



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108314708 A

(43)申请公布日 2018.07.24

(21)申请号 201710030851.4

(22)申请日 2017.01.17

(71)申请人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇
国家农业科技园南京农业大学基地

(72)发明人 冯秀丽 周广防 宗嫚嫚 周川杰
郑阳 余远楠 曹瑞兵 陈溥言

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 徐冬涛 杜静

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)

A61K 38/08(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

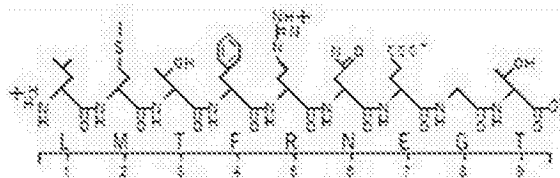
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种具有促进疫苗免疫反应的法氏囊活性九肽及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种具有促进疫苗免疫反应的法氏囊活性九肽。本发明所述的免疫活性肽是一种来源于法氏囊的小分子多肽,氨基酸组成为 Leu Met Thr Phe Arg Asn Glu Gly Thr,结构简单,免疫原性极弱。本发明活性肽具有促进疫苗免疫反应的功能,对小鼠具有刺激抗体产生、细胞免疫反应、淋巴细胞活力增强和提高疫苗免疫效力作用。本发明可作为疫苗佐剂或免疫增强剂应用于动物疫苗应用研究,以提高动物机体针对特异抗原的免疫应答能力,提高疫苗的免疫效力,从而提高动物机体抗疫病感染的能力,可应用于基础免疫研究、临床应用研究等领域。



1. 一种法氏囊多肽BP9,其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。
2. 权利要求1所述法氏囊多肽BP9在制备免疫药物中的应用。
3. 权利要求1所述法氏囊多肽BP9在制备畜禽免疫药物中的应用。
4. 权利要求1所述法氏囊多肽BP9在制备预防乙型脑炎药物中的应用。
5. 一种预防乙型脑炎的免疫组合物,其特征在于,包含乙型脑炎及权利要求1所述的法氏囊多肽BP9。
6. 根据权利要求5所述的免疫组合物,其特征在于,所述法氏囊多肽BP9以2~255ug/mL计量存在于免疫组合物中。
7. 根据权利要求6所述的免疫组合物,其特征在于,所述法氏囊多肽BP9以10~250ug/mL计量存在于免疫组合物中。
8. 根据权利要求7所述的免疫组合物,其特征在于,所述法氏囊多肽BP9以10~50ug/mL计量存在于免疫组合物中。
9. 根据权利要求8所述的免疫组合物,其特征在于,所述法氏囊多肽BP9以10 ug/mL计量存在于免疫组合物中。

一种具有促进疫苗免疫反应的法氏囊活性九肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于兽医生物制品技术领域,具体涉及一种具有促进疫苗免疫反应的法氏囊活性九肽及其应用。

背景技术

[0002] 日本乙型脑炎(Japanese encephalitis,简称乙脑)是由乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的一种危害严重的人畜共患传染病,临床上以高热、意识障碍、抽搐及脑膜刺激症为特征,严重者出现中枢性呼吸衰竭。乙脑病死率高,即使治愈也常伴有后遗症。乙脑病毒的传播主要呈现:猪-蚊-人模式,猪是重要的病毒扩增宿主,人是终末宿主,而蚊子是关键传播媒介。目前控制乙脑的主要手段是宿主接种疫苗。随着全球气候变暖和人口流动性增大引起的蚊媒传染病发病率上升,JEV的防控策略显得越来越紧迫。因此如何诱导机体产生有效持久的免疫保护应答是相关科研工作人员迫切需要解决的现实问题。

[0003] 疫苗免疫不仅是当前畜禽传染病防制的主要措施。临床上使用的大多数疫苗配合佐剂才能发挥良好的功效。因而,安全、无残留、有效的新型免疫增强剂研究及技术创新已成为我国动物疫病防控规划的重要举措。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种价格低、安全、无残留的高效促进疫苗免疫效果的新型活性肽,可作为疫苗佐剂或免疫增强剂应用于动物疫苗应用研究,以提高动物机体针对特异抗原的免疫应答能力,提高疫苗的免疫效力,从而提高动物机体抗疫病感染的能力,可应用于基础免疫研究、临床应用研究等领域。

[0005] 一种法氏囊多肽BP9,其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,为:5' - Leu Met Thr Phe Arg Asn Glu Gly Thr -3'。

[0006] 本发明所述法氏囊多肽BP9在制备免疫药物中的应用,优选的在制备畜禽免疫药物中的应用,特别优选的,在制备预防乙型脑炎药物中的应用。

[0007] 一种预防乙型脑炎的免疫组合物,包含乙型脑炎及所述的法氏囊多肽BP9。

[0008] 所述法氏囊多肽BP9优选以2~255ug/mL计量存在于免疫组合物中,更优选10~250ug/mL,进一步优选10~50ug/mL,最优选为10ug/mL。

[0009] 本发明通过超滤浓缩技术,回收分子量1000Da以下的有效成分(即粗提物)。经真空干燥,再次浓缩,溶解后,用反向高效液相色谱(RP-HPLC)分离、纯化多种法氏囊中的活性成分。经MODIL-TOF质谱分析,测定该法氏囊活性肽的分子量为1068.22(m/z),并获得完整的氨基酸序列,即LMTFRNEG(T即 5' - Leu Met Thr Phe Arg Asn Glu Gly Thr - 3',序列1),并命名为法氏囊多肽(BP9)。在小鼠免疫中,添加0.01mg/mL和0.05mg/mL剂量BP9的实验组JEV疫苗免疫效力显著高于未加该组分的疫苗对照组。

[0010] 1.法氏囊多肽BP9的制备

利用超滤浓缩和分子筛技术,回收分子量小于1KDa的法氏囊粗提物,经真空冷冻干燥,超纯水稀释后用反向高效液相色谱(RP-HPLC)分离,收获特定洗脱峰值的法氏囊多肽成分。通过刺激杂交瘤细胞,能够抗体水平升高的组分经MODIL-TOF质谱分析,测定该法氏囊活性肽的分子量为1068.22(m/z),并获得该法氏囊多肽的完整氨基酸序列,即LMTFRNEGT。通过人工合成BP9,以一定浓度进行验证实验。

[0011] 2. 法氏囊多肽BP9促进JEV灭活疫苗实验

(1) 将免疫活性肽BP9按照10、50和250ug/mL三种剂量添加至JEV灭活疫苗中进行联合接种小鼠;免疫后的小鼠的抗体水平、抗体亚型、中和抗体水平高于疫苗组,且T细胞亚型和淋巴细胞增殖活力发生了变化。

[0012] 本发明的积极意义:

本发明从法氏囊中分离、鉴定出一个新的免疫活性肽BP9,结构简单,免疫原性极弱,可作为畜禽疫苗免疫增强剂,如促进JEV灭活疫苗的免疫活性。本发明所述的活性肽是一种来源于法氏囊的小分子多肽,安全、无残留、副作用小、具有促进广泛的免疫增强作用,对多种畜禽具有刺激抗体生成、调节细胞因子和提高疫苗免疫效力作用,该多肽的氨基酸序列为: 5' -LMTFRNEGT - 3'。

附图说明

[0013] 图1 法氏囊九肽的分离和纯化。反向高效液相色谱图中,箭头所指,BP9的洗脱峰11.19 min。

[0014] 图2: MALDI-TOF-MS分析。

[0015] 图3: 免疫后6周,小鼠JEV特异抗体水平,用不同字母标记的各组之间差异显著 ($p < 0.05$), NS代表无显著性差异。

[0016] 图4: 免疫后6周,小鼠JEV特异亚型IgG1和IgG2a抗体水平,用不同字母标记的各组之间差异显著 ($p < 0.05$), NS代表无显著性差异。

[0017] 图5: 二免后1周,小鼠JEV中和抗体水平,用不同字母标记的各组之间差异显著 ($p < 0.05$), NS代表无显著性差异。

[0018] 图6: 二免后1周,小鼠T淋巴细胞亚型CD3+CD4+, CD3+CD8+比例,用不同字母标记的各组之间差异显著 ($p < 0.05$), NS代表无显著性差异。

[0019] 图7: 二免后1周,小鼠淋巴细胞活力,用不同字母标记的各组之间差异显著 ($p < 0.05$), NS代表无显著性差异。

具体实施方式

[0020] 本发明的实施例为进一步描述本发明的技术方案,但不构成对本发明的限制。

[0021] 实施例 1

1. BP9的分离及鉴定

取健康4~6周龄鸡的法氏囊(AA肉鸡,上海农业科学院附属养殖场)500克,用1000ml生理盐水碾碎,反复冻融三次,14,000g低温离心60分钟。上清经1000Da分子筛超滤、冻干。超纯水稀释后,0.22um滤膜过滤,经反向高效液相纯化分析,收获洗脱峰值时间为11.19 min的活性峰(见图1),经 MALDI-TOF-MS分析,分子量为1068.22,氨基酸序列LMTFRNEGT(见图

2)。

[0022] 实施例2

1. 人工合成 BP9

委托商业化多肽合成公司按照LMTFRNEGT序列 (SEQ ID No.1) 合成多肽,要求纯度 \geq 97%。

[0023] 2. 疫苗

猪用JEV灭活疫苗(购自山东滨州沃华生物工程有限公司)

3. 实验动物分组

将75只BALB/C小鼠随机分为五组,每组15只:(I)PBS 对照组(每只免疫 0.2ml PBS);(II)JEV灭活疫苗免疫组(每只免疫灭活疫苗0.2ml);(III~V)灭活疫苗 +BP9 组(BP9浓度分别为10、50、250 μ g/mL,免疫剂量均为0.2ml);采用腹腔注射的方式对相应组小鼠分别进行两次免疫。免疫间隔两周,200 μ l/每只/每次(表1)。

[0024] 4. 样品采集

小鼠二免后,每周眼眶采血,8000 \times g离心10min分离血清,测定抗体水平和抗体亚型水平;并于第二次免疫后1周采血分离血清,采用蚀斑减少法测定中和抗体,采用流式细胞术检测了第二次免疫后一周小鼠血液中淋巴细胞及其亚群的情况,所有检测结果进行统计分析。

[0025] 表 1 小鼠免疫程序

	0 天	14天
I	PBS	PBS
II	JEV疫苗(vaccine)	JEV疫苗(vaccine)
III	0.01mg/ml BP9+ JEV疫苗	0.01mg/ml BP9+ JEV疫苗
IV	0.05mg/ml BP9+ JEV疫苗	0.05mg/ml BP9+ JEV疫苗
V	0.25mg/ml BP9+ JEV疫苗	0.25mg/ml BP9+ JEV疫苗

5. 结果

(1) 抗体水平检测结果

采用间接ELISA方法测定了小鼠免疫后6周的血清中针对JEV抗原的抗体水平,结果见图3。实验显示,第六周,BP9联合免疫组与只免疫疫苗组小鼠相比,抗体水平出现极显著差异,且灭活疫苗+0.01mg/ml BP9组的抗体水平最高。

[0026] (2) 抗体亚型水平检测结果

免疫后6周采血分离血清,用ELISA方法对各组小鼠血清中JEV特异的抗体亚型检测检测,结果见图4。结果表明,与疫苗组对照相比,BP9联合免疫组明显提高IgG1和IgG2a抗体水平,不过随着BP9浓度的增加,而两种抗体亚型水平则下降,这说明BP9促进疫苗免疫的能力与其剂量密切相关。

[0027] (3) 中和抗体水平检测结果

采用蚀斑形成与蚀斑减少实验测定小鼠二免后一周的血清中针对JEV的中和抗体的水平,结果见图5。BP9对中和抗体的产生有明显的剂量依赖性,免疫剂量为0.01mg/ml时,促进效果最明显(与单独免疫抗原的组相比,差异极显著, $P<0.0001$)且剂量越大,对抗体产生的促进效果越小,0.25mg/ml剂量时,基本无促进效果。

[0028] (4) T细胞亚型结果

采用PE、FITC和PE-Cy5标记的CD3、CD4和CD8 单抗 (eBioscience, USA) 三色的流式细胞术技术检测了第二次免疫后一周小鼠血液中淋巴细胞及其亚群的情况, 结果见图6。结果实验表明, 与PBS组相比, 免疫了JEV疫苗的小鼠CD4⁺ T细胞 (CD3⁺CD4⁺) 所占百分比下降, 而CD8⁺ T细胞 (CD3⁺CD8⁺) 占比上升。BP9联合JEV疫苗组与疫苗对照组相比, 基本无变化, 仅有0.01mg/ml组的CD4⁺ T细胞占比显著下降。

[0029] (5) 淋巴细胞增殖结果

采用了MTT比色法检测了BP9对淋巴细胞增殖的影响情况, B-/T- 淋巴细胞有丝分裂原细菌脂多糖 (LPS) /植物血凝素 (PHA) 作为阳性对照, 结果见图7。结果实验表明, 与JEV疫苗组相比较, 同时BP9联合JEV疫苗组的淋巴细胞增殖能力显著增强, 尤其0.01mg/ml BP9的免疫组, 细胞增殖情况差异达到极显著水平。此外, 与单独的LPS组相比, BP9也显著增强了LPS (10 μg/ml) 诱导的脾淋巴细胞的增殖, 但有一定浓度依赖性, 在0.01 mg/ml的情况下增强效果极显著。与单独的PHA 组相比, BP9显著增强了PHA (10 μg/ml) 诱导的脾淋巴细胞的增殖, 且0.01mg/ml的增强效果极显著。结果表明, BP9可以作为免疫佐剂强烈刺激免疫反应。

序列表

<110> 南京农业大学

<120> 一种具有促进疫苗免疫反应的法氏囊活性九肽及其应用

<130> 2017

<160> 1

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<400> 1

Leu Met Thr Phe Arg Asn Glu Gly Thr

5

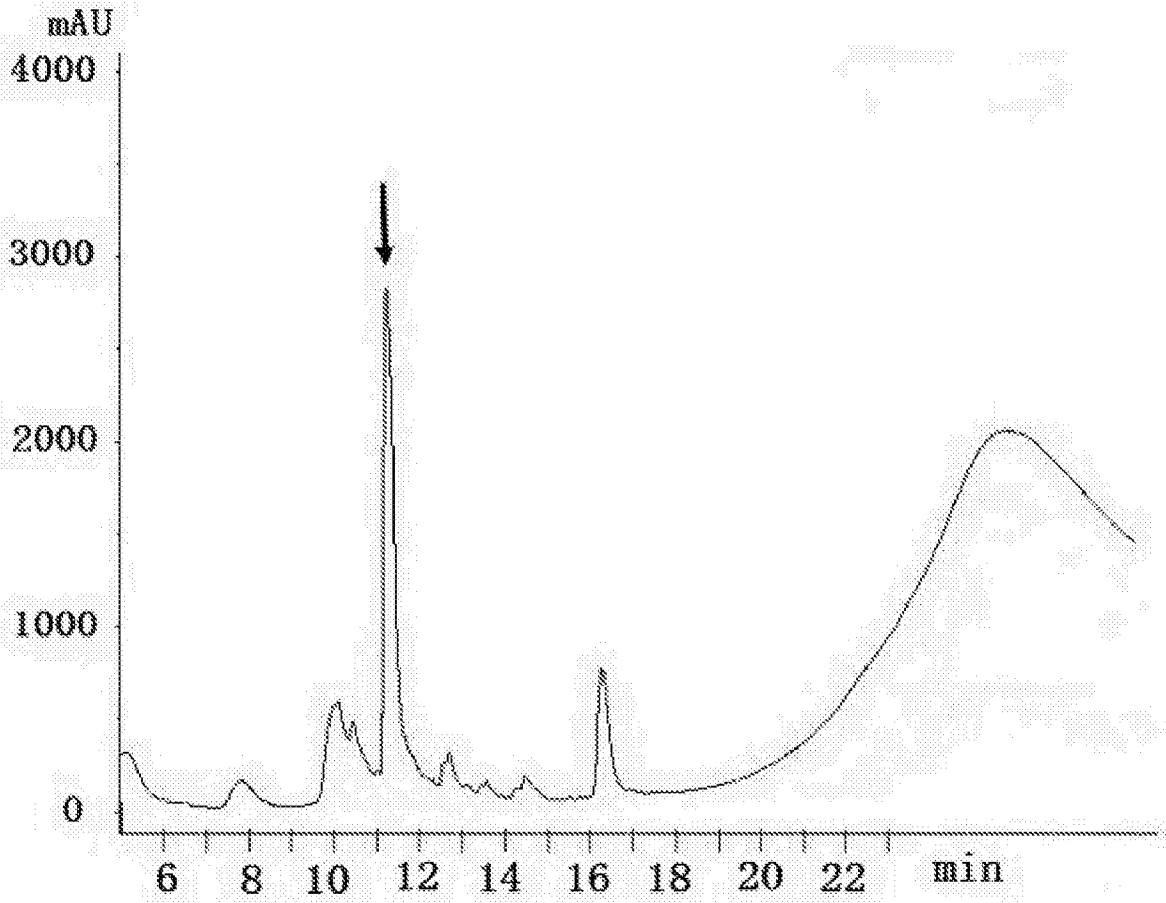


图1

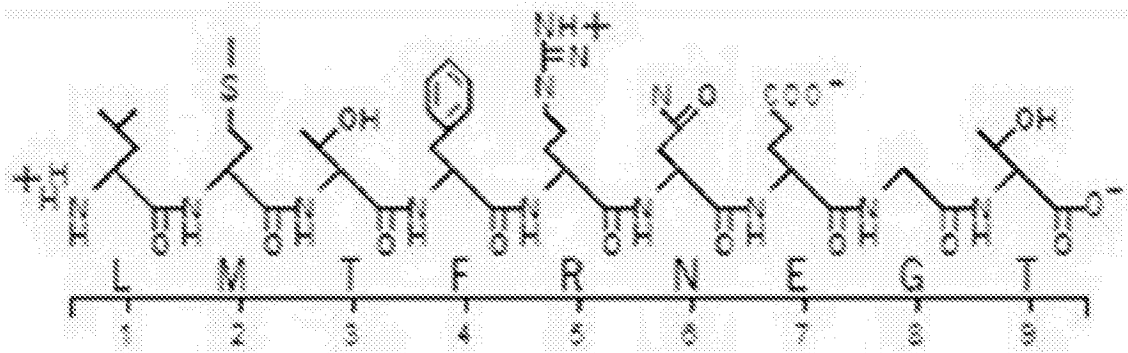


图2

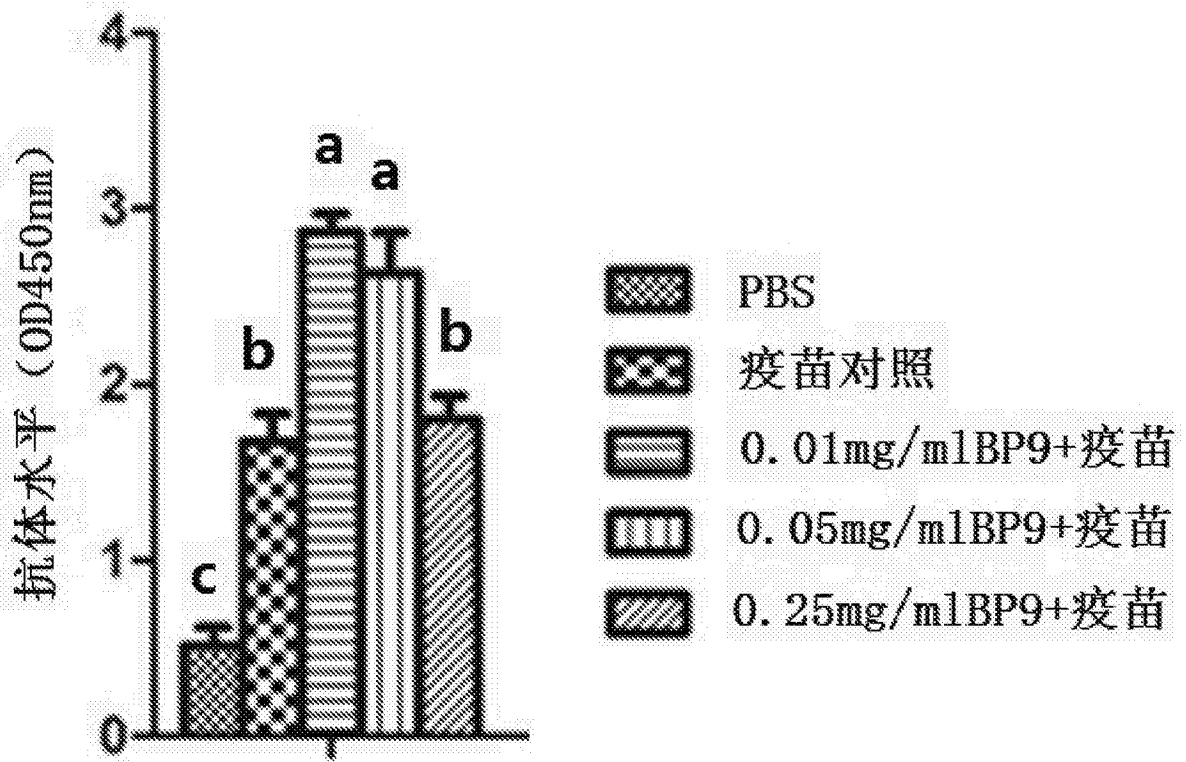


图3

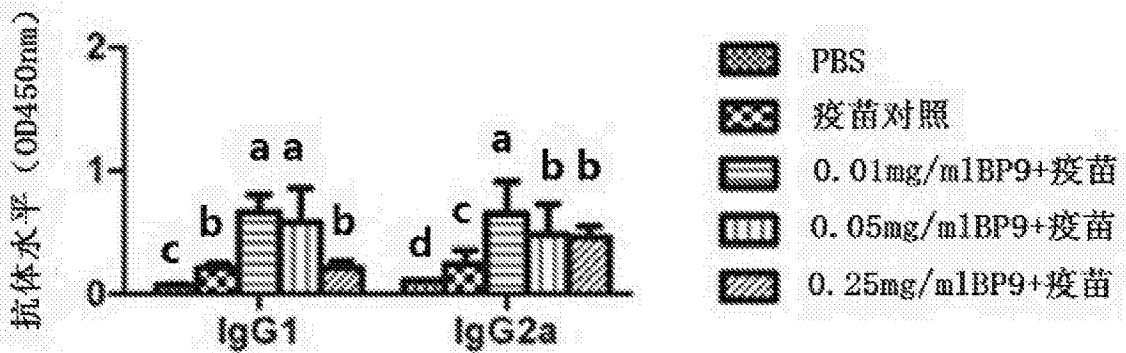


图4

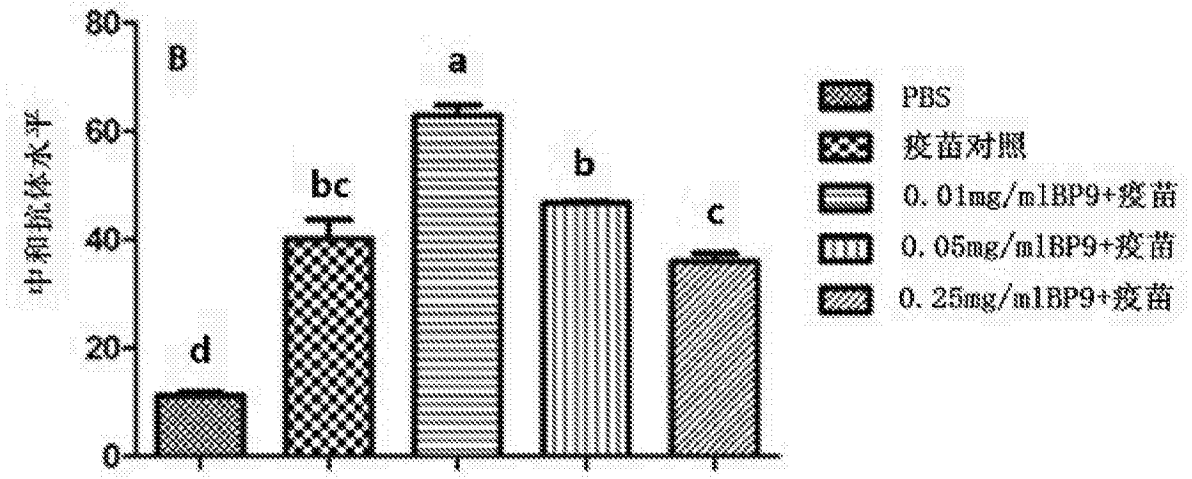


图5

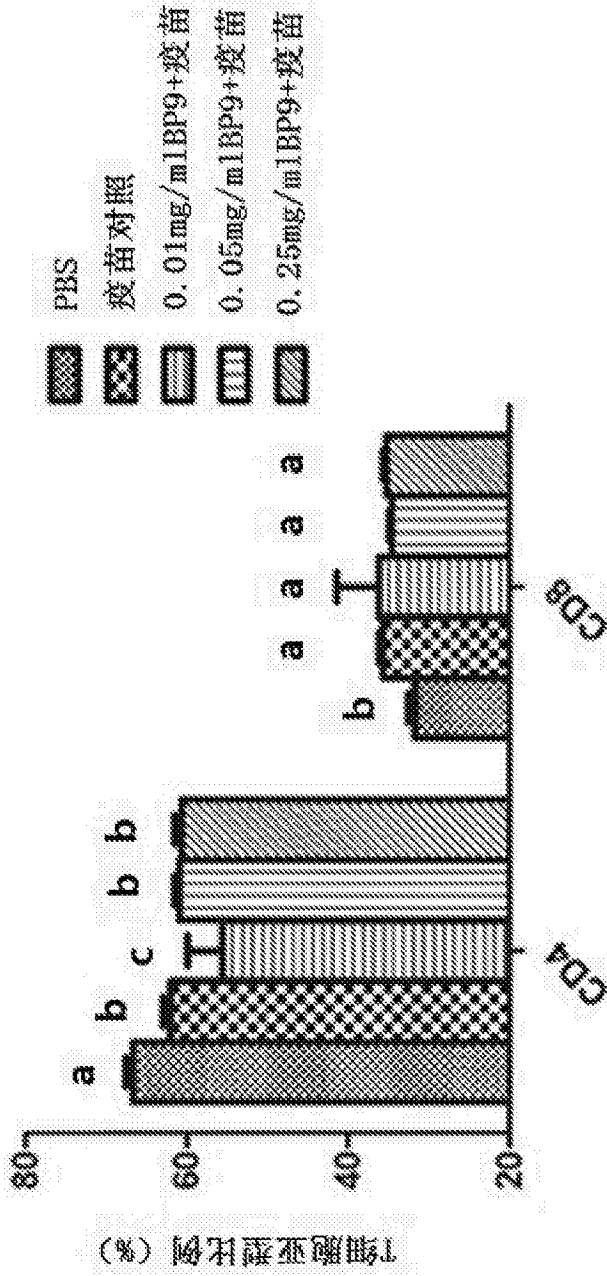


图6

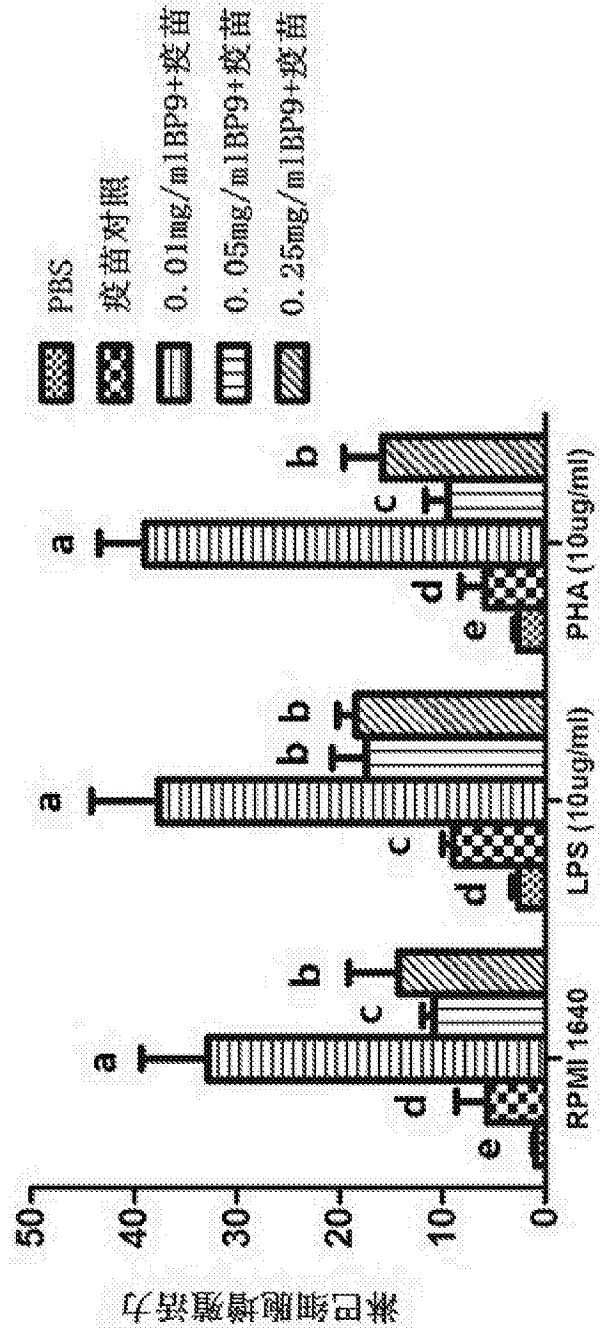


图7