



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101045745 B

(45) 授权公告日 2010.12.08

(21) 申请号 200610025139.7

CN 1696151 A, 2005.11.16, 说明书第2页第2段至第3页第8段.

(22) 申请日 2006.03.28

(德) 休厄德, 贾库布克著, 刘克良等译. 肽: 化学与生物学

(73) 专利权人 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

1. 科学出版社, 2005, 全文.

(72) 发明人 邵钧 王丙云 费俭 石嘉豪
徐来根

审查员 孙尚瑜

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务有限公司
31100

代理人 徐迅

(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)

(56) 对比文件

CN 1528783 A, 2004.09.15, 说明书全文.

权利要求书 1 页 说明书 13 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效益。

1. 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:

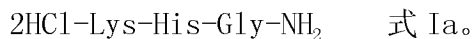
(a) 将 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 与 H-Gly-NH_2 在惰性溶剂中反应,形成式 II 化合物:



式 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:



2. 如权利要求 1 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 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 。

三肽囊素的规模化制备方法及其作为禽流感疫苗佐剂的应用

技术领域

[0001] 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

[0002] 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)FFWKTKPR **KHG** GRR, 具有同样生物学活性。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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。

[0006] 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。

[0007] 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

[0008] 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。

[0009] 本发明的另一目的是提供用所述方法制备的三肽囊素。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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:

[0013] BOC_n-Lys-His-Gly-NH₂ 式 I

[0014] 或

[0015] $2\text{HCl-Lys-His-Gly-NH}_2$ 式 Ia

[0016] 式中, BOC 为叔丁氧羰基, n 为 1 或 2。

[0017] 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:

[0018] (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;

[0019] $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3 + \text{H-Gly-NH}_2 \rightarrow \text{BOC}_2\text{-Lys-His-Gly-NH}_2$

[0020] 式 II

[0021] 式中, BOC 为叔丁氧羰基;

[0022] (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:

[0023] $2\text{HCl-Lys-His-Gly-NH}_2$ 式 Ia。

[0024] 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:

[0025] (i) 在惰性溶剂中, 使 $\text{BOC}_2\text{-Lys-OSU}$ 与 H-His-OCH_3 反应, 形成 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-OCH}_3$;

[0026] $\text{BOC}_2\text{-Lys-OSU} + \text{H-His-OCH}_3 \rightarrow \text{BOC}_2\text{-Lys-His-OCH}_3$

[0027] 式中, BOC 为叔丁氧羰基; OSU 为 N-羟基琥珀酰亚胺酯;

[0028] (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 $\text{BOC-Lys(BOC)-His-NHNH}_2$;

[0029] (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 $\text{BOC}_2\text{-Lys-His-N}_3$ 。

[0030] 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。

[0031] 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:

[0032] (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 2HCl-His-Gly-NH_2 反应, 形成式 III 化合物;

[0033] $\text{BOC-Lys-OH} + 2\text{HCl-His-Gly-NH}_2 \rightarrow \text{BOC-Lys-His-Gly-NH}_2$

[0034] 式 III

[0035] 式中, BOC 为叔丁氧羰基;

[0036] (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:

[0037] $2\text{HCl-Lys-His-Gly-NH}_2$ 式 Ia。

[0038] 在另一优选例中, 在步骤 (a') 中, 用硅胶薄层层析监测 2HCl-His-Gly-NH_2 二肽, 当 2HCl-His-Gly-NH_2 二肽基本消失时停止步骤 (a')。

[0039] 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。

[0040] 在另一优选例中, 所述的 2HCl-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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 在另一优选例中, 所述的组合物为注射剂或口服制剂。

[0044] 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。

[0045] 在本发明的第六方面,提供了三肽囊素或其活性衍生物的用途,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。

[0046] 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)。

[0047] 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。

[0048] 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的用途,所述的用途包括:

[0049] (a) 用于制备增强红细胞非特异性免疫功能的药物组合物;

[0050] (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;

[0051] (c) 用于制备减少胸腺细胞和/或脾细胞凋亡的药物组合物;

[0052] (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

[0053] (e) 用于制备提高血清 IL-2 水平的药物组合物。

[0054] 在另一优选例中,所述的药物组合物包括疫苗组合物。

[0055] 在另一优选例中,所述的免疫抑制剂是如环磷酰胺。

[0056] 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。

[0057] 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

[0058] 图 1 显示了叠氮-活化酯组合法合成三肽囊素流程图。

[0059] 图 2 显示了胰蛋白酶酶促合成三肽囊素流程图。

[0060] 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 μ g/Kg;III:10 μ g/Kg;IV:30 μ g/Kg)。

[0061] 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 μ g/Kg;III:10 μ g/Kg;IV:30 μ g/Kg)。

[0062] 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

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 术语

[0066] 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。

[0067] 如本文所用，术语“BS”指三肽囊素。

[0068] 如本文所用，术语“CP”指环磷酰胺。

[0069] 如本文所用，术语“Gly”指甘氨酸 (G)。

[0070] 如本文所用，术语“His”指组氨酸 (H)。

[0071] 如本文所用，术语“Lys”指赖氨酸 (K)。

[0072] 如本文所用，术语“BOC”指叔丁氧羰基。

[0073] 如本文所用，术语“HOSU”指 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0074] 如本文所用，术语“OSU”指 N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0075] 如本文所用，术语“DCCI”指二环己基碳二亚胺。

[0076] 如本文所用，术语“DCU”指二环己基脒。

[0077] 如本文所用，术语“HCl”指氯化氢。

[0078] 如本文所用，术语“NaOH”指氢氧化钠。

[0079] 如本文所用，术语“NaCl”指氯化钠。

[0080] 如本文所用，术语“THF”指四氢呋喃。

[0081] 如本文所用，术语“HOAC”指醋酸。

[0082] 如本文所用，术语“DMF”指二甲基甲酰胺。

[0083] 如本文所用，术语“HPLC”指高压液相色谱。

[0084] 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。

[0085] 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）。

[0086] 制备方法

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] $\text{BOC}_n\text{-Lys-His-Gly-NH}_2$ 式 I

[0090] $2\text{HCl-Lys-His-Gly-NH}_2$ 式 Ia

[0091] 式中，BOC 为叔丁氧羰基，n 为 1 或 2。

[0092] 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。

[0093] 步骤一、BOC-Lys (BOC)-OSU 制备：

[0094] 将 L-Lys-OH 溶于碱性水溶液（如 1N NaOH 溶液）中，在室温下（如 4-20°C）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 pH4），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。

[0095] 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°C 至 -2°C (如 -5°C 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。

[0096] 步骤二、 2HCl-His-OCH_3 制备:

[0097] 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-OCH_3 。

[0098] 步骤三、BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂ 制备:

[0099] 将 BOC-Lys(BOC)-OSU 溶于合适的惰性溶剂(如 THF 中),加入 2HCl-His-OCH_3 ,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。

[0100] 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 $65\pm 5^{\circ}\text{C}$)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。

[0101] 步骤四、BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂ 制备:

[0102] 将 BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂ 溶于合适的惰性溶剂中(如 DMF)中,在约 -20°C (如 -25°C 至 -15°C)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。

[0103] 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。

[0104] 步骤五、 $2\text{HCl-Lys-His-Gly-NH}_2$

[0105] 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°C 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 $2\text{HCl-Lys-His-Gly-NH}_2$ 。

[0106] 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。

[0107] 步骤一、BOC-His(BOC)-OSU 制备:

[0108] 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°C 以下(如 -10°C 至 -5°C),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

[0109] 步骤二、BOC-His(BOC)-Gly-NH₂ 制备:

[0110] 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。

[0111] 步骤三、 2HCl-His-Gly-NH_2 制备:

[0112] 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 2HCl-His-Gly-NH_2 。

[0113] 步骤四、BOC-Lys-His-Gly-NH₂ 酶促合成：

[0114] 将 BOC-Lys-OH 和 2HCl-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 2HCl-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。

[0115] 5. 2HCl-Lys-His-Gly-NH₂ 的制备：

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 作用机理

[0119] 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。

[0120] 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：

[0121] (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）；

[0122] (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）。

[0123] (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）。

[0124] (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。

[0125] 疫苗组合物

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 本发明的主要优点在于：

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] 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。

[0134] 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适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。

[0135] 实施例 1：

[0136] 叠氮与活化酯组合法：

[0137] 参见图 1。各步骤如下：

[0138] 1. BOC-Lys(BOC)-OSU 制备：

[0139] 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 pH8-9，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%。

[0140] 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℃。

[0141] 2. 2HCl-His-OCH₃ 制备：

[0142] 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℃。

[0143] 3. BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂ 制备：

[0144] 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℃。

[0145] 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-NHNH₂,产率 80%,熔点:140-141℃。

[0146] 4. BOC-Lys(BOC)-His-Gly-NH₂ 制备:

[0147] 称取 74.7 克 BOC-Lys(BOC)-His-NHNH₂(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 1.26 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%。

[0148] 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℃。

[0149] 5. 2HCl-Lys-His-Gly-NH₂

[0150] 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℃。

[0151] 6. 产物鉴定:

[0152] (1). 氨基酸组成分析:Lys:His:Gly = 0.9:0.95:1(表 1)。

[0153] 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

[0155] (2). HPLC 分析:

[0156] 柱:Zorbax Eclipse XDB-C₈(Agilent)4.6×150mm I.D.,5 μm particlesize;

[0157] 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);

[0158] 流速:1 毫升/分钟;紫外检测:230nm;温度:室温。

[0159] 结果如图 5 所示。

[0160] (3). 质谱分析结果符合理论值 MW :339.1。

[0161] 实施例 2 :

[0162] 酶促合成法

[0163] 参见图 2。各步骤如下 :

[0164] 1. BOC-His(BOC)-OSU 制备 :

[0165] 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°C 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 : $66.2-68^{\circ}\text{C}$ 。

[0166] 2. BOC-His(BOC)-Gly-NH₂ 制备 :

[0167] 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°C 。

[0168] 3. 2HCl-His-Gly-NH₂ 制备 :

[0169] 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 2HCl-His-Gly-NH₂。

[0170] 4. BOC-Lys-His-Gly-NH₂ 酶促合成 :

[0171] 称取 24.6 克 BOC-Lys-OH(100 毫克分子) 和 8.14 克 2HCl-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 $30-37^{\circ}\text{C}$ 保温并搅拌反应, 用硅胶薄层层析监测 2HCl-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%

[0172] 5. 2HCl-Lys-His-Gly-NH₂ 的制备 :

[0173] 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 $188-195^{\circ}\text{C}$ 。

[0174] 6. 产物鉴定 :

[0175] 氨基酸分析、HPLC 及质谱鉴定方法与叠氮法 (实施例 1) 一致。

[0176] 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。

[0177] 实施例 3：

[0178] 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)：

[0179] 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。

[0180] 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。

[0181] 表 1 试验动物的分组

	BS/体重 $\mu\text{g/Kg}$	BS用量(μg)		合计 (μg)
		4d	7d	
[0182] 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

[0183] 对照组 (I)；

[0184] 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。

[0185] 结果：

[0186] 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。

[0187] 表 3 墟岗黄鸡血浆 HI-AIV-H9 抗体滴度 (平均值 \pm 标准误, $n = 10$, \log_2)

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
[0188] 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

[0189] 表 4 墟岗黄鸡血浆 HI-AIV-H5 抗体滴度 (平均值 \pm 标准误, $n = 10$, \log_2)

[0190]

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

[0191] 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

[0193] [0193] 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

[0195] 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。

[0196] 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。

[0197] 实施例4

[0198] 三肽囊素免疫调节的生理学机制研究:

[0199] 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。

[0200] 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

[0202] 结果:

[0203] 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。

[0204] 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

[0206] 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)

[0207]

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

[0208] 表 10BS 和 CP 对墟岗黄鸡 RBC-CR₁ 和 RBC-IC 花环率(%)的影响

[0209]

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

[0210] 表 11BS 和 CP 对墟岗黄鸡的胸腺细胞凋亡的影响(平均值±标准误)

[0211]

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

[0212] 表 12BS 和 CP 对墟岗黄鸡脾脏细胞凋亡的影响 (平均值 ± 标准误)

[0213]

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

[0214] 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,还可部分拮抗环磷酸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。

[0215] 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)。

[0216] 实施例 5

[0217] 疫苗组合物的配制

[0218] 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。

[0219] 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。

[0220] 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。

[0221] 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。

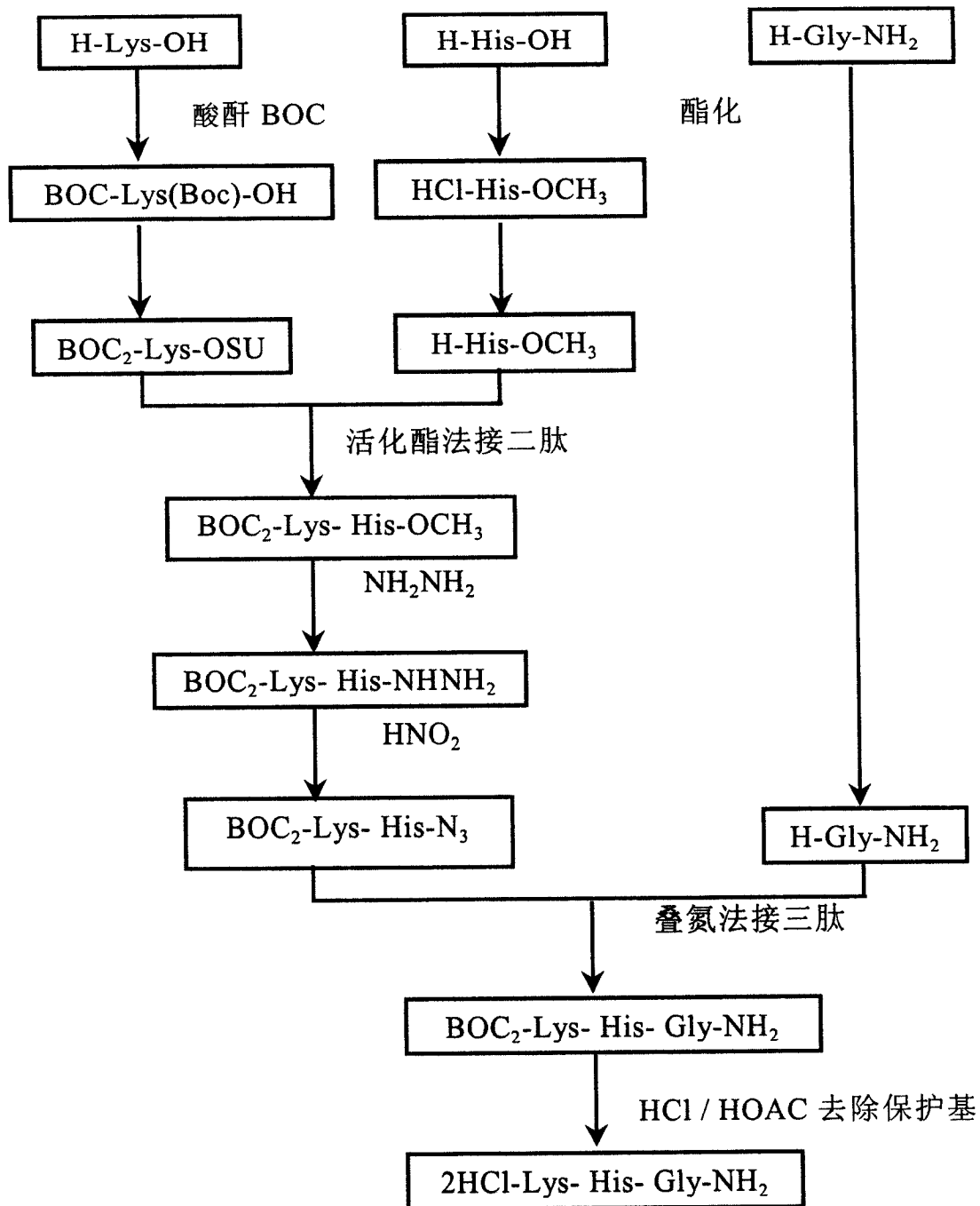


图 1

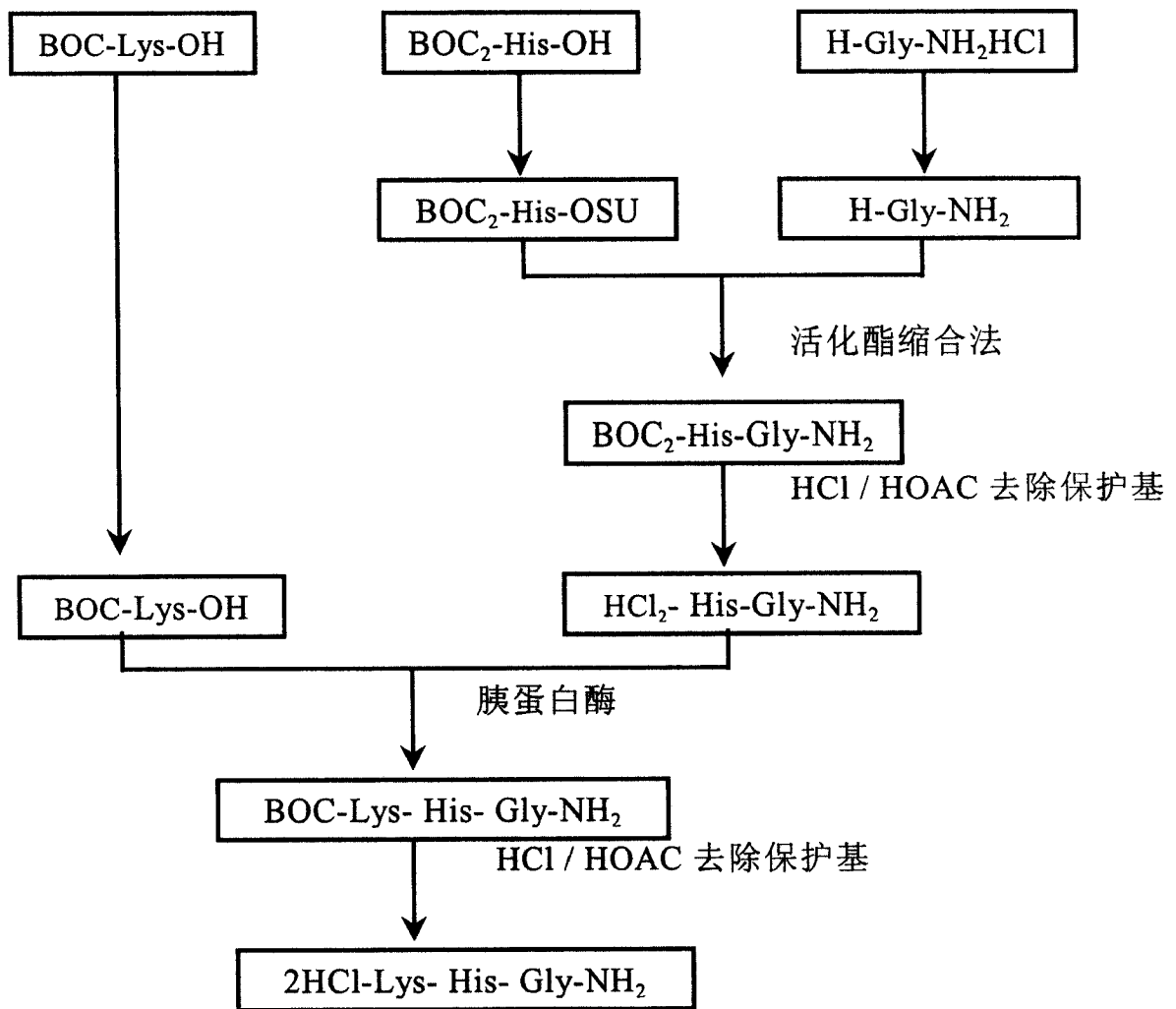


图 2

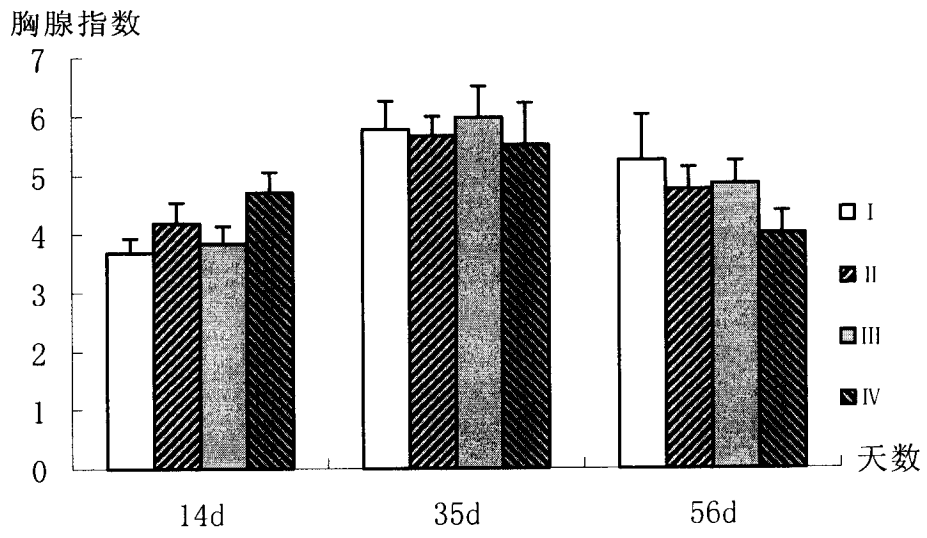


图 3

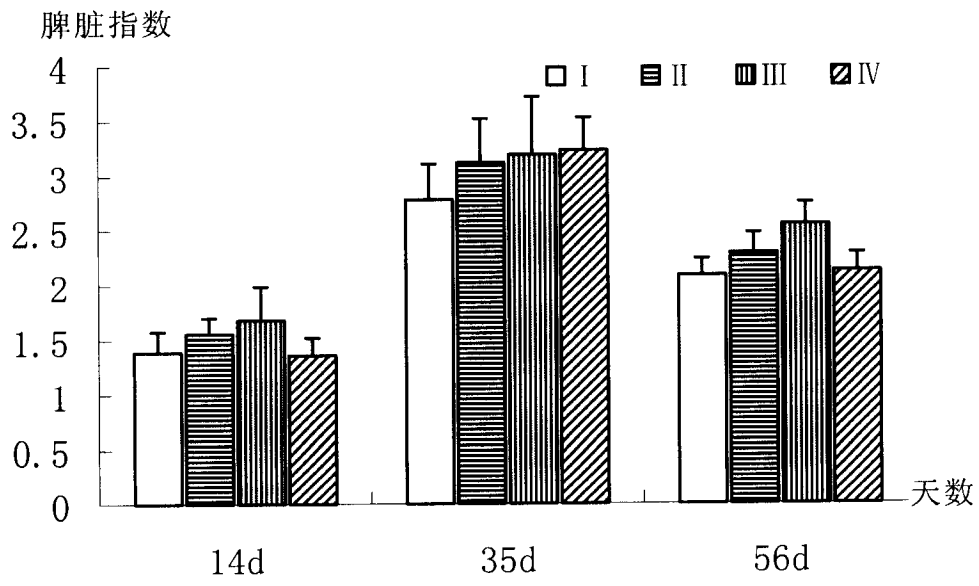


图 4

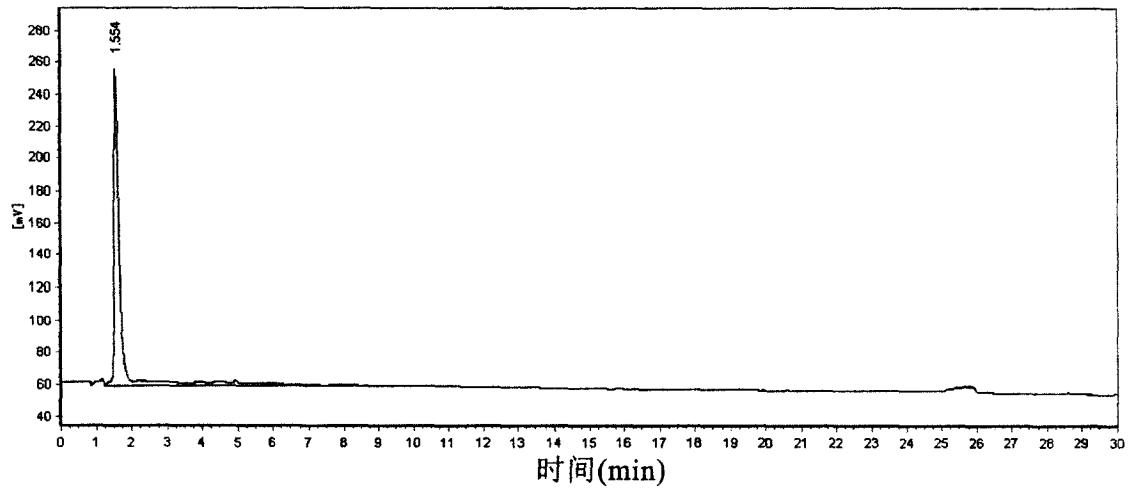


图 5

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	CN101045745B	公开(公告)日	2010-12-08
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		
[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	CN101045745A		
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。

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