



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104817618 B

(45)授权公告日 2018.07.03

(21)申请号 201410044246.9

A23L 33/18(2016.01)

(22)申请日 2014.01.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104817618 A

CN 102741269 A,2012.10.17,

CN 104817617 A,2015.08.05,

WO 00/29588 A1,2000.05.25,

(43)申请公布日 2015.08.05

王志超等.生物活性肽的研究进展.《河南医学研究》.2004,第13卷(第4期),第353-356页.

(73)专利权人 陈光健

地址 620500 四川省眉山市仁寿县曹家乡梨园村5组

Tatsuro Yasukata et al..An Efficient and Practical Method for Solid-Phase Synthesis of Tripeptide-Bearing Glycopeptide Antibiotics:Combinatorial Parallel Synthesis of Carboxamide Derivatives of Chloroorienticin B.

《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2002,第12卷(第21期),第3033-3036页.

(72)发明人 陈光健

审查员 皇甫洁琼

(51)Int.Cl.

C07K 5/087(2006.01)

C07K 1/06(2006.01)

C07K 1/04(2006.01)

A61K 38/05(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 17/02(2006.01)

A61P 1/04(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表1页

(54)发明名称

寡肽CD01及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一个小分子寡肽及其制备方法,具体是寡肽CD01及其制备方法和应用,本发明公开了寡肽的氨基酸序列如SEQ ID:1所示,可以采用合成,提取或者基因工程等方式制备寡肽CD01,在制备治疗抗炎镇痛、创面修复以及提高免疫的药物中有较好的治疗效果。

1. 一种寡肽CD01,其特征在於,由Y、E、H 3个氨基酸残基组成,分子量为447.45 Da,其氨基酸序列如SEQ ID:1 所示,所述寡肽的制备方法,包括如下步骤:

a. 合成顺序为从C端到N端;取1倍摩尔当量的树脂放入多肽合成仪反应器中,加入DCM(二氯甲烷)溶胀半小时,然后抽掉DCM,加入序列中第一个Fmoc保护的氨基酸10mmol,2倍摩尔当量的DIEA(二异丙基乙胺),加入DMF(二甲基甲酰胺)和DCM溶液,以可使树脂充分鼓动起来为宜,用氮气鼓泡反应60min;然后加入5倍摩尔当量甲醇,反应半小时,抽掉反应液,用DMF、甲醇洗净;

b. 加入适量哌啶去除Fmoc(9-芴甲氧羰基)保护基,洗净,茚三酮检测;

c. 往反应器中加入2倍摩尔当量序列中的第二个氨基酸,2倍摩尔当量HBTU(苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐)及DIEA,氮气鼓泡反应半小时,抽掉液体,用DMF,甲醇洗净,茚三酮检测;

d. 重复依步骤b、c的方式依次加入序列中氨基酸,抽掉液体,用DMF洗净,茚三酮检测;

e. 将树脂用氮气吹干后,从反应柱中取下并称取重量,倒入烧瓶中,然后往烧瓶中加入一定量的95%TFA(三氟乙酸)切割液,震荡反应2 h,目的是将多肽从树脂载体上裂解下来并去除氨基酸的侧链保护基团;

f. 滤掉树脂,得到滤液,然后向滤液中加入大量乙醚,析出粗产物,然后离心,清洗即可得到该序列的粗产物;

g. 分析提纯和质谱检测:用ESI(电喷雾电离)离子源质谱仪检测该序列分子量的正确性,用高效液相色谱将粗品提纯至要求纯度;

h. 收集纯化好的目标寡肽溶液放入冻干机中进行浓缩,冻干成白色粉末。

2. 一种如权利要求1 所述的寡肽在制备抗炎或镇痛药物中的应用。

3. 一种如权利要求1 所述的寡肽在制备修复创面药物中的应用。

4. 一种如权利要求1 所述的寡肽在制备治疗皮肤外伤药物中的应用。

5. 一种如权利要求1 所述的寡肽在制备治疗消化道溃疡药物中的应用。

6. 一种如权利要求1 所述的寡肽在制备提高免疫力药物中的应用。

7. 根据权利要求1所述的寡肽,其特征在於,所述的寡肽可作为普通食品、保健品或者药品的组成部分。

8. 含有权利要求1所述的一种或多种寡肽的组合物,其中含有药学可以接受的载体。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其特征在於所述的组合物以药物制剂形式存在,将药物活性成分,本发明的寡肽与药物载体混合,按照制剂学常规技术制成所需要的剂型。

10. 根据权利要求8所述的组合物,其特征在於所述的组合物的剂型为冷冻干燥注射剂。

寡肽CD01及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质领域,特别涉及寡肽及其应用。

背景技术

[0002] 寡肽是多肽的一种分类,分子量段一般在1000道尔顿以下,也称作小肽,一般由2--6个氨基酸组成。与其他肽的区别是,寡肽在人体不需消化,即可直接吸收。

[0003] 炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的防御反应。对机体的损伤的局部组织所呈现的反应称为炎症反应,炎症发展后期会产生渗出液,渗出物的压迫和炎症介质的作用可引起患者疼痛。现在抗炎的临床应用药物主要为化学合成药物,如萘丁美酮、吡罗昔康、布洛芬等,这些化学药物虽然抗炎效果明显,但不能治本,不能消除致炎的基本原因,大多都有较严重的不良反应,给患者造成痛苦和损失。

[0004] 创面修复,创面是正常皮肤(组织)在外界致伤因子如外科手术、外力、热、电流、化学物质、低温以及机体内在因素如局部血液供应障碍等作用下所导致的损害。常伴有皮肤完整性的破坏以及一定量正常组织的丢失,同时,皮肤的正常功能受损。也称为伤口或者创伤。创面修复既伤口修复。

[0005] 消化道溃疡病,胃溃疡、十二指肠溃疡统称为消化道溃疡病。由于生活节奏加快,工作压力加大,近年消化道溃疡病的发病率不仅未见下降,反有上升趋势。近10多年来本病的症状也变得不典型,无规律的胃部隐痛常引起人们的注意,直到发生呕血或黑便时方到医院就诊。消化性溃疡主要指发生在胃和十二指肠的慢性溃疡,亦可发生于食管下段、胃空肠吻合口周围及含有异位胃粘膜的美克尔(MECKEL)憩室。这些溃疡的形成与胃酸和胃蛋白酶的消化作用有关,故称消化性溃疡。近年研究发现溃疡的形成与幽门螺旋杆菌(H P)的存在有关。本病绝大多数(95%以上)位于胃和十二指肠,故又称胃十二指肠溃疡。本病的总发病率占人口的5-10%,十二指肠溃疡较胃溃疡多见,以青壮年多发,男多于女,儿童亦可发病,老年患者所占比例亦逐年有所增。由于复发率很高,给患者带来痛苦。

[0006] 免疫力是人体自身的防御机制,是人体识别和消灭外来侵入的任何异物(病毒、细菌等);处理衰老、损伤、死亡、变性的自身细胞以及识别和处理体内突变细胞和病毒感染细胞的能力。现代免疫学认为,免疫力是人体识别和排除“异己”的生理反应。年老体弱的人员由于自身免疫系统较弱,所以需要提高细胞的识别能力。免疫力低下是会造成人体容易受到外界的感染,功能下降。

发明内容

[0007] 为了寻找一种可以多角度保护人体创面和抗炎镇痛,同时提高人体免疫功能的药物,发明人通过大量合成试验,广泛的筛选,采用Fmoc保护的氨基酸来合成,得到大量寡肽分子,其中部分寡肽分子获得了意想不到的技术效果。意外地发现治疗效果较好的寡肽CD01,其由Y、E、H3个氨基酸残基组成,分子量为447.45Da,其氨基酸序列如SEQ ID:1所示。

[0008] 上述寡肽的制备方法可以使用合成,也可以采用从生物体中提取纯化得到。寡肽

的制备方法,其特征在于包括如下的步骤:

[0009] a.合成顺序为从C端到N端;取1倍摩尔当量的树脂放入多肽合成仪反应器中,加入DCM(二氯甲烷)溶胀半小时,然后抽掉DCM,加入序列中第一个Fmoc保护的氨基酸10mmol,2倍摩尔当量的DIEA(二异丙基乙胺),适量的DMF(二甲基甲酰胺)、DCM溶液(适量是指以可使树脂充分鼓动起来为宜),用氮气鼓泡反应60min;然后加入约5倍摩尔当量甲醇,反应半小时,抽掉反应液,用DMF、甲醇洗净;

[0010] b.加入适量哌啶去除Fmoc(9-芴甲氧羰基)保护基,洗净,茚三酮检测;

[0011] c.往反应器中加入序列中第二个氨基酸(也为2倍摩尔当量),2倍摩尔当量HBTU(苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐)及DIEA,氮气鼓泡反应半小时,抽掉液体,用DMF,甲醇洗净,茚三酮检测;

[0012] d.重复依步骤b、c的方式依次加入序列中氨基酸,抽掉液体,用DMF洗净,茚三酮检测;

[0013] e.将树脂用氮气吹干后,从反应柱中取下并称取重量,倒入烧瓶中,然后往烧瓶中加入一定量的95%TFA(三氟乙酸)切割液,震荡反应2h,目的是将多肽从树脂载体上裂解下来并去除氨基酸的侧链保护基团;

[0014] f.滤掉树脂,得到滤液,然后向滤液中加入大量乙醚,析出粗产物,然后离心,清洗即可得到该序列的粗产物;

[0015] g.分析提纯和质谱检测:用ESI(电喷雾电离)离子源质谱仪和测序仪检测该序列的正确性,用高效液相色谱将粗品提纯至要求纯度;

[0016] h.收集纯化好的目标寡肽溶液放入冻干机中进行浓缩,冻干成白色粉末。

[0017] 本发明提供的寡肽可作为普通食品、保健品或者药品的组成部分。本发明还提供一种寡肽的组合物,其中含有药学可以接受的载体。组合物可以以药物制剂形式存在,优选的是注射剂,更优选的是冷冻干燥注射剂,该药物制剂形式药物组合物,可以按照制剂学常规技术制备,包括将药物活性成分,本发明的寡肽与药物载体混合,按照制剂学常规技术制成所需要的剂型。

[0018] 本发明中的寡肽,分子量小、人工合成方便、纯度很高,生产方面,适合大规模生产,在应用方面,这些寡肽抗炎镇痛效果明显,对创面损伤、烧伤、烫伤、消化道溃疡具有显著的治疗效果;该寡肽还有能提高动物免疫机能的作用,寡肽能够在制备抗菌、抗炎镇痛、抗肿瘤和提高免疫力的药物中的应用。

具体实施方式

[0019] 以下是结合具体试验对本发明的说明,并不是对本发明保护范围的限制。实施例1 本发明中寡肽的制备方法

[0020] 原料:树脂(Wang Resin),Fmoc保护的氨基酸,

[0021] 试剂:N,N-二甲基酰胺(DMF),DCM,MeOH,乙酸酐,吡啶,DIEA,HBTU,六氢吡啶

[0022] 仪器:十二通道半自动多肽合成仪,高效液相色谱(HPLC),型号:Waters2695检测试剂:苯酚试剂,吡啶,茚三酮试剂

[0023] (1)合成顺序为从C端到N端。

[0024] (2)取10mmol当量的树脂放入多肽合成仪反应器中,加入DCM(二氯甲烷)溶胀半小

时,然后抽掉DCM,加入序列中第一个Fmoc保护的氨基酸10mmol,20mmol的DIEA(二异丙基乙胺),适量的DMF(二甲基甲酰胺)、DCM溶液(适量是指以可使树脂充分鼓动起来为宜),用氮气鼓泡反应60min。然后加入约50mmol当量甲醇,反应半小时,抽掉反应液,用DMF、甲醇洗净。

[0025] (3) 加入适量哌啶去除Fmoc(9-芴甲氧羰基)保护基,洗净,茚三酮检测。

[0026] (4) 往反应器中加入序列中第二个氨基酸(也为20mmol),20mmolHBTU(苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐)及DIEA,氮气鼓泡反应半小时,抽掉液体,用DMF,甲醇洗净,茚三酮检测。

[0027] (5) 重复依步骤3、4的方式依次加入序列中氨基酸,抽掉液体,用DMF洗净,茚三酮检测。

[0028] (6) 将树脂用氮气吹干后,从反应柱中取下并称取重量,倒入烧瓶中,然后往烧瓶中加入一定量的95%TFA(三氟乙酸)切割液,震荡反应2h,目的是将多肽从树脂载体上裂解下来并去除氨基酸的侧链保护基团。

[0029] (7) 滤掉树脂,得到滤液,然后向滤液中加入大量乙醚,析出粗产物,然后离心,清洗即可得到该序列的粗产物。

[0030] (8) 分析提纯和质谱检测:用ESI(电喷雾电离)离子源质谱仪检测该序列分子量的正确性,用高效液相色谱将粗品提纯至要求纯度。

[0031] (9) 收集纯化好的目标寡肽溶液放入冻干机中进行浓缩,冻干成白色粉末。

[0032] 实施例2寡肽对小鼠耳廓肿胀程度的影响,抗炎消肿镇痛的作用

[0033] 取昆明种小鼠,雌雄各半,体重25-30g,按样品量随机分组:每组10只。HY01-HY24(250mg/kg)(2mg/ml)、萘丁美酮(250mg/kg)、生理盐水对照组(0.1ml/10g)粗提物剂量均折算为原动物生药剂量(下同)。各组均经口灌胃给药,对照组经口灌胃生理盐水。各组每天灌胃1次,连续4d,末次灌胃2h后,尾静脉注射Evan's blue50mg/kg,于小鼠右耳双面涂二甲苯25ul/面,20h后,拉颈处死小鼠,沿耳廓基线剪下双耳,用直径7.5mm的打孔器分别在双耳同一部位打下圆耳片,电子天平称重,求出重量差,用以表示肿胀度(肿胀度=左耳耳片重-右耳耳片重)。按以下公式计算肿胀抑制百分率。

[0034] 抑制率(%)=(对照组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/对照组平均肿胀度*100%。

[0035] 表1

[0036]

组别	肿胀度(mg)	抑制率(%)	P值
CD01	9.31±3.54	53.22	<0.01
萘丁美酮组	13.24±2.31	33.47	<0.05
生理盐水组	19.90±2.53	--	--

[0037] 试验分析:寡肽分别进行二甲苯致小鼠耳廓肿胀试验,观察其是否具有抑制作用。二甲苯诱导的小鼠耳片水肿为急性非特异性的炎症模型,所导致的急性炎症改变包括血管扩张、毛细血管通透性增加、渗出等。从试验结果看寡肽对抑制小鼠的急性炎症效果良好,结果具有统计学意义。

[0038] 实施例3寡肽对醋酸致小鼠扭体反应的影响,镇痛作用

[0039] 取昆明种小鼠,雌雄各半,体重25-30g,随机分组,寡肽给药组(250mg/kg)、对照组

5%阿斯匹林可溶性淀粉溶液(250mg/kg)、生理盐水组。给药组和生理盐水组末次灌胃2h后,分别腹腔注射0.6%冰醋酸,各组在给致痛剂0.2ml后观察15min内各组由醋酸引起的扭体次数,凡超过15min不扭体者按无扭体反应对待。

[0040] 表2

组别	给药剂量 (mg/kg)	抑制率 (%)
[0041] CD01	250	48.05
阿司匹林组	250	42.15
生理盐水组	--	12.89

[0042] 结果表明,寡肽组能有效减轻小鼠醋酸性腹腔疼痛反应。

[0043] 实施例4寡肽对皮肤烧伤的试验

[0044] 1、实验材料

[0045] 1.1样品:按实施例1制得样品:CD01。

[0046] 1.2实验动物:18-22g KM小鼠,320只,雌雄各半。

[0047] 1.3实验试剂:氯化钠注射液、湿润烧伤膏(汕头市美宝制药有限公司)。

[0048] 2、皮肤创面修复功能评价方法

[0049] 2.1对小鼠实验性烫伤的影响

[0050] 160只KM小鼠按性别与体重随机分为16组,10只/组(详见表1),试验时将小鼠右后足跖部位置于预先调至55℃恒温水浴中15秒,此后每隔半小时各组小鼠分别于右足跖部涂药1次,共给药3次,4.5小时后将小鼠脱颈椎处死,于同一部位剪下两足跖部,用精密扭力天平称重,以每鼠右足重减去左足重量为肿胀度并计算肿胀抑制率。

[0051] 2.2对小鼠实验性烧伤的影响

[0052] 将中间挖空2cm×2cm的石棉纸置于小鼠背上,用微量移液器吸取100uL无水乙醇滴于20mg棉球上,置于暴露处,点火燃烧造成II度烧伤模型。按性别与烧伤面积随机分组,10只/组。各组分别涂药,连续涂15d,Bid,末次给药后用数码相机拍照,用IPP5.1图像分析软件包测量各组动物烧伤面积。

[0053] 3、皮肤创面修复功能评价结果

[0054] 3.1样品对小鼠实验性烫伤的影响

[0055] 表3样品对小鼠实验性烫伤的影响($\bar{x} \pm SD$)

组别	动物数 (n)	足跖肿胀度 (mg)	抑制率 (%)
[0056] 对照组(生理盐水)	10	180.2±16.1	/
阳性组(湿润烧伤膏)	10	154.3±11.0*	14.4
CD01	10	164.0±13.5*	9.0

[0057] 注:*:P<0.05与对照组比较

[0058] 结果显示,CD01对热水烫伤致小鼠足跖的肿胀度有不同程度的降低,与对照组比

较均有明显差异 ($P < 0.05$), 提示CD01对烫伤有较好的保护作用。

[0059] 3.2样品对小鼠实验性烧伤的影响

[0060] 表4样品对小鼠实验性烧伤的影响($\bar{x} \pm SD$)

	组别	动物数 (n)	创面结痂面积 (mm^2)	
			开始给药	给药 15 天
[0061]	模型组 (生理盐水)	12	126.7±39.1	32.0±12.6
	阳性组 (湿润烧伤膏)	12	126.4±31.7	15.0±5.8*
	CD01	12	124.7±32.1	18.0±6.3*

[0062] 注:与模型组比较* $P < 0.05$

[0063] 结果显示,与对照组比较,给药15天,CD01组小鼠的创面结痂面积均明显减少 ($P < 0.05$)。

[0064] 3.3功能评价结果由上述实验结果表明:CD01对烧烫伤所致皮肤创面均有修复作用。

[0065] 实施例5寡肽对胃溃疡的治疗作用

[0066] 1、实验材料

[0067] 1.1样品:按实施例1制得样品:CD01。

[0068] 1.2实验动物:KM小鼠,18~22g,160只,雌雄各半。SD大鼠,200~220g,204只,雌雄各半。

[0069] 1.3实验试剂:盐酸雷尼替丁胶囊、达喜(铝碳酸镁片)。

[0070] 2、样品对胃溃疡粘膜的保护功能评价方法

[0071] 2.1无水乙醇致小鼠胃粘膜损伤模型试验

[0072] 160只KM小鼠按性别与体重随机分组,10只/组(详见表5),各组给予相应的药物,连续8天,第7天给药后禁食24h,自由饮水,末次给药后1h,所有动物均ig无水乙醇0.2ml/只,1小时后处死动物,结扎幽门,1%甲醛固定,观察并评定溃疡指数(标准:条索状损伤的长度大于1mm者,测定其长度,每毫米计1分,其宽度大于1mm者计分加倍,长度与宽度均小于1mm,计0.5分,将计分相加即为该鼠的溃疡指数)并计算溃疡抑制百分率。

[0073] 2.2乙酸致大鼠慢性胃溃疡模型试验

[0074] 除假手术组(12只),其余大鼠

[0075] 采用10%醋酸按0.05ml/只平刺于胃浆膜下0.4-0.5mm造模。术后造模大鼠进一步分组(详见表6),并于第2日开始给药,每日1次,给药14天,末日给药后禁食禁水一夜后处死动物。以游标卡尺测定溃疡最大长径及垂直于最大长径的最大宽径。计算溃疡指数(溃疡指数=溃疡最大长径×垂直于最大长径的最大宽径)及溃疡抑制率。

[0076] 3、样品对胃溃疡粘膜的保护功能评价结果

[0077] 3.1样品对无水乙醇致小鼠胃粘膜损伤的影响

[0078] 表5样品对无水乙醇致小鼠胃粘膜损伤的影响($\bar{x} \pm SD$)

	组别	动物数 (n)	溃疡指数	抑制率 (%)
[0079]	对照组(生理盐水)	10	43.3±14.5	/
	阳性组(雷尼替丁)	10	23.4±12.9*	46.0
	CD01	10	22.3±11.5*	48.5

[0080] 注: *:P<0.05与对照组比较

[0081] 结果显示,与对照组比较,CD01可使无水乙醇致小鼠胃粘膜损伤的溃疡指数明显降低(P<0.05),提示CD01对无水乙醇致胃粘膜损伤有较好的保护作用。

[0082] 3.2样品对乙酸致大鼠慢性胃溃疡模型的影响

[0083] 表6样品对乙酸致大鼠慢性胃溃疡模型的影响($\bar{x} \pm SD$)

	组别	动物数 (n)	溃疡指数 (cm ²)	抑制率 (%)
[0084]	假手术组(生理盐	12	0.0000±0.000*	/
	模型组(生理盐	12	0.0502±0.0119	/
	阳性组(达喜)	12	0.0302±0.0125*	39.8
	CD01	12	0.0324±0.0108*	35.5

[0085] 注:与模型组比较*P<0.05

[0086] 由上表显示,模型组的溃疡指数与假手术组有差异(P<0.05);CD01的溃疡指数与模型组比较有明显改善(P<0.05)。

[0087] 3.3功能评价结果由上述实验结果表明:CD01对急、慢性胃溃疡的黏膜具有修复作用。

[0088] 实施例6寡肽提高机体的免疫机能

[0089] 1、实验材料

[0090] 样品:按实施例1制得的样品。

[0091] 实验动物:质量为18~22g SPF级雄性BALB/C小鼠,雄性,随机分组进行实验。

[0092] 实验方法:将小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组及样品CD01剂量组,每组10只。将样品配成0.5mg/ml受试液后给小鼠灌胃,正常组和模型组给予等量生理盐水,阳性组按20mL/kg给予黄芪精,每天ig一次,连续14天。在给药第1、2、3、8、9、10,除正常组外,其余各组小鼠ip50mL/kg环磷腺苷,共6次,诱导免疫功能低下模型。

[0093] 2、提高免疫力功能评价方法

[0094] 通过实验前后免疫低下小鼠免疫器官指数:胸腺指数、脾指数、肝指数和吞噬指数、吞噬系数,用分光光度法测定小鼠血清中溶血素水平。

[0095] 3、增强免疫力功能评价结果

[0096] 3.1对免疫低下小鼠免疫器官指数的影响

[0097] 表7对免疫低下小鼠免疫器官指数的影响

[0098]

分组	剂量 /mL · kg ⁻¹	动物数/ 只	胸腺指数/mg · g (X±s)	脾指数/mg · g (X±s)	肝指数/mg · g (X±s)
正常组	-	10	2.55±0.24#	3.39±0.90#	54.09±2.09#
模型组	-	10	1.11±0.21*	3.01±0.14*	57.13±1.90*
阳性组	20	10	1.88±0.21*#	5.89±0.21*#	59.41±2.01*#
CD01	20	10	2.15±0.19*#	5.88±0.11*#	58.17±4.19*#

[0099] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0100] 由表7可知,样品CD01胸腺指数、脾指数和肝脏指数高于模型组,具有统计学(P<0.05)。

[0101] 3.2对免疫低下小鼠吞噬指数和吞噬系数的影响

[0102] 表8对免疫低下小鼠吞噬指数和吞噬系数的影响

[0103]

分组	剂量/mL · kg ⁻¹	动物数/只	吞噬指数 (X±s)	吞噬系数 (X±s)
正常组	-	10	0.025±0.009#	5.103±0.224#
模型组	-	10	0.014±0.007*	3.516±0.418*
阳性组	20	10	0.025±0.007*#	4.401±0.319*#
CD01	20	10	0.025±0.004*#	4.567±0.219*#

[0104] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0105] 由表8可知,样品CD01吞噬指数和吞噬系数高于模型组,具有统计学(P<0.05)。

[0106] 3.3对免疫低下小鼠迟发型超敏反应和血清中溶血素生成的影响

[0107] 表9对免疫低下小鼠迟发型超敏反应和血清溶血素生成的影响

[0108]

分组	剂量/mL · kg ⁻¹	动物数/只	耳肿胀度/mg (X±s)	OD ₅₄₀ (X±s)
正常组	-	10	3.38±1.41#	0.247±0.049#
模型组	-	10	2.04±0.80*	0.043±0.018*
阳性组	20	10	3.99±0.79*#	0.129±0.026*#
CD01	20	10	3.79±0.39*#	0.104±0.009*#

[0109] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0110] 由表9可知,样品CD01小鼠血清中溶血素水平高于模型组,具有统计学意义。(P<0.05)。上述实验表明该寡肽可以提高免疫力低下的人群。

[0111] 实施例8提高老龄鼠免疫功能

[0112] 1、实验材料

[0113] 样品:按实施例1制得的样品。

[0114] 实验动物:SPF级80周ICR雄性小鼠,SPF级6周龄ICR雄性小鼠10只,分组进行实验。

[0115] 实验方法:将大鼠80周龄老鼠随机分为模型组、阳性组及样品CD01-CD14剂量组,配成)0.5mg/ml每组10只,共16组;并同步设置6周龄的正常小鼠组,每组10只。将样品配制成受试液后给小鼠灌胃,正常组和模型组给予等量生理盐水,阳性组按20mL/kg给予黄芪精,连续给药30天。

[0116] 2、提高免疫力功能评价方法

[0117] 通过实验前后免疫低下小鼠免疫器官指数:胸腺指数、脾指数、肝指数和吞噬指数、吞噬系数,用分光光度法测定小鼠血清中溶血素水平、脑组织中MDA、SOD和总抗氧化的能力。

[0118] 2、增强免疫力功能评价结果

[0119] 2.1对老龄鼠脏器指数的影响

[0120] 表10老龄鼠脏器指数的影响

[0121]

分组	剂量 /mL·kg ⁻¹	动物数/只	胸腺指数/mg·g (X±s)	脾指数/mg·g (X±s)	肝指数/mg·g (X±s)
正常组	-	10	2.39±0.31#	3.30±0.42#	53.86±4.14#
对照组	-	10	0.67±0.19*	2.51±0.41*	46.22±2.61*
阳性组	20	10	1.05±0.09*#	2.99±0.45*#	44.18±3.15*#
CD01	20	10	1.03±0.11*#	2.97±0.46*#	48.46±4.62*#

[0122] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0123] 由表10可知,样品CD01胸腺指数、脾指数和肝脏指数高于模型组,具有统计学(P<0.05)。

[0124] 2.2对老龄鼠吞噬指数和吞噬系数的影响

[0125] 表11对老龄鼠吞噬指数和吞噬系数的影响

[0126]

分组	剂量/mL · kg ⁻¹	动物数/只	吞噬指数 (X±s)	吞噬系数 (X±s)
正常组	-	10	0.028±0.004#	5.309±0.387#
对照组	-	10	0.016±0.003*	4.741±0.250*
阳性组	20	10	0.020±0.004*#	5.642±0.503*#
CD01	20	10	0.017±0.005*#	5.187±0.354*#

[0127] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0128] 由表11可知,样品CD01吞噬指数和吞噬系数高于模型组,具有统计学(P<0.05)。

[0129] 2.3对老龄鼠迟发型超敏反应和血清中溶血素生成的影响

[0130] 表12对老龄鼠迟发型超敏反应和血清溶血素生成的影响

[0131]

分组	剂量/mL · kg ⁻¹	动物数/只	耳肿胀度/mg (X±s)	OD ₅₄₀ (X±s)
正常组	-	10	3.78±1.03#	0.254±0.046#
对照组	-	10	5.74±0.51*	0.061±0.031*
阳性组	20	10	8.14±1.41*#	0.169±0.089*#
CD01	20	10	5.53±2.68*#	0.134±0.034*#

[0132] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0133] 由表12可知,样品CD01小鼠血清中溶血素水平高于模型组,具有统计学意义。(P<0.05)。

[0134] 2.4对老龄鼠脑组织中衰老相关指标的影响

[0135] 表13老龄鼠脑组织中衰老相关指标的影响

[0136]

分组	剂量 /mL · kg ⁻¹	动物 数/只	MDA/nmol · mg ⁻¹ (X±s)	SOD/U · mg ⁻¹ (X±s)	T-10C/U · mg ⁻¹ (X±s)
正常组	-	10	3.09±0.32#	789.81±79.31#	6.31±0.07#
对照组	-	10	4.00±0.65*	540.38±29.53*	4.21±0.39*
阳性组	20	10	3.05±0.25*#	803.89±19.93*#	7.89±0.22*#
CD01	20	10	2.97±0.73*#	646.48±99.38*#	5.74±2.12*#

[0137] 注*表示与正常组相比P<0.05,#表示与模型组比较P<0.05

[0138] 由表13可知,样品CD01MDA低于模型组,SOD和T-AOC高于模型组,具有统计学($P < 0.05$)。

[0139] 上述试验表示寡肽CD01可以很好的提高老年人免疫能力。

[0140] 实施例9安全性毒理学评价

[0141] (1) 样品:按实施例1制得的寡肽CD01。

[0142] (2) 实验动物:清洁级昆明种小鼠和SD大鼠

[0143] (3) 安全性毒理学评价方法:对寡肽进行急性毒性实验(MTD法)、遗传毒性实验和大鼠30天喂养实验。其中遗传毒性实验包括Ames实验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验和小鼠精子畸形实验。

[0144] (4) 安全性毒理学评价结果

[0145] 急性经口毒性实验:SD大鼠和昆明种小鼠的急性经口MTD均大于20g/kg.bw属于实际无毒类。遗传毒性实验Ames实验:小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验和小鼠精子畸形实验3项遗传毒性实验结果均为阴性,表明本产品无致突变和致畸作用。大鼠30天喂养实验:最高剂量为人体推荐量的100倍,本产品未引起大鼠整体健康状况生理生化功能和器官组织形态学等各项重要指标的异常变化。

[0146] 以上试验表明了本专利的寡肽可以具有消炎、镇痛、创面修复,治疗胃溃疡,免疫提高等等作用。

[0147] 所述的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域中的普通技术人员来说,在不脱离本发明核心技术特征的前提下,还可以做出若干改进,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001] 序列表
<110> 陈光健
<120> 寡肽 CD01 及其制备方法和应用
<160> 1
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 1
Tyr Glu His
1 5