物包括水乳佐剂;

[0011] 所述第一佐剂复合物和第二佐剂复合物还包括CpG-C(胞嘧啶多鸟嘌呤C)和/或氯化锰。

[0012] 在上述方法中,所述动物优选为小鼠。

[0013] 在上述方法中,所述VLPs类型抗原与第一佐剂复合物或第二佐剂复合物优选按照体积比1:1混合。

[0014] 在上述方法中,在所述第一佐剂复合物或第二佐剂复合物中,CpG-C的浓度为30~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,氯化锰的浓度为90~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$;其中,CpG-C的浓度优选为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,氯化锰的浓度优选为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0015] 在上述方法中,采用皮下结合肌肉注射的方式免疫动物。

[0016] 在上述方法中,所述增强免疫的次数为1~5。

[0017] 弗氏佐剂是一种经典的油包水型佐剂,该佐剂是由矿物油(石蜡油)、乳化剂(羊毛脂)和死的结核分枝杆菌组成,若三种成分都有,则称为完全佐剂,若无分枝杆菌则被称为弗氏不完全佐剂。在上述方法中,步骤S1中的第一佐剂复合物优选包含的是弗氏完全佐剂。

[0018] 在上述方法中,水乳佐剂又称为水溶性佐剂,是一种与抗原混合后可以直接免疫而不用乳化的佐剂类型;具体可以为PR40009(武汉三鹰)或/和KX0210049(博奥龙)。

[0019] 本发明的有益效果为:本发明通过特定复合佐剂的组合免疫法来降低VLPs本身的免疫原性,同时提高特异性抗原的免疫原性,而且该组合免疫方法不会破坏VLPs细胞膜以及细胞膜上的特异性抗原,最终得到了针对特异性抗原的高效价血清。

具体实施方式

[0020] 为了使本发明所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。

[0021] 下述实施例中,若无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和材料,若无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0022] 实施例1

[0023] 本例的VLPs类型抗原具体为GPRC5D-VLPs抗原,第一佐剂复合物由弗氏完全佐剂、CpG-C和氯化锰组成,第二佐剂复合物由博奥龙KX0210049(水乳佐剂)、CpG-C和氯化锰组成,在第一佐剂复合物和第二佐剂复合物中,CpG-C的浓度均为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,氯化锰的浓度均为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0024] 本例的免疫过程具体为:

[0025] 实验组:将GPRC5D-VLPs抗原与第一佐剂复合物按照体积比1:1的比例混合乳化,采用皮下结合肌肉注射免疫的方式首次免疫小鼠;待14天后,再将GPRC5D-VLPs抗原与第二佐剂复合物按照体积比1:1的比例混合,进行第二次免疫,免疫方式同首次免疫;待14天后,进行第三次免疫,免疫试剂及免疫方式同第二次;每针每次的50 μg ;

[0026] 对照组:除采用VLPs作为抗原外,其他同实验组。实验组和对照组均分别进行两次实验。

[0027] 待最后一次免疫结束7天后采集各组免疫小鼠血液,收集抗血清,通过以下方法检测抗血清的效价:

[0028] ①抗原用CB稀释成2 μ g/ml,每孔100 μ l包被到96孔板中,4度过夜;

[0029] ②拍干板子,4%的脱脂奶粉每孔200 μ l进行封闭,37度2小时;

[0030] ③TBS洗板5次,每次1分钟;用PBS稀释抗血清,按照1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:16000,1:32000,1:64000,1:128000,1:256000,1:512000,1:1024000的稀释比例后,每孔加100 μ l,37度1小时;

[0031] ④TBS洗板3次,每次1分钟;洗完后,羊抗小鼠二抗(1:5000),每孔100 μ l;

[0032] ⑤40分钟后,TBS洗板5次,每次1分钟,每孔加50 μ l的TBM,37度15分钟。

[0033] ⑥酶标仪读数。

[0034] 各组小鼠的抗血清效价检测结果见表1。

[0035] 表1

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
1:1000	2.6114	2.6097	2.654	2.6195
1:2000	2.6419	2.5719	2.654	2.6458
1:4000	2.759	2.6599	2.5763	2.5867
1:8000	2.5969	2.759	2.6446	2.5347
1:16000	2.759	2.759	2.4594	2.4463
1:32000	2.5072	2.4692	2.1929	1.9239
1:64000	2.3215	2.3047	1.7157	1.3553
1:128000	2.06	1.9864	1.1806	0.7533
1:256000	1.4969	1.4056	0.6879	0.3546
1:512000	0.959	1.0318	0.3783	0.2453
1:1024000	0.6066	0.7904	0.1972	0.077
PBS	0.0695	0.0994	0.1253	0.0843
效价	256000	512000	128000	64000

[0038] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为384000,VLPs平均效价为96000,差值可达288000。

[0039] 实施例2

[0040] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物仅由弗氏完全佐剂和CpG-C组成,第二佐剂复合物仅由博奥龙KX0210049和CpG-C组成,且在第一佐剂复合物和第二佐剂复合物中,CpG-C的浓度均为40 μ g/ml。

[0041] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表2。

[0042] 表2

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.2543	2.3482	2.6364
1:2000	2.3472	2.4081	2.6694	2.5744
1:4000	2.3635	2.3397	2.4498	2.4807
1:8000	2.4451	2.4031	2.501	2.4092
1:16000	2.3165	2.3748	2.1221	2.0564
1:32000	2.1943	2.2807	1.7254	1.5633
1:64000	2.0325	1.9723	1.1339	1.008
1:128000	1.6153	1.5181	0.6293	0.582
1:256000	1.3029	1.0574	0.3499	0.2626
1:512000	0.6435	0.7091	0.1386	0.0942
1:1024000	0.4882	0.3471	0.0502	0.0229
PBS	0.0589	0.0822	0.1673	0.0709
效价	256000	256000	64000	64000

[0043] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为256000,VLPs平均效价为64000,差值可达192000。

[0045] 实施例3

[0046] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物仅由弗氏完全佐剂和氯化锰组成,第二佐剂复合物仅由博奥龙KX0210049和氯化锰组成,且在第一佐剂复合物和第二佐剂复合物中,CpG-C的浓度均为100 μ g/ml。

[0047] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表3。

[0048] 表3

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.5992	2.5983	2.5876
1:2000	2.607	2.7461	2.5356	2.5104
1:4000	2.615	2.8229	2.5426	2.4895
1:8000	2.6313	2.6911	2.5426	2.2745
1:16000	2.5213	2.9164	2.4037	1.8708
1:32000	2.4961	2.4692	1.8148	1.2224
1:64000	2.2792	2.2499	1.3002	0.8698
1:128000	1.8986	1.9234	0.7521	0.4618
1:256000	1.353	1.343	0.381	0.1803
1:512000	0.8038	0.8363	0.2127	0.0392
1:1024000	0.5156	0.5447	0.0582	0.0995
PBS	0.0512	0.0236	0.2037	0.145
效价	256000	256000	64000	32000

[0049] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为256000,VLPs平均效价为48000,差值可达208000。

[0051] 对比例1

[0052] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由弗氏完全佐剂和CpG-C组成,第二

佐剂复合物由弗氏不完全佐剂和CpG-C组成,其他同实施例1。

[0053] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表4。

[0054] 表4

包被蛋白	GPRC5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.6979	2.7843	2.3016
1:2000	2.5755	2.6365	2.2615	2.3501
1:4000	2.5989	2.5672	2.1629	2.204
1:8000	2.5118	2.4833	2.0448	2.04
1:16000	2.3401	2.3569	1.7412	1.7989
1:32000	1.8168	1.8946	1.0041	1.1851
1:64000	1.4862	1.3346	0.6683	0.7925
1:128000	0.7883	0.9953	0.386	0.4102
1:256000	0.5018	0.5944	0.1021	0.2063
1:512000	0.2253	0.2506	0.0236	0.0812
1:1024000	0.1026	0.11	0.0666	0.0821
PBS	0.0435	0.0199	0.0414	0.0647
效价	64000	64000	32000	32000

[0056] 由上表可知,在免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为64000,VLPs平均效价为32000,差值为32000。

[0057] 对比例2

[0058] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由弗氏完全佐剂、氯化锰和CpG-C组成,第二佐剂复合物由弗氏不完全佐剂、氯化锰和CpG-C组成,其他同实施例1。

[0059] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表5。

[0060] 表5

包被蛋白	GPRC5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.6981	2.3558	2.1399
1:2000	2.6271	2.3696	2.267	2.3186
1:4000	2.611	2.2737	2.3304	2.3186
1:8000	2.3971	2.1858	2.1726	2.1335
1:16000	2.0726	2.2482	2.0245	1.7934
1:32000	1.6263	1.8668	1.374	1.1972
1:64000	1.3381	1.4455	0.8834	0.7809
1:128000	0.829	0.8982	0.4037	0.4934
1:256000	0.4134	0.5928	0.2019	0.289
1:512000	0.1503	0.2887	0.1025	0.1156
1:1024000	0.0472	0.1443	0.0945	0.0141
PBS	0.0752	0.0415	0.0773	0.0777
效价	64000	64000	32000	32000

[0062] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为64000,VLPs平均效价为32000,差值为32000。

[0063] 对比例3

[0064] 与实施例1不同的是,本例中首次免疫所用佐剂为弗氏完全佐剂,第二次和第三次免疫所用佐剂均为合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan,其他同实施例1。

[0065] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表6。

[0066] 表6

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.3666	2.6526	2.553
1:2000	2.4831	2.4119	2.581	2.5644
1:4000	2.4258	2.4874	2.4708	2.3602
1:8000	2.3418	2.4659	2.3534	2.2594
1:16000	2.0428	2.368	2.1698	1.9468
1:32000	1.495	1.9906	1.7066	1.5006
1:64000	1.0861	1.4776	1.2312	0.9689
1:128000	0.7009	1.1373	0.7399	0.5442
1:256000	0.269	0.6344	0.3943	0.2688
1:512000	0.2552	0.2887	0.2389	0.1076
1:1024000	0.0493	0.1209	0.0843	0.094
PBS	0.3017	0.1158	0.0243	0.0561
效价	64000	128000	64000	32000

[0068] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为96000,VLPs平均效价为48000,差值为48000。

[0069] 对比例4

[0070] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由弗氏完全佐剂和氯化锰组成,第二佐剂复合物由合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan和氯化锰组成,其他同实施例1。

[0071] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表7。

[0072] 表7

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.2202	2.2054	2.7066
1:2000	2.3915	2.342	2.6589	2.6449
1:4000	2.4211	2.3516	2.5013	2.5673
1:8000	2.2899	2.3281	2.514	2.3886
1:16000	2.4061	2.2644	2.421	2.1008
1:32000	1.8606	1.763	1.969	1.5339
1:64000	1.431	1.2846	1.4143	0.974
1:128000	0.9524	0.764	0.7415	0.5945
1:256000	0.6264	0.5254	0.6487	0.2684
1:512000	0.285	0.202	0.2398	0.092
1:1024000	0.0689	0.1194	0.0918	0.0799
PBS	0.06	0.0492	0.0351	0.0451
效价	64000	64000	64000	32000

[0074] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为64000,VLPs平均效价为48000,差值为16000。

[0075] 对比例5

[0076] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物和第二佐剂复合物相同,均由水乳佐剂博奥龙KX0210049和氯化锰组成。其他同实施例1。

[0077] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表8。

[0078] 表8

包被蛋白	GPRC5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.5927	2.2588	2.6833
1:2000	2.3751	2.3326	2.63	2.5464
1:4000	2.4476	2.338	2.802	2.3179
[0079] 1:8000	2.2618	2.349	2.7126	2.0981
1:16000	2.2987	2.4282	2.4539	1.7159
1:32000	1.9959	2.1655	2.0076	1.2761
1:64000	1.5526	1.8431	1.5963	0.7727
1:128000	1.1863	1.4302	0.9834	0.419
1:256000	0.5665	0.8494	0.5588	0.1654
1:512000	0.2958	0.4504	0.344	0.0511
[0080] 1:1024000	0.1261	0.2602	0.1912	0.0088
PBS	0.0243	0.1636	0.1456	0.1381
效价	128000	128000	64000	32000

[0081] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为128000,VLPs平均效价为48000,差值为80000。

[0082] 对比例6

[0083] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由博奥龙KX0210049和CpG-C组成,第二佐剂复合物由弗氏不完全佐剂和CpG-C组成。其他同实施例1。

[0084] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表9。

[0085] 表9

[0086]	包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.4665	2.4616	2.5835	2.5875
1:2000	2.4855	2.4417	2.6567	2.7015	
1:4000	2.4603	2.4353	2.5688	2.6133	
1:8000	2.4542	2.3333	2.6748	2.5477	
1:16000	2.2702	2.2186	2.6393	2.5182	
1:32000	2.3671	2.304	2.3095	1.9772	
1:64000	2.1326	1.9711	1.9404	1.5196	
1:128000	1.9499	1.5259	1.3588	1.0173	
1:256000	1.3334	0.8976	0.9219	0.5181	
1:512000	0.8704	0.5128	0.4457	0.251	
1:1024000	0.4331	0.2314	0.1849	0.1924	
PBS	0.2517	0.1447	0.0959	0.0474	
效价	256000	128000	128000	128000	

[0087] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为192000,VLPs平均效价为128000,差值为64000。

[0088] 对比例7

[0089] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由博奥龙KX0210049、氯化锰和CpG-C组成,第二佐剂复合物由弗氏不完全佐剂、氯化锰和CpG-C组成。其他同实施例1。

[0090] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表10。

[0091] 表10

[0092]	包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.451	2.4326	2.6281	0.1822
1:2000	2.5435	2.3912	2.7708	2.6057	
1:4000	2.5585	2.4166	2.5277	2.6753	
[0093]	1:8000	2.4223	2.4063	2.7956	2.7046
	1:16000	2.3849	2.4665	2.725	2.7149
	1:32000	2.3058	2.2713	2.6028	2.56
	1:64000	2.2106	2.2904	2.2977	2.1026
	1:128000	1.855	1.8964	1.7485	1.512
	1:256000	1.3344	1.1946	1.1763	0.9981
	1:512000	0.8267	0.8801	0.7298	0.5643
	1:1024000	0.4263	0.484	0.3548	0.2303
	PBS	0.2177	0.3732	0.2196	0.1252
	效价	256000	256000	256000	128000

[0094] 由上表可知,免疫量为50 μ g时,虽然GPCR5D-VLPs平均效价较高为256000,但VLPs的平均效价也高达192000,差值为64000。

[0095] 对比例8

[0096] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由博奥龙KX0210049、氯化锰和CpG-C组成,第二佐剂复合物由合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan、氯化锰和CpG-C组成。其他

同实施例1。

[0097] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表11。

[0098] 表11

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.6821	2.5889	2.4734
1:2000	2.8532	2.5812	2.4467	2.5242
1:4000	2.5913	2.5662	2.5197	2.4237
1:8000	2.4523	2.4563	2.3798	2.3581
1:16000	2.5375	2.5242	2.0018	1.9578
1:32000	2.1726	2.2472	1.4077	1.3945
1:64000	1.6832	1.6531	0.9713	0.9247
1:128000	1.1585	1.1754	0.6075	0.5184
1:256000	0.6601	0.644	0.3146	0.2614
1:512000	0.2421	0.2326	0.1166	0.0931
1:1024000	0.1149	0.1046	0.0467	0.0245
PBS	0.0855	0.0294	0.0144	0.0646
效价	128000	128000	64000	64000

[0100] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为128000,VLPs平均效价为64000,差值为64000。

[0101] 对比例9

[0102] 与实施例1不同的是,本例中首次免疫所用佐剂为水乳佐剂博奥龙KX0210049,第二次和第三次免疫所用佐剂为合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan。

[0103] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表12。

[0104] 表12

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.5519	2.502	2.5849
1:2000	2.3071	2.5891	2.5	2.5705
1:4000	2.4939	2.5348	2.4291	2.5636
1:8000	2.3556	2.6296	2.259	2.4653
1:16000	2.397	2.457	1.7955	2.1507
1:32000	2.2864	2.2979	1.1541	1.508
1:64000	1.9242	1.7845	0.8036	0.9605
1:128000	1.4774	1.2406	0.3886	0.589
1:256000	0.911	0.8029	0.1549	0.3398
1:512000	0.4816	0.4048	0.0439	0.1674
1:1024000	0.3148	0.2495	0.0811	0.0295
PBS	0.2276	0.2246	0.0537	0.0742
效价	128000	128000	64000	64000

[0106] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为128000,VLPs平均效价为64000,差值为64000。

[0107] 对比例10

[0108] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物和第二佐剂复合物相同,均由合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan、氯化锰和CpG-C组成。其他同实施例1。

[0109] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表13。

[0110] 表13

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
1:1000	2.5834	2.657	2.4575	2.6356
1:2000	2.658	2.5548	2.5345	2.5776
1:4000	2.5004	2.5478	2.4575	2.4685
1:8000	2.5911	2.478	2.1647	2.2689
1:16000	2.4472	2.4839	1.8317	1.9622
1:32000	1.9483	1.939	1.051	1.4099
1:64000	1.5699	1.6517	0.7917	0.9982
1:128000	0.9022	1.0376	0.4589	0.6481
1:256000	0.5153	0.6378	0.2203	0.2879
1:512000	0.2026	0.2882	0.0884	0.185
1:1024000	0.0732	0.1517	0.0968	0.0988
PBS	0.0084	0.0378	0.0869	0.04
效价	64000	128000	32000	32000

[0112] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPCR5D-VLPs平均效价为96000,VLPs平均效价为32000,差值为64000。

[0113] 对比例11

[0114] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan、氯化锰和CpG-C组成,第二佐剂复合物由弗氏不完全佐剂、氯化锰和CpG-C组成。其他均同实施例1。

[0115] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表14。

[0116] 表14

包被蛋白	GPCR5D-VLPs		VLPs	
1:1000	2.4938	2.8005	2.5406	2.564
1:2000	2.5337	2.7259	2.4847	2.535
1:4000	2.5173	2.6336	2.5406	2.5212
1:8000	2.4788	2.2928	2.5078	2.4524
1:16000	2.5254	2.0179	2.2891	2.1782
1:32000	2.2954	1.5741	1.7888	1.4483
1:64000	1.7726	1.1416	1.145	1.0015
1:128000	1.3924	0.7007	0.558	0.5906
1:256000	0.9213	0.3182	0.3225	0.2402
1:512000	0.5443	0.1681	0.1971	0.0776
1:1024000	0.3127	0.0291	0.0637	0.0659
PBS	0.2087	0.0063	0.0827	0.0197
效价	128000	64000	64000	64000

[0118] 由上表计算可得,免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为96000,VLPs平均效价为64000,差值为32000。

[0119] 对比例12

[0120] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan和CpG-C组成,第二佐剂复合物由弗氏不完全佐剂和CpG-C组成。其他均同实施例1。

[0121] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表15。

[0122] 表15

包被蛋白	GPRC5D-VLPs		VLPs	
1:1000	2.4772	2.637	2.6225	2.6926
1:2000	2.6533	2.7702	2.7148	2.654
1:4000	2.4132	2.6537	2.5165	2.423
1:8000	2.457	2.3527	2.1579	1.771
[0123] 1:16000	2.1626	2.1036	1.6062	1.1372
1:32000	1.563	1.4805	0.9131	0.5783
1:64000	1.0435	1.0358	0.6558	0.3953
1:128000	0.5593	0.6506	0.3391	0.2087
1:256000	0.2782	0.3036	0.1033	0.0354
1:512000	0.1245	0.1611	0.0612	0.0491
[0124] 1:1024000	0.0228	0.0498	0.0066	0.0124
PBS	0.0822	0.0733	0.0401	0.0453
效价	64000	64000	16000	16000

[0125] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为64000,VLPs平均效价为16000,差值为48000。

[0126] 对比例13

[0127] 与实施例1不同的是,本例的第一佐剂复合物由合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan和CpG-C组成,第二佐剂复合物由水乳佐剂博奥龙KX0210049和CpG-C组成,且CpG-C含量同实施例1。

[0128] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表16。

[0129] 表16

[0130]	包被蛋白	GPC5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.5321	2.5677	2.2613	2.245
1:2000	2.585	2.5061	2.1636	2.2984	
1:4000	2.4482	2.4752	1.8657	1.923	
1:8000	2.4036	2.4247	1.2178	1.3087	
1:16000	2.2962	2.5532	0.7041	0.751	
1:32000	1.7308	2.1893	0.294	0.3007	
1:64000	1.3284	1.4928	0.1109	0.1071	
1:128000	0.8757	0.9772	0.0044	0.0075	
1:256000	0.4316	0.5391	0.0074	0.035	
1:512000	0.23	0.2781	0.0436	0.0488	
1:1024000	0.0917	0.1159	0.0273	0.0341	
PBS	0.0466	0.0492	0.0278	0.0334	
效价	64000	64000	8000	8000	

[0131] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为64000,VLPs平均效价为8000,差值为56000。

[0132] 对比例14

[0133] 与实施例1不同的是,本例的第一次免疫仅采用合成佐剂AS03-like vaccine adjuvan,第二、三次免疫均仅采用水乳佐剂博奥龙KX0210049。

[0134] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表17。

[0135] 表17

[0136]	包被蛋白	GPC5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.6404	2.5272	2.2358	2.2899
1:2000	2.5323	2.4887	1.5767	2.1154	
1:4000	2.525	2.5114	1.017	1.4615	
1:8000	2.458	2.4145	0.5152	0.9238	
[0137]	1:16000	2.3209	2.3251	0.2762	0.5
	1:32000	1.7396	1.7825	0.062	0.1808
	1:64000	1.1595	1.2666	0.068	0.0462
	1:128000	0.6956	0.8341	0.0101	0.0458
	1:256000	0.3706	0.4238	0.0381	0.0398
	1:512000	0.1679	0.208	0.0397	0.0386
	1:1024000	0.0445	0.0775	0.0209	0.0313
	PBS	0.0021	0.0109	0.0403	0.0339
效价	64000	64000	4000	4000	

[0138] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为64000,VLPs平均效价为4000,差值为60000。

[0139] 对比例15

[0140] 与实施例1不同的是,本例中首次免疫所用佐剂为弗氏完全佐剂,第二次和第三次免疫所用佐剂为博奥龙KX0210049。

[0141] 本例中各组小鼠的抗血清效价检测结果见表18。

[0142] 表18

包被蛋白	GPC5D-VLPs		VLPs	
	1:1000	2.5992	2.5816	2.6541
1:2000	2.6686	2.5966	2.437	2.585
1:4000	2.7125	2.5601	2.4094	2.5292
1:8000	2.6137	2.5264	2.4589	2.395
1:16000	2.6442	2.413	2.2137	1.9328
[0143] 1:32000	2.3392	2.2189	1.7782	1.5429
1:64000	1.999	1.8274	1.2391	0.9058
1:128000	1.6137	1.4774	0.788	0.4949
1:256000	1.0779	0.9395	0.4258	0.23
1:512000	0.6771	0.5876	0.2422	0.1396
1:1024000	0.5504	0.4443	0.144	0.0491
PBS	0.0145	0.0015	0.0747	0.1613
效价	256000	128000	64000	32000

[0144] 由上表可知,当免疫量为50 μ g时,GPRC5D-VLPs平均效价为192000,VLPs平均效价为48000,差值为144000。

[0145] 从各实施例和对比例可知,根据本发明提供的免疫方法,只用免疫三次,且在抗原量只需要50ug每针的情况下,即可将针对目标抗原的抗血清效价从市场平均30000-50000的水平提高到200000的水平,这对后期小鼠脾脏融合后的阳性率提供了有利的保证,从而使整个项目的周期、成本大大的节约,还保证了项目的成功率。

[0146] 综上,本发明基于VLPs类型抗原的结构特异性和不同佐剂的特性,并结合免疫原理,确定了能针对性提高VLPs上嵌合的特异性抗原(即目标抗原)的免疫原性的组合免疫方式,解决了VLPs本身强免疫原性的背景干扰,有效增加了目标抗原产生的效价。

[0147] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。