

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年2月11日 (11.02.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/023264 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 31/164* (2006.01) *A61K 31/375* (2006.01)  
*A61K 38/01* (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/107411

(22) 国际申请日: 2020年8月6日 (06.08.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910719544.6 2019年8月6日 (06.08.2019) CN

(71) 申请人: 连云港金康和信药业有限公司 (LIANYUNGANG JINKANG HEXIN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江

苏省连云港市经济技术开发区金桥路南、云桥路东, Jiangsu 222000 (CN)。

(72) 发明人: 成永之 (CHENG, Yongzhi); 中国江苏省连云港市新浦区云华路8-2号楼三单元301室, Jiangsu 222006 (CN)。 连增林 (LIAN, Zenglin); 中国江苏省连云港市新浦区云华路8-2号楼三单元301室, Jiangsu 222006 (CN)。 刘康 (LIU, Kang); 中国江苏省连云港市新浦区云华路8-2号楼三单元301室, Jiangsu 222006 (CN)。 顾睿 (GU, Rui); 中国江西省连云港市新浦区云华路8-2号楼三单元301室, Jiangxi 222006 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW FIRM); 中国北京市海淀区上地三街9号嘉华大厦E座1004室田芳, Beijing 100085 (CN)。

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AFRICAN SWINE FEVER AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 用于治疗非洲猪瘟的药物组合物及其用途

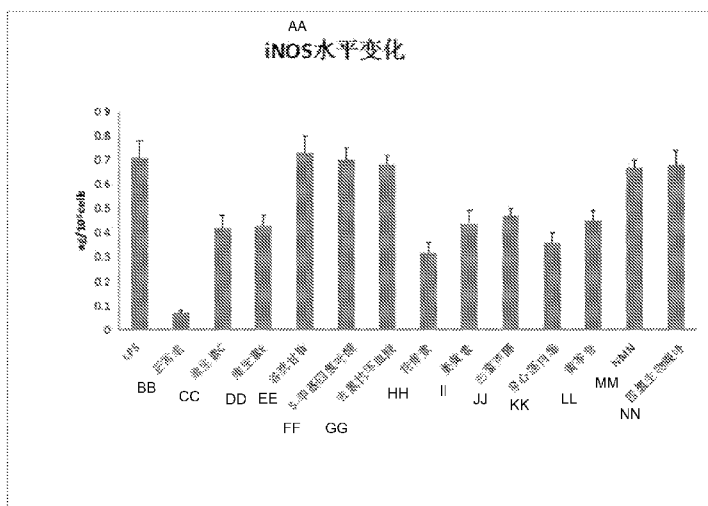


图6

AA iNOS level changes	HH Anthocyanin
BB Normal group	II Curcumin
CC Vitamin C	JJ Resveratrol
DD Vitamin E	KK Andrographolide
EE Glutathione	LL Baicalin
FF 5-methyltetrahydrofolic acid	MM NMN
GG Dehydroascorbic acid	NN Tetrahydrobiopterin

(57) Abstract: A pharmaceutical composition for generating a safe amount of nitric oxide (NO) in vivo and use thereof. The pharmaceutical composition comprises the follow components: an NO toxicity decreasing agent, an NO extender, and a nitric oxide synthase inducer. Provided is the pharmaceutical composition which has high versatility and extremely effectively treats pathogenic microorganism infections. The NO toxicity decreasing agent is selected from 5-methyltetrahydrofolic acid, NMN, and dehydroascorbic acid, the NO extender is selected from arginine, and the nitric oxide synthase inducer is selected from phytohaemagglutinin. Provided is a



WO 2021/023264 A1

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

---

new medicinal activity of the 5-methyltetrahydrofolic acid, having a variety of active effects on an immune system caused by pathogen infection, and capable of being used for treating or preventing diseases caused by virus infections and other pathogen infections. In particular, the composition is used for preventing or treating African swine fever.

(57) 摘要: 一种在体内产生安全量的一氧化氮的药物组合物及其用途。其包括以下组分: NO减毒剂、NO增量剂和一氧化氮合酶诱导剂。提供了通用性强而且又极为有效治疗致病微生物感染的药物组合物。其中NO减毒剂选自5-甲基四氢叶酸, NMN以及去氢抗坏血酸, NO增量剂选自精氨酸, 一氧化氮合酶诱导剂选自植物血凝素。提供了5-甲基四氢叶酸的新药用活性, 其对因病原体感染导致的免疫系统具有多种活性作用, 可用于治疗或预防病毒感染以及其他病原体感染所带来的疾病, 特别的, 组合物用于预防或治疗非洲猪瘟。

## 说明书

### 用于治疗非洲猪瘟的药物组合物及其用途

本申请要求2019年08月06日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为201910719544.6，发明名称为“安全的一氧化氮组合物及其用途”的在先申请的优先权，上述在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

#### 技术领域

本发明属于医药领域，具体涉及一种可在动物体内产生一氧化氮的药物组合物，它能提供安全足量的一氧化氮，用于疾病的预防和治疗。

#### 背景技术

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种急性、热性、高度接触性、致死性动物传染病。ASFV的主要宿主为各品种的家猪、非洲和欧亚野猪、钝缘蜱等，其中疣猪和灌木猪均可被感染，但不表现临床症状，疣猪等非洲野猪和钝缘蜱为 ASFV 的宿主。根据 ASFV 的毒力，ASF 的临床症状和感染过程有显著差异，最急性和急性型感染死亡率为 100%。

非洲猪瘟无有效的预防疫苗，无特效治疗药物。各阶段家猪、野猪和软蜱是非洲猪瘟自然宿主，可在家猪和野猪之间直接传播，也可通过蜱虫叮咬传播，还可以通过污染了病毒的泔水、饲料以及腌制的干火腿等猪肉产品跨国家和地区传播。发现疫情，必须进行扑杀，是全球防范内危害猪群最严重的传染病之一，是我国重点防范的头号外来动物疫病。

人类的历史中新的病毒不断出现，已知的病毒不断变异，面对新的传染性病毒时，由于人体内没有相对应的特异性抗体，导致类周期性的出现大规模的感染。人类的几次流感病毒大流行，带走了很多人的生命。2009 年美国墨西哥爆发了 H1N1 流感病毒，2020 年全球爆发 COVID-19 病毒，不同个体感染相同的流感病毒，结果却不相同，有些病人会失去生命，而有些却几乎没有症状，尽管病毒的毒力可能会有所不同，但宿主的免疫状态也很重要。

当需要预防和治疗流感病毒感染时，抗体是最好的手段，但是流感病毒发展迅速，抗体对季节性流感病毒的选择性压力推动了逃逸突变体的出现，这些突变体可以在早期菌株免疫的社区中引起流行病，这就是为什么季节性流感疫苗需要经常更新的原因。不幸的是抗体反应的特异性也为流感大流行的出现奠定了基础。上个世纪，已经发生了多次流感病毒或冠状病毒大流行，包括，A(H1N1)，A(H2N2)，A(H3N2)，A(H1N1)，非典新型冠状病毒和 COVID-19，上述流感或冠状病毒感染分别发生在 1918、1957、1968、2009、2001 和 2020 年。有趣的是上述的流感病毒感染流行发展中，宿主患病的严重程度均差异巨大。有学者证明免疫细胞中，特别是 T 细胞感染与激活的差异，导致抵抗流感病毒的能力差异[Kelso, Anne. CD4+ T cells limit the damage in influenza[J]. Nature Medicine, 2012, 18(2):200-202.]。

有证据表明，T 细胞可以介导交叉保护免疫，T 细胞无法预防病毒感染，但它们可以通过识别与感染的上皮细胞或抗原递呈细胞表面上的人类白细胞抗原 (HLA) 分子复合的病毒蛋白 (表位) 片段来感知被感染的细胞。由于 T 细胞优先看到源自病毒保守内部蛋白的表位，因此交叉保护性免疫已被归因于预先存在的细胞毒性 CD8+T 细胞，这些细胞会杀死递呈这些保守表位的病毒感染细胞，减少因缺乏抗体保护的大流行病毒感染的时间和严重程度。

非洲猪瘟病毒具有独特的性质，导致不会从感染中恢复过来的猪中诱导中和抗体，进一步的抵抗病毒的复发。未中和抗体的存在导致了非洲猪瘟可能存在 ADE (抗体依赖性增强) 效应，即抗体的存在不仅不阻止病毒的感染，反而加剧的病毒的感染以及有关疾病的病理进程。同时未中和抗体

的存在导致，受到减毒疫苗免疫保护猪中持续的抗原阳性。在综述[Dixon L K, Islam M, Nash R, et al. African swine fever virus evasion of host defences[J]. Virus research, 2019.]中，作者描述分析了非洲猪瘟病毒的免疫逃脱策略，SFV pA179 L Bcl-2 家族蛋白结合并抑制一些仅 BH3 的结构域促凋亡蛋白。pA224 L IAP 家族蛋白结合并抑制 caspase 3 并激活 NF- $\kappa$ B 信号传导，从而增加抗凋亡基因（包括 cFLIP, cIAP2 和 c-rel）的表达。上述机制的存在导致非洲猪瘟病毒能够抑制感染细胞的凋亡从而保证病毒的继续复制，但却通过 TNF- $\alpha$  诱导未感染的淋巴细胞的凋亡，急性 ASFV 疾病的主要特征就是淋巴组织和血液中 B 和 T 淋巴细胞的大量凋亡。

由于抗生素的发现，人们对于细菌感染已经具有了非常好的临床治疗手段，而对于病毒，目前还没有很好的手段去治疗。目前人类对于病毒的治疗药物主要分为两类，M2 离子通道阻断剂以及神经氨酸酶抑制剂，M2 离子通道阻断剂存在整体的病毒抵抗效应以及神经系统的副作用导致临床应用不是很理想，而神经氨酸酶抑制剂虽然能诱导病毒，但是效果比较弱。近年来出现了大量的病毒爆发，禽流感病毒、非洲猪瘟病毒、非典型肺炎病毒，这些病毒的毒理学后果非常严重，对于患者或患病动物医生也无法拿出良好的治疗手段。不仅新病毒无良好的治疗手段，很多长期存在的病毒人们也束手无策，包括登革热病毒、艾滋病病毒等等。治疗病毒最佳方案就是预防，也就是疫苗，通过人体的免疫系统达到预防病毒的效果，以上事实也说明了对于病毒的治疗，开发以抗生素那种直接杀死或抑制病原体的药物的思路其实是事倍功半。

人们需要以新的思路来开发抗病毒药物，利用人体免疫系统达到治疗病毒感染就是其中重要的方向，特别是针对 NO 和免疫的有关药物，以实现通用性强的抗病毒效果。

一氧化氮气体无色无味，能溶于水，醇类，脂肪。上世纪 80 年代以前，一氧化氮只是一种普通而无用的化学气体，人们只知道它存在于汽车尾气和某些化学过程的气体污染物中。在 1980 年之前的 27 中，人们发现了内皮细胞产生一种物质（称为“内皮源性舒张因子”），1986 年 Ignarro 提交的第一篇实验论文，声称内皮源性舒张因子（EDRF）为一氧化氮。这些成果激起了人们极大的热情来关注和研究 NO。它快速的进出细胞，传导信号调节血管扩张，神经传导，大脑发育甚至学习与记忆，它能够强化免疫，杀死部分外来微生物，它能够降低血压，预防中风，心脏病，肿瘤，老年痴呆。

NO 是由 L-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)催化下，经过 NADPH 还原而成，一氧化氮合酶可以分为内皮型一氧化氮合酶（eNOS）、诱导性一氧化氮合酶（iNOS）、神经型一氧化氮合酶（nNOS）。它们分别在人体不同的组织细胞中，分别参与了心、脑血管系统的调节、免疫调节、神经系统的调节。

参与免疫的 NO 可以由多种免疫细胞产生（树突状细胞，NK 细胞，巨噬细胞，嗜酸粒细胞和中性粒细胞），在 iNOS 表达时，可产生大量的 NO，作为人体主动防御的机制。有证据表明 NO 能够抑制病毒的复制，相关机制包括导致病毒刺突蛋白棕榈化减少，抑制病毒蛋白酶，阻碍病毒蛋白和核酸合成。

一氧化氮合酶是一种二聚体，其在氧化条件下会解偶联，从而导致原本合成 NO 的反应路径转变为产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup>，NO<sub>3</sub><sup>-</sup>（PON）等活性氧自由基(ROS)。而 NO 本身也可以与活性氧自由基(ROS)反应生成活性氮(RNS)。

NO 在体内跟超氧阴离子迅速反应生产过氧亚硝酸。在酸性条件下，又会迅速分解产生羟基自由基。过氧亚硝酸是氧化性极强的物质，能够导致蛋白质硝基化、导致 DNA 链断裂。种种原因导致生物体内产生很多氧化性的自由基，既包括活性氧也包括活性氮。这些自由基的存在相当程度的破坏了过往的平衡。这些自由基中，影响最大的当属过氧亚硝基阴离子（PON）。其生产途径主要是一氧化氮跟超氧阴离子反应获得。

PON 在人体内的作用大部分都是负面的。包括而不限于：

1. 氧化作用：PON 本身是一种强氧化剂。在酸性条件下迅速分解出二氧化氮和羟基自由基。羟

基自由基是更强的氧化剂，几乎可以氧化降解所有有机物。在生命体内，PON 能够跟很多酶、蛋白质、细胞因子等的铁/硫中心，巯基，脂质等反应造成氧化损害，造成细胞功能损伤和凋亡；还能够降低谷胱甘肽清除自由基的机制，造成恶性循环。PON 氧化作用可能引起各种疾病发生，如急性慢性炎症，败血症，外伤性局部缺血，动脉硬化，神经再生性失调等。

2. 硝基化作用：PON 能够跟蛋白质中的酪氨酸反应生成硝基酪氨酸而影响蛋白质的功能，造成 DNA 断裂等后果。

3. 影响能量代：酶蛋白在氧化作用和硝基化作用下活性降低。如线粒体的 ATP 合成酶，乌头酶活性受到抑制，导致能量减少。PON 是多聚 ADP-核糖合成酶的强烈激活物。该酶激活后会启动无效的修复循环，导致能量池迅速耗尽。细胞代谢和膜的完整性被破坏，导致细胞死亡。

4. 干扰钙的运转：Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交换蛋白的巯基被氧化，发生功能障碍，导致细胞内钙超载，造成功能障碍。

当然，可耐受剂量的 PON 也表现出正面的作用，比如抵抗病毒，病菌，病原虫，癌细胞等对人体的危害。

NO 这个 1992 年的明星分子，实际上在生命体内无处不在。它是免疫系统的信使，调节血流，神经传导，大脑发育等方面起到重要的作用；它可以杀死病菌，病毒，病原虫，癌细胞，是非特异性免疫非常重要的组成部分。被 NO 杀死的外来微生物或者异常细胞自溶后可以释放大量的抗原物质，启动特异性免疫。NO 还会使机体释放出很多细胞因子比如白细胞介素，干扰素，肿瘤坏死因子 TNF，集落刺激因子 CSF 等，调节免疫应答。

NO 跟超氧阴离子等自由基反应生成过氧化亚硝酸盐 (PON)，氧化性极强，具有特别的硝基化能力，积累到一定程度就会造成炎症，释放出影响病理进程的细胞因子。PON 通过蛋白质硝基化破坏蛋白质功能，使 DNA 断裂，促使病毒变异，破坏免疫平衡，唤醒原癌基因，促发癌症。

NO 参与免疫调控，急性炎症反应是一个复杂但高度协调的事件序列，涉及分子，细胞和生理学改变，其中如果宿主对感染的反应失调，进一步的产生异常免疫反应，从而产生以器官功能障碍的综合征即为脓毒症 (Sepsis)。脓毒症的治疗的研究反映了我们人类对病理生理学和宿主-微生物相互作用的理解的进步。早期人们主要关注在微生物及其致病性上，在 20 世纪 80 年代，随着分子克隆的实施和人类炎症基因的测序，研究脓毒症更专注于宿主对入侵病原体的反应。

根据 2016 年脓毒症 3 的国际会议 (The Third International Consensus Definitions for Sepsis) 将脓毒症定义为由于宿主对感染的反应失调，而威胁宿主生命的器官功能障碍，其临床表现为发烧，呼吸加快，意识水平改变和血压低，并且伴随该病相关的症状比如肺部感染导致的肺炎、肾脏感染、尿路感染等。

尽管人类对脓毒症起源，进展的认识有了极大的提高，但是脓毒症的死亡率依然十分高，根据文章 [Hotchkiss R S, Moldawer L L, Opal S M, et al. Sepsis and septic shock[J]. Nature reviews Disease primers, 2016, 2(1): 1-21.] 所述，对高收入国家的数据进行的初步推断表明，全球每年发生 3150 万例脓毒症和 1940 万例严重脓毒症，每年可能有 530 万人死亡。在许多情况下，尤其是在患有慢性疾病（例如癌症，充血性心力衰竭和慢性阻塞性肺疾病）的患者中，官方的死亡记录通常报告的是潜在疾病，而不是直接的死亡原因（脓毒症），这可能使得脓毒症死亡率明显被低估。这些数字只是估计，因为有关的发病率和低收入、中等收入国家的脓毒症死亡率记录仍然匮乏。

炎症是宿主对病原体入侵的防御反应，因此临床上优先采用的清除病原体的治疗方案是，使用抗生素药物或抗病毒药物来减少病原体抗原的外来刺激。病毒感染性疾病发展到免疫失调阶段，就会发生严重的炎症。一些终止炎症或者抗炎的治疗会减少炎症区域的巨噬细胞数量，提高免疫或是降低免疫反应的决策往往是困难的。常见的抗炎药物有非甾体抗炎药，糖皮质激素等。在严重炎症发生时，临床上往往使用糖皮质激素，然而对脓毒症来说，皮质醇的使用却没有实质益处，根据一

项随机对照试验[Annane D, Cariou A, Maxime V, et al. Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial[J]. *Jama*, 2010, 303(4): 341-348.]表明氟氢可的松并没有降低脓毒症患者的死亡率。而之后的萃取分析[Wang C, Sun J, Zheng J, et al. Low-dose hydrocortisone therapy attenuates septic shock in adult patients but does not reduce 28-day mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2014, 118(2): 346-357.]也说明氢化可的松并不能降低严重感染患者或脓毒症的死亡率，目前临床上对严重感染患者，使用类固醇是有争议的。

过去 20 年内，人们一直尝试弄清维生素 C 与脓毒症之间的关系，脓症患者一般具有非常低的血清维生素 C 水平，人们认为危重病人低维生素 C 水平与血管加压，肾损伤，多器官功能障碍和死亡率增加相关。通过研究维生素 C 的作用机制，发现多种可能对脓毒症有作用的机制，包括抗氧化、抗炎、微循环、抗血栓、增加肾上腺敏感性、促进伤口愈合等。然而和预期不同的是，临床上使用维生素 C 未见具有显著的效果，根据[常雪妮, 李敏, 张正馨, et al. 维生素 C 在脓毒症及脓毒性休克患者治疗中疗效的 Meta 分析[J]. *中华危重症医学杂志（电子版）*, 2019, 012(001):37-41.]统计，静脉输注维生素 C 不能改善脓毒症及脓毒性休克患者的病死率。

5-甲基四氢叶酸是叶酸在人体的活性形式，其并未观察到直接的抗病毒作用，目前叶酸与病毒的直接联系主要在叶酸受体  $\alpha$  (FR $\alpha$ )，其已被描述为介导包括埃博拉等病毒进入细胞的因子。5-甲基四氢叶酸具有直接的抗氧化作用，通过二氢叶酸还原酶的作用促进 BH<sub>2</sub> 转化为 BH<sub>4</sub>，众所周知 BH<sub>4</sub> 是 eNOS 必要的辅助因子。已经有人证明了 5-甲基四氢叶酸通过促进 eNOS，有利于预防和保护心血管疾病，但几乎没有研究报道 5-甲基四氢叶酸在先天免疫激活的条件下对 iNOS 及巨噬细胞分泌 NO 的影响。

L-精氨酸是 NO 内源性合成的前体，在一氧化氮合成酶作用下，会反应产生 NO 和 L-瓜氨酸，尽管 L-精氨酸只有一小部分通过这种途径在体内代谢，但是急性炎症的状况下，由巨噬细胞的 iNOS 所产生的 NO 会大大超过人体的正常剂量。L-精氨酸虽然是非必需氨基酸，可以在在脯氨酸，谷氨酰胺或谷氨酸的代谢途径中内源性合成（通过全身蛋白质降解过程），在肾脏中，瓜氨酸通过精氨酸琥珀酸合酶和精氨酸琥珀酸裂合酶的作用而转化为精氨酸，然而当精氨酸内源性合成不足以满足生物体的代谢需求时，其在不同的病理生理条件下非常重要。

### 发明内容

本发明发现，5-甲基四氢叶酸在“药理”浓度下，具有与“营养支持”的低浓度不同的生理活性，含有5-甲基四氢叶酸的组合物具有治疗病毒感染的作用，进一步发现其对不同病原体，包括细菌、真菌等均具有治疗效果。本发明还发现，去氢坏血酸以及NMN的活性与5-甲基四氢叶酸类似。

基于以上发现，本发明提供如下技术方案：

一种能在动物体内产生安全量的一氧化氮，即控制或降低体内活性氮比例的药物组合物，该组合物使得体内产生的一氧化氮能够达到预防和治疗疾病所需的剂量。

本发明的药物组合物，包括 NO 减毒剂，和任选的 NO 增量剂，所述 NO 减毒剂选自在用药剂剂量下清除过氧化亚硝酸或其盐 (PON) 的抗氧化物质。优选的，所述减毒剂在不低于 10  $\mu$ mol/L 浓度下不抑制诱导性一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达，例如不抑制 LPS 诱导下巨噬细胞的 iNOS 的表达。

本发明的 NO 减毒剂选自抗氧化物质，该物质不影响 iNOS 合酶的激活，且对过氧化亚硝酸盐选择性猝灭。示例性的，其选自下列物质中的一种或者几种：5-甲基四氢叶酸或其盐，去氢抗坏血酸，NMN。

本发明的 NO 增量剂选自酶生 NO 底物，所述酶生 NO 底物选自 L-精氨酸或其盐、瓜氨酸或其盐或精氨酸生物素。

本发明的药物组合物，包括 5-甲基四氢叶酸或其盐和精氨酸或其盐。进一步的，可包括植物血

凝素。

本发明的药物组合物,所述5-甲基四氢叶酸单剂量不小于15mg,所述精氨酸单剂量不小于50mg。

本发明还提供上述药物组合物的用途,用于制备预防或治疗致病微生物感染导致的疾病的药物方面的用途。优选的,所述致病微生物感染为病毒感染。

根据本发明药物组合物的用途,其能够提高病毒感染宿主的T细胞水平,特别是CD4以及CD8T细胞,降低炎症因子的表达,从而用于抗病毒感染。

根据本发明药物组合物的用途,所述病毒为流感病毒、疱疹病毒、非洲猪瘟病毒、冠状病毒例如COVID-19。

特别的,本发明提供一种用于预防和治疗猪瘟的药物组合物,其包括NO减毒剂和NO增量剂,所述NO减毒剂选自5-甲基四氢叶酸或其盐,去氢抗坏血酸,NMN中的一种或者几种,所述NO增量剂选自精氨酸、瓜氨酸或精氨酸生素中的一种或几种。

根据本发明上述治疗猪瘟的组合物,其包括5-甲基四氢叶酸和精氨酸。进一步的,其可以包括植物血凝素,三者的质量比为2:8:1。

根据本发明上述治疗猪瘟的组合物,所述猪瘟为非洲猪瘟。

根据本发明上述治疗猪瘟的组合物,所述组合物能够提高病毒感染宿主的T细胞水平,特别是CD4以及CD8T细胞,降低炎症因子的表达,抗病毒感染。

根据本发明上述治疗猪瘟的组合物,所述组合物单剂量的活性成分为至少30mg/公斤,例如50mg/公斤。根据本发明药物组合物的用途,所述组合物用于制备预防和治疗感染导致的脓毒症、全身性炎症反应综合征的药物用途。

根据本发明药物的组合物,其包括包含5-甲基四氢叶酸或其盐和维生素C。优选的,所述5-甲基四氢叶酸钙与维生素C的质量比为2:1至5:1,例如3:1,4:1。

本发明还提供上述药物组合物的用途,所述组合物用于制备治疗由非感染因素引起的全身性炎症反应综合征、脓毒症的用途。

根据本发明药物组合物的用途,所述脓毒症由金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、绿脓杆菌、流感病毒感染所引起的。

根据本发明的药物组合物,可以由活性成分和药学上可接受的辅料制成,例如,所述药物制选自片剂、胶囊剂、冲剂、注射剂、外用膏剂或喷剂。

根据本发明的药物组合物,其是一种免疫佐剂。

本发明中,安全量的一氧化氮是指,一氧化氮中转变为以过氧化亚硝酸为代表的毒性自由基、活性氮的比例可控,能够满足使用一氧化氮预防和治疗疾病的安全需求。这些自由基在体内严重影响物质和能量的代谢,影响甚至破坏细胞和组织的功能,显著增加基因突变的几率,还是很多疾病发生的原因。

本发明的组合物通过控制毒性自由基,并有效地提升一氧化氮的产生量到能够满足预防和治疗疾病的需求。

本发明中,产生安全量一氧化氮的药物组合物,在多种疾病的治疗中具有应用潜力,本发明的组合物能够促进T细胞的增殖与活化,提高宿主在感染过程中的CD4和CD8细胞的水平,阻断CD4和CD8T细胞的凋亡,显著提高宿主的生存率,并且改善感染过程中的炎症反应。

本发明给感染流感病毒的小鼠使用含有5-甲基四氢叶酸、精氨酸组合物,得到了大比例痊愈的结果,而且病程显著缩短。

叶酸的主要功能为碳的传递者,参与DNA的甲基化,参与嘌呤和胸腺嘧啶的合成,进一步合成DNA和RNA。而病毒以DNA或RNA的结构,在宿主细胞中大量复制,充足的叶酸供给应该有利于病毒的复制与传播,而实验结果让人意外,5-甲基四氢叶酸联合一氧化氮增量剂,反而抑制了病

毒。本发明首次提出 5-甲基四氢叶酸和精氨酸等组合物在微生物感染，特别是病毒感染的应用。

iNOS 是免疫系统中生成 NO 的关键酶，现有技术已知，该酶氧化会导致二聚体解偶联，使生成 NO 的反应路径转变为生成自由基，活性氮的反应路径。5-甲基四氢叶酸是内源性的抗氧化剂，能够激活 NADPH，从而达到很好的抗氧化效果，具有直接的抗氧化作用。本发明组合物能够使得机体在病原体感染下，产生 NO 的同时避免产生不利于机体的自由基，包括活性氧(ROS)以及活性氮(RNS)。本发明已经验证了，包括 5-甲基四氢叶酸或其盐，去氢抗坏血酸，NMN 在内的抗氧化剂能够消除过氧化亚硝酸盐，并不影响 iNOS 表达的功能。

本发明提供一种在体内产生足量一氧化氮的方法。本发明的组合物通过抑制过氧化亚硝酸盐的生成，且不抑制并诱导提升一氧化氮合酶的活性，并进一步增加酶生一氧化氮底物精氨酸及其前体的方式，使得体内产生足量一氧化氮。

本发明中，足量的概念是指在达到或者超过预防和治疗疾病所需要的一氧化氮的最低剂量。

本发明为提供足量的一氧化氮提供了系统的方案，可以根据需要选择和优化。为提高一氧化氮产量，组合物中还可以使用一氧化氮合酶诱导剂，比如植物血凝素。植物血凝素 PHA 是一种有丝分裂原，是一种高效安全的一氧化氮合酶诱导剂，提取于豆类植物的技术已经可以规模化生产。本发明的另一目的是提供多种上述安全的一氧化氮组合物的用途。

本发明组合物中的活性成份包括 5-甲基四氢叶酸或其盐。所述盐选自但不限于钙盐，精氨酸盐，氨基葡萄糖盐，钠盐。

在一种优选方案中，本发明每单剂量组合物中 5-甲基四氢叶酸或其盐的用量为 15mg 以上，优选 25mg 以上，更优选 50-1000 毫克。

在一种方案中，组合物包含 5-甲基四氢叶酸或其盐或去氢抗坏血酸或 NMN，和精氨酸；每单剂量组合物中包含 5-甲基四氢叶酸或其盐的用量为 15mg 以上，优选 25mg 以上；优选 50-1000 毫克；更优选 50-500 毫克。示例性的，精氨酸的用量为 50-5000 毫克，优选 100-1000 毫克。

在一种方案中，组合物包括 5-甲基四氢叶酸或其盐和精氨酸以及植物血凝素 PHA。每单位剂量组合物中包含 5-甲基四氢叶酸或其盐的用量为 15mg 以上(折合为 5-甲基四氢叶酸用量)，优选 25mg 以上；优选 50-1000 毫克；更优选 50-500 毫克；每单位剂量组合物中精氨酸的用量为 50-5000 毫克，优选 100-1000 毫克；每单位剂量组合物中植物血凝素用量为 10-500 毫克，优选 20-100 毫克。

所述药物制剂可以选自片剂、胶囊剂、冲剂、注射剂、外用膏剂或气体制剂。

### 发明详述

NO 诱导的 HIF-1 $\alpha$  的稳定化和磷酸化的 p53 水平被活性氧减少[Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, et al. Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling. J Biol Chem. 2006;281(36):25984–25993.], 事实上，添加抗氧化剂对亚硝化信号具有保护作用[Edirisinghe I, Arunachalam G, Wong C, et al. Cigarette-smoke-induced oxidative/nitrosative stress impairs VEGF- and fluid-shear-stress-mediated signaling in endothelial cells [retracted in: Rahman I. Antioxid Redox Signal. 2013 Apr 2018(12):1535]. Antioxid Redox Signal. 2010;12(12):1355–1369.], 因此 NO 水平和随后的下游信号传导被活性氧调节，也是调节氧化还原信号的一个因素。

iNOS 的表达需要同时激活 STAT 和 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 充当炎症的主要开关，与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生有关，NF- $\kappa$ B 受到氧化还原调节。绝大部分的还原剂或抗氧化剂都会某种程度上具有抗炎的作用，抑制 NF- $\kappa$ B 通路，能够抑制 iNOS 的表达，在我们的一个实施例中，我们比较了不同抗氧化剂对 LPS 诱导下的巨噬细胞表达 iNOS 的影响，结果表明 5-甲基四氢叶酸、去氢抗坏血酸、BH<sub>4</sub>、谷胱甘肽、烟酰胺单核苷酸在 10  $\mu$ mol/L 的浓度下对 iNOS 的表达几乎不影响。考察上述抗氧化剂对过氧化亚硝酸盐的反应性，结果表明 5-甲基四氢叶酸、去氢抗坏血酸、NMN 均具有较高的消除过氧化亚硝酸盐的能力。已经证明在低氧条件下，淋巴细胞的免疫功能被抑制并且凋亡率增加，由于缺乏活性氧，它阻碍了 iNOS 的合成，破坏了 iNOS 和  $\alpha$ -actinin4 的结合，阻止了 iNOS 附着在肌动蛋白细胞骨架

上。因此，抗氧化剂的存在可能会导致 iNOS 的下调。而本发明却发现，如下抗氧化剂：5-甲基四氢叶酸、去氢抗坏血酸、NMN 具有独特的性质，它们在一定浓度下不会降低 iNOS 的表达，却具有较好的清除过氧化亚硝酸盐的能力。上述抗氧化剂均具有在抗原激活免疫后，不降低免疫应答能力，特别是不对感染过程中 iNOS 表达产生负面影响，且还会降低过氧化亚硝酸盐的产生，NO 具有抑制细胞凋亡的作用，通过 S-亚硝基化作用抑制 caspases-8, caspases-9 或 caspases-3，而过氧化亚硝酸盐则会通过 DNA 损伤以及 p53 的上调促进细胞的凋亡。

NO 对感染微生物具有直接和间接的作用，NO 能够直接破坏病原微生物的酶结构，特别是[Fe-S]簇，在病毒感染中，表达 NO 能够抑制病毒的酶活性，抑制病毒的复制。NO 的直接毒性尤其是细胞外抗病毒活性已经得到充分的证明，但是 NO 对免疫功能的调节的间接作用则复杂很多。有研究证明流感病毒感染的 iNOS 缺陷小鼠几乎没有肺炎的组织病理学证据，因此该学者认为宿主的 iNOS 可能比病毒复制对肺炎的贡献更大[Karupiah G, Chen JH, Mahalingam S, Nathan CF, MacMicking JD. Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;188(8):1541-1546.]。在内毒素血症中，早期使用的 iNOS 抑制剂治疗的临床前模型结果令人失望[Hauser B, Bracht H, Matejovic M, et al. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2005, 101(2): 488-498.]迄今为止已经描述了有益的和有害的效果，人们疑惑 NO 是感染的积极因素还是消极因素。

人们观察到外源性的 NO 会抑制 T 淋巴细胞的增殖，外源性 NO（即，NO 不是由 T 细胞产生的本身）抑制增殖或甚至引起 T 细胞的死亡[Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide.[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 677:375-393.]。缺乏重要抗氧化剂机制的小鼠（即 GSNOR）由于过度的 S-亚硝基化和淋巴细胞凋亡而在外周显示出 T 和 B 细胞的明显缺乏。在另一方面，少量的 NO 支 T 细胞亚群，尤其是 Th1 细胞和 FoxP3 的阴性调节性 T 细胞群，可有效抑制 Th17 细胞分化。此外，最近的研究表明，外源 NO 也调节 Th9 和 Th17 细胞。

在本发明的一个实施例中发现，细胞培养液中 5-甲基四氢叶酸在 15.625  $\mu\text{m}$  的浓度下，几乎不影响巨噬细胞 NO 的分泌，更为有趣的是，在未加 LPS 刺激时，5-甲基四氢叶酸在低浓度时，发现可促进 NO 的分泌。

本发明中筛选的 NO 减毒剂与 NO 增量剂的联合使用显示出能够显著增加抗原刺激后 CD4+ T 细胞增殖的活性。现有研究以表明，病毒清除是由抗原特异性 CD8+ 效应 T 细胞介导的，而记忆 CD4+ T 细胞在维持 CD8+ T 和 B 细胞记忆反应中起到重要作用[Stambas J, Guillonau C, Kedzierska K, et al. Killer T cells in influenza[J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2008, 120(2): 186-196.]。另外，近期还有研究表明，CD4+ 和 CD8+ T 细胞均与肺炎的控制有关，并通过产生白介素 10 来限制过度的组织损伤。因此本发明的含有上述 NO 减毒剂与 NO 增量剂的药物组合物能够用于病毒清除和抗炎治疗中。

本发明中精氨酸作为 NO 的增量物，与 5-甲基四氢叶酸联合使用时，产生了意想不到的抗病毒、治疗脓毒症的效果。在一个实施例中，本发明的组合物能够显著的刺激小鼠胸腺和脾脏的 T 细胞的增殖，施用精氨酸和 5-甲基四氢叶酸的组合，相对于仅添加精氨酸，CD4 细胞的增殖明显提高，说明组合物能够提高效应 CD4+T 细胞的增殖能力。正如背景技术中所讲，病毒特异性记忆 CD4+T 细胞的数量可以预测人类感染流感病毒的严重程度，病毒特异性 T 细胞数量与疾病的严重程度成反比。因此本发明的组合物具有治疗流感病毒感染的潜力，可降低患病的严重程度。前已经知道，过氧化亚硝酸盐影响细胞的免疫反应，有研究支持过氧化亚硝酸盐阻止了抑制炎症反应和修复的反馈能力，容易使得宿主在感染中免疫失调。使用的组合物既能提高宿主免疫能力而且维持了炎症的负反馈机制，能够使得宿主能够抵御感染，特别是病毒感染。

现有的病毒感冒药，多数用于缓解症状、减轻感冒的痛苦，但是不能可靠且明显的缩短病程。而本发明的上述药物组合物对感冒治疗产生了颠覆性的效果：起效快，针对 40 多名试用者的回访结

果，服用组合物之后一般 48 小时内感冒症状消失，虽然没有进行双盲对照的临床实验，但是有关的试用组合物的反馈结果也超乎预期。

进一步的，本发明在动物模型中验证了组合物的抗病毒感染效果，结果表明组合物能够保护小鼠的免疫功能，减轻流感病毒感染肺部的病理状态，减轻肺组织损伤。5-甲基四氢叶酸与精氨酸的组合物能够明显降低感染所致的炎性因子的水平，显著降低感染后 5 天肺部病毒滴度，提示组合物具有一定的抗病毒作用。此外，组合物的使用能够显著提高感染小鼠脾脏及胸腺的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的水平，提示虽然组合物降低炎性因子但是未降低宿主的免疫力。肺组织切片的结果表明组合物能够减少肺组织损伤和炎症状态，在对于感冒病毒的宿主模型中显示了非常好的疗效。

最近的研究表明，NO 能够促进 T 细胞受体 (TCR) 介导的免疫突触 (IS) 信号[Garcia-Ortiz A, Martin-Cofreces N B, Ibiza S, et al. eNOS S-nitrosylates  $\beta$ -actin on Cys374 and regulates PKC- $\theta$  at the immune synapse by impairing actin binding to profilin-1[J]. PLoS biology, 2017, 15(4): e2000653.]，IS 对于调节 T 细胞活化、分泌和细胞间免疫信号通讯非常重要，这也是组合物能够显著提高 T 细胞数量的可能原因。

在本发明的一个实施例中，将组合物应用在非洲猪瘟病毒感染猪的治疗，获得了非常好的效果，显著提高了感染非洲猪瘟病毒的猪的存活率，进一步证明了组合物抗病毒的潜力。

此外，本发明发现，本发明上述组合物能够显著保护高剂量病毒的攻毒实验中宿主的生存，显示一定的治疗脓毒症的潜力。

在过去的三十年中，已经进行了 100 多次 II 期和 III 期临床试验，以测试各种新型药物和治疗干预措施，以期改善严重脓毒症和败血性休克患者的预后。所有这些努力最终都未能产出能够减少器官衰竭并改善脓症患者生存率的新型药物[Artenstein AW, Higgins TL, Opal SM. Sepsis and scientific revolutions. Crit Care Med. 2013;41(12):2770 - 2772.]。所有这些研究都使用特定分子或途径的单一药物，由于涉及到非常复杂的免疫代谢途径，以及上千个可能靶点，以此思路筛选药物并不容易。

外源性精氨酸的补充在脓毒症的治疗中是存在争议的，由于之前人们认为 NO 介导的过氧化在脓毒症的病理发展起重要作用。有人假设，NO 产生过程中的药理学阻断剂是一种治疗脓毒症的可行策略，因此开发了 NOS 合酶抑制剂，但是回顾临床结果，有关抑制 NOS 的疗法总体上无益处。另一方面脓症患者精氨酸水平降低，但是增加 NO 的内源性供体可能导致氧化应激的增强的有害影响。本发明的组合物中 5-甲基四氢叶酸与精氨酸的联合使用在临床前动物模型中取得意想不到的非常好的疗效。

本发明发现 5-甲基四氢叶酸能够显著降低 LPS 诱导下的脓毒症小鼠的死亡率，提示 5-甲基四氢叶酸对由于严重过敏导致的脓毒症的治疗可能有益。

本发明发现 5-甲基四氢叶酸与精氨酸组合物能够显著降低由于感染微生物（例如，金黄色葡萄球菌）所导致的脓毒症小鼠的死亡率。脓毒症是一种高度致死性疾病，其特征在于广泛的细胞凋亡诱导的免疫细胞耗竭和之后的免疫抑制。本发明发现 5-甲基四氢叶酸和精氨酸的组合可以显著提供宿主存活率，阻断 CD4 和 CD8 T 细胞的凋亡，在多种细菌和病毒导致的脓毒症模型中均证明了组合物具有的疗效。

应该认识到，人体中的某些氧化性信号对感染性疾病是有益的，在保护性氧化信号和活性氧的有害作用之间存在微妙的平衡。本发明的组合物选用的抗氧化剂具有独特的性质，可以缓解病原微生物感染导致症状，且同时提高 NO 的水平，使得 NO 介导的病原体杀伤作用胜过 NO 触发的氧化应激机制。

T 细胞确实在交叉保护中起着重要作用，在疫苗领域灭活的病毒疫苗往往针对某些病毒通透诱导特异性抗体来进行保护，而对增强交叉保护性 T 细胞反应的作用却很小，本发明组合物具有增强免疫反应的作用，在一个实施例中组合物的使用显著提高了接种狂犬疫苗后免疫动物的抗体水平。

本发明利用了人和动物体的免疫系统，这一天然而强大的抗病毒工具。非洲猪瘟这一烈性传染病，现有技术完全无能为力，致死率 95%-100%，而使用本发明显示明确的疗效，显示组合物抗病毒感染的能力超乎预期。[Oura, C. A L . In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(9):2445-2450.]中报道了，减毒病毒分离株 OUR/T88/3，使用该病毒作为疫苗后发现，无毒 ASFV 分离株 OUR/T88/3 的感染可以保护远亲猪免受葡萄牙 ASFV 强毒分离株 OUR/T88/1 的攻击。但是暴露于 OUR/T88/3 然后耗尽了 CD8 (+) 淋巴细胞的猪不再能完全免受 OUR/T88/1 攻击。这表明 CD8+淋巴细胞对 ASFV 感染的保护性免疫应答中起到了重要作用。

近年来，人们对 NO 在免疫力的作用认识已发生巨大的进步，除了直接对病原微生物的抑制外，还广泛调节免疫功能，除 iNOS 外，还必须将 eNOS 作为免疫条件 NO 的来源。因此对 NO 的多种功能和目标靶点的认识的补充使我们认识到针对 NOS 亚型的抑制或激活难以应用到临床实践，但是，本发明的组合物的临床前动物模型的结果令人鼓舞，显示 NO 在抗病毒和脓毒症治疗潜力。

本发明首次提出安全和足量一氧化氮应用于抗病毒感染疾病的概念，使用的组合物相互协同体现了很好的效果。在免疫系统中存在复杂的调控机制，多个信号通路或目标靶点存在有益或有害的作用，有关一氧化氮的研究论文也多达数万篇，但是研究的结论却不一致，相互矛盾，难以理清。有研究人员甚至将东方文明的“阴与阳平衡”的概念引入，已表达各种靶点机制的双刃剑的作用[Burke A J, Sullivan F J, Giles F J, et al. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 503-512.]。本发明从免疫的整体角度发明的组合物，构成十分显著的技术效果：1.可以显著提升宿主的免疫细胞水平，或者阻止免疫细胞的凋亡；2.有效降低炎症因子，降低炎症损伤；3.利用调节免疫功能来抗病毒，能够使宿主较好的抵抗二次感染；4.组合物中各个成分安全性较好。

名词解释：

NO，一氧化氮；

NOS，一氧化氮合酶；

SNO，安全的一氧化氮，指过氧化亚硝酸等毒性自由基含量可控的一氧化氮，能够满足使用一氧化氮治疗和预防疾病时的安全需求

PON，过氧化亚硝酸及其盐；

NO 减毒剂：用以减少过氧化亚硝酸等毒性含氮自由基生成的还原性物质。

NO 增量剂：产生 NO 的前体物质。分为能够在体内释放 NO 的化学物质以及产生酶生 NO 的氨基酸，精氨酸生素等物质。

NO 合酶诱导剂：用以诱导产生 NO 合酶的物质

叶源酸：6S-5-甲基四氢叶酸钙。

本发明所述的盐，是指药学上可接受的盐。

## 附图说明

图 1 实施例 7 中各组体重变化曲线；

图 2 实施例 7 各组体温变化曲线；

图 3 实施例 7 各组采食量变化曲线；

图 4 实施例 7 各组饮水量变化曲线；

图 5 实施例 7 各组生存曲线；

图 6 实施例 8 中各种抗氧化剂在 LPS 诱导下对巨噬细胞表达 iNOS 的影响；

图 7 实施例 9 中各种抗氧化剂对过氧化亚硝酸盐清除作用；

图 8 实施例 10 中组合物对刺激 CD4 T 细胞三天的增殖的影响；

图 9 实施例 10 中定量组合物对刺激 CD4 T 细胞三天的增殖的结果；

- 图 10 实施例 12 中炎性因子检测结果；  
 图 11 实施例 12 中炎性因子检测结果；  
 图 12 实施例 12 中炎性因子检测结果；  
 图 13 实施例 13 中中脾脏指数及脾脏各免疫细胞总数变化；  
 图 14 实施例 13 中中脾脏指数及脾脏各免疫细胞总数变化；  
 图 15 实施例 13 中中脾脏指数及脾脏各免疫细胞总数变化；  
 图 16 实施例 13 中中胸腺指数及胸腺各免疫细胞总数变化；  
 图 17 实施例 13 中肺组织切片图；  
 图 18 实施例 13 中外周血炎性因子分泌变化；  
 图 19 实施例 13 中各组小鼠病毒滴度；  
 图 20 实施例 17 中脓毒症模型小鼠脾脏淋巴细胞计数图；  
 图 21 实施例 24 中组合物对家猪耳静脉血常规 LYMP/NEUP 变化图。

### 具体实施方式

下文通过对本发明实施例的描述，更加详细地对本发明的上述及其他特性和优势进行解释和说明。应当理解，下列实施例旨在对本发明的技术方案进行示例性的说明，而并非旨在对由权利要求及其等价方案所限定的本发明保护范围进行任何限制。

除非另有说明，本文中的材料和试剂均为市售商品，或可由本领域技术人员根据现有技术制备。

#### 实施例 1 胶囊

6s-甲基四氢叶酸钙 200mg  
 维生素 c 200mg  
 填充剂适量  
 粘合剂适量  
 崩解剂适量

#### 实施例 2 胶囊

6s-甲基四氢叶酸钙 100mg  
 精氨酸 400mg  
 填充剂适量  
 粘合剂适量  
 崩解剂适量

#### 实施例 3 片剂

6S-5-甲基四氢叶酸钙 100 毫克  
 植物血凝素 50 毫克  
 精氨酸 400 毫克  
 填充剂适量  
 粘合剂适量  
 崩解剂适量

#### 实施例 4 片剂

6S-5-甲基四氢叶酸钙 200 毫克  
 维生素 C 600 毫克  
 填充剂适量  
 粘合剂适量

崩解剂适量

### 实施例5 片剂

6S-5-甲基四氢叶酸钙	400 毫克
维生素 C 钠	100 毫克
1, 6-二磷酸果糖	2 毫克

填充剂适量

粘合剂适量

崩解剂适量

### 实施例6 冻干粉针

6S-5-甲基四氢叶酸钙	800 毫克
精氨酸	3 克

溶解, 过滤, 冻干即可

### 实施例7 小鼠抗感冒试验

小鼠: Balb/c 小鼠, 雌性, 6 周龄, 15-17g, 25 只。

A, 给药组, 感染给药, 10 只;

B, 模型组, 感染不给药, 10 只;

C, 正常组, 不感染不给药, 5 只。

感染方法: 使用 150 $\mu$ l 5%水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, PR8 流感病毒 ( $1 \times 10^6$ pfu/mouse) 滴鼻感染。

给药方法: 5-甲基四氢叶酸钙蒸馏水配制浓度 6mg/ml, 每只小鼠 200 $\mu$ l, 1.2mg/每只, 灌胃, 本次实验感染 32 小时后给药。

感染当天开始称体重、体温、饮水量、食量。小鼠体重、食物和水摄取量每日固定时间测定一次; 体温测定: 感染后 3 天内每日测定 2 次, 间隔 12 小时, 从感染 4 天起, 每日固定时间测定一次。实验直至感染后第 15 天, 小鼠体重基本恢复。

结果: 各组体重变化曲线见图 1, 体温变化曲线见图 2, 采食量变化曲线见图 3, 饮水量变化曲线见图 4, 生存曲线见图 5。从各图可以看出, 给药组的状况大为改善。其中附图 1-4 的纵坐标以第一天数值为 1 的相对比值。

### 实施例8 组合物中减毒剂的筛选

一、实验材料

1、细胞株: 巨噬细胞 RAW264.7。

2、试剂: LPS (Sigma); iNOS 检测试剂盒 (Stressgen); MTT (Biotopped)。

二、实验方案

1、细胞培养:

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱用含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基培养。

2、加药处理:

调整细胞密度为  $5 \times 10^4$ cell/mL, 于 96 孔板中每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h。

基于 LPS 诱导炎症模型:

LPS 诱导: 所有孔加入 40  $\mu$ L LPS (至终浓度为 0.1  $\mu$ g/mL);

维生素 C 组: 每孔维生素 C, LPS (至终浓度为 10  $\mu$ mol/L 维生素 C, 0.1  $\mu$ g/mL LPS);

维生素 E 组: 每孔维生素 E, LPS (至终浓度为 10  $\mu$ mol/L 维生素 E, 0.1  $\mu$ g/mL LPS);

谷胱甘肽组: 每孔谷胱甘肽, LPS (至终浓度为 10  $\mu$ mol/L 谷胱甘肽, 0.1  $\mu$ g/mL LPS);

5-甲基四氢叶酸组：每孔 5-甲基四氢叶酸钙，LPS，5-甲基四氢叶酸钙至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 至终浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS)；

去氢抗坏血酸组：每孔去氢抗坏血酸，LPS (去氢抗坏血酸至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS)；

花青素组：每孔花青素，LPS (花青素至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$ )；

姜黄素组：每孔姜黄素，LPS (姜黄素至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS)；

白藜芦醇组：每孔白藜芦醇，LPS (白藜芦醇至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$ )；

穿心莲内酯组：每孔穿心莲内酯，LPS (穿心莲内酯至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$ )；

黄芩苷组：每孔黄芩苷，LPS (黄芩苷至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$ )；

NMN 组，每孔 NMN，LPS (NMN 至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$ )；

四氢生物蝶呤组，每孔四氢生物蝶呤，LPS(四氢生物蝶呤，至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$ )；

正常组：每孔加入 50  $\mu\text{L}$  完全培养基。

混匀，于  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 24h。

### 3、iNOS 的检测

使用多克隆抗体抗人 iNOS (Stressgen) 通过 ELISA 测定巨噬细胞中的 iNOS 蛋白水平。使用自动流式细胞分析仪确定巨噬细胞的数量。

### 4、结果

结果见图 6，结果表明 5-甲基四氢叶酸、谷胱甘肽、NMN、四氢生物蝶呤在 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度下不影响 iNOS 的表达。

### 实施例 9 不同抗氧化剂清除过氧化亚硝酸盐的比较

取过氧化亚硝酸盐供体 3-morpholino-sydnominine (SIN-1) 分别置于 15 只试管中，浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 。分别向含有 SIN-1 溶液的试管中加入 5-甲基四氢叶酸钙至终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ，分别向含有 SIN-1 溶液的试管中加入去氢抗坏血酸至终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ，分别向含有 SIN-1 溶液的试管中加入谷胱甘肽至终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ，分别向含有 SIN-1 溶液的试管中加入 NMN 至终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ，分别向含有 SIN-1 溶液的试管中加入四氢生物蝶呤至终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 。过氧化亚硝酸盐浓度用分光光度法测定，检测波长为 302nm。

结果见图 7，结果表明去氢抗坏血酸、5-甲基四氢叶酸、NMN 均具有非常好的过氧化亚硝酸盐消除效果。

### 实施例 10 组合物介入下 T 细胞的增殖分化实验

颈椎脱臼法处死小鼠，无菌分离小鼠脾脏及淋巴结放于 Hank's 液中，使用免疫微珠 (CD4+细胞提取试剂盒；美国 Miltenyi Biotec) 从小鼠的脾脏和淋巴结中纯化 CD4T 细胞。在 96 多孔板上分别添加 4  $\mu\text{g/mL}$  的小鼠 CD3 单抗以及 2  $\mu\text{g/mL}$  的抗 CD28 (Biolegend 公司)，并且添加 Dulbecco 的改良 Eagle 培养基 (不含 L-精氨酸)，微量青霉素，甘氨酸，10%的胎牛血清中。

组合物 A 组：细胞培养液中添加 5-甲基四氢叶酸钙至终浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ，精氨酸至终浓度 40  $\mu\text{mol/L}$ ；组合物 B 组：细胞培养液中添加去氢抗坏血酸至终浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ，精氨酸至终浓度 40  $\mu\text{mol/L}$ ；组合物 C 组：细胞培养液中添加 NMN 至终浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ，精氨酸至终浓度 40  $\mu\text{mol/L}$ ；精氨酸组：细胞培养液中添加精氨酸至终浓度 40  $\mu\text{mol/L}$ ；空白组：使用初始细胞培养液 (不含 L-精氨酸)。

纯化的 T 细胞使用 Cell Violet Trace Proliferation kit (Invitrogen) 染色并培养三天，使用流式细胞仪分析测定增殖。

结果如图 8, 9。结果表明，经过筛选的组合物某种程度均能提高刺激后 CD4 细胞的增殖，显示

出能够提高感染中宿主的细胞免疫的能力。

#### **实施例 11 感冒患者试用组合物临床预实验**

制备 400 毫克/粒叶源酸（6S-5-甲基四氢叶酸钙）胶囊，给予感冒患者试用，表 1 中记录用药后各症状的消失时间（小时）。扁桃体炎，咽喉疼痛之外的其他症状都消失的，定义为基本康复；包括扁桃体炎，咽喉疼痛在内的全部消失的定义为完全康复。

表 1 感冒患者临床统计（症状消失时间，小时）

患者编号	头痛	鼻塞	流涕	喷嚏	低烧	疲乏无力	咽部干痒	畏寒肢冷	肌肉酸痛	食欲不振	头晕头胀	咳嗽	咽喉疼痛	基本康复	完全康复
A01			33			33						33	33	33	33
A02		9	11			35			16					35	35
A03	13		13						13					13	13
A04	12												12	12	12
A05		17										17		17	17
A06	32	32	32	32					32				32	32	32
A07	8	8	8			8								8	8
A08	9	43	9	9					9			29	29	43	43
A09	12	12		18		12							36	18	36
A10		20	20	34									36	34	36
A11		15	15	15		15	15		15		48			15	48
A12			11	9						13	9			11	13
A13	8	56	12	12		8								56	56
A14	8	32	12	8		8						46	46	32	46
A15		33	33	33								33	33	33	33
A16	12	12	12	12		12						44	12	12	44
A17		24				10						46	32	24	46
A18	10				10	10		10	10			13	10	10	13
A19	10	10	46			10			10					46	46
A20		15		10		10							54	58	58
A21	12	41	53	17		12						58	58	53	58
A22	32			32									32	32	32
A23		12	17	12										17	17
A24	14		14						14				14	14	14

平均	13.7	23.0	20.6	18.1	10.0	14.1	15.0	10.0	14.9	13.0	28.5	35.7	29.4	27.4	32.9
----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

感冒患者试食处方 GK301（叶源酸 300 毫克，L-精氨酸 100 毫克）胶囊，结果在表 2 中统计。

表 2 感冒患者临床分析（症状消失小时数）

患者序号	头痛	鼻塞	流涕	喷嚏	低烧	疲乏无力	咽部干痒	畏寒肢冷	肌肉酸痛	食欲不振	恶心	咳嗽	咽喉疼痛	基本康复	完全康复
B01		35	11	35										35	35
B02	15	18	15	18					41					18	41
B03	6.5		6.5			6.5						38		6.5	37.5
B04	9		9										9	9	9
B05	13											36		13	36
B06			11		11	11								11	11
B07	13		13			13						84		13	84
B08	13			24		13				13			48	13	48
B09		15		15		15				15	15			15	15
B10	9		9	9		9								9	9
B11	16		22			36						60		36	60
B12	9	9	9				9				9		9	9	9
B13		9	9	9		19			9			9	33	19	33
B14	9		9	9										9	9
B15	12	12	12	12	12	12		12	12			12	36	12	36
B16	35		32			32		32	32	32	32		32	35	35

B17		8		8		8							32	8	32
B18	23	23	23		11	23		23	23	23		23		23	23
B19		15	15			15							15	15.0	15.0
B20	16	16	16							16				16.0	16.0
B21	12			12		12								12.0	12.0
平均时间	14.0	16.0	13.8	15.1	11.3	16.0	9.0	22.3	23.4	19.8	18.7	37.4	26.8	16.0	28.8

对照表 1 可以看出,加入精氨酸缩短了病程。服用组合物的抗感冒效果优于单独的 5-甲基四氢叶酸。但不论是表 1 还是表 2 数据均显示,服用 5-甲基四氢叶酸后,患者的感冒几乎都在 2 天内痊愈。

**实施例 12 5-甲基四氢叶酸对部分炎性因子的影响及 NO 分泌的影响**

一、实验材料

1. 细胞株: 巨噬细胞 RAW264.7。
2. 试剂: LPS (Sigma); MTT (Biotopped); 叶源酸即为 5-甲基四氢叶酸钙(连云港金康和信药业有限公司); NO 检测试剂盒(碧云天)

二、实验方案

1. 细胞培养: 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱用含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基培养。采用 ELISA 法检测上清液炎性因子 (TNF-α、IL-1α、IL-6)。

2. 加药处理:

- 1) 调整细胞密度为 2×10<sup>5</sup>cell/mL, 于 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h。

- 2) 叶源酸组每孔加入 50 μL 叶源酸 (至终浓度为 15.625, 62.5, 250 μmol/L);

LPS+叶源酸组, 每孔加入 50 μL LPS (至终浓度为 0.1 μg/mL), 培养箱中培养 6h 后, 每孔加入 10 μL 叶源酸 (至终浓度为 15.625, 62.5, 250 μmol/L);

LPS 组, 50 μL LPS (至终浓度为 0.1 μg/mL);

正常组每孔加入 50 μL 完全培养基。

- 3) 混匀, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h。

在 520nm 的吸光度值用均数±标准差表示。计算 NO 分泌率=(OD 样品孔-OD 空白孔) / (OD 正常孔-OD 空白孔) ×100%, 根据标准曲线计算 NO 分泌量。

三、实验结果

表 3 NO 检测试剂盒在 520nm 测定 OD 值, 以均值表示 (n=6)

不同处理	组别	浓度 (μM)	裂解液		上清	
			OD520nm	NO 分泌量 (μM)	OD520nm	NO 分泌量 (μM)
	正常	0	0.0481	0.888	0.1076	1.657

未诱导	LPS	1 $\mu$ g/mL	0.0566	1.95	0.395	42.714
	叶源酸	15.625	0.0719	3.863	0.108	1.714
1 $\mu$ g/mL LPS 诱导	正常	0	0.0665	3.188	0.1052	1.314
	LPS	1 $\mu$ g/mL	0.0538	1.6	0.3574	37.343
	叶源酸	15.625	0.0548	1.725	0.3537	36.814

结果表明 5-甲基四氢叶酸在 15.625  $\mu$  mol/L 的浓度下,并不会抑制 LPS 诱导的巨噬细胞表达 NO。炎症因子结果见说明书附图 10,说明书附图 11,说明书附图 12。

上述结果表明 5-甲基四氢叶酸钙对巨噬细胞及 LPS 诱导下的炎症因子表达未有显著影响。

### 实施例 13 考察组合物不同剂量一次性给药对流感病毒感染小鼠的早期保护作用

#### 1.1 材料与方法

##### 1.1.1 小鼠

Balb/c 小鼠, 20 只(每组 5 只), 雌性, 6 周龄, 15-17g, 购自维通利华实验动物公司;

##### 1.1.2 药物配制

使用去离子水溶解药物, 现用现配, 30 分钟内使用。

##### 1.1.3 给药方法

G1 组: 空白对照组

G2 组: 模型组

G3 组: 低剂量给药组 (5-甲基四氢叶酸钙: 精氨酸=1: 4, 0.173g/kg)

G4 组: 高剂量给药组 (5-甲基四氢叶酸钙: 精氨酸=1: 4, 0.346g/kg)

低剂量组、高剂量组灌胃给药, 模型组: 只造模不给药, 给与等体积去离子水。空白对照组: 给与等体积的去离子水。一次性给药。

##### 1.1.4 感染方法

使用 150  $\mu$ l 15%水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, PR8 流感病毒 ( $1 \times 10^6$  pfu/mouse) 滴鼻感染。

##### 1.1.5 小鼠处理方法

感染当天开始称体重, 小鼠体重每天固定时间测定一次。感染后 3 天, 眼眶取静脉血 100ul, 制备血清、冻存。感染后 5 天处死小鼠, 取肺、胸腺、脾脏及外周血。

血: 制备血清, 一部分检测细胞因子 (外检), 其余冻存。

肺脏: 肺组织分为 2 份, 一份 (右侧肺叶) 测定病毒滴度; 一份 (左侧肺叶的上尖端) 固定, 做石蜡包埋、切片并进行 HE 染色。

脾、胸腺: 称重、拍照、细胞计数及免疫细胞染色。

##### 1.1.6 观察指标

体重变化, 每天称量体重。留取样本: 第 5 天血清样品用于检测炎症因子 (使用 Biolegend 的 LEGENDplex Mouse Inflammation Panel 检测, 外检)。肺脏: 测量病毒滴度; 做肺组织病理切片; 检测肺组织中炎症因子的变化。胸腺: 称重、拍照、胸腺总细胞计数、淋巴细胞染色 (CD4+、CD8+T 细胞)。脾脏: 称重、拍照、脾脏总细胞计数、脾淋巴细胞染色分析 (表面染色, B 细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞)。

#### 1.2 实验结果

##### 1.2.1 脾脏指数及脾脏各免疫细胞总数变化

见说明书附图 13、14、15。

##### 1.2.3 胸腺指数及各免疫细胞总数变化

见说明书附图 16。

#### 1.2.2 肺部病理变化

见说明书附图 17。

#### 1.2.6 外周血炎性因子分泌变化

见说明书附图 18。

#### 1.2.7 肺部病毒滴度 (5dpi) 的变化

见说明书附图 19。

结果表明,在感染流感病毒后,除正常对照组外,其他各组小鼠脾脏淋巴细胞都减少、胸腺都缩小,高剂量组胸腺变化较小。脾脏和胸腺均属于免疫器官,与小鼠免疫功能有关,胸腺缩小是导致免疫功能低下的原因之一,提示组合物可能有助于保护免疫器官,对抵抗病毒感染导致得免疫低下有一定的保护作用。肺部病理切片经 HE 染色后,模型组及治疗各组均呈现程度相似的淋巴细胞浸润及肺部组织结构的变化,高剂量治疗组较模型组的肺组织损伤程度略轻。提示组合物有助于减轻流感病毒感染早期肺部的病理状态,减轻肺组织损伤。

感染流感病毒后,感染后 5 天模型组外周血的多种细胞因子显著升高,给药组可明显降低感染所致的炎性因子的分泌。说明药物干预能够有效减低炎性因子水平,可能有助于减弱炎性因子风暴,防治炎性因子风暴所致的肺损伤。感染后 5 天的肺部病毒滴度,治疗组与模型组相比均呈现不同程度的下降趋势。特别是高剂量治疗组,与模型组相比病毒滴度的下降已经接近统计学的显著性差异的临界值。提示组合物降低病毒滴度能够抑制病毒在体内的复制,有一定的抗病毒作用。

#### 实施例 14 组合物对疱疹病毒 I 型脑炎小鼠的治疗

昆明小鼠 60 只,雄性,体重 14~18g,HSV-1 攻击 HeLa 细胞,HSV-1 在 HeLa 细胞中培养 48 小时,收集病毒测定该病毒滴度,选择质量分数为 100TCID<sub>50</sub>10<sup>-5</sup> 病毒接种小鼠。小鼠分为对照组、模型组、生理盐水治疗组、阿昔洛韦治疗组 (10mg/kg)、组合物组 (5-甲基四氢叶酸 14mg/kg、精氨酸 50mg/kg、植物血凝素 7mg/kg),对照组注射 0.03ml 无菌生理盐水,模型组和各治疗组注射 HSV-1 病毒液 0.03ml 后,灌胃给药,连用 4 天,观察各组死亡情况及其他变化。7 天后,眼球取血 0.5ml,35℃ 温箱保存 2h,1000r/min 离心 5min,检测 NO 与 IL-1β 结果如下:

表 4 不同组死亡数及死亡率

组别	n	48h	D4	D7	死亡率
对照组	15	0	0	0	0
模型组	15	2	5	8	100%
阿昔洛韦组	15	0	4	5	60%
组合物组	15	2	4	1	33%

表 5 对照组、模型组、阿昔洛韦和一氧化氮组合物组小鼠血清 NO、IL-1β 水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	NO(μmol/L)	IL-1β (mg/L)
对照组	15	43.31 ± 9.16	0.153 ± 0.02
模型组	0	-	-
阿昔洛韦组	6	79.21 ± 6.23	0.264 ± 0.01
组合物组	10	94.11 ± 9.31	0.172 ± 0.03

本实验表明组合物能够显著降低疱疹病毒感染下的小鼠死亡率,提高感染过程中小鼠 NO 的释放和降低炎症因子的水平。

#### 实施例 15 5-甲基四氢叶酸组合物抗脓毒症配方筛选

C57 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 体重 18~22g, 观察动物的一般生理指标、体重和进食情况。适应性喂养一周。标准颗粒饲料饲养, 自由饮水。自然昼夜光线照明, 室温 18~26℃, 相对湿度 40%~70%。LPS, 购买于 sigma 公司, 货号: L2880。

将 49 只雄性 C57 小鼠分为 7 组, 6 组给药组, 1 组模型组, 每组 7 只, 腹腔注射 LPS 13mg/kg (经预实验确定的剂量, 由于 20mg LPS 剂量下无法观察 120 小时的情况, 为了延长模型组存活时间, 经预实验确认剂量为 13mg/kg)。

A 组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=3: 1 (折合人体用量为 5-甲基四氢叶酸钙 300mg, 维生素 C 100mg);

B 组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=1: 3 (折合人体用量为 5-甲基四氢叶酸钙 100mg, 维生素 C 300mg);

C 组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=1: 12 (折合人体用量为 5-甲基四氢叶酸钙 50mg, 维生素 C 600mg);

D 组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=12: 1 (折合人体用量为 5-甲基四氢叶酸钙 600mg, 维生素 C 50mg);

E 组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=4: 1 (折合人体用量为 5-甲基四氢叶酸钙 1200mg, 维生素 C 300mg)

F 组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=3: 1 (折合人体用量为 5-甲基四氢叶酸钙 1200mg, 维生素 C 400mg)  
H 组, 模型组。

所有给药组均分 3 次: 分别于造模后 9 小时给药一次 (第一天晚上 9 点), 次日早晨再给药一次, 第三日早晨再给药一次, 共 3 次, 给药体积一致。结果如下。

表 6 腹腔注射 LPS 后各时间点动物表现及死亡情况

组别	死亡时间				24h 生存率	48h 生存率	72h 生存率	144h 生存率
	24h	48h	72h	144h				
A 组	1	1	1		100.00%	85.71%	71.43%	57.14%
B 组	1	1	2		100.00%	85.71%	71.43%	42.86%
C 组	1	2	1		100.00%	85.71%	57.14%	42.86%
D 组	2	2	1		71.43%	42.85%	28.57%	28.57%
E 组			1		100.00%	100.00%	85.71%	85.71%
F 组					100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
模型组		4	1		100.00%	100.00%	42.86%	28.57%

C 组、D 组在给药过程中, 部分小鼠出现浑身发抖, 明显精神萎靡等症状, E、F 组状态最好, A、B 组次之, 144h 后各组没有死亡动物。

结果表明不同剂量, 不同配比的 5-甲基四氢叶酸与维生素 C 组合物可不同程度抑制 LPS 诱导的小鼠死亡率, 提高小鼠的存活率, 口服灌胃给药即可达到良好的降低脓毒症模型小鼠死亡率的作用, 其最佳比例为 3: 1。效果随剂量的加大明显改善, 在折合人体用量 1200mg 的 5-甲基四氢叶酸剂量下, 与 400mg 维生素 C 作用能够对 LPS 诱导的脓毒症模型小鼠 100% 存活, 具有极大的临床价值。

#### 实施例 16 5-甲基四氢叶酸组合物对金黄色葡萄球菌脓毒症模型小鼠的保护尝试

SPF 级昆明种小鼠, 体重 20 克左右, 金黄色葡萄球菌取单个菌落接种于培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 收集菌液 4000rpm 离心 3min, 收集沉淀, 用无菌生理盐水洗涤 2 次。菌液约 ( $5 \times 10^9$  CFU/ml, 预实验表明腹腔注射菌液 2ml, 7 天死亡率在 90% 以上)。

小鼠随机分为 5 组, 雌雄各半, 分组如下:

A 组, 高剂量组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=3: 1 (折合人体用量为 1200mg/日即 192mg/日);

B 组, 中剂量组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=3: 1 (折合人体用量为 600mg/日即 96mg/kg/日);

C 组, 低剂量组, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=3: 1 (折合人体用量为 300mg/日即 48mg/kg/日);

D 组, 联合治疗, 5-甲基四氢叶酸钙: 维生素 C=3: 1 (折合人体用量为 600mg/日即 96mg/kg/日) +

苯唑西林 30mg/kg/d  
模型组。

腹腔注射菌液后 4h，开始给药，按上述剂量，分三次给药（0、2、4 天），隔一天施用一次。

表 7 金黄色葡萄球菌脓毒症模型的治疗

组别	死亡时间								存活率
	0	1	2	3	4	5	6	7	
A 组	3	4	2						10%
B 组	3	2	1	2			1		10%
C 组	2	1	2	1	2	2			0%
D 组	1	2		1	1	2	1	1	10%
模型组	2		2	1	2	1	1	1	0%

实验结果令人惊奇，在 LPS 模型组小鼠上切实具有保护性的组合物，在葡萄球菌模型小鼠上不能减缓疾病，二者没有显著差异。

**实施例 17 组合物 C 配方治疗脓毒症及抑菌试验**

5-甲基四氢叶酸钙、精氨酸、植物血凝素，按:2:8:1 比例混合，得到配方 C 的组合物。

健康 ICR 小鼠 120 只，体重 18~24g，雌雄各半，取金黄色葡萄球菌，肺炎链球菌作为供试菌种，按体重随机分为正常组、模型组、组合物低剂量组（40mg/kg）、组合物中剂量组（80mg/kg）、组合物高剂量组（160mg/kg）、阿莫西林组（120mg/kg）。以上各组均按 20ml/kg 腹腔给药，每天 1 次，除正常组外，各组小鼠均以 0.5ml/只腹腔注射金黄色葡萄球菌液（5×10<sup>9</sup>CFU/ml）。（肺炎链球菌感染方式及分组情况与金黄色葡萄球菌相同）观察各组小鼠注入菌液后 4 天内死亡情况，比较组间差异，计算存活率。实验结果如下。

表 8 受试组合物对感染小鼠具有保护作用( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

组别	剂量 mg/kg	动物存活率 (%)	
		金黄色葡萄球菌	肺炎链球菌
正常	-	100	100
模型	-	10	10
阿莫西林	120	70**	50*
组合物低剂量组	40	20	20
组合物中剂量组	80	40*	30*
组合物高剂量组	160	70**	60**

注：与模型对照组比较，\*p<0.05；与模型对照组比较，\*\*p<0.01

结果表明，对于有明确感染的模型动物，组合物应该加入 L-精氨酸。

组合物能够显著提高宿主的存活率，为了进一步验证组合物对淋巴细胞的作用，开展了独立的实验，取 ICR 小鼠，分别注射 0.5ml 金黄色葡萄球菌菌液（5×10<sup>9</sup>CFU/ml），其中取 10 只模型小鼠同时腹腔注射 5-甲基四氢叶酸、精氨酸的组合物溶液 20mg/kg，造模 24 小时后，处死小鼠，收集脾脏。脾脏总细胞计数、脾淋巴细胞染色分析（表面染色, B 细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、NK 细胞。

结果见图 20, 结果表明组合物可以防止败血症中 CD4 和 CD8T 细胞的凋亡, 败血症小鼠在造模 24 小时后, 败血症诱导所有类型的免疫效应细胞的凋亡, 组合物阻止了 CD4T, CD8T 细胞以及 B 细胞的凋亡, 但没有阻止 NK 细胞的减少 (n=11)。这是迄今为止尚未报道组合物的作用, 应强烈考虑组合物在脓毒症的治疗前景。

### 实施例 18 组合物体内对革兰氏阴性菌的抑制作用

5-甲基四氢叶酸钙、精氨酸、植物血凝素, 按:2:8:1 比例混合, 经过总混后, 得到配方 C 的组合物。

取 50 只 BAL B/C 雄鼠, 体重 18~22g, 分为 6 组, 每组 8 只, 其中实验组为 2 组, 其余为各种对照组, 分别为组合物低剂量组(40mg/kg)、组合物高剂量组(80mg/kg)、正常组、模型组、青霉素组 (450mg/kg)、美罗培南组(75mg/kg)。绿脓杆菌的菌液在 LB 固体培养基上划线培养后, 挑取典型菌落接种于普通 LB 液体培养基中, 经过 37℃ 过夜振荡培养约 12h 后 4000r/min 离心 3min, 弃去上清液, 生理盐水重悬菌体后待用。将致死剂量的绿脓杆菌菌液按 500 μL/只的剂量腹腔注射各实验组和三个对照组中 BAL B/C 雄鼠。实验组的 BAL B/C 雄鼠感染菌体 30min 后, 组合物中剂量组、组合物高剂量组灌胃给药, 青霉素组和美罗培南组同样灌胃给药, 正常组灌胃纯净水。给药 24h 后, 对各实验组和对照组的 BAL B/C 雄鼠进行二次给药, 给药类型和剂量与第一次给药相同。BAL B/C 雄鼠给药后每 24h 观察一次, 记录存活情况, 第 15 天处死所有动物。

结果表明, 本发明的配方 C 组合物在动物体内能够起到对革兰氏阴性菌的抑制作用, 且毒性小。本发明所述组合物可以使受到致死剂量绿脓杆菌感染的小鼠在 14 天保持 100% 的存活。美罗培南组小鼠在 14 天后存活率 100%, 而青霉素组全部死亡, 模型组也全部死亡。

### 实施例 19 组合物治疗和预防给药对 H1N1 (FM1) 流感病毒感染小鼠的死亡保护作用

#### 1.1 受试样品

组合物颗粒 (5-甲基四氢叶酸钙:精氨酸=1:4), 连云港金康和信药业有限公司

#### 1.2 试验动物

ICR 小鼠, SPF 级, 体重 13~15g, 雌雄各半。由北京维通利华试验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2016-0006, 动物合格证: 1100111911082385。

#### 1.3 接种毒株

购买 FM1 毒株(浓度为 100. TICD<sub>50</sub>)。由本实验室传代, -80℃ 冰箱保存。

## 2 试验方法及结果

### 2.1 剂量设计

试验中受试物均采用 1000 倍 FM1 毒株稀释液进行小鼠滴鼻感染, 组合物分高、中、低三个剂量组。另外, 设置预防给药组, 采用低剂量一次性给药, 设置维生素组与中剂量组进行比较。

### 2.2 菌液准备

取 FM1 毒株 0.2ml, 冻融后用生理盐水进行梯度稀释获得试验所需浓度 (1000 倍量)。

### 3.3 动物感染量确定

将不同浓度的 FM1 病毒液分别滴鼻感染小鼠, 每个浓度组 10 只, 每只 45 μl, 观察感染后 12 天内动物的死亡情况, 选用引起小鼠 80±5% 死亡的病毒液浓度作为正式试验的感染浓度。结果见表 9。

表 9 流感病毒 FM1 致小鼠死亡感染毒液浓度的确定

浓度	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)
250 倍稀释液	10	10	100
500 倍稀释液	10	9	90

1000 倍稀释液	10	8	80
-----------	----	---	----

根据以上结果：正式试验用浓度为 1000 倍 FM1 稀释液，45 μl/只，滴鼻感染。

4.1 动物感染及分组

取 ICR 小鼠 130 只，动物按体重等级随机分为 7 组，分别为正常对照组、模型对照组、组合物高、中、低剂量组、组合物预防组、组合物后期治疗组。取 10 只做为正常对照组外，其余各组 20 只动物按 45ul/只滴鼻感染 H1N1 流感病毒。感染后各给药组灌胃给药，0.1ml/10g。

4.2 治疗给药及预防给药剂量设计

正常对照组：给与等量的生理盐水

模型对照组：给与等量的生理盐水

高剂量组：组合物（5-甲基四氢叶酸钙：精氨酸=1：4）0.346g/kg 体重，给药时间分别为感染后 12h、24h 各给药一次，第二次给药是第一次给药剂量的一半。

中剂量组：组合物（5-甲基四氢叶酸钙：精氨酸=1：4）0.173g/kg 体重，给药时间分别为感染后 12h、24h 各给药一次，第二次给药是第一次给药剂量的一半。

低剂量组：组合物（5-甲基四氢叶酸钙：精氨酸=1：4）0.087g/kg 体重，给药时间分别为感染后 12h、24h 各给药一次，第二次给药是第一次给药剂量的一半。

预防组：预防作用，即造模前 12h 一次性给予低剂量组用量，即组合物（5-甲基四氢叶酸钙：精氨酸=1：4）0.087g/kg 体重。

后期治疗组：组合物（5-甲基四氢叶酸：精氨酸=1：4）0.173g/kg 体重，给药时间分别为感染后 12h、24h 各给药一次，第二次给药是第一次给药剂量的一半。组合物（5-甲基四氢叶酸：精氨酸：维生素 C=3：12：1）0.173g/kg 体重，给药两次时间分别为感染后第 3 天、第 6 天。

观察感染后 14 天内动物的死亡情况，计算死亡率、死亡保护率（对照组死亡率-实验组死亡率）/对照组死亡率。肺指数=肺湿重（g）/体重（g）。结果采用组间比较 X<sup>2</sup> 检验和 t 检验进行统计学处理。结果见下表。

表 10 对初次感染 FM1 流感病毒致小鼠死亡的保护作用

组别	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	保护率 (%)
正常对照组	10	0	0	
模型对照组	20	14	70	-
高剂量组	20	3	15	78.57
中剂量组	20	6	30	57.14
低剂量组	20	8	40	42.86
预防组	20	11	55	21.43
后治疗组	20	2	10	85.71

表 11 对 FM1 流感病毒致小鼠肺部炎症的影响

组别	动物 (只)	肺指数
正常对照组	10	0.54

模型对照组	3	1.20
高剂量组	17	0.86
中剂量组	14	0.95
低剂量组	11	1.10
预防组	8	1.14
后治疗组	18	0.85

#### 5. 组合物对治疗后存活小鼠重复感染的死亡保护作用

在上述实验中，于给药后第 15 天，对于经过上述流感病毒感染或药物干预后存活的小鼠，将继续复感实验，采用同种流感病毒再次感染存活动物 1 次，观察再次感染 7 天内死亡情况，比较不同处理组对流感病毒再次感染的小鼠的死亡率和死亡保护率的影响。复感实验各组不进行药物干预。

表 12 组合物对复感 FM1 流感病毒的小鼠死亡保护作用

组别	复感动物数 (只)	复感死亡数 (只)	复感死亡率 (%)	复感保护率 (%)
正常对照组	10	0	0	-
模型对照组	6	3	50	-
高剂量组	17	0	0	100
中剂量组	14	0	0	100
低剂量组	12	1	8.33	83.34
预防组	9	1	11.11	77.78
后治疗组	18	0	0	100

结果表明组合物高剂量组，在初次感染和重复感染后对动物死亡均有保护作用。预防给药组也有一定的保护作用。提示组合物除了降低流感病毒导致的小鼠死亡率，对动物有较好的治疗和死亡保护作用外，其预防给药也显示出一定的保护作用，能够延长小鼠存活时间。

#### 实施例 20 配方 A 组合物对内毒素引起的发热的抑制作用

配方 A 组合物的配制：5-甲基四氢叶酸钙与维生素 C 按 1: 1 质量比混合，经三维混合总混后，制得配方 A 的组合物。

内毒素配制：根据以往报道，本实验经文献报道，预实验后将内毒素致热量确定为 250ng/ml/kg，实验前用生理盐水配制。

家兔的选择：新西兰兔 35 只，体重 2.0-3.0Kg，每日测肛温 1 次，连续 2 日，使兔适应此测温操作。选择体温范围在 37.5-38.5℃，且体温波动在 0.5℃以内者，用于实验。

每兔均从耳缘静脉注射内毒素，于注射后 1 小时，测肛温，根据体温变化均衡分组，分别为模型组、阳性药组、本发明药物组合物 A 配方大 (40mg/kg)、中(20mg/kg)、小(10mg/kg)剂量组。各个给药组灌胃给药一次，2ml/kg，模型组在同等条件下给予蒸馏水。分别测定给药后 0.5h、1h、1.5h、2h 肛温。实验结果见表 13。

表 13 本发明配方 A 组合物对内毒素致热家兔体温变化的影响 (n=6)

组别	基础体		模后体		给药后体温 (°C) ( $\bar{x} \pm s$ )			
	温	温	温	温	0.5h	1h	1.5h	2h
模型组	37.5 ± 0.2	39.0 ± 0.3	39.0 ± 0.3	39.1 ± 0.4	39.0 ± 0.4	39.1 ± 0.4	39.0 ± 0.4	38.9 ± 0.3
双黄连	37.6 ± 0.3	38.9 ± 0.3	38.6 ± 0.4	38.6 ± 0.4	38.6 ± 0.4	38.6 ± 0.4	38.5 ± 0.4	38.3 ± 0.3
大剂量	37.5 ± 0.3	39.1 ± 0.3	38.6 ± 0.5	38.5 ± 0.4	38.6 ± 0.4	38.5 ± 0.4	38.4 ± 0.4	38.5 ± 0.2
中剂量	37.4 ± 0.2	39.0 ± 0.2	38.7 ± 0.3	38.8 ± 0.4	38.7 ± 0.3	38.8 ± 0.3	38.7 ± 0.3	38.6 ± 0.3
小剂量	37.5 ± 0.3	38.9 ± 0.3	38.7 ± 0.3	38.7 ± 0.4	38.7 ± 0.4	38.7 ± 0.4	38.7 ± 0.4	38.7 ± 0.3

结果显示, 注射内毒素后, 各组家兔体温均明显升高, 用药后, 各组家兔体温均有所下降, 显示组合物具有一定的解热作用。

#### 实施例 21 C 配方体内抗肺炎支原体试验

肺炎支原体国际标准株 (ATCCFH15531), 购自美国菌种保藏中心。

C 配方组合物, 实验室自制, 5-甲基四氢叶酸钙、精氨酸、植物血凝素, 按:2:8:1 比例混合, 经过总混后, 得到配方 C 的组合物。

BALB/C 小鼠 50 只, 雌雄各半, 体重 16-20g, 购自广东省医学实验动物中心。

阳性药组, 阿奇霉素分散片, 哈药集团制药六厂, 批号 160303, 规格, 0.25g/片。

BALB/C 小鼠适应性饲养一周后, 分层随机分为 5 组, 雌雄各半, 分别为正常对照组、模型对照组、阳性药对照组 (40mg/kg)、C 组合物高剂量组(80mg/kg)、C(40mg/kg)组合物低剂量组。除正常对照组外, 其余各组小鼠经乙醚麻醉后, 滴鼻感染浓度为  $10^6$ CCU/ml 的肺炎支原体(MP)菌液 50  $\mu$ L, 连续感染 3 天。之后开始灌胃给药, 每日一次, 连续 10 天。最后一次给药 4h 后, 小鼠眼球取血处死, 取肺脏、脾脏、胸腺称重后进行病理学观察, 另取一小块肺组织, 研磨后使用 PCR 定量检测 MP 的含量。结果如下。

表 14 对小鼠脾指数和胸腺指数的影响

组别	给药剂量 (mg/Kg)	脾指数 (mg/g)	胸腺指数(mg/g)
正常对照组	-	4.445 ± 0.876*	3.212 ± 1.342
模型对照组	-	6.163 ± 2.047	3.253 ± 1.164
阳性药对照组	40	4.515 ± 0.982*	3.818 ± 1.232
C 组合物高剂量组	80	4.297 ± 0.844*	3.273 ± 1.362
C 组合物低剂量组	40	4.684 ± 0.931*	3.311 ± 1.171

注: 与模型对照组比较, \* $p < 0.05$

与模型组比较, 空白对照组小鼠脾脏指数具有显著性差异, 各给药组小鼠脾指数具有显著差异, 提示给药后, 机体内 MP 被杀灭。对免疫器官刺激减轻, 降低脾指数。

小鼠肺脏组织病理学检查, 解剖时可见于正常组相比模型组肺部组织病变明显, 肺部外观充血、水肿, 并且在肺叶分布有不等的坏死灶, 病理学检查可见病变主要在肺内, 主要为间质性肺炎和细支气管肺炎, 支气管有明显的淋巴细胞浸润, 空白组肺组织基本正常; 阿奇霉素对照组可见轻度的间质性肺炎; C 组合物组炎症明显减轻, 细支气管周围可见少许炎性细胞浸润, 间质性肺炎的程度随着剂量的增加而逐渐减轻。结果表明, C 组合物具有控制小鼠肺炎支原体感染的作用, 使肺组织病

变情况减轻。

### 实施例 22 一氧化氮组合物作为免疫佐剂对狂犬病毒疫苗效果的影响

成年昆明小鼠 30 只，体重 20~28g，雌雄各半。自新疆医科大学实验动物中心，狂犬病 rSRV<sub>9</sub> 减毒口服冻干活疫苗（北京中联康生物科技有限公司），一氧化氮组合物 B 配方制备：5-甲基四氢叶酸钙与精氨酸按质量比 1:4 混合，值得 B 配方组合物。将 30 只小鼠雌雄各半分成 3 组，每组 10 只。分别为空白对照组，病毒口服免疫组，B 配方+病毒口服免疫组。分别于试验第 1 天，7 天，14 天口服对应的疫苗，免疫后 0，14，21，35，42，70 天眼眶采血 300 μL/只，静置 1h 后，5000r/min 离心 5min，吸取血清；同步采集小鼠粪便 0.05g 左右，放入 PBS(pH 值约 7.4)500 μL，粉碎形成浑浊液，离心吸取上清，于 -20℃ 冰箱保存，血清 IgG 抗体采用 ELISA 检测试剂盒检测，粪便 IgA 抗体采用小鼠血清狂犬病特异性 IgA 抗体 ELISA 检测试剂盒检测。结果如下表。

表 15 各组小鼠初免后不同时间检测血清抗狂犬病特异性 IgG 水平 (U/ml)

分组	14d	21d	35d	42d	70d
空白对照	73.00±	73.42±	71.13±	79.73±	75.32±
照组	53.26	55.73	52.73	51.72	54.61
B 组合物	198.15±	267.35±	896.14±	1945.76	2693.79
+口服疫苗组	63.82	61.63	83.85	±94.44	±75.23
口服疫苗	105.93±	200.63±	492.53±	1013.83	1893.25
苗组	55.84	61.24	62.12	±59.43	±74.91

结果表明，组合物 B 能够提高血清中 IgG 的抗体水平，口服疫苗与组合物 C 联用后，第 14 天既具有相当程度的抗体，免疫 21 天后，不同组之间抗体差异明显。

表 16 各组小鼠初免后不同时间检测粪便 SIgA 水平(U/ml)

分组	14d	21d	35d	42d	70d
空白对照	1.63±	0.74±	0.22±	0.32±0.08	0.92±0.09
照组	0.01	0.08	0.08		
B 组合物	24.22±	35.22±	42.43±	51.03+1.28	62.01+2.14
+口服疫苗	0.33	0.27	0.35		
苗组					
口服疫苗	20.35±	31.25±	35.35±	43.21±	47.53±
苗组	0.24	0.16	0.44	0.56	0.41

以上结果表明，配方 B 组合物能够，提高疫苗的免疫活性，在配方 B 组合物作为免疫佐剂的协同作用下，rSRV<sub>9</sub> 病毒口服减毒疫苗能够明显提高小鼠体内的抗体表达，具有降低免疫接种次数，提高免疫效果的作用。

### 实施例 23 配方 C 组合物应用在非洲猪瘟的治疗

江苏省动物疫病防控中心送检样品经中国动物卫生与流行病学研究中心确诊了一例非洲猪瘟，阳性样品来源于江苏省连云港赣榆区某养殖户，该户存栏生猪 300 头、发病 130 头、死亡 120 多头。对死亡病猪进行解剖，病理学检查发现：肺出血，间质性肺炎等症状，对脾脏解剖发现，脾脏严重肿大，严重的脾脏肿大 7 倍；胃部解剖发现胃浆膜面弥漫性出血；肾脏肿胀明显，符合非洲猪瘟的症状。

将取该户 3 头发病猪、及 10 头健康猪血液，3000r/min 离心，取血清加有陶珠的 Roche 中，加入 PBS 缓冲液，使用病毒 DNA 试剂盒提取 DNA，检测确定为 ASFV 非洲猪瘟基因 II 型，为 2017 年俄罗斯远东地区和东欧地区播放的病毒属。使用配方 C 组合物介入非洲猪瘟的治疗。

配方 C 组合物注射剂的制备：5-甲基四氢叶酸钙与 L-精氨酸与植物血凝素按按 2:8:1 比例混合，经过总混后，得到配方 C 的组合物。配方 C 组合物经过灭菌处理后，经生理盐水溶解，过微滤膜过滤，活性炭吸附热源，之后制备成注射剂。

对 18 头发病初期的猪进行隔离，相关饲料和废水、粪便进行无害化处理。患病猪体温平均在 40℃，部分病猪出现皮肤充血、紫绀，并且在耳部、腹下出现多处出血点或红点，全部病猪进食不正常，食欲不振。对病猪进行血液检测发现白细胞水平较正常猪下降。

根据以上情况，对 18 头病猪进行配方 C 组合物介入治疗，每头猪每天注射含有配方 C 的注射液，剂量为 50mg/公斤，持续 2 天，期间检测各猪的体温。

结果如下：

表 17 18 头病猪 7 天存活率统计汇总

对象	剂量	死亡例	存活例	动物存活率 (%)
非洲猪瘟患病猪	50mg/公斤	1	17	94.4

结果表明：对非洲猪瘟患病猪具有超乎预期的效果，提示配方 C 组合物具有非常好的抗病毒效果。结果表明 7 天内仅有 1 头猪死亡，之后由于政策要求，所有感染猪进行处死，该养殖户其他染病猪均在发病后 3 至 4 天死亡。

#### 非洲猪瘟死亡病例解剖检测

对病死猪进行解剖，发现病死猪脾脏严重肿大，而且脾脏充血，质地变脆，易碎，肺部出现出血的现象，肺部出血较大规模出血，肺组织观察定性为间质性肺炎；胃部也同样出血，胃浆膜面弥漫性出血；肾脏肿胀明显。

取血液，静置 1h 后，5000r/min 离心 5min，吸取血清。检测 IgG 抗体水平。血液加入 Krebs-HEPES 缓冲液，维持在 37℃，静置 30 分钟，加入 L-NAME (100 μM)，使用电化学方法检测超氧化物，亚硝酸盐及 NO 的含量。

对治愈猪进行处死解剖进行病理学观察，发现治愈猪除了脾脏略微大之外，肺部局部有出血现象。取血液，静置 1h 后，5000r/min 离心 5min，吸取血清。检测 IgG 抗体水平。血液加入 Krebs-HEPES 缓冲液，维持在 37℃，静置 30 分钟，加入 L-NAME (100 μM)，使用光化学方法检测亚硝酸盐及 NO 的含量。

结果如下：

表 18 病死组及治愈猪的生化指标

分组	IgG(U/ml)	亚硝酸盐 (RLU/ml)	NO (RLU/ml)
病死组	1173.00	8.5	61.1
治愈猪	2198.15	1.3	54.7

结果显示，治愈猪体内存在大量的抗体，提升组合物 C 能够提高猪的免疫系统水平，起到抗病毒的效果。

并且还发现了病死猪的 NO 水平也并不低，但是其中的活性氮水平大大提高，这提示我们由病毒引起的急性症状及死亡与活性氮的水平有关，高强度的免疫系统反而加剧了个体死亡，这个在病毒的治疗过程中是常见的。对于某些病毒，免疫基因敲除小鼠的存活时间反而大大超过正常小鼠。因此我们推测非洲猪瘟的死亡与免疫系统过度反应有关，通过比较发现病死猪血液中 RNS/NO 的比值是治愈猪血液 RNS/NO 比值的 3 倍之多。

提示，本发明组合物能够通过降低 RNS，而减少恶性病毒由于免疫过度表达而导致的死亡，并且维持免疫系统正常运作，达到清除病毒的目的。本发明组合物的实施效果大大超乎预期。

#### 实施例 24 组合物对家猪免疫细胞的影响

取 3 只普通家猪，猪龄约 3 个月，体重 25kg 左右，分别给予含有 5-甲基四氢叶酸的组合物，组合物的制备过程如下，5-甲基四氢叶酸钙与 L-精氨酸与植物血凝素按 1:4:0.1 比例混合，得到药物组合物。服用组合物前取耳血，测血常规。之后每日按猪体重每公斤 30mg 口服组合物，分别在第一周，第二周取耳血，测血常规。血常规检测主要指标 LYMP（淋巴细胞）、NEUP（中性粒细胞）。

血常规检测指标如下：

天数	D1		D9		D16	
猪血常规检测	LYMP	NEUP	LYMP	NEUP	LYMP	NEUP
W1	68.7	24.2	70.1	21.8	70.7	23.2
W2	49.0	46.7	69.5	22.2	66.3	20.9
W3	37.8	57.6	53.9	39.6	62.1	29.8

免疫指数 LYMP/NEUP 较高的病人感染病毒症状会比较轻。在[Zhang B, Zhou X, Qiu Y, et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19[J]. MedRxiv, 2020.]文章中对新冠肺炎患者的临床分析，死亡的患者基本都是淋巴细胞/中性粒细胞的比值较低。在图 21 中，表明了组合物具有提高 LYMP/NEUP 比值，能够限制感染病毒的症状的严重程度。一定程度说明组合物对病毒具有预防作用。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

### 权利要求

1. 一种用于预防和治疗猪瘟的药物组合物，其包括 NO 减毒剂和 NO 增量剂，所述 NO 减毒剂选自 5-甲基四氢叶酸或其盐，去氢抗坏血酸，NMN 中的一种或者几种，所述 NO 增量剂选自精氨酸、瓜氨酸或精氨酸维生素中的一种或几种。
2. 根据权利要求 1 的组合物，其包括 5-甲基四氢叶酸和精氨酸。
3. 根据权利要求 2 的组合物，其还包括植物血凝素。
4. 根据权利要求 3 的组合物，5-甲基四氢叶酸：精氨酸：植物血凝素的质量比为 2:8:1。
5. 根据权利要求 1 的组合物，所述猪瘟为非洲猪瘟。
6. 根据权利要求 1 的组合物，所述组合物能够提高病毒感染宿主的 T 细胞水平，特别是 CD4 以及 CD8T 细胞，降低炎症因子的表达，抗病毒感染。
7. 根据权利要求 1 或权利要求 4 的组合物，所述组合物单剂量的活性成分为至少 30mg/公斤，例如 50mg/公斤。
8. 权利要求 1-7 任一项的组合物在制备预防或治疗猪瘟的药物组合物中的用途。

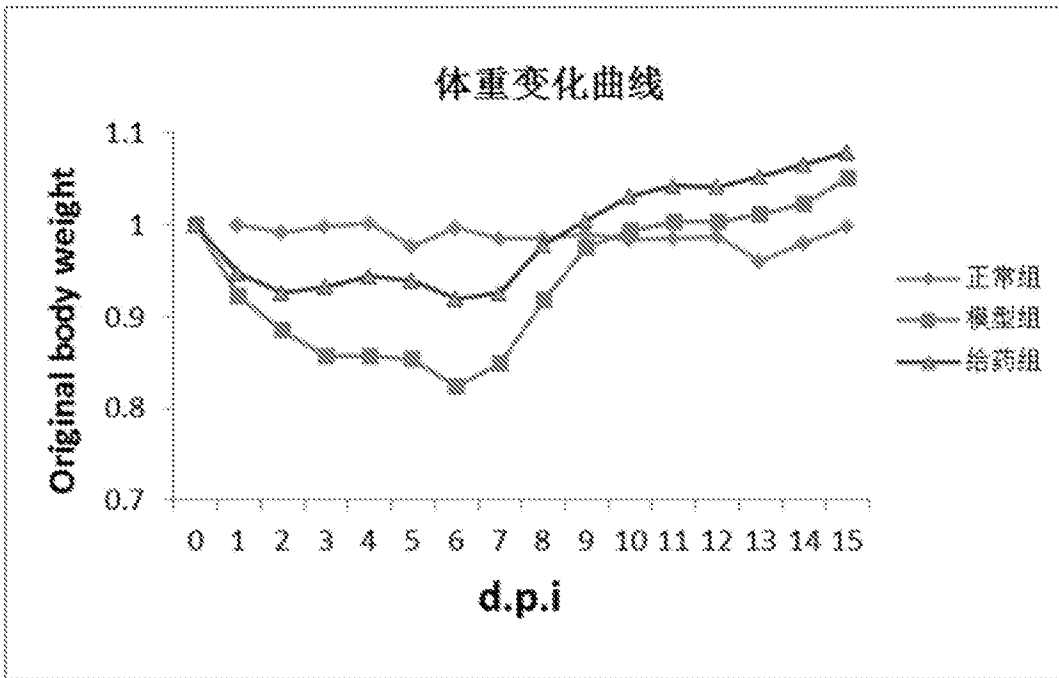


图 1

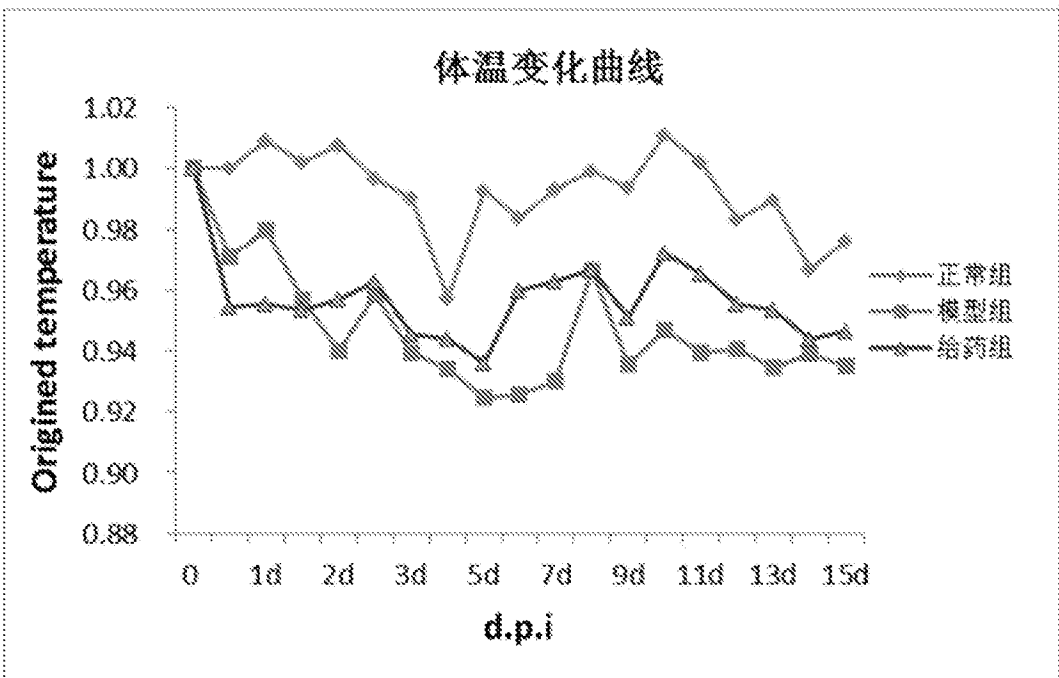


图 2

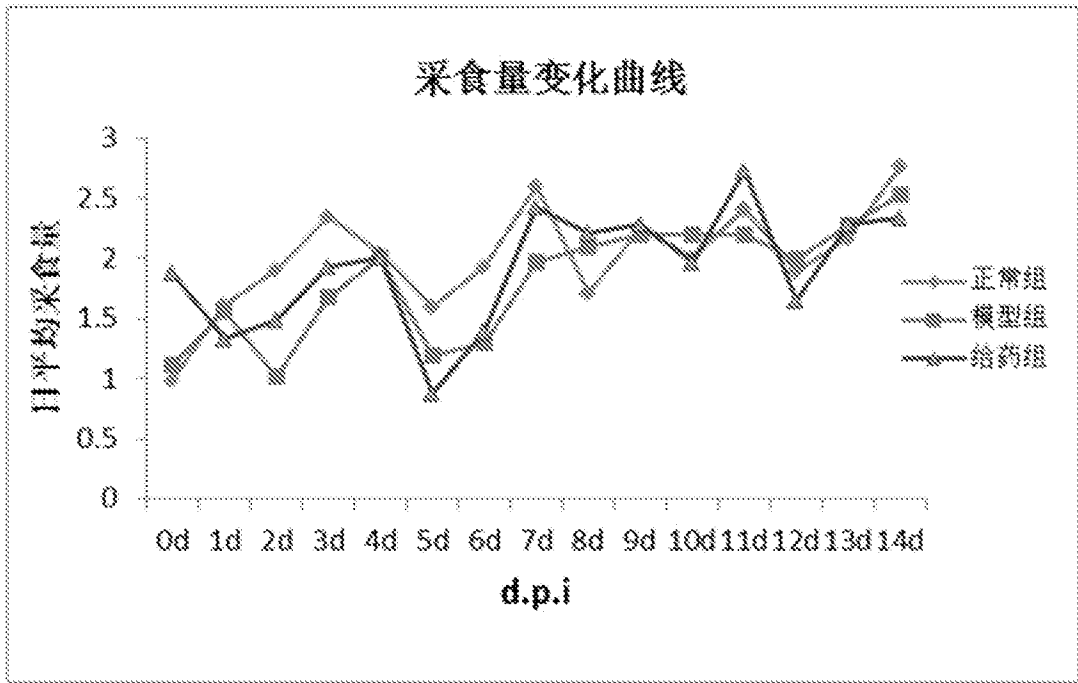


图 3

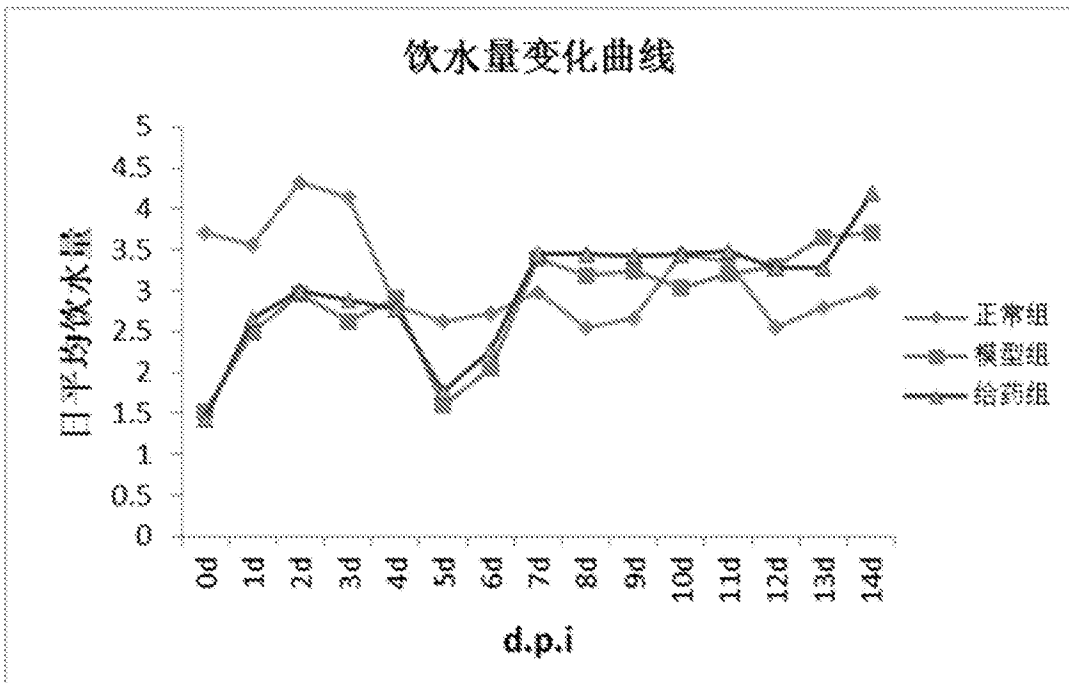


图 4

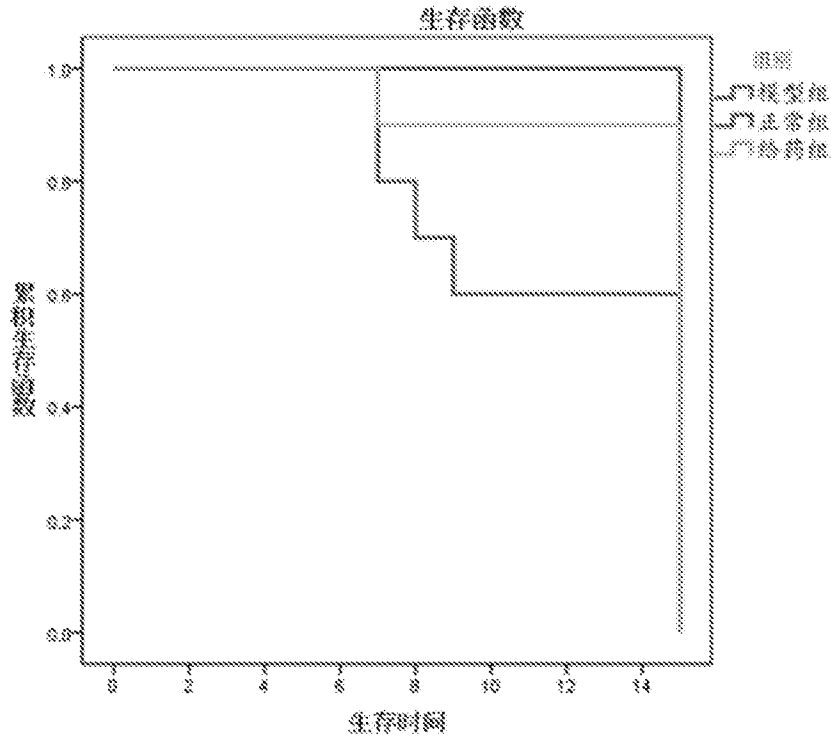


图 5

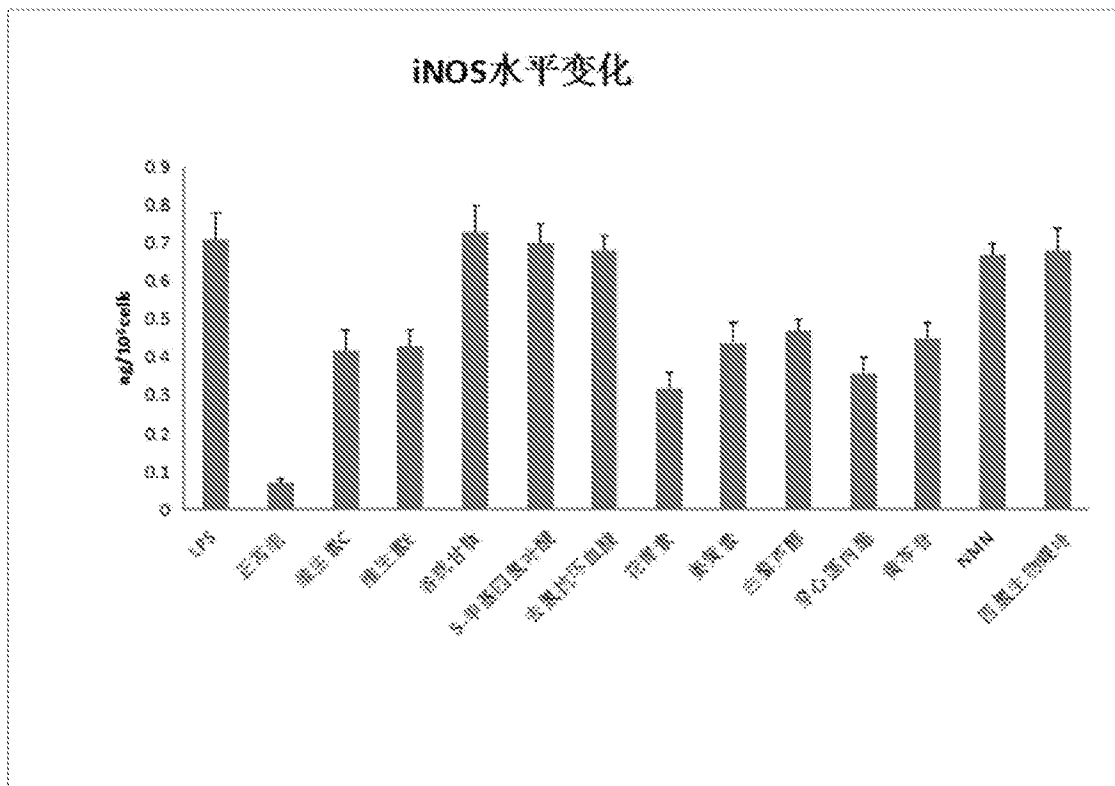


图 6

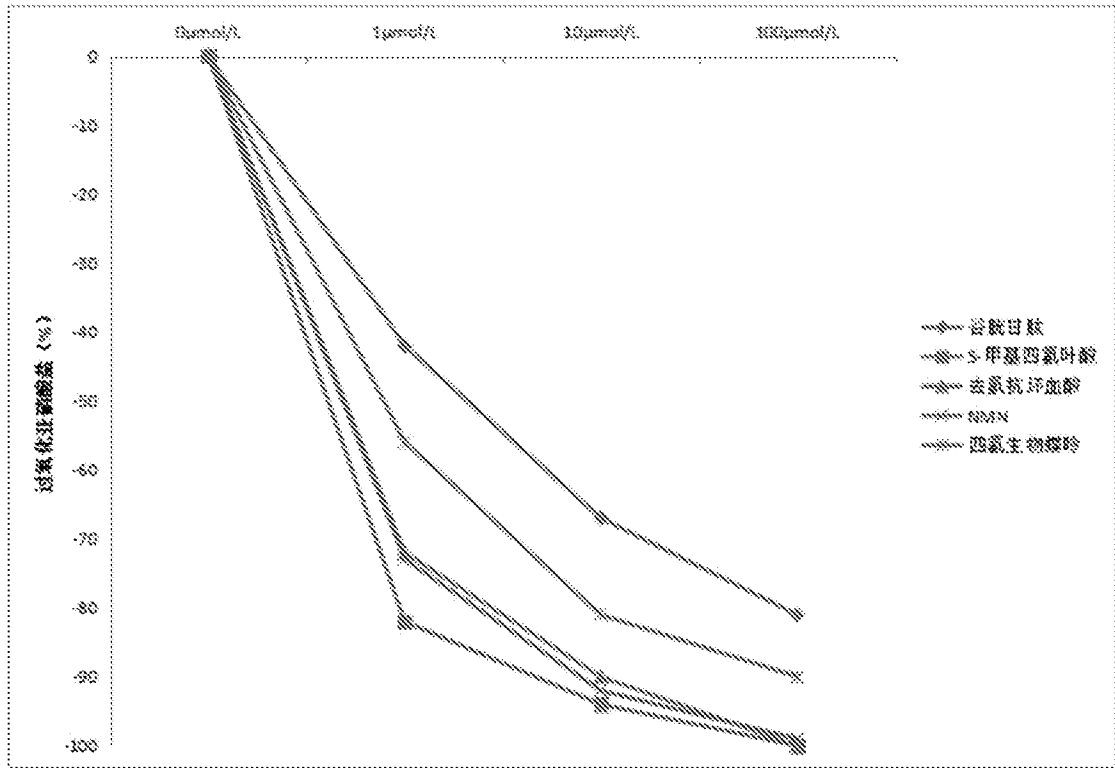


图 7

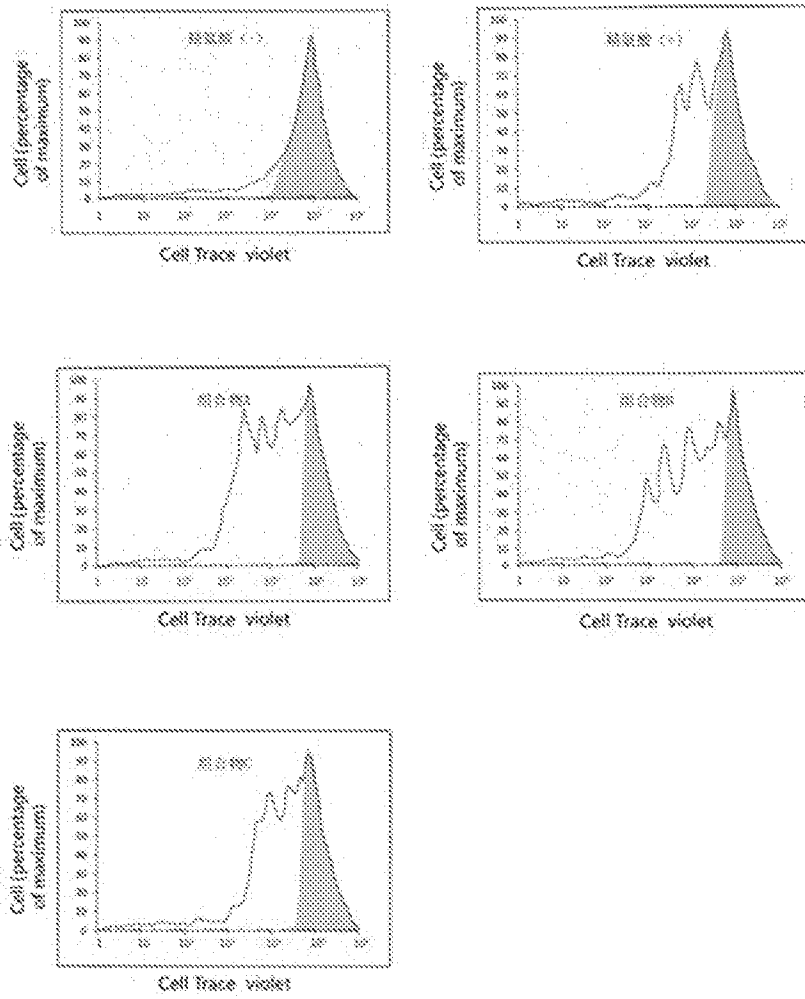


图 8

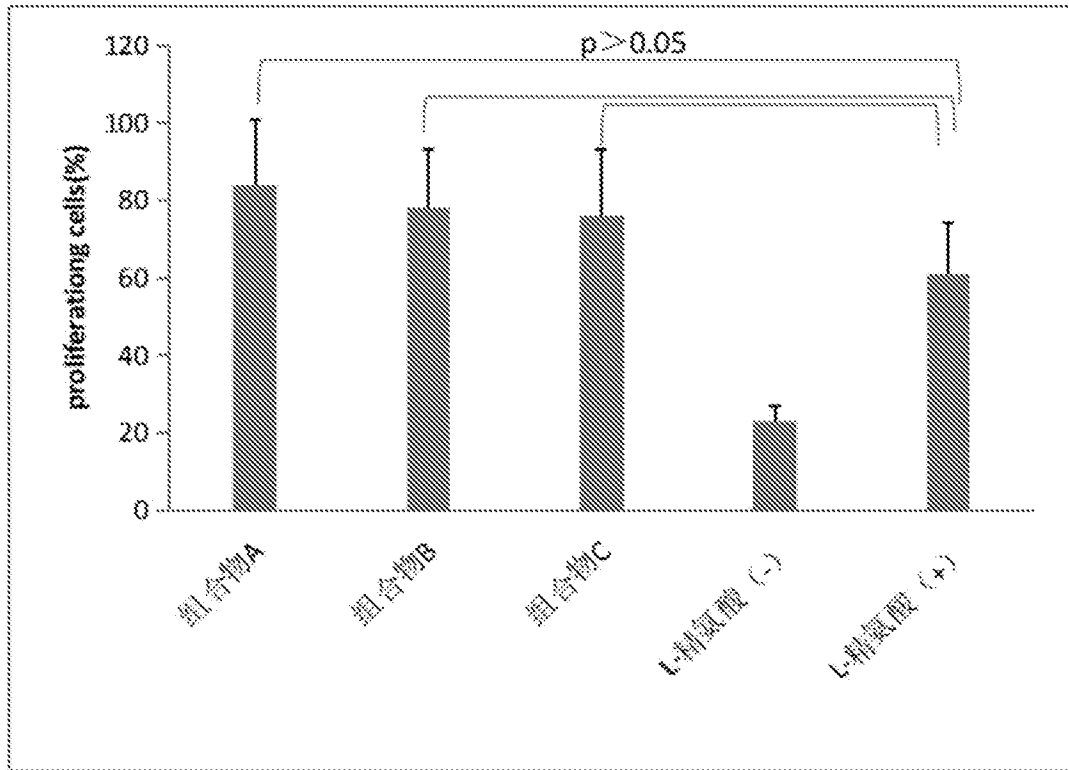


图 9

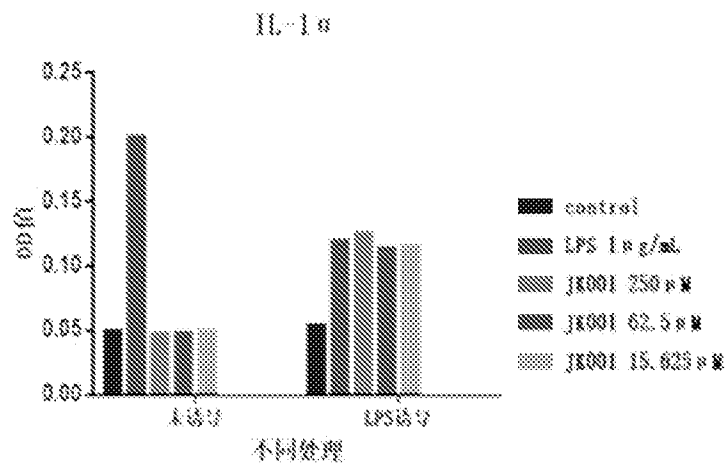


图 10

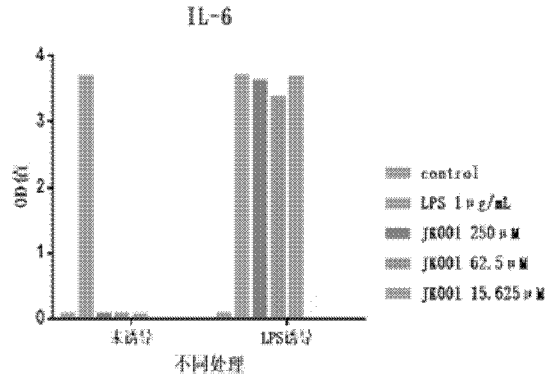


图 11

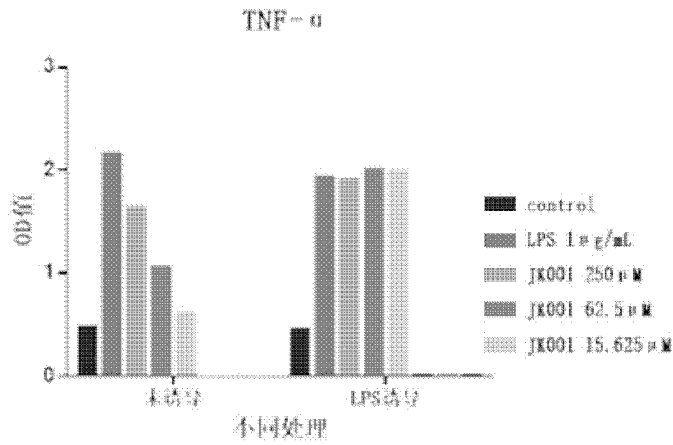


图 12

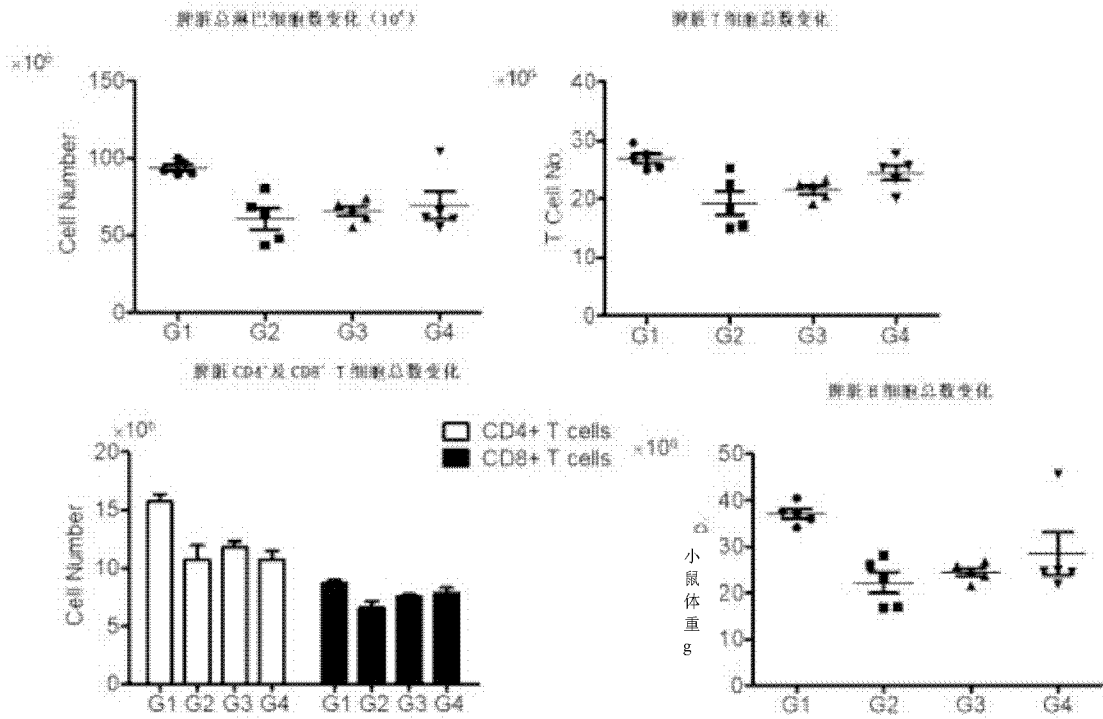


图 13

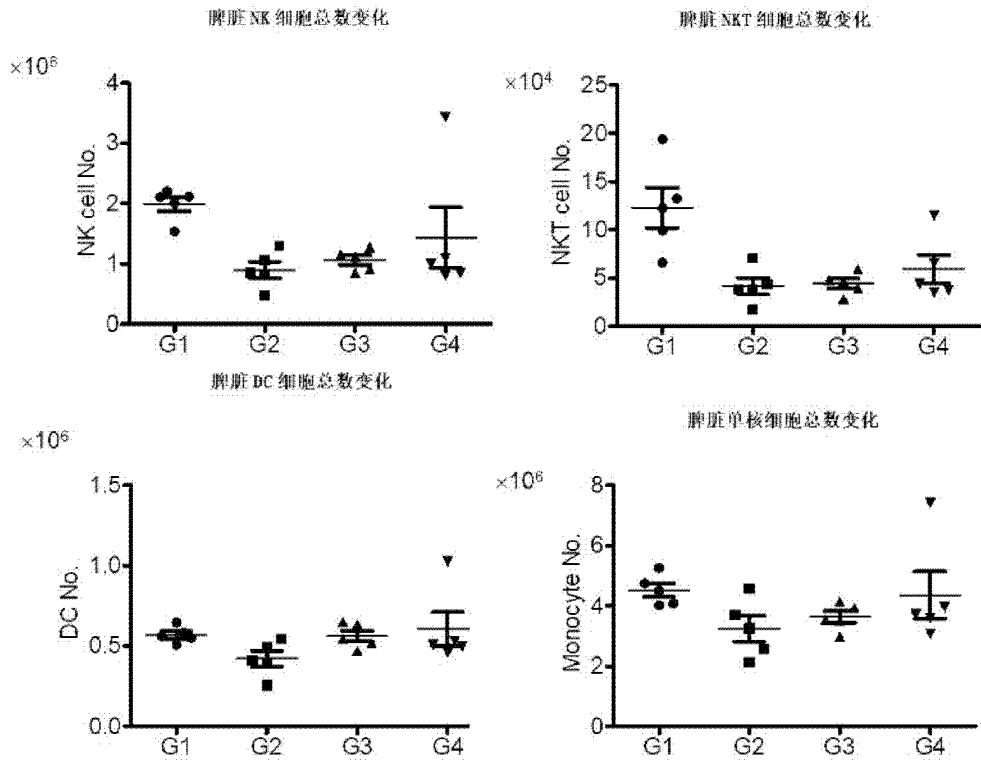


图 14

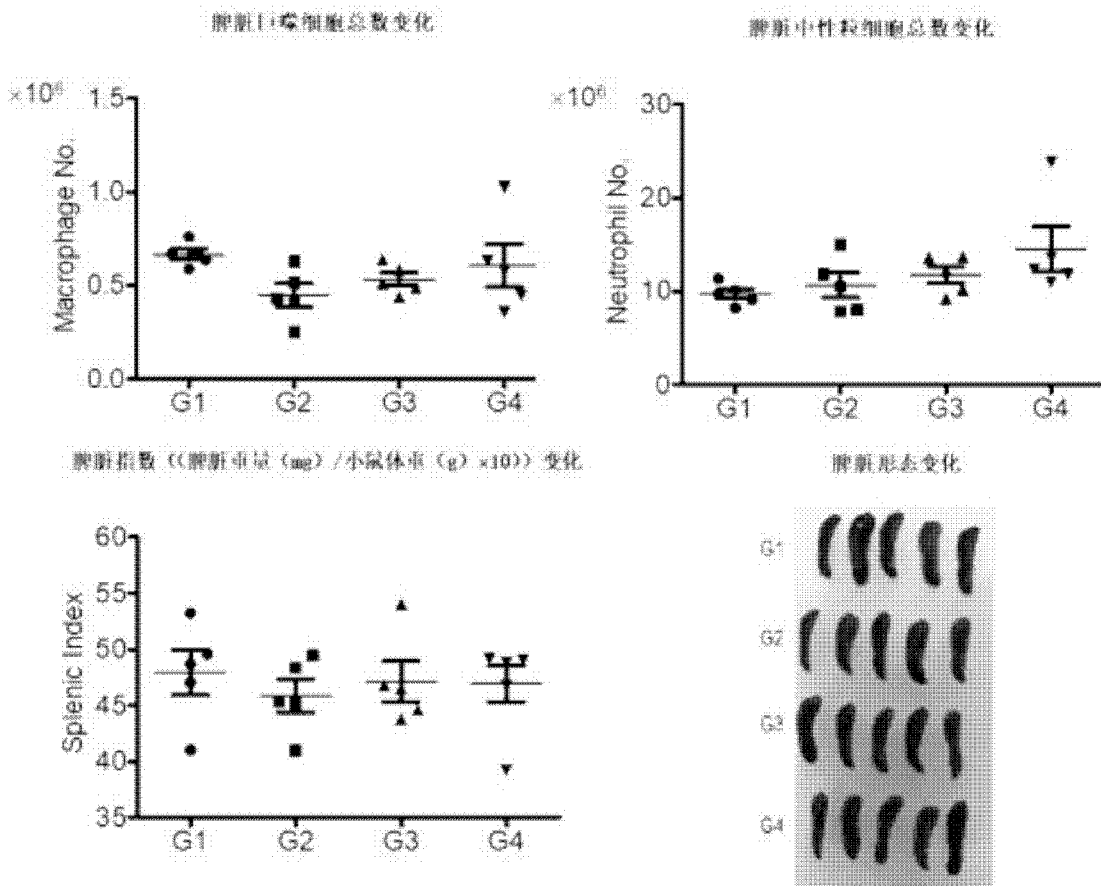


图 15

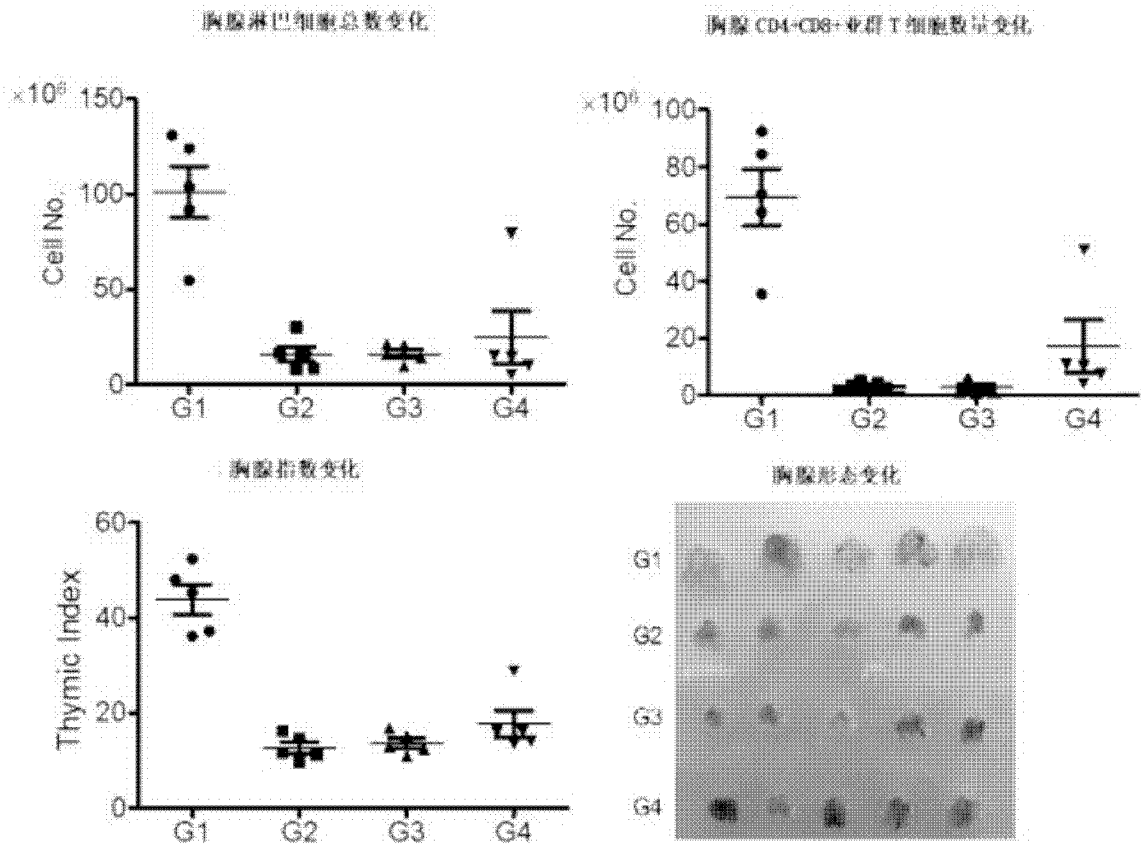


图 16

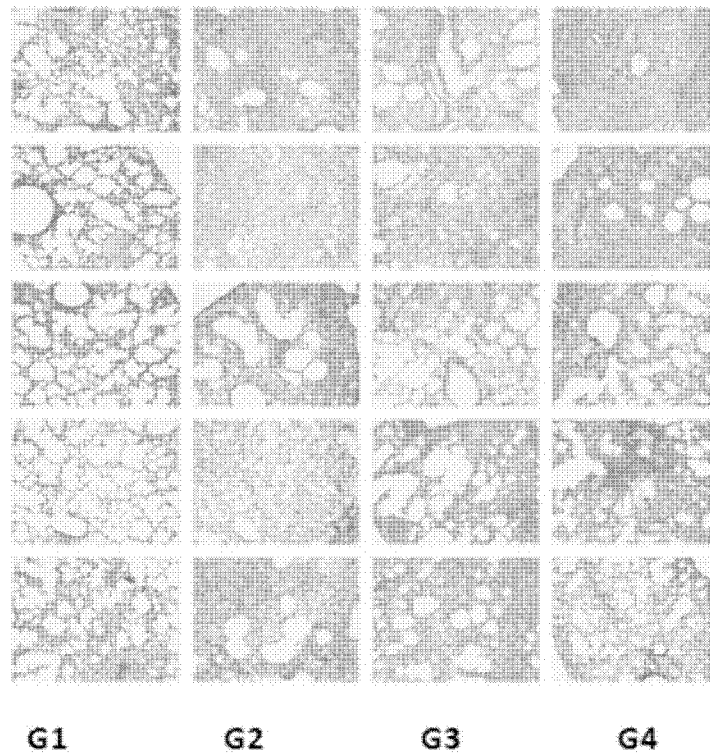


图 17

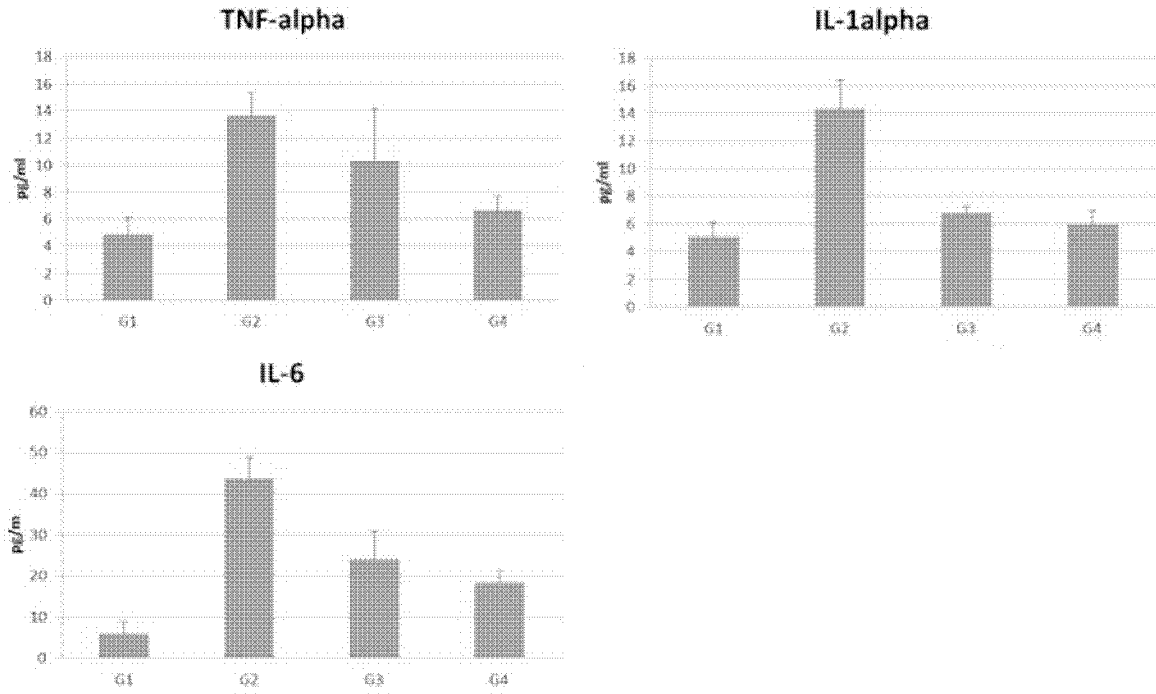


图 18

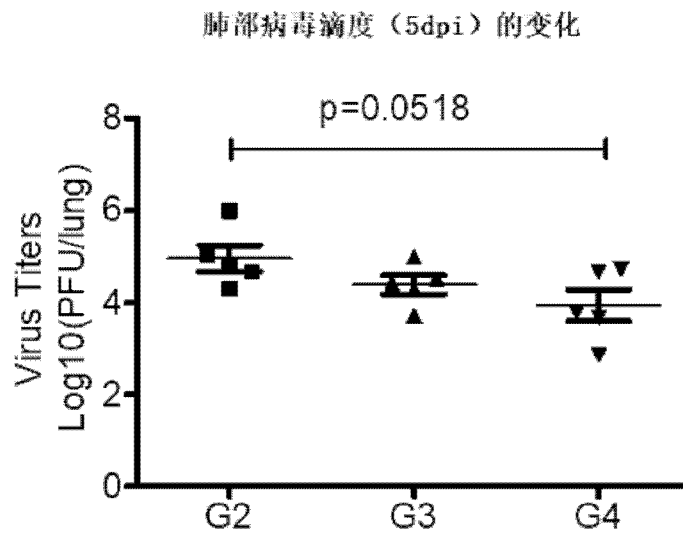


图 19

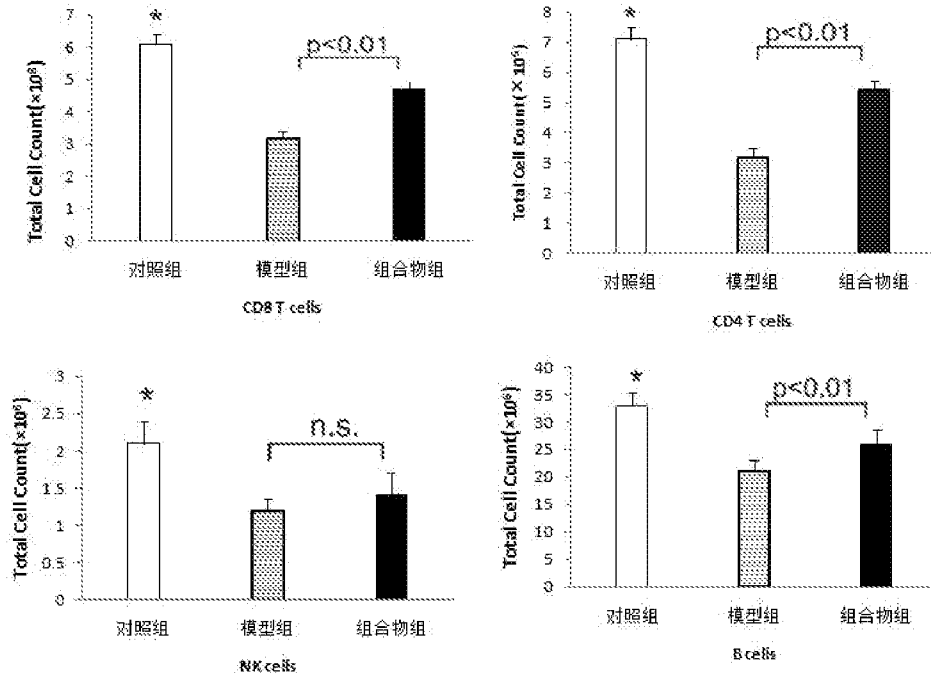


图 20

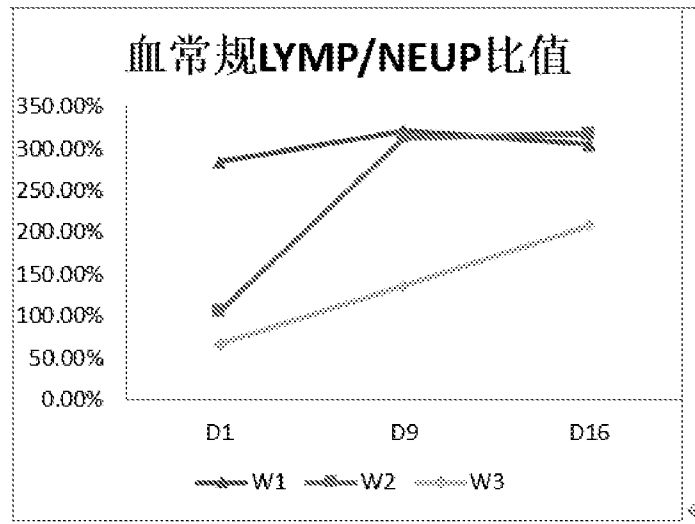


图 21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/107411

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 31/164(2006.01)i; A61K 38/01(2006.01)i; A61K 31/375(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED; DWPI; TWABS; MOABS; TWMED; HKABS; CNABS; Pubmed; ISI web of science, CNKI: NO减毒剂, 叶酸, 去氢抗坏血酸, 维生素C, VC, NMN, NO增量剂, 精氨酸, 瓜氨酸, 精氨酸生素, CD4, CD8, 猪瘟, NO attenuation agent, folic acid, dehydroascorbic acid, vitamin C, NO bulking agent, arginine, citrulline, argininogen, swine fever

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109350623 A (HOBBOOMLIFE TECHNOLOGY (SHENZHEN) CO., LTD.) 19 February 2019 (2019-02-19) claims 1-10, and embodiment 1	1, 5-7
X	CN 1106296 A (SANDOZ NUTRITION LTD.) 09 August 1995 (1995-08-09) claims 1-12, description, embodiments 1-2	1-2, 5-7
Y	CN 1106296 A (SANDOZ NUTRITION LTD.) 09 August 1995 (1995-08-09) claims 1-12, description, embodiments 1-2	1-7
Y	刘娟等 (LIU, Juan et al.). "瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展 (Progress on Pharmacological Activities and Production Methods of Citrulline)" 《药实践杂志》 (《Journal of Pharmaceutical Practice》), Vol. 29, No. 3, 25 May 2011 (2011-05-25), ISSN: 1006-0111, page 173, right-hand column, paragraph 1 to page 174, left-hand column, paragraph 2	1-7
Y	CN 108865995 A (SHENZHEN TOPBIOTECH CO., LTD.) 23 November 2018 (2018-11-23) description, paragraphs [0019]-[0029]	3-4, 7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2020

Date of mailing of the international search report

10 November 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	translated by GAO, Feng. "影响猪瘟流行地区疫苗成功接种的关键因素 (Factors Critical for Successful Vaccination Against Classical Swine Fever in Endemic Areas)" 《国外畜牧学 (猪与禽)》 (Animal Science Abroad(Pigs and Poultry)), Vol. 29, No. 1, 25 January 2009 (2009-01-25), page 8, right-hand column, paragraph 2 to page 9, right-hand column, paragraph 2	1-8
A	WO 2017123418 A1 (SYNLOGIC, INC.) 20 July 2017 (2017-07-20) abstract, and claims 1-75	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/107411**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109350623	A	19 February 2019	None			
CN	1106296	A	09 August 1995	CZ	9402156	A3	12 April 1995
				JPH	07149664	A	13 June 1995
				CA	2131512	A1	09 March 1995
				HUT	67889	A	29 May 1995
				EP	0641562	A1	08 March 1995
				AU	7167394	A	23 March 1995
				SK	106594	A3	14 September 1995
CN	108865995	A	23 November 2018	None			
WO	2017123418	A1	20 July 2017	US	2019010506	A1	10 January 2019
				EP	3402497	A1	21 November 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/107411

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 31/164(2006.01)i; A61K 38/01(2006.01)i; A61K 31/375(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNMED;DWPI;TWABS;MOABS;TWMED;HKABS;CNABS;Pubmed;ISI web of science,CNKI: NO减毒剂, 叶酸, 去氢抗坏血酸, 维生素C, VC, NMN, NO增量剂, 精氨酸, 瓜氨酸, 精氨酸生素, CD4, CD8, 猪瘟, NO attenuation agent, folic acid, dehydroascorbic acid, vitamin C, NO bulking agent, arginine, citrulline, argininogen, swine fever</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 109350623 A (博元生命科技深圳有限公司) 2019年 2月 19日 (2019 - 02 - 19) 权利要求1-10, 实施例1</td> <td>1, 5-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1106296 A (山道士营养有限公司) 1995年 8月 9日 (1995 - 08 - 09) 权利要求1-12, 说明书实施例1-2</td> <td>1-2, 5-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1106296 A (山道士营养有限公司) 1995年 8月 9日 (1995 - 08 - 09) 权利要求1-12, 说明书实施例1-2</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>刘娟等. “瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展” 《药学实践杂志》, 第29卷, 第3期, 2011年 5月 25日 (2011 - 05 - 25), ISSN: 1006-0111, 第173页右栏第1段至174页左栏第2段</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108865995 A (深圳市拓普生物科技有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 说明书第[0019]-[0029]段</td> <td>3-4, 7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>高枫译. “影响猪瘟流行地区疫苗成功接种的关键因素” 《国外畜牧学(猪与禽)》, 第29卷, 第1期, 2009年 1月 25日 (2009 - 01 - 25), 第8页右栏第2段至第9页右栏第2段;</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 109350623 A (博元生命科技深圳有限公司) 2019年 2月 19日 (2019 - 02 - 19) 权利要求1-10, 实施例1	1, 5-7	X	CN 1106296 A (山道士营养有限公司) 1995年 8月 9日 (1995 - 08 - 09) 权利要求1-12, 说明书实施例1-2	1-2, 5-7	Y	CN 1106296 A (山道士营养有限公司) 1995年 8月 9日 (1995 - 08 - 09) 权利要求1-12, 说明书实施例1-2	1-7	Y	刘娟等. “瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展” 《药学实践杂志》, 第29卷, 第3期, 2011年 5月 25日 (2011 - 05 - 25), ISSN: 1006-0111, 第173页右栏第1段至174页左栏第2段	1-7	Y	CN 108865995 A (深圳市拓普生物科技有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 说明书第[0019]-[0029]段	3-4, 7	A	高枫译. “影响猪瘟流行地区疫苗成功接种的关键因素” 《国外畜牧学(猪与禽)》, 第29卷, 第1期, 2009年 1月 25日 (2009 - 01 - 25), 第8页右栏第2段至第9页右栏第2段;	1-8
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 109350623 A (博元生命科技深圳有限公司) 2019年 2月 19日 (2019 - 02 - 19) 权利要求1-10, 实施例1	1, 5-7																					
X	CN 1106296 A (山道士营养有限公司) 1995年 8月 9日 (1995 - 08 - 09) 权利要求1-12, 说明书实施例1-2	1-2, 5-7																					
Y	CN 1106296 A (山道士营养有限公司) 1995年 8月 9日 (1995 - 08 - 09) 权利要求1-12, 说明书实施例1-2	1-7																					
Y	刘娟等. “瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展” 《药学实践杂志》, 第29卷, 第3期, 2011年 5月 25日 (2011 - 05 - 25), ISSN: 1006-0111, 第173页右栏第1段至174页左栏第2段	1-7																					
Y	CN 108865995 A (深圳市拓普生物科技有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 说明书第[0019]-[0029]段	3-4, 7																					
A	高枫译. “影响猪瘟流行地区疫苗成功接种的关键因素” 《国外畜牧学(猪与禽)》, 第29卷, 第1期, 2009年 1月 25日 (2009 - 01 - 25), 第8页右栏第2段至第9页右栏第2段;	1-8																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 10月 12日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 11月 10日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>陈卫星</p> <p>电话号码 53961864</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2017123418 A1 (SYNLOGIC, INC.) 2017年 7月 20日 (2017 - 07 - 20) 说明书摘要, 权利要求1-75	1-8

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/107411

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109350623	A	2019年 2月 19日	无			
CN	1106296	A	1995年 8月 9日	CZ	9402156	A3	1995年 4月 12日
				JPH	07149664	A	1995年 6月 13日
				CA	2131512	A1	1995年 3月 9日
				HUT	67889	A	1995年 5月 29日
				EP	0641562	A1	1995年 3月 8日
				AU	7167394	A	1995年 3月 23日
				SK	106594	A3	1995年 9月 14日
CN	108865995	A	2018年 11月 23日	无			
WO	2017123418	A1	2017年 7月 20日	US	2019010506	A1	2019年 1月 10日
				EP	3402497	A1	2018年 11月 21日