



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103613680 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201310654756. 3

(22) 申请日 2013. 12. 05

(71) 申请人 三峡大学

地址 443002 湖北省宜昌市西陵区大学路 8
号

(72) 发明人 袁丁 张长城 刘朝奇 王婷
孙志伟 周志勇 崔倩倩 万静枝
何毓敏

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务
所 11305

代理人 向华

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006. 01)

A61K 31/715 (2006. 01)

A61K 39/39 (2006. 01)

A61P 37/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

一种醇沉竹节参多糖及其制备方法与它的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种醇沉竹节参多糖及其制备方法,该方法包括竹节参水提取、脱蛋白、氧化与醇沉等步骤。本发明使竹节参多糖具有明显的佐剂活性,其中 60% 醇沉竹节参多糖部分的佐剂活性最强,粘均分子量处于中间。自然界中植物多糖分布广泛,另由于其低毒性和有效性使其应用更具有优势,为开发新型疫苗佐剂找到了新的思路和方向。

1. 一种用作疫苗佐剂的醇沉竹节参多糖的制备方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

A、竹节参水提取

将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1:5 ~ 15,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 85 ~ 95% 乙醇水溶液中,浸泡 1 ~ 5h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1:5 ~ 15,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取 1 ~ 5h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 2 ~ 5 次,蒸馏水提取液合并,再减压浓缩,除去其水量的 4/5 ~ 14/15 的水分,得到浓缩的水提取液;

B、脱蛋白

按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂按重量比 1:0.3 ~ 1.5,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液进行离心分离,离心的上清液按照上述操作重复 2 ~ 10 次,得到脱蛋白的上清液;

C、氧化

往步骤 B 得到的脱蛋白上清液中加入氨水,将所述上清液的 pH 值调节至 7.0 ~ 9.0,再向其中缓慢滴加 H_2O_2 ,在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液体积的 1 ~ 5%,然后在温度 30 ~ 60℃ 下保温 2 ~ 8h,得到一种无色溶液;

D、醇沉

往步骤 C 得到的无色溶液中加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 30 ~ 90%,然后在室温下静置 3 ~ 15h,再进行离心,离心上清液进行真空干燥,得到醇沉竹节参多糖。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于在步骤 A 中,所述竹节参渣与蒸馏水按照重量比 1:8 ~ 12 混合,然后加热回流提取 2 ~ 4h。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于在步骤 A 中,所述的减压浓缩是在压力 0.001 ~ 0.01MPa 下进行浓缩。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于在步骤 B 中,所述浓缩水提取液与 Sevage 试剂的重量比是 0.6 ~ 1.2。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于在步骤 C 中,含有 H_2O_2 的脱蛋白上清液在温度 38 ~ 50℃ 下保温 3.2 ~ 6.5h。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于在步骤 C 中,含有乙醇的无色溶液在室温下静置 5 ~ 12h。

7. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于在步骤 D 中,所述真空干燥是在压力 0.01 ~ 0.1MPa 与温度 30 ~ 50℃ 的条件下进行干燥。

8. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于所述的离心分离是在离心机转速 1000 ~ 3000 转 / 分的条件下进行分离的。

9. 根据权利要求 1-8 所述制备方法得到的醇沉竹节参多糖。

10. 根据权利要求 9 所述的醇沉竹节参多糖在制备疫苗佐剂中的用途。

一种醇沉竹节参多糖及其制备方法与它的用途

【技术领域】

[0001] 本发明属于疫苗佐剂技术领域。更具体地,本发明涉及一种醇沉竹节参多糖,还涉及所述醇沉竹节参多糖的制备方法,还涉及所述醇沉竹节参多糖的用途。

【背景技术】

[0002] 竹节参系五加科人参属植物竹节参的干燥呈竹鞭状根茎,为我国的名贵特产少常用的中药材之一。竹节参多生长在海拔 1000m 以上的阔叶疏林阴湿地或岩石、沟涧旁边,对土壤条件要求较高,适宜在中性或微酸性环境中生长,喜腐殖质层厚、疏松肥沃、排水良好的沙壤土。在云南、贵州、四川、湖北、陕西、甘肃、河南、浙江、安徽、江西等省民间有较长的应用历史,还有少量出口香港。有滋补强壮,散瘀止痛,止血祛痰的功效,也是土家族著名民族药,一直被湖北恩施土家族先民奉为“草药之王”。随着现代药理学研究深入,竹节参的主要功效已经逐步地体现在某一类成分,甚至到某种成分上。竹节参的主要有效成分为竹节参皂苷和多糖类。

[0003] 在现有技术中也记载了竹节参多糖的制备方法,例如 CN101265302B 以及 CN101265301B 记载了竹节参多糖的制备方法,但是使用该方法制备得到的竹节参多糖仅能用于简单药物和保健品之中,这些专利仅提及了竹节参多糖增强免疫力的功效,只是简单的体外增加淋巴细胞增殖活性,并未对其具体作用(疫苗佐剂)进行研究,更没有阐明用于疫苗佐剂。虽然大量研究结果显示,竹节参多糖能够明显增强机体的免疫调节功能,但是作为疫苗佐剂的研究并未见报道,而且用于疫苗佐剂的竹节参多糖在制备方法和产品的选择上具有更加严格的要求。

[0004] 传统的疫苗一般多为全菌或全病毒制成,含有大量的非特异免疫原性物质,既有疫苗成分,也有佐剂作用,一般不需加佐剂。目前,用于人用疫苗的佐剂为铝盐佐剂(主要是氢氧化铝及其磷酸盐, Alum)。铝盐佐剂作为人类疫苗佐剂已使用了几十年,成为人用疫苗中常用的佐剂,具有良好的佐剂效果。随着新型疫苗的不断出现,铝盐佐剂显现出一些问题,其中包括:(1) 因其理化性质特点,铝盐疫苗冷冻后胶体状态被破坏,因此不能冷冻干燥和在低温状态下运输,但现在的很多多肽疫苗必须要低温保存。(2) 因含盐量高,贮存日久有结晶沉淀,使制备的疫苗稳定性得不到保障。(3) 铝盐对人、畜的神经系统可能有影响。(4) 在注射部位有时会发生局部无菌性脓肿,甚至可以形成肉芽肿,轻度局部反应较为常见。(5) 对肿瘤疫苗不适合,以铝盐佐剂作疫苗主要适用于以抗体为保护性免疫的疫苗。(6) 铝盐佐剂释放抗原物质的速度缓慢,效应也比较弱,对许多可溶性抗原都不够有效,对抗原的要求比较高。因此研究新型疫苗佐剂是制备新型疫苗的重要环节。

[0005] 正在开发的新型疫苗如基因工程疫苗、核酸疫苗等具有良好的抗原特异性和低毒性,但免疫原性较差,尤其需要佐剂来增强其免疫原性及宿主对抗原的保护性应答。中药活性成分多糖属于天然物质,毒副作用小,取材广泛,开发新型中药佐剂是佐剂研究发展的重要途径和新的趋势。

[0006] 本发明的竹节参多糖的制备方法把竹节参总多糖分成几个有效部位,利用黏度法

区分它们的主要成分;本发明方法制备得到的竹节参多糖具有非常明显的免疫佐剂作用,为开发新型疫苗佐剂指明了方向。

【发明内容】

[0007] [要解决的技术问题]

[0008] 本发明的目的是提供一种疫苗佐剂用醇沉竹节参多糖的制备方法。

[0009] 本发明的另一个目的是提供醇沉竹节参多糖。

[0010] 本发明的另一个目的是提供所述醇沉竹节参多糖的用途。

[0011] [技术方案]

[0012] 本发明是通过下述技术方案实现的。

[0013] 本发明涉及一种用作疫苗佐剂的醇沉竹节参多糖的制备方法。

[0014] 该制备方法包括如下步骤:

[0015] A、竹节参水提取

[0016] 将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1:5 ~ 15,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 85 ~ 95% 乙醇水溶液中,浸泡 1 ~ 5h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1:5 ~ 15,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取 1 ~ 5h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 2 ~ 5 次,蒸馏水提取液合并,再减压浓缩,除去其水量的 4/5 ~ 14/15 的水分,得到浓缩的水提取液;

[0017] B、脱蛋白

[0018] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1:0.3 ~ 1.5,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液进行离心分离,离心的上清液按照上述操作重复 2 ~ 10 次,得到脱蛋白的上清液;

[0019] C、氧化

[0020] 往步骤 B 得到的脱蛋白上清液中加入氨水,将所述合并上清液的 pH 值调节至 7.0 ~ 9.0,再向其中缓慢滴加 H_2O_2 ,在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液总体积的 1 ~ 5%,然后在温度 30 ~ 60℃ 下保温 2 ~ 8h,得到一种无色溶液;

[0021] D、醇沉

[0022] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 30 ~ 90%,然后在室温下静置 3 ~ 15h,再进行离心,离心上清液进行真空干燥,得到醇沉竹节参多糖。

[0023] 根据本发明的一种优选实施方式,在步骤 A 中,所述竹节参渣与蒸馏水按照重量比 1:8 ~ 12 混合,然后加热回流提取 2 ~ 4h。

[0024] 根据本发明的另一种优选实施方式,在步骤 A 中,所述的减压浓缩是在压力 0.001 ~ 0.01MPa 下进行浓缩。

[0025] 根据本发明的另一种优选实施方式,在步骤 B 中,所述浓缩水提取液与 Sevage 试剂的重量比是 0.6 ~ 1.2。

[0026] 根据本发明的另一种优选实施方式,在步骤 C 中,含有 H_2O_2 的脱蛋白上清液在温度 38 ~ 50℃ 下保温 3.2 ~ 6.5h。

[0027] 根据本发明的另一种优选实施方式,在步骤D中,含有乙醇的无色溶液在室温下静置5~12h。

[0028] 根据本发明的另一种优选实施方式,在步骤D中,所述真空干燥是在压力0.01~0.1MPa与温度30~50℃的条件下进行干燥。

[0029] 根据本发明的另一种优选实施方式,所述的离心分离是在离心机转速1000~3000转/分的条件下进行分离的。

[0030] 本发明还涉及采用所述制备方法所得到的醇沉竹节参多糖。

[0031] 本发明还涉及所述的醇沉竹节参多糖在制备疫苗佐剂中的用途。

[0032] 下面将更详细地描述本发明。

[0033] 本发明涉及一种用作疫苗佐剂的醇沉竹节参多糖的制备方法。

[0034] 该制备方法包括如下步骤:

[0035] A、竹节参水提取

[0036] 将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比1:5~15,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为85~95%乙醇水溶液中,浸泡1~5h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比1:5~15,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取1~5h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取2~5次,蒸馏水提取液合并,再减压浓缩,除去其水量的4/5~14/15的水分,得到浓缩的水提取液;

[0037] 所述的竹节参原料是目前我国市场上销售的竹节参中药材,例如湖北省恩施州宣恩椿木营竹节参种植基地种植的竹节参。通常,竹节参中药材需要进行常规挑选、清洗、干燥等预处理后,再使用在中药材加工技术领域通常使用的粉碎机对干燥竹节参进行粉碎,粉碎的竹节参再用标准筛进行筛分,收集20-40目竹节参粉作为本发明方法的处理原料。

[0038] 根据本发明,用乙醇处理竹节参的作用在于去除竹节参另一主要成分皂苷及其它脂溶性杂质的干扰。

[0039] 在本发明中,使用体积分数为85~95%乙醇水溶液浸泡竹节参粉,如果乙醇水溶液的浓度超过95%,则会使脂溶性皂苷成分除不去达不到脱脂的效果;如果乙醇水溶液的浓度低于85%,则会使得多糖含量降低;因此,乙醇水溶液的浓度为85~95%是合适的,优选地是88~92%。

[0040] 在用乙醇处理竹节参时,竹节参与乙醇水溶液的重量比优选地是1:6~14,浸泡1.8~4.2h,更优选地是1:8~12,浸泡2.5~3.6h。

[0041] 用乙醇处理竹节参所使用的设备是目前市场上普遍销售的圆底烧瓶,例如由蜀牛玻璃仪器公司以商品名圆底烧瓶销售的产品。

[0042] 根据本发明,用蒸馏水提取竹节参的作用是使得竹节参中的水溶性糖完全提取出来。在用蒸馏水提取竹节参时,竹节参渣与蒸馏水的重量比优选地是1:6~12,加热回流提取1.8~4.2h。更优选地是1:8~10,加热回流提取2.8~4.0h。

[0043] 用蒸馏水提取竹节参所使用的加热回流提取设备是目前市场上销售的电加热套,例如由巩义市予华仪器有限责任公司公司以商品名电热套销售的产品。

[0044] 在减压浓缩时所使用的设备是目前市场上销售的旋转蒸发仪,例如由上海亚荣生

化仪器厂公司以商品名 RE-52AA 型旋转蒸发仪销售的产品。

[0045] 根据本发明,在压力 0.001 ~ 0.01MPa 与室温的条件下进行减压浓缩,浓缩除去其水量的 4/5 ~ 14/15 的水分最为合适,如果除去的水量小于 4/5,则剩余体积太大,为后续操作带来不便并且浪费试剂;如果除去的水量大于 14/15,则多糖过饱和,可能产生沉淀。优选地是除去 6/7 ~ 12/13 的水分,更优选地是除去 8/9 ~ 11/12 的水分。

[0046] B、脱蛋白

[0047] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1:0.3 ~ 1.5,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液进行离心分离,离心的上清液按照上述操作重复 2 ~ 10 次,得到的脱蛋白的上清液。

[0048] Sevage 试剂是由氯仿与正丁醇按照体积比 5:1 组成的试剂。该步骤利用蛋白质在氯仿等溶剂中变性的特点,让所述提取液与 Sevage 试剂混合、震荡、静置,将蛋白质分离除去,这种方法条件温和,不会引起多糖变性。

[0049] 该步骤使用的设备是化工技术领域里通常使用的设备大型离心机,例如由济南福的机械有限公司以商品名落地式大型离心机 TG21KR 销售的产品。

[0050] 优选地,所述浓缩水提取液与 Sevage 试剂的重量比是 0.6 ~ 1.2。

[0051] 优选地,所述重复除蛋白次数为 3-5 次。

[0052] C、氧化

[0053] 往步骤 B 得到的脱蛋白上清液中加入氨水,将所述上清液的 pH 值调节至 7.0 ~ 9.0,再向其中缓慢滴加 H_2O_2 ,在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液总体积的 1 ~ 5%,然后在温度 30 ~ 60℃ 下保温 2 ~ 8h,得到一种无色溶液。

[0054] 在本发明中,所使用氨水的浓度不是特别关键,通常是以重量计 25 ~ 35%。

[0055] 在本发明中, H_2O_2 的作用在于将有色的酚类等物质氧化成无色的酸类。如果 H_2O_2 的体积为所述脱蛋白上清液总体积的 1.0% 以下时,则不能充分的达到氧化脱色的效果;如果 H_2O_2 的体积为所述脱蛋白上清液总体积的 5.0% 以上时,则脱色并未明显增强而浪费时间和试剂;因此 H_2O_2 的体积为所述脱蛋白上清液总体积的 1 ~ 5% 是合适的。

[0056] 优选地,所述 H_2O_2 的体积是所述脱蛋白上清液总体积的 1.5 ~ 4.5%,更优选地是 2.0 ~ 4.0%。

[0057] 在本发明中,含有 H_2O_2 的脱蛋白上清液优选地在温度 38 ~ 50℃ 下保温 3.2 ~ 6.5h,更优选地在温度 42 ~ 46℃ 下保温 4.2 ~ 5.5h。

[0058] D、醇沉

[0059] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 30 ~ 90%,然后在室温下静置 3 ~ 15h,再进行离心,离心上清液进行真空干燥,得到醇沉竹节参多糖。

[0060] 在这个步骤中,含有乙醇的无色溶液优选地在室温下静置 5 ~ 12h,更优选地在室温下静置 8 ~ 10h。

[0061] 在这个步骤中,所述真空干燥是在压力 0.01 ~ 0.1MPa 与温度 30 ~ 50℃ 的条件下进行干燥。

[0062] 本发明使用的真空干燥设备是目前市场上销售的产品,例如由上海一恒科学仪器有限公司以商品名真空干燥箱销售的产品。

[0063] 在本发明中,所述的离心分离是在离心机转速 1000 ~ 3000 转 / 分的条件下进行分离的。所述的离心机是目前市场上销售的离心机,例如由北京京立离心机有限公司以商品名低速大容量离心机销售的产品。

[0064] 在本发明中,往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 30 ~ 90%,因为若使溶液中乙醇浓度小于 30%,则乙醇浓度太低,所得多糖量较少;若加入乙醇量大于 90%,虽然得到多糖量增加,但后续药理实验证实作为免疫佐剂的效果降低,所以使乙醇浓度达到体积分数为 30 ~ 90% 较为合适,更优选地为 55-62%。

[0065] 本发明还涉及采用所述制备方法所得到的竹节参多糖。所述竹节参多糖的红外图谱如附图 2:

[0066] 从图中可知,在 $3200-3600\text{cm}^{-1}$ 之间出现一个宽峰,这是多糖分子内或分子间氢键 O-H 伸缩振动的结果,在 2950cm^{-1} 附近是次甲基 ($-\text{CH}_2-$) 中 C-H 的伸缩振动吸收峰;在 $1200-1400\text{cm}^{-1}$ 吸收峰是 C-H 的弯曲振动引起的,它和 C-H 的伸缩振动构成了糖环的特征吸收, 1500cm^{-1} 吸收峰是羰基 C=O 的伸缩振动; 1030cm^{-1} 为醇羟基的伸缩振动;在 1150cm^{-1} 附近的峰为吡喃糖环的醚键 (C-O-C) 伸缩振动;在 900cm^{-1} 附近的吸收峰为吡喃糖环醚键 (C-O-C) 非对称伸缩振动;因此,所述 30%、60% 及 90% 醇沉竹节参多糖都是含有吡喃糖环的多糖。

[0067] 采用所述制备方法所得到的醇沉竹节参多糖的含量测定方法如下:

[0068] 5% 苯酚的配制:

[0069] 称取苯酚 100g,加 0.1g 铝片和 0.05g 碳酸氢钠,进行常压蒸馏,收集 $180\pm 2^\circ\text{C}$ 馏分。精确称取约 10.0g 该馏分,置于 200mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀后转置于棕色试剂瓶中, 4°C 保存备用。

[0070] 葡萄糖对照溶液的配制:

[0071] 精确称取 50mg 减压真空干燥至恒重的葡萄糖,溶于在 50mL 容量瓶中的蒸馏水中,精确移取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0mL,加到 25mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,得到一组葡萄糖对照溶液。

[0072] 本发明醇沉竹节参多糖测试液配制:

[0073] 精密称定竹节参粉末 1g(过四号筛),置圆底烧瓶中,加入 50mL80% 乙醇,回流 3 次,每次 2h,弃滤液,粉末挥干溶剂后加 50mL 蒸馏水,称重,静置 1h,回流 2h,放冷,称重,用蒸馏水补足重量,摇匀,滤过,滤液即是竹节参多糖测试液。

[0074] 本发明醇沉竹节参多糖最大吸收波长的选择:

[0075] 吸取葡萄糖标准溶液、本发明醇沉竹节参多糖测试液各 1mL 至具塞试管中,加入 2.0mL 苯酚,迅速加入 7.0mL 浓硫酸,混匀,置 40°C 水浴中 30min,在冰浴中冷却 10min。以试剂空白为参比,在 200 ~ 1100nm 波长范围进行扫描,确定最大吸收波长为 478nm。扫描结果见附图 1。

[0076] 标准曲线的绘制:

[0077] 精确量取葡萄糖与测试溶液各 1mL,测定吸光度,得到在每 1mL 含葡萄糖 40 ~ 160 μg 范围内葡萄糖量与吸收度呈良好的线性关系,回归方程为 $A=49.379X+0.1741R^2=0.9997$ 。根据回归方程,计算样品中竹节参多糖的含量。

- [0078] 本发明用作疫苗佐剂的醇沉竹节参多糖制备方法具有下述特点与优势：
- [0079] A、采用水回流提取法简单、成本低、易于实现大量生产。
- [0080] B、水提醇沉法能够将大部分的多糖完全沉淀出来，效率较高。
- [0081] C、分段醇沉可以将不同极性、不同分子量的多糖区分开来，寻找最强免疫佐剂活性的活性部位。
- [0082] 本发明还涉及所述的醇沉竹节参多糖在制备疫苗佐剂中的用途。
- [0083] 佐剂是非特异性免疫增强剂，当与抗原一起注射或预先注入机体时，它可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。
- [0084] 采用粘度法测定不同醇沉部位多糖粘均分子量，随后进行动物实验并采用 ELISA 检测抗体滴度（参见实施例部分）及特异性细胞免疫学活性测定，通过这些实验证明，采用本发明方法制备的醇沉竹节参多糖具有佐剂活性。
- [0085] 该佐剂活性表征如下：
- [0086] 应用抗原免疫小鼠，同时分别加入多糖作为免疫佐剂，然后分离小鼠血清，通过 ELISA 方法检测小鼠特异性抗体产生效价，通过对比 ELISA 结果中实验组与对照组的 OD 值，及通过刺激淋巴细胞测定抗原特异性细胞免疫及细胞因子的产生，判断佐剂效果。
- [0087] 与现有的疫苗佐剂相比，本发明醇沉竹节参多糖疫苗佐剂具有优点如下：
- [0088] A、竹节参多糖疫苗佐剂副作用小、来源广泛、易于生产。
- [0089] B、竹节参多糖佐剂具有刺激 Th1 细胞免疫及刺激抗体产生的强大佐剂活性，能更大的辅助疫苗发挥作用。
- [0090] C、竹节参多糖属于中药疫苗佐剂，为进一步开发新型疫苗佐剂奠定了基础。
- [0091] [有益效果]
- [0092] 本发明的有益效果是：本发明是竹节参多糖具有明显的佐剂活性，其中 60% 醇沉竹节参多糖部分，粘均分子量处于中间，其佐剂活性明显优于铝佐剂。
- [0093] ELISA 实验结果中，60% 醇沉中粘多糖，其多糖佐剂活性表征指标值明显高于单纯抗原组，特异性细胞免疫活性也明显高于铝佐剂。而且，竹节参多糖来源广泛，副作用小，因此，可以作为临床开发的疫苗佐剂。

【附图说明】

- [0094] 图 1 是本发明醇沉竹节参多糖在波长 200 ~ 1100nm 范围内的吸收光谱；
- [0095] 样品 1- 葡萄糖，样品 2- 多糖
- [0096] 图 2 是 60% 醇沉竹节参多糖红外光谱图；
- [0097] 图 3 表示佐剂对小鼠淋巴细胞增殖的细胞因子 IL-2 产生的影响；
- [0098] 图 4 表示佐剂对小鼠淋巴细胞增殖的细胞因子 IFN- γ 产生的影响；
- [0099] 图 5 表示佐剂对小鼠 OVA 特异性抗体 IgG 及其亚型产生的影响。

【具体实施方式】

- [0100] 通过下述实施例将能够更好地理解本发明。在本发明中，在没有特殊说明的前提下，液相混合物中的组分的百分比应当理解为体积百分比，固相混合物的组分的百分比应当理解为重量百分比。

[0101] 实施例 1 :本发明醇沉竹节参多糖的制备

[0102] 该实施例的实施步骤如下 :

[0103] A、竹节参水提取

[0104] 将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1 :14,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 85% 乙醇水溶液中,浸泡 1h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1 :5,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取 1.8h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 2 次,蒸馏水提取液合并,再在压力 0.006MPa 下减压浓缩得到浓缩的水提取液 ;

[0105] B、脱蛋白

[0106] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1 :0.8,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液在离心机转速 2000 转 / 分的条件下进行离心分离,离心的上清液接着重复上述操作 4 次,得到的离心上清液合并 ;

[0107] C、氧化

[0108] 往步骤 B 得到的合并离心上清液中加入以重量计 28% 氨水,将所述合并上清液的 pH 值调节至 7.6,再向其中缓慢滴加 H_2O_2 ,在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液体积的 1.5%,然后在温度 38℃ 下保温 3.2h,得到一种无色溶液 ;

[0109] D、醇沉

[0110] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 30%,然后在室温下静置 3h,再在离心机转速 2000 转 / 分的条件下进行离心,离心上清液在压力 0.06MPa 与温度 35℃ 的条件下进行真空干燥,得到醇沉竹节参多糖。

[0111] 采用本说明书描述的方法测定本实施例制备醇沉竹节参多糖的竹节参多糖含量是 52.8%。

[0112] 实施例 2 :本发明醇沉竹节参多糖的制备

[0113] 该实施例的实施步骤如下 :

[0114] A、竹节参水提取

[0115] 将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1 :8,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 85% 乙醇水溶液中,浸泡 2.5h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1 :8,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取 4.2h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 5 次,蒸馏水提取液合并,再在压力 0.008MPa 下减压浓缩得到浓缩的水提取液 ;

[0116] B、脱蛋白

[0117] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1 :1.0,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液在离心机转速 2600 转 / 分的条件下进行离心分离,离心的上清液接着重复上述操作 6 次,得到的离心上清液合并 ;

[0118] C、氧化

[0119] 往步骤 B 得到的合并离心上清液中加入体积分数为 35% 氨水,将所述合并上清液的 pH 值调节至 7.0,再向其中缓慢滴加 H_2O_2 ,在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液体积的 4.5%,然后在温度 30℃ 下保温 6.5h,得到一种无色溶液 ;

[0120] D、醇沉

[0121] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 45%,然后在室温下静置 15h,再在离心机转速 2600 转 / 分的条件下进行离心,离心上清液在压力 0.08MPa 与温度 40℃ 的条件下进行真空干燥,得到醇沉竹节参多糖。

[0122] 采用本说明书描述的方法测定本实施例制备醇沉竹节参多糖的竹节参多糖含量是 65.1%

[0123] 实施例 3:本发明醇沉竹节参多糖的制备

[0124] 该实施例的实施步骤如下:

[0125] A、竹节参水提取

[0126] 将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1:5,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 90% 乙醇水溶液中,浸泡 3.6h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1:10,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取 1h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 3 次,蒸馏水提取液合并,再在压力 0.001MPa 下减压浓缩得到浓缩的水提取液;

[0127] B、脱蛋白

[0128] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1:0.3,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液在离心机转速 1000 转 / 分的条件下进行离心分离,离心的上清液接着重复上述操作 2 次,得到的离心上清液合并;

[0129] C、氧化

[0130] 往步骤 B 得到的合并离心上清液中加入体积分数为 25% 氨水,将所述合并上清液的 pH 值调节至 8.0,再向其中缓慢滴加 H_2O_2 ,在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液体积的 1%,然后在温度 50℃ 下保温 2h,得到一种无色溶液;

[0131] D、醇沉

[0132] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇,使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 60%,然后在室温下静置 5h,再在离心机转速 1000 转 / 分的条件下进行离心,离心上清液在压力 0.01MPa 与温度 30℃ 的条件下进行真空干燥,得到醇沉竹节参多糖。

[0133] 采用本说明书描述的方法测定本实施例制备醇沉竹节参多糖的竹节参多糖含量是 81.8%。

[0134] 实施例 4:本发明醇沉竹节参多糖的制备

[0135] 该实施例的实施步骤如下:

[0136] A、竹节参水提取

[0137] 将竹节参原料粉碎,按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1:15,将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 90% 乙醇水溶液中,浸泡 5h,再加热回流提取脱脂,分离得到提取液与竹节参渣,提取液弃去,按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1:15,往所述竹节参渣中添加蒸馏水,加热回流提取 5h,然后分离,提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 4 次,蒸馏水提取液合并,再在压力 0.002MPa 下减压浓缩得到浓缩的水提取液;

[0138] B、脱蛋白

[0139] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1:1.5,往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂,震荡后静置,上层液在离心机转速 2600 转 / 分的条件下进行离心分离,离心的上清液接着重复上述操作 8 次,得到的离心上清液合并;

[0140] C、氧化

[0141] 往步骤 B 得到的合并离心上清液中加入体积分数为 28% 氨水, 将所述合并上清液的 pH 值调节至 9.0, 再向其中缓慢滴加 H_2O_2 , 在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液体积的 5%, 然后在温度 42℃ 下保温 8h, 得到一种无色溶液;

[0142] D、醇沉

[0143] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇, 使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 75%, 然后在室温下静置 12h, 再在离心机转速 1500 转 / 分的条件下进行离心, 离心上清液在压力 0.02MPa 与温度 46℃ 的条件下进行真空干燥, 得到醇沉竹节参多糖。

[0144] 采用本说明书描述的方法测定本实施例制备醇沉竹节参多糖的竹节参多糖含量是 65.9%。

[0145] 实施例 5: 本发明醇沉竹节参多糖的制备

[0146] 该实施例的实施步骤如下:

[0147] A、竹节参水提取

[0148] 将竹节参原料粉碎, 按照竹节参与乙醇水溶液的重量比 1:6, 将粉碎竹节参浸泡在体积分数为 90% 乙醇水溶液中, 浸泡 1.8h, 再加热回流提取脱脂, 分离得到提取液与竹节参渣, 提取液弃去, 按照竹节参渣与蒸馏水的重量比 1:6, 往所述竹节参渣中添加蒸馏水, 加热回流提取 2.8h, 然后分离, 提余的竹节参渣再用蒸馏水重复提取 5 次, 蒸馏水提取液合并, 再在压力 0.004MPa 下减压浓缩得到浓缩的水提取液;

[0149] B、脱蛋白

[0150] 按照步骤 A 得到的浓缩水提取液与 Sevage 试剂重量比 1:0.6, 往所述浓缩水提取液中加入 Sevage 试剂, 震荡后静置, 上层液在离心机转速 2000 转 / 分的条件下进行离心分离, 离心的上清液接着重复上述操作 10 次, 得到的离心上清液合并;

[0151] C、氧化

[0152] 往步骤 B 得到的合并离心上清液中加入体积分数为 35% 氨水, 将所述合并上清液的 pH 值调节至 8.5, 再向其中缓慢滴加 H_2O_2 , 在不断的搅拌下使 H_2O_2 的体积达到所述脱蛋白上清液体积的 2.0%, 然后在温度 60℃ 下保温 4.2h, 得到一种无色溶液;

[0153] D、醇沉

[0154] 往步骤 C 得到的无色溶液加入体积分数为 95% 乙醇, 使无色溶液中的乙醇浓度达到体积分数为 90%, 然后在室温下静置 8h, 再在离心机转速 2000 转 / 分的条件下进行离心, 离心上清液在压力 0.04MPa 与温度 50℃ 的条件下进行真空干燥, 得到醇沉竹节参多糖, 也称之 90% 醇沉竹节参多糖。

[0155] 采用本说明书描述的方法测定本实施例制备醇沉竹节参多糖的竹节参多糖含量是 62.3%。

[0156] 试验实施例:

[0157] 一、粘度法测定不同醇沉部位的多糖粘均分子量

[0158] 1、本发明醇沉竹节参多糖溶液粘度流出时间 t_i

[0159] ①在粘度计中注入 10mL 本发明醇沉竹节参多糖溶液;

[0160] ②测量时, 将由上海笛柏化学品技术有限公司销售的粘度计沿 A 管一侧放倒, 使计内溶液由 A 球全部进入 B 球, 再慢慢顺时针抬起粘度计 45° 角度, 使 a 球溶液顺利流入定

体积 c 球,并注满。此时可将粘度计竖直,多余溶液及液表面气泡由 f 管流入 b 球,观察记录液面通过 e1、e2 刻度线时所用的时间,即为要测得 t_i (平行测量 2 次,偏差 $< 0.5s$);

[0161] ③再向粘度计原溶液中依次加入 5mL、10mL 水,测量其 t_i 。

[0162] 2、水粘度流入时间 t_0 的测量

[0163] 用双蒸水洗粘度计 3 次,再向粘度计中注入 10mL 左右的双蒸水,操作步骤同上,测其流出时间 t_0 (平行测量 2 次,偏差 $< 0.5s$)。

[0164] 3、粘度计最后清洗处理测完后,倾净计内水,使管内尽量不要有残余水珠,将计内废液倒入回收瓶中,侧到放置于实验台上。

[0165] 二、动物实验

[0166] A、实验方法

[0167] 1、动物分组及免疫方法

[0168] 本实施例中将竹节参中粘多糖生理盐水溶液和 OVA (sigma Aldrich 公司)生理盐水溶液混合后在室温下以每分钟 50 转的转速震荡 30 分钟,制备竹节参中粘多糖生理盐水溶液和 OVA 生理盐水溶液的混合液。其它佐剂与 OVA 的混合液都是以同样的条件和方法制备。将 30 只 Balb/c 雌性小鼠随机分组,每组 5 只。生理盐水对照组:每只皮下注射生理盐水 0.2mL; 其它各组均按表中所列的剂量进行相应的免疫。各组皮下注射免疫 2 次,第一次免疫和第二次免疫间隔 14 天,在第二次免疫后的 14 天,取小鼠眼球放血,制备相应的血清,及无菌条件下取小鼠脾脏,进行下列研究。

[0169]

	分组	试剂	剂量 x 免疫次数	动物数
第 1 组	空白对照	生理盐水	200 ul x2	5
第 2 组	抗原	OVA	100ugx2	5
第 3 组	铝盐	OVA+铝佐剂	(100ug+200ug) x2	5
第 4 组	竹节参中粘多糖 100	OVA+竹节参中粘多糖	(100ug+100ug) x2	5
第 5 组	竹节参中粘多糖 200	OVA+竹节参中粘多糖	(100ug+200ug) x2	5
第 6 组	竹节参中粘多糖 400	OVA+竹节参中粘多糖	(100ug+400ug) x2	5

[0170] 2、脾细胞悬液的制备

[0171] 将小鼠断颈处死,用 75% 的酒精浸泡消毒;无菌条件解剖小鼠取脾;用剪刀剔除结缔组织和脂肪,将脾组织置于放有纱布的平皿内,加 3mL 1640 培养液,研磨脾组织,用纱布过滤,吸取 1640 液得脾细胞悬液。悬液收集到无菌离心管,以 1800rpm/min 离心 5min,弃上清液,加入红细胞裂解液,待红细胞裂解后,以 1800rpm/min 离心 5min,用 1640 液洗涤细胞两次,用 RPMI1640 培养液将细胞稀释成 1×10^6 个 /ml,制成单细胞悬液,用于特异性淋巴细胞增殖实验。

[0172] 3、特异性淋巴细胞增殖反应

[0173] 将上述制备的淋巴细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加 $100 \mu l$ 脾细胞悬液 (1×10^6 个 /ml),各孔加等体积 OVA 溶液 (终浓度为 $10 \mu g/ml$),重复 3 孔,用 RPMI1640 (100IU/ml 青霉素、 $100 \mu g/ml$ 链霉素、10% 小牛血清) 补到 $200 \mu l$,另设空白对照组。在温度 $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱中培养 68h 后,各孔分别加 $20 \mu l$ 四甲基偶氮唑盐 (Methylthiazolotetrazolium, MTT 上海生工生物工程技术服务有限公司) 溶液 ($5mg/ml$),继续培养 4 小时,吸去上清液,加入 $200 \mu l$ 酸性二甲基亚砷 (DMSO) 溶液,振荡,于室温放置

15min,用酶标仪于 570nm 处测定吸光度(OD)值,并按下式计算刺激指数(SI):

[0174] SI(刺激指数)=加有 OVA 抗原的 OD 值 / 未加入 OVA 抗原的 OD 值

[0175] 4、ELISA 检测淋巴细胞培养上清中 IL-2 和 IFN- γ 的含量

[0176] 收集上述培养淋巴细胞的上清液,依照试剂盒(美国 R&D 公司)说明书测定细胞因子,具体操作如下:

[0177] 1) 包被用磷酸缓冲液(PBS)稀释后的捕获抗体,每孔 100 μ l,在温度 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。

[0178] 2) ELISA (酶联免疫吸附试验)洗涤液洗三遍后,甩去酶标板内液体,再对着吸水纸轻拍几下。

[0179] 3) 使用 1%BSA (牛血清白蛋白)室温封闭 90min 后重复步骤 2。

[0180] 4) 将获取的细胞上清液直接加入已包被有抗体的 ELISA 板,每孔 100 μ l,在室温下 2h。

[0181] 5) 重复步骤 2。

[0182] 6) 将生物素标记检测抗体稀释后(终浓度为 2000pg/mL)加入 ELISA 板,每孔 100 μ L,在室温下 2h。

[0183] 7) 重复步骤 2。

[0184] 8) 将 ABC (酶标记亲和素)工作液 100 倍稀释后加入 ELISA 板,每孔 100 μ l,置温度 37 $^{\circ}$ C 箱中反应 30min,1 \times PBS 洗 3 次后,加入 TMB 显色液 100 μ l,再次置 37 $^{\circ}$ C 避光反应 10-15min。

[0185] 9) 直接加入 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)终止液,每孔 50 μ l 后,在 450nm 波长的酶标仪进行测定。

[0186] 10) 按照试剂盒说明,绘制标准曲线,经 OD 值计算出各组的细胞因子浓度。

[0187] 5、ELISA 方法测定血清中 OVA 特异性抗体及亚类效价

[0188] 收集小鼠外周血血清,测定 OVA 特异性抗体。在 96 孔酶标板上,每孔加入 100 μ lOVA 的包被液(50 μ LmLOVA 的碳酸盐缓冲液),置 4 $^{\circ}$ C 孵育 24h,用洗涤液洗涤 3 次,每次 3min。每孔加封闭液 200 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,用洗涤液洗涤 3 次,每次 3min。加 100 μ L 待测血清,并用血清稀释液进行倍比稀释。37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,用洗涤液洗涤 3 次,每次 3min。每孔加辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgG 抗体稀释液(1:20000)、羊抗小鼠 IgG1 抗体稀释液(1:16000)和羊抗小鼠 IgG2b 抗体稀释液(1:8000)100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗涤 3 次,每次 3min。每孔加 100 μ L TMB 底物溶液(A 液和 B 液各 50 μ L),37 $^{\circ}$ C 暗处放置 10min,每孔加 50 μ L/孔 2NH₂SO₄ 溶液终止反应。置酶标仪于波长 450nm 处测定 OD 值,根据公式计算效价。样品效价 = 样品的 OD 值(A_{450nm}) / 阴性对照 OD 值 \geq 2.1 时的样品的最大稀释倍数。

[0189] C、实验结果

[0190] 1、粘度法测定不同醇沉部位多糖分子量结果

[0191] 60% 醇沉竹节参多糖的粘度系数为 8.167mL \cdot g⁻¹,经公式 $[\eta]=k\cdot M^{\alpha}$ (其中 K 为常数, K=0.007575mL \cdot g⁻¹, α =0.76 温度为 25 $^{\circ}$ C,溶剂为水时)计算粘均分子量分别为 1.45×10^4 。

[0192] 2、特异性淋巴细胞增殖活性

[0193] 竹节参中粘多糖(Panaxjaponicusmediumviscosity polysaccharidesPJ MVP)属

于 60% 醇沉的多糖,在竹节参总多糖中属于中等粘度,所以命名为 PJMVP。

[0194] 3、对 OVA 诱导的 OVA 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响

[0195] PJMVP 对 OVA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响结果见表 1。实验结果表明与 OVA 对照组相比,不同剂量的 PJMVP 均能极显著促进 OVA 诱导的小鼠特异性淋巴细胞增殖反应 $P<0.01$; 而 Alum 与单纯 OVA 相比,没有显著促进 OVA 特异性淋巴细胞增殖活性。

[0196] 表 1 特异性淋巴细胞增殖实验

[0197]	分组	剂量	SI
	生理盐水	-	1.41±0.05
	OVA	100	1.35±0.09
	铝佐剂	200	1.40±0.12
	竹节参中粘多糖	100	1.72±0.11*
		200	1.76±0.12*
		400	1.80±0.10**

[0198] 注：实验测定值用平均值 ± 标准差表示 ((n=5), 各组与铝佐剂组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

[0199] 4、竹节参中粘多糖对培养的淋巴细胞中 IL-2、IFN- γ 含量的影响

[0200] 上述刺激培养的淋巴细胞,于 72 小时收集上清,应用 ELISA 试剂盒测定上清中 IL-2、IFN- γ 含量。实验结果如附图 3 和附图 4,这些实验结果显示培养的淋巴细胞上清中 IL-2、IFN- γ 含量,在不同剂量的 PJMVP 组均能显著促进 IL-2、IFN- γ 的分泌,与抗原 OVA 组比较 $P<0.01$; 而 Alum 与单纯 OVA 相比,其 IL-2、IFN- γ 的分泌没有明显差异。结果表明,PJMVP 有良好的促进淋巴细胞分泌 IL-2 及 IFN- γ 的作用,提示他们具有促进 Th1 淋巴细胞增殖的活性。

[0201] 由 ELISA 检测抗体滴度图 5 可以看出:各种佐剂均具有促进抗体生成效应,其中 PJMVP 作用最为明显,可显著提高免疫小鼠血清中 OVA 特异性 IgG、IgG1 和 IgG2b 抗体效价。而 Alum 只具有刺激 IgG 和 IgG1 抗体产生作用,对 IgG2b 没有明显的促进作用(与 OVA 比较)。这些结果提示 Alum 主要针对 Th2 型的免疫效应,对 Th1 型细胞免疫活化作用较弱,与文献报道一致。PJMVP 具有促进 Th1 和 Th2 型细胞免疫活化作用介导的抗体产生。

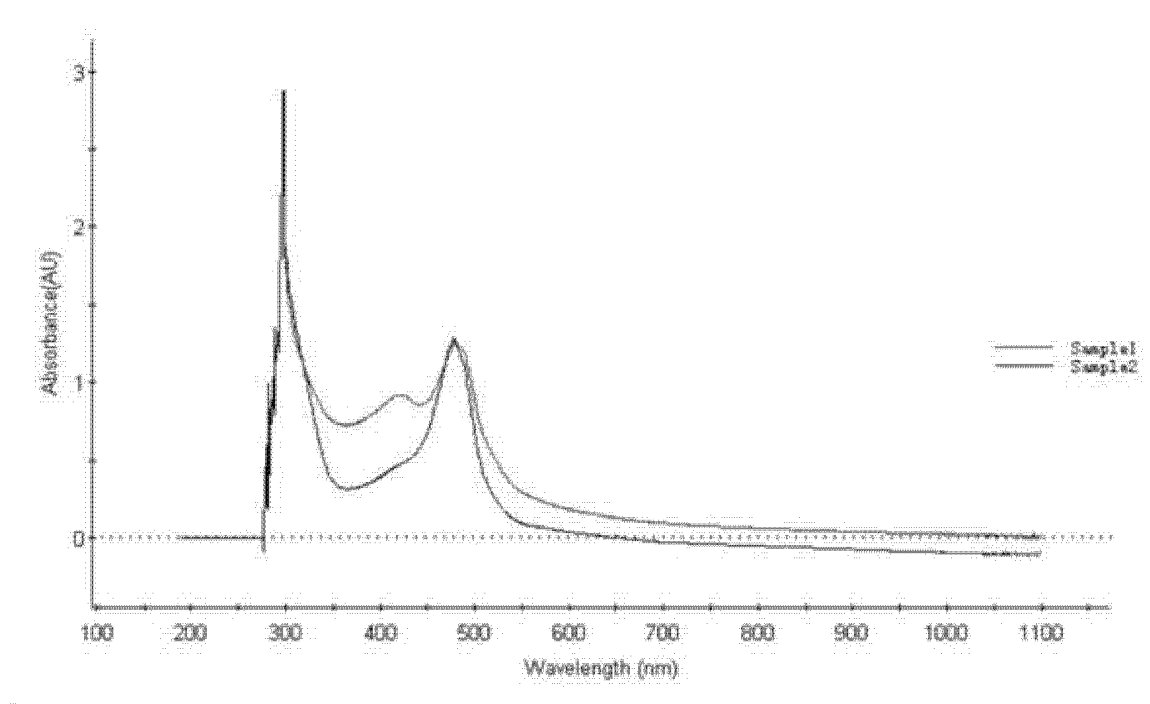


图 1

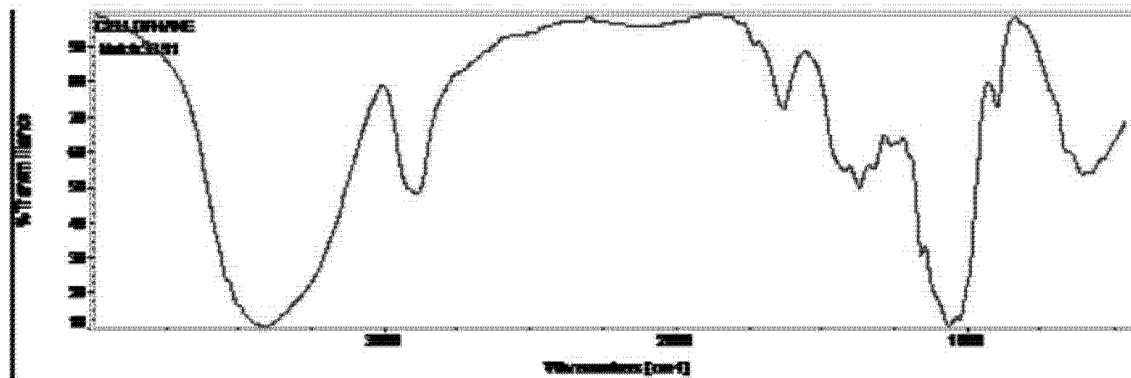


图 2

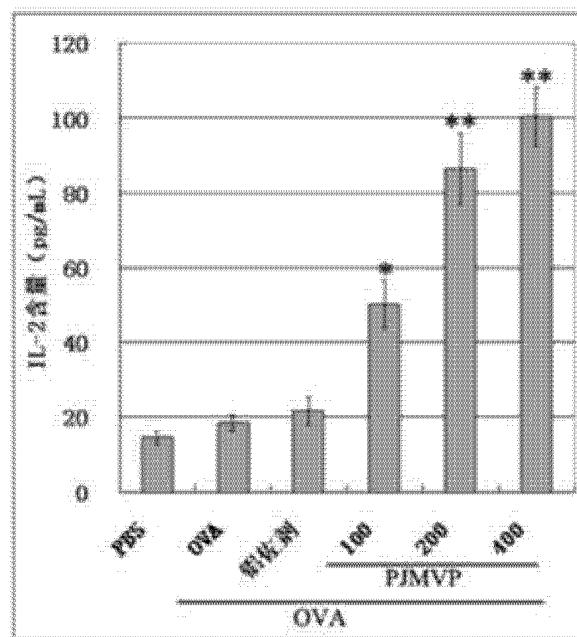


图 3

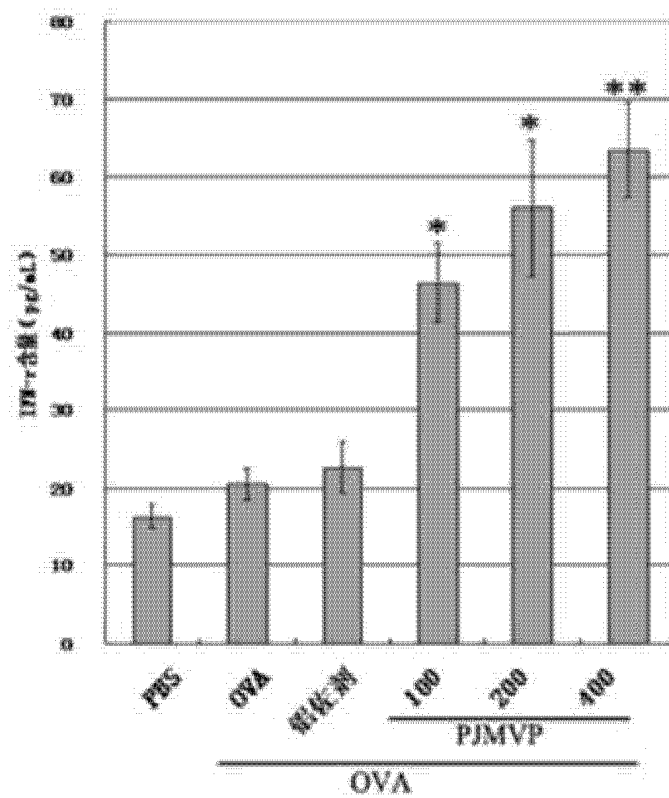


图 4

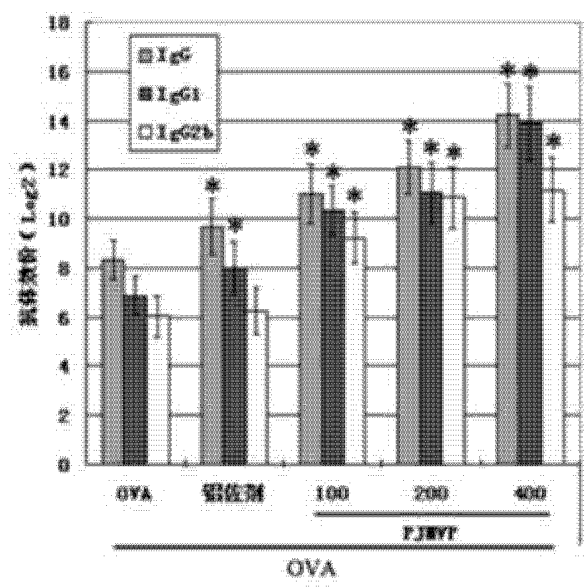


图 5