



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107247132 A

(43)申请公布日 2017.10.13

(21)申请号 201710363857.3

(22)申请日 2017.05.22

(71)申请人 东莞市儿童医院

地址 523321 广东省东莞市石龙镇西湖三路(南)68号

申请人 东莞市儿科研究所

(72)发明人 刘倩 陆小梅 彭琪 蒋再学  
谢明玉

(74)专利代理机构 东莞市华南专利商标事务所  
有限公司 44215

代理人 姜华

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C07K 14/085(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

(54)发明名称

一种多肽疫苗的筛选评估方法

(57)摘要

本发明涉及多肽疫苗技术领域,具体涉及一种多肽疫苗的筛选评估方法,包括如下步骤:选择病原体中和抗原表位多肽序列作为多肽疫苗的序列;将选定的中和抗原表位采用化学方法进行多肽合成,封闭活性基团;将多肽与偶联载体进行偶联,洗脱未偶联的多肽,封闭未偶联的偶联载体,清洗待用;将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,加入抗体样本,洗脱并收集中和抗体;通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。本发明涉及一种前期已在动物试验中证实具有中和效果的抗原表位肽,评估其是否适合用于人体的多肽疫苗的筛选评估方法。本发明的筛选评估方法将大大提高多肽疫苗的研发效率,降低研发成本。

1. 一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 多肽序列的选择:选择病原体中和抗原表位多肽序列作为多肽疫苗的序列;

(2) 中和抗原表位多肽的合成:将选定的中和抗原表位进行多肽合成,封闭活性基团;

(3) 多肽与偶联载体偶联:将多肽与偶联载体进行偶联,洗脱未偶联的多肽,封闭未偶联的偶联载体,清洗待用;

(4) 亲和层析:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,加入抗体样本,洗脱并收集中和抗体;

(5) 中和抗体分析:通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。

2. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(1)具体为:选择EV71病毒C4流行株中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28多肽序列作为多肽疫苗的序列。

3. 根据权利要求2所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(1)中,EV71病毒C4流行株中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28多肽序列分别为:

SP55:PDSRESLAWQTATNP

SP70:YPTFGEHKQEKDLEY

VP2-28:AGGTGTEDTHPPYKQ。

4. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(3)包括如下步骤:

(3.1) 偶联载体预处理:选择琼脂糖珠作为偶联载体,加入双蒸水进行膨胀,再加入双蒸水进行洗涤;

(3.2) 偶联配基:

(3.2.1) 配基溶解:将多肽用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺溶解;

(3.2.2) 偶联:将预处理后的琼脂糖珠和溶解后的多肽按体积比0.8-1.2:1的比例混合,在20-40℃温度下孵育14-18h;

(3.2.3) 洗脱:用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺洗脱未偶联的多肽;

(3.2.4) 封闭:在20-40℃温度下,将洗脱后的琼脂糖珠静置于0.8-1.2mol/L的乙醇胺中3-5h,封闭未偶联的偶联载体;

(3.2.5) 清洗:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的醋酸盐缓冲液加0.4-0.6mol/L的NaCl溶液和pH为8.0的tris-HCl缓冲液加摩尔浓度为0.4-0.6mol/L的NaCl溶液循环清洗琼脂糖珠。

5. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(4)包括如下步骤:

(4.1) 结合:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,以丙种球蛋白作为抗体样本,加入纯化柱中,加入pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗涤;

(4.2) 洗脱:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的柠檬酸缓冲液洗脱抗体,于收集管中加入0.4-0.6gTris固体试剂;

(4.3) 收集:重复步骤(4.1)和步骤(4.2),直至收集足够量的抗体;

(4.4) 平衡:用10K的蛋白超滤管加入13-17mLPBS平衡,在4500-5500rpm转速下离心25-35min,弃掉废液;

(4.5) 浓缩去盐:将步骤(4.3)收集的抗体加入蛋白超滤管中,在4500-5500rpm转速下离心25-35min,收集超滤膜上方液体为浓缩去盐抗体;重复该步骤,直至全部抗体浓缩去盐。

6. 根据权利要求5所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(4.5)之后还包括步骤(4.6)保存:短时间内用不完的抗体加入无菌甘油至质量分数为45%-55%,于-15~-25℃温度下保存。

7. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(5)包括如下步骤:

(5.1) 病毒TCID<sub>50</sub>的计算:将Vero细胞接种至96孔板,然后接种EV71病毒,接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒的TCID<sub>50</sub>;

(5.2) 体外微量中和实验通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。

8. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(5.1)包括如下步骤:

(5.1.1) 接种细胞:将含有FBS的DMEM培养基的Vero细胞,用PBS洗三遍,再用2-4mL质量分数为0.2%-0.3%的胰酶消化1.5-2.5min,加入2-4mL含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,800-1200rpm转速下离心4-6min,弃掉上清,加入含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,并用细胞计数板计数;

用含有FBS的DMEM培养基将细胞稀释成 $1.5 \times 10^4$ - $2.5 \times 10^4$ 个细胞/100μL,并接种至96孔板,过夜培养;

(5.1.2) 接种病毒:将培养的EV71病毒经过0.20-0.25μm滤膜过滤,用含有FBS的DMEM培养基将EV71病毒按照 $10^{-1}$ ~ $10^{-15}$ 梯度稀释;

将EV71病毒接种至步骤(5.1.1)中的96孔板,每孔接种100μL,每个梯度接种10个孔;

(5.1.3) 计算:病毒接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒TCID<sub>50</sub>;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为1.5%-2.5%。

9. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在于:所述步骤(5.2)包括如下步骤:

(5.2.1) 将Vero细胞按每孔 $1.5 \times 10^4$ - $2.5 \times 10^4$ 个细胞/100μL接种到96孔板,生长过夜;

(5.2.2) 用含有FBS的DMEM培养基稀释病毒至TCID<sub>50</sub>为100,取新96孔板,每孔加入EV71病毒50μL;

(5.2.3) 用含有FBS的DMEM培养基按倍比稀释浓缩去盐抗体,将不同稀释比例的抗体按50μL/孔加入步骤(5.2.2)的96孔板中,轻摇混匀,36-37℃温度下孵育0.5-1.5h;

(5.2.4) 将步骤(5.2.2)的96孔板中的液体加入步骤(5.2.1)的96孔板中,每个样本设平行孔3个,在CO<sub>2</sub>浓度为4%-6%、36-37℃温度下培养2-4d,完全抑制致细胞病变效应出现的最高血清稀释度作为血清的中和滴度;

(5.2.5) 分析单个中和抗原表位多肽结合抗体的中和滴度,并作为评价该中和抗原表位多肽在人体免疫反应中的效果;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为1.5%-2.5%。

10. 根据权利要求1所述的一种用于非治疗目的的多肽疫苗的筛选评估方法,其特征在

于:所述步骤(5)之后还包括步骤(6)组合分析:将捕获的中和抗体两两组合以及三个组合,通过体外微量中和试验的方法,分析不同组合的中和抗体的中和滴度。

## 一种多肽疫苗的筛选评估方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及多肽疫苗技术领域,具体涉及一种多肽疫苗的筛选评估方法。

### 背景技术

[0002] 多肽疫苗的研发是目前病毒疫苗研发中的一个重要组成部分,在疫苗的研究中,多肽疫苗具有免疫应答能力、安全、反应原性低等优势,是新一代疫苗研究的热点之一。

[0003] EV71病毒是导致重症手足口病的重要病毒之一,目前多以小鼠和兔等实验动物进行EV71中和抗原表位肽的研究。然而,由于动物与人的免疫系统的差异,基于动物实验的EV71中和表位和多肽疫苗的研究,其结果不能等同于人类对于相同多肽疫苗的反应。

### 发明内容

[0004] 为了克服现有技术中存在的缺点和不足,本发明的目的在于提供一种多肽疫苗的筛选评估方法,用于筛选经动物实验验证的具有中和效果的中和抗原表位或多肽在用于人体前的评估工作。

[0005] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种多肽疫苗的筛选评估方法,包括如下步骤:

- (1) 多肽序列的选择:选择病原体中和抗原表位多肽序列作为多肽疫苗的序列;
- (2) 中和抗原表位多肽的合成:将选定的中和抗原表位进行多肽合成,封闭活性基团;
- (3) 多肽与偶联载体偶联:将多肽与偶联载体进行偶联,洗脱未偶联的多肽,封闭未偶联的偶联载体,清洗待用;
- (4) 亲和层析:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,加入抗体样本,洗脱并收集中和抗体;
- (5) 中和抗体分析:通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。

[0006] 本发明通过对EV71病毒中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28分别通过小鼠和兔作为实验动物进行研究,具有较好的中和效果。将其作为EV71多肽疫苗的备选序列。

[0007] SP55:PESRESLAWQTATNPC

SP70:YPTFGEHKQEKDLEYC

VP2-28:AGGTGTEDSHPPYKQ。

[0008] 本发明的实验动物不仅限于小鼠和兔体内验证有效的中和抗原表位,还包括其他动物,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0009] 优选的,所述步骤(1)具体为:选择EV71病毒C4流行株中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28多肽序列作为多肽疫苗的序列。本发明选用的病原体不仅限于EV71病毒,还可以为其他病原体(如病毒、细菌、支原体、衣原体和寄生虫等),还包括临床各类疾病等的疫苗研发,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0010] 更为优选的,所述步骤(1)中,EV71病毒C4流行株中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28多肽序列分别为:

SP55:PDSRESLAWQTATNP

SP70:YPTFGEHKQEKDLEY

VP2-28:AGGTGTEDTHPPYKQ。

[0011] 本发明的多肽序列不仅限于上述三条,还可以为很多条,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0012] 所述步骤(2)具体为:将选定的中和抗原表位采用化学方法进行多肽合成,封闭巯基等活性基团。

[0013] 本发明的多肽合成方法不仅限于化学方法,还可以采用其它多肽合成方法,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0014] 优选的,所述步骤(3)包括如下步骤:

(3.1)偶联载体预处理:选择琼脂糖珠作为偶联载体,加入双蒸水进行膨胀,再加入双蒸水进行洗涤;

(3.2)偶联配基:

(3.2.1)配基溶解:将多肽用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺溶解;

(3.2.2)偶联:将预处理后的琼脂糖珠和溶解后的多肽按体积比0.8-1.2:1的比例混合,在20-40℃温度下孵育14-18h;

(3.2.3)洗脱:用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺洗脱未偶联的多肽;

(3.2.4)封闭:在20-40℃温度下,将洗脱后的琼脂糖珠静置于0.8-1.2mol/L的乙醇胺中3-5h,封闭未偶联的偶联载体;

(3.2.5)清洗:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的醋酸盐缓冲液加0.4-0.6mol/L的NaCl溶液和pH为8.0的tris-HCl缓冲液加摩尔浓度为0.4-0.6mol/L的NaCl溶液循环清洗琼脂糖珠。

[0015] 本发明采用的偶联载体不仅限于琼脂糖珠,只要带有偶联基团的载体均可,如磁珠或其它微球等,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0016] 优选的,所述步骤(4)包括如下步骤:

(4.1)结合:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,以丙种球蛋白作为抗体样本,加入纯化柱中,加入pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗涤;

(4.2)洗脱:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的柠檬酸缓冲液洗脱抗体,于收集管中加入0.4-0.6gTris固体试剂;

(4.3)收集:重复步骤(4.1)和步骤(4.2),直至收集足够量的抗体;

(4.4)平衡:用10K的蛋白超滤管加入13-17mLPBS平衡,在4500-5500rpm转速下离心25-35min,弃掉废液;

(4.5)浓缩去盐:将步骤(4.3)收集的抗体加入蛋白超滤管中,在4500-5500rpm转速下离心25-35min,收集超滤膜上方液体为浓缩去盐抗体;重复该步骤,直至全部抗体浓缩去盐。

[0017] 本发明采用的抗体样本不仅限于人丙种球蛋白,还包括各类血液制品以及患者的血液类样本,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

[0018] 优选的,所述步骤(4.5)之后还包括步骤(4.6)保存:短时间内用不完的抗体加入无菌甘油至质量分数为45%-55%,于-15~-25℃温度下保存。

[0019] 优选的,所述步骤(5)包括如下步骤:

(5.1)病毒TCID<sub>50</sub>的计算:将Vero细胞接种至96孔板,然后接种EV71病毒,接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒的TCID<sub>50</sub>;

(5.2)体外微量中和实验通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。

[0020] 优选的,所述步骤(5.1)包括如下步骤:

(5.1.1)接种细胞:将含有FBS的DMEM培养基的Vero细胞,用PBS洗三遍,再用2-4mL质量分数为0.2%-0.3%的胰酶消化1.5-2.5min,加入2-4mL含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,800-1200rpm转速下离心4-6min,弃掉上清,加入含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,并用细胞计数板计数;

用含有FBS的DMEM培养基将细胞稀释成 $1.5 \times 10^4$ - $2.5 \times 10^4$ 个细胞/100μL,并接种至96孔板,过夜培养;

(5.1.2)接种病毒:将培养的EV71病毒经过0.20-0.25μm滤膜过滤,用含有FBS的DMEM培养基将EV71病毒按照 $10^{-1}$ ~ $10^{-15}$ 梯度稀释;

将EV71病毒接种至步骤(5.1.1)中的96孔板,每孔接种100μL,每个梯度接种10个孔;

(5.1.3)计算:病毒接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒TCID<sub>50</sub>;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为1.5%-2.5%。

[0021] 优选的,所述步骤(5.2)包括如下步骤:

(5.2.1)将Vero细胞按每孔 $1.5 \times 10^4$ - $2.5 \times 10^4$ 个细胞/100μL接种到96孔板,生长过夜;

(5.2.2)用含有FBS的DMEM培养基稀释病毒至TCID<sub>50</sub>为100,取新96孔板,每孔加入EV71病毒50μL;

(5.2.3)用含有FBS的DMEM培养基按倍比稀释浓缩去盐抗体,将不同稀释比例的抗体按50μL/孔加入步骤(5.2.2)的96孔板中,轻摇混匀,36-37℃温度下孵育0.5-1.5h;

(5.2.4)将步骤(5.2.2)的96孔板中的液体加入步骤(5.2.1)的96孔板中,每个样本设平行孔3个,在CO<sub>2</sub>浓度为4%-6%、36-37℃温度下培养2-4d,完全抑制致细胞病变效应出现的最高血清稀释度作为血清的中和滴度;

(5.2.5)分析单个中和抗原表位多肽结合抗体的中和滴度,并作为评价该中和抗原表位多肽在人体免疫反应中的效果;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为1.5%-2.5%。

[0022] 优选的,所述步骤(5)之后还包括步骤(6)组合分析:将捕获的中和抗体两两组合以及三个组合,通过体外微量中和试验的方法,分析不同组合的中和抗体的中和滴度。

[0023] 本发明的有益效果在于:本发明涉及一种前期已在动物试验中证实具有中和效果的抗原表位肽,评估其是否适合用于人体的多肽疫苗的筛选评估方法。本发明的筛选评估方法将大大提高多肽疫苗的研发效率,降低研发成本,还可以为科研学术提供理论依据。

[0024] 本发明的验证方法用于筛选经动物实验验证的具有中和效果的中和抗原表位或多肽在用于人体前的评估工作。一方面预测该中和抗原表位或多肽其免疫人体后产生中和

抗体的情况,分析人体和动物免疫差异。另一方面又可以将无法引起免疫反应的中和抗原表位肽或多肽疫苗去掉,从而大大的减少研发费用,同时亦为后续临床试验提供宝贵数据。

### 具体实施方式

[0025] 为了便于本领域技术人员的理解,下面结合实施例对本发明作进一步的说明,实施方式提及的内容并非对本发明的限定。

#### [0026] 实施例1

一种多肽疫苗的筛选评估方法,包括如下步骤:

(1) 多肽序列的选择:选择病原体中和抗原表位多肽序列作为多肽疫苗的序列;

(2) 中和抗原表位多肽的合成:将选定的中和抗原表位采用化学方法进行多肽合成,封闭巯基等活性基团;

(3) 多肽与偶联载体偶联:将多肽与偶联载体进行偶联,洗脱未偶联的多肽,封闭未偶联的偶联载体,清洗待用;

(4) 亲和层析:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,加入抗体样本,洗脱并收集中和抗体;

(5) 中和抗体分析:通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。

[0027] 所述步骤(1)具体为:选择EV71病毒C4流行株中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28多肽序列作为多肽疫苗的序列。

[0028] 所述步骤(1)中,EV71病毒C4流行株中和抗原表位SP55、SP70和VP2-28多肽序列分别为:

SP55:PDSRESLAWQTATNP

SP70:YPTFGEHKQEKDLEY

VP2-28:AGGTGTEDTHPPYKQ。

[0029] 所述步骤(3)包括如下步骤:

(3.1) 偶联载体预处理:选择琼脂糖珠作为偶联载体,加入双蒸水进行膨胀,再加入双蒸水进行洗涤;

(3.2) 偶联配基:

(3.2.1) 配基溶解:将多肽用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺溶解;

(3.2.2) 偶联:将预处理后的琼脂糖珠和溶解后的多肽按体积比0.8:1的比例混合,在20℃温度下孵育18h;

(3.2.3) 洗脱:用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺洗脱未偶联的多肽;

(3.2.4) 封闭:在20℃温度下,将洗脱后的琼脂糖珠静置于0.8mol/L的乙醇胺中3h,封闭未偶联的偶联载体;

(3.2.5) 清洗:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的醋酸盐缓冲液加0.4mol/L的NaCl溶液和pH为8.0的tris-HCl缓冲液加摩尔浓度为0.4mol/L的NaCl溶液循环清洗琼脂糖珠。

[0030] 所述步骤(4)包括如下步骤:

(4.1) 结合:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,以丙种球蛋白作为抗体样本,加入纯化柱中,加入pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗涤;

(4.2) 洗脱:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的柠檬酸缓冲液洗脱抗体,于收集管中加

入0.4gTris固体试剂;

(4.3) 收集:重复步骤(4.1)和步骤(4.2),直至收集足够量的抗体;

(4.4) 平衡:用10K的蛋白超滤管加入13mLPBS平衡,在4500rpm转速下离心35min,弃掉废液;

(4.5) 浓缩去盐:将步骤(4.3)收集的抗体加入蛋白超滤管中,在4500rpm转速下离心35min,收集超滤膜上方液体为浓缩去盐抗体;重复该步骤,直至全部抗体浓缩去盐。

[0031] 所述步骤(4.5)之后还包括步骤(4.6)保存:短时间内用不完的抗体加入无菌甘油至质量分数为45%,于-15℃温度下保存。

[0032] 所述步骤(5)包括如下步骤:

(5.1) 病毒TCID<sub>50</sub>的计算:将Vero细胞接种至96孔板,然后接种EV71病毒,接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒的TCID<sub>50</sub>;

(5.2) 体外微量中和实验通过体外微量中和试验的方法,分析捕获的中和抗体的中和滴度。

[0033] 所述步骤(5.1)包括如下步骤:

(5.1.1) 接种细胞:将含有FBS的DMEM培养基的Vero细胞,用PBS洗三遍,再用2mL质量分数为0.2%的胰酶消化1.5min,加入2mL含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,800rpm转速下离心6min,弃掉上清,加入含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,并用细胞计数板计数;

用含有FBS的DMEM培养基将细胞稀释成 $1.5 \times 10^4$ 个细胞/100μL,并接种至96孔板,过夜培养;

(5.1.2) 接种病毒:将培养的EV71病毒经过0.20μm滤膜过滤,用含有FBS的DMEM培养基将EV71病毒按照 $10^{-1} \sim 10^{-15}$ 梯度稀释;

将EV71病毒接种至步骤(5.1.1)中的96孔板,每孔接种100μL,每个梯度接种10个孔;

(5.1.3) 计算:病毒接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒TCID<sub>50</sub>;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为1.5%。

[0034] 所述步骤(5.2)包括如下步骤:

(5.2.1) 将Vero细胞按每孔 $1.5 \times 10^4$ 个细胞/100μL接种到96孔板,生长过夜;

(5.2.2) 用含有FBS的DMEM培养基稀释病毒至TCID<sub>50</sub>为100,取新96孔板,每孔加入EV71病毒50μL;

(5.2.3) 用含有FBS的DMEM培养基按倍比稀释浓缩去盐抗体,将不同稀释比例的抗体按50μL/孔加入步骤(5.2.2)的96孔板中,轻摇混匀,36℃温度下孵育1.5h;

(5.2.4) 将步骤(5.2.2)的96孔板中的液体加入步骤(5.2.1)的96孔板中,每个样本设平行孔3个,在CO<sub>2</sub>浓度为4%、36℃温度下培养4d,完全抑制致细胞病变效应出现的最高血清稀释度作为血清的中和滴度;

(5.2.5) 分析单个中和抗原表位多肽结合抗体的中和滴度,并作为评价该中和抗原表位多肽在人体免疫反应中的效果;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为1.5%。

[0035] 所述步骤(5)之后还包括步骤(6)组合分析:将捕获的中和抗体两两组合以及三个组合,通过体外微量中和试验的方法,分析不同组合的中和抗体的中和滴度。

**[0036] 实施例2**

本实施例与上述实施例1的不同之处在于：

所述步骤(3)包括如下步骤：

(3.1) 偶联载体预处理：选择琼脂糖珠作为偶联载体，加入双蒸水进行膨胀，再加入双蒸水进行洗涤；

(3.2) 偶联配基：

(3.2.1) 配基溶解：将多肽用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺溶解；

(3.2.2) 偶联：将预处理后的琼脂糖珠和溶解后的多肽按体积比1:1的比例混合，在30℃温度下孵育16h；

(3.2.3) 洗脱：用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺洗脱未偶联的多肽；

(3.2.4) 封闭：在30℃温度下，将洗脱后的琼脂糖珠静置于1mol/L的乙醇胺中4h，封闭未偶联的偶联载体；

(3.2.5) 清洗：用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的醋酸盐缓冲液加0.5mol/L的NaCl溶液和pH为8.0的tris-HCl缓冲液加摩尔浓度为0.5mol/L的NaCl溶液循环清洗琼脂糖珠。

**[0037] 所述步骤(4)包括如下步骤：**

(4.1) 结合：将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱，以丙种球蛋白作为抗体样本，加入纯化柱中，加入pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗涤；

(4.2) 洗脱：用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的柠檬酸缓冲液洗脱抗体，于收集管中加入0.5gTris固体试剂；

(4.3) 收集：重复步骤(4.1)和步骤(4.2)，直至收集足够量的抗体；

(4.4) 平衡：用10K的蛋白超滤管加入15mLPBS平衡，在5000rpm转速下离心30min，弃掉废液；

(4.5) 浓缩去盐：将步骤(4.3)收集的抗体加入蛋白超滤管中，在5000rpm转速下离心30min，收集超滤膜上方液体为浓缩去盐抗体；重复该步骤，直至全部抗体浓缩去盐。

**[0038] 所述步骤(4.5)之后还包括步骤(4.6)保存：**短时间内用不完的抗体加入无菌甘油至质量分数为50%，于-20℃温度下保存。

**[0039] 所述步骤(5.1)包括如下步骤：**

(5.1.1) 接种细胞：将含有FBS的DMEM培养基的Vero细胞，用PBS洗三遍，再用3mL质量分数为0.25%的胰酶消化2min，加入3mL含有FBS的DMEM培养基，吹打制成单细胞悬液，1000rpm转速下离心5min，弃掉上清，加入含有FBS的DMEM培养基，吹打制成单细胞悬液，并用细胞计数板计数；

用含有FBS的DMEM培养基将细胞稀释成 $2 \times 10^4$ 个细胞/100μL，并接种至96孔板，过夜培养；

(5.1.2) 接种病毒：将培养的EV71病毒经过0.22μm滤膜过滤，用含有FBS的DMEM培养基将EV71病毒按照 $10^{-1} \sim 10^{-15}$ 梯度稀释；

将EV71病毒接种至步骤(5.1.1)中的96孔板，每孔接种100μL，每个梯度接种10个孔；

(5.1.3) 计算：病毒接种7天后观察细胞病变情况，计算EV71病毒TCID<sub>50</sub>；

所述含有FBS的DMEM培养基中，FBS的质量分数为2%。

**[0040] 所述步骤(5.2)包括如下步骤：**

(5.2.1) 将Vero细胞按每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞/100 $\mu$ L接种到96孔板,生长过夜;

(5.2.2) 用含有FBS的DMEM培养基稀释病毒至TCID<sub>50</sub>为100,取新96孔板,每孔加入EV71病毒50 $\mu$ L;

(5.2.3) 用含有FBS的DMEM培养基按倍比稀释浓缩去盐抗体,将不同稀释比例的抗体按50 $\mu$ L/孔加入步骤(5.2.2)的96孔板中,轻摇混匀,37℃温度下孵育1h;

(5.2.4) 将步骤(5.2.2)的96孔板中的液体加入步骤(5.2.1)的96孔板中,每个样本设平行孔3个,在CO<sub>2</sub>浓度为5%、37℃温度下培养3d,完全抑制致细胞病变效应出现的最高血清稀释度作为血清的中和滴度;

(5.2.5) 分析单个中和抗原表位多肽结合抗体的中和滴度,并作为评价该中和抗原表位多肽在人体免疫反应中的效果;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为2%。

#### [0041] 实施例3

本实施例与上述实施例1的不同之处在于:

所述步骤(3)包括如下步骤:

(3.1) 偶联载体预处理:选择琼脂糖珠作为偶联载体,加入双蒸水进行膨胀,再加入双蒸水进行洗涤;

(3.2) 偶联配基:

(3.2.1) 配基溶解:将多肽用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺溶解;

(3.2.2) 偶联:将预处理后的琼脂糖珠和溶解后的多肽按体积比1.2:1的比例混合,在40℃温度下孵育14h;

(3.2.3) 洗脱:用质量分数为25%、pH为9.0的二甲基甲酰胺洗脱未偶联的多肽;

(3.2.4) 封闭:在40℃温度下,将洗脱后的琼脂糖珠静置于1.2mol/L的乙醇胺中5h,封闭未偶联的偶联载体;

(3.2.5) 清洗:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的醋酸盐缓冲液加0.6mol/L的NaCl溶液和pH为8.0的tris-HCl缓冲液加摩尔浓度为0.6mol/L的NaCl溶液循环清洗琼脂糖珠。

#### [0042] 所述步骤(4)包括如下步骤:

(4.1) 结合:将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱,以丙种球蛋白作为抗体样本,加入纯化柱中,加入pH为7.4的磷酸盐缓冲液洗涤;

(4.2) 洗脱:用摩尔浓度为0.1mol/L、pH为4.0的柠檬酸缓冲液洗脱抗体,于收集管中加入0.6gTris固体试剂;

(4.3) 收集:重复步骤(4.1)和步骤(4.2),直至收集足够量的抗体;

(4.4) 平衡:用10K的蛋白超滤管加入17mLPBS平衡,在5500rpm转速下离心25min,弃掉废液;

(4.5) 浓缩去盐:将步骤(4.3)收集的抗体加入蛋白超滤管中,在5500rpm转速下离心25min,收集超滤膜上方液体为浓缩去盐抗体;重复该步骤,直至全部抗体浓缩去盐。

[0043] 所述步骤(4.5)之后还包括步骤(4.6)保存:短时间内用不完的抗体加入无菌甘油至质量分数为55%,于-25℃温度下保存。

#### [0044] 所述步骤(5.1)包括如下步骤:

(5.1.1) 接种细胞:将含有FBS的DMEM培养基的Vero细胞,用PBS洗三遍,再用4mL质量分

数为0.3%的胰酶消化2.5min,加入4mL含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,1200rpm转速下离心4min,弃掉上清,加入含有FBS的DMEM培养基,吹打制成单细胞悬液,并用细胞计数板计数;

用含有FBS的DMEM培养基将细胞稀释成 $2.5 \times 10^4$ 个细胞/100 $\mu$ L,并接种至96孔板,过夜培养;

(5.1.2) 接种病毒:将培养的EV71病毒经过0.25 $\mu$ m滤膜过滤,用含有FBS的DMEM培养基将EV71病毒按照 $10^{-1} \sim 10^{-15}$ 梯度稀释;

将EV71病毒接种至步骤(5.1.1)中的96孔板,每孔接种100 $\mu$ L,每个梯度接种10个孔;

(5.1.3) 计算:病毒接种7天后观察细胞病变情况,计算EV71病毒TCID<sub>50</sub>;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为2.5%。

[0045] 所述步骤(5.2)包括如下步骤:

(5.2.1) 将Vero细胞按每孔 $2.5 \times 10^4$ 个细胞/100 $\mu$ L接种到96孔板,生长过夜;

(5.2.2) 用含有FBS的DMEM培养基稀释病毒至TCID<sub>50</sub>为100,取新96孔板,每孔加入EV71病毒50 $\mu$ L;

(5.2.3) 用含有FBS的DMEM培养基按倍比稀释浓缩去盐抗体,将不同稀释比例的抗体按50 $\mu$ L/孔加入步骤(5.2.2)的96孔板中,轻摇混匀,37℃温度下孵育0.5h;

(5.2.4) 将步骤(5.2.2)的96孔板中的液体加入步骤(5.2.1)的96孔板中,每个样本设平行孔3个,在CO<sub>2</sub>浓度为6%、37℃温度下培养2d,完全抑制致细胞病变效应出现的最高血清稀释度作为血清的中和滴度;

(5.2.5) 分析单个中和抗原表位多肽结合抗体的中和滴度,并作为评价该中和抗原表位多肽在人体免疫反应中的效果;

所述含有FBS的DMEM培养基中,FBS的质量分数为2.5%。

[0046] 上述实施例为本发明较佳的实现方案,除此之外,本发明还可以其它方式实现,在不脱离本发明构思的前提下任何显而易见的替换均在本发明的保护范围之内。

|                |                                                    |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种多肽疫苗的筛选评估方法                                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN107247132A</a>                       | 公开(公告)日 | 2017-10-13 |
| 申请号            | CN201710363857.3                                   | 申请日     | 2017-05-22 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东莞市儿童医院<br>东莞市儿科研究所                                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 东莞市儿童医院<br>东莞市儿科研究所                                |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 东莞市儿童医院<br>东莞市儿科研究所                                |         |            |
| [标]发明人         | 刘倩<br>陆小梅<br>彭琪<br>蒋再学<br>谢明玉                      |         |            |
| 发明人            | 刘倩<br>陆小梅<br>彭琪<br>蒋再学<br>谢明玉                      |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 C07K14/085 C07K1/22                      |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/005 C12N2770/32334 C12N2770/32351 G01N33/53 |         |            |
| 代理人(译)         | 姜华                                                 |         |            |
| 其他公开文献         | CN107247132B                                       |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>     |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及多肽疫苗技术领域，具体涉及一种多肽疫苗的筛选评估方法，包括如下步骤：选择病原体中和抗原表位多肽序列作为多肽疫苗的序列；将选定的中和抗原表位采用化学方法进行多肽合成，封闭活性基团；将多肽与偶联载体进行偶联，洗脱未偶联的多肽，封闭未偶联的偶联载体，清洗待用；将偶联多肽后的偶联载体装填至蛋白质纯化柱，加入抗体样本，洗脱并收集中和抗体；通过体外微量中和试验的方法，分析捕获的中和抗体的中和滴度。本发明涉及一种前期已在动物试验中证实具有中和效果的抗原表位肽，评估其是否适合用于人体的多肽疫苗的筛选评估方法。本发明的筛选评估方法将大大提高多肽疫苗的研发效率，降低研发成本。