

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/02



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 39/395 A61K 51/00

A61K 9/127 A61K 9/14

A61P 31/12 G01N 33/53

A23L 1/30

[21] 申请号 03104002.0

[43] 公开日 2003 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 1438245A

[22] 申请日 2003.2.1 [21] 申请号 03104002.0

[71] 申请人 郭占军

地址 252000 山东省聊城市文化路 1 号市中
医院

[72] 发明人 郭占军 赵 华 郭爱芹 杨焕云
张 慧 尹连杰

权利要求书 3 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 传染性病原体相关蛋黄抗体的制备
及应用

[57] 摘要

本发明涉及一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，包括针对于病原体免疫原的蛋黄多克隆抗体 IgY、抗独特型抗体和病原体特异性表达抗原的制备方法，另外还涉及该蛋黄抗体的用途。本发明主要以产蛋禽类尤其是鸡作为免疫反应器，用一种或多种病原体免疫原进行免疫注射，特点是多种免疫原单独或多种联合进行禽类尤其是鸡的免疫注射，其产蛋中即有针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物存在和储存。本发明具有成本低、产量高、特异性强、决定簇广并能进行集约化大规模生产的优点，尤其是能避免 HAMA 反应和异质性问题，且无毒副作用、安全性好。适用于传染病的免疫诊断、治疗和预防，尤其适用于对人类具有极大危害性传染病如艾滋病、乙型肝炎、丙

型肝炎、结核、幽门螺杆菌性胃炎、梅毒、淋病等性传播性疾病、病毒性肠炎及流感等疾病的主、被动免疫治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征在于：以产蛋禽类尤其是鸡作为免疫反应器，用一种或多种纯化的或采用基因工程技术重组的病原体特异性抗原或疫苗瘤苗或病原体特异性DNA或mRNA及其与之相应载体组成的重组体或针对于病原体特异性抗原的单克隆或多克隆抗体或病原体或上述病原体免疫原的脂质体复合物作为免疫原，分别单独进行或多种联合进行禽类尤其是鸡的多次重复免疫注射，然后再以不完全佐剂进行追加强化反应，待5-20天后禽类尤其是鸡的产蛋中即有针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体IgY或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物存在和储存。其具体步骤包括：

a)病原体免疫原或其组合物进行多次免疫注射禽类优选为鸡。在此所述的病原体免疫原是通过纯化的病原体抗原或通过灭活的病原体、通过基因工程技术重组的病原体特异性抗原或疫苗瘤苗、通过提取纯化的病原体特异性裸DNA或mRNA及其与相应载体组成的重组体、病原体特异性抗原的单克隆或多克隆抗体，另外还包括上述病原体免疫原的脂质体微粒甚至是纳米微粒；所述禽类包括鸡、鸭、鹅、鹌鹑，首选是鸡；注射部位包括肌肉、皮下、皮内、血管和生殖腔囊；注射方法包括将上述病原体免疫原单独进行注射和多种免疫原联合进行多次重复免疫注射，其中所述的多病原体免疫原联合进行免疫注射包括用不同种类和来源的病原体抗原、基因重组病原体特异性抗原或疫苗瘤苗、病原体特异性裸DNA或mRNA及其重组体中的任一种或其组合物；还包括不同种类和来源的病原体特异性单克隆或多克隆抗体中的任一种或其组合物；所述的免疫原注射量为1-2ml(免疫原量10-500 μ g/ml+等量不完全福氏佐剂，其中抗体Ab1的用量为100~2000 μ g/ml+等量不完全福氏佐剂)。所述的病原体包括病毒、衣原体、支原体、立克次氏体、细菌、螺旋体、真菌和原虫、蠕虫、线虫等人体寄生虫中的任一种或其组合；所述传染性疾病病原体包括艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、庚型肝炎、结核、幽门螺杆菌性胃炎、梅毒、淋病等性传播性疾病、病毒性肠炎、病毒性肺炎、病毒性脑炎、支原体、衣原体肺炎、斑疹伤寒、疱疹、风疹流感及寄生虫感染等疾病的病原体中的任一种或其组合。

b)上述病原体免疫原用不完全佐剂进行追加免疫反应。

c)待5-20天后禽类尤其是鸡的产蛋中即有针对于上述病原体免疫原的蛋黄抗体存在和储存。其中所述的蛋黄抗体包括针对于上述病原体抗原、病原体、重组病原体抗原或疫苗瘤苗及其脂质体或纳米微粒的蛋黄多克隆抗体IgY中的任一种或其组合物；针对于病原体特异性裸DNA或mRNA及其重组体及其脂质体或纳米微粒的病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物；针对于病原体特异性单克隆或多克隆抗体或上述蛋黄多克隆抗体IgY及其脂质体或纳米微粒的抗独特型抗体Ab2 α 和Ab2 β 中的任一种或其组合物。

2、根据权利要求1所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征还在于：上述病原体相关蛋黄抗体的提取纯化方法是采用水稀释法、反复冻融法或硫酸铵、硫酸钠、PEG或辛酸沉淀或浸提、萃取、浓缩、膜过滤的方法从上述禽类尤其是鸡蛋黄中提取纯化针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体IgY或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物，然后将该纯化的病原体相关蛋黄抗体添加相应辅料包括海藻糖而制备成药剂学上的任意剂型包括片剂、针剂、口服液和喷雾剂。其具体步骤包括：

a)取禽蛋尤其是鸡蛋去壳取黄，除去粘附于蛋黄膜上的蛋白组分，然后将蛋黄置于灭菌蒸馏

水中，反复洗涤三次，进一步除去蛋黄膜上的蛋白组分，沥干后刺破蛋黄膜，收集蛋黄。

b) 将上述收集蛋黄充分搅拌均匀后，加入蛋黄匀浆5倍体积的0.1mol/L PH7.2磷酸盐-海藻糖稀释液，制成稀释蛋黄液。在该稀释蛋黄液中海藻糖的重量百分比是5-30%。

c) 将上述稀释蛋黄液置于冰盒（-20℃）冰冻1-5小时，然后取出于室温复融并低速离心（500-1000r/min）后沥出收集上清液，然后再向沉淀物中加入2-5倍体积的0.1mol/L PH7.2磷酸盐-海藻糖稀释液，充分混匀溶解沉淀物，依上法再次冻融收集上清液，如此反复冻融3-5次，合并收集各次得到的上清液备用。

d) 向上述收集上清液中按比例加入硫酸铵、硫酸钠、PEG、硫酸葡聚糖、藻酸钠或辛酸沉淀剂中的任一种及其复合物，离心收集其沉淀物，该沉淀物中即含有针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体IgY或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物。批量制备的病原体相关蛋黄抗体，每只鸡蛋可提取57~171mg的病原体特异性蛋黄抗体，平均每只鸡蛋可提取89mg，其纯度为90-95%。

e) 将上述沉淀物用蒸馏水复溶后透析或超滤浓缩或凝胶层析，进一步分离纯化针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体IgY或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物。

f) 向上述纯化的病原体相关蛋黄抗体按比例添加相应辅料，将其制备成药剂学上的任意剂型包括片剂、针剂、口服液和喷雾剂。在此所述的辅料包括海藻糖。

3、根据权利要求1或2所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征还在于：上述病原体相关蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 的修饰处理方法是偶联或共价结合放射性核素、药物和毒素制备免疫导向药物或生物导弹；是偶联或共价结合放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶制备体内免疫诊断试剂和体外免疫诊断试剂包括免疫组化试剂和生物芯片；是向上述病原体相关蛋黄抗体IgY中添加不完全佐剂制备病原体特异性免疫治疗剂；是向上述病原体相关蛋黄抗体尤其是抗独特型抗体Ab2 β 或病原体特异性表达抗原中添加不完全佐剂及其他组分制备病原体特异性疫苗。其具体步骤包括：

a) 病原体相关蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 的酶分解或偶联活性基团预修饰处理，其中酶分解是利用胃蛋白酶或无花果蛋白酶将蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 分解，再用二巯基苏糖醇或 β -巯基乙醇还原为Fab'小片断，以使其具有更好的组织穿透力；或用相应的活化试剂将蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 及其Fab'小片断上的氨基或羧基或巯基或醛基活化，然后再同各种不同的药物分子偶联。

b) 偶联药物的预修饰处理包括将放射性核素、药物和毒素分子用相应的活化试剂，分别把含有羟基、氨基、醛基、胍基、巯基等基团的偶联药物活化，然后再使其与病原体相关蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 及其Fab'小片断发生共价结合。

c) 病原体相关蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 及其Fab'小片断与已活化处理的偶联药物包括将放射性核素、药物和毒素分子共价结合而制备病原体特异性免疫导向药物或生物导弹。

d) 将病原体相关蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 进行放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶标记而制备其相应的标记物。

e) 将病原体相关蛋黄抗体IgY或抗独特型抗体Ab2 α 的放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶标记物中的任一种配合其他组分制备体内免疫诊断试剂和体外免疫诊断试剂（包括免疫组化试剂和生物芯片）。

f) 向上述病原体相关蛋黄抗体IgY中添加不完全佐剂及其他组分，然后再进行免疫注射，免

疫机体产生针对于病原体相关蛋黄抗体 IgY 的抗独特型抗体 Ab2 β ，从而诱导机体产生抗病原体的特异性免疫应答。

g) 向上述抗独特型抗体 Ab2 β 、病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物中添加不完全佐剂及其他组分制备病原体特异性疫苗（包括抗独特型抗体疫苗和多肽疫苗）。

h) 向禽类尤其是鸡注射病原体特异性单克隆或多克隆抗体尤其是注射病原体相关蛋黄抗体中的 IgY 抗体，制备所述的抗独特型抗体 Ab2 β 疫苗。

4、根据权利要求 1-3 所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征还在于：将上述蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 制备成脂质体微粒甚至是纳米微粒然后再偶联上述细胞毒性物质而制备免疫导向药物的方法；将上述抗独特型抗体 Ab2 β 或病原体特异性表达抗原制备成脂质体微粒甚至是纳米微粒的病原体特异性疫苗的方法。

5、根据权利要求 1-4 所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征还在于：将上述蛋黄抗体中的具有相同或相近作用的两种或两种以上组分同其他辅料按一定配比混合成组合物，使相应病原体相关蛋黄抗体组分针对于病原体发挥协同作用。

6、一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途，其特征是：上述蛋黄抗体中的任一种或任意组合的任意剂型单独或联合用于传染病的诊断、治疗和预防。

7、根据权利要求 6 所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途，其特征还在于：上述病原体相关蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其荧光、发光、酶、金属标记物中的任一种用于配制体外用免疫诊断试剂；上述病原体相关蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其脂质体甚至纳米微粒的放射性核素标记物用于配制体内免疫导向诊断试剂。上述所述的免疫诊断试剂包括免疫组化试剂和生物芯片。

8、根据权利要求 6 所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途，其特征还在于：上述病原体相关蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其脂质体甚至纳米微粒用于制备治疗性免疫制剂；上述病原体相关蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其脂质体甚至纳米微粒与放射性核素、药物和毒素的偶联物用于制备免疫导向药物或生物导弹。

9、根据权利要求 6 所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途，其特征还在于：上述病原体相关蛋黄抗体中的 IgY 抗体用于制备传染病免疫治疗剂；上述病原体相关蛋黄抗体中的病原体特异性表达抗原用于制备病原体多肽疫苗；上述病原体相关蛋黄抗体中的抗独特型抗体 Ab2 β 用于制备病原体抗独特型抗体疫苗。

10、根据权利要求 6 所述的一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途，其特征还在于：上述病原体相关蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY、病原体特异性表达抗原、抗独特型抗体 Ab2 α 、Ab2 β 的任一种或其组合物用于制备预防传染病的食品、饮料和保健品。

传染性病原体相关蛋黄抗体的制备及应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，特别是涉及传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，另外还涉及该蛋黄抗体的用途。

背景技术

特异性抗体的制备对传染性疾病的诊断、治疗和预防具有非常重要的意义，因而受到国内外生物医学界的广泛关注，已开展了大量的工作并取得了较大的进展。在现有技术中多采用单克隆抗体应用于传染性疾病的诊断和生物治疗，其中单克隆抗体的制备方法一般包括获取传染性病原体相关抗原、免疫小鼠和融合杂交瘤三个步骤，亦即 a 首先利用生化和免疫化学的方法获取携带有传染性病原体相关信息的病原体相关抗原，b 然后将该病原体相关抗原多次重复注射入小鼠体内，待小鼠发生特异性免疫反应一定时间后，取出其脾脏并分离出带有病原体相关抗原信息的致敏淋巴细胞，再将该致敏淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，再筛选出针对于病原体相关抗原的阳性杂交瘤细胞进行体外扩增或接种于小鼠腹腔内，即可从培养上清液或小鼠腹水中获得所需的单克隆抗体。

上述单克隆抗体(简称单抗)或多单克隆抗体(简称多抗)作为传染性疾病的诊断剂或检测剂，近年来已在医学和生物学领域得到广泛应用。该类方法的原理是基于单抗或多抗对相应传染性病原体相关抗原的高特异性识别能力而设计的，结合以相应的标记物(酶标、金标、硒标、荧光、发光和放射性标记等)而显示传染性病原体相关抗原的存在与否及其量的多少。

单抗作为治疗剂的研究也于近年获得重要进展。单抗药物(monoclonal antibody agents)可应用于治疗肿瘤、病毒性感染、心血管病以及其它疾患，尤其是用于传染性疾病的治疗，已显示出良好的前景。

抗体药物一般包括两类，一是抗病原体单抗或多抗；二是抗病原体单抗或多抗偶联物，或称免疫偶联物(immunoconjugate)。免疫偶联物分子由单抗或多抗与“弹头”药物两部分构成，故称为导向药物，又称为生物导弹或“魔弹”(magic bullets)，与之相对应的治疗方法称为导向治疗。单抗或多抗所针对的靶标通常为病原体表面的相关抗原或特定的受体。用作“弹头”的物质主要有三类，即放射性核素、药物和毒素，其与单抗或多抗连接分别构成放射免疫偶联物、化学免疫偶联物和免疫毒素。自 80 年代以来对抗病原体尤其是抗肿瘤单抗药物进行了大量研究，特别是自 1997 年以来，Rituxan、Herceptin 在美国相继获批准用于临床肿瘤治疗，单抗药物的研究与开发有了新的发展势头，成为生物技术药物的新热点(甄永苏，单克隆抗体药物治疗肿瘤的研究现状与展望，中国医学科学院学报，2000, 22: 9-12)。

尽管单抗药物的临床研究结果已为其应用于治疗肿瘤展示出良好的前景，但仍有许多问题需要进一步研究解决(Nguyen DT, Amess JA, Doughty H, et al. IDEC-C2B8 anti-CD20 (rituximab) immunotherapy in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma and lymphoproliferative disorders: evaluation of response on 48 patients. Eur J Haematol, 1999, 62: 76-82)。单抗药物存在的问题主要涉及免疫学和药理学两方面。免疫学方面的问题关键是人抗鼠 Ig 抗体(HAMA)反应，因为多年来用于临床研究的单抗药物多数使用小鼠单抗制备，往往导致 HAMA 反应。此外，病原体在抗原性方面的异质性，病原体的抗原性调变等也能影响单抗药物的疗效。药理学方面的问题主要是到达病原体

的药量不足。单抗药物在体内运送过程中受多种因素影响。由于它是异体蛋白，会被网状内皮系统摄取，有相当数量将积聚于肝、脾和骨髓；再者就是机体对该异体蛋白产生抗体而降低其效力。单抗药物是大分子物质，通过毛细血管内皮层以及穿透病原体均受到限制。（甄永苏，单克隆抗体药物治疗肿瘤的研究现状与展望，中国医学科学院学报，2000, 22: 9-12）。

传染性疾病预防治疗是利用病原体抗原进行主动免疫来激发、增强机体对病原体的主动特异性免疫反应。目前所研究的病原体疫苗主要是基因工程疫苗、肽疫苗、核酸疫苗、抗独特型抗体疫苗。其中 a 病原体基因工程疫苗是通过基因重组技术，将目的基因导入受体细胞而制备的疫苗。b 肽疫苗是基于在免疫反应中抗原在胞浆内降解为短肽，最后形成肽-MHC-TCR 复合体最终激发细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应。c 核酸疫苗是由编码能引起保护性免疫反应的抗原基因片段和载体构建而成的，包括 DNA 疫苗和 RNA 疫苗，目前研究较多的为 DNA 疫苗。核酸疫苗能够同时刺激机体产生体液免疫和细胞免疫，诱导许多亚单位疫苗不能诱导的 CTL 效应。d 抗独特型抗体疫苗(Ab2 疫苗)是根据抗独特型抗体具有模拟抗原及免疫调节的双重作用，同时能克服机体免疫抑制，打破免疫耐受故能代替病原体抗原诱发特异性主动免疫反应（Bhattacharya CM, Mukerjee S, Biddle W, et al. Murine monoclonal anti-idiotypic antibody as a potential network antigen for human carcinoembryonic antigen. *J Immunol*, 1990, 145: 2758.）。

在上述病原体疫苗免疫治疗方法中，由于病原体抗原的抗原性强弱不同，且病原体宿主经常处于免疫抑制状态，难以激发有效的抗病原体反应。尽管抗独特型抗体的研究已取得许多进展，但事物总是两方面的。Ab2 疫苗应用存在许多困难，因为 Ab2 β 虽能模拟小分子多肽抗原，却难以精确反映大分子蛋白质抗原的决定簇，尤其是 Ab2 β 单抗。再者由于病原体抗原极其复杂，常发生调变等，制备广谱的病原体特异性独特型疫苗难度很大。更重要的是目前使用的 Ab2 β 主要来自鼠杂交瘤细胞，为异种蛋白，能激发人免疫系统产生人抗鼠 Ig 抗体（HAMA），发生中和反应并产生毒性免疫复合物，而降低疗效，严重时可引起血清病反应。

鉴于以上技术方案所存在的诸多问题，为了避免或减少 HAMA 反应，现通常是使鼠源性单抗人源化或研制完全的人源抗体。单抗人源化主要是通过基因工程技术制备嵌合抗体(chimeric antibody)或改形抗体(reshaping antibody)。嵌合抗体是将 Fc 段置换为人源性，其它部分仍为鼠源性。改形抗体是指除互补决定区(CDR)为鼠源性外，其它部分均为人性。使偶联物分子小型化，以提高药物对病原体的渗透力，研制高效单抗药物。局部注射以提高单抗药物在病原体部位的浓度。多种抗体混合应用以弥补单抗的异质性问题。其中鼠源性单抗人源化和研制完全的人源抗体具有较高的技术难度，难于普及应用。

禽类尤其是鸡在系统发育上与哺乳动物有很大差异，鸡的免疫球蛋白与哺乳动物免疫球蛋白在免疫学特性上也有很大不同。鸡的免疫系统能识别更多的免疫反应位点和更多的抗原决定簇，因此鸡免疫系统对哺乳动物的蛋白或生物分子能产生具有更高效价和亲和力的特异性抗体。鸡免疫系统针对于外源性蛋白所产生的 IgY 不仅具有更高的免疫特异性，更重要的是这种特异性 IgY 主要储存在鸡蛋黄中，因此可利用下蛋母鸡作为免疫反应器来大量生产具有重要临床应用价值的抗体药物。

众所周知鸡蛋作为人类的常用食品和化妆品原料，无论内服和外用均对人体无任何生物毒性和不良作用。因此，利用禽类作为免疫反应器来大量生产抗体药物，并应用于传染性疾病的诊断和免疫治疗，将具有极广阔的应用前景。以传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 为原料制备的免疫药物和抗独特型抗体疫苗(Ab2 疫苗)可以很好地解决上述单抗偶联物或上述病原体疫苗所存在的 HAMA 反应和异质性问题。

发明目的

本发明的目的在于克服上述缺点与不足，提供一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，包括针对于病原体的蛋黄多克隆抗体 IgY、抗独特型抗体和病原体特异性表达抗原的制备方法，尤其

是针对与多重病原体的蛋黄多克隆抗体 IgY、抗独特型抗体和病原体特异性表达抗原中的多重组合物的制备方法，另外还涉及该蛋黄抗体的用途即采用该蛋黄抗体制备相关药物、食品或保健品。

技术方案

本发明的技术方案是这样实现的：一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法是利用禽类作为免疫反应器，通过将病原体特异性免疫原（包括病原体、纯化或重组抗原或疫苗瘤苗、病原体特异性 DNA 或 mRNA 及其与相应载体组成的重组体、针对于病原体特异性抗原的单克隆或多克隆抗体）或其组合物单独或联合注射给产蛋禽类尤其是鸡，使其产生针对于病原体特异性免疫原的蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体（包括 Ab2 α 和 Ab2 β ）或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物而被大量地输送到蛋黄中储存，然后无创性的利用蛋黄提纯所需要的病原体抗体（包括病原体特异性蛋黄抗体 IgY、病原体特异性表达抗原和抗独特型抗体 Ab2 α 和 Ab2 β 中的任一种或其组合物）。利用该蛋黄抗体中的 IgY 抗体为主要原料可制备成针对于病原体特异性抗原的免疫诊断药剂和免疫治疗药剂，包括病原体体外诊断试剂、体内导向诊断试剂和特异性蛋黄抗体免疫治疗剂以及特异性蛋黄抗体偶联药物或毒素的导向药物即生物导弹；利用该蛋黄抗体中的病原体特异性表达抗原可制备成针对于病原体的免疫诊断药剂和免疫治疗药剂，包括传染性病原体体外诊断试剂和病原体特异性疫苗瘤苗；利用该蛋黄抗体中的抗独特型抗体 Ab2 α 和 Ab2 β 为主要原料可制备成针对于传染性病原体病原体的免疫诊断药剂和免疫治疗药剂，包括传染性病原体体外诊断试剂、体内导向诊断试剂（主要采用 Ab2 α ）和抗独特型抗体 Ab2 α 偶联药物或毒素的导向药物即抗独特型生物导弹和抗独特型抗体疫苗（主要采用 Ab2 β ）；用于传染性疾病的诊断、免疫治疗和导向治疗。另外该蛋黄抗体还可作为添加剂添加于食品、饮料及保健品中，用于传染性疾病的预防及早期预防性治疗。

由于采用本发明方法制备传染性病原体相关蛋黄抗体，利用鸡免疫系统对异源性蛋白或生物分子能产生具有更高效价和亲和力的特异性抗体，可诱导高滴度的特异性抗病原体抗原的抗体，且具有成本低、产量高、特异性强、决定簇广并能进行集约化大规模生产的优点，可实现针对与多重病原体的蛋黄多克隆抗体 IgY、抗独特型抗体和病原体特异性表达抗原中的多重组合物的一次性制备，更重要的是该蛋黄抗体能够很好地解决上述鼠源性单抗偶联物或病原体疫苗所存在的 HAMA 反应和异质性问题，且对人体无毒副作用，具有较好的安全性。另外，本发明所制备的传染性病原体相关蛋黄抗体或其组合物可用作传染性病原体相关诊断试剂的原料，尤其是传染性病原体相关生物芯片的原料；再者就是本发明所制备的传染性病原体相关蛋黄抗体或其组合物能够在被动免疫和主动免疫两方面共同发挥其免疫调节和治疗作用。本发明适用于传染性疾病的免疫诊断、免疫治疗和预防，尤其适用于对人类具有极大危害性传染病如艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、庚型肝炎、结核、幽门螺杆菌性胃炎、梅毒、淋病等性传播性疾病、病毒性肠炎、病毒性肺炎、病毒性脑炎、支原体、衣原体肺炎、斑疹伤寒、疱疹、风疹流感及寄生虫感染等疾病的被动免疫和主动免疫治疗，将具有极其广阔的应用前景。

为了进一步公开本发明，下就对本发明进行更进一步的详细描述。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征在于：以产蛋禽类尤其是鸡作为免疫反应器，用一种或多种纯化或灭活的病原体抗原或通过基因工程技术重组的病原体特异性抗原或疫苗瘤苗或病原体特异性 DNA 或 mRNA 及其与相应载体组成的重组体或针对于病原体特异性抗原的单克隆或多克隆抗体或其脂质体复合物作为免疫原，分别单独进行或多种联合进行禽类尤其是鸡的多次重复免疫注射，然后再以不完全佐剂进行追加强化反应，待 5-20 天后禽类尤其是鸡的产蛋中即有针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物存在和储存。其具体步骤包括：

a)病原体免疫原或其组合物进行多次免疫注射禽类优选为鸡。在此所述的病原体免疫原是采用纯化的病原体抗原或通过灭活的病原体、通过基因工程技术重组的病原体特异性抗原或疫苗瘤苗、

通过提取纯化的病原体特异性裸 DNA 或 mRNA 及其与相应载体组成的重组体、病原体特异性抗原的单克隆或多克隆抗体, 另外还包括上述病原体免疫原的脂质体微粒甚至是纳米微粒的免疫注射, 借助于脂质体对组织和细胞的亲和性以强化免疫效果; 所述禽类包括鸡、鸭、鹅、鹌鹑, 首选是鸡; 注射部位包括肌肉、皮下、皮内、血管和生殖腔囊; 注射方法包括将上述病原体免疫原单独进行注射和多种病原体免疫原联合进行多次重复免疫注射, 其中所述的多种病原体免疫原联合进行免疫注射包括用不同种类和来源的病原体抗原、基因重组病原体特异性抗原或疫苗瘤苗、病原体特异性裸 DNA 或 mRNA 及其重组体中的任一种或其组合物; 还包括不同种类和来源的病原体特异性单克隆或多克隆抗体中的任一种或其组合物; 所述的免疫原注射量为 1-2ml (免疫原量 10-500 μ g/ml+等量不完全福氏佐剂, 其中抗体 Ab1 的用量为 100~2000 μ g/ml+等量不完全福氏佐剂); 所述的病原体包括病毒、衣原体、支原体、立克次氏体、细菌、螺旋体、真菌和原虫、蠕虫、线虫等人体寄生虫中的任一种或其组合; 所述传染性病原体包括艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、庚型肝炎、结核、幽门螺杆菌性胃炎、梅毒、淋病等性传播性疾病、病毒性肠炎、病毒性肺炎、病毒性脑炎、支原体、衣原体肺炎、斑疹伤寒、疱疹、风疹流感及寄生虫感染等疾病的病原体中的任一种或其组合。

b) 上述病原体免疫原用不完全佐剂进行追加免疫反应。

c) 待 5-20 天后禽类尤其是鸡的产蛋中即有针对于上述病原体免疫原的蛋黄抗体存在和储存。其中所述的蛋黄抗体包括针对于上述病原体抗原、病原体、重组病原体抗原或疫苗瘤苗或其脂质体或纳米微粒的蛋黄多克隆抗体 IgY 中的任一种或其组合物; 针对于病原体特异性裸 DNA 或 mRNA 及其重组体或其脂质体或纳米微粒的病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物; 针对于病原体特异性单克隆或多克隆抗体或上述蛋黄多克隆抗体 IgY 或其脂质体或纳米微粒的抗独特型抗体 Ab2 α 和 Ab2 β 中的任一种或其组合物。

本发明用上述病原体免疫原注射免疫产蛋禽类尤其是鸡, 并以所产蛋黄作为针对于上述病原体免疫原的抗病原体抗体的来源, 该方法具有很多优点如禽类尤其是鸡易于饲养, 费用不高, 收集产蛋方便, 无需抽动物血, 无损伤, 符合现代动物保护规则; 另外还具有产生有效免疫反应所需抗原量小的优点, 高度保守的异源性蛋白质对种系发生学上距离较远的禽类尤其是鸡通常有较强的免疫原性。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法, 其特征还在于: 该蛋黄抗体的提取纯化方法是采用水稀释法、反复冻融法或硫酸铵、硫酸钠、PEG、硫酸葡聚糖、藻酸钠或辛酸沉淀或浸提、萃取、浓缩、膜过滤的方法从上述禽类蛋黄尤其是鸡蛋黄中提取纯化针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物, 然后将该纯化的蛋黄抗体添加相应辅料包括海藻糖而制备成药剂学上的任意剂型包括片剂、针剂、口服液和喷雾剂。其具体步骤包括:

a) 取禽蛋尤其是鸡蛋去壳取黄, 除去粘附于蛋黄膜上的蛋白组分, 然后将蛋黄置于灭菌蒸馏水中, 反复洗涤三次, 进一步除去蛋黄膜上的蛋白组分, 沥干后刺破蛋黄膜, 收集蛋黄。

b) 将上述收集蛋黄充分搅拌均匀后, 加入蛋黄匀浆 5 倍体积的 0.1mol/L PH7.2 磷酸盐-海藻糖稀释液, 制成稀释蛋黄液。在该稀释蛋黄液中海藻糖的重量百分比是 5-30%。

c) 将上述稀释蛋黄液置于冰盒 (-20 $^{\circ}$ C) 冰冻 1-5 小时, 然后取出于室温复融并低速离心 (500-1000r/min) 后沥出收集上清液, 然后再向沉淀物中加入 2-5 倍体积的 0.1mol/L PH7.2 磷酸盐-海藻糖稀释液, 充分混匀溶解沉淀物, 依上法再次冻融收集上清液, 如此反复冻融 3-5 次, 合并收集各次得到的上清液备用。

d) 向上述收集上清液中按比例加入硫酸铵、硫酸钠、PEG、硫酸葡聚糖、藻酸钠或辛酸沉淀

剂中的任一种或其复合物,离心收集其沉淀物,该沉淀物中即含有针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物。批量制备的病原体相关蛋黄抗体,每只鸡蛋可提取 57~171mg 的病原体特异性蛋黄抗体,平均每只鸡蛋可提取 89mg,其纯度为 95%。

e)将上述沉淀物用蒸馏水复溶后透析或超滤浓缩或凝胶层析,进一步分离纯化针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物。

f)向上述纯化的蛋黄抗体按比例添加相应辅料,将其制备成药剂学上的任意剂型包括片剂、针剂、口服液和喷雾剂。在此所述的辅料包括海藻糖。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法,其特征还在于:该蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 的修饰处理方法是采用偶联或共价结合放射性核素、药物和毒素及其他细胞毒性物质的方法制备免疫导向药物或生物导弹;是采用偶联或共价结合放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶的方法制备体内免疫诊断药剂和体外免疫诊断试剂包括免疫组化试剂和生物芯片;是采用向上述蛋黄抗体尤其是抗独特型抗体 Ab2 β 或病原体特异性表达抗原中添加不完全佐剂或其他组分的方法制备病原体特异性疫苗(包括抗独特型抗体疫苗和多肽疫苗)。

导弹的主要部件一是能追踪目标的导航系统,二是摧毁特定目标的炸弹。应用这一原理制备出一种能追踪病原体而又能专一性地杀伤病原体的“武器”,即生物导弹,它的基本部件是能特异性识别病原体抗原目标的抗体以及在抗体的末端接上杀伤病原体的毒性药物。这样从理论上讲,只要能研制出可识别病原体的抗体,并使它带上毒性药物就可大功告成。但事实上并不那么简单,首先是抗体问题,早期人们是用纯度及特异性相对较高的病原体抗原免疫小鼠后的完整抗体(即由识别抗原簇的 Fab 片段和 Fc 片段所组成的免疫球蛋白),使它的“尾端”(Fc 片段)携带上放射性核素碘(¹²⁵I);1975 年杂交瘤技术的建立及单克隆抗体的问世,使单抗与放射性核素的结合,推动了导向治疗的进展。然而,经过一段时间的实验,单抗与多抗在体内治疗的结果,并没有明显的差别,其主要原因是:①单抗和多抗都是完整抗体,它们一旦进入机体,就会被正常组织交叉吸附,不能相对集中地到达靶标;而且不容易清除和排出体外;②由于完整抗体的分子量大,不易通过机体的生理屏障(如结缔组织等)进入病原体中心部位;③由于完整的抗体都来源于小鼠,对人体来说是一种异源性蛋白,所以可在体内产生抗抗体而被中和。由于存在以上问题,因此使完整抗体用于导向治疗受到限制。

根据以上存在的问题,近几年来研究人员已设法研究制备出应用小分子量的抗体片段,而且设法用人-人杂交瘤来制备人-人单克隆抗体,目前又用基因工程的方法来制备出基因工程抗体,这是一种不含 Fc 片段的 Fab 小分子多肽,并建立了双功能抗体技术。后者有特异性识别的双臂(即把两个 Fab 片段结合在一起),因此有双重识别能力,即既可以与病原体结合,又可与药物弹头相连接。由于基因工程抗体不含 Fc 片段,因此减少了非特异吸附,并可将鼠源性成分减少到最低限度;小分子的基因工程产物,有利于杀伤物质进入病原体内部且不易被宿主识别为异物而产生抗抗体;这种双功能抗体,使弹头直接命中病原体,若将双功能抗体与 LAK, TIL 细胞联合应用,则可获得更大的效应,从而有效地控制疾病的发展。但该类方法均有较高的技术难度,难于推广。

本发明就是为了克服以上问题而利用传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 的修饰处理即采用其偶联或共价结合放射性核素、药物和毒素及其他细胞毒性物质的方法制备免疫导向药物或生物导弹。其具体步骤包括:

a)传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 的酶分解或偶联活性基团预修饰处理,其中酶分解是利用胃蛋白酶或无花果蛋白酶将传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 分解,再用二巯基苏糖醇或 β -巯基乙醇还原为 Fab' 小片断,以使其具有更好的组织穿透力;或用不同的活化试剂将传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其 Fab' 小片断上

的氨基或羧基或巯基或醛基活化，如用 1-乙基-3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 将其变成活泼酯，然后再同各种不同的药物分子偶联。

b) 偶联药物的预修饰处理包括将放射性核素、药物和毒素分子用不同的活化试剂活化，如用 1-乙基-3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 将其变成活泼酯，如此采用类似公知共用的方法，可以分别把含有羟基、氨基、醛基、胍基、巯基等基团的偶联药物活化，以使其能够与传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其 Fab' 小片断发生共价结合。

c) 传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其 Fab' 小片断与已活化处理的偶联药物包括将放射性核素、药物和毒素分子共价结合而成为传染性疾病特异性免疫导向药物或生物导弹。

本发明是采用传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 的修饰处理即采用偶联或共价结合放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶的方法制备体内免疫诊断药剂和体外免疫诊断试剂包括免疫组化试剂和生物芯片。其具体步骤包括：

a) 将传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 采用公知共用的方法进行放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶标记而制备其相应的标记物。

b) 将传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 的放射性核素、发光物质、胶体金或胶体硒或酶标记物中的任一种配合其他组分制备体内免疫诊断药剂和体外免疫诊断试剂(包括免疫组化试剂和生物芯片)。

本发明是采用传染性病原体相关蛋黄抗体中的蛋黄抗体 IgY 制备病原体特异性免疫治疗剂。其具体步骤包括：向上述中蛋黄抗体 IgY 添加不完全佐剂及其他组分，然后再进行免疫注射，免疫机体产生针对于传染性病原体相关蛋黄抗体 IgY 的抗独特型抗体 Ab2 β ，从而诱导机体产生抗病原体的特异性免疫应答。

本发明是采用传染性病原体相关蛋黄抗体中的抗独特型抗体 Ab2 β 或病原体特异性表达抗原制备特异性病原体疫苗。其具体步骤包括：向上述抗独特型抗体 Ab2 β 、病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合中添加不完全佐剂及其他组分制备特异性病原体疫苗。在此所述的抗独特型抗体 Ab2 β 疫苗是采用向禽类尤其是鸡注射病原体特异性单克隆或多克隆抗体尤其是注射蛋黄抗体中的传染性病原体相关抗体 IgY 而制备的。

针对外来抗原的抗体分子(Ab1)可变区上独特型 (Id) 可刺激机体产生相应的抗 Id 抗体(Ab2)。其中 Ab2 β 具有与外来抗原相似的氨基酸排列顺序或空间构型，它能够在体内模拟始动抗原的作用，故被认为是外部抗原在机体免疫系统中的“内影像”(internal image)。应用 Ab2 β 的这一特性，可有目的地制备 Ab2 β ，将其作为抗原的替代物用于诱导机体产生抗病原体的特异性免疫应答，即所谓抗独特型疫苗(anti-idiotypic vaccine)。它是用抗 Id 型抗体 (Ab2) 代替抗原作为免疫原，故该类疫苗特别适用于目前还不能培养或培养很困难而产量又很低的病原体；直接用病原体制苗有危险的病原体；以及免疫原性低且不能用重组 DNA 技术生产的病原体多糖类抗原。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法，其特征还在于：将上述蛋黄抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 制备成脂质体微粒甚至是纳米微粒然后再偶联上述细胞毒性物质成免疫导向药物的方法，以增加其对病灶的亲性和渗透性；将上述抗独特型抗体 Ab2 β 或病原体特异性表达抗原制备成脂质体微粒甚至是纳米微粒的特异性病原体疫苗的方法。

脂质体技术是被喻为“生物导弹”的第四代靶向给药技术，脂质体属于纳米级药物载体，该技术利用脂质体的独有特性，将毒副作用大、在血液中稳定性差、降解快的药物包裹在脂质体内，根

据人体病灶部位血管内皮细胞间隙较大,脂质体药物可透过此间隙到达病灶部位,在病灶部堆积释放,从而达到定向给药。脂质体主要辅料为磷脂,而磷脂在血液中消除极为缓慢,因此脂质体药物在血循环系统保留时间长,使病灶部位得到充分治疗的效果。利用该技术可将一大批已知高毒性活性药物安全有效地应用于临床治疗,其中有抗癌药、抗生素类药、抗真菌类药、抗寄生虫类药、蛋白质或多肽类药物,极大地提高了临床治疗水平,减轻了患者的病痛。同时可将单克隆抗体连接到脂质体上,借助于抗原与抗体的特异反应,将载药脂质体定向送入。本发明就是利用上述传染性病原体相关蛋黄抗体包括蛋黄抗体 IgY、抗独特型抗体 Ab2 α 、抗独特型抗体 Ab2 β 和病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物所制备的脂质体微粒甚至是纳米微粒,能够有效到达靶区,共同发挥其主动和被动免疫治疗作用和对不同病原体共同发挥免疫治疗作用。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的制备方法,其特征还在于:将上述蛋黄抗体中的具有相同或相近作用的两种或两种以上组分同其他辅料按一定配比混合成组合物,使相应蛋黄抗体组分针对于病原体发挥协同作用。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途,其特征还在于:上述蛋黄抗体中的任一种或任意组合的任意剂型单独或联合用于传染病的诊断、治疗和预防。

人体对传染病有一定的免疫力,但不同的人,免疫力有强有弱。免疫治疗是设法调动人体内各种积极防御因素,提高机体的免疫力,以消除药物治疗后残余的病原体,以防止疾病的复发和恶化。传染病的免疫治疗概括起来可分为特异性免疫治疗和非特异性免疫治疗两大类。免疫治疗是一种扶正措施,副作用少,所以易受病人欢迎。传染病的被动免疫治疗是指给机体输注外源的免疫效应物质,由这些外源性效应物质在机体内发挥治疗作用。目前主要有以下两大类:

a)抗病原体导向治疗即利用高度特异性的单克隆抗体为载体,将细胞毒性的杀伤分子带到病灶处,可特异地杀伤病原体。目前根据所用的杀伤分子的性质不同,将传染病的导向治疗分为:①放射免疫治疗,将高能放射性核素与单克隆抗体连接,可将放射性核素带至病灶杀死病原体;②抗体导向化学疗法,抗病原体药物与单抗通过化学交联组成的免疫偶联物,可以将药物导向病灶,杀伤病原体,常用的有氨甲蝶呤(MTX)、阿霉素等;③免疫毒素疗法(immunotoxin therapy),将毒素与单克隆抗体相连,制备的免疫毒素对病原体有特异性的强杀伤活性。常用的毒素有两类:一类是植物毒素,包括蓖麻籽毒素(RT)、相思子毒素(abrin)、苦瓜毒素(MD)、氧化苦参碱(OXY)等。另一类是细胞毒素,包括白喉毒素(DT)、绿脓杆菌外毒素(PE)。但目前所用的单克隆抗体多为鼠源单克隆抗体,应用于人体后会产生抗鼠源单克隆抗体的抗体,使其不能反复应用影响了其疗效。用基因工程的方法,使鼠源抗体人源化可减少这个问题,但技术难度较高,广泛推广受限。

b)过继免疫疗法(adoptive immunotherapy)是取对病原体有免疫力的供者淋巴细胞转输给患者,或取患者自身的免疫细胞在体外活化、增殖后,再转输入患者体内,使其在患者体内发挥抗病原体作用。过继免疫疗法的效应细胞具有异质性,如CTL、NK细胞、巨噬细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)和浸润性淋巴细胞(TIL)等都在杀伤病原体中起作用。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途,其特征还在于:上述蛋黄抗体中的多克隆抗癌抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其荧光、发光、酶、金属标记物中的任一种用于配制体外用免疫诊断试剂;上述蛋黄抗体中的多克隆抗癌抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其脂质体甚至纳米微粒的放射性核素标记物用于配制体内免疫导向诊断试剂。上述所述的免疫诊断试剂包括免疫组化试剂和生物芯片。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途,其特征还在于:上述蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其脂质体甚至纳米微粒用于制备治疗性免疫制剂;上述蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体 Ab2 α 及其脂质体甚至纳米微粒与放射性核素、药物和毒素的偶联物用于制备免疫导向药物或生物导弹。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途,其特征还在于:上述蛋黄抗体中的病原体特异性表达抗原用于制备多肽疫苗;上述蛋黄抗体中的抗独特型抗体 Ab₂β 用于制备抗独特型抗体疫苗。

特异性主动免疫治疗是通过激活特定的免疫系统,达到消灭病原体的目的,这种治疗并不影响周围正常组织。从理论上讲,由疫苗介导的特异性免疫治疗,能够激活特定的淋巴细胞(B细胞和(或)T细胞)反应,产生即刻的抗病原体作用,并对将来的病原体产生记忆反应。最初,利用病原体制备疫苗;后来,病原体抗原成为制备疫苗的材料。随着分子生物学方法的进展,利用可表达抗原的基因修饰病原体抗原来增强免疫原性或利用修饰基因以分泌细胞因子等技术用于疫苗制备。同时,也可利用提纯的病原体相关抗原、DNA 编码蛋白抗原和(或)蛋白衍生肽制备疫苗。疫苗接种的最终目的是激活免疫系统的某一部分,如抗体或淋巴细胞,来杀灭病原体。目前,特异性主动免疫治疗有很多方法,如完整病原体与卡介苗等佐剂的混合物;用遗传学方法改变病原体。另外,亦可用肽、黏蛋白和碳水化合物等单个抗原制备疫苗。许多重组疫苗可表达各种抗原如乙肝表面抗原。利用重组疫苗,其他基因(例如编码协同刺激因子分子的基因),亦可以病原体相关基因转导。针对特异性抗体还可采用抗独特型抗体,因为病原体抗原的抗原性不同,且病原体宿主经常处于免疫抑制状态,难以激发有效的抗病原体反应。80年代以来,许多学者通过动物实验证明用抗原内影像型 Ab₂(又称抗独特型疫苗)能够克服免疫抑制,诱导机体产生特异性免疫应答。免疫网络理论认为,抗体(Ab₁)分子上存在的独特型(Id)抗原决定簇可以刺激机体产生 A-Id 抗体(Ab₂)及 Ab₃ 等一系列抗体的产生,从而构成一个复杂的免疫网络。根据抗独特型抗体与抗体独特位反应的特点和抗独特型抗体的功能,可将 A-Id 分为 Ab₂α、Ab₂β、Ab₂γ、Ab₂δ。其中 Ab₂β 可识别 Ab₁ 上与抗原互补的决定簇,能完全抑制抗原与 Id 的结合。它具有类似抗原的结构,可以“模拟”抗原,产生与抗原相同的生物学效应,被认为是外部抗原在机体免疫系统中的“内影像”(internal image)。Ab₂β 具有下列特点:a)能特异性与不同种属个体产生的抗体(Ab₁)反应;b)能特异性与不同类抗体(Ab₁)反应;c)Ab₂β 与抗原能竞争性地结合 Ab₁,二者之间存在竞争性抑制作用;d)能诱导不同种属个体产生特异性免疫应答。

具有内影像特点的抗独特型抗体能模拟病原体相关抗原诱导机体产生主动免疫应答,其应答过程极其复杂,但主要涉及体液免疫和细胞免疫两方面。Ab₂β 作为胸腺依赖抗原(TD)激活辅助 T 淋巴细胞亚群(Th₁和Th₂),分泌一系列细胞因子,如 Th₁细胞产生 INF-γ、IL-10、TNF 和 IL-2; Th₂细胞产生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等。Th₂细胞产生的细胞因子影响和促进 B 淋巴细胞分化和增殖,产生特异性抗体 Ab₃, Ab₃ 一部分能与 Ab₁ 互相模拟,即具有与抗原结合性,称之为抗病原体抗体(Ab₁')。总 Ab₃ 的产生已被证实与微小病原体病灶消退和/或病人病情好转呈正相关。被激活的 Th₁细胞释放细胞因子,如 INF-γ 可通过影响 NK 细胞及 T 细胞功能而发挥抗病原体效应,IL-2 可促进 T 细胞生长、克隆性扩增而增强机体的免疫功能,亦可诱导或促进多种细胞毒性细胞活性,如 NK、CTL、LAK 及 TIL 等,发挥免疫监视及抗病原体效应。同时 IL-2 还可协同刺激 B 细胞增殖及分泌抗体,与补体及效应细胞相作用,发挥 ADCC 及 CDC 抗病原体作用(龚非力等,医学免疫学,第二版,武汉:科学出版社,2000)。人体内免疫系统是一个处于自身动态平衡中的系统。在传染病患者体内的免疫系统中,抗独特型抗体是一个较关键的系统要素,用人为的方法改变抗独特型抗体的质量和数量,必然会使系统发生变化,再在更高的层次上达到新的平衡。使病原体免疫的系统平衡按照理论上预测的有利于患者的方向发展变化,在某种意义上这正是抗独特型抗体应用的关键所在。

本发明就是采用上述方法所制备的蛋黄病原体特异性表达抗原和抗独特型抗体 Ab₂β 作为病原体特异性疫苗而用于传染病的特异性免疫治疗,能够激活特定的淋巴细胞(B细胞和(或)T细胞)反应,产生相应的抗病原体作用,并对将来的病原体产生记忆反应,激活机体免疫系统甚至重新调节机体免疫的系统平衡,调动体液免疫和细胞免疫作用,产生特异性病原体抗体或杀伤性淋巴细胞,来共同杀灭病原体,达到免疫性治疗传染病的目的。

一种传染性病原体相关蛋黄抗体的用途，其特征还在于：上述蛋黄抗体中的多克隆抗体 IgY、病原体特异性表达抗原、抗独特型抗体 Ab2 α 、Ab2 β 的任一种或任意组合用于制备预防传染病的食品、饮料和保健品。即采用将本发明中的多克隆抗体 IgY、病原体特异性表达抗原、抗独特型抗体 Ab2 α 、Ab2 β 中的任一种或任意组合按一定配比添加于食品、饮料及保健品中，用于传染病的预防及早期预防性治疗。

技术效果

本发明就是针对以上问题利用传染性病原体相关蛋黄抗体中的 IgY 抗体为主要原料制备成针对于病原体特异性抗原的免疫诊断药剂和免疫治疗药剂，包括体外诊断试剂、体内导向诊断试剂和特异性蛋黄抗体免疫治疗剂以及特异性蛋黄抗体偶联药物或毒素的导向药物即生物导弹；利用该蛋黄抗体中的病原体特异性表达抗原可制备成针对于病原体的免疫诊断药剂和免疫治疗药剂，包括体外诊断试剂和特异性疫苗瘤苗和核酸疫苗；利用该蛋黄抗体中的抗独特型抗体 Ab2 α 和 Ab2 β 为主要原料可制备成针对于病原体的免疫诊断药剂和免疫治疗药剂，包括体外诊断试剂、体内导向诊断试剂（主要采用 Ab2 α ）和抗独特型抗体 Ab2 α 偶联药物或毒素的导向药物即抗独特型生物导弹和抗独特型抗体疫苗（主要采用 Ab2 β ）；用于传染病的诊断、免疫治疗和导向治疗。另外该蛋黄抗体 IgY 和抗独特型抗体还可作为添加剂添加于食品、饮料及保健品中，用于传染病的预防及早期预防性治疗，尤其是用于对人类具有极大危害性传染病如艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎、结核、幽门螺杆菌性胃炎、梅毒、淋病等性传播性疾病、病毒性肠炎及流感等的被动免疫和主动免疫治疗。

由于采用本发明方法制备传染性病原体相关蛋黄抗体，利用鸡免疫系统对异源性蛋白或生物分子能产生具有更高效价和亲和力的特异性抗体，可诱导高滴度的特异性抗病原体的抗体，且具有成本低、产量高、特异性强、决定簇广并能进行集约化大规模生产的优点，可实现针对与多重病原体的蛋黄多克隆抗体 IgY、抗独特型抗体和病原体特异性表达抗原中的多重组合物的一次性制备，更重要的是该蛋黄抗体能够很好地解决上述鼠源性单抗偶联物或肿瘤疫苗所存在的 HAMA 反应和异质性问题，且对人体无毒副作用，具有较好的安全性。另外，本发明所制备的传染性病原体相关蛋黄抗体或其组合物可用作传染性病原体相关诊断试剂的原料，尤其是传染性病原体相关生物芯片的原料；再者就是本发明所制备的蛋黄抗体及其组合物能够在被动免疫和主动免疫两方面共同发挥其免疫治疗作用。本发明适用于传染病的免疫诊断、治疗和预防，尤其适用于对人类具有极大危害性传染病如艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎、结核、幽门螺杆菌性胃炎、梅毒、淋病等性传播性疾病、病毒性肠炎及流感等的被动免疫和主动免疫治疗。

实施方案

下面结合实施例进一步说明本发明。

实施例 1：用具有免疫活性的病原体特异性免疫原包括病原体特异性抗原、疫苗瘤苗、DNA 或 mRNA 和抗体或其脂质体复合物中的任一种或其复合物免疫产蛋禽类尤其是鸡，然后再以不完全佐剂进行追加强化反应，待 5-20 天后禽类尤其是鸡的产蛋中即有针对于上述病原体免疫原的多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物存在和储存，其具体步骤包括：取 6 月龄 SPF 纯系莱航产蛋母鸡于标准 II 级清洁级动物房饲养，每只鸡于胸腹部多点注射上述病原体免疫原 1-2ml（免疫原量 10-500 μ g/ml+等量不完全福氏佐剂，其中抗体 Ab1 的用量为 100~2000 μ g+等量不完全福氏佐剂），2~4 周后加强免疫注射 3-5 次，待 5-20 天后免疫母鸡所产的免疫蛋中即含有病原体相关蛋黄抗体。

实施例 2：传染性病原体相关蛋黄抗体的制备 将上述免疫鸡蛋去蛋清后的卵黄充分搅拌均匀后，加入蛋黄匀浆 5 倍体积的 0.1mol/L PH7.2 磷酸盐-海藻糖稀释液，然后置于冰盒（-20 $^{\circ}$ C）冰冻 1-5 小时，取出于室温复融并低速离心（500-1000r/min）后沥出收集上清液，再向沉淀物中加入 2-5

倍体积的 0.1mol/L PH7.2 磷酸盐-海藻糖稀释液，充分混匀溶解沉淀物，依上法再次冻融收集上清液，如此反复冻融 3-5 次，合并收集各次得到的上清液加入硫酸钠，使硫酸钠的终浓度达 10-30%，离心收集其沉淀物，并将该沉淀物用蒸馏水复溶后对盐透析后超滤浓缩、凝胶过滤、冷冻干燥即得到纯化的病原体相关蛋黄抗体包括蛋黄多克隆抗体 IgY 或抗独特型抗体或病原体特异性表达抗原中的任一种或其组合物。实验结果表明：批量制备的病原体相关蛋黄抗体，每只鸡蛋可提取 57~171mg 的病原体特异性蛋黄抗体，平均每只鸡蛋可提取 89mg，其纯度为 95%。

实施例 3：传染性病原体相关蛋黄抗体的检测 乙型肝炎重组表面抗原特异性蛋黄抗体 IgY 的检测采用 ELISA 间接法检测，以乙型肝炎重组表面抗原液包被酶标板孔，采用辣根过氧化物酶标记的鼠抗鸡 IgY 单抗作为二抗；特异性表达乙型肝炎表面抗原的检测采用 ELISA 双抗体夹心法，以乙肝表面抗体包被酶标板孔，采用辣根过氧化物酶标记的乙肝表面抗体作为标记抗体；乙型肝炎重组表面抗原特异性蛋黄抗独特型抗体的检测采用 ELISA 间接法，以乙肝表面抗原特异性蛋黄抗体 IgY 包被酶标板孔，采用辣根过氧化物酶标记的鼠抗鸡 IgY 单抗作为二抗；上述 ELISA 检测依常规操作进行。实验结果表明：乙型肝炎重组表面抗原特异性蛋黄抗体的效价在 1: 1280-1: 10240 之间，其中乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体 IgY 的平均效价在 1: 5120 左右；特异性表达乙肝表面抗原的平均效价在 1: 2560 左右；乙型肝炎重组表面抗原特异性蛋黄抗独特型抗体的平均效价在 1: 5120 左右。

实施例 4：传染性病原体相关蛋黄抗体的稳定性试验 病原体相关蛋黄抗体经过滤除菌，以 10mg/ml 分装小试管中，分别于 -20°C 冰冻、4°C 和室温保存，定期进行其效价检测。实验结果表明：病原体相关蛋黄抗体于 -20°C 冰冻保存，其稳定性至少可保持 12 个月以上；于 4°C 保存，其稳定性至少可保持 6 个月以上；于室温保存，其稳定性至少可保持 2 个月以上。

实施例 5：乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体 IgY 与氧化苦参碱的偶联试验 首先取葡聚糖 1.0g，加入 200mL 蒸馏水后加高碘酸钠 0.3g，室温下避光反应过夜，使葡聚糖充分氧化为多醛基葡聚糖，蒸馏水充分透析后冻干；注射治疗前 2 小时内取多醛基葡聚糖 10mg 加入 0.15mol/L (pH 7.2) 的磷酸缓冲液 2mL 中，加氧化苦参碱 10mg，室温下反应 24 小时后，再加入已纯化的乙肝重组表面抗原特异性蛋黄抗体 IgY 10mg，4°C 搅拌反应 24 小时；然后在上述反应混合物中加硼氢化钠 0.2mg，在 4°C 下还原 2 小时，离心后经 Sephadex G-150 层析柱过柱，收集第一峰即可用于治疗。

实施例 6：治疗效果观察 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 转阴率后两组（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。表明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 联合治疗具有激活机体细胞及体液免疫的作用，从而达到对抗乙肝病毒保护肝脏组织细胞的目的。