

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610025139.7

[51] Int. Cl.

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月3日

[11] 公开号 CN 101045745A

[22] 申请日 2006.3.28

[21] 申请号 200610025139.7

[71] 申请人 上海安晶生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区李冰路151号

[72] 发明人 邵 钧 王丙云 费 俭 石嘉豪
徐来根

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 徐 迅

权利要求书2页 说明书19页 附图4页

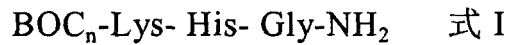
[54] 发明名称

三肽囊素的规模化制备方法及作为禽流感疫苗佐剂的应用

[57] 摘要

本发明涉及新的三肽囊素(免疫佐剂)规模化制备方法,以及三肽囊素用作禽流感疫苗佐剂的用途及其免疫调节机理。本发明还涉及含三肽囊素的药物组合物,及其制法和用途。试验表明,三肽囊素可有效提高抗体滴度。机理研究表明,三肽囊素可增强了红细胞免疫功能,拮抗免疫抑制,减少淋巴细胞、脾细胞及法氏囊细胞凋亡。三肽囊素作为广谱免疫佐剂,具有直接而明显的社会经济效益。

1. 一种式 I 所示的三肽囊素衍生物或其去保护基的式 Ia 所示的三肽囊素衍生物:



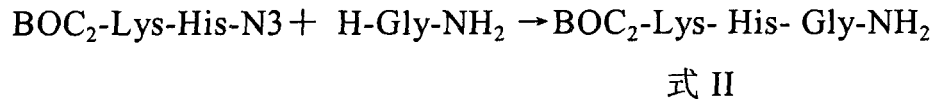
或



式中, BOC 为叔丁氧羰基, n 为 1 或 2。

2. 一种式 Ia 所示的三肽囊素衍生物的制备方法, 其特征在于, 包括步骤:

(a) 将 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 与 H-Gly-NH_2 在惰性溶剂中反应, 形成式 II 化合物:



式中, BOC 为叔丁氧羰基;

(b) 用 HCl/HOAc 处理式 II 化合物, 从而去除保护基, 形成式 Ia 化合物:



3. 如权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述的 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 是通过以下步骤制备的:

(i) 在惰性溶剂中, 使 $\text{BOC}_2\text{-Lys-OSU}$ 与 H-His-OCH_3 反应, 形成 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-OCH}_3$;



式中, BOC 为叔丁氧羰基; OSU 为 N-羟基琥珀酰亚胺酯;

(ii) 在惰性溶剂中, 将 $\text{BOC-Lys(BOC)-His-OCH}_3$ 与水合肼, 在 $65 \pm 5^\circ\text{C}$ 加热反应 2-10 小时形成 $\text{BOC-Lys(BOC)-His-NHNH}_2$;

(iii) 在惰性溶剂中, 在 -25°C 至 -15°C 下, 将 $\text{BOC-Lys(BOC)-His-NHNH}_2$ 与氯化氢的 THF 溶液和亚硝酸叔丁酯反应, 形成 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 。

4. 一种式 Ia 所示的三肽囊素衍生物的制备方法, 其特征在于, 包括步骤:

(a') 在合适的惰性溶剂中, 在胰蛋白酶存在下, 在 pH 为 6.5-7.5 和 $30-40^\circ\text{C}$ 下, 使 BOC-Lys-OH 和 $\text{HCl}_2\text{-His-Gly-NH}_2$ 反应, 形成式 III 化合物:



式 III

式中，BOC 为叔丁氧羰基；

(b')用 HCl/HOAc 处理式 III 化合物，从而去除保护基，形成式 Ia 化合物：



5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的 $\text{HCl}_2\text{-His-Gly-NH}_2$ 是用活化酯缩合法，通过 $\text{BOC}_2\text{-His-OSU}$ 和 H-Gly-NH_2 的反应而制备的。

6. 一种用权利要求 2 或 4 所述的方法制备的式 Ia 所示的三肽囊素衍生物。

7. 一种药物组合物或疫苗组合物，其特征在于，它含有权利要求 6 所述三肽囊素和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求 7 所述的组合物，其特征在于，所述的组合物是禽流感疫苗组合物，更佳地所述禽流感疫苗组合物中，三肽囊素的含量是每 1000 毫升或 1000g 动物疫苗中含有 100-1000 微克三肽囊素。

9. 三肽囊素或其活性衍生物用途，其特征在于，用于制备禽流感疫苗，所述的禽流感疫苗含有三肽囊素或其活性衍生物作为免疫佐剂。

10. 一种三肽囊素或其活性衍生物用途，其特征在于，所述的用途包括：

- (a) 用于制备增强红细胞非特异性免疫功能的药物组合物；
- (b) 用于制备拮抗免疫抑制剂所导致的免疫抑制作用的药物组合物；
- (c) 用于制备减少胸腺细胞和/或脾细胞凋亡的药物组合物；
- (d) 用于制备提高外周血 ANAE 淋巴细胞的比例的药物组合物；或
- (e) 用于制备提高血清 IL-2 水平的药物组合物。

三肽囊素的规模化制备方法及作为禽流感疫苗佐剂的应用

技术领域

本发明涉及兽医学和兽药学、免疫学领域。更具体地，本发明涉及新的三肽囊素(免疫佐剂)规模化制备方法，以及三肽囊素用作禽流感疫苗佐剂的用途及其免疫调节机理。本发明还涉及含三肽囊素的药物组合物，及其制法和用途。

背景技术

囊素三肽(也称为“三肽囊素”)是 Audhya 在 1986 年首次从法氏囊中分离到的一种称为 Bursin 的三肽，氨基酸顺序为 Lys-His-Gly-NH₂，功能是诱导禽类和哺乳类的 B 细胞前体分化为 B 细胞，选择性分化激素，对体液免疫起着重要的调节作用(T.Audhye et al, Science,231,997,1986)。1991 年他们又从牛骨髓和肝脏中分离到它的前体 14 肽(Probursin)FFWKTKPRK**KHG**GRR，具有同样生物学活性。

针对当前规模化、集约化养殖业中普遍面临的畜禽群体免疫功能低下和疫苗免疫水平不高，甚至有的疫苗有免疫抑制作用的重要问题，同时针对市场上缺乏严格质量控制的畜禽用免疫增强剂，研制出既具有较强免疫调节功能，具明显佐剂活性的安全、高效、质量稳定、价格低廉的免疫佐剂是预防兽医学研究的重要方向和发展趋势之一。

近年来，禽流感已成为世界关注的严峻问题，如何提高禽流感疫苗的作用 是开发高效低成本疫苗的关键，其中囊素肽作为免疫增强剂已受到充分的证实。传统上，利用提取的囊素肽虽然能够在加强疫苗效果中获得应用，但是质量控制存在非常严重的问题。

利用人工合成的囊素三肽，虽然可以解决质量控制的问题，但是由于是畜牧业用的疫苗，以目前的工艺还存在成本太高，无法推广使用的困难。所以研制低成本、适合产业化的增强型禽流感疫苗佐剂是本领域迫切需要的。

现有技术中虽然有公开了一些合成三肽囊素的方法，但是步骤烦琐，无法大幅度降低成本，或者合成的三肽囊素活性较低。

综上所述，为了推广活性肽疫苗佐剂的应用，迫切需要开发新的制法简便、

成本低廉、适合规模化制备三肽囊素的方法。

发明内容

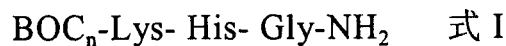
本发明的目的就是提供一种制法简便、成本低廉、适合规模化制备三肽囊素的方法。

本发明的另一目的是提供用所述方法制备的三肽囊素。

本发明的另一目的是提供所述三肽囊素作为禽流感疫苗佐剂的用途及其免疫调节机理。

本发明的另一目的是提供含有所述三肽囊素的药物组合物，及其制法和用途。

在本发明的第一方面，提供了一种式 I 所示的三肽囊素衍生物或其去保护基的式 Ia 所示的三肽囊素衍生物：



或



式中，BOC 为叔丁氧羰基，n 为 1 或 2。

在本发明的第二方面，提供了一种式 Ia 所示的三肽囊素衍生物的制备方法(叠氮-活化酯)，包括步骤：

(a) 将 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 与 H-Gly-NH_2 在惰性溶剂中(通常 pH 为 7-8,温度为 -10°C 至 4°C ，例如约 0°C)反应，形成式 II 化合物；



式 II

式中，BOC 为叔丁氧羰基；

(b) 用 HCl/HOAc 处理式 II 化合物，从而去除保护基，形成式 Ia 化合物：



在另一优选例中，所述的 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 是通过以下步骤制备的：

(i) 在惰性溶剂中，使 $\text{BOC}_2\text{-Lys-OSU}$ 与 H-His-OCH_3 反应，形成 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-OCH}_3$ ；



式中，BOC为叔丁氧羰基；OSU为N-羟基琥珀酰亚胺酯；

(ii) 在惰性溶剂中，将BOC-Lys(BOC)-His-OCH₃与水合肼，在65±5℃加热反应2-10小时形成BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂；

(iii) 在惰性溶剂中，在-25℃至-15℃下，将BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂与氯化氢的THF溶液和亚硝酸叔丁酯反应，形成BOC₂-Lys-His-N₃。

在另一优选例中，所述的叠氮-活化酯组合法如图1或实施例1所示。

在本发明的第三方面，提供了一种式Ia所示的三肽囊素衍生物的制备方法(酶促法)，包括步骤：

(a') 在合适的惰性溶剂中，在胰蛋白酶存在下，在pH为6.5-7.5和30-40℃下，使BOC-Lys-OH和HCl₂-His-Gly-NH₂反应，形成式III化合物；



式 III

式中，BOC为叔丁氧羰基；

(b')用HCl/HOAc处理式III化合物，从而去除保护基，形成式Ia化合物：



在另一优选例中，在步骤(a')中，用硅胶薄层层析监测HCl₂-His-Gly-NH₂二肽，当HCl₂-His-Gly-NH₂二肽基本消失时停止步骤(a')。

在另一优选例中，所述的胰蛋白酶酶促缩合法如图2或实施例2所示。

在另一优选例中，所述的HCl₂-His-Gly-NH₂是用活化酯缩合法，通过BOC₂-His-OSU和H-Gly-NH₂的反应而制备的。

在本发明的第四方面，提供了用上述方法制备的式Ia所示的三肽囊素衍生物。

在本发明的第五方面，提供了一种药物组合物或疫苗组合物，它含有本发明所述的三肽囊素和药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的组合物为注射剂或口服制剂。

在另一优选例中，所述的组合物是禽流感疫苗组合物，更佳地所述禽流感疫苗组合物中，三肽囊素的含量是每1000毫升或1000g动物疫苗中含有100-1000微克三肽囊素，更佳地150-400微克。

在本发明的第六方面，提供了三肽囊素或其活性衍生物用途，它被用于制备禽流感疫苗，所述的禽流感疫苗含有三肽囊素或其活性衍生物作为免疫佐

剂。

在另一优选例中，所述的禽流感疫苗的用量为按动物体重每公斤使用三肽囊素 3-30 微克(更佳地 5-15 微克)。

在另一优选例中，所述的疫苗采用注射或口服或眼滴或喷雾法给予。

在本发明的第七方面，提供了一种三肽囊素或其活性衍生物用途，所述的用途包括：

- (a) 用于制备增强红细胞非特异性免疫功能的药物组合物；
- (b) 用于制备拮抗免疫抑制剂所导致的免疫抑制作用的药物组合物；
- (c) 用于制备减少胸腺细胞和/或脾细胞凋亡的药物组合物；
- (d) 用于制备提高外周血 ANAE 淋巴细胞的比例的药物组合物；或
- (e) 用于制备提高血清 IL-2 水平的药物组合物。

在另一优选例中，所述的药物组合物包括疫苗组合物。

在另一优选例中，所述的免疫抑制剂是如环磷酰胺。

在本发明的第八方面，提供了一种降低药物组合物的免疫抑制作用的方法，其中所述的药物组合物含有免疫抑制剂，所述方法包括步骤：在1000kg所述组合物中添加100-1000微克(更佳地150-400微克)的三肽囊素。

在本发明的第九方面，提供了一种增强禽类动物免疫力的方法，它包括给所述禽类施用按动物体重每公斤使用三肽囊素3-30微克(更佳地5-15微克)。

附图说明

图 1 显示了叠氮-活化酯组合法合成三肽囊素流程图。

图 2 显示了胰蛋白酶酶促合成三肽囊素流程图。

图 3 显示了三肽囊素(BS)对胸腺发育的影响。其中，横坐标：时间(天)；纵坐标：胸腺指数=胸腺重量/禽体重(I：对照组；II：5 μg/Kg；III：10 μg/Kg；IV：30 μg/Kg)。

图 4 显示了三肽囊素(BS)对脾脏发育的影响。其中，横坐标：时间(天)；纵坐标：脾脏指数=脾脏重量/禽体重(I：对照组；II：5 μg/Kg；III：10 μg/Kg；IV：30 μg/Kg)。

图 5 显示了三肽囊素 KHG-NH₂ 的高压液相鉴定结果。其中，横坐标：时间；纵坐标：A₂₃₀ 紫外吸收。

具体实施方式

本发明人经过深入而广泛的研究，首次研发出了低成本、适合规模化且又不会引起多肽消旋的三肽囊素的生产方法，即三肽囊素的叠氮-活化酯组合液相合成法和酶法制备法。

基于本发明新的低成本制备方法，本发明还提供将此三肽囊素应用到禽流感疫苗作为佐剂，从而广谱提高禽类免疫能力的用途。试验证明，本发明提供的三肽囊素可以提高禽类红细胞非特异性免疫功能；拮抗环磷酰胺引起免疫抑制；减少胸腺、脾脏、法氏囊细胞凋亡；增加免疫器官发育。因此，从机理上证明了三肽囊素可以广泛作为畜禽免疫佐剂使用。

术语

如本文所用，除非另外说明，术语通常具有在本领域中常用的含义。

如本文所用，术语“BS”指三肽囊素。

如本文所用，术语“CP”指环磷酰胺。

如本文所用，术语“Gly”指甘氨酸(G)。

如本文所用，术语“His”指组氨酸(H)。

如本文所用，术语“Lys”指赖氨酸(K)。

如本文所用，术语“BOC”指叔丁氧羰基。

如本文所用，术语“HOSU”指N-羟基琥珀酰亚胺。

如本文所用，术语“OSU”指N-羟基琥珀酰亚胺酯。

如本文所用，术语“DCCI”指二环己基碳二亚胺。

如本文所用，术语“DCU”指二环己基脲。

如本文所用，术语“HCl”指氯化氢。

如本文所用，术语“NaOH”指氢氧化钠。

如本文所用，术语“NaCl”指氯化钠。

如本文所用，术语“THF”指四氢呋喃。

如本文所用，术语“HOAC”指醋酸。

如本文所用，术语“DMF”指二甲基甲酰胺。

如本文所用，术语“HPLC”指高压液相色谱。

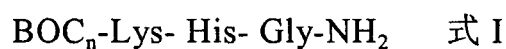
如本文所用，术语“禽类”包括鸡、鸭、鹅、鸽子、鹌鹑、火鸡等各种禽类。

如本文所用，术语“三肽囊素”和“囊素三肽”可互换使用。另外，所述术语还包括三肽囊素的衍生物(例如药学上可接受的盐形式，如盐酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐等)。

制备方法

由于活性多肽组成的氨基酸具有光学活性，因此，在多肽合成时对选择的缩合剂和接肽方法必须能保证产物的光学活性。叠氮合成与酶促合成是最少引起消旋的方法，保证三肽的光学活性纯度，而且此方法可以大规模放大。

具体地，本发明提供了式I或式Ia所示的三肽囊素衍生物的制备方法。



式中，BOC为叔丁氧羰基，n为1或2。

一种优选的方法是叠氮-活化酯组合法。其制备流程图如图1所示。

步骤一、BOC-Lys(BOC)-OSU 制备：

将L-Lys-OH溶于碱性水溶液(如1N NaOH溶液)中，在室温下(如4-20℃)滴加BOC酸酐的叔丁醇溶液，维持反应液pH约为8-9。反应时间没有特别限制，通常为1-24小时。反应完成后，反应溶液用冰浴冷却，调节pH至酸性(如约pH 4)，用乙酸乙酯抽提，以NaCl水溶液洗至pH中性，干燥，减压抽去乙酸乙酯，即可获得BOC-Lys(BOC)-OH。

将BOC-Lys(BOC)-OH溶于惰性有机溶剂(如THF)中，与等摩尔的HOSU(300毫克分子)在-10℃至-2℃(如-5℃左右)反应。反应完成后，去除DCU副产物，用结晶法等方法可获得所需的BOC-Lys(BOC)-OSU。

步骤二、2HCl-His-OCH₃ 制备：

向L-His-OH与无水甲醇的混合物中，通入氯化氢至饱和，回流至His完全溶解，反应1-50小时(如放置过夜)。反应结束后，可析出大量结晶，即为2HCl-His-OCH₃。

步骤三、BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂ 制备：

将BOC-Lys(BOC)-OSU溶于合适的惰性溶剂(如THF中), 加入2HCl-His-OCH₃, 并加入三乙胺, 搅拌反应。反应时间通常为1-50小时(如反应过夜)。反应结束后, 减压抽去溶剂, 经乙酸乙酯萃取、洗涤、干燥、结晶等, 加入乙醚结晶等步骤, 可获得固体形式的BOC-Lys(BOC)-His-OCH₃。

将BOC-Lys(BOC)-His-OCH₃溶于合适的惰性溶剂(如甲醇)中, 加入水合肼, 加热回流(约65±5℃)反应一段时间(如2-10小时, 更佳地约6小时), 冷却后析出固体, 过滤, 收集固体, 洗涤, 干燥, 就获得了BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂。

步骤四、BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂ 制备:

将BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂溶于合适的惰性溶剂中(如DMF)中, 在约-20℃(如-25℃至-15℃)的温度下, 加入氯化氢的THF溶液和亚硝酸叔丁酯, 维持反应温度半小时后, 加入三乙胺, 反应液pH调至7-8左右。随后加入H-Gly-NH₂, 反应完成后, 滤去三乙胺盐酸盐固体。从滤液中分离获得反应产物, 即为BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂粗产物。

对BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂粗产物进行硅胶层析, 即可获得纯化的BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂精制固体。

步骤五、2HCl-Lys-His-Gly-NH₂

对上述精制固体用常规方法去除保护基BOC, 例如溶于HCl/HOAc溶液中, 25℃搅拌反应1.5小时, 减压抽去HCl/HOAc, 残留物用甲醇100毫升溶解, 再次减压抽干, 带去多余HCl, 用无水乙醚研磨成粉, 即可获得2HCl-Lys-His-Gly-NH₂。

另一种优选的方法是胰蛋白酶酶促合成法。其制备流程图如图2所示。

步骤一、BOC-His(BOC)-OSU 制备:

将BOC-His(BOC)-OH溶于合适的惰性有机溶剂(如THF)中, 加入HOSU, 在约-5℃以下(如-10℃至-5℃), 加入DCCI, 反应完成后, 滤去DCU固体, 从滤液中用常规方法分离获得固体, 即为BOC-His(BOC)-OSU

步骤二、BOC-His(BOC)-Gly-NH₂ 制备:

将BOC-His(BOC)-OSU溶于合适的惰性溶剂(如THF)中, 与HCl-Gly-NH₂和

三乙胺混合，将反应混合物维持pH 7.7左右(如7.5-8.0)，搅拌反应一段时间(如1-50小时)。反应结束后，用乙酸乙酯萃取，洗涤、无水硫酸钠干燥，滤去干燥剂，滤液减压浓缩至小体积，加入石油醚至微混，可析出固体，即为BOC-His(BOC)-Gly-NH₂。

步骤三、HCl₂-His-Gly-NH₂制备：

对BOC-His(BOC)-Gly-NH₂用常规方法去除保护基BOC，例如用HCl/HOAc溶液处理，即可获得HCl₂-His-Gly-NH₂。

步骤四、BOC-Lys-His-Gly-NH₂酶促合成：

将BOC-Lys-OH和HCl₂-His-Gly-NH₂溶于合适的惰性溶剂(如1,4-丁二醇：水(7：1)混合溶剂)中，调节pH为6.5-7.5。在胰蛋白酶(优选的是各种市售的固相化胰蛋白酶，其中固相酶与底物重量比为1：10~1：20)存在下，于30-37℃保温并搅拌反应，用硅胶薄层层析监测HCl₂-His-Gly-NH₂二肽基本消失时停止反应。然后，从反应混合物中分离出BOC-Lys-His-Gly-NH₂。

5. HCl₂-Lys-His-Gly-NH₂的制备：

对上述获得的BOC-Lys-His-Gly-NH₂用常规方法去除保护基，例如溶于35毫升4N HCl/HOAc室温反应1.5小时，减压抽干醋酸，加入甲醇100毫升溶解残留物，再次减压抽干甲醇，去除残余HCl，抽干后用少量甲醇溶解，加入乙醚，析出固体，滤集固体，乙醚洗涤，干燥，即可获得2HCl-Lys-His-Gly-NH₂。

对于获得的2HCl-Lys-His-Gly-NH₂，可以直接使用。另外，将其溶解于常规的PBS等缓冲液时，会转化成相应的Lys-His-Gly-NH₂。

作用机理

应理解，本发明的保护范围并不受到具体机理的限制。然而，为了便于理解三肽囊素的作用，本发明人还提供了机理研究的结果。本发明的试验结果表明，三肽囊素具有：免疫调节剂功能；增强红细胞非特异性免疫功能；拮抗免疫抑制剂-环磷酰胺所导致的免疫器官受损、免疫器官的细胞凋亡的功能。因此三肽囊素可作为广谱免疫佐剂，不仅提高禽类生长和饲料转化率，并可促进免疫器官的发育,拮抗有些疫苗带来的免疫抑制。

基于上述作用机理，本发明还提供了三肽囊素的新用途，它们包括：

(1) 用于制备增强红细胞非特异性免疫功能的药物组合物(包括免疫组合物，如疫苗)；

(2) 用于制备拮抗免疫抑制剂(如环磷酰胺)所导致的免疫抑制作用的药物组合物(包括免疫组合物，如疫苗)。

(3) 用于制备减少胸腺细胞和/或脾细胞凋亡的药物组合物(包括免疫组合物，如疫苗)。

(4) 用于制备药物组合物(包括免疫组合物，如疫苗)，所述的组合物用于提高外周血 ANAE 淋巴细胞的比例、或提高血清 IL-2 水平。

疫苗组合物

本发明还提供了一种药物组合物(包括免疫组合物，如疫苗)，它含有安全有效量的本发明三肽囊素作为免疫佐剂以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如注射剂之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。

三肽囊素的给药量是治疗有效量或有效预防量，例如给予家禽时，用量为 5-30 微克/千克体重，更佳地为 5-15 微克/千克体重。例如，当三肽囊素被用作禽流感疫苗中免疫佐剂时，其用量可以是按动物体重每公斤使用三肽囊素 5-10 微克。

本发明的药物组合物可以用常规方式施用于动物。例如，本发明的疫苗采用注射或口服或眼滴或喷雾法给予家禽或家畜。

本发明的主要优点在于：

1. 本发明的三肽囊素制备方法适合规模化生产，成本低廉，并且可保持活性多肽的光学性质，进而保持活性。本发明所制备三肽囊素质量达高压液相 98% 纯，质谱测定分子量为 339.1，符合理论分子量。

2. 本发明的方法所产生的三肽囊素可作为免疫佐剂增加禽流感疫苗的免疫功能，从而预防和治疗禽类高致病性病毒感染。

3. 本发明的机理研究证明, 三肽囊素具有: 免疫调剂功能; 增强红细胞非特异性免疫功能; 拮抗免疫抑制剂-环磷酰胺所导致的免疫器官受损、免疫器官的细胞凋亡的功能。因此三肽囊素可作为广谱免疫佐剂, 不仅提高禽类生长和饲料转化率, 并可促进免疫器官的发育, 拮抗有些疫苗带来的免疫抑制。

4. 由于在哺乳类动物胸腺和脾脏中已发现了三肽囊素及其前体, 所以本发明三肽囊素也可用作家畜的免疫佐剂。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照制造厂商所建议的条件。另外, 除非另外说明, 否则所有的百分比和份数按重量计算。

实施例1:

叠氮与活化酯组合法:

参见图1。各步骤如下:

1. BOC-Lys(BOC)-OSU 制备:

取100克L-Lys-OH(684毫克分子)溶于800毫升 1N NaOH溶液中, 室温下滴加700毫升含340克BOC酸酐的叔丁醇溶液, 用4N NaOH水溶液维持反应液pH 8-9, 共用4N NaOH 400毫升, 室温反应过夜。次日, 反应溶液用冰浴冷却, 用1N HCl调至pH 4, 乙酸乙酯抽提3次, 合并乙酸乙酯层, 以5% NaCl水溶液洗至pH中性, 无水硫酸钠干燥, 滤去干燥剂, 减压抽去乙酸乙酯, 得白色油状物215克, 产率91%。

称取103.9克BOC-Lys(BOC)-OH(300毫克分子)溶于500毫升THF中, 加入34.5克HOSU(300毫克分子), 待固体完全溶解后, 用盐冰浴冷却, 反应液保持-5℃左右, 在搅拌下加入含61.8克DCCI(300毫克分子)的THF溶液100毫升, 在-5℃下反应3小时, 室温反应6小时, 滤去反应产生的DCU副产物, 并用少量THF洗涤DCU固体数次(弃去), 滤液减压浓缩至干, 残留物用300毫升异丙醇热溶解, 待冷后加入正丁烷300毫升, 析出固体, 得112克, 产率84%, 熔点: 93-94℃。

2. 2HCl-His-OCH₃ 制备:

称取250毫克L-His-OH(1.6克分子)悬浮于无水甲醇2000毫升中, 通入氯化

氢至饱和，反应液装上冷凝管，回流至His完全溶解，放置过夜。次日，析出大量结晶，过滤收集结晶，无水乙醚洗2次，干燥，得368.9克，产率95%，熔点204.8-205.4℃。

3. BOC-Lys(BOC)-His-NH₂ 制备:

称取88.5克BOC-Lys(BOC)-OSU(200毫克分子)溶于300毫升THF中，加入53.1克研细2HCl-His-OCH₃(220毫克分子)，在悬浮中滴加入61.6毫升三乙胺，搅拌反应过夜。次日，减压抽去THF后加入乙酸乙酯500毫升，依次用5%柠檬酸水溶液100毫升×3次、5% NaCl水溶液洗至pH中性，5%碳酸钾水溶液100毫升×3次、5% NaCl水溶液洗至pH中性，无水硫酸钠干燥，滤去干燥剂后将乙酸乙酯浓缩至小体积，加入乙醚至混，即得固体BOC-Lys(BOC)-His-OCH₃ 75.4克，产率94%，熔点118-120℃。

称取79.8克BOC-Lys(BOC)-His-OCH₃(160毫克分子)溶于200毫升甲醇中，加入32.7毫升98%水合肼，加热回流(65℃)反应6小时，冷却后析出固体，过滤，收集固体，乙醚洗2次，在装有浓硫酸的干燥器内真空干燥，得75.4克BOC-Lys(BOC)-His-NH₂，产率80%，熔点：140-141℃。

4. BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂ 制备:

称取74.7克BOC-Lys(BOC)-His-NH₂(150毫克分子)溶于58毫升二DMF(预先处理)中，在干冰中冷却至-20℃，加入3.1N氯化氢/THF 291毫升，搅拌1-2分钟后，加入28.5毫升亚硝酸叔丁酯，维持反应温度-20℃半小时后，滴加126毫升三乙胺，反应液pH调至7-8左右，随后加入13.3克H-Gly-NH₂(180毫克分子)10毫升二甲基甲酰胺溶液，加毕后放置冰箱(4℃)反应过夜。次日，滤去三乙胺盐酸盐固体，滤液减压浓缩至小体积，加入400毫升乙醚，得白色沉淀，滤集固体，用乙醚洗2次，得BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂粗产物73克，产率90%。

称取1500克硅胶(80-120目)，用热水、氯仿、甲醇、水洗后，置于100℃烘箱过夜。次日，装玻璃干柱。另取40克BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂粗产物溶于150毫升氯仿：甲醇(8：2)混合溶剂中，并加入70克硅胶，充分搅拌并抽干溶剂，将其铺于硅胶柱上端，用氯仿：甲醇(8：2)溶液洗脱，部分收集流出液体，用薄层层析鉴定每管洗脱液，合并BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂纯度均一的部分，浓缩至小体积，加入乙醚，析出固体，得21克，熔点120-121℃。

5. 2HCl-Lys-His-Gly-NH₂

取上述精制固体溶于300毫升4N HCl/HOAc溶液中，25℃搅拌反应1.5小时，减压抽去HCl/HOAc，残留物用甲醇100毫升溶解，再次减压抽干，带去多余HCl，用无水乙醚研磨成粉，得15.3克，产率95.6%，熔点：188.5-195℃。

6. 产物鉴定：

(1). 氨基酸组成分析：Lys : His : Gly = 0.9 : 0.95 : 1(表1)。

表1 三肽囊素氨基酸组成分析结果

氨基酸	理论值	实测值
Lys	1	0.90
His	1	0.95
Gly	1	1

(2). HPLC分析：

柱：Zorbax Eclipse XDB-C₈(Agilent)4.6×150 mm I.D., 5 μ m particle size;

鉴定条件：线性A B梯度(从0至 30分钟, B是从0至60%, A 是从0.1% TFA起，并且洗脱剂B是甲醇)；

流速：1毫升/分钟；紫外检测：230 nm；温度：室温。

结果如图5所示。

(3). 质谱分析结果符合理论值MW：339.1。

实施例2：

酶促合成法

参见图2。各步骤如下：

1. BOC-His(BOC)-OSU 制备：

称取106.6克BOC-His(BOC)-OH(300毫克分子)溶于500毫升THF中，加入34.5克HOSU(300毫克分子)全部溶解后，盐冰浴冷至-5℃以下，滴加61.8克DCCI的THF溶液，加毕后反应液放置冰箱过夜。次日，滤去DCU固体，滤液减压浓缩至干，加入150毫升热的异丙醇溶解残留物，待冷后加入500毫升正己烷，析

出固体，滤集固体，得113.4克，产率83.6%，熔点：66.2-68℃。

2. BOC-His(BOC)-Gly-NH₂ 制备：

称取112.2克BOC-His(BOC)-OSU(248毫克分子)溶于THF 300毫升中，加入27.2克HCl-Gly-NH₂(248毫克分子)，混合后慢慢滴加68毫升三乙胺，反应液维持pH 7.8左右，室温搅拌反应过夜。次日，减压抽去THF，加入乙酸乙酯500毫升，依次用5%柠檬酸水溶液、5% NaCl水溶液洗至pH中性及5%碳酸钾水溶液100毫升、5% NaCl水溶液洗至pH中性，无水硫酸钠干燥，滤去干燥剂，滤液减压浓缩至小体积，加入石油醚至微混，析出固体，得62.3克BOC-His(BOC)-Gly-NH₂，产率60%，熔点78℃。

3. HCl₂-His-Gly-NH₂制备：

称取60克BOC-His(BOC)-Gly-NH₂加入400毫升4N HCl/HOAc室温反应1.5小时，减压抽干醋酸，加入甲醇100毫升溶解残留物，再次减压抽干甲醇，去除残余HCl，抽干后用少量甲醇溶解，加入乙醚，溶液浑浊，放置得28.2克HCl₂-His-Gly-NH₂。

4. BOC-Lys-His-Gly-NH₂酶促合成：

称取24.6克BOC-Lys-OH(100毫克分子)和8.14克HCl₂-His-Gly-NH₂(33毫克分子)溶于100毫升1,4-丁二醇：水(7：1)混合溶剂中，并调pH 6.5-7.5，分批加入固相化的胰蛋白酶(固相酶与底物重量比为1：10~1：20)，于30-37℃保温并搅拌反应，用硅胶薄层层析监测HCl₂-His-Gly-NH₂二肽基本消失时停止反应，滤去固相酶，滤液加入5%碳酸钾水溶液，并用乙酸乙酯抽提2次，合并乙酸乙酯层，5% NaCl洗至pH中性，无水硫酸钠干燥，滤去干燥剂，乙酸乙酯减压浓缩至小体积，加入正己烷，析出固体，得8.7克，产率60%

5. HCl₂-Lys-His-Gly-NH₂的制备：

上述获得的8.7克BOC-Lys-His-Gly-NH₂溶于35毫升4N HCl/HOAc室温反应1.5小时，减压抽干醋酸，加入甲醇100毫升溶解残留物，再次减压抽干甲醇，去除残余HCl，抽干后用少量甲醇溶解，加入乙醚，析出固体，滤集固体，乙醚洗2次，干燥，得7.74克，产率95%，熔点188-195℃。

6. 产物鉴定:

氨基酸分析、HPLC及质谱鉴定方法与叠氮法(实施例1)一致。

结果表明,氨基酸分析和HPLC检测结果与实施例1的结果相同,质谱分析结果符合理论值MW: 339.1。

实施例3:

三肽囊素对H5、H9禽流感疫苗有显著佐剂功能(H5 是高致病性禽流感病毒疫苗):

本实施例中选择了禽流感疫苗进行研究。480只一日龄墟岗黄鸡,购自佛山市墟岗黄畜牧有限公司。

动物随机分组如下表2所示,在雏鸡购回后适应一周,注射疫苗。

表1 试验动物的分组

	BS/体重 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	BS用量(μg)		合计 (μg)
		4d	7d	
I (对照组)	0	0.00	0.00	0.00
II (低剂量)	5	0.25	0.35	0.60
III(中剂量)	10	0.50	0.70	1.20
IV(高剂量)	30	1.50	2.10	3.60

对照组(I):

普通疫苗组(II),即市售的H5-H9亚型抗原禽流感油乳剂灭活疫苗;浓缩疫苗组(III),即用病毒超滤膜将上述等量灭活病毒液浓缩至一半,使抗原浓度提高一倍;囊素疫苗组(IV),即H5-H9亚型囊素禽流感油乳剂灭活疫苗加入三肽囊素。

结果:

鸡群健康,用药组体重增加高于对照组。在注射疫苗后第一周开始每周每组随机选取10只鸡采集血样,用血凝抑制试验进行抗体水平的测定。结果如表3-6所示。

表 3 墟岗黄鸡血浆 HI-AIV-H9 抗体滴度(平均值±标准误, n=10, log₂)

时间\组别	I	II	III	IV
1周	0.40 ± 0.22 ^a	1.30 ± 0.21 ^b	2.30 ± 0.70 ^{bc}	3.20 ± 0.20 ^{cd}
2周	0.60 ± 0.16 ^a	4.50 ± 0.17 ^b	4.60 ± 0.16 ^b	5.70 ± 0.15 ^c
3周	2.40 ± 0.16 ^a	4.50 ± 0.27 ^b	6.80 ± 0.25 ^c	6.20 ± 0.13 ^c
4周	2.50 ± 0.17 ^a	4.10 ± 0.23 ^b	6.70 ± 0.21 ^c	6.30 ± 0.15 ^c
5周	0.50 ± 0.10 ^a	4.50 ± 0.17 ^b	6.60 ± 0.18 ^c	6.70 ± 0.16 ^c
6周	0.50 ± 0.12 ^a	6.50 ± 0.21 ^{bc}	7.80 ± 0.15 ^c	8.56 ± 0.24 ^c

表 4 墟岗黄鸡血浆 HI-AIV-H5 抗体滴度(平均值±标准误, n=10, log₂)

时间\组别	I	II	III	IV
1周	0.30 ± 0.15 ^a	1.10 ± 0.10 ^b	1.60 ± 0.27 ^b	0.60 ± 0.22 ^{ab}
2周	0.50 ± 0.17 ^a	4.50 ± 0.17 ^b	4.70 ± 0.15 ^b	6.70 ± 0.15 ^c
3周	2.30 ± 0.15 ^a	4.30 ± 0.26 ^b	6.90 ± 0.23 ^c	6.20 ± 0.13 ^c
4周	2.50 ± 0.17 ^a	4.50 ± 0.22 ^b	6.90 ± 0.23 ^c	6.40 ± 0.16 ^c
5周	0.20 ± 0.13 ^a	5.300 ± 0.26 ^a	7.80 ± 0.12 ^c	7.11 ± 0.18 ^c
6周	0.26 ± 0.14	6.70 ± 0.28 ^a	8.10 ± 0.23 ^c	8.26 ± 0.19 ^c

表 5 禽流感疫苗对鸡外周血 ANAE⁺ 比例的影响(平均值±标准误)(n=10,%)

时间\组别	I	II	III	IV
1周	12.00 ± 1.42 ^a	13.67 ± 2.19 ^a	26.00 ± 3.97 ^b	17.67 ± 3.02 ^b
2周	27.33 ± 3.29 ^a	31.00 ± 3.10 ^a	33.33 ± 4.61 ^a	40.33 ± 3.67 ^b
3周	25.67 ± 3.65 ^a	29.33 ± 2.52 ^a	34.00 ± 4.44 ^a	29.34 ± 2.15 ^a
4周	25.18 ± 3.34 ^a	26.33 ± 3.91 ^a	30.33 ± 3.56 ^a	31.33 ± 2.86 ^a
5周	29.26 ± 4.22 ^a	27.33 ± 3.91 ^a	30.33 ± 3.56 ^a	31.11 ± 3.19 ^a
6周	25.32 ± 3.12 ^a	26.31 ± 3.26 ^a	30.56 ± 4.12 ^a	32.14 ± 3.56 ^a

表6 禽流感疫苗对鸡血清 IL-2 水平

时间\组别	I	II	III	IV
1周	0.47 ± 0.05 ^a	1.02 ± 0.05 ^b	1.64 ± 0.19 ^c	2.07 ± 0.18 ^c
2周	0.78 ± 0.09 ^a	1.59 ± 0.21 ^b	2.36 ± 0.35 ^{bc}	3.13 ± 0.43 ^c
3周	0.69 ± 0.12 ^a	1.39 ± 0.12 ^b	2.02 ± 0.13 ^c	2.22 ± 0.26 ^c
4周	0.66 ± 0.09 ^a	1.34 ± 0.25 ^b	1.77 ± 0.14 ^{bc}	2.01 ± 0.18 ^c
5周	0.53 ± 0.06 ^a	1.66 ± 0.12 ^b	1.66 ± 0.11 ^b	1.92 ± 0.24 ^b
6周	0.63 ± 0.07 ^a	1.56 ± 0.11 ^b	1.69 ± 0.12 ^b	1.99 ± 0.22 ^b

表3和表4的数据表明，用添加了三肽囊素的禽流感疫苗免疫鸡后，产生的抗体不仅比普通疫苗高2个滴度可以有效，而且维持时间也长。

表5和表6的数据表明，三肽囊素可提高外周血ANAE淋巴细胞的比例和血清IL-2水平，这表明三肽囊素作为禽流感疫苗佐剂对鸡细胞免疫功能的促进最强。

实施例4

三肽囊素免疫调节的生理学机制研究：

三肽囊素对新城疫弱毒苗和禽流感疫苗都有明显的佐剂功能，这可能和三肽囊素能刺激外周血液淋巴细胞增殖转化的作用有关。在家禽的免疫过程中，一些疫苗经常对法氏囊等重要免疫器官造成损伤，造成免疫抑制。我们假设三肽囊素能够保护免疫器官，甚至可以促进免疫器官的发育，从而发挥免疫佐剂的功能。基于这种假设，在环磷酰胺诱导的鸡免疫抑制模型的基础上，通过观察三肽囊素对环磷酰胺的免疫抑制是否有阻断作用，进一步阐明三肽囊素的免疫增强作用机制。1日龄墟岗黄肉鸡母鸡苗180只(购自佛山墟岗畜牧有限公司)，随机分成:对照组(I组)、环磷酰胺组(II组)、三肽囊素+环磷酰胺组(III组)、三肽囊素组(IV)。剂量：三肽囊素0.01mg/kg体重、环磷酰胺40mg/kg体重。具体给药方式见表7。

表7 三肽囊素与环磷酰胺的给药剂量与方式

组别	4日龄	7日龄	10日龄
I	生理盐水	生理盐水	生理盐水
II	生理盐水	生理盐水	环磷酰胺
III	三肽囊素	三肽囊素	环磷酰胺
IV	三肽囊素	三肽囊素	生理盐水

结果:

鸡群健康, 环磷酰胺组体重增加低于对照组, 三肽囊素组体重增加高于对照组。详细结果如表8-12所示。

表8 三肽囊素与环磷酰胺对墟岗黄鸡法氏囊指数的影响(g/kg, 平均值±标准误, n=15)

组别	14日龄	35日龄	56日龄
I	2.41±0.20 ^a	3.86±0.34 ^a	2.74±0.21 ^a
II	0.89±0.06 ^b	1.15±0.23 ^b	0.80±0.13 ^b
III	0.89±0.04 ^b	2.08±0.63 ^b	1.02±0.13 ^b
IV	2.69±0.18 ^a	4.22±0.42 ^a	2.58±0.23 ^a

表9 三肽囊素(BS)与环磷酰胺(CP)对墟岗黄鸡胸腺指数的影响(g/kg, 平均值±标准误, n=15)

组别	14日龄	35日龄	56日龄
I	3.64±0.23 ^a	8.36±0.71 ^a	4.92±0.55 ^a
II	1.32±0.15 ^b	7.06±0.76 ^a	4.03±0.43 ^a
III	1.35±0.09 ^b	7.69±0.56 ^a	4.41±0.32 ^a
IV	4.31±0.31 ^a	8.90±0.82 ^a	5.06±0.63 ^a

表10 BS和CP对墟岗黄鸡RBC-CR₁和RBC-IC花环率(%)的影响

组别	14日龄		35日龄	
	RBC-CR ₁	RBC-IC	RBC-CR ₁	RBC-IC
I	9.25±1.31 ^a	6.80±1.33 ^a	16.65±2.79 ^a	6.50±2.22 ^a
II	6.33±0.44 ^b	9.67±1.17 ^b	12.90±1.66 ^b	9.10±1.60 ^b
III	6.83±0.66 ^{ab}	4.00±0.76 ^a	15.63±2.60 ^a	4.20±1.86 ^a
IV	8.67±2.61 ^a	7.00±1.80 ^a	18.60±0.90 ^a	4.00±1.22 ^a

表11 BS和CP对墟岗黄鸡的胸腺细胞凋亡的影响(平均值±标准误)

组别	14 d	35 d	56 d
I	2.00 ± 1.00 ^a	4.33 ± 0.58 ^a	5.33 ± 1.53 ^a
II	4.67 ± 0.58 ^b	5.00 ± 1.73 ^b	6.33 ± 0.58 ^a
III	1.67 ± 0.58 ^a	4.00 ± 1.00 ^a	2.67 ± 1.15 ^b
IV	1.33 ± 0.58 ^c	2.33 ± 0.58 ^c	3.00 ± 1.00 ^b

表12 BS和CP对墟岗黄鸡脾脏细胞凋亡的影响(平均值±标准误)

组别	14 d	35 d	56 d
I	2.33 ± 0.58 ^a	4.32 ± 0.58 ^a	5.33 ± 1.15 ^a
II	4.69 ± 1.15 ^b	6.31 ± 2.00 ^a	5.35 ± 1.53 ^a
III	2.69 ± 1.53 ^a	3.00 ± 1.00 ^a	2.67 ± 1.15 ^b
IV	2.00 ± 1.00 ^a	2.65 ± 0.58 ^b	2.35 ± 0.58 ^b

上述试验表明,三肽囊素本身具有很强的促进鸡、特别是幼龄鸡的免疫器官的发育,还可部分拮抗环磷酰胺对鸡免疫器官的免疫抑制作用(表8,表9)。这是三肽囊素免疫佐剂功能的重要生理学机制。

此外,三肽囊素可提高RBC-CR花环率和降低RBC-IC花环率(表10),提示三肽囊素可促进鸡的红细胞非特异性免疫功能,并可减少胸腺细胞、脾细胞凋亡(表11和表12)。

实施例5

疫苗组合物的配制

鉴于三肽囊素具有广谱免疫佐剂性能,可将它应用于禽流感疫苗佐剂,预防和治疗禽流感致病性病毒感染。在实施例3-4中研究了不同剂量三肽囊素对免疫作用,及机理的影响(禽类体重按每公斤分别使用5微克、10微克、30微克的不同剂量)。结果显示,在胸腺的发育和脾脏发育中10微克/公斤比5微克/公斤的更好(表2、图3、图4),说明低剂量不如中剂量。这提示,在禽流感疫苗中,宜使用10微克/公斤的剂量。

在市售的H5-H9亚型抗原禽流感油乳剂灭活疫苗中,按每1000毫升(或1000g)动物疫苗加入100、200、500、或1000微克的三肽囊素,制得4种规格的

含三肽囊素的禽流感疫苗。

使用时，按10微克三肽囊素/公斤的剂量免疫接种于墟岗黄鸡。结果表明，接种后，三肽囊素可以明显地提高接种鸡中外周血ANAE淋巴细胞的比例和血清IL-2水平，提示对鸡细胞免疫功能的有明显促进作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

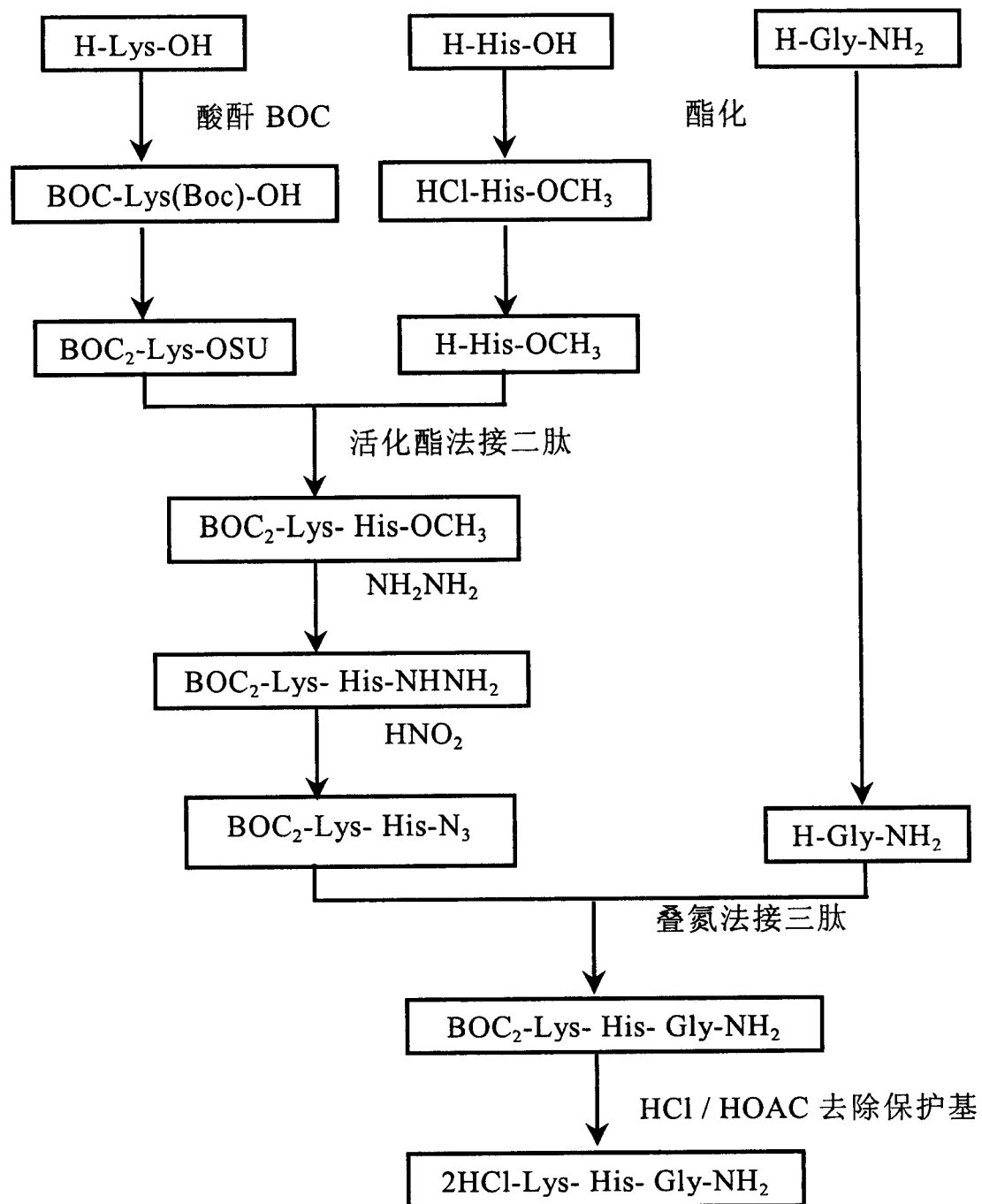


图 1

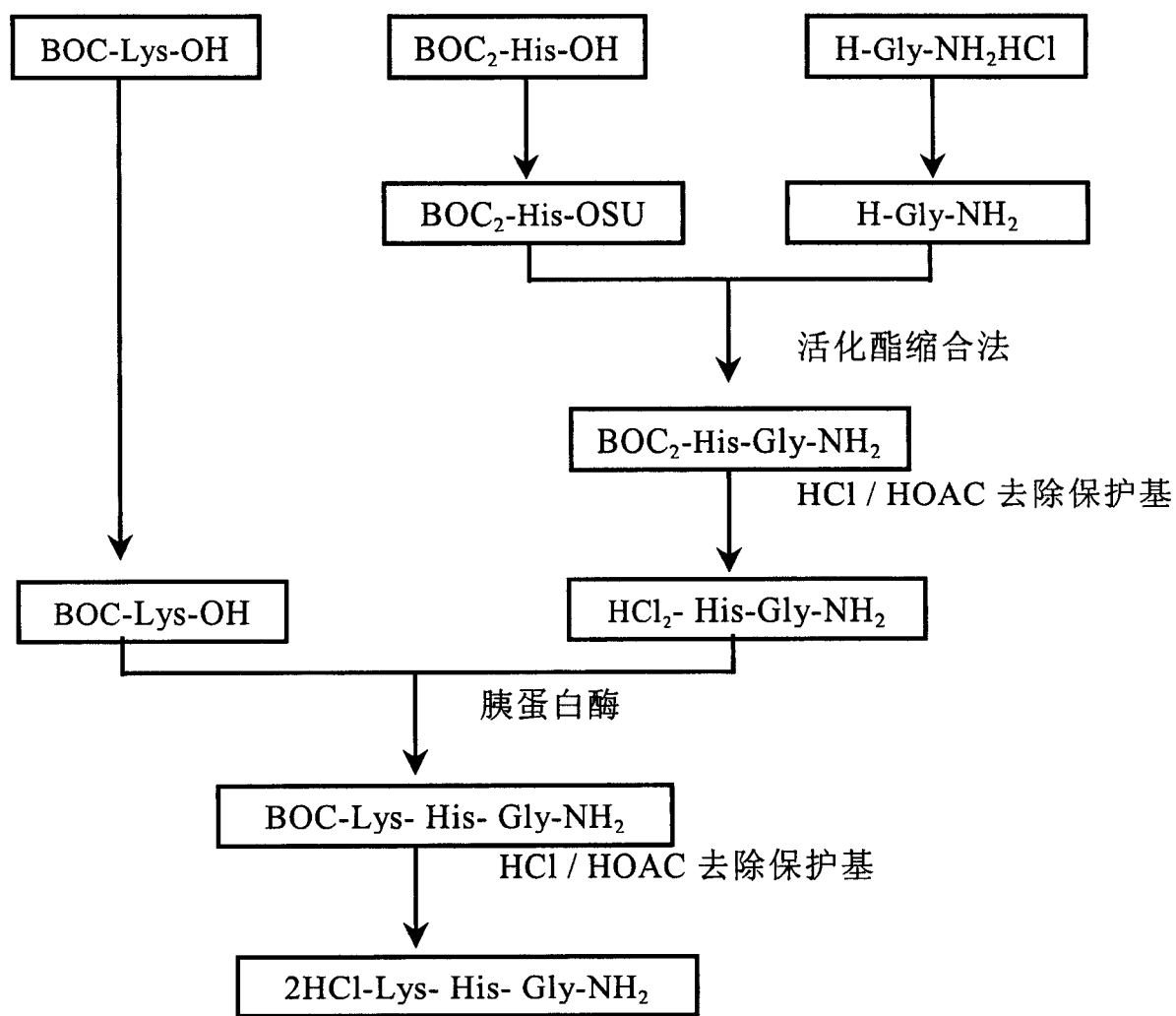


图 2

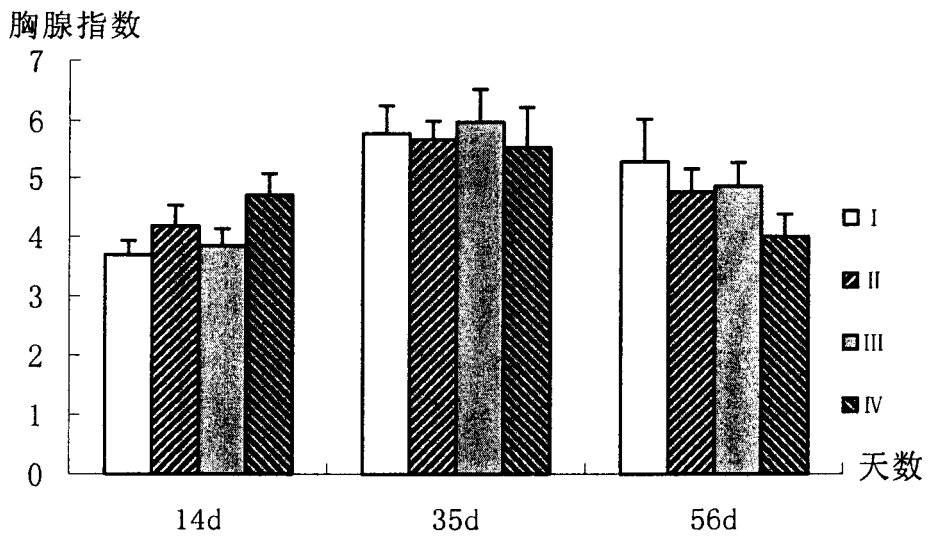


图 3

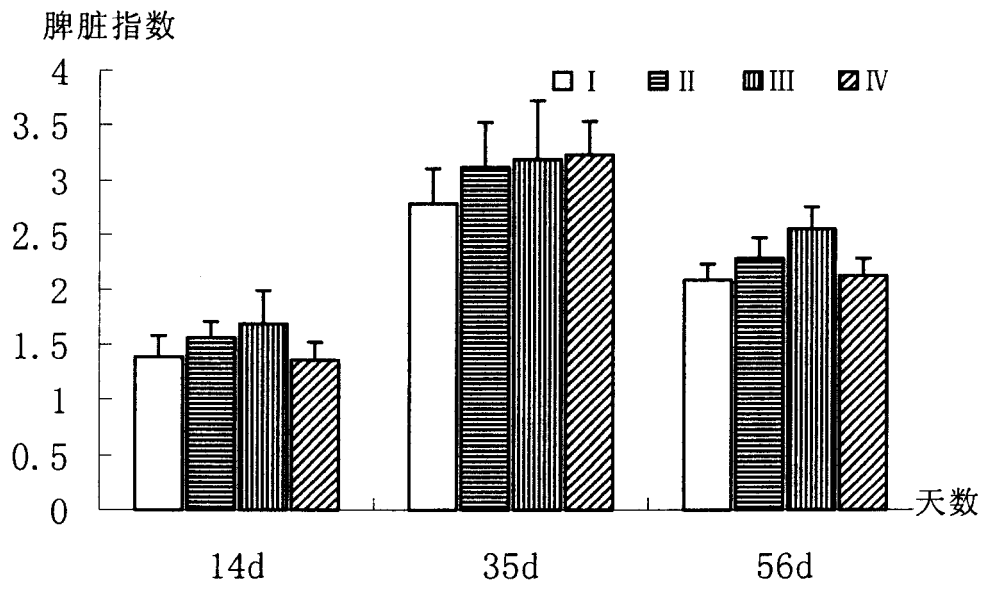


图 4

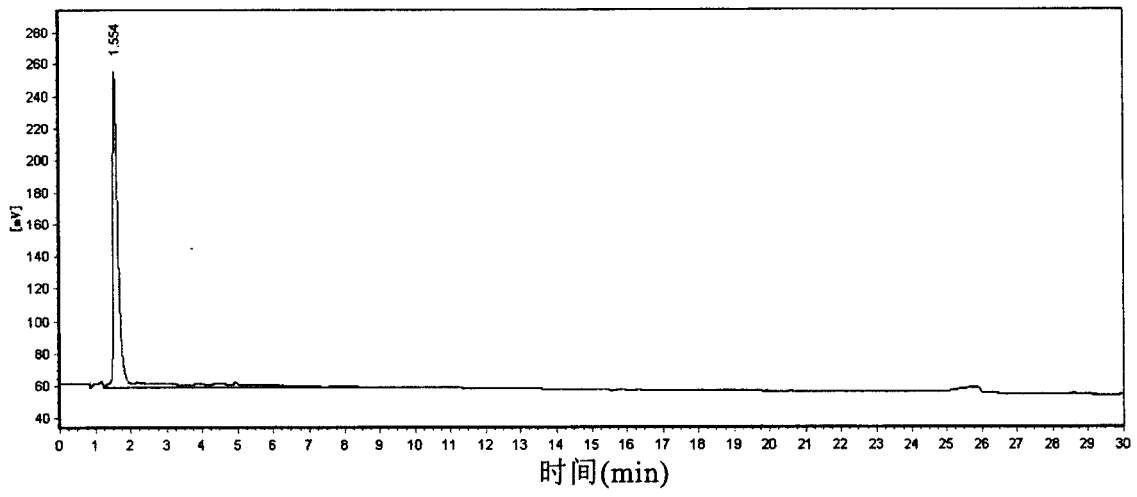


图 5

专利名称(译)	三肽囊素的规模化制备方法及作为禽流感疫苗佐剂的应用		
公开(公告)号	CN101045745A	公开(公告)日	2007-10-03
申请号	CN200610025139.7	申请日	2006-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海安晶生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海安晶生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海安晶生物技术有限公司		
[标]发明人	邵钧 王丙云 费俭 石嘉豪 徐来根		
发明人	邵钧 王丙云 费俭 石嘉豪 徐来根		
IPC分类号	C07K5/08 C07K1/02 A61K38/06 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	Y02P20/55		
代理人(译)	徐迅		
其他公开文献	CN101045745B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及新的三肽囊素(免疫佐剂)规模化制备方法, 以及三肽囊素用作禽流感疫苗佐剂的用途及其免疫调节机理。本发明还涉及含三肽囊素的药物组合物, 及其制法和用途。试验表明, 三肽囊素可有效提高抗体滴度。机理研究表明, 三肽囊素可增强了红细胞免疫功能, 拮抗免疫抑制, 减少淋巴细胞、脾细胞及法氏囊细胞凋亡。三肽囊素作为广谱免疫佐剂, 具有直接而明显的社会经济效益。

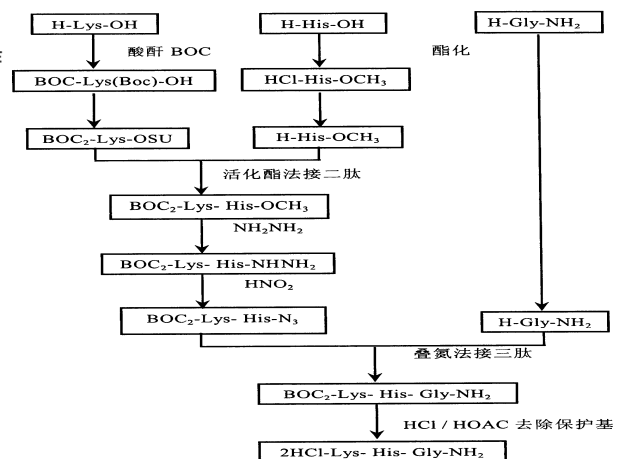


图 1