



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113347984 A

(43) 申请公布日 2021.09.03

(21) 申请号 201980069992.4

H·巴卢松

(22) 申请日 2019.10.22

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

(30) 优先权数据

1859721 2018.10.22 FR

11313

代理人 郝名悦 闫茂娟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.22

(51) Int.Cl.

A61K 36/05 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/078757 2019.10.22

A61P 31/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/083931 FR 2020.04.30

(71) 申请人 阿玛德特公司

地址 法国布雷昂

(72) 发明人 K·阿瑟努恩 C·杰奎琳

M·布拉斯 A·罗奎利

P·尼沃科伦 H·德玛斯

权利要求书1页 说明书21页 附图13页

(54) 发明名称

用于治疗或预防创伤后免疫抑制的藻类提取物

(57) 摘要

本发明涉及包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目藻类的提取物,用于预防和/或治疗由创伤后免疫抑制引起的并发症。

1. 一种包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物,用于预防和/或治疗由创伤后免疫抑制诱导的并发症。

2. 根据权利要求1所述使用的藻类提取物,用于预防和/或治疗与创伤后免疫抑制相关的感染性并发症。

3. 根据权利要求2所述使用的藻类提取物,其中所述感染性并发症是院内感染,特别是选自由下述组成的组中的院内感染:肺部疾病,比如机械通气下获得的肺炎,即呼吸机相关肺炎(VAP);尿路感染;中心静脉导管的感染;细菌性脑膜感染比如积脓症、脑膜炎和脑脓肿。

4. 根据权利要求1至3任一项所述使用的藻类提取物,其中所述创伤后免疫抑制由于一种或多种严重创伤,特别是严重颅脑创伤发生。

5. 根据权利要求1至4任一项所述使用的藻类提取物,其中所述藻类提取物是石莼类型的绿藻的提取物。

6. 根据权利要求1至4任一项所述使用的藻类提取物,其中分子量小于或等于50kDa的所述硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖具有小于15kDa,和优选地大于500Da的分子量。

7. 根据权利要求6所述使用的藻类提取物,其中所述藻类提取物不包括具有分子量大于15kDa的硫酸化或非硫酸化多阴离子多糖。

8. 根据权利要求1至7任一项所述使用的藻类提取物,其中所述藻类提取物包括:

- 甘露糖;和/或
- 阿拉伯糖;和/或
- 半乳糖;和/或
- 葡萄糖;和/或
- 鼠李糖;和/或
- 木糖;和/或
- 葡糖醛酸。

9. 根据权利要求1至8任一项所述使用的藻类提取物,其中,以藻类提取物的总干物质(干重)的质量百分比计,所述藻类提取物包括:

- 10至50%碳;
- 1至10%氢;
- 1至5%氮;
- 20至50%氧;和
- 1至15%硫。

10. 根据权利要求1至9任一项所述使用的藻类提取物,其中所述藻类提取物通过下述制备方法获得,其中:

- a) 将藻类冲洗和除沙;
- b) 研磨所述藻类;
- c) 将研磨材料的固相与其液相分开;
- d) 澄清所述液相;
- e) 通过具有50kDa或更小的孔径大小的膜超滤步骤d)中获得的汁液;和
- f) 浓缩步骤e)中获得的过滤汁液并且然后干燥。

用于治疗或预防创伤后免疫抑制的藻类提取物

技术领域

[0001] 本发明涉及包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目藻类的提取物,用于预防和/或治疗由创伤后免疫抑制诱导的并发症。

背景技术

[0002] 多创伤(多发性创伤)或严重创伤伴随着被称为“危险相关分子模式”(DAMP)的细胞内成分的释放引起的全身炎症性反应综合症(SIRS)。这些DAMP将直接刺激存在于免疫系统细胞上的特定受体,即“模式识别受体”,从而导致炎症的介质(炎症性介质)的释放。为了避免来自不受控制的SIRS的全身并发症,机体会发展早期全身代偿性抗炎性反应综合征(CARS)。CARS导致持续时间和程度不同的创伤后免疫抑制。起初,这种免疫抑制是“生理性”的并且存在于所有患者。如果免疫抑制持续,会变成病理性的,导致创伤后感染(主要是肺炎),其是重症监护中并发症的主要原因(Roquilly等,2015, Réanimation[Intensive Care Medicine],24:S285-S290)。

[0003] 颅脑创伤(或头部创伤)是发病和死亡的主要原因,受害者的总死亡率在每10万名患者中5和25人之间变化。约三分之一的发病和死亡因素是在重症监护中发生的可避免的并发症(感染、血栓栓塞事件),主要是由于呼吸系统并发症。在机械通气下获得的肺炎,即呼吸机相关肺炎(VAP)引起的发病率和医疗卫生费用,使其成为与提供的护理最相关的并发症之一。在重症监护室中住院的具有严重颅脑创伤的患者中,有40和60%之间将具有VAP,其约50%是由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MSSA)引起。遭受VAP的颅脑创伤患者在重症监护室住院期间,将具有更多的全身起源的脑损伤(发热、低血压、缺氧、高碳酸血症);机械通气的持续时间也将会延长,以及在重症监护室的持续时间也会延长。所有这些因素一方面有助于新的缺氧缺血性脑损伤的出现,并且另一方面也延误了重症监护后的管理(康复等)。因此,颅脑创伤患者的VAP的发展是不期望的长期神经病学结果的风险的独立因素。颅脑创伤患者对院内感染的易感性,尤其是对VAP的易感性是由于创伤后免疫抑制的出现。

[0004] 在细胞水平上,这种创伤后免疫抑制是在大约几个水平上带来的:

[0005] 1. 通过抗原呈递细胞(APC),主要是树突状细胞(DC)和单核细胞的抗原呈递能力的损伤。DC在捕获和呈现抗原,以及经分泌促炎性细胞因子(白细胞介素-12)激活淋巴细胞(T和NK)方面起着核心作用。

[0006] 2. 分泌促炎性细胞因子的能力下降。在急性肺损伤的情况下,APC和淋巴细胞之间的合作是必要的。因此,IL-12的产量改变,一种颅脑创伤的后果,将诱导由淋巴细胞分泌促炎性细胞因子比如INF γ 的减少(Spolarics等,2003,Crit.Care Med.;31(6):1722-9)。另一方面,经交感神经过度激活分泌抗炎性细胞因子(IL-10)的增加有助于加深这种免疫抑制状态(Roquilly等,2014,Crit.Care Med.,42(12):752-61)。因此,先天免疫应答的该“循环”的改变导致机体抵抗继发感染的能力下降。

[0007] 3. T淋巴细胞耗竭(“T细胞耗竭”),一种也在感染后免疫抑制中发现的现象。这种耗竭相当于淋巴细胞在高抗原负荷存在的情况下逐渐丧失促炎性功能。这种现象将用于部

分解释颅脑创伤患者中VAP的高发病率。这种“耗竭”现象和所得的淋巴球减少症是多创伤(多发性创伤)患者的死亡风险的因素(Heffernan等,2012,Crit.Care.,20;16(1):R12)。而且,在大多数患者中,这种淋巴球减少症会持续6个月以上。

[0008] 为了纠正这种创伤后免疫抑制的目的,近年来试验了许多疗法。他们的目的是限制最初的SIRS(以及CARS),特别是通过使用低剂量糖皮质激素;或通过使用葡聚糖、IFN γ 、GM-CSF或白细胞介素12恢复抗原呈递能力或细胞因子分泌能力。

[0009] “toll样受体”(TLR)涉及识别危险相关分子(DAMP)。这些受体位于先天免疫系统的细胞(先天免疫细胞)的表面。在人类中已经确定了十种不同的TLR,每种TLR识别一种或多种DAMP。TLR受体与其配体识别后,可激活两种主要的细胞内信号传导途径,其导致激活i) 转录因子核因子 κ B(NF- κ B,骨髓分化因子88或MyD88依赖性途径),其导致结合至促炎性细胞因子(白细胞介素12[IL-12]、肿瘤坏死因子 α [TNF α])的基因的启动子;和ii) IRF家族的核转录因子(干扰素调节因子[IRF],含有TIR结构域的衔接子-诱导的干扰素- β [TRIF]依赖性途径)。研究最多的受体是TLR4,其涉及识别构成革兰氏阴性杆菌的壁的脂多糖(LPS)以及TLR2,其识别革兰氏阳性细菌的脂磷壁酸。

[0010] TLR激动剂已被建议作为可能的研究途径,目的是恢复因创伤而“瘫痪”的免疫功能,并且对抗继发感染(Hedayat等,2011,Lancet Infect Dis.;11(9):702-12)。

[0011] 已表明,施用单磷酸脂质A(MPLA)(一种已知具有TLR4激动剂活性的LPS的无毒衍生物),预防源自出血-诱导的免疫抑制小鼠的出血后肺炎的小鼠模型的死亡(Roquilly等,2010,PLoS One 7;5(10):e13228;国际专利申请W02011080126)。然而,其中有效涉及的作用机制尚未阐明。在这种源自出血-诱导的免疫抑制小鼠的出血后肺炎的小鼠模型中,也已经显示MPLA部分恢复树突细胞(DC)的功能;预防NK细胞中IL-10mRNA的过度表达;并且DC的直接MPLA-刺激降低死亡,然而,直接刺激NK细胞将在这种对肺炎的免疫应答中显得可有可无(Roquilly等,2013,Eur Respir J.;42(5):1365-78)。然而,正如作者自己所承认的那样,尚未显示MPLA的这种作用由TLR4,特别是由DC或NK细胞表面表达的TLR4受体介导。

[0012] 基于海洋藻类的化合物被用于从制药工业至微生物学领域范围的各个领域。他们的生物活性成分主要由肽、多不饱和脂肪酸和多糖组成。海洋藻类的细胞壁含有丰富的硫酸化多糖,比如绿藻中的石莼聚糖。最近,已经显示,从石莼类型的绿藻中提取的纯化部分的石莼聚糖具有免疫调节活性,特别是在体外对肠猪上皮细胞IPEC-1(专利申请W02015071497)。在该IPEC-1细胞系中,藻类提取物经TLR4/NF- κ B途径(Berri等,2017,Algal Research,28,39-47),在体外(Berri等,2016,Journal of Applied Phycology,28(5):2999-3008)刺激促炎性细胞因子(IL1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 等)的分泌。

[0013] 发明人尝试确定石莼目藻类,特别是石莼类型的绿藻的提取物,其包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖,可预防或有效治疗创伤后免疫抑制,特别是其呼吸系统并发症。在颅脑(头部)创伤(Flierl等,2009,Nat Protoc.;4(9):1328-37),随后耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MSSA)诱导的肺炎的小鼠模型中特别评估了该提取物对肺的黏膜免疫力的影响。

[0014] 由此可见,在创伤后肺的细菌感染的鼠模型中,藻类提取物:

[0015] -限制了全身(脾脏)细菌扩散,但该影响并没有被显示与提取物的直接抗细菌作用有关,从而指示因创伤而瘫痪的免疫功能的恢复。

[0016] -不增加肺中产生促炎性细胞因子的先天性免疫细胞(产生IL-12的DC、产生TNF α 的巨噬细胞、产生干扰素 γ (INF γ)NK或T淋巴细胞(TL)的比例。

[0017] -增加肺(感染位点)的,而不是脾脏的总NK细胞的数量和产生INF γ 的NK细胞的数量,但不增加INF γ ⁺NK细胞的百分比。因此,这种影响抵消了颅脑创伤诱导的肺中的总NK细胞和INF γ ⁺NK细胞的数量减少。

[0018] -当小鼠经历了NK细胞耗竭(肺的NK细胞>95%耗竭)时,对全身细菌扩散没有影响。

[0019] -在肺中不会诱导涉及NK细胞趋化作用的趋化因子水平的任何增加。

[0020] 当在没有颅脑创伤的情况下诱导小鼠中的肺的细菌感染(因此没有免疫抑制)时,藻类提取物不诱导刺激先天性免疫细胞,无论是经由通过DC刺激IL-12分泌,通过巨噬细胞刺激TNF α ,或通过NK或T淋巴细胞(TL)刺激INF γ ;或经由通过DC刺激主要组织相容性复合物II类型(MHC II)的膜表达;并且还不限制细菌扩散。

[0021] 此外,直接在体外刺激来自天然或遭受创伤的小鼠的肺的NK细胞,藻类提取物不诱导干扰素 γ 或用于激活NK细胞的标志物杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1(KLRG1)的产量的任何增加。

[0022] 因此,这些结果表明由分子量小于或等于50kDa的包括硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目藻类,特别是石莼类型绿藻的提取物对预防或治疗创伤后免疫抑制的实用价值。

发明内容

[0023] 本发明涉及分子量小于或等于50kDa的包括硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目藻类的提取物,用于预防和/或治疗由创伤后免疫抑制诱导的并发症。

[0024] 根据一个实施方式,诱发的并发症是与创伤后免疫抑制相关的感染性并发症。根据某些实施方式,感染性并发症是院内感染,特别是选自由下述组成的组中的院内感染:肺部疾病,机械通气下获得的肺炎,即呼吸机相关肺炎(VAP);尿路感染;中心静脉导管的感染;细菌性脑膜感染比如积脓症、脑膜炎和脑脓肿。

[0025] 根据一个实施方式,创伤后免疫抑制发生是由于一种或多种严重创伤,特别是严重的颅脑创伤(头部创伤)的结果。

[0026] 石莼目的藻类提取物优选地是石莼(Ulva)类型的绿藻提取物。

[0027] 根据一个实施方式,分子量小于或等于50kDa的所述硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖具有小于15kDa并且优选地大于500Da的分子量。优选地,藻类提取物不包括具有大于15kDa的分子量的硫酸化或非硫酸化多阴离子多糖。

[0028] 根据一个实施方式,藻类提取物包括:

[0029] -甘露糖;和/或

[0030] -阿拉伯糖;和/或

[0031] -半乳糖;和/或

[0032] -葡萄糖;和/或

[0033] -鼠李糖;和/或

[0034] -木糖;和/或

- [0035] -葡糖醛酸。
- [0036] 根据一个实施方式,藻类提取物包括:
- [0037] -10至50%碳;
- [0038] -1至10%氢;
- [0039] -1至5%氮;
- [0040] -20至50%氧;和
- [0041] -1至15%硫;
- [0042] 占藻类提取物的总干物质(干重)的质量百分比。
- [0043] 根据一个其他实施方式,藻类提取物通过下述制备方法获得,其中:
- [0044] a) 将藻类冲洗和除沙;
- [0045] b) 研磨所述藻类;
- [0046] c) 研磨材料的固相与其液相分开;
- [0047] d) 澄清所述液相;
- [0048] e) 通过具有50kDa或更小的孔径大小的膜超滤步骤d)中获得的汁液;和
- [0049] f) 浓缩步骤e)中获得的过滤汁液并且然后干燥。
- [0050] 详细描述
- [0051] 根据一个方面,本发明涉及包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目藻类的提取物,用于预防和/或治疗由创伤后免疫抑制诱导的并发症。
- [0052] 根据一个方面,本发明涉及在需要其的受试者中预防性或治疗性治疗由创伤后免疫抑制诱导的并发症的治疗方法,方法包括向所述受试者施用有效量的包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物。
- [0053] 石莼目的藻类提取物
- [0054] 在专利申请W02015071497中特别地描述了包括具有分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的藻类提取物。
- [0055] 包括分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物特别地是石莼类型的绿藻提取物。
- [0056] 术语“石莼类型的绿藻”被理解为指石莼目的石莼科族的石莼属中的绿藻。可特别的提到由以下物种和亚物种制造: *Ulva acanthophora*, *Ulva anandii*, *Ulva angusta*, *Ulva arasakii*, *Ulva armoricana*, *Ulva atroviridis*, *Ulva attenuata*, *Ulva beytensis*, *Ulva bifrons*, *Ulva brevistipitata*, *Ulva bulbosa*, *Ulva burmanica*, *Ulva byssoides*, *Ulva californica*, *Ulva chaetomorphoides*, *Ulva clathrata*, *Ulva coccinea*, *Ulva compressa*, *Ulva conglobata*, *Ulva cornucopiae*, *Ulva cornuta*, *Ulva covelongensis*, *Ulva crassa*, *Ulva crassimembrana*, *Ulva curvata*, *Ulva dactylifera*, *Ulva denticulata*, *Ulva elegans*, *Ulva elminthoides*, *Ulva enteromorpha*, *Ulva erecta*, *Ulva expansa*, *Ulva fasciata*, *Ulva fenestrata*, *Ulva flexuosa*, *Ulva gelatinosa*, *Ulva geminoidea*, *Ulva gigantea*, *Ulva grandis*, *Ulva hendayensis*, *Ulva hookeriana*, *Ulva hopkirkii*, *Ulva indica*, *Ulva intestinalis*, *Ulva intestinaloides*, *Ulva intricata*, *Ulva intybacea*, *Ulva javanica*, *Ulva kylinii*, *Ulva lactuca*, *Ulva lactucaefolia*, *Ulva laetevirens*, *Ulva laingii*, *Ulva linearis*, *Ulva lingulata*, *Ulva linkiana*, *Ulva*

linza、Ulva lippii、Ulva litoralis、Ulva littorea、Ulva lobata、Ulva lubrica、Ulva marginata、Ulva micrococca、Ulva myriotrema、Ulva neapolitana、Ulva nematoidea、Ulva ohnoi、Ulva olivacea、Ulva olivaceum、Ulva pacifica、Ulva papenfussii、Ulva paradoxa、Ulva parva、Ulva parvula、Ulva patengensis、Ulva percursa、Ulva pertusa、Ulva phyllosa、Ulva popenguinensis、Ulva porrifolia、Ulva procera、Ulva profunda、Ulva prolifera、Ulva pseudocurvata、Ulva pseudolinza、Ulva pulchra、Ulva purpurascens、Ulva quilonensis、Ulva radiata、Ulva ralfsii、Ulva ranunculata、Ulva reticulata、Ulva rhacodes、Ulva rigida、Ulva rotundata、Ulva rubens、Ulva saifullahii、Ulva scagelii、Ulva scandinavica、Ulva sericea、Ulva serrata、Ulva simplex、Ulva sorensenii、Ulva spinulosa、Ulva stenophylla、Ulva stipitata、Ulva sublittoralis、Ulva subulata、Ulva taeniata、Ulva tenera、Ulva tetragona、Ulva torta、Ulva tuberosa、Ulva umbilicata、Ulva uncialis、Ulva uncinata、Ulva usneoides、Ulva utricularis、Ulva utriculosa、Ulva uvoides、Ulva ventricosa。

[0057] 以上提到的藻类提取物包括分子量小于或等于50k Da的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖。更特别地，藻类提取物包括具有分子量等于或小于50kDa (其中分子量小于40、30、20或15kDa)的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖。更特别地确实，海藻提取物的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖具有小于或等于15kDa的分子量。优选地，海藻提取物的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖具有大于500Da，优选地大于750Da的分子量。

[0058] 根据本发明的一个实施方式，藻类提取物不包括具有分子量大于50kDa (或大于40, 30, 20或15kDa, 当由分子量小于40、30、20或15kDa分别定义硫酸化的和未硫酸化的多糖时)的硫酸化或非硫酸化多阴离子多糖。因此，根据一个实施方式，当藻类提取物包括具有分子量小于或等于15kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖时，藻类提取物不包括具有分子量大于15kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖。

[0059] 达尔顿 (Da) 是质量单位，其定义为等于一个未结合的碳-12原子质量的十二分之一，一种随后将显示出从几种同位素 (主要是碳-12和碳-13, 除了任何碳原子的6个质子外，还分别具有6个和7个中子)的混合物中评估的质量。达尔顿是以相当良好程度精确性的氢原子的质量，精确值是1.00794amu (原子量单位)。单位千道尔顿 (kDa) 等于1000Da。在本发明的上下文中，以kDa计提到的质量是由本领域技术人员通常使用的任何适当的方法确定的，特别是藻类提取物的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的质量可通过在只允许预定尺寸分子过滤通过的膜上超滤来选择性地分离。

[0060] 根据一个实施方式，如以上本文描述的，具有分子量小于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖具有聚合作用的程度大于5-ose单位。

[0061] 在以上本文定义的藻类提取物中，多糖包括甘露糖和/或阿拉伯糖，优选地甘露糖。仍更特别地，藻类提取物相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计包括至少0.005%的甘露糖和/或至少0.005%的阿拉伯糖，特别是至少0.01%的甘露糖和/或至少0.01%的阿拉伯糖。优选地，藻类提取物包括至少0.005%的甘露糖。

[0062] 甚至更特别地，藻类提取物相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计包括0.005至0.5%，例如0.005至0.2%或0.15至0.5%范围的量的甘露糖；和/或0.005至0.5%范围的量的阿拉伯糖；特别是相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计0.005至

0.5%，例如0.005至0.2%或0.15至0.5%范围的量的甘露糖。

[0063] 甚至更特别地，藻类提取物相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计包括0.01至0.5%，例如0.01至0.2%或0.2至0.5%范围的量的甘露糖；和/或0.01至0.5%范围的量的阿拉伯糖；特别是0.03至0.45%，例如0.03至0.15%或0.15至0.45%范围的量的甘露糖；和/或0.01至0.2%范围的量的阿拉伯糖。

[0064] 优选地，藻类提取物相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计包括0.01至0.50%，例如0.01至0.20%或0.20至0.5%范围的量的甘露糖，特别是0.03至0.45%，例如0.03至0.15%或0.15至0.45%范围的量的甘露糖。

[0065] 根据一个实施方式，藻类提取物包括：

[0066] -半乳糖；和/或

[0067] -葡萄糖；和/或

[0068] -鼠李糖；和/或

[0069] -木糖；和/或

[0070] -葡糖醛酸。

[0071] 更特别地，相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计，藻类提取物包括：

[0072] -0.05至0.5%的半乳糖，特别是0.1至0.4%；和/或

[0073] -0.005至0.5%的葡萄糖，特别是0.005至0.05%、特别是0.01至0.03%或0.05至0.5%；和/或

[0074] -2至15%的鼠李糖，特别是5至10%；和/或

[0075] -0.1至1%的木糖，特别是0.3至0.7%；和/或

[0076] -1至7%的葡糖醛酸，特别是1至5%。

[0077] 因此，根据一个实施方式，藻类提取物包括：

[0078] -甘露糖；和/或

[0079] -阿拉伯糖；和/或

[0080] -半乳糖；和/或

[0081] -葡萄糖；和/或

[0082] -鼠李糖；和/或

[0083] -木糖；和/或

[0084] -葡糖醛酸。

[0085] 可更特别地提到，例如，由藻类提取物构成，相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计，所述藻类提取物包括：

[0086] -0.01至0.5%的甘露糖，例如0.01至0.2%，特别是0.03至0.15%或0.2至0.5%；和/或

[0087] -0.01至0.5%的阿拉伯糖，特别是0.01至0.2%；和/或

[0088] -0.05至0.5%的半乳糖，特别是0.1至0.4%；和/或

[0089] -0.005至0.5%的葡萄糖，特别是0.005至0.05%，特别是0.01至0.03%或0.05至0.5%；和/或

[0090] -2至15%的鼠李糖，特别是5至10%；和/或

[0091] -0.1至1%的木糖，特别是0.3至0.7%；和/或

- [0092] -1至7%的葡糖醛酸,特别是1至5%。
- [0093] 确实甚至更特别地,可提到,例如,由藻类提取物构成,相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计,所述藻类提取物包括:
- [0094] -0.09%甘露糖;和/或
- [0095] -0.1%阿拉伯糖;和/或
- [0096] -0.3%半乳糖;和/或
- [0097] -0.02%葡萄糖;和/或
- [0098] -8.1%鼠李糖;和/或
- [0099] -0.5%木糖;和/或
- [0100] -2.6%葡糖醛酸。
- [0101] 可提到,例如,由藻类提取物构成,相对于藻类提取物的总干物质的重量按重量计,所述藻类提取物包括:
- [0102] -0.3%甘露糖;和/或
- [0103] -0.2%半乳糖;和/或
- [0104] -0.4%葡萄糖;和/或
- [0105] -7.9%鼠李糖;和/或
- [0106] -0.5%木糖;和/或
- [0107] -4.9%葡糖醛酸。
- [0108] 根据一个实施方式,藻类提取物包括具有分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖,如以上本文描述的,包括:
- [0109] -10至50%碳;
- [0110] -1至10%氢;
- [0111] -1至5%氮;
- [0112] -20至50%氧;和
- [0113] -1至15%硫;
- [0114] 占藻类提取物的总干物质的质量百分比。
- [0115] 的确甚至更特别地,藻类提取物包括:
- [0116] -15至30%碳;
- [0117] -3至6%氢;
- [0118] -1至3%氮;
- [0119] -25至40%氧;和
- [0120] -2.5至10%硫;
- [0121] 占藻类提取物的总干物质的质量百分比。
- [0122] 根据本发明的一个其他实施方式,藻类提取物包括:
- [0123] -10至50%碳;
- [0124] -1至10%氢;
- [0125] -0.5至5%氮;
- [0126] -20至60%氧;和
- [0127] -1至15%硫;

[0128] 占藻类提取物的总干物质的质量百分比。

[0129] 提取物的干物质中存在的其他化学元素特别是由矿物质 (Ca、K、Na、Mg、Al、Cl、I、P、Fe等) 表示。

[0130] 更特别地,本发明的上下文中描述的藻类提取物特征在于图1中呈现的¹H NMR光谱。

[0131] 该¹H NMR光谱是在298K在配备5mm逆TCI低温探针¹H/¹³C/¹⁵N的Bruker Avance 500光谱仪上记录的。在分析之前,将样品溶解在99.97%的D₂O中。相对于外部标准(三甲基硅基丙酸),化学位移以ppm表达。没有进行HOD信号抑制。

[0132] 如以上本文描述的,包括具有分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物能够通过以下制备方法获得,或通过以下制备方法获得:

[0133] a) 将藻类冲洗和除沙;

[0134] b) 研磨所述藻类;

[0135] c) 研磨材料的固相与其液相分开;

[0136] d) 澄清所述液相;

[0137] e) 通过具有50kDa或更小的孔径大小的膜超滤步骤d)中获得的汁液;和

[0138] f) 浓缩步骤e)中获得的过滤汁液并且然后干燥。

[0139] 根据一个实施方式,制备方法另外包括在冲洗/去沙的步骤a)和研磨的步骤b)之间的冷冻步骤随后解冻处理。

[0140] 特别地,对于如本发明的上下文中指示的方法的实施,其步骤a)中,用淡水冲洗藻类。

[0141] 他们可通过本领域技术人员可获得的任何方式去沙。

[0142] 然后研磨所述藻类,特别是通过研磨机,比如例如精磨机或切割机。

[0143] 其后,研磨材料的固相(榨渣)通过压制研磨材料,例如使用带式或板式压机或通过离心与其液相(汁液)分开。

[0144] 术语“汁液”被理解为指包括藻类细胞的双膜结构的腔壁结构的细胞质汁液。

[0145] 然后澄清获得的液相,例如用盘式堆澄清器或通过离心、倾析或过滤(例如用袋式或板式过滤器)。

[0146] 然后超滤获得的汁液。

[0147] 根据实施如本发明的上下文中指示的方法的一个实施方式,在具有50kDa或更小的孔径大小(或标称分子量限制NMWL)的膜上,特别是在具有40、30、20或15kDa的孔径大小的膜上进行超滤。更特别地,膜是具有15kDa或更小的孔径大小的膜。

[0148] 这种膜可例如是陶瓷膜或有机膜。更特别地,膜是陶瓷膜。

[0149] 其后可浓缩获得的过滤汁液,例如通过反渗透、蒸发或沉淀,并且然后干燥例如通过冷冻干燥或雾化。

[0150] 任选地,浓缩步骤可通过去矿化步骤进行,特别是在具有150和1000Da之间大小的膜上。

[0151] 任选地,然后可再次研磨获得的提取物,以便获得就颗粒大小方面是均质的粉末。

[0152] 根据这些方面中的一个,方法部分地在环境温度进行。术语“环境温度”被理解为

指示5和25°C之间的温度。

[0153] 根据这些方面中的另一个,方法部分地在4和10°C之间的温度进行,这样为了防止微生物形成和生长。

[0154] 根据用于实施如本发明的上下文中指示的方法的一个实施方式,以上提到的方法中的步骤f)获得的藻类提取物,例如通过超滤,特别是超滤盒上纯化,特别是为了去除矿物质部分。根据可选的实施方式,该纯化也可在浓缩步骤f)前或在浓缩步骤f)期间进行。

[0155] 制备以上本文描述的藻类提取物的制备方法不使用溶剂,特别是有机溶剂,和更特别地除了水的溶剂。

[0156] 优选地,包括具有分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物展示出一个或多个以下效果:

[0157] -其限制了全身性细菌扩散,优选地通过由NK细胞介导的机制;

[0158] -其在感染的位点处增加了总NK细胞的数量和产生INF γ 的NK细胞的数量,优选地没有增加INF γ ⁺NK细胞的百分比;

[0159] -其在感染的位点处不增加产生促炎性细胞因子的先天免疫细胞(特别是产生IL-12的DC和/或产生TNF α 的巨噬细胞和/或产生INF γ 的NK或TL)的比例;

[0160] -其不具有直接的抗细菌的效果,特别是对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;

[0161] -其不诱导增加通过NK细胞的干扰素 γ 的产生,通过体外直接刺激;

[0162] -其不诱导增加NK细胞中标志物KLRG1的表达,通过体外直接刺激;

[0163] -其不诱导增加在感染的位点处趋化因子CXCL-1和/或CXCL-2的水平。

[0164] 药物组合物

[0165] 包括具有分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物优选地以药物组合物或药物配制。

[0166] 实施本发明的药物组合物或药物通常包含包括具有分子量小于或等于50kDa的硫酸化和非硫酸化多阴离子多糖的石莼目的藻类提取物以及药学上可接受的赋形剂。

[0167] 用于制备包括根据本发明的其用途的藻类提取物的药物或药物组合物的药学上可接受的赋形剂是基于药物形式和所期望的施用方式,从本领域技术人员已知的常用赋形剂中选择。

[0168] 对于口服、舌下、皮下、肌肉内、静脉内、局部、局域、腹腔内、气管内、鼻内、经皮或直肠施用,以上本文限定的藻类提取物可与常规的药学赋形剂混合,以单位剂量的形式施用。

[0169] 施用的适当的形式包括口服途径形式比如片剂、软胶囊或硬胶囊、粉剂、颗粒剂和口服溶液或悬液;用于舌下、口腔、气管内、眼内、鼻内施用的形式,和通过吸入施用;局部、肠胃外施用的形式,比如经皮、腹腔内、气管内、皮下、肌肉内或静脉内;直肠施用的形式和植入物。

[0170] 当制备以片剂形式的固体组合物时,主要活性成分可以与药物载体,如明胶、淀粉、乳糖、硬脂酸镁、滑石粉、阿拉伯胶等混合。

[0171] 片剂也可以用蔗糖、纤维素衍生物或其他适当的材料涂布,或确实可以对他们进行合适地处理,以便确保他们具有延长或延缓的活性,并且他们连续释放预定量的活性成分。

[0172] 例如,可以通过将活性成分与稀释剂混合,并且将获得的混合物倾倒入软胶囊或硬胶囊中,获得胶囊形式的制剂。

[0173] 在一个实施方式中,根据本发明使用的藻类提取物、药物或药物组合物旨在用于口服施用。在一个其它实施方案中,根据本发明使用的藻类提取物、药物或药物组合物旨在用于肠胃外施用。在一个其它实施方案中,根据本发明使用的藻类提取物、药物或药物组合物旨在用于腹腔内施用。

[0174] 包括根据本发明使用的藻类提取物的药物或药物组合物也可以以液体形式,例如,以溶液、乳液、悬液或糖浆的形式存在;并且例如,特别是以适合于口服或鼻内施用的形式。适当的液体载体可以是,例如,水、有机溶剂如甘油或乙二醇,以及其在水中的不同比例的混合物。

[0175] 以糖浆或酞剂形式或以滴剂形式施用的制剂还可含有与甜味剂(不具有热量或具有低热量),例如作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯以及增香剂和适当的着色剂一起的活性成分。

[0176] 水中可分散的粉末或细粒可例如含有与分散剂或湿润剂或悬浮剂,比如聚乙烯吡咯烷酮,以及与甜味剂或风味改良剂混合的活性成分。

[0177] 一般而言,在本发明的上下文下,藻类提取物的每日剂量将是能够对创伤后免疫抑制产生预防和/或治疗效果的藻类提取物的最低有效剂量。

[0178] 术语“有效剂量”被理解为指使得有可能获得所观察到的预期效果,在本情况下免疫刺激效果的组合物的任何量。

[0179] 根据其方面之一,根据本发明使用的藻类提取物在如以上提到的组合物中使用,以0.1和300mg/kg之间,例如0.1和100mg/kg之间、甚至更特别地0.5和60mg/kg之间,例如1和20mg/kg之间或5和30mg/kg之间的剂量在人体内/对人施用,或以1和300mg/kg之间或1和200mg/kg,更特别地1和100mg/kg之间,确实甚至更特别地2和45mg/kg之间或10和60mg/kg之间的剂量在动物中施用。

[0180] 根据其方面之一,根据本发明使用的藻类提取物在如以上提到的组合物中使用,以100和300mg/kg之间,例如50和100mg/kg之间的剂量在人中经口服途径施用,或以100和300mg/kg之间或100和200mg/kg之间的剂量在动物中经口服途径施用。

[0181] 由创伤后免疫抑制诱导的的并发症的预防性或治疗性治疗

[0182] 在本发明的上下文中,术语“治疗”被理解为指抑制、缓解或预防疾病或与该疾病有关的一种或多种症状的进展。“预防性”或“预防的”治疗涉及预防这种疾病或与这种疾病有关的一种或多种症状的发生。

[0183] 根据本发明的预防性或治疗性治疗的受试者是动物,优选地哺乳动物,例如啮齿动物、犬科动物、猫科动物、牛科动物、马科动物或灵长类动物。受试者特别是人,无论男人、女人或儿童。

[0184] 受试者呈现创伤后免疫抑制。通常,创伤后免疫抑制是由于受试者的一种或多种严重创伤,比如颅脑创伤,特别是具有或不具有多创伤(多发性创伤)、主要外科手术或严重感染的颅脑创伤发生。

[0185] 根据一个实施方式,考虑的具有严重创伤的受试者呈现出至少两种损伤(多创伤(多发性创伤)),其中至少一种损伤是危及生命的。受试者通常住院,例如在医院重症监护

室。受试者可更特别地安置于人工通气之下，特别是插管。

[0186] 根据一个实施方式，具有严重创伤的受试者具有至少16的“损伤严重程度评分”（或ISS）。对于非常严重的创伤，ISS至是少25。ISS的计算要考虑对患者身体多个区域（头颈部、面部、胸腔、腹部和骨盆、骨盆带和四肢、皮肤和皮下组织）导致的损害。对每个区域的损害根据其严重程度从1到6分级（1：轻微损伤，6：危急损伤）。然后将三个最受损的区域的得分平方计算ISS（例如，如果每个区域的评级分别如下：头部4，腹部3，胸腔2，其他区域1，那么ISS将达到 $4^2+3^2+2^2=16+9+4=29$ （Baker等，1974，J Trauma. 14:187-196）。

[0187] 根据一个实施方式，具有严重创伤的受试者呈现由格拉斯哥昏迷标准（GCS）评分小于8限定的严重颅脑创伤。GCS的测定是一种方法，其提供了通过研究以下3个非常精确的临床标准的变化来评估昏迷深度的方法：1) 眼睛的睁开（评分从1：“不睁眼”到4：“眼睛自发睁开”）；2) 运动能力（移动的能力），或作为可优选的，最好的运动反应（评分从1：“无运动反应”到6：“服从命令”）；3) 对提出的问题的反应（言语反应，评分从1：“无言语反应”到5：“定向反应”）。GCS是以上提到的三个临床标准获得的结果之和。因此，分数范围从最低3分到最高15分（Teasdale等1974，Lancet 2:81-84）。

[0188] 创伤后免疫抑制优选地特征在于：

[0189] a) 与健康个体观察到的产生水平相比，用革兰氏阴性杆菌，例如大肠杆菌的LPS刺激后，血液白细胞诱导的促炎性细胞因子的离体产生水平下降；和/或

[0190] b) 与健康个体观察到的表达水平相比，患者的抗原呈递细胞上的HLA-DR（人白细胞抗原-DR同种型）表达水平下降。

[0191] 观察到的细胞因子产生水平的下降（例如以皮克/毫升表示）是针对健康志愿者报告的，健康志愿者的细胞因子产生水平表示100%的值。细胞因子通常是在LPS刺激的全血培养物中测量的（一般而言来自大肠杆菌）。HLA-DR的表达是针对健康志愿者报告的，以细胞表面表达的HLA-DR分子的数量计（MFI为“平均荧光强度”），或以百分比术语，100%的值表示健康志愿者的HLA-DR表达水平。特别地，如果以百分比术语考虑，以上a) 和/或b) 中下降至少约20%。优选地至少约25%，更优选地至少约30、35、40、45%，并且更优选地至少约50、55、60%，或甚至更多。

[0192] 更优选地，在具有严重创伤的患者中观察到创伤后免疫抑制使得在一种或多种创伤后24小时内（从D0至D1）所述患者的单核细胞上的HLA-DR表达水平与健康个体观察到的表达水平相比降低。而且，这种最初的降低还可以在在实践中可能预测感染性并发症（或继发感染）的风险。因此，在一种或多种严重创伤后第一天（D1），单核细胞的HLA-DR表达的低水平，例如减少了50%，则预测患者感染继发感染的高风险。HLA-DR的表达是针对健康志愿者报告的，以细胞表面表达的HLA-DR分子的数量（MFI为“平均荧光强度”），或以百分比术语，100%的值表示健康志愿者的HLA-DR表达水平。特别地，如果以百分比术语考虑，HLA-DR表达水平下降至少约20%的，优选地至少约25%，更优选地至少约30、35、40、45%，并且更优选地至少约50、55、60%，或甚至更多。

[0193] 根据一个实施方式，预防和/或治疗创伤后免疫抑制导致预防和/或治疗与创伤后免疫抑制相关的感染性并发症。

[0194] 与创伤后免疫抑制相关的感染性并发症（或继发感染）更特别地是院内感染，特别是细菌或真菌或病毒感染。特别地，考虑的院内感染选自由下述组成的组中：肺部疾病，比

如在机械通气下获得的肺炎,即呼吸机相关肺炎(VAP);尿路感染;中心静脉导管感染;细菌性脑膜感染比如积脓症、脑膜炎和脑脓肿。仍更特别地,肺部疾病是由于选自以下之中的致病菌:葡萄球菌,优选地金黄色葡萄球菌,更优选地耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;嗜血杆菌物种,优选地流感嗜血杆菌;肺炎双球菌;肠杆菌,假单胞菌物种,特别是铜绿假单胞菌。导致肺部疾病的细菌也可属于其他细菌属或物种(例如,革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性球菌)。此外,他们可以抵抗抗生素。在除了肺部疾病的感染的情况下,有责任的细菌或酵母菌可以是,例如,对于尿路感染的革兰氏阴性杆菌(例如,大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌)和革兰氏阳性球菌(例如,金黄色葡萄球菌);对于中心导管感染的革兰氏阴性杆菌(例如,大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌)、革兰氏阳性球菌(例如,金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌)和酵母菌比如假丝酵母属物种;对于细菌性脑膜感染的革兰氏阴性杆菌(例如,大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌)和革兰氏阳性球菌(如金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、肺炎双球菌)。

[0195] 根据一个实施方式,感染的位点(或感染的起源位点)是肺。

[0196] 藻类提取物或含有其的组合物或药物,优选地从患者入院之日起,特别是在医院重症监护室,在至多约1个月,优选地至多28天的时期内,如果必要时施用一次或多次。换句话说,从患者入院之日起,寻求预防的感染性并发症可能在至多约1个月,优选地至多28天的时期内发生(或感染)。例如,其发现,40至50%的严重创伤患者在D0和D10之间发生感染性并发症,并且10至20%的另外患者在D10和D28之间发生感染性并发症,也就是说总共50至70%的患者感染了继发感染(Osborn等,2004 Crit. Care Med.; 32(11):2234-40)。

[0197] 特别地,在患者插管期间,将藻类提取物或含有其的组合物或药物施用一次或多次。

[0198] 在本申请中,术语“和/或”是语法连词,其被解释为涵盖其连接的一个或多个情况或实例可发生的事实。例如,表达“所述多糖包括甘露糖和/或阿拉伯糖”中的表达“甘露糖和/或阿拉伯糖”指示多糖可包括甘露糖、或阿拉伯糖、或甘露糖和阿拉伯糖。

[0199] 在本专利申请中,术语“包括”应解释为包括所有具体提到的特征特点,以及任选的、另外的、未指明的特点。如本文所使用的,术语“包括”的使用也描述了除具体提到的特征特点之外不存在其它特征的实施方式(即“由…组成”)。

[0200] 本发明将通过以下的图和实施例更详细地阐释,但不限制其范围。

[0201] 附图

[0202] 图1:示意性表示细菌学分析的实验方案的图。

[0203] 图2:藻类提取物对遭受创伤和继发感染的小鼠的重量减轻没有影响。假冒物(S)和仅肺炎(PN)组的小鼠在没有颅脑创伤(TC)的颅骨上接受1cm切口。将在遭受TC后24小时诱发肺炎的遭受创伤和感染的小鼠分为未治疗组(TC+PN)和用6次化合物注射(每12小时,从TC开始直到安乐死)的治疗组(TC+PN+TX)。肺炎在遭受TC后24小时诱发,小鼠在肺炎后48小时被安乐死。结果来自于2个独立的实验(每组n=9)。重量减轻%的结果以平均值±标准偏差提供。* $p < 0.05$ 遭受创伤和PN组(在PN后)与S,* $p < 0.05$,遭受创伤组与PN。

[0204] 图3:藻类提取物在诱导MSSA肺炎后限制了遭受创伤的小鼠中的细菌的脾脏扩散,但在没有创伤的情况下没有影响:假冒物(S)组和仅肺炎(PN)组的小鼠在没有TC的颅骨上接受1cm切口。将遭受创伤和感染的小鼠分为未治疗组(TC+PN)和用化合物治疗的组(每12

小时200 μ g,从TC开始直到安乐死(TC+PN+TX)。诱导肺炎后24小时(A)和48小时(B)取出肺。诱导肺炎后24小时(C)和48小时(D)后取出脾脏。将在Chapman琼脂培养基上培养的研磨器官孵育24小时,并且其后计数菌落。结果源自2个独立实验(每组n=8或9),并且以平均Log₁₀CFU(集落-形成单位) \pm 标准偏差提供。***p<0.001。(E)和(F):将小鼠被分为3组:假冒物(S);未治疗的肺炎(PN);48小时,每12小时用藻类提取物治疗肺炎(无创伤)(PN+TX)。在诱导肺炎后48小时取出肺(E)和脾脏(F)。结果来自一个实验(每个感兴趣的组n=5)。结果以平均值 \pm 标准偏差提供。

[0205] 图4:藻类提取物在体外不具有抗MSSA活性。在50、200和500 μ g/ml的化合物浓度范围的液体培养基中发展/确定了杀菌活性的动力学。然后在TS琼脂上计数细菌负荷,并且结果以Log₁₀CFU/mL表达。结果来自2个独立和一致的实验。

[0206] 图5:腹腔内施用藻类提取物在2小时时不诱导天然小鼠中促炎性细胞因子分泌的增加。腹腔内注射藻类提取物以3种浓度(50、200和500 μ g)进行并且与注射磷酸盐-缓冲盐水PBS(假冒物)和与1mg/kg的LPS比较。在细胞内染色后,通过流式细胞术评估通过肺的DCIL-12的分泌(图5A)、通过肺泡巨噬细胞(图5B)和间质巨噬细胞TNF α 的分泌,以及通过肺的NK(图5C)和TLINF γ 的分泌。在脾脏中发现没有差异(数据未显示)。结果来自一个实验(每组n=2),并且以中位数 \pm 四分位数间距提供。

[0207] 图6:气管内施用海藻提取物在2小时和12小时内不会诱导天然小鼠中促炎性细胞因子分泌的增加。在安乐死前12小时(T过夜)和2小时(T(H-2))以50 μ g的浓度进行气管内注射藻类提取物。其与健康小鼠(天然的)和安乐死前2小时灌注50 μ g的LPS(LPS(H-2))比较。在细胞内染色后,通过流式细胞术评估通过肺的DC IL-12的分泌(图7A)、通过肺泡巨噬细胞(图7B)和间质巨噬细胞TNF α 的分泌,以及通过肺的NK(图7C)和TL INF γ 的分泌。在脾脏中发现没有差异(结果未显示)。结果来自一个实验(每组n=2),并且以中位数 \pm 四分位数间距提供。

[0208] 图7:示意性表示荧光-激活细胞分选(FACS)和酶联免疫吸附试验(ELISA)分析的实验方案的图。

[0209] 图8:遭受MSSA肺炎的遭受创伤的小鼠中腹腔内施用藻类提取物不增加肺中产生促炎性细胞因子的细胞的比例。

[0210] 将小鼠分为4组:假冒物(S);仅肺炎(PN);未治疗的TC+肺炎(TC+PN);和用藻类提取物治疗的TC+肺炎(TC+PN+TX)。肺炎在遭受TC后24小时灌注,其中小鼠在肺炎后12小时被安乐死。治疗组中的小鼠接受3次腹腔内注射200 μ g的藻类提取物(每12小时,从TC开始直至安乐死)。细胞内染色后通过流式细胞术分析通过CDIL-12的分泌(A)、通过巨噬细胞TNF α 的分泌(B)、通过TL和NKINF γ 的分泌(C)。结果来自2个不同实验(每组n=4)。结果以阳性细胞的中位数百分比 \pm 四分位数间距提供。脾脏中发现没有差异(结果未显示)。

[0211] 图9:在遭受创伤的感染小鼠中施用藻类提取物诱导产生干扰素 γ 的肺的NK细胞的数量增加。将小鼠分为4组:假冒物(S);仅肺炎(PN);未治疗的颅脑创伤TC+肺炎(TC+PN);和用藻类提取物治疗的肺炎(TC+PN+TX)。在遭受TC后24小时灌注肺炎,其中小鼠在肺炎后12小时被安乐死。治疗组小鼠接受3次腹腔内注射200 μ g的藻类提取物(每12小时,从TC开始直至安乐死)。在细胞内染色细胞因子后,通过流式细胞术分析NK细胞(A)、产生干扰素 γ 的NK细胞(B)的和产生干扰素 γ 的TL(C)的总数量。结果来自3个独立的实验(每组n=9)。

结果以中位数±四分位数间距提供。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[0212] 图10:藻类提取物在体外不诱导肺的NK细胞中INF γ 分泌的增加或活化因子KLRG 1的表达增加:将6只天然小鼠和6只遭受创伤的小鼠的肺在TC后24小时的每次机械研磨2个,以便获得每组3个肺的匀浆。经磁选后,用:IL-2(对照组:Ctrl);以IL-2+500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的藻类(藻类);以及IL-2+豆蔻酸-佛波醇-乙酸酯PMA(50 ng/mL)和罗奴霉素((1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (PMA+lono)培养5小时NK细胞。在磁选之前(A左)和在磁选之后(A右),通过流式细胞术检查NK细胞匀浆的纯度。通过流式细胞术评估产生INF γ 的NK(B)的百分比、KLRG 1的膜表达(C)和刺激后每孔NK的数量(D)。结果来自一个实验(每组 $n=3$),并且以中位数±四分位数间距提供。*** $p < 0.01$,与Ctrl和藻类组相比。“Ns”,与其他2组相比。

[0213] 图11:示意表示FACS和细菌学分析的实验方案的图。

[0214] 图12:在遭受创伤的、NK细胞耗竭的小鼠中施用藻类提取物并不限制在感染后48小时在脾脏中的细菌扩散。将小鼠分为3组:遭受创伤且感染(TBI+PN);遭受创伤的、感染的和耗竭NK细胞(TBI+PN+del);遭受创伤的、感染的、NK细胞耗竭的、用藻类提取物治疗的(TBI+PN+del+TX)。在TC后24小时灌输肺炎,并且TC后2小时和48小时通过IV注射抗NK1.1 Ab带来NK细胞耗竭。治疗组小鼠从TC开始直至安乐死,接受每12小时1次腹腔内注射200 μg 的藻类提取物。安乐死在TC后72小时进行,FACS分析脾脏细菌负荷(图12A)和肺的NK细胞耗竭的质量(图12B和C)。结果来自一个实验(每组 $n=4$),并且以中位数±四分位数间距提供。**** $p < 0.0001$ 。

[0215] 图13:示意性表示使用Luminex技术分析在脾脏和肺中的趋化因子的实验方案的图。

[0216] 图14:在仅患有创伤的小鼠和遭受创伤/感染的小鼠中施用多糖可诱导趋化因子CCL2、CCL3、CCL4和CCL8的脾脏浓度的增加。将小鼠分为5组。天然的(SHAM);仅创伤(TC);TC+用化合物治疗(TC+TX);创伤+肺炎(TC+PN);创伤+肺炎+用化合物治疗(TC+PN+TX)。肺炎在遭受TC后24小时被诱发,其中小鼠在肺炎发病后12小时被安乐死。治疗组的小鼠接受3次200 μg 的海洋化合物的腹腔内注射(每12小时,从TC开始直到安乐死)。在诱发肺炎后12小时取出脾脏,然后研磨,随后使用Luminex技术测量趋化因子CCL2(A)和CCL3(B)、CCL4(C)和CCL8(D)的水平。结果来自一个实验(每组 $n=5$ 只小鼠)。结果以中位数+/-四分位数间距提供*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$ 。

实施例

[0217] 实施例1:根据本发明使用的藻类提取物的制备

[0218] 藻类提取物如国际专利申请W02015071497的实施例1中描述的制备。

[0219] 将一公吨新鲜的、未加工的石莼类型的绿藻用淡水冲洗,并且使用藻类清洗机去沙。

[0220] 除非另外指示,方法的步骤在环境温度进行。

[0221] 然后通过工业精磨机(品牌/型号:Inotec“I 175CD-75D”)将藻类(1公吨具有8%干物质的脱水藻类)研磨成细颗粒。术语“细颗粒”理解为指在50至1000nm范围大小的颗粒,有两个群,第一个包括在50至200nm之间的颗粒大小,第二个包括在600至1000nm之间的颗粒大小。

[0222] 然后,使用品牌/型号Flottweg“B FRU 800HK”的工业带式压制机以近似1公吨/小时的吞吐率对研磨的材料进行压制。该步骤使固相(榨渣)能够与液相(汁液)分开。获得的汁液产量是75%。

[0223] 然后,使用品牌/型号Flottweg“AC 2000”的盘式堆离心机对获得的750kg的未加工的汁液进行澄清。因此,这样生产710kg的具有3.10%干物质(95-98%质量产量)和膏状物(2-5%质量)的清澈的汁液。

[0224] 其后,通过15KDa陶瓷膜(Tami Industries)对清澈的汁液进行超滤。因此,随后获得渗透液和截留物。渗透液被储存直到获得具有2.2%干物质的640kg的过滤汁液(91%体积产量)。

[0225] 然后,过滤汁液(渗透液)在通过蒸发浓缩后,再通过冻干来干燥。

[0226] 浓缩过程使用单效蒸发器(EVA 1000,Pignat)进行,具有参数如下:强制再循环,进料流速10L/h,蒸汽压力1bar,真空压力0.3bar和蒸发温度90°C。用8L/h的蒸发水流速进行第一次浓缩,并且白利度值从5.5(等于4.5%的干物质浓度)上升至14.7。然后用5-6L/h的蒸发水流速对该溶液进行第二次浓缩并且白利度值上升至34。溶液的干物质浓度确定为38.4%。

[0227] 然后使用来自Bioblock Scientific的设备(型号:CHRIST-Alpha 1-4LSC)在-80°C的冷冻温度下进行冻干,这也是该步骤期间的最低温度。

[0228] 然后用行星式磨粉机,品牌Philips MiniMill研磨获得的粉末。将产品引入研磨碗中(每个具有4个氧化锆球的研磨碗中10g产品)。以速度10操作该组件旋转15分钟。因此,这产生了14kg的藻类提取物粉末。

[0229] 实施例2:研究颅脑创伤(头部创伤)的小鼠模型中藻类提取物的作用-材料和方法

[0230] 动物福利:所有实验都是按照实验室动物福利的原则进行的。所有的实验都得到了Pays de la Loire伦理委员会和MESR (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation/French Ministry of Higher Education, Research and Innovation)的批准(编号2016121915529061)。小鼠(5周龄的Swiss雄性,品系Rj0r1:SWISS和6周龄的C57BL/6雄性,品系C57BL/6JRj,称重为24至28g)从Janvier实验室(Laval)获得。小鼠在法国Nantes的Institut de Recherche en Santé²(IRS2) [Institute for Health Research]的动物设施中以12小时的日/夜周期保持,自由地获得水和食物。

[0231] 包括硫酸化和非硫酸化多糖的藻类提取物:根据实例1描述的方案,其从在Plestin les Grèves(Brittany,法国)海滩上采集的藻类Ulva armoricana中提取和纯化。使用使用商业上可获得的技术(E-toxate试剂盒,Sigma)评定具有LPS的各部分没有污染。通过该试验检测在最终提取物中没有LPS。使用的样品是以水溶液的形式,以1%的硫酸化和非硫酸化多糖的浓度(相对于溶液的最终体积,按干物质的重量计的浓度)。

[0232] 颅脑创伤模型:颅骨创伤是使用“重物下降装置”技术造成的(Flierl等,2009年,Nat.Protoc.4(9):1328-37)。在手术前三十分钟施用0.1mg/kg的丁丙诺啡的皮下注射液,并且其后通过连续吸入异氟醚(新鲜气体流速0.8L/min,吸入分数3.5%)麻醉小鼠。在颅骨顶部1厘米的切口用作有效地定位冠状缝和矢状缝,并且优化手术。然后创伤通过高度测量为2.5cm的标准化重物的下降递送,其后切口被4.0缝合线缝合。不应该有颅骨的破坏。立即并且然后每12小时监测伤口整合恢复,并如果必要的话,给小鼠皮下注射丁丙诺啡止痛。在病

理苏醒的情况下,小鼠被安乐死。根据以下表I对终点进行评估:

	0分	1分	2分	3分
[0233] 重量减轻	<5%	5-12%	13-20%	>20%
身体外观(毛发竖立和驼背)	正常	轻微受损	中等受损	高度受损
行为(分离)	正常	轻微改变	中等改变	高度改变(与其余组永久性分离)

[0234] 表I:终点。分数大于或等于6的小鼠被安乐死。

[0235] 细菌接种体:所有实验均采用MSSA菌株ATCC 29213(溶血素阳性,Panton-Valentine阴性杀白细胞素)。菌株在37°C的心脑液体培养基中孵育18小时,并且其后冲洗2次(1000g,在20°C 10min),并且最后用无菌PBS稀释。其后,接种物通过浊度测定法校准,以便获得7McFarl,并且然后最终浓缩5次,以达到1和 3×10^9 CFU/mL之间的浓度。

[0236] 肺炎模型:在手术前三十分钟施用0.1mg/kg丁丙诺啡的皮下注射液,并且其后通过持续吸入异氟醚(新鲜气体流速0.8L/min,吸入分数3.5%)麻醉小鼠。然后,通过气管内插入24号灌胃套管,并且然后提供注射75 μ L的接种体诱发肺炎。将小鼠分为4组:非遭受创伤、未感染的假冒小鼠(S);非遭受创伤、感染的小鼠(PN);未治疗的遭受创伤和感染的小鼠(PN+TC);用腹腔内每12小时施用的,用200 μ g海洋化合物治疗的遭受创伤和感染的小鼠(PN+TC+TX)。

[0237] 藻类提取物的施用:藻类提取物以200 μ L总体积(补充PBS)中50 μ g、200 μ g和500 μ g的剂量腹腔内或气管内施用。

[0238] 提取物的剂量-效果的研究:藻类提取物在安乐死前2小时和12小时以200 μ L PBS的总体积中50、200和500 μ L的剂量腹腔内施用。为了原位刺激肺的粘膜免疫系统的细胞,藻类提取物也根据与肺炎诱导期间细菌接种相同的程序,以75 μ L中50 μ g剂量气管内施用。然后取出脾脏和肺,并且其后细胞种群在细胞内染色促炎性细胞因子(IL-12、TNF α 、INF γ)后通过流式细胞术分析。

[0239] 细胞种群的FACS分析:肺和脾脏细胞悬液通过人工机械研磨,并且然后用胶原酶消化30分钟(脾脏)或45分钟(肺),并且随后穿过筛网(70 μ m的孔)获得。用红细胞裂解溶液处理后,将获得的细胞悬液在4°C孵育30分钟,抗体偶联至特异性荧光素。

[0240] 对于DC:CD24-BV711(M1/69,BD Horizon)、CD11c-PeCy7(NK18,Biolegend)、MHC II-BV421(M5/114.15.2,Biolegend);对于巨噬细胞:F4/80-Alexa647(BM8,Biolegend)、CD11b-BV605(M1/70,BD Horizon)、CD11c-PeCy7(NK18,Biolegend)。对于NK细胞和T淋巴细胞:NK1.1-BV421(PK136,BD Horizon)、CD3-PE(145-2C11,eBioscience)和KLRG 1-APC(2F1,eBioscience)。细胞在BD LSR II®装置上分析,并且其后使用Flowjo Software®(TreeStar Inc,Ashland,OR)解释所有的数据。

[0241] 细胞内细胞因子的染色:小鼠在气管灌注产生肺炎的MSSA后12小时被安乐死。对于DC、巨噬细胞和淋巴细胞中细胞因子的细胞内染色,将细胞在包括Roswell Park

Memorial Institute培养基(RPMI)和Golgi Plug(BD Bioscience)的培养基中孵育5小时,以阻断胞外分泌,冲洗两次,并且然后根据膜标志物(参见上文)进行标记。根据制造商的建议(BD Cytotfix/Cytoperm kit,BD Bioscience)进行固定和透化。用抗体抗IL12-PE(C15.6,BD Pharmingen)、INF γ -Alexa488(XMG1.2,eBioscience)和TNF α -PE(MP6-XT22,BD Pharmingen)在4 $^{\circ}$ C在PermWash中孵育过夜;然后将细胞冲洗两次,并且通过流式细胞术分析。

[0242] 细菌生长和扩散的评估:称重肺和脾脏,并且然后在无菌条件下进行机械研磨。器官匀浆经过多次稀释(根据条件从 10^{-2} 至 10^{-6}),并且在特定培养基(Chapman)上在37 $^{\circ}$ C孵育,以避免其他细菌的生长。在孵育24小时期间后,计数菌落,并且结果以每克器官 \log_{10} CFU表示。

[0243] 杀菌动力学:液体培养基中的杀菌动力学使用MSSA ATCC 29213的接种至Mueller Hinton液体培养基(起始接种物= 6×10^6 CFU/mL)稀释5次的0.5McFarland标准物(浊度数据)进行。对照与海洋硫酸化化合物的几个浓度范围(50 μ g/mL、200 μ g/mL、500 μ g/mL)进行比较。然后将50 μ L在H0、H3、H6和H24铺在在TS琼脂上,并且然后在37 $^{\circ}$ C孵育24小时。计数菌落,并且结果以 \log_{10} CFU/ml表示。

[0244] 通过Luminex方法测定肺的和脾脏趋化因子的表达水平。在取出肺和脾脏的样品后,在4 $^{\circ}$ C,在含有1mM的蛋白酶抑制剂混合物(Sigma,Isle D'Abeau Chesnes,法国)的裂解缓冲液(1xPBS,pH 7.4/0.1%triton X-100)存在的情况下,对后者进行机械匀浆。然后将匀浆在4 $^{\circ}$ C以12,000g离心20分钟,其后取出上清液,并且然后在-80 $^{\circ}$ C存储直至分析。不同趋化因子的浓度在以下不同趋化因子的特异性标记后使用Luminex $^{\circ}$ 方法通过使用CIMNA平台(Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique/Nantes Atlantique Immunomonitoring Centre)产生:CCL19/MIP-3 β (BR19)、CCL2/MCP-1/JE(BR18)、CCL20/MIP-3 α (BR48)、CCL21/6Ckine(BR72)、CCL3/MIP-1 α (BR46)、CCL4/MIP-1 β (BR51)、CCL8/MCP-2(BR38)、CXCL1/KC(BR13)、CXCL10/IP-10(BR37)、CXCL2/MIP-2(BR20)。

[0245] NK细胞的磁选:根据用于FACS分析的方案获得肺的细胞悬液。计数细胞(每肺约 2.10^7 个),并且然后以300g离心10分钟。对于 10^7 个细胞,将细胞悬浮在40 μ L的FACS缓冲液中,并且然后用10 μ L的NK细胞生物素-抗体混合物(Miltenyi Biotec $^{\circ}$,德国)标记,并且在4 $^{\circ}$ C孵育5分钟。在进一步以300g离心10分钟后,对于 10^7 个细胞,细胞用20 μ L抗生物素微珠(Miltenyi Biotec $^{\circ}$,德国)在4 $^{\circ}$ C孵育10分钟。最后,根据制造商(Miltenyi Biotec,德国)的建议进行磁分离。每组(天然的和TC)由6只小鼠组成,然后将肺每次研磨两个,以达到每孔至少10000个NK细胞(每只小鼠肺总计约2000万个细胞)。NK细胞的纯度大于90%。

[0246] NK细胞的体外刺激:磁选后分离的NK细胞在37 $^{\circ}$ C的CO $_2$ 炉中体外刺激5小时,并且在以下3种不同条件下进行:对照(RPMI+FBS[胎牛血清]+以3000IU/mL的浓度的IL-2)、藻类(对照+以500 μ g/mL的藻类)和PMA-罗奴霉素(对照+以50ng/mL的PMA和罗奴霉素(1 μ g/mL))。根据制造商的建议,在5个小时中的4小时,细胞还用Golgi Plug(BD Bioscience)刺激。然后通过FACS分析IFN-g的分泌、KLRG 1的膜表达和NK细胞的数量。

[0247] NK细胞的体内耗竭:NK细胞通过IV(眶后)注射190 μ L的PBS中的10 μ L的LEAF纯化抗小鼠NK1.1(克隆PK136/cat#108712-1mg/mL)(Biolegend)体内耗竭。在颅脑创伤后2h和48h

施用注射液。通过计数肺的NK细胞: NK1.1-BV421 (PK136, BD Horizon)、CD3-PE (145-2C11, eBioscience) 的数量, 使用FACS评估NK细胞耗竭的效力。

[0248] **统计学:** 使用应用软件GraphPadPrism6.0® (San Diego, CA, 美国) 进行统计分析。非参数连续变量以中位数±四分位数间距表示, 并且通过Kruskall-Wallis检验和Dunn检验的post-hoc利用进行分析。对种群的百分比术语分析通过双边Fisher检验进行。

[0249] **实施例3: 临床和细菌影响**

[0250] 将小鼠分为4组: 假冒物 (S); 仅肺炎 (PN); 颅脑创伤+肺炎 (TC+PN); 和遭受创伤和感染的小鼠, 每12小时通过腹腔内注射 (IP) 200µg的化合物治疗 (TC+PN+TX), 从创伤后2小时开始直到安乐死。S组和PN组的小鼠从无创伤的颅骨顶部接受1cm的切口。颅脑创伤后24小时诱发肺炎。根据所研究的标准 (图1), 安乐死发生在诱发肺炎后24至48小时。

[0251] 藻类提取物对遭受创伤的小鼠和继发感染的小鼠的重量减轻没有影响

[0252] 在24小时后MSSA肺炎诱导约体重的12%的短暂的重量减轻。与非遭受创伤的小鼠相比, 颅骨创伤增加了感染初期的重量减轻, 但不影响D+3的恢复。治疗对遭受创伤和继发感染的小鼠的重量减轻没有影响 (图2)。

[0253] 藻类提取物限制了诱发MSSA肺炎后48小时遭受创伤的小鼠的细菌扩散

[0254] 肺的细菌负荷在诱发肺炎后24小时 (PN、TC+PN、TC+PN+TX) (图3A) 以及48小时 (图3B) 感染的所有组中类似。

[0255] 在肺感染后第24小时, 所有患有肺炎的小鼠是MSSA菌血症 (脾脏细菌负荷>2log)。

[0256] 与非遭受创伤的小鼠相比, 遭受创伤的小鼠不显示在肺炎后更高细菌扩散 (PN与TC+PN) (图3C和3D)。

[0257] 该治疗对感染后24小时的菌血症没有影响 (图3C), 但在感染的第48小时, 在治疗组 (TC+PN+TX) 中22%的小鼠检测到金黄色葡萄球菌, 而在未治疗的遭受创伤后肺炎的组 (TC+PN) 中则为100%。因此, 用藻类提取物治疗的组中的小鼠从诱发肺炎的48小时呈现低脾脏细菌负荷 (图3D)。这种效果似乎与施用的频率有关, 因为单次注射藻类提取物诱导菌血症的减少, 其小于多次注射的情况下观察到的减少 (结果未显示)。

[0258] 虽然, 仅肺炎组 (PN) 和遭受感染创伤的组 (CT+PN) 之间的细菌负荷没有差异 (图3C和3D), 但佐剂治疗 (感染前注入) 降低创伤后感染期间的细菌扩散 (图3D), 但是在没有创伤的情况下, 没有细菌扩散 (图3E)。该结果提示在创伤后免疫抑制的情况下, 藻类提取物改善肺对细菌感染的反应, 但在肺炎期间对健康动物具有很小或没有影响。

[0259] 藻类提取物不具有体外特定抗MSSA活性

[0260] 在创伤后肺炎期间, 治疗减小细菌感染的全身扩散持续时间 (图3)。这种治疗效果可能与藻类提取物的直接抗细菌作用有关, 或与对宿主免疫力的影响有关。为了研究潜在的直接抗细菌特性, 我们评估了藻类提取物对MSSA ATCC 29213菌株的影响。为了做到这一点, 体外评估藻类提取物对MSSA生长的影响通过应用液体培养基中的杀菌动力学方法进行。结果显示, 无论测试的浓度如何, 包括在超治疗剂量 (50、200和500µg/mL) 的藻类提取物不具有直接抗MSSA作用 (图4)。

[0261] **实施例4: 天然小鼠的藻类提取物的免疫刺激作用的研究**

[0262] 藻类提取物对细菌扩散的临床效果 (图3D)、其在体外缺乏抗MSSA作用 (图4) 以及在无创伤的情况下缺乏临床作用 (图3E和F), 导致对多糖的免疫刺激作用的研究。首先在

天然小鼠中研究了提取物对肺和脾脏中促炎性细胞因子(通过DC的IL-12、通过巨噬细胞的TNF α 、通过NK和TL的INF γ)分泌的剂量-效应关系。细胞因子产生的评估是在细胞内染色后通过流式细胞术进行。为了该目的,多次(安乐死前2小时和12小时)腹腔内注入提取物。提取物同样气管内施用,试图诱导直接刺激肺粘膜免疫系统的细胞。

[0263] 安乐死前2小时和12小时腹腔内施用藻类提取物不诱导天然小鼠中产生促炎性细胞因子(IL-12、TNF α 、INF γ)的增加

[0264] 无论使用何种剂量,藻类提取物都不诱导产生IL-12的肺的DC的百分比增加(图5A)。其不增加产生TNF α 的巨噬细胞的比例(图5B),或不增加肺组织中NK细胞(图5C)或INF γ +TL的数量。通过藻类提取物在天然小鼠中的注射未改变肺的CD、NK和TL的总数量。

[0265] 在腹腔注射化合物后12小时也评估施用藻类提取物的作用。已经研究相同剂量。在12小时,注意到促炎性肺部细胞因子的产生以及细胞的数量无差异(数据未显示)。

[0266] 安乐死前2小时和12小时气管内施用藻类提取物不诱导天然小鼠中促炎性细胞因子(IL-12、TNF α 、INF γ)的产生的增加

[0267] 因为腹腔内途径对研究的免疫细胞的天然小鼠具有很小的作用,测试通过气管内途径直接施用的治疗的作用。气管内灌注藻类提取物后2小时(T(H-2))和12小时(T(过夜))评估细胞因子的产生。与对照小鼠(天然的)和安乐死前2小时以50 μ g的剂量施用LPS(LPS(H-2))相比,证明无明显分泌差异(图6)。

[0268] 实施例5:创伤后免疫抑制模型中的藻类提取物的免疫刺激作用的研究

[0269] 天然小鼠的藻类提取物的免疫刺激作用的缺乏在遭受创伤和继发感染的小鼠的模型中继续研究,再现临床环境中观察的情况。因此,在创伤后免疫抑制模型中评估藻类提取物的免疫刺激作用。在C57/BI6雄性小鼠中引起颅脑创伤,然后藻类提取物以200 μ g的剂量腹腔内施用,从在创伤后两小时开始并且然后每12小时直到安乐死(总共3次注射)。颅脑创伤后24小时诱发肺炎并且随后在肺炎后12小时将小鼠安乐死。将小鼠分为4组:假冒物(S);仅肺炎(PN);未治疗的颅脑创伤+肺炎(TC+PN);和用藻类提取物治疗的颅脑创伤+肺炎(TC+PN+TX)(图7)。

[0270] 施用藻类提取物不增加产生促炎性细胞因子的肺部先天免疫细胞的百分比

[0271] 在创伤后肺炎模型中,腹腔内施用藻类提取物不增加以下的比例:产生IL-12的DC(图8A)、产生TNF α 的巨噬细胞(图8B)或产生的INF γ NK或TL(图8C)。

[0272] 施用藻类提取物增加产生干扰素 γ 的NK细胞的数量

[0273] 颅骨创伤诱导在肺中NK细胞总数量减少(图9A),以及产生干扰素 γ 的NK细胞减少($p < 0.01$)(图9B)。施用藻类提取物诱导肺中总NK细胞和产生干扰素 γ 的NK细胞的数量增加(图9A和9B)($p < 0.05$),而不增加INF γ +细胞的百分比(图8C)。即使有新兴的趋势,也没有发现这种效果对T淋巴细胞明显($p = 0.17$)(图9C)。

[0274] 实施例6:藻类提取物对天然和遭受创伤的小鼠的NK细胞的直接影响的体外研究

[0275] 藻类提取物在体外通过肺的NK细胞对干扰素 γ 的分泌或激活因子KLRG1的表达不具有影响。

[0276] 鉴于用提取物治疗的小鼠中干产生扰素 γ 的NK细胞的数量增加,并且趋化因子CXCL-1和CXCL-2的水平没有增加,因此研究了在体内发现的效果是否是由于治疗对NK细胞的直接作用。为此,将天然和遭受创伤的小鼠的肺的NK细胞进行磁选,并且然后在下述3种

条件下体外刺激5小时:对照(Ctrl)、藻类提取物和PMA+罗奴霉素(PMA+lono)。

[0277] 与PMA-lono的刺激不同,以藻类提取物的体外刺激不诱导通过NK细胞干扰素 γ 的产生的增加(图10B)或激活标志物KLRG 1的产生的增加(图10C)。刺激5小时后,不同组的NK细胞数量没有不同(图10D)。

[0278] 实施例7:在体内NK细胞耗竭的情况下细菌作用的研究

[0279] 将小鼠分为3组:遭受创伤和感染的小鼠(TC+PN);遭受创伤的小鼠、感染的和NK细胞耗竭的(TC+PN+de1);遭受创伤、感染的小鼠、NK细胞耗竭的和用藻类提取物治疗的(TC+PN+de1+TX)。颅脑创伤24小时后诱发肺炎。安乐死发生在诱发肺炎后48小时。NK细胞的耗竭在颅脑创伤后约2小时和48小时引起。在诱发肺炎后48小时分析脾脏细菌负荷以及肺的NK细胞耗竭(FACS)的效力(图11)。

[0280] 藻类提取物不限制遭受创伤、NK细胞耗竭的小鼠的脾脏细菌扩散

[0281] 为了评估藻类提取物对脾脏细菌扩散的影响是否是由于肺的NK细胞数量的增加,评估这种对菌血症的影响是否是在体内NK细胞耗竭的情况下发现。

[0282] 在肺的NK细胞(耗竭大于95%)没有的情况下,未注意到藻类提取物对感染48小时下脾脏细菌扩散的影响(TBI+PN+de1对TBI+PN+de1+TX)(图12)。

[0283] 实施例8:藻类提取物对脾脏和肺的趋化因子的分泌的影响的研究

[0284] 施用硫酸化的多糖诱导遭受创伤和感染的小鼠中的肺的NK细胞的数量增加。为了确定该数量的增加是否是由于NK细胞通过诱导趋化因子的分泌而招募至肺部,在Luminex中评估了趋化因子CCL2(MCP-1)、CCL19(MIP-3b)、CXCL2(MIP-2)、CXCL10(IP-10)、CCL8(MCP-2)、CCL3(MIP-1a)、CCL20(MIP-3a)、CCL4(MIP-1b)和CCL21(6Ckine)的脾脏和肺的分泌。这些趋化因子涉及急性炎症后NK细胞的化学吸引。

[0285] 将小鼠分为7组:天然小鼠(SHAM);仅遭受创伤的小鼠(TC);遭受创伤和用化合物治疗的小鼠(TC+TX);仅感染的小鼠(PN)(仅用于肺的趋化因子的研究);感染和用藻类提取物治疗的小鼠(PN+TX)(仅用于肺的趋化因子的研究);遭受创伤和感染的小鼠(TC+PN);和遭受创伤、感染和用藻类提取物治疗的小鼠(TC+PN+TX)。颅脑创伤后24小时诱发肺炎。诱发肺炎后12小时发生安乐死。通过Luminex技术分析脾脏和肺的以上提到的趋化因子的水平(图13)。

[0286] 藻类提取物引起趋化因子CCL2、CCL3、CCL4、CCL8的脾脏水平增加(图14)。藻类提取物对趋化因子CXCL1、CCL19、CXCL2、CXCL10、CCL20、CCL4、CCL21的脾脏分泌没有影响(数据未显示)。腹腔内注射藻类提取物也不导致肺中分析的趋化因子的水平增加(数据未显示)。

[0287] 结论:

[0288] 在创伤后细菌性肺感染模型中初步研究了藻类提取物的临床效果。对肺的细菌负荷没有表现出明显效果,但这种治疗限制了遭受创伤的小鼠中感染(脾脏细菌负荷)后48小时的全身细菌扩散。这种效果是由于恢复了因创伤而瘫痪的免疫功能,并且不是由于直接抗菌活性,因为藻类提取物在体外没有抗MSSA活性,对感染的非遭受创伤的小鼠中的细菌扩散也没有影响。

[0289] 用藻类提取物治疗后,在创伤后肺炎小鼠模型中观察到的细菌扩散减少,以及在体外建立的初步数据,导致了在天然小鼠中提取物对先天免疫系统细胞(DC、巨噬细胞以及

淋巴细胞NK和TL)的剂量-效应关系进行了体内研究。选择50、200和500 μg /小鼠的剂量是与体内建立的初步毒性数据有关(由Laboratoire Effimune, Nantes, 法国进行的测试)。选择注射次数(死亡前2小时和12小时)以便有效地展示IL-12、TNF α 和INF γ 的分泌增加,然而在肺或脾脏中没有发现作用。藻类提取物也没有通过树突细胞诱导MHC II的膜表达的增加(数据未显示)。在免疫抑制不存在的情况下,施用藻类提取物不会诱导先天免疫细胞的刺激。这证实了细菌学的结果,其中在没有创伤的情况下(因此免疫抑制),施用藻类提取物不限制细菌扩散,这与在遭受创伤和感染的小鼠中所观察到的情况相反。

[0290] 因此,在其中创伤后24小时诱导MSSA肺炎的遭受创伤的小鼠模型中研究了对促炎性细胞因子的分泌的刺激。每12小时腹腔内注射藻类提取物(从TC开始直到安乐死,即总共3次)没有增加产生促炎性细胞因子的先天免疫细胞的比例。然而,总肺的NK细胞和INF γ 生产亚组(在急性肺感染的背景下感兴趣的细胞)的数量在用海洋提取物治疗的小鼠组中增加。这种增加仅在感染位点发现(脾脏中没有发现差异)。因此,颅脑创伤诱导产生INF γ 的NK细胞的数量显著减少,这种减少由藻类提取物的施用部分抵消。对于T淋巴细胞,这种影响并不显著。

[0291] 因此,出现了问题,即仅肺的NK细胞数量的增加是否足以解释治疗的小鼠中感染后48小时细菌扩散的限制。NK细胞对抗细菌反应至关重要,尤其是在急性肺感染中。另外,在这种临床情况下,NK细胞的作用不限于分泌促炎性物质,而是导致其他先天免疫系统细胞的共同刺激,特别是通过减少多核嗜中粒细胞的凋亡并且保留其功能的能力。NK细胞还通过破坏可引起组织损害的未激活的DC和过度激活的巨噬细胞而起到免疫调节作用,这些巨噬细胞。在此背景下,评估提取物对NK细胞耗竭的小鼠中在创伤后免疫抑制模型中脾脏细菌扩散的影响。在NK细胞耗竭的情况下(肺的NK细胞超过95%耗竭),没有注意到提取物对脾脏细菌负荷的影响,这证实了这些细胞在海洋提取物体内作用中的角色。

[0292] 响应注射藻类提取物的趋化因子分泌,特别是经TLR4/NF- κB 途径通过上皮细胞,是可解释感染位点处NK细胞的数量增加的假设之一。因此,在注射藻类提取物之前和之后,在急性炎症的情况下涉及NK细胞趋化作用的主要趋化因子的肺和脾脏水平进行了测定: CXCL1 (KC)、CCL2 (MCP-1)、CCL19 (MIP-3b)、CXCL2 (MIP-2)、CXCL10 (IP-10)、CCL8 (MCP-2)、CCL3 (MIP-1a)、CCL20 (MIP-3a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL21 (6Ckine)。通过Luminex技术对这些趋化因子的研究,可以经验地表明脾脏中趋化因子CCL2、CCL3、CCL4、CCL8的分泌增加。发现注射海藻提取物对研究时肺的趋化因子的分泌,或对脾脏中其他趋化因子都没有影响。

[0293] 因此,多种假设是可能的:1)肺的趋化因子的分泌峰可能由于发生较早而没有得到有效证明;2)其他中间信号传导途径涉及肺中的NK细胞数量的增加。趋化因子CCL2、CCL3、CCL4和CCL8主要由上皮细胞和内皮细胞分泌,并且使免疫细胞(中性粒细胞、NK细胞、淋巴细胞)能够招募,特别是在急性肺损伤后。

[0294] 最后,研究了藻类提取物是否对NK细胞具有直接影响,其中TLR 4受体的膜或细胞内表达在文献中是有争议的。为了该目的,通过磁选分离了天然小鼠和遭受创伤的小鼠的肺的NK细胞,并且在IL-2存在的条件下通过藻类提取物进行体外刺激。对INF γ 分泌、KLRG1的膜表达以及每孔NK细胞的数量检测均未发现影响。因此,藻类提取物的作用机制还有待阐明。

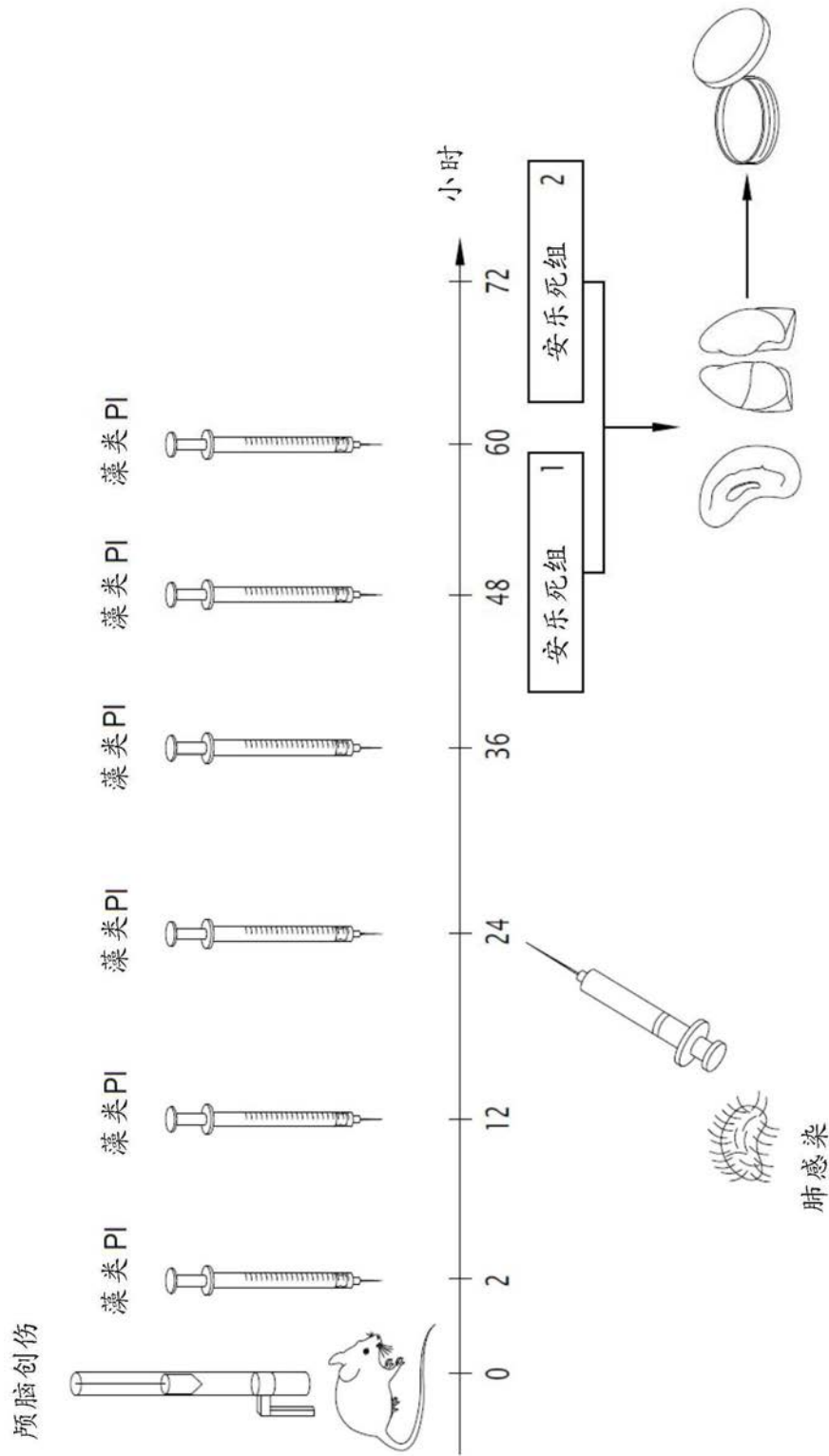


图1

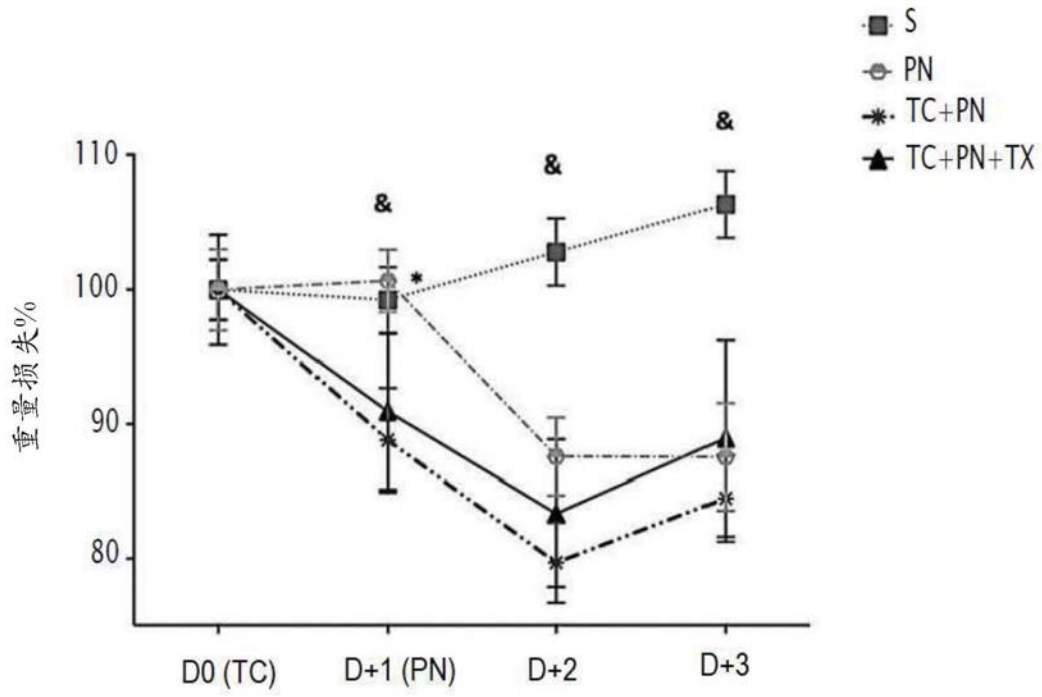


图2

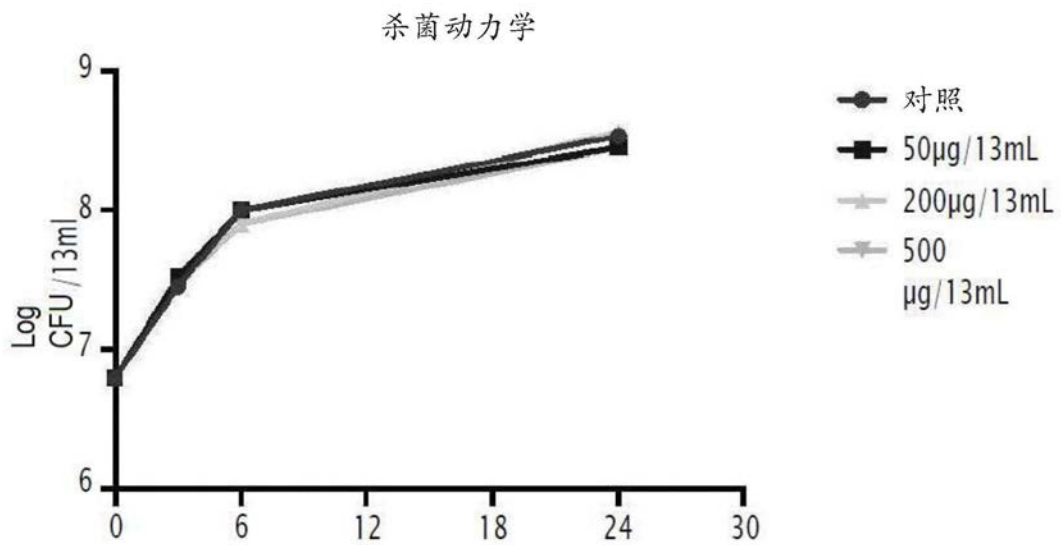


图4

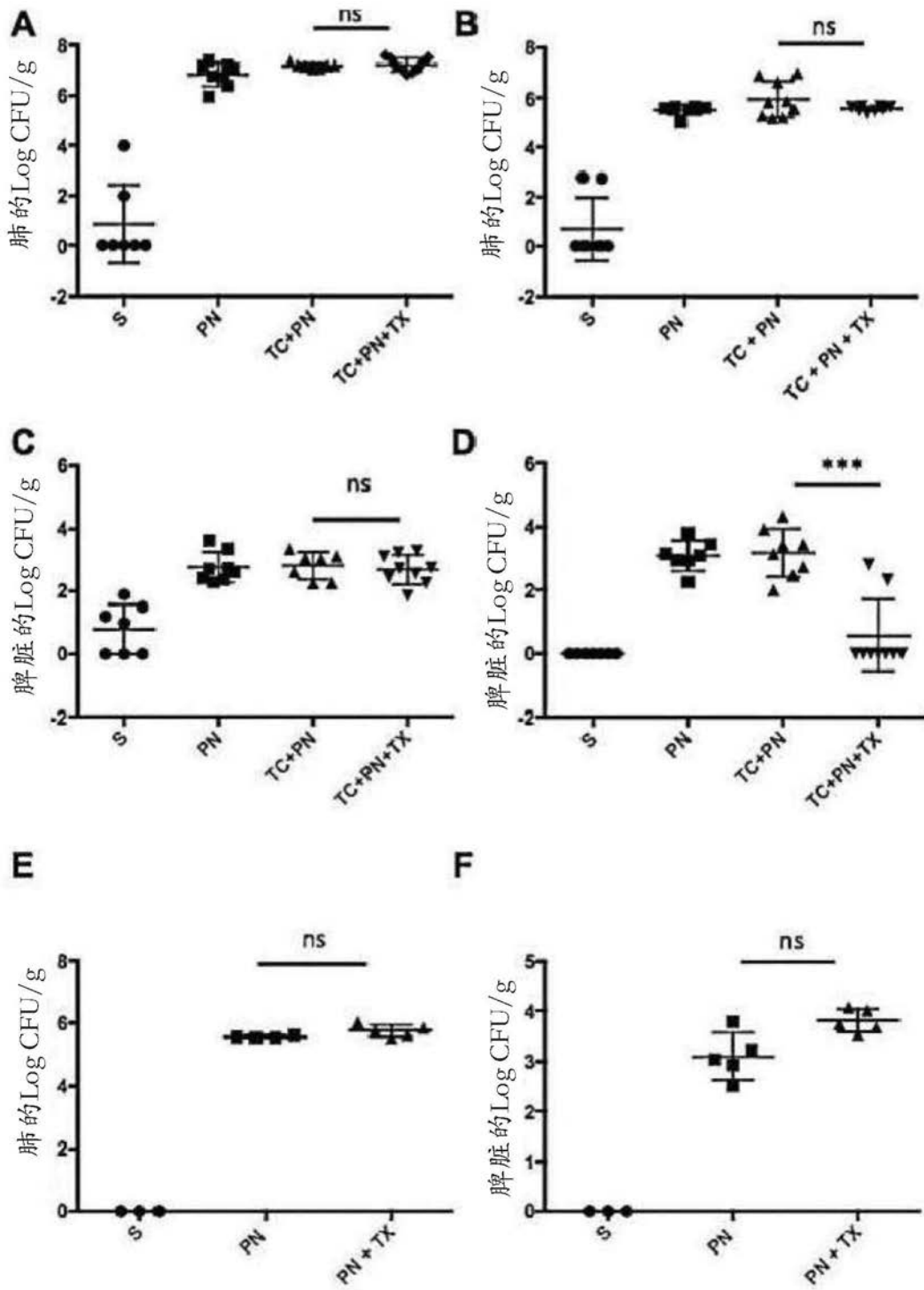


图3

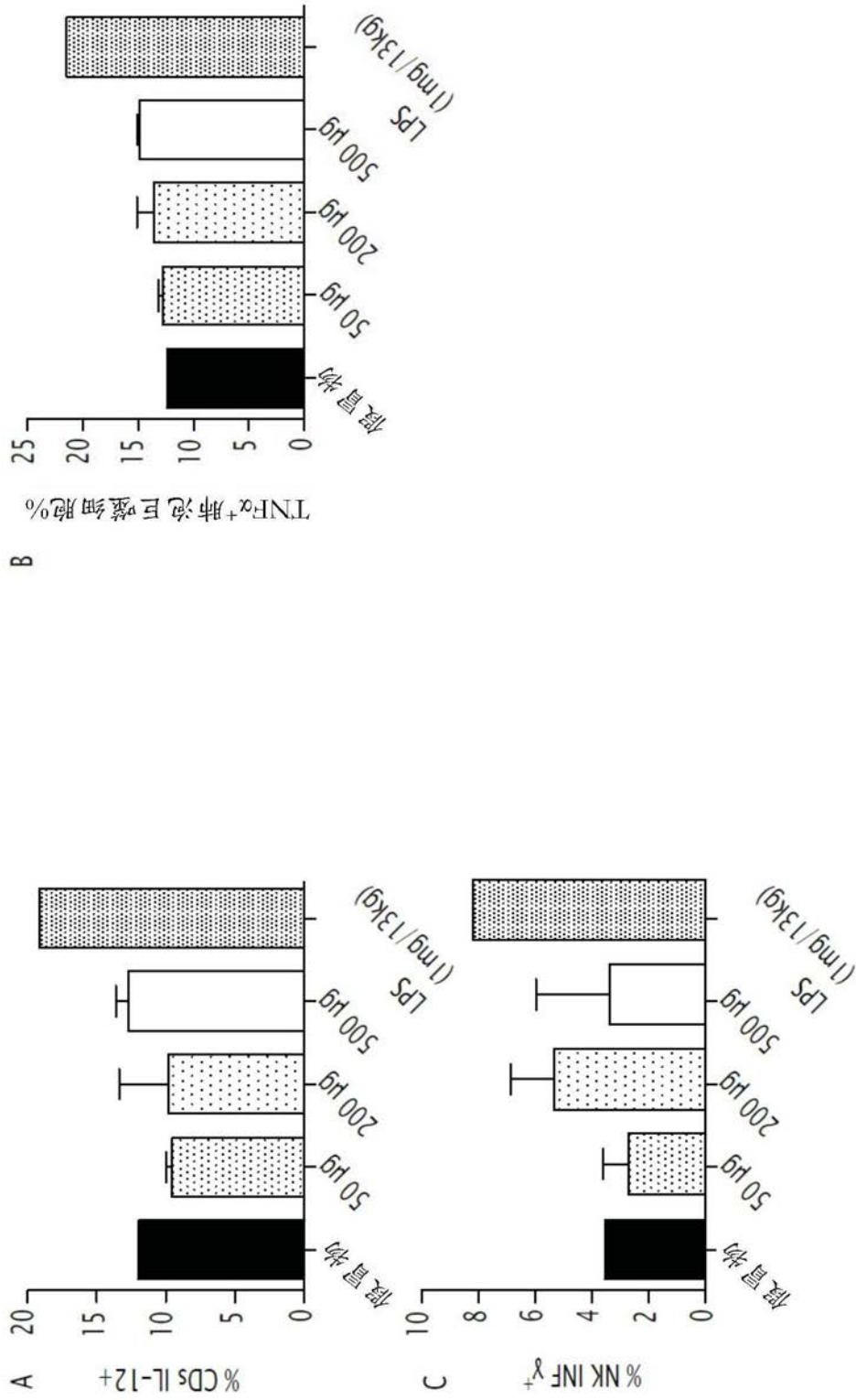


图5

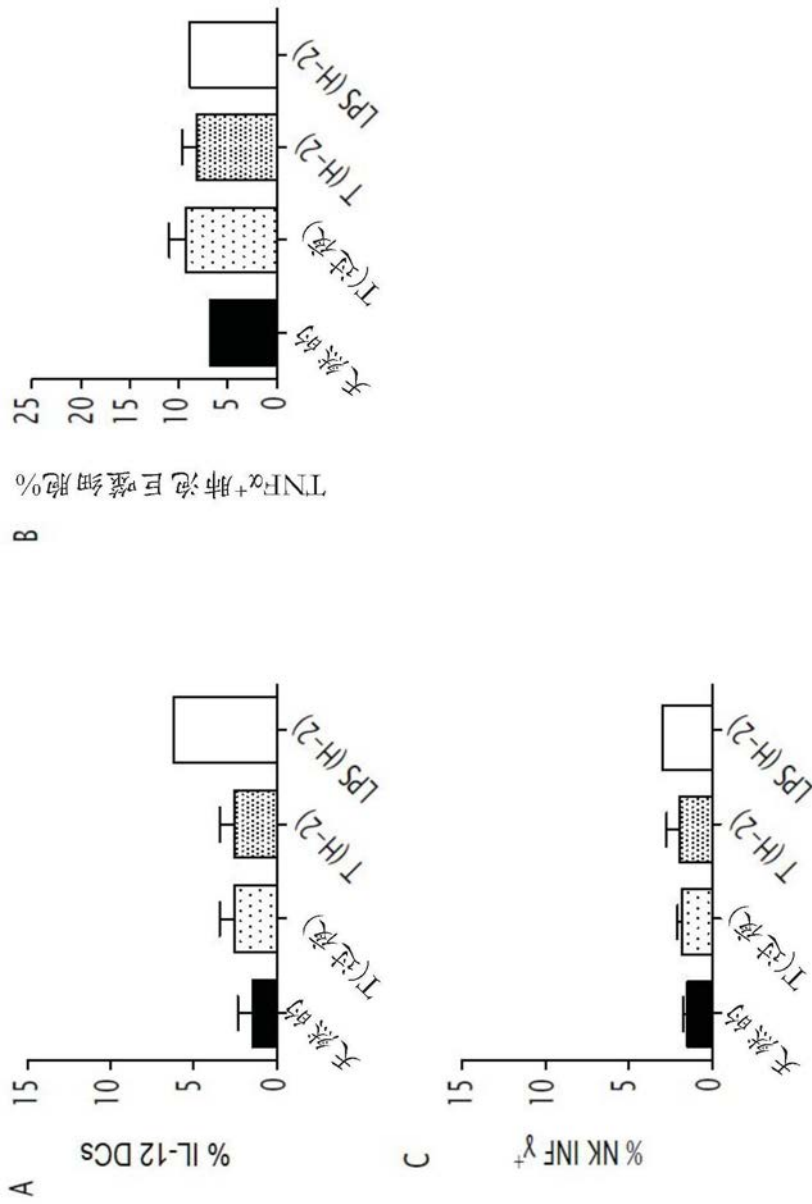


图9

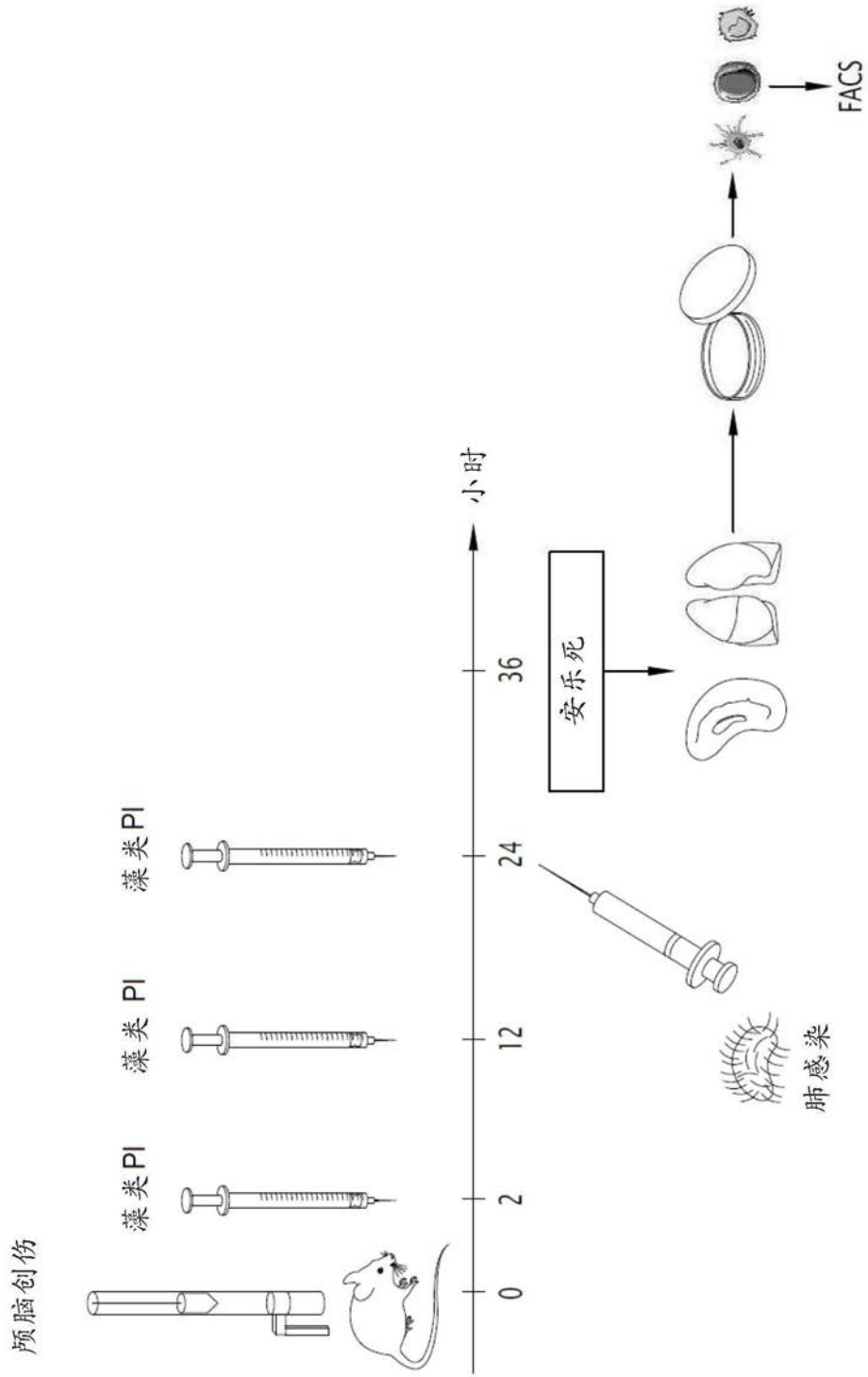
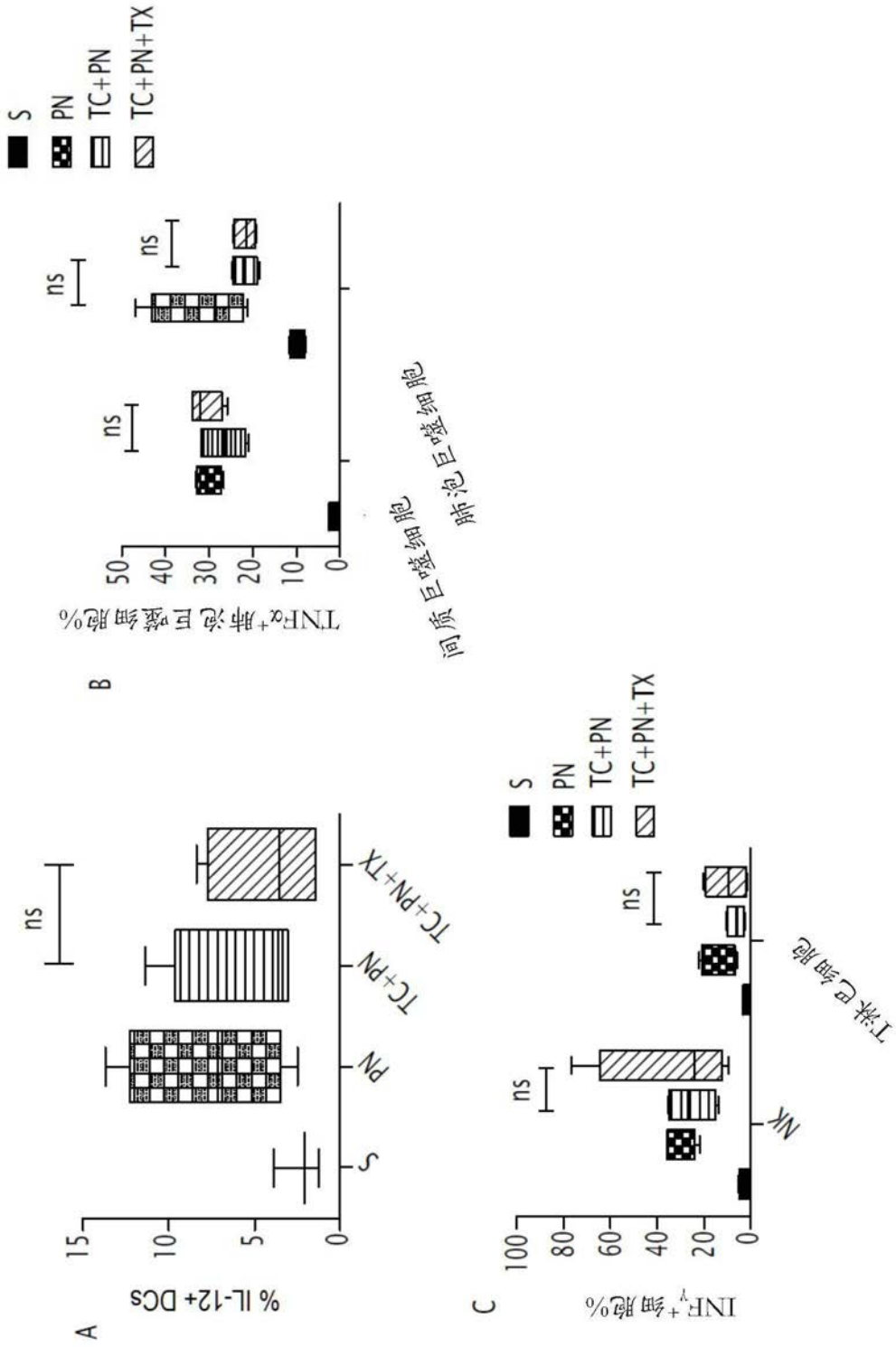


图7



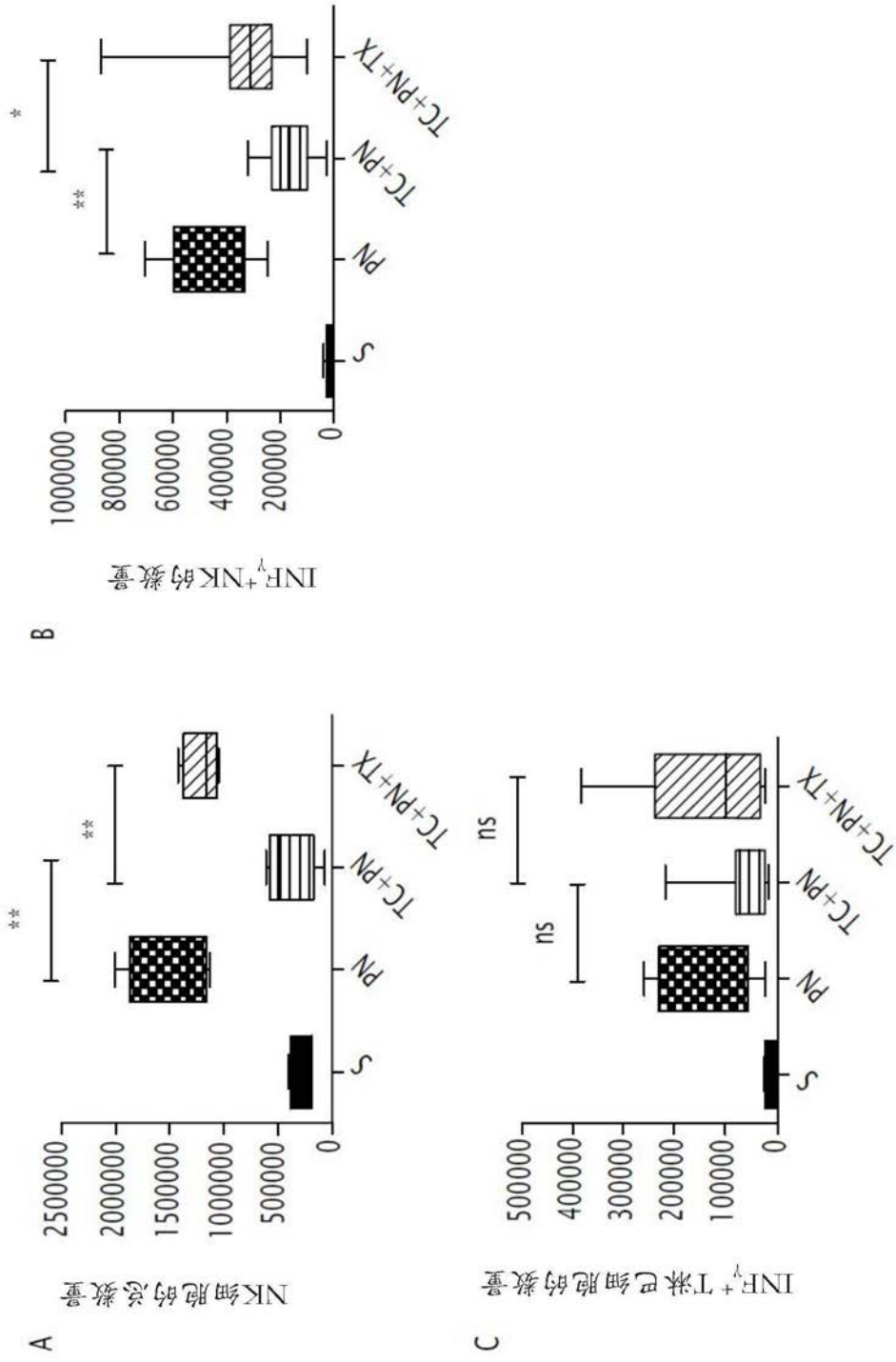


图9

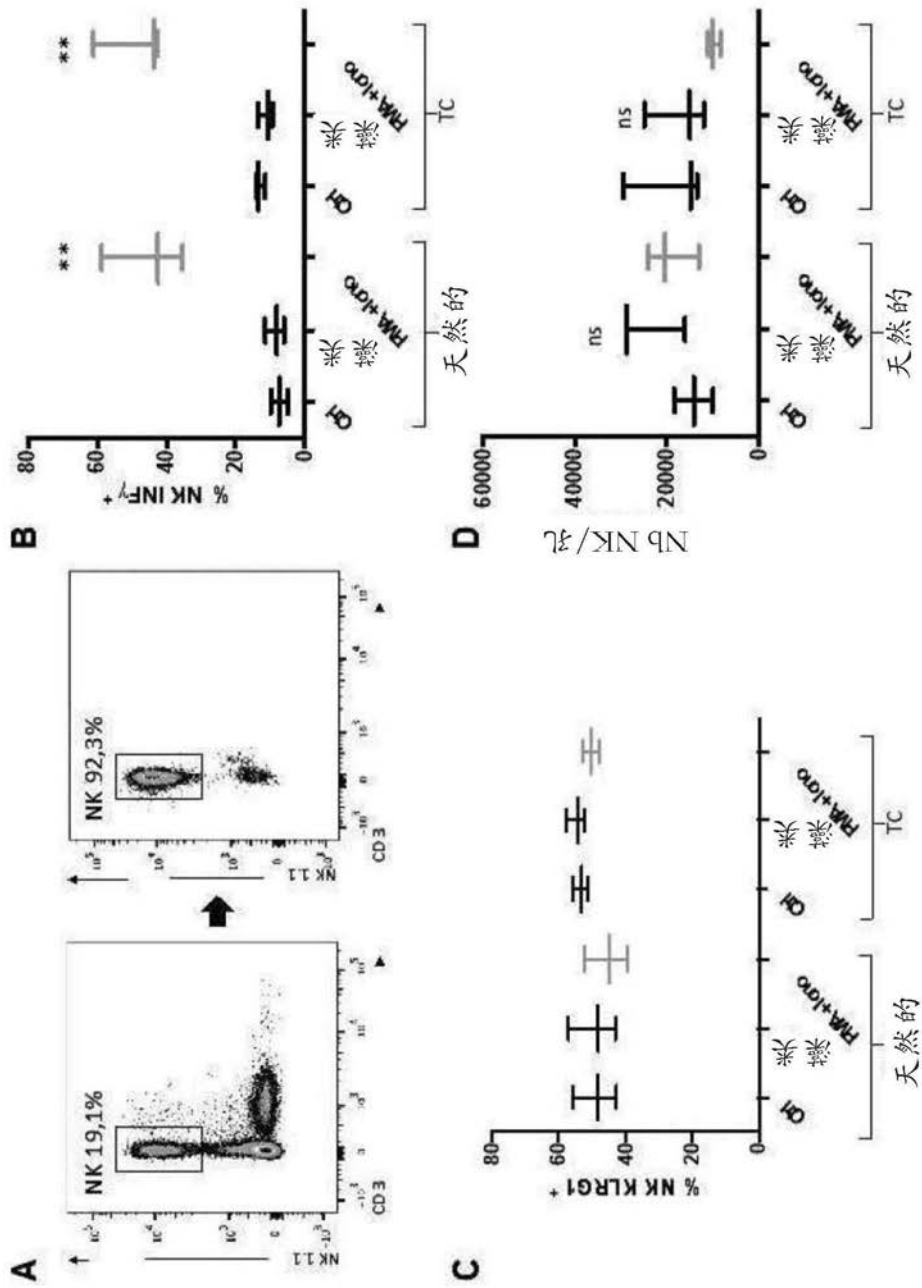


图10

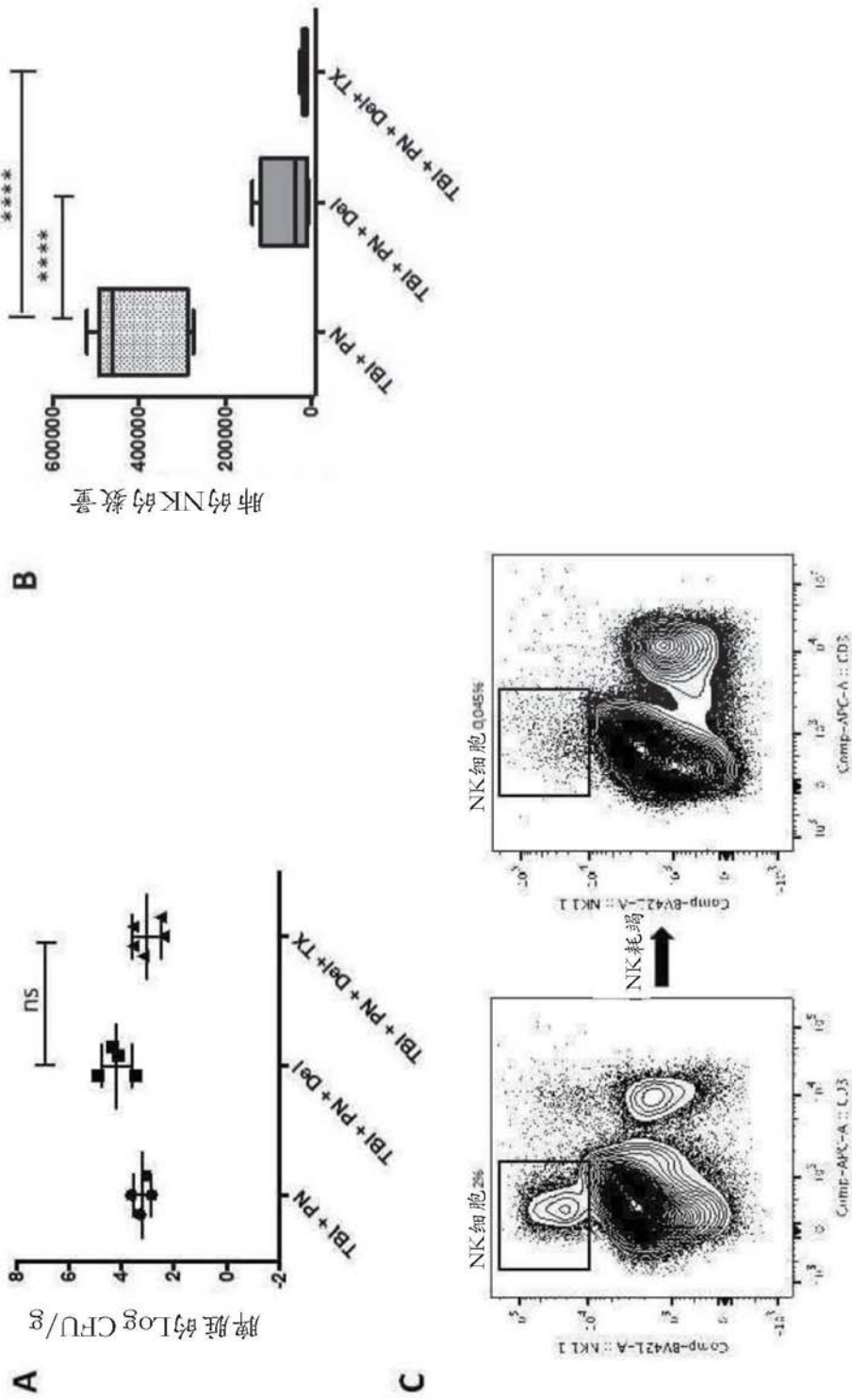


图12

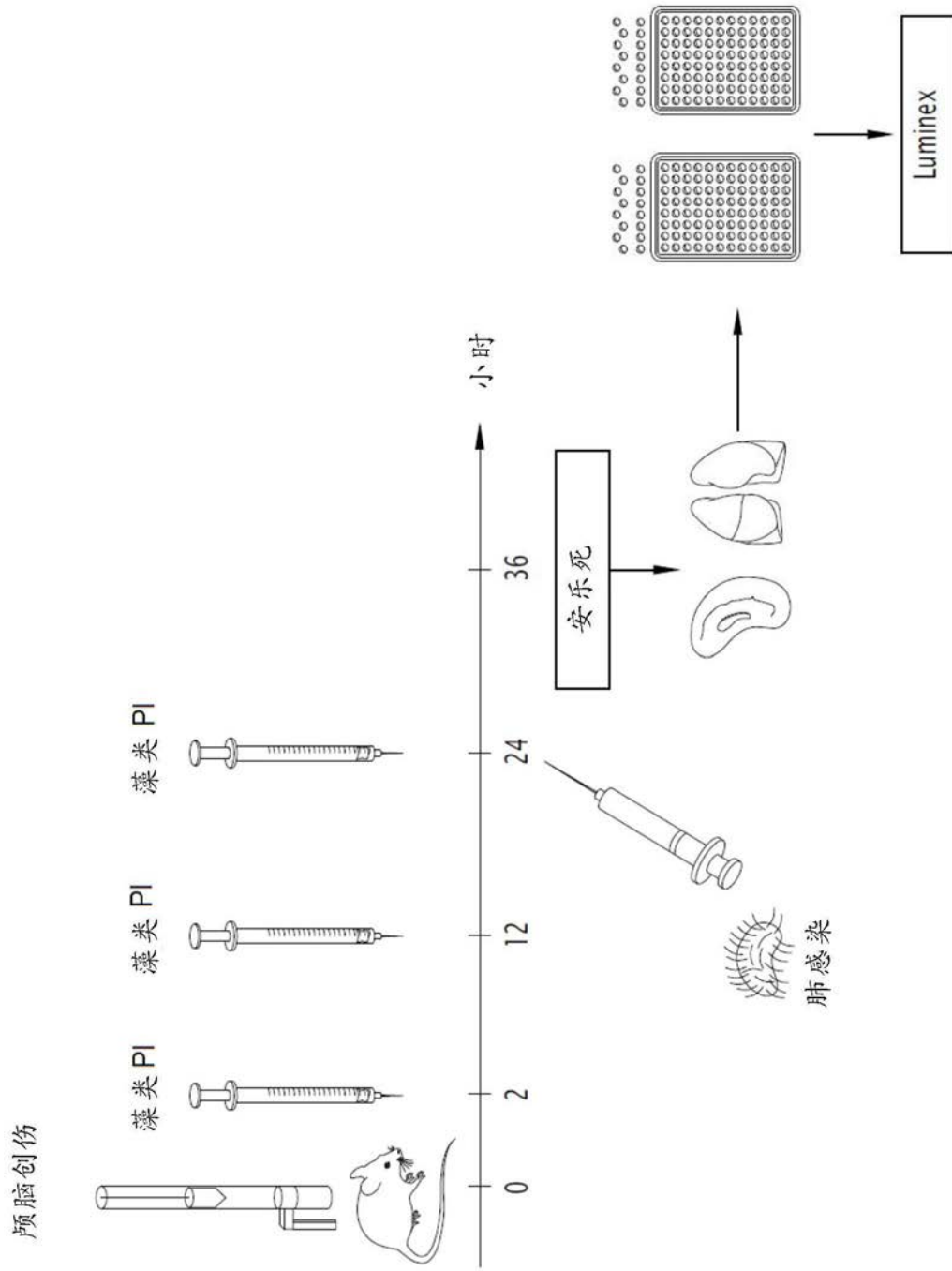


图13

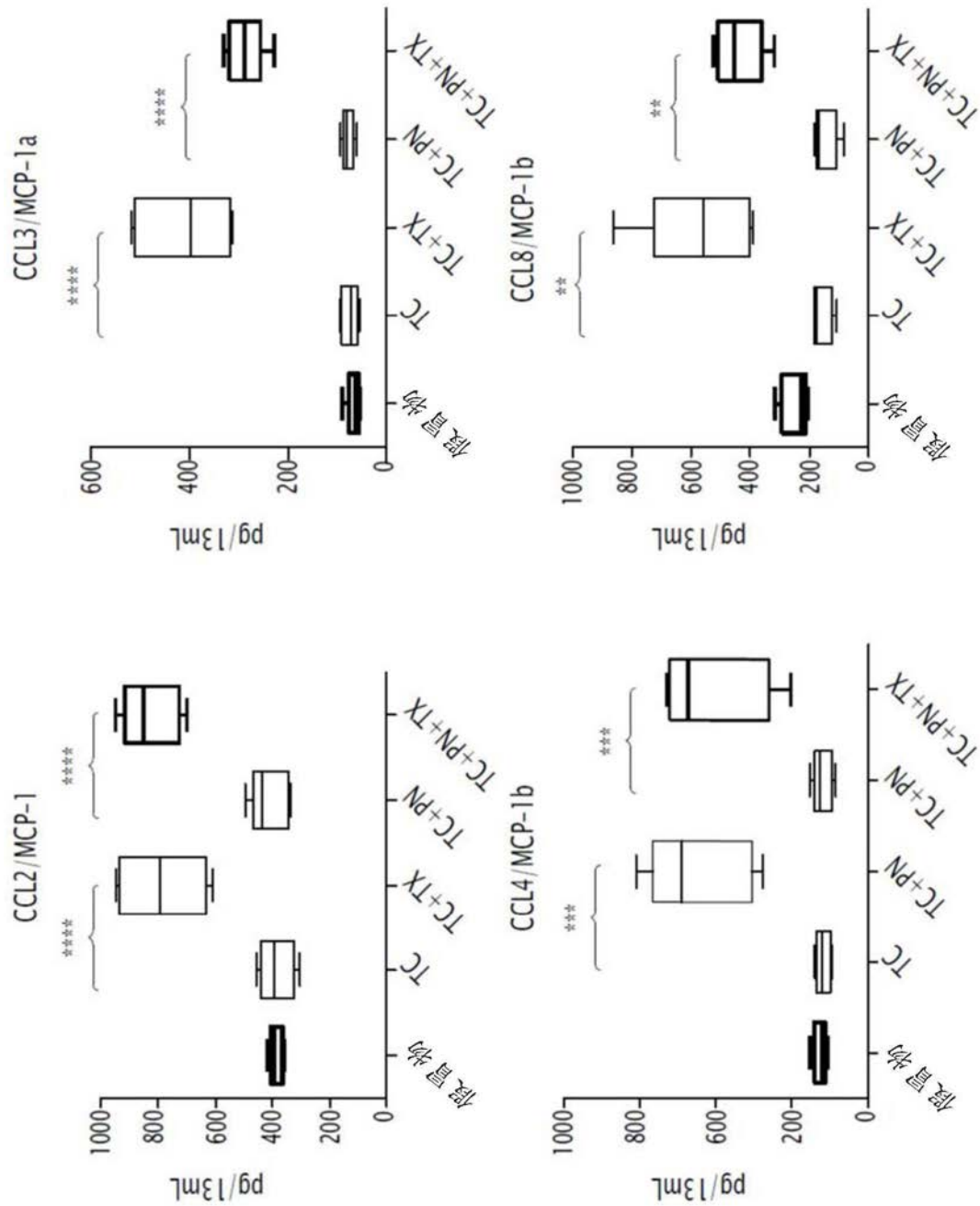


图14