



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102014941 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200980114017. 7

(22) 申请日 2009. 02. 27

(30) 优先权数据

61/064, 354 2008. 02. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 10. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/000379 2009. 02. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/106975 EN 2009. 09. 03

(73) 专利权人 阿费克萨生命科学公司

地址 加拿大埃德蒙顿

(72) 发明人 达里尔·J·亚当科

肯尼斯·L·罗森塔尔 雅克利娜·尚

吴英琪 沙尔拉·萨瑟兰

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 顾晋伟 韩宏星

(51) Int. Cl.

A61K 31/715(2006. 01)

A61K 36/25(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1285752 A, 2001. 02. 28,

审查员 董海鹏

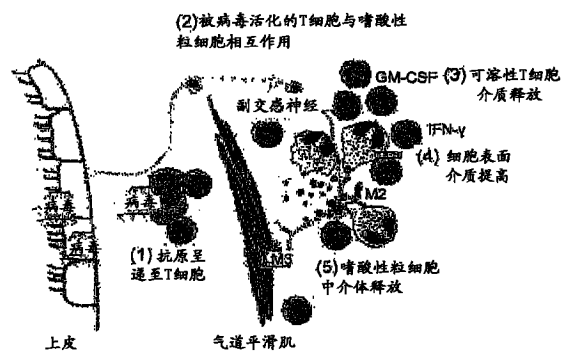
权利要求书1页 说明书17页 附图20页

(54) 发明名称

人参提取物对固有及适应性免疫应答的激活

(57) 摘要

本发明涉及人参级分以及用于激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善受试者中病症的方法,所述方法通过向该受试者施用有效量的人参级分、含有该级分与另一药物或与一种或多种可药用载体之组合的药物组合物或含有该级分的食品来实现。所述级分可从西洋参(Panaxquinquefolius)中制备,或者可选自CVT-E002、PQ₂、PQ₂₂₃以及来自CVT-E002、PQ₂和PQ₂₂₃的纯化级分。



1. 西洋参 (*Panax quinquefolius*) 级分用于制备在患有以呼吸道高反应性为特征之病症的受试者中预防、治疗或改善呼吸道高反应性的药物的用途, 其中所述级分从西洋参根部的可溶性提取物中制备, 并且所述级分与 CVT-E002 具有化学和药理学一致性。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述级分为 CVT-E002。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述病症为哮喘。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述病症为变态反应。

5. 根据权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述级分调节来自 Toll 样受体的信号转导。

6. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 2。

7. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 2 与 Toll 样受体 6 的异二聚体。

8. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 2 与 Toll 样受体 1 的异二聚体。

9. 根据权利要求 5 的用途, 其中所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 4。

人参提取物对固有及适应性免疫应答的激活

技术领域

[0001] 本发明涉及人参级分以及激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善受试者中病症的方法,所述方法通过向该受试者施用有效量的人参级分、包含该级分的药物组合物或食品来实现。所述病症包括变态反应、哮喘、病毒及微生物感染,以及癌症。所述人参级分可用作疫苗佐剂。

背景技术

[0002] CVT-E002 是一种从西洋参 (North American ginseng, *Panaxquinquefolium*) 根部提取的水溶性专利提取物,其商品名为 COLD-FX™。该提取物的多糖和人参皂苷含量不同于其它人参或西洋参产品,主要由呋喃-吡喃型聚糖 (poly-furanosyl-pyranosyl-saccharides) 构成。产品各批次之间的质量由 ChemBioPrint™ 技术保证,该技术确保其化学和药理学一致性。已知该专利天然提取物具有免疫调节效应 (Wang 等 2001、2004)。CVT-E002 增强小鼠脾细胞的增殖,并在体外提高腹膜巨噬细胞中白细胞介素-1 (IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和一氧化氮 (NO) 的产生。向小鼠施用 CVT-E002 可提高血清免疫球蛋白 G (IgG) 抗体水平 (Wang 等 2001),并且向患有病毒诱发白血病的小鼠每日施用 CVT-E002 能够提高骨髓和脾中巨噬细胞和 NK 细胞的比例,同时减少白血病细胞数 (Miller 2006)。在近期一项关于用活流感病毒培养人外周血单个核细胞 (PBMC) 的研究中, CVT-E002 有效增强了 IL-2 和干扰素 γ (IFN γ) 产生 (Jing 等, 已提交)。IL-2 和 IFN γ 是重要的 T 细胞及 NK 细胞的细胞因子,与病毒特异性的适应性免疫应答有关。在一项临床研究中,每日以低剂量向健康成年人补充 COLD-FX™ 可提高血浆中 NK 细胞的比例 (Preedy 等 2006)。

[0003] 作为抵抗微生物病原体的第一道防线,巨噬细胞和 NK 细胞都是固有免疫的重要成员。这些细胞通过释放抗微生物物质 (如细胞因子、干扰素和趋化因子) 和通过其吞噬或溶胞活性迅速发挥作用,以限制感染原的增殖和扩散。

[0004] 由于临床前研究提出了 CVT-E002 用于预防病毒相关的上呼吸道感染的潜在用途,因此实施了涉及 198 个机构养老老人的临床试验。该研究表明,在流行性感冒多发季中每日施用 CVT-E002 (4 个月) 可使因流感病毒和呼吸道合胞体病毒所致急性呼吸系统疾病的相对风险降低高达 89% (McElhaney 等 2004)。另一项研究也表明, CVT-E002 显著减少了 323 个健康成年人中呼吸道感染的复发 (Preedy 等 2005)。CVT-E002 处理还降低了健康成年人上呼吸道感染相关症状的严重程度和持续时间。在一项对 43 位 65 岁以上社区老人进行的随机双盲安慰剂对照试验中,每日摄入 CVT-E002 将呼吸道症状的相对风险和持续时间分别降低了 48% 和 55%。每日施用 CVT-E002 已被证明是在健康老年人中预防急性呼吸系统疾病的安全、天然的治疗手段。

[0005] 哺乳动物免疫系统已进化出多样的、多层次的和交互式的防御系统来抵抗感染,其大致分为固有免疫和适应性免疫。固有免疫是机体抵抗微生物病原体的第一道防线,并且几乎即时发挥作用,通过激活吞噬细胞和抗原呈递细胞 (如树突细胞和巨噬细胞) 来限制感染原的早期增殖和扩散,并通过释放多种细胞因子、趋化因子和抗微生物因子 (如干

扰素和防御素)启动炎性应答。固有免疫在进化上更为古老,多年来免疫学家们因其相对非特异性而大大忽视了对固有免疫的研究。大部分情况下,人类通过固有免疫系统抵抗感染。如果感染性生物穿透固有免疫的防御,则固有防御会促进并引导适应性免疫应答的产生,所述适应性免疫应答针对入侵病原体特异表达的高特异性决定簇。这些应答依赖于B细胞和T细胞中特异性抗原-受体基因的重排,结果产生高亲和力的抗原特异性抗体(体液免疫)和T细胞或细胞介导的免疫。抗体促进胞外病原体及其毒素的清除、破坏或中和。T细胞介导的免疫应答有助于消除或控制胞内病原体。与固有免疫应答不同,适应性免疫应答具有特异性免疫记忆的特点。

[0006] 前期研究试图明确宿主固有免疫系统如何发现感染以及如何区分自身和病原体或感染性外来物(infectious non-self)。Toll样受体(TLR)的发现和表征提供了对固有免疫识别的更深了解,并确定了固有免疫系统在宿主感染防御中的关键作用(Akira等2006, Hargreaves和Medzhitov2005, Kawai和Akira 2006, Philpott和Girardin 2004, Seth等2006)。TLR是固有免疫和适应性免疫中的关键分子。固有免疫系统利用多个家族的种系编码的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来检测感染并引发一系列抗微生物防御机制(Janeway和Medzhitov 1998)。在从植物和果蝇到哺乳动物的物种中,这些PRP在进化上高度保守。固有免疫识别策略是基于识别存在于多种微生物中但不存在于宿主细胞中的高度保守且必要的结构(Janeway 1992, Janeway和Medzhitov 1999)。由于固有免疫识别的靶标为保守的分子模式,因此称之为病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)。PAMP具有使其成为固有免疫感知的理想靶标的重要特征。PAMP仅由微生物产生而宿主细胞不产生。这是区分自身和感染性外来物的基础。PAMP在给定的微生物类别中保守,使得数量有限的PRR能够检测众多种类入侵病原体的存在。例如,LPS模式使得单个PRR能检测任何革兰氏阴性菌的存在。PAMP对微生物存活来说是必需的,PAMP的任何突变或缺失对生物体将是致死的或极大降低其适应合宜性(adaptive fitness)。这些对固有免疫识别的新了解对于免疫防御、发病机理以及感染性疾病的治疗和预防的认识来说是革命性的。

[0007] TLR代表了一个进化上保守的跨膜受体PRR家族,该家族识别PAMP并作为其信号传导的受体。TLR发现于果蝇(Drosophila)中,在果蝇的腹部/背部极化发育中发挥作用(Stein等1991)。当该基因发生突变时,发育而成的果蝇呈现“toll”状,toll是德国俚语,意为疯狂的或“狂热的”。此外,还发现具有Toll突变的果蝇对真菌感染高度敏感(Lemaitre等1996)。迄今,已在哺乳动物中鉴定出11种TLR,它们各自感知不同的微生物刺激组,并激活不同的信号途径和转录因子以驱动针对该病原体的特异性应答(Kawai和Akira 2005)。TLR是I型膜整合糖蛋白,其特征为这样的胞外结构域,其包含跨膜区、与白细胞介素-1受体(IL-1R)同源的胞质信号结构域(称为Toll/IL-1R同源(TIR)结构域(O'Neill2006))以及不同数目的富亮氨酸重复(leucine-rich-repeat, LRR)基序。LRR结构域由19-25个串联LRR基序组成,各自长度为24-29个氨基酸。

[0008] TLR4是第一种被发现的哺乳动物TLR,已证实为长期以来所寻找的革兰氏阴性菌脂多糖(LPS)受体(Medzhitov等1997, Poltorak等1998)。除革兰氏阳性菌和支原体的脂蛋白和脂肽外,TLR2还识别肽聚糖(Takeda等2003, Takeuchi等1999)。TLR2能够与TLR1或TLR6形成异二聚体,以分别区分二酰和三酰脂肽(Takeda等2003)。此外,还发现

TLR2 与非 TLR 受体 dectin-1 共同作用,介导针对可见于酵母细胞壁中的酵母聚糖的应答 (Gantner 等 2003)。TLR5 识别细菌鞭毛内的一种蛋白组分——鞭毛蛋白 (Hayashi 等 2001)。TLR11 (与 TLR5 密切相关) 发现其在小鼠生殖泌尿道中大量表达,与抵抗泌尿系统病原菌有关 (Zhang 等 2004),并于最近发现其识别原生寄生虫鼠弓形体 (*Toxoplasma gondii*) 中的肌动蛋白抑制蛋白 (profilin) 样蛋白 (Yarovinsky 等 2005)。TLR3、7、8 和 9 识别核酸且不在细胞表面表达,而是仅在内体区室中表达 (Latz 等 2004, Matsumoto 等 2003)。TLR3 参与对病毒感染期间所产生双链 RNA (dsRNA) 的识别 (Alexopoulou 等 2001),其中密切相关的 TLR7 和 8 识别富含鸟苷或尿苷的病毒单链 (ss)RNA (Diebold 等 2004, Heil 等 2004) 以及合成的咪唑喹啉样分子咪唑莫特和瑞喹莫德 (R-848) (Hemmi 等 2002, Jurk 等 2002)。TLR9 介导对细菌和病毒中未甲基化 CpG DNA 基序的识别 (Hemmi 等 2000),并于最近发现其识别非 DNA 病原组分,如来自疟原虫的疟原虫色素 (Coban 等 2005)。TLR10 在病原体介导的炎症途径、病原体识别和固有免疫的激活中起作用,但 TLR10 配体目前未知。

[0009] TLR 也可根据序列相似性分为六个主要亚家族 (Roach 等 2005),各自识别相关的 PAMP。由 TLR1、TLR2 和 TLR6 组成的亚家族识别脂肽,TLR3 识别 dsRNA,TLR4LPS、TLR5 鞭毛蛋白和 TLR9 亚家族 (包括密切相关的 TLR7 和 TLR8) 识别核酸。重要的是,TLR 的亚细胞定位与其配基的性质 (而不是序列相似性) 相关 (Hargreaves 和 Medzhitov 2005)。TLR1、2、4、5、6 和 10 存在于质膜表面,并在此参与病原体介导的炎症途径和 / 或识别细菌和病毒组分;而抗病毒 TLR (TLR3、7、8 和 9) 则表达于胞内的内体中。由于被抗病毒 TLR 识别的核酸也存在于脊椎动物中,因此这些 TLR 在内体内的定位限制了其对自身核酸的反应性 (Barton 等 2006)。TLR11 存在于细胞表面,是尿道病原菌和原生寄生生物的受体。

[0010] TLR 的信号转导很复杂,已在其它地方进行过综述 (Akira 和 Takeda 2004, O' Neill 2006)。简而言之,除 TLR3 之外的所有 TLR 均通过衔接分子 (adaptor molecule) 髓样分化因子 88 (MyD88) 来传递信号,MyD88 是含有 TIR 结构域和死亡结构域的胞质蛋白。最后, NF- κ B 和 MAPK 在 TRAF6 下游被激活,导致产生促炎性细胞因子和趋化因子,如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-12。除了 MyD88 外,TLR3 和 TLR4 还通过 TRIF 传递信号,TRIF 是含有 TIR 的另一种衔接分子,是产生 I 型干扰素和 I 型干扰素依赖性基因所必需的。

[0011] TLR 表达于多种免疫和非免疫细胞上。小鼠巨噬细胞表达 TLR1-9,反映其在启动促炎性应答中的重要性。可在病毒感染过程中产生大量 I 型干扰素的类浆细胞 DC (pDC) 表达 TLR7 和 9。小鼠中的所有常规 DC 均表达 TLR1、2、4、6、8 和 9,而 TLR3 仅局限在 CD8⁺ 和 CD4⁻CD8⁻ DC 亚群中 (Iwasaki 和 Medzhitov 2004)。在人中,TLR9 的表达局限在 pDC 和 B 细胞中 (Bauer 等 2001, Krug 等 2001)。

[0012] 粘膜上皮细胞 (EC) 作为抵御大多数感染的第一道防线,了解其上 TLR 的表达情况是极具吸引力的研究领域。在最近的研究中 (Yao X-D 等 2007),我们致力于了解小鼠和人生殖道中 EC 细胞上 TLR 的表达和调节。激光捕获显微切割 (LCM) 技术显示,雌鼠的发情期对其阴道上皮细胞中 TLR 表达有极大影响。基本上所有 TLR (除 TLR11 外) 的 mRNA 表达都在间情期显著提高,尤其是用长效孕酮 Depo-Provera 处理后 (Yao X-D 等,原稿已提交)。这些发现帮助我们了解了针对性传播感染的固有免疫防御,并增强女性生殖健康的质量。

[0013] TLR 配体 (包括 CpG 寡聚脱氧核苷酸 (ODN, 是 TLR9 的配体)、dsRNA 和鞭毛蛋白) 的粘膜递送能够诱发固有抗病毒效应,从而保护小鼠抵抗阴道内 (IVAG) 的 HSV-2 攻击

(Ashkar 和 Rosenthal 2002)。研究表明,纯化的 HSV-2 包膜糖蛋白 (gB) 加 CpG ODN(作为佐剂)的鼻内给药可在阴道内诱导产生 gB 强特异性的 IgA 和 IgG(在整个发情期内持续存在),以及全身和生殖道内 gB 特异性的 CTL,并提供对致死性 IVAG HSV-2 感染的保护 (Gallichan 等 2001)。随后的研究表明,灭活的 gp120 缺陷型 HIV-1 加 CpG ODN 的鼻内免疫在生殖道内诱导产生抗 HIV 的 IgA 和 HIV 特异性 T 细胞介导的免疫应答,包括产生 IFN γ 和 β 趋化因子 (Dumais 等 2002)。此外,用 HIV-1 加 CpG 进行鼻内免疫的小鼠可在生殖道内诱导产生 CD8⁺T 细胞,对表达来自不同进化枝之 HIV-1gag 的重组痘苗病毒的 IVAG 攻击提供跨进化枝的保护 (Jiang 等 2005)。新近发现,虽然曾经认为生殖道是免疫诱导弱的部位(尤其是用非复制型抗原免疫后),但与仅用抗原进行免疫的小鼠相比,用重组亚单位 HSV-2gB 加 CpG 对雌鼠进行的阴道内 (IVAG) 免疫在血清和阴道洗出液中诱导了更高水平的 gB 特异性 IgG 和 IgA 抗体,并且用 gB 加 CpG 免疫的小鼠能够更好地抵抗 HSV-2 对阴道的感染 (Kwant 和 Rosenthal 2004)。因此,在用非复制型亚单位蛋白质抗原与适当的粘膜佐剂进行 IVAG 免疫后有可能诱发保护性免疫应答。

[0014] 近期研究表明,PAMP(包括 CpGDNA、dsRNA 和 LPS)能够在体外抑制 2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 和疱疹性口炎病毒 (VSV) (Ashkar 等 2003 & 2004)。在不含任何病毒抗原的情况下经粘膜递送至阴道粘膜的单剂量 CpG ODN 提供了针对致死剂量 HSV-2 生殖器感染的保护。这种保护是由固有免疫系统介导的,因为其发生于缺乏 B 细胞和 T 细胞的敲除小鼠中。CpG ODN 在 IVAG 内的局部递送导致阴道上皮细胞的快速增殖和加厚,并诱导产生 TLR-9 依赖性抗病毒状态,该状态不阻挡病毒进入,而是抑制阴道上皮细胞中的病毒复制 (Ashkar 等 2003)。dsRNA (TLR3 的配体)的粘膜递送提供了针对生殖器 HSV-2 感染的保护,而不产生如使用 CpG ODN 时所见的局部或全身炎症 (Ashkar 等 2004)。因此,TLR3 配体的局部递送可能是保护机体抵御生殖器病毒感染的一种更安全的手段。

[0015] TLR 诱导一系列应答,这取决于它们被激活时所处的细胞类型 (Ashkar 和 Rosenthal 2002, Iwasaki 和 Medzhitov 2004)。例如,用通过 TLR9 起作用的 CpG DNA 处理 DC 可激活 DC 发生成熟,包括上调 II 类 MHC 和共刺激分子,以及产生促炎性细胞因子、趋化因子并增强抗原呈递。同样地,用 CpG 处理 B 细胞诱导其活化和增殖,并分泌抗体、IL-6 和 IL-10,同时 B 细胞开始对凋亡有抗性。CpG DNA 对免疫细胞的活化诱导了 Th1 主导的应答。

[0016] PRR 介导宿主防御病原体的机制是深入研究的热点。由于能够增强固有免疫应答,因此需要新的策略来使用 PRR 的配体、合成拮抗剂或拮抗剂(即“固有免疫学药剂”)作为优良药剂提供针对胞内细菌、寄生虫和病毒感染的保护或治疗。此外,使用相应配体或激动剂通过 PRR 激活固有免疫系统,这代表了增强对特定病原体的免疫应答的一种策略,使得通过 PRR 传递信号的药剂成为可能的疫苗佐剂。

[0017] 需要能够特异性地激活固有及适应性免疫应答的天然植物级分或组合物,以治疗相关病症(如变态反应、哮喘、病毒及微生物感染,以及癌症)而不造成有害的副作用或不适。免疫应答的类型众所周知。Th1 应答的特征在于应答于胞内病原体和胞内缺陷(如癌症)而产生杀伤性 T 细胞和特定抗体。Th2 应答抵抗胞外病原体。变应性反应由环境物质(即变应原)引发,是特异性 Th2 应答的结果。Th2 应答的特征在于产生其它特定类型的抗体,是变应性反应中典型的,所述变应性反应中,变应原在粘膜表面被错误地当作病原体而引发免疫应答,导致诸如流泪、气道炎症和肺中气道肌细胞收缩的症状。TLR 的活化诱导抗

原呈递细胞产生有利于 Th1 型免疫应答的细胞因子,从而阻止或减弱因接触变应原而发生的有害 Th2 应答。

[0018] 变态反应的特殊特征在于 IgE 使称为肥大细胞和嗜碱性粒细胞的白细胞过度活化,导致极端炎性应答。当易过敏患者初次接触变应原时,会产生大量相应的特异性 IgE 抗体。IgE 分子附着在肥大细胞(在组织中)或嗜碱性粒细胞(在循环中)表面。肥大细胞存在于肺、皮肤、舌以及鼻和肠道的内膜中。当肥大细胞或嗜碱性粒细胞上的 IgE 抗体遇到其特异性抗原时,IgE 抗体传递信号给肥大细胞或嗜碱性粒细胞以释放化学物质(如组胺、肝素以及其它血小板的物质),并吸引次级细胞如嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞。被激活的肥大细胞或嗜碱性粒细胞还合成新的介质,包括前列腺素和白三烯。这些化学介质导致与变态反应有关的病症,包括哮喘、打喷嚏、流泪和发痒。常见的变应性反应包括湿疹、荨麻疹、花粉热、哮喘、食物过敏和对带刺昆虫(如黄蜂和蜜蜂)毒液的反应。

[0019] 哮喘加剧是患者肺功能的严重恶化,常常导致住院甚至死亡。哮喘在肺的主要气道(支气管)发炎时产生。支气管壁的肌肉收紧,肺中细胞产生过多的粘液,进一步使气道变窄,导致轻微哮喘至严重的呼吸困难。哮喘经常由呼吸道病毒感染(如普通感冒)触发;但其它刺激物如香烟、尘螨、动物毛屑、植物花粉、空气污染、除臭剂和香水也能使哮喘症状更加频繁、严重和不可控制。其它哮喘触发物包括运动、冷空气和情绪紧张。大部分的哮喘加剧是由普通呼吸道病毒感染引起的。对儿童而言,特应性和病毒感染都是因哮喘疾病就医的两大主要风险因子。尽管哮喘加剧(尤其是病毒性哮喘加剧)的临床重要性已经清楚,但对哮喘患者在接触普通感冒病毒之后病情恶化的原因仍知之甚少。

[0020] 通常,病毒感染导致嗜中性粒细胞与大的单个核细胞组分(主要是 CD8⁺T 细胞)流入呼吸道。不过,显然病毒感染能够取决于宿主现有条件而产生一系列炎性应答,包括呼吸道嗜酸性粒细胞增多。在特应性个体中,实验性鼻病毒感染提高了抗原攻击后增加嗜酸性粒细胞向呼吸道的募集,并导致呼吸道反应性比非变应性个体更高。用鼻病毒进行鼻内感染后,哮喘个体的下呼吸道活检中含有更多的嗜酸性粒细胞,它们甚至持续到康复后。在哮喘患者中,已经确定在加剧期间呼吸道中存在嗜酸性粒细胞。考虑到这些加剧常常是由病毒感染触发的,哮喘加剧期间在呼吸道中存在嗜酸性粒细胞这一发现变得有些自相矛盾。尽管已有对哮喘患者病毒感染期间嗜酸性粒细胞与其脱粒产物在呼吸道中结合的描述,但还不知道嗜酸性粒细胞是否应答于病毒而具有活性,也不知道这种活化是如何发生的。

[0021] 对于哮喘加剧的发生而言,目前的看法认为效应细胞(即嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞)可被激活。图 1 阐释了病毒诱导嗜酸性粒细胞介质在呼吸道中释放的模型,其通过呼吸道平滑肌神经控制的机能障碍而造成呼吸道超反应性。病毒或病毒抗原被呈递给记忆性 T 细胞。被激活的 T 细胞(CD4)释放未知的可溶性脱粒因子,可能是细胞因子如 GM-CSF。这些 T 细胞还可表达细胞表面配体,例如 ICAM-1。嗜酸性粒细胞应答于可溶性介质、细胞表面配体或其组合,并释放多种嗜酸性粒细胞介质(即嗜酸性粒细胞的主要碱性蛋白、嗜酸性粒细胞的过氧化物酶、RANTES)。

[0022] 在哮喘中,由病毒诱发的嗜酸性粒细胞介质在呼吸道中的释放与哮喘加剧的发生相关。由于嗜酸性粒细胞参与病毒诱发哮喘加剧的发生,因此它必定对病毒直接地或通过其它细胞间接地产生应答。该过程可代表病毒诱导嗜酸性粒细胞介质的释放。

[0023] 西医不愿开草药处方,因为缺乏对其预防和治疗特性的科学研究。但草药不需要

合成药物通常面临的漫长开发时间和高成本。此外,草药易于获得,并为受试者提供了一种与处方药或疫苗相比更舒适、更经济并且副作用极小的选择。

发明内容

[0024] 在一个实施方案中,本发明涉及在需要治疗的受试者中治疗对激活固有免疫信号转导具有敏感性之病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的至少一种人参级分。在一个实施方案中,所述病症选自变态反应、哮喘、病毒感染、微生物感染或癌症。在一个实施方案中,所述病毒感染来自于呼吸系统或粘膜传播的病毒,包括但不限于:流感病毒、冠状病毒、疱疹病毒、呼吸道合胞体病毒、弹状病毒或人免疫缺陷病毒。

[0025] 在一个实施方案中,所述级分从选自以下的人参中制备:西洋参 (*Panax quinquefolius*)、*Panax trifolia*、人参 (*Panax ginseng*)、大叶三七 (*Panax japonicus*)、*Panax schinseng*、三七 (*Panax notoginseng*)、假人参 (*Panax pseudoginseng*)、越南人参 (*Panax vietnamensis*)、秀丽人参 (*Panax elegatior*)、峨嵋人参 (*Panax wangianus*)、羽叶三七 (*Panax bipinratifidus*)、绿参 (green ginseng) 或鲜参、白参或红参。在一个实施方案中,所述级分为西洋参的级分。在一个实施方案中,所述级分选自 CVT-E002、PQ₂、PQ₂₂₃ 或者 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。在一个实施方案中,CVT-E002 调控来自于 Toll 样受体的信号转导。在一个实施方案中,所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 2。在一个实施方案中,所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 2 与 Toll 样受体 6 的异二聚体。在一个实施方案中,所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 2 与 Toll 样受体 1 的异二聚体。在一个实施方案中,所述 Toll 样受体为 Toll 样受体 4。在一个实施方案中,CVT-E002 诱导淋巴细胞和抗原呈递细胞的上调、细胞因子的分泌、抗病毒因子的分泌或其组合。

[0026] 在一个实施方案中,本发明涉及用于激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善病症的人参级分。在一个实施方案中,所述级分从选自以下的人参中制备:西洋参、*Panax trifolia*、人参、大叶三七、*Panax schinseng*、三七、假人参、越南人参、秀丽人参、峨嵋人参、羽叶三七、绿参或鲜参、白参或红参。在一个实施方案中,所述级分为西洋参的级分。在一个实施方案中,所述级分选自 CVT-E002、PQ₂、PQ₂₂₃ 或者 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。

[0027] 在一个实施方案中,本发明涉及包括人参级分与其它药物或一种或多种可药用载体(包括食品)之组合的药物组合物,所述药物组合物用于激活固有及适应性免疫应答,以预防、治疗或改善病症。在一个实施方案中,所述级分从选自以下的人参中制备:西洋参、*Panax trifolia*、人参、大叶三七、*Panax schinseng*、三七、假人参、越南人参、秀丽人参、峨嵋人参、羽叶三七、绿参或鲜参、白参或红参。在一个实施方案中,所述级分为西洋参的级分。在一个实施方案中,所述级分选自 CVT-E002、PQ₂、PQ₂₂₃ 或者 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。

[0028] 在一个实施方案中,本发明涉及包含人参级分的用于激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善病症的食品。在一个实施方案中,所述级分从选自以下的人参中制备:西洋参、*Panax trifolia*、人参、大叶三七、*Panax schinseng*、三七、假人参、越南人参、秀丽人参、峨嵋人参、羽叶三七、绿参或鲜参、白参或红参。在一个实施方案中,所述级分为西洋

参的级分。在一个实施方案中,所述级分选自 CVT-E002、PQ₂、PQ₂₂₃ 或者 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。

[0029] 在另一实施方案中,本发明涉及人参级分用于制备药物组合物或食品的用途,所述药物组合物或食品用于激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善病症。在一个实施方案中,所述病症选自变态反应、哮喘、病毒感染、微生物感染或癌症。在一个实施方案中,所述病毒感染来自于呼吸系统或粘膜传播的病毒,包括流感病毒、冠状病毒、疱疹病毒、呼吸道合胞体病毒、弹状病毒和人免疫缺陷病毒。在一个实施方案中,所述级分从选自以下的人参中制备:西洋参、*Panax trifolia*、人参、大叶三七、*Panaxschinseng*、三七、假人参、越南人参、秀丽人参、峨嵋人参、羽叶三七、绿参或鲜参、白参或红参。在一个实施方案中,所述级分为西洋参的级分。在一个实施方案中,所述级分选自 CVT-E002、PQ₂、PQ₂₂₃ 或者 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。

[0030] 在另一实施方案中,本发明涉及激活固有及适应性免疫应答以在需要这种激活的受试者中预防、治疗或改善病症的方法,所述方法通过向所述受试者施用人参级分或包含所述级分与其它药物或一种或多种可药用载体之组合的药物组合物(包括食品)来实现。

[0031] 在另一实施方案中,本发明涉及预防、治疗或改善与固有免疫信号转导的激活有关之病症的方法,包括通过向有此需要的受试者施用人参级分来调节来自 Toll 样受体的信号转导。

附图说明

[0032] 图 1 显示病毒介导的嗜酸性粒细胞介质在呼吸道中释放的作用模型。

[0033] 图 2 显示与副流感病毒以及自体淋巴细胞、树突细胞和巨噬细胞的多种组合共培养后,嗜酸性粒细胞过氧化物酶从人嗜酸性粒细胞中释放 ($p < 0.001$)。各直方条表示用不同供体进行至少 12 次实验得到的平均值 \pm SEM。

[0034] 图 3 显示与副流感病毒和抗原呈递细胞(即巨噬细胞和树突细胞)一起培养 (34°C , $5\% \text{CO}_2$) 六天后发生的淋巴细胞增殖(通过 H^3 -胸苷掺入来衡量)。各直方条代表用不同活病毒供体进行至少 5 次实验得到的平均值 \pm SEM。用 RSV 得到了相似的结果(数据未显示)。

[0035] 图 4 显示对与树突细胞共培养的淋巴细胞进行表征的流式细胞术结果。

[0036] 图 5 显示用 ELISA/Searchlight 测量的细胞因子/趋化因子值列表, $n = 1$, 箭头代表分别相对于合适对照的数值。

[0037] 图 6 显示与淋巴细胞、CVT-E002 和树突细胞共培养 (34°C , $5\% \text{CO}_2$) 六天后发生的淋巴细胞增殖(在光学显微镜下观察,通过掺入 H^3 -胸腺嘧啶来测量)。

[0038] 图 7A-D 显示抗原呈递和 DC 成熟的流式细胞术分析结果。图 7A 显示细胞亚群。图 7B 显示不同条件下针对 DQ-OVA 摄入和降解对细胞进行筛选的结果。数值代表各类别中 DQ-OVA 阳性细胞的百分比。图 7C 显示通过大小和粒度(数值代表各类别中存在的总细胞百分比)对 DC 成熟情况进行的评估。图 7D 是代表 CVT-E002 处理(右)和未处理(左)的 DC 细胞亚群的流式细胞术的图。

[0039] 图 8A 和 8B 显示,在体外 CVT-E002 处理刺激了 RAW264.7 细胞中 IL-6(图 8A) 和 IFN- β (图 8B) 的产生。

- [0040] 图 9 显示,在体外 CVT-E002 处理刺激了一氧化氮 (NO) 的产生。
- [0041] 图 10 显示了用 CVT-E002 孵育后原代人单核细胞 / 巨噬细胞中 IL-6 的产生。
- [0042] 图 11A 和 11B 显示, CVT-E002 在体外显著抑制 VSV 的复制。
- [0043] 图 12 显示了用 CVT-E002 或 HT-1001 处理 C57/B6 和 MyD88^{-/-} 腹膜巨噬细胞期间 IL-6 的产生。
- [0044] 图 13A 和 13B 显示了用 CVT-E002 或 HT-1001 处理 C57/B6 和 MyD88^{-/-} 腹膜巨噬细胞期间 IL-6 (图 13A) 或 IFN- β (图 13B) 的产生。
- [0045] 图 14 显示, 24 小时的 CVT-E002 处理在 hTLR2、hTLR1/2、hTLR2/6 和 hTLR4 转染的 293 细胞中刺激了 IL-8 产生 (Pam3CSK/LPS 对照)。hTLR4 代表 hTLR4 与 MDR 和 CD14 的共表达。
- [0046] 图 15 显示, 48 小时的 CVT-E002 处理在 hTLR2、hTLR1/2、hTLR2/6 和 hTLR4 转染的 293 细胞刺激了 IL-8 产生 (Pam3CSK/LPS 对照)。hTLR4 代表 hTLR4 与 MDR 和 CD14 的共表达。
- [0047] 图 16A 和 16B 显示, CVT-E002 处理抑制了呼吸道高反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR) (图 16A) 的发生, 并减少了嗜酸性粒细胞呼吸道炎症的量 (图 16B)。
- [0048] 图 17A 和 B 说明, CVT-E002 向粘膜界面的递送提供了针对递送至同一粘膜表面之病毒 (HSV-2) 的保护。图 17A 显示了在 HSV-2 IVAG 攻击后给予 CVT-E002、HT1001 或 PBS IVAG 的 C57BL/6 小鼠的阴道病理学评分。图 17B 为 HSV-2 IVAG 攻击后给予 CVT-E002、HT1001 或 PBSIVAG 的 C57BL/6 小鼠的存活百分比。
- [0049] 本发明的另一些方面和优点将在其后的说明中呈现。但应当了解的是, 该详细描述和实施例尽管指明了本发明的优选实施方案, 但仅用于举例说明, 因为本领域技术人员容易从该详细描述中认识到各种符合本发明精神和范围内的变动和修改。
- [0050] 发明详述
- [0051] 在描述本发明时, 所有未在本文中定义的术语具有本领域内公认的常见意义。它们仅用于说明, 而非限制要求保护的发明, 其程度为以下描述是本发明的具体实施方案或具体用途。以下描述旨在涵盖如所附权利要求书所定义的本发明精神和范围内所包括的所有替代方案、修改和等同方案。
- [0052] 此处和权利要求中所使用的下列术语和词组具有如下意义。
- [0053] “生物相容性” 意为对预期用途而言不产生明显的不良宿主应答。最优选的是, 生物相容性材料对预期用途而言无毒。因此, 对人类用途来说, 生物相容性最优选为对人或人体组织无毒。
- [0054] “载体” 意为生物相容性且可药用的合适运载工具, 包括如适于施用的一种或多种固体、半固体或液体稀释剂、赋形剂、佐剂、调味剂或包封材料。
- [0055] “受试者” 意为人或脊椎动物。受试者可以是年幼的或成年的。
- [0056] “功能食品” 在外观上与作为日常膳食的一部分而摄入的常规食品相似, 或者可以是所述常规食品, 其被证实在基础营养功能之外具有生理益处和 / 或降低患病风险, 即, 它们含有活性成分。
- [0057] “营养品” 是从食物中分离或纯化得到的产品, 通常以药物形式出售而与食物无

关。营养品应该具有生理益处或是提供针对疾病的保护。

[0058] “疫苗佐剂”意为在加入疫苗中之后能够促发提高或增强的免疫应答的任何物质或化合物。

[0059] “疫苗”意为旨在刺激正常免疫应答的任何化合物或抗原制剂。疫苗可以是预防性的或治疗性的。

[0060] “有效量”和 / 或“治疗量”意为足以对所治疗疾病提供预防、治疗和 / 或改善的剂量。其因患者、疾病和所使用治疗手段而异。例如,在病毒感染的情形中,“有效量”是显著提高治疗感染之可能性所必需的量,尤其指提高成功预防感染或(在感染发生时)消除感染之可能性的量。

[0061] “级分”指用适当溶剂提取植物或植物部分所得到的浓缩制备物,所述溶剂如水、醇、其混合物、油或其它植物提取领域所熟知的合适溶剂。级分或提取物如符合药用标准可直接使用,或者除去所得溶液中的溶剂后将残余物直接使用或进一步加工后使用,例如用适当溶剂重溶或重悬。术语“植物”应理解为指完整植物和含有活性成分的植物部分,例如叶、茎、果实或根。

[0062] “人参”意为涉及任何品种和类型的人参,包括但不限于以下所列:

[0063] 表 1. 人参的品种和类型

拉丁名	通用名
<i>Panax quinquefolius</i>	北美/加拿大人参
<i>Panax trifolia</i>	北美东部人参
<i>Panax ginseng</i>	亚洲参
<i>Panax japonicus</i>	高丽参
<i>Panax schinseng</i>	东方参 (Oriental ginseng)
<i>Panax notoginseng</i>	日本参
<i>Panax pseudoginseng</i>	中国参
<i>Panax vietnamensis</i>	尼泊尔参
<i>Panar elegatior</i>	越南参
<i>Panax wangianus</i>	野山参
<i>Panax bipinratifidus</i>	绿参或新鲜参
	红参
	白参
	西洋参
	人参/高丽参
	田七/三七
	Sâm Ngoc Linh

[0064]

[0065] 本领域技术人员会了解,还可以从五加科 (Araliaceae) 中除人参属植物以外的许多其他属中获得人参提取物,并在本发明情况下使用。术语“人参”还包括野生或加工的人参。野生人参是未经人工种植和栽培,而是天然生长并从发现处就地采集而得的人参。加工人参包括例如鲜参或绿参、白参和红参。鲜参或绿参是田间收获的未加工人参。白参是对鲜参进行干燥而获得的,而红参则是由鲜参蒸煮后再干燥而得。

[0066] “人参级分”指从表 1 所列或如上所述任何人参类型和品种中制得的级分,以及从这些人参级分中获得的亚级分,所述级分和亚级分表现出激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善受试者病症的活性,如一项或多项体外或体内药理学评估所证实。

[0067] “CVT-E002”指一种从西洋参中获得的示例性人参级分,该级分具有免疫调节特性(如之前美国专利申请 No. 6, 432, 454、7, 067, 160、7, 186, 423 和 7, 413, 756 中所述,其以引用方式并入本文)。CVT-E002 表现出本文所述激活固有及适应性免疫应答的额外活性。

[0068] “PQ₂”指一种从西洋参中获得的示例性人参级分,该级分具有免疫调节特性,如之前美国专利申请 No. 6, 432, 454、7, 067, 160、7, 186, 423 和 7, 413, 756 中所述,其以引用方式并入本文。

[0069] “PQ₂₂₃”指一种从西洋参中获得的示例性人参级分,该级分具有免疫调节特性,如之前美国专利申请 No. 6, 432, 454、7, 067, 160、7, 186, 423 和 7, 413, 756 中所述,其以引用方式并入本文。

[0070] 本领域技术人员会意识到,可同样用于本发明情况下的来自非人参植物或植物部分的级分或是合成级分也在本发明的范围之内,只要其化学特性和活性与本文所用人参级分足够相似。

[0071] 本发明涉及人参级分或包含该级分的药物组合物或食品,其用于激活固有及适应性免疫应答,以预防、治疗或改善病症。此外,本发明还涉及人参级分或包含该级分的药物组合物或食品,其用于通过模式识别受体 (PRR, 如 Toll 样受体) 激活固有及适应性免疫应答,以预防、治疗或改善受试者的多种病症。所述病症包括但不限于:病毒和微生物感染、变态反应、哮喘和癌症。就本发明人所知,这是首次证发现天然植物来源的级分可通过 PRR 特异性地激活哺乳动物固有免疫系统。在一个实施方案中,所述人参级分为西洋参的级分。在一个实施方案中,所述人参级分选自 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃,以及来自 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。

[0072] 所述人参级分通常如下制备:首先将人参植株或植株部分干燥并粉末化,然后用适当溶剂进行提取过程,典型溶剂为水、乙醇、乙醇/水混合物、甲醇、丁醇、异丁醇、丙酮、己烷、石油醚或其它有机溶剂。然后可通过喷雾干燥、真空炉干燥或冷冻干燥将级分或提取物进一步蒸发,从而浓缩得到干燥提取物。从西洋参根部的可溶性提取物中制备示例性人参级分(其选自 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 以及来自 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分)的方法之前在美国专利申请 No. 6, 432, 454、7, 067, 160、7, 186, 423 和 7, 413, 756 中已有描述,其以引用方式并入本文。

[0073] 人参级分一旦制备好,即通过进行一项或多项体外或体内药理学评估来评估和确定其激活固有及适应性免疫应答的活性。在本发明中,所述评估包括但不限于:示例性人参级分 CVT-E002 对病毒复制(见实施例 1 和 2)和树突细胞功能(见实施例 3)之影响的体外研究。就本发明而言,任何药理学评估均适用,前提是所述评估关注于指示人参级分、大规模生产中某一批人参级分的代表性样品或人参级分之亚级分的上述活性。可通过 ChemBioPrint™ 技术来保证不同批次间产品的质量,该技术保证了化学和药理学一致性,如美国专利申请 No. 6, 156, 291 中所述,其以引用方式并入本文。

[0074] 此外,本发明还涉及人参级分单独或与其它药物组合后用于制备药物组合物或食品用途,所述药物组合物或食品适于激活固有及适应性免疫应答,以治疗、预防或改善受试者的病症。在一个实施方案中,所述人参级分为西洋参的级分。在一个实施方案中,所述人参级分选自 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 以及来自 CVT-E002、PQ₂ 和 PQ₂₂₃ 的纯化级分。在一个实施方案中,所述级分为 CVT-E002。

[0075] 此外,本发明还涉及包含人参级分与可药用载体之组合的药物组合物。本领域技术人员熟悉适用于此处的可药用载体,因此将不再详细讨论制备本发明药物组合物的方法。药物组合物的适用形式可以是片剂、胶囊剂、液体剂、锭剂、洗剂、气雾剂、适于注射的溶

液或栓剂。

[0076] 经口组合物可包括惰性稀释剂或可食用载体。为实现经口治疗性给药,可将人参级分与赋形剂混合,以片剂、糖锭剂或胶囊剂(如明胶胶囊)的形式使用。经口组合物还可用于流体载体配制,用作漱口剂。药学相容性粘合剂或其它载体材料也可作为组合物的一部分包括在内。所述粘合剂和载体可以是:粘合剂如微晶纤维素、黄耆胶或明胶,赋形剂如淀粉或乳糖,崩解剂如藻酸或玉米淀粉,润滑剂如硬脂酸镁,助流剂如胶体二氧化硅,甜味剂如蔗糖或糖精,或是调味剂。

[0077] 为实现吸入给药,化合物从加压容器或配药器中以气雾剂喷雾形式递送,所述容器或配药器中含有适当的抛射剂(诸如二氧化碳等气体)或雾化器。

[0078] 全身给药也可经粘膜或经皮实现。为实现经粘膜或经皮给药,在制剂中使用适用于待渗透屏障的渗透剂。所述渗透剂为本领域所公知。经粘膜给药可通过利用鼻腔喷雾、用于直肠递送的栓剂或保留灌肠剂来实现。所述栓剂可包含常规栓剂基质,如可可脂和其它甘油酯。为实现经皮给药,将活性化合物配制成本领域所普遍熟知的软膏剂、油膏剂、凝胶剂或霜剂。

[0079] 所述人参级分还可以与保护活性剂在体内不被迅速清除的载体制备在一起,如控释制剂,包括植入物、包衣和微胶囊递送系统。

[0080] 所述人参级分可单独使用或与其它药物组合使用。由于已知癌症患者具有严重的免疫系统抑制,因此本发明的人参级分特别适合于与化疗剂共同施用或作为放射治疗的补充。所述人参级分还可用作免疫调节剂或疫苗佐剂。

[0081] 可制备含有所述人参级分为有效成分的多种固体、半固体或液体的食品。所述食品的实例包括但不限于:谷物、意面、甜食(例如:饼干、糕饼、焦糖、口香糖、硬糖)、营养品、零食或代餐棒、酸奶、果冻(gelatin)、果酱、布丁、汤、水果或蔬菜基质、饮料(例如:果汁、软饮料、运动能量饮料、瓶装水、牛奶、豆制品),以及儿童和婴儿食品(例如:婴儿配方、改良奶粉、婴儿食品)。此外,所述人参级分还可用作功能食品、营养品或膳食补剂中的活性成分。

[0082] 所述人参级分制剂可能会因老化而损失一些活性,因此制备成稳定形式,或施用现制,例如为多组分药盒形式,以避免所述人参级分老化并使其效用最大化。众所周知,适当的药盒或容器用于在使用前使各制剂的状态分隔开。比如,含有粉末形式所述人参级分的药盒可以与无菌载体分开包装,所述载体如盐溶液、醇或水,并可以与其他成分(其使用时混合的特定量)分开包装。所述人参级分可以“茶包”型浸出剂(infuser)(药袋或扁囊)的形式提供,用于在使用时产生液体制剂。茶包型浸出剂的优势在于药袋可作为过滤器来阻隔粉末中可对某些给药形式(如注射或输注)不利的小颗粒。颗粒还可通过如过滤等方法除去。

[0083] 本发明人参级分的剂量取决于所治疗的具体病症以及患者的年龄、性别和总体健康状况。不过,可以在1至5000mg/kg体重/天、每天给药1至10次的范围内寻找适当剂量。长期或预防性使用的优选剂量为每日400mg。针对急性病的使用,起初要施用显著更高的剂量。例如,第一天可分三次施用1800mg剂量,第二天分三次施用1200mg剂量,第三天分三次施用900mg剂量;此后,每日施用200-400mg直至症状缓解。所述人参级分可经口、注射或输注、局部、鼻内、眼部、阴道或直肠给药。

[0084] 本发明人参级分有效地激活固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善受试者的多种病症。此外,由于所述人参级分是由天然的可食用产品制得,因此降低了存在副作用的可能性。人参级分刺激固有及适应性免疫应答以预防、治疗或改善病毒感染、变态反应和哮喘的能力将在以下讨论和/或在实施例中用示例性人参级分 CVT-E002 加以证明。

[0085] CVT-E002 调节固有免疫系统活性以产生炎性和抗病毒因子。在体外用 CVT-E002 处理小鼠单核细胞,然后接触 2 型单纯疱疹病毒或疱疹性口炎病毒,这导致 IL-6、干扰素- β 和一氧化氮的产生水平以剂量依赖性方式显著升高,而未处理和对照处理的培养物则不然(实施例 1,图 8A、8B 和 9)。同样地,原代人单核细胞/巨噬细胞用 CVT-E002 孵育 40 小时导致了 IL-6 的剂量依赖性显著产生(图 10)。

[0086] 使用标记有绿色荧光蛋白的疱疹性口炎病毒(VSV-GFP),CVT-E002 在体外显著地抑制病毒复制(图 11A 和 11B)。CVT-E002 可抵御一系列性传播病毒感染,包括 HIV-1。本文所述结果支持局部施用 CVT-E002 以快速激活固有粘膜免疫系统,并诱导保护粘膜表面不受性传播病原体感染的局部抗病毒状态。由于使用更为“天然的杀菌剂”和进化上古老的固有粘膜免疫应答来实现保护,该方法可以更安全且更不容易选择出抗性病原体。

[0087] 所有 TLR(除了 TLR3)的信号转导均通过髓样分化初级应答基因 88(myeloid differentiation primary response gene 88,MyD88)发生,MyD88 是激活转录因子 NF- κ B 的衔接蛋白。为了确定 CVT-E002 处理后的细胞因子应答是否依赖于 MyD88 信号转导,由 C57B1/6 野生型或 MyD88 敲除型(MyD88^{-/-})小鼠建立腹膜巨噬细胞培养物,并用 CVT-E002 处理或不处理(实施例 4)。CVT-E002 处理后 IL-6 和 IFN- β 的产生均为 MyD88- 依赖型,表明 CVT-E002 基于对 TLR 信号转导的刺激而激活免疫细胞中促炎性细胞因子和抗病毒细胞因子的产生。

[0088] 为了确定有哪些 TLR 被 CVT-E002 激活,使用经转导而稳定表达特定人 TLR 基因的 HEK293 细胞(实施例 5,图 14 和 15)。虽然 CVT-E002 不刺激仅表达 hTLR4 的细胞产生 IL-8,但结果表明,CVT-E002 在两个不同时间点以剂量依赖性方式刺激表达 hTLR4 和 MD2-CD14 的细胞产生 IL-8。有意思的是,CVT-E002 还以剂量依赖性方式刺激表达人 TLR2 的细胞。由于 TLR2 还能与 TLR1 和 TLR6 形成异二聚体,因此将仅表达 hTLR2 或表达 hTLR2/1 和 hTLR2/6 细胞的刺激进行比较。与 CVT-E002 共孵育导致上述每种细胞系中 IL-8 的剂量依赖性产生,虽然仅表达 hTLR2 的细胞持续产生显著更高水平的 IL-8。在比较相同细胞计数的所有四种细胞系的实验中,大部分的 CVT 固有免疫激活是通过 TLR2 进行的。使用表达单个 TLR 的细胞,发现 CVT-E002 显示出通过 TLR4 的信号极低,而 TLR4 正是脂多糖(LPS)的固有 PRR(图 14)。总之,结果表明,人参级分(例如 CVT-E002)能够通过 TLR 激活固有免疫系统。这可以解释其抗感染的保护效应,并说明人参级分可用作潜在的疫苗佐剂,以帮助刺激针对疫苗成分的固有及适应性免疫,从而使疫苗效力更高。

[0089] 鉴于 CVT-E002 激活固有和/或适应性免疫应答以抑制病毒复制的能力,本发明人发现 CVT-E002 还可用于预防、治疗或改善其它与固有免疫信号激活相关的病症,包括但不限于变态反应和哮喘。

[0090] 基于变应原/抗原的体外模型,用 I 型副流感病毒(PIV)和呼吸道合胞体病毒(RSV)建立了将呼吸道病毒与分离的人白细胞共孵育的细胞共培养体系。选择这些病毒是因为它们是在人的一生中经常会感染到的 ssRNA 呼吸道病毒,并与哮喘的加剧相关。

[0091] 如图 2 所示,病毒在嗜酸性粒细胞的存在下不直接诱导嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)的释放。相反,病毒只在嗜酸性粒细胞与淋巴细胞、树突细胞和巨噬细胞(即,后两者为抗原呈递细胞)的特定组合共孵育时才会诱导 EPO 释放。抗原呈递细胞单独与病毒和嗜酸性粒细胞组合不会诱导 EPO 释放。EPO 释放不会发生在没有病毒的任何组合中。因此,病毒与抗原呈递细胞共培养似乎可激活淋巴细胞诱导 EPO 从嗜酸性粒细胞中释放。病毒的紫外灭活不能阻止这一效应。

[0092] 因其在嗜酸性粒细胞功能中的重要性、其抗病毒特性和测量经验,选择 EPO 的释放作为介质释放的度量。将 PIV 或 RSV 分别仅与嗜酸性粒细胞共孵育时,没有观察到 EPO 的释放,表明不可能存在直接的嗜酸性粒细胞脱粒作用。其他人用鼻病毒也观察到相似的阴性结果。白细胞供体为具有特异性背景、表现出外周血嗜酸性粒细胞增多的成年个体。由于 PIV 和 RSV 是常见的感染,因此这些供体将以记忆性 T 细胞的形式对该病毒具有免疫力。在所述模型中,淋巴细胞增殖应答于 PIV 和 RSV 而发生,但仍仅发生在与抗原呈递细胞共培养时。如图 3 所示,淋巴细胞增殖发生在与副流感病毒和抗原呈递细胞(即巨噬细胞和树突细胞)共培养六天后,相比于巨噬细胞,在树突细胞培养物中观察到更高的增殖。用植物血球凝集素(PHA, $5 \mu\text{g/ml}$) 仅与淋巴细胞的组合作为阳性对照。在此共培养体系中观察到细胞因子(IFN- γ 和 GM-CSF)的产生,虽然其来源或与 EPO 释放诱导的相关性尚不明确。

[0093] 与病毒刺激结果相似,CVT-E002 不能直接诱导淋巴细胞增殖;不过 CVT-E002 与树突细胞共培养时观察到强烈的增殖应答(实施例 2 和 3)。淋巴细胞增殖发生在淋巴细胞、CVT-E002 和树突细胞共培养六天后。将 CVT-E002 与病毒一起加入培养孔内时增殖反应可稍有升高。用流式细胞术表征细胞,观察到用 CVT-E002 刺激的树突细胞中 HLA-DR 的表达提高。发生增殖的淋巴细胞为 CD4^+ ,并显示出激活标志物 CD25 的表达增高。LPS 刺激作为阳性对照。没有 CVT-E002 或病毒时,树突细胞与淋巴细胞的共培养物中观察不到增殖或 CD25 上调。CVT-E002 刺激诱导了 CD4^+ 淋巴细胞中 CD25 的表达提高,与仅用病毒感染时所观察到的结果相似。所述组合进一步增强了表达。

[0094] 特异性/变应性哮喘是 Th2 疾病。CVT-E002 能够产生 Th1 应答(实施例 2,图 5),这种 Th1 偏好有可能抑制 Th2 应答,因此被用作特异性/变应性疾病的治疗。在一个广泛使用的特异性/变应性哮喘模型中(小鼠使用腹腔注射 OVA 和明矾致敏,然后用 OVA 攻击以在呼吸道中产生变应性疾病),CVT-E002 能够防止 AHR 发生,并降低嗜酸性粒细胞呼吸道炎症量(实施例 7,图 16a 和 16b)。在未致敏的对照动物中没有特异性/变应性疾病,而经过致敏、用强饲法给动物施用盐水然后用 OVA 攻击的小鼠在呼吸道中发生由嗜酸性粒细胞呼吸道炎症和 AHR 组成的顽固的特异性/变应性疾病。在用 OVA 致敏、通过强饲法施用 CVT-E002 随后接受 OVA 攻击的实验小鼠中,嗜酸性粒细胞呼吸道炎症和对吸入乙酰甲胆碱的 AHR 均被抑制。

[0095] CVT-E002 可用于治疗由呼吸道病毒感染或其它刺激物和诱发剂引起的哮喘。虽然大多数成年人每年接触相同的常见病毒感染,但一部分哮喘症患者将发生肺功能下降的反应。CVT-E002 的特性使其可能为此类患者带来益处。如本文和实施例中所述,CVT-E002 可用于调节哮喘症患者对病毒感染的应答,所述调节通过抑制病毒复制和/或通过有利于 Th1 免疫应答来实现。对病毒复制的抑制是有益的,因为它降低了炎症程度和后续的气道阻塞程度。对 Th1 免疫应答的促进是有益的,因为它可对抗与特异性反应相关的 Th2 应答。

[0096] 除了治疗由呼吸道病毒感染引起的哮喘以外, CVT-E002 还可有效治疗由其它刺激物和诱发剂引起的哮喘。所述刺激物和诱发剂包括但不限于: 室内变应原如居室螨、有毛动物、蟑螂和真菌, 室外变应原如花粉和霉菌, 室内空气污染物如香烟, 室外空气污染物如臭氧、一氧化氮、酸雾和颗粒物, 职业接触, 食品和食品添加剂, 药物如阿司匹林和非固醇类抗炎药和 β -受体阻断药, 鼻炎, 鼻窦炎, 鼻息肉, 胃食管反流, 激素波动, 干冷空气, 以及运动。

[0097] CVT-E002 的免疫调节剂特性也可对患者有益, 因为 CVT-E002 增强了细胞因子、干扰素从淋巴细胞和 / 或树突细胞中的释放, 并参与淋巴细胞与抗原呈递细胞的相互作用。

[0098] 从以上描述和下文的实施例, 应该理解, 所提到的 CVT-E002 优选实施方案仅作为示例, 所述活性的应用可适用于所有具有期望活性的人参级分。

[0099] 在此将进一步通过实施例对本发明进行阐释。

[0100] 实施例 1——CVT-E002 在体外对病毒复制的影响

[0101] 研究了多种剂量的 CVT-E002 在体外抑制小鼠单核细胞中病毒复制的能力。将若干剂量 (0、10、100 和 500 μ g/ml) 的 CVT-E002 以及作为对照 (250-2000 μ g) 的 HT-1001 (含有人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的示例性人参级分, 在美国专利申请 No. 6, 083, 932 中有述) 溶于 PBS 缓冲液中, 用完全组织培养基稀释至终浓度, 然后加入 37°C 下体外的 RAW-264 小鼠巨噬细胞中。处理细胞 24 或 48 小时后, 使处理和未处理的细胞培养物与 2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 或疱疹性口炎病毒 (VSV) 接触。用噬菌斑测定来评估病毒复制。在处理后不同时间收集 CVT-E002 和对照培养物的上清液, 并用 ELISA 对 I 型 IFN、TNF α 、IL-6 和一氧化氮 (NO) 进行评估。RAW 细胞在用 CVT-E002 处理后以剂量依赖性方式产生显著高水平的 IL-6 (图 8A)、IFN β (图 8B) 和 NO (图 9)。未处理和对照处理的培养物为阴性。检查细胞因子产生及病毒滴度的数据以进行关联。

[0102] 还测试了 CVT-E002 对 TNF α 和 IFN α 的刺激。TNF α 水平在 CVT-E002 和 HT-1001 处理组中都提高。IFN α 的测试结果不可靠, 可能是由于 ELISA 不佳 (数据未显示)。重要的是, 原代人单核细胞 / 巨噬细胞培养物与 CVT-E002 的孵育导致显著的剂量依赖性 IL-6 产生 (图 10)。还利用经遗传改造而表达绿色荧光蛋白的 VSV (VSV-GFP) 显示, CVT-E002 在体外显著地抑制了病毒复制 (图 11A 和 11B)。

[0103] 实施例 2——CVT-E002 诱导抗病毒活性的机制

[0104] 将树突细胞 (DC) 与淋巴细胞共培养, 并用流式细胞术表征淋巴细胞。用 LPS 刺激作为阳性对照。发现 RSV 和 PIV 在树突细胞 (DC) 存在下诱导 CD3+CD4+CD25+T 细胞的增殖 (图 4, 各个 n = 3)。相比于与淋巴细胞培养的未感染 DC, RSV 诱导干扰素 α 和 γ 、TNF α 、RANTES 以及 IL-1、2、4、10、12、13 和 15 的产生 (图 5, n = 1)。所述数据代表与各自未感染对照 (给定值为 1) 的相对值。CVT-E002 仅与 T 细胞培养诱导了 IFN γ 和 IL12 的释放。CVT-E002 仅与 DC 培养诱导了 TNF、IFN γ 、IL-1、10、12 和 15 的释放。向含病毒的细胞培养物中加入 CVT-E002 极大提高了细胞因子 / 趋化因子的释放。此外, 相比于未感染细胞, CVT-E002 可在有 DC 而无病毒的情况下诱导淋巴细胞增殖 (图 6)。

[0105] 实施例 3——CVT-E002 对树突细胞功能的影响

[0106] 通过用 GM-CSF 和 IL-4 处理七天而从血液单核细胞中产生树突细胞 (DC)。将 DC 在存在或不存在 5mg/ml 自淬灭 DQ-卵白蛋白 (DQ-OVA) 和 CVT-E002 的情况下孵育。DQ-OVA

是附着在卵白蛋白上的荧光染料。DQ-OVA 的荧光在完整分子状态下淬灭,而通过 DC 抗原呈递被降解后,荧光染料被释放,荧光得以发出。

[0107] 图 7A 显示了细胞的亚群。“DC 样”细胞在大小和粒度上与成熟树突细胞一致,而“非 DC”为未成熟 DC 细胞以及有分化抗性的单核细胞和 T 细胞。经 LPS 处理的细胞被用作 DC 成熟的阳性对照。用流式细胞术测定大小和粒度,看来存在一个单核细胞亚群,认为其代表未成熟表型(非 DC),而不是成熟 DC(DC 样)。这一印象是基于之前用 CD11c 和 HLA-DR 染色的经验(数据未显示)。

[0108] 掺入了 DQ-OVA 的 DC 以荧光显示(图 7B)。有意思的是, CVT-E002 以剂量依赖性方式增强了总体 DQ-OVA 信号(所有细胞均为 OVA⁺)。DC 样细胞群为 100% OVA 阳性,而未成熟细胞群看来在 CVT-E002 处理后更好地摄入卵白蛋白(非 DC OVA⁺,图 7B)。

[0109] CVT-E002 处理将单核细胞数从非 DC 细胞群改变成成熟 DC 样细胞(成熟 DC 池)(图 7C 和 7D)。用 CD11c 和 MHC II 染色对这些细胞群进行初步的基因分型,证实了我们关于成熟与未成熟的印象。这些数据表明,除了 DC 细胞因子数据, CVT-E002 还增强了 DC 功能和成熟。

[0110] 实施例 4——CVT-E002 激活核因子 κ B(NF- κ B) 和通过 MyD88 传递信号的能力

[0111] 为确定 CVT-E002 是否通过与 TLR 相互作用来激活固有免疫应答,对 CVT-E002 激活核因子 κ B(NF- κ B) 和通过 MyD88 传递信号的能力进行了测定。从正常小鼠(C57B1/6 野生型)和 MyD88 缺失小鼠(即 MyD88 敲除小鼠,命名为“MyD88^{-/-}”)中分离腹膜巨噬细胞。体外孵育 24 小时以使细胞附着于培养板后,将这些巨噬细胞清洗后用多种剂量的 CVT-E002 或 HT-1001 进行处理,再孵育 24 小时。用 HT-1001 作为对照。收集上清液,用 ELISA 对 IL-1、IL-6、IFN β 和 NO 产生进行评估。包括 CpG DNA(MyD88 依赖性)和 dsRNA(TLR3 的非 MyD88 依赖性配体),分别作为阳性和阴性对照。此外,构建以 NF- κ B 启动子驱动报告基因 LacZ 的质粒。将转染有该质粒的细胞用多种剂量的 CVT-E002 处理,并评估报告基因产物的产生。

[0112] 结果表明, CVT-E002 只在野生型腹膜巨噬细胞中诱导显著水平的促炎性细胞因子 IL-6 和抗病毒因子 I 型 IFN β 的产生,而在 MyD88^{-/-} 小鼠中则不然(图 12、13A 和 13B)。未处理或 HT-1001 处理的培养物为阴性。这些结果显示, CVT-E002 诱导的对 IL-6 和 IFN β 的刺激是 MyD88 依赖性的,并表明 CVT-E002 通过 TLR 激活脊椎动物免疫细胞中促炎性及抗病毒细胞因子的产生。

[0113] 实施例 5——对 CVT-E002 所利用的 TLR 进行鉴定

[0114] 为鉴定哪些 TLR 可能是 CVT-E002 的受体,构建只单独表达一种 TLR 受体的细胞系。将这些细胞在体外用最佳剂量的 CVT-E002 和对照 TLR 配体/激动剂处理,并用这些细胞的上清液测量 IL-1、IL-6、TNF α 和 NO 的产生。将各 TLR 的已知配体/激动剂包括在内作为阳性对照,以确保表达每一种独立 TLR 的细胞具有功能。结果表明, CVT-E002 不能仅通过 TLR4 传递信号。CVT-E002 处理 24 小时在转染有 hTLR2、hTLR1/2、hTLR2/6 和 hTLR4 的 293 细胞(Pam3CSK/LPS 对照)中刺激了 IL-8 产生(图 14)。CVT-E002 处理 48 小时在转染有 hTLR2、hTLR1/2、hTLR2/6 和 hTLR4 的 293 细胞(Pam3CSK/LPS 对照)中刺激了 IL-8 产生(图 15)。hTLR4 代表与 MDR 和 CD14 共表达的 hTLR4。两个时间段中,观察到所有受体的 IL-8 产生均显著增加。

[0115] 实施例 6——粘膜递送 CVT-E002 的效果

[0116] 将 CVT-E002 或对照以膳食形式经口、经鼻腔或经阴道递送至小鼠。随后用多种剂量的 HSV-2 或干扰素敏感性疱疹性口炎病毒 (VSV) 对小鼠进行鼻内或阴道内攻击。在病毒攻击后不同时间点 (感染后第 1-3 天和第 6 天), 通过测量体重、监测整体病理学情况以及用噬菌斑试验测定肺和生殖器洗出液及组织中攻击病毒的滴度来评估针对病毒感染的保护 (图 17A 和 17B)。

[0117] 实施例 7——CVT-E002 抑制呼吸道高反应性 (AHR) 发生和降低嗜酸性粒细胞呼吸道炎症量的能力

[0118] 用 OVA 和明矾腹膜内注射将 OVA 和 CVT-E002+OVA 小鼠致敏两次, 而对照动物不接受免疫。在最后一次免疫七天后, 通过强饲法向对照动物和 CVT-E002+OVA 小鼠施用 200mg/kg CVT-E002 化合物, 共七天。最后一次强饲后 24 小时, 用 50 μ g OVA 对所有小鼠进行两次鼻内攻击, 并在第二次攻击后 24 小时评估 AHR 和呼吸道炎症。通过全身体积描记术来测量增强的呼吸间歇 (Enhanced pause, Penh), 以测定对乙酰甲胆碱攻击产生应答的 AHR ($n = 3$)。* 与 OVA 或对照组相比 $P < 0.05$ (图 16A)。通过测定 BAL 流体中嗜酸性粒细胞数量来测定呼吸道炎症 ($n = 3$)。* 与 OVA 或对照组相比 $P < 0.05$ (图 16B)。

[0119] 对本领域技术人员而言显而易见的是, 可以对上述具体公开内容进行多种修改、改变和变化, 而不违背本文所要求保护发明的范围。

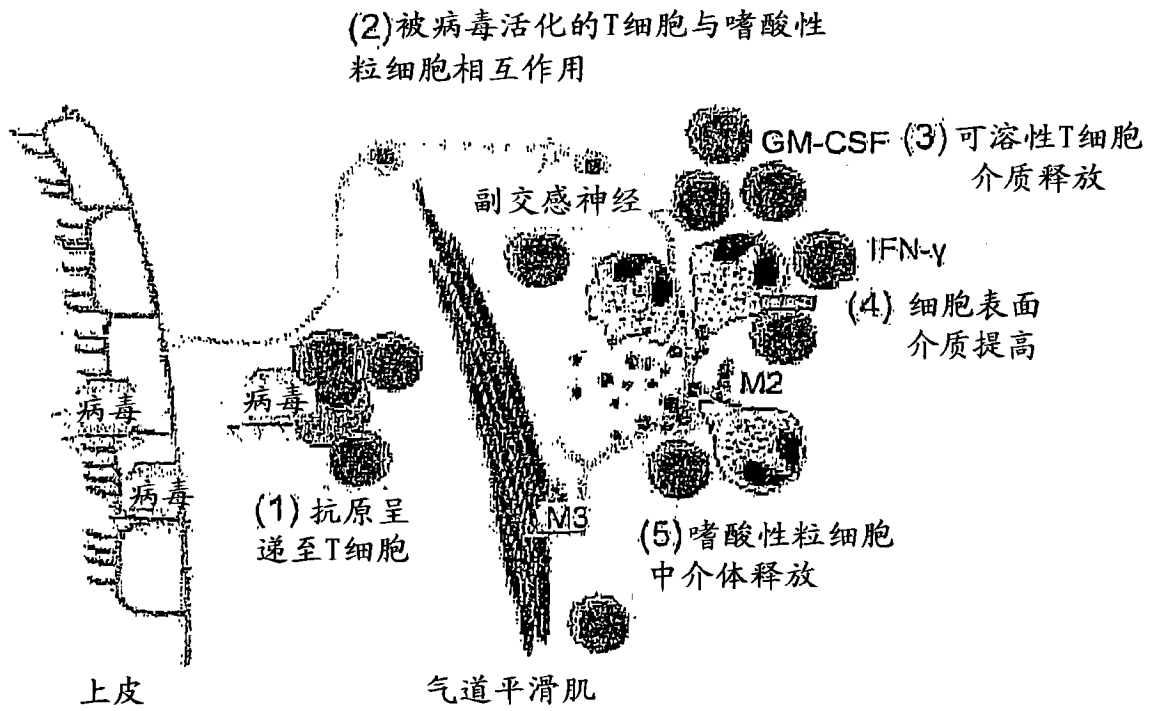


图 1

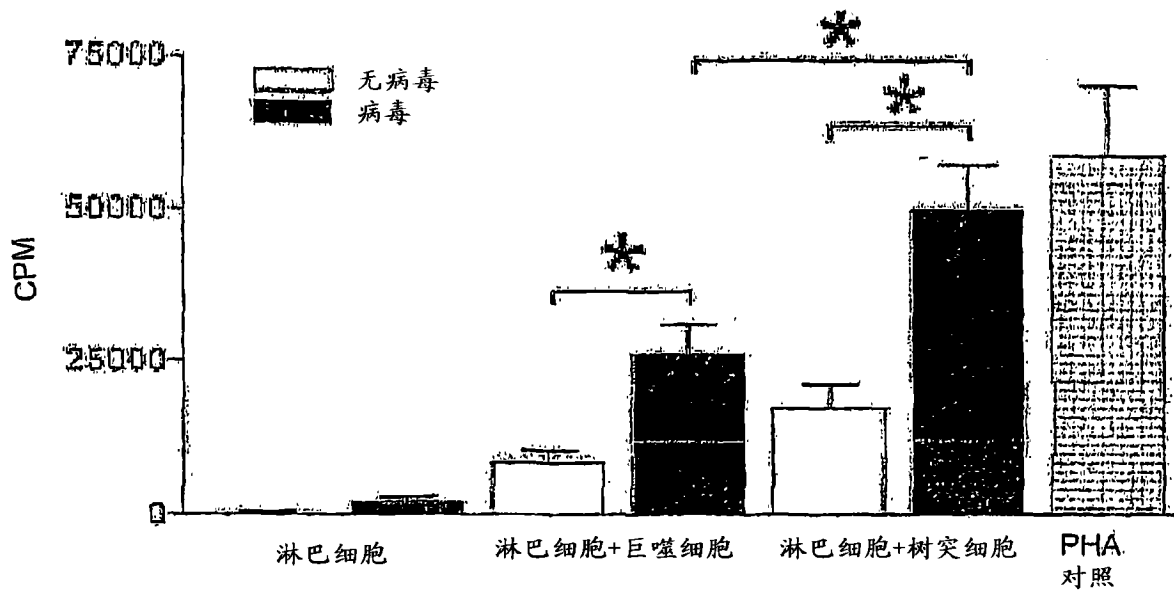
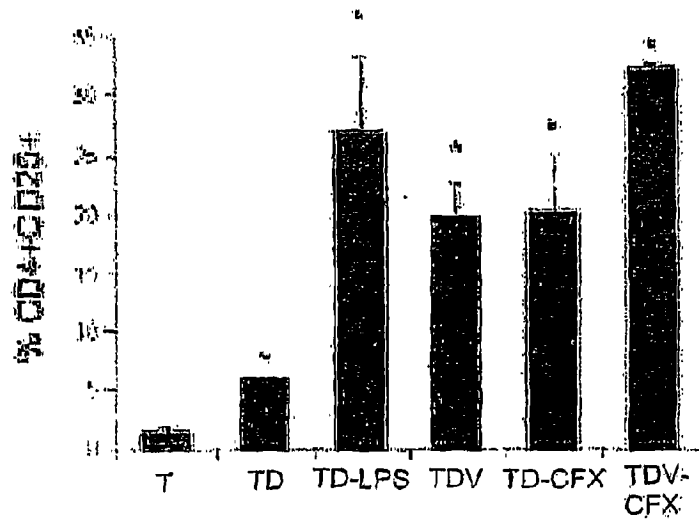
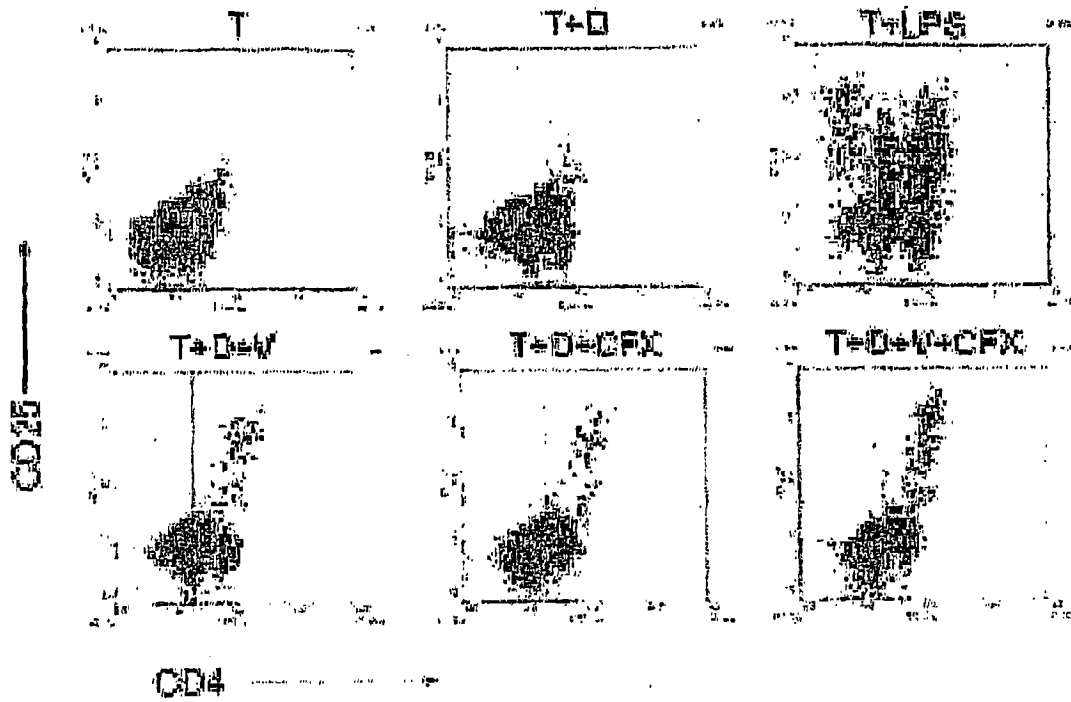


图 3



(N = 5, *p < 0.05)

图 4

	IL1b	IL2	IL4	IL10	IL12p70	IL13	IL15	IFNa	IFNg	TNF	RANTES	GMCSF
仅T细胞	1	1	1	↑	1	1	1	1	1	1	1	
T细胞 + LPS	↑	≈	≈	1	↑	↑	↑	≈	↑	≈	≈	
T细胞 + PHA	≈	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + ColdFX	≈	≈	≈	↑	↑	↑	↑	≈	↑	≈	↑	
T细胞 + RV	≈	·	≈	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + RSV	≈	≈	↑	↑	≈	≈	≈	≈	↑	↑	↑	
T细胞 + PIV	↑	≈	≈	↑	↑	≈	≈	≈	↑	≈	≈	
仅DC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DC + LPS	1	≈	↑	↑	↑	≈	↑	↑	↑	↑	↑	
DC + ColdFX	↑	≈	1	↑	↑	≈	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC	1	1	1	1	1	↑	1	1	1	1	1	
T细胞 + DC + LPS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + ColdFX	↑	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + RV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + RV + ColdFX	↑	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + RSV	↑	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + RSV + ColdFX	↑	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + PIV	↑	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
T细胞 + DC + PIV + ColdFX500	↑	·	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
与对照相比		高于 10X > 5X < 10X					≈		高于 0.5, 高于 0.25	低于 2X 低于 0.5		

图 5

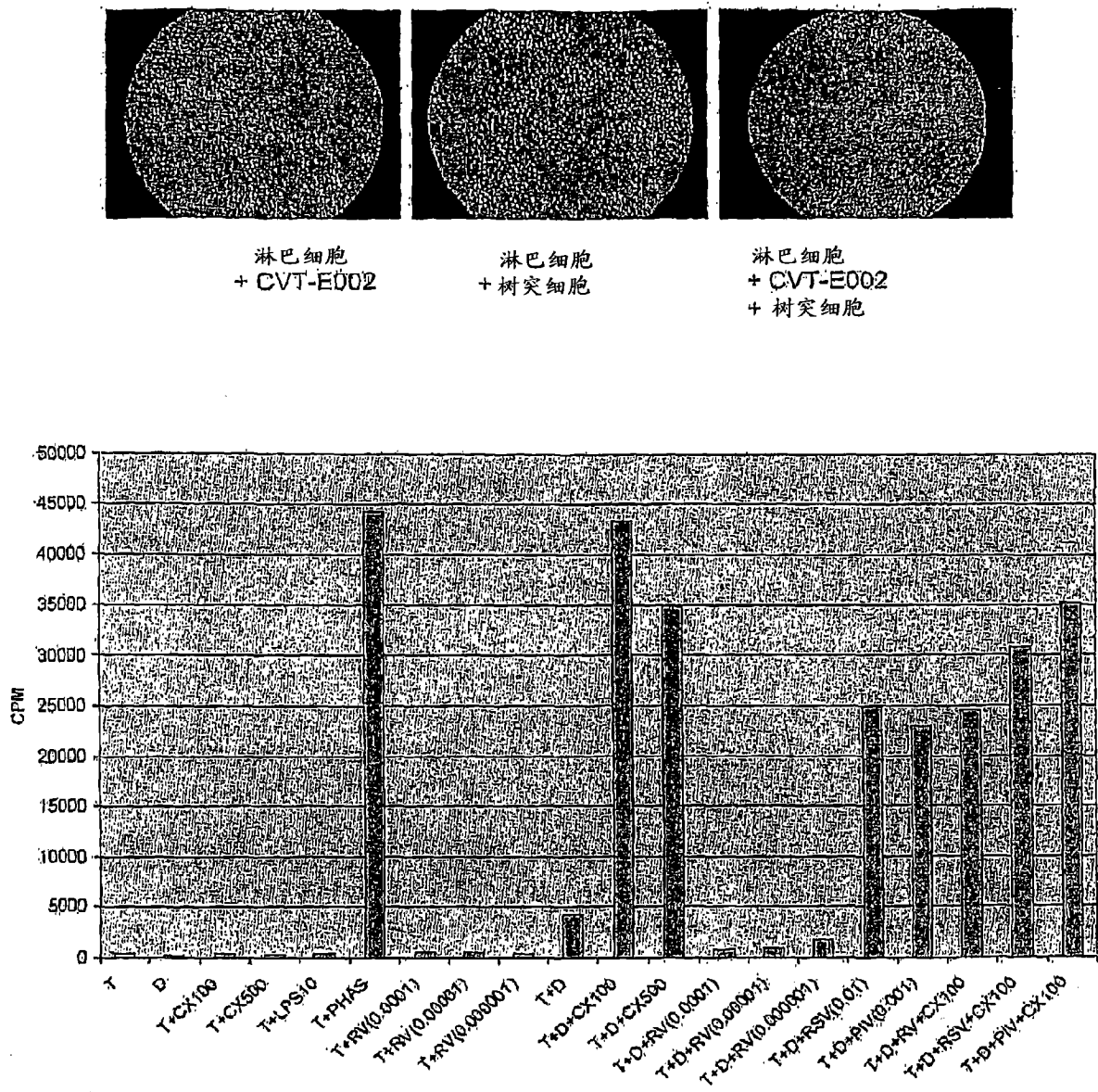


图 6

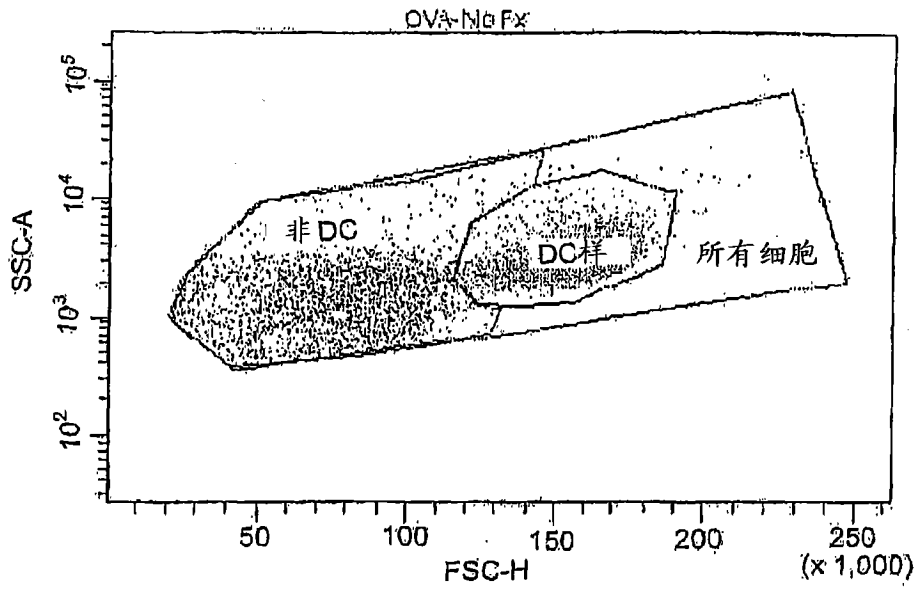


图 7A

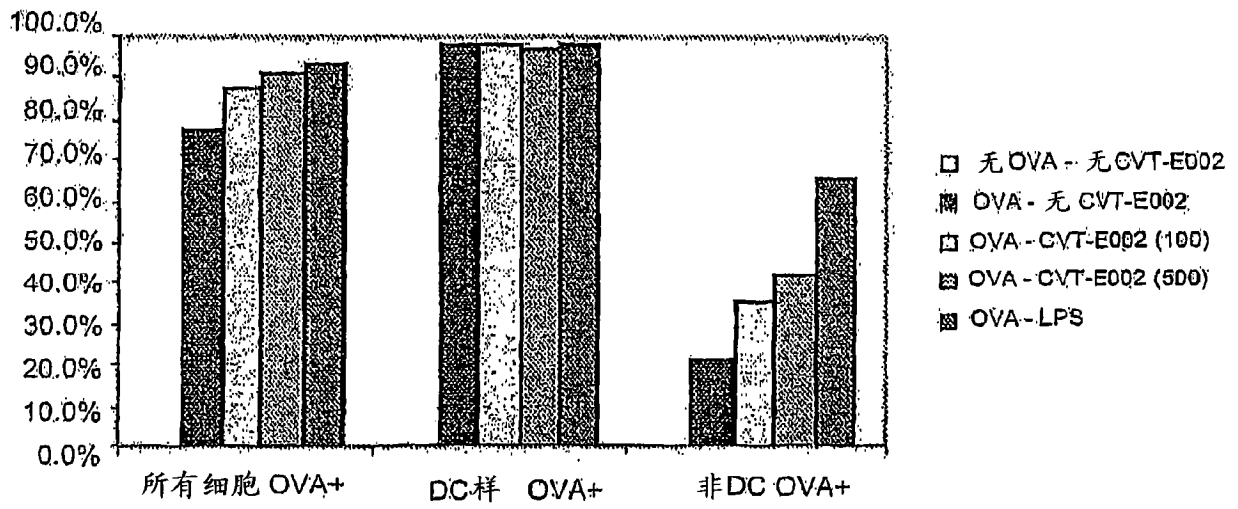


图 7B

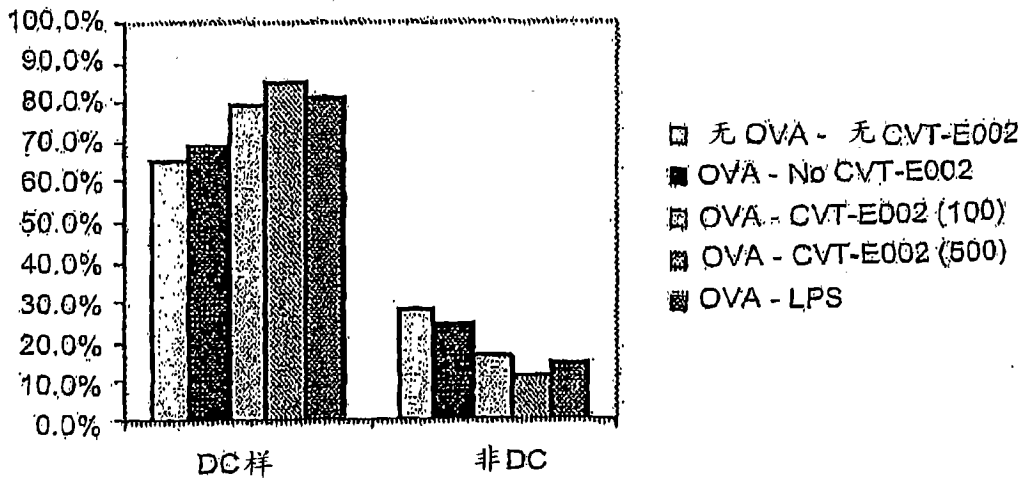


图 7C

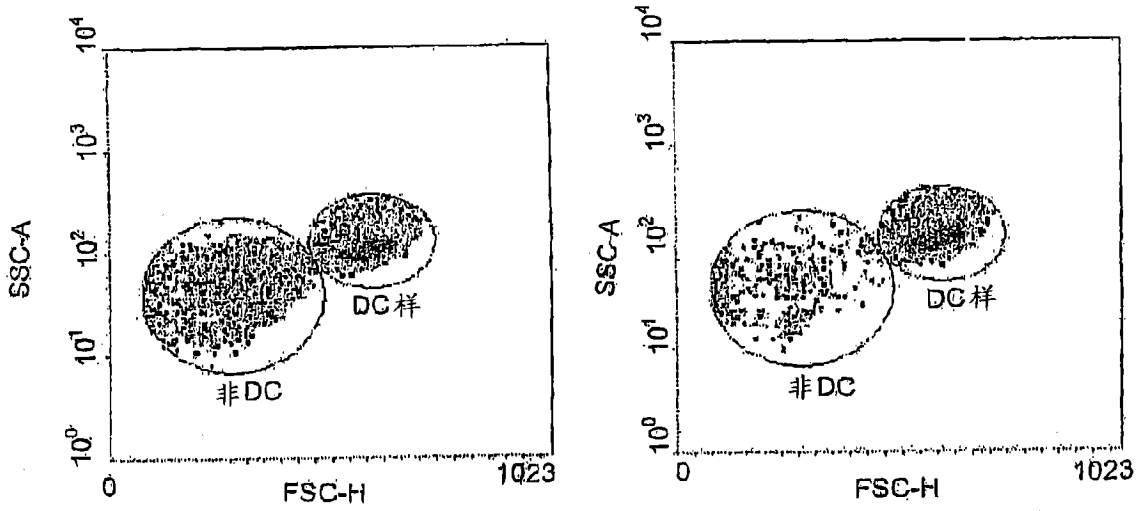


图 7D

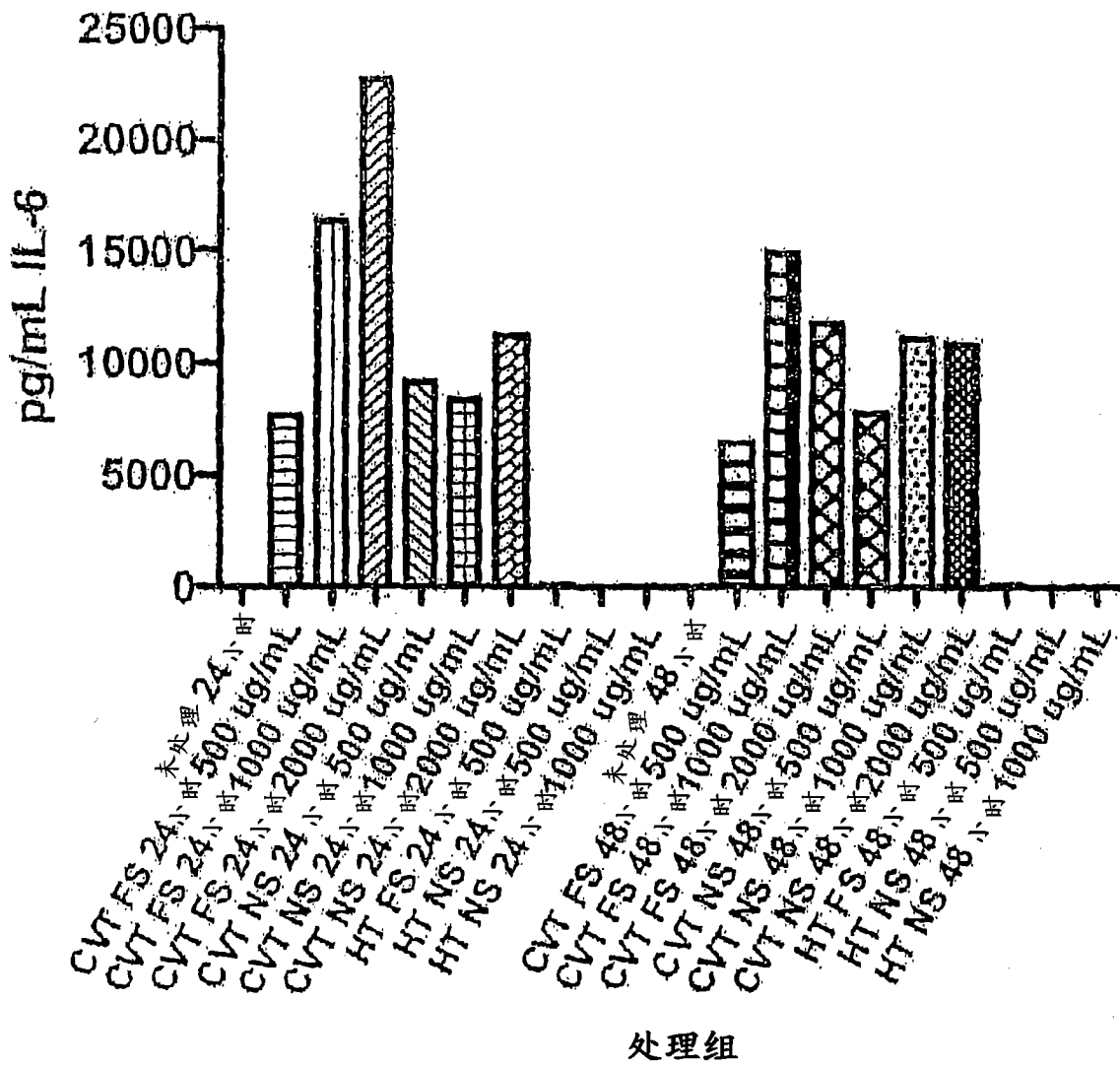


图 8A

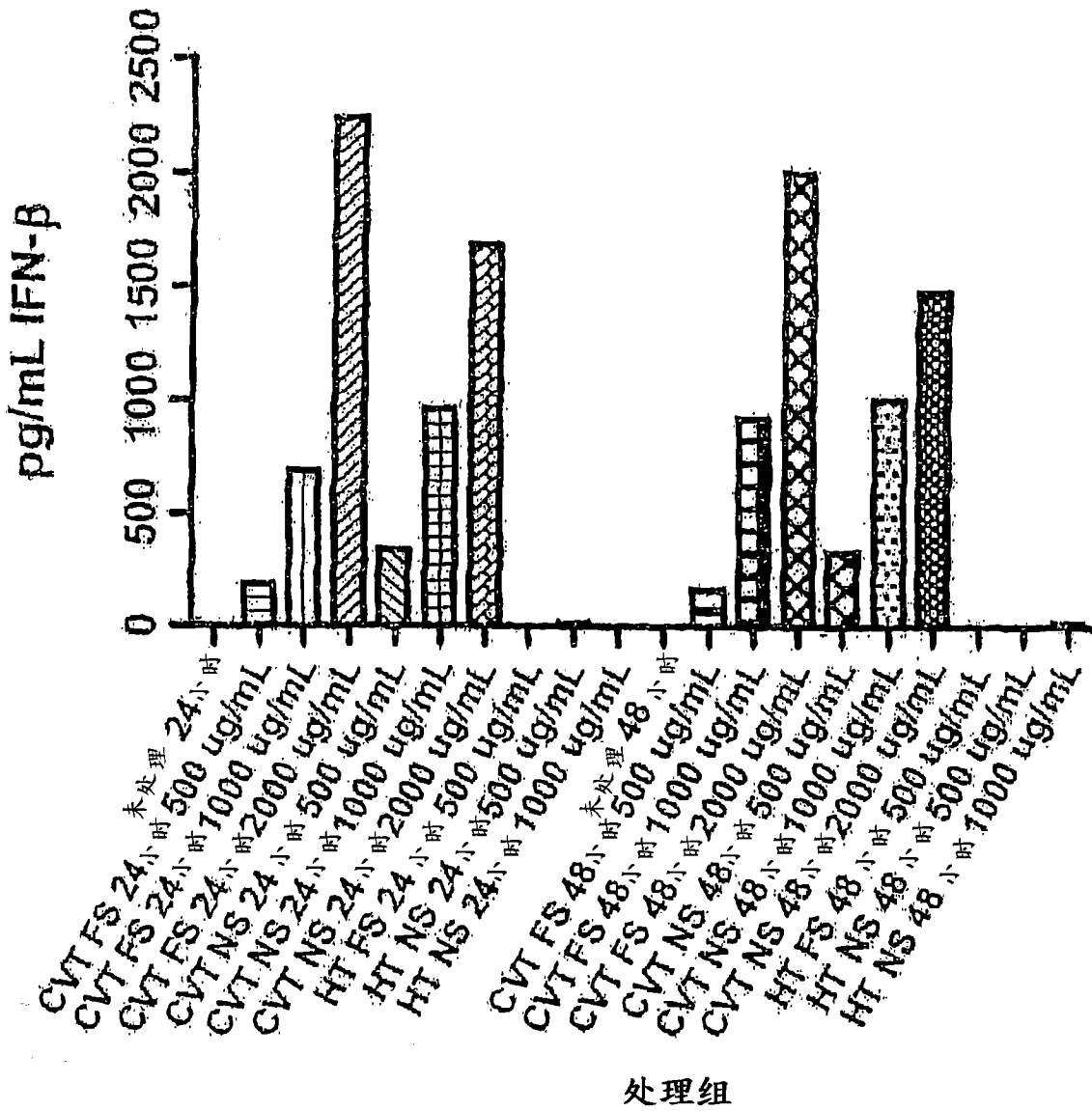


图 8B

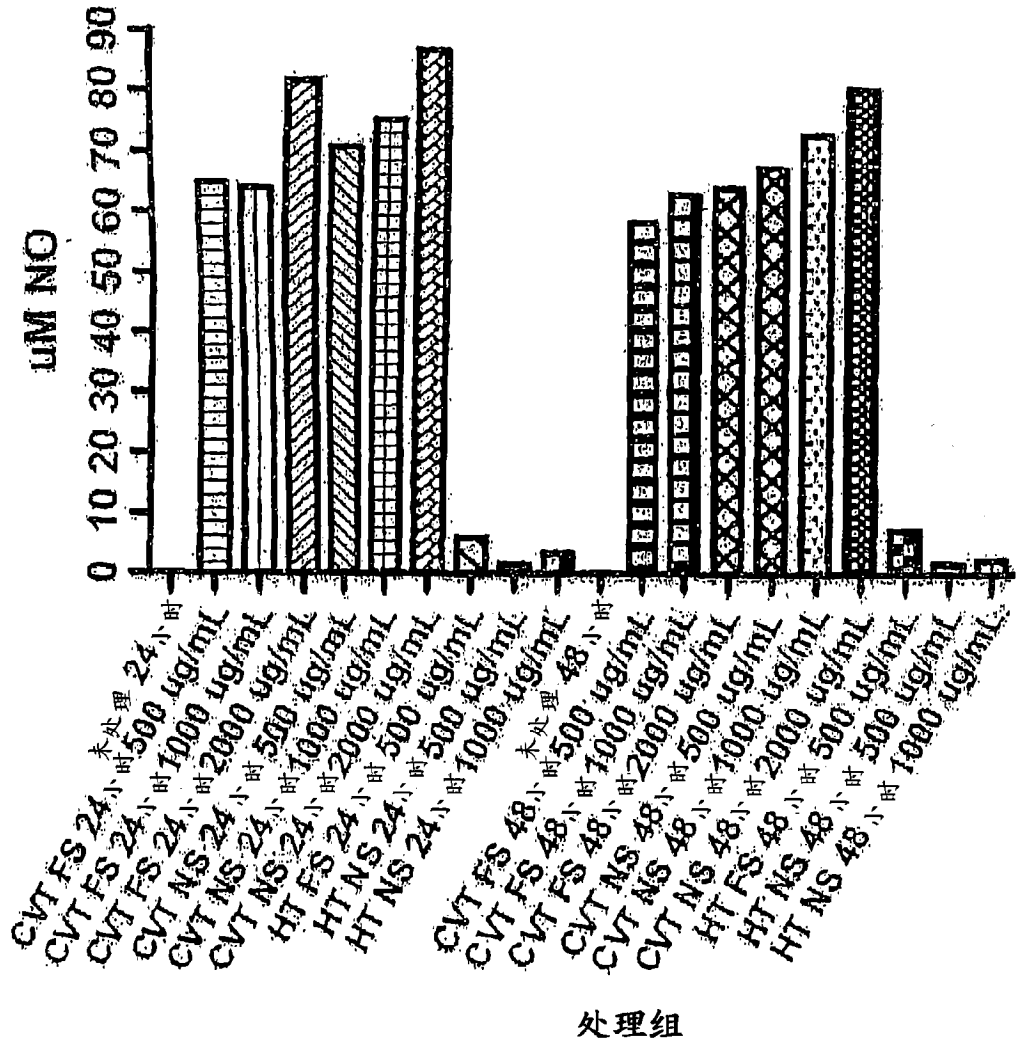


图 9

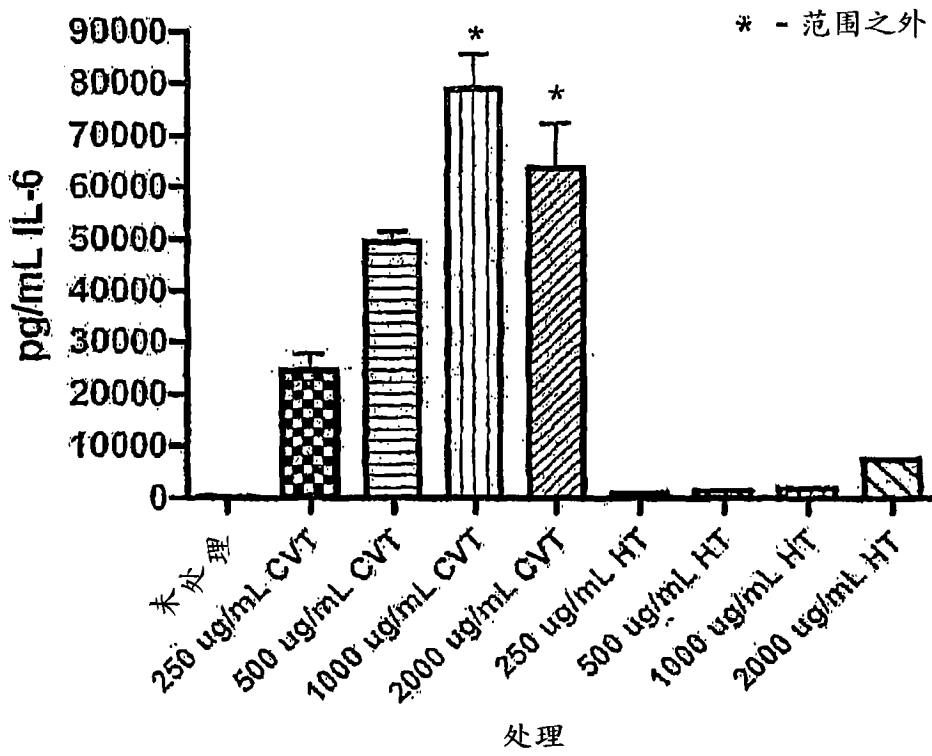


图 10

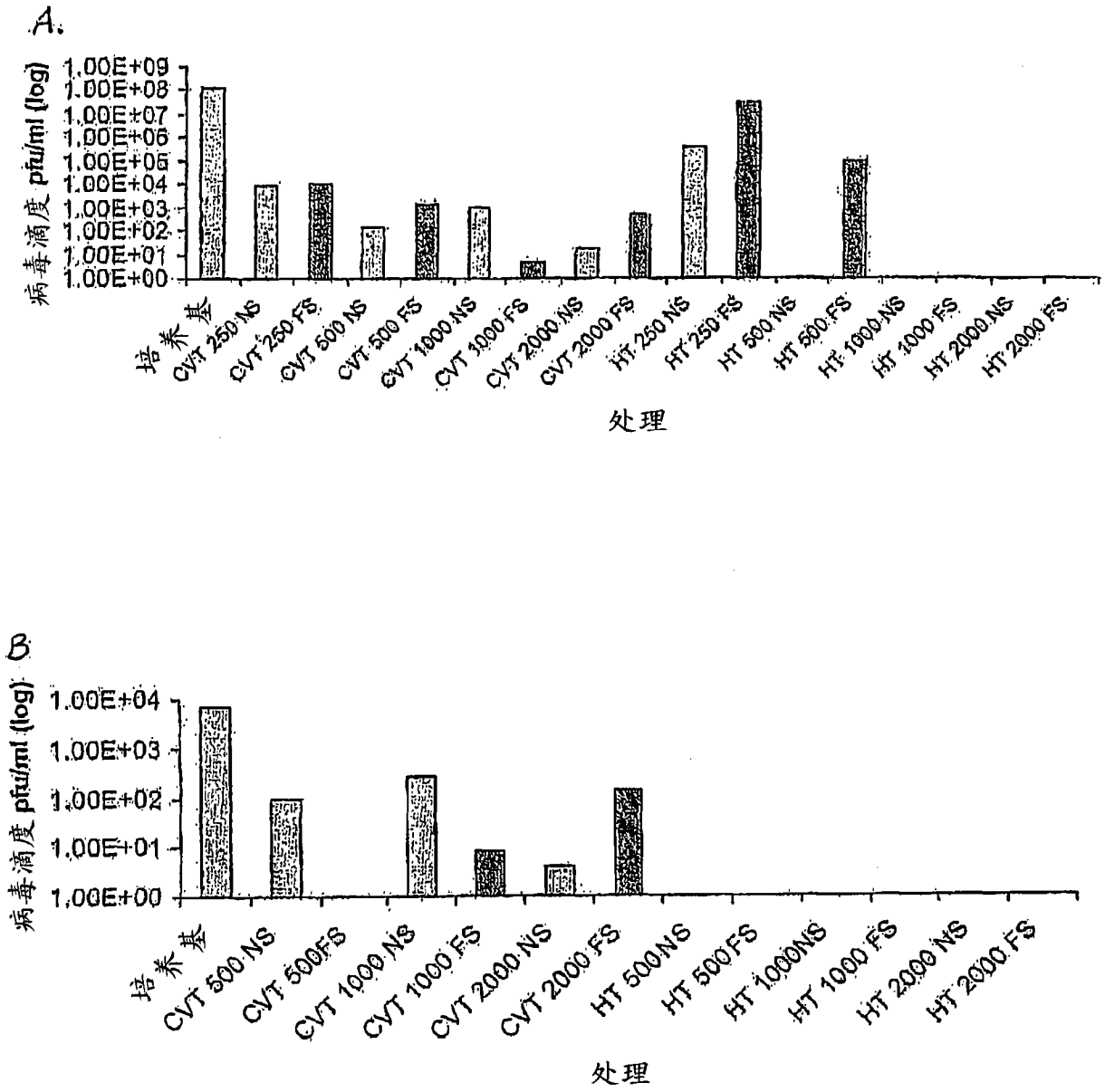


图 11

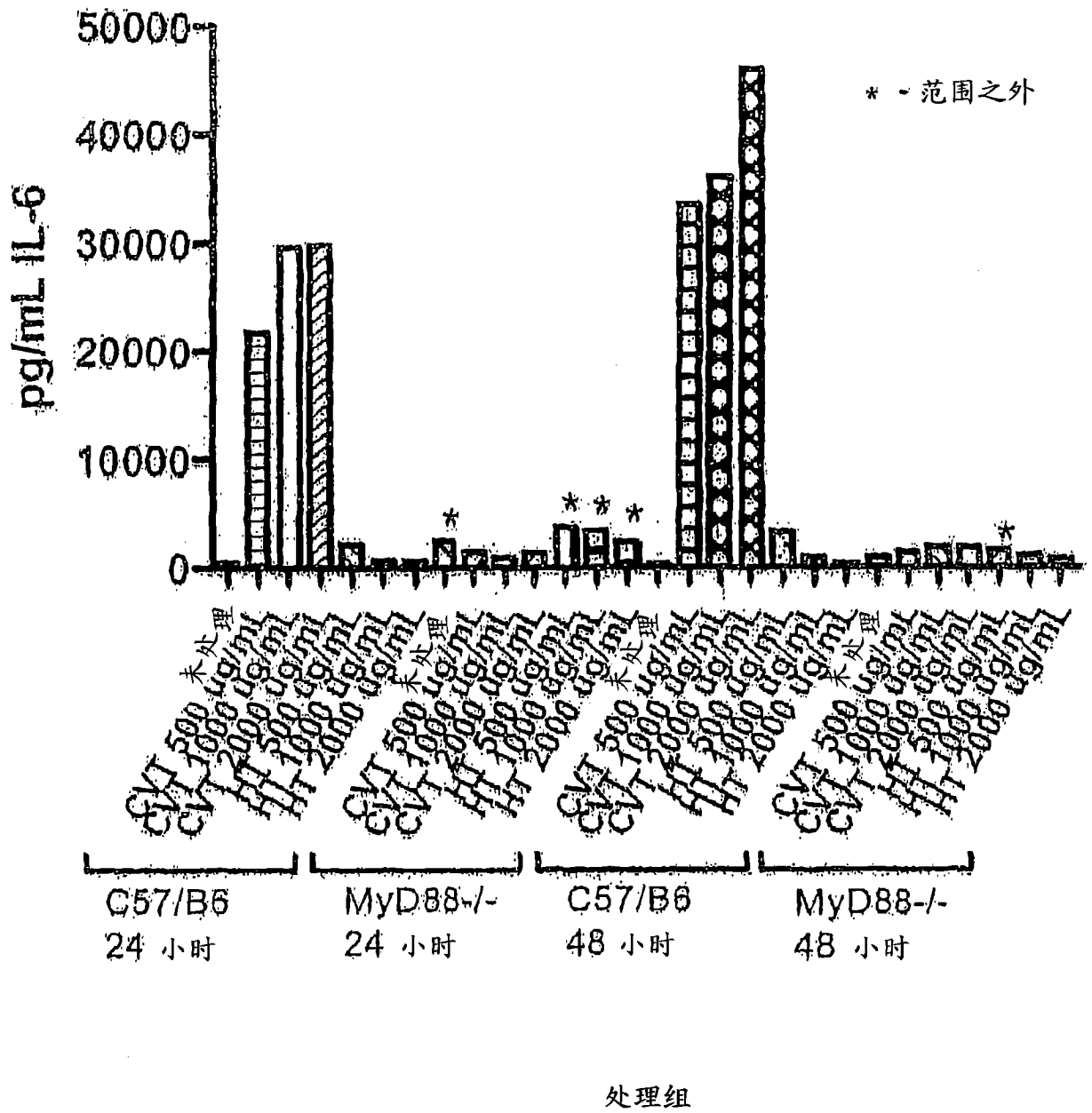


图 12

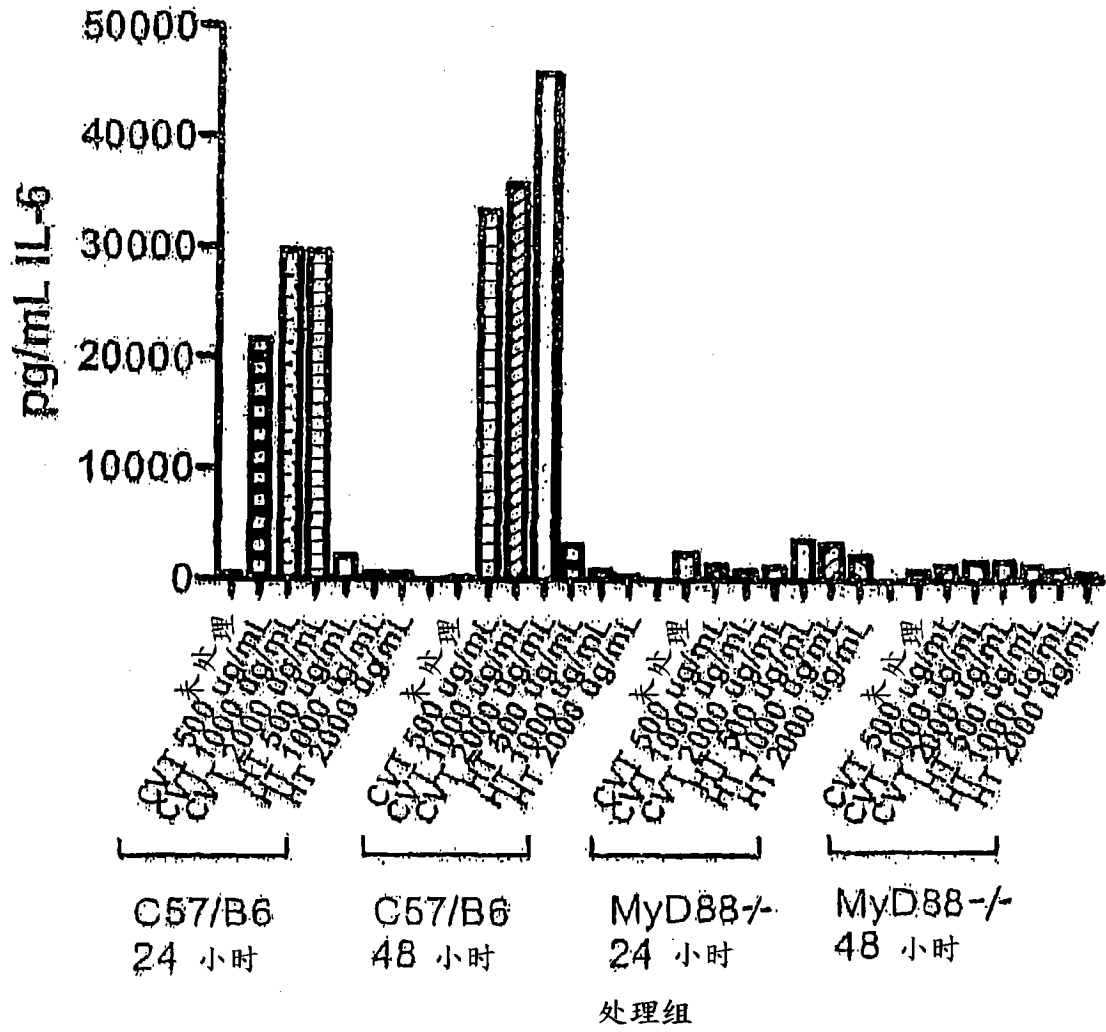


图 13A

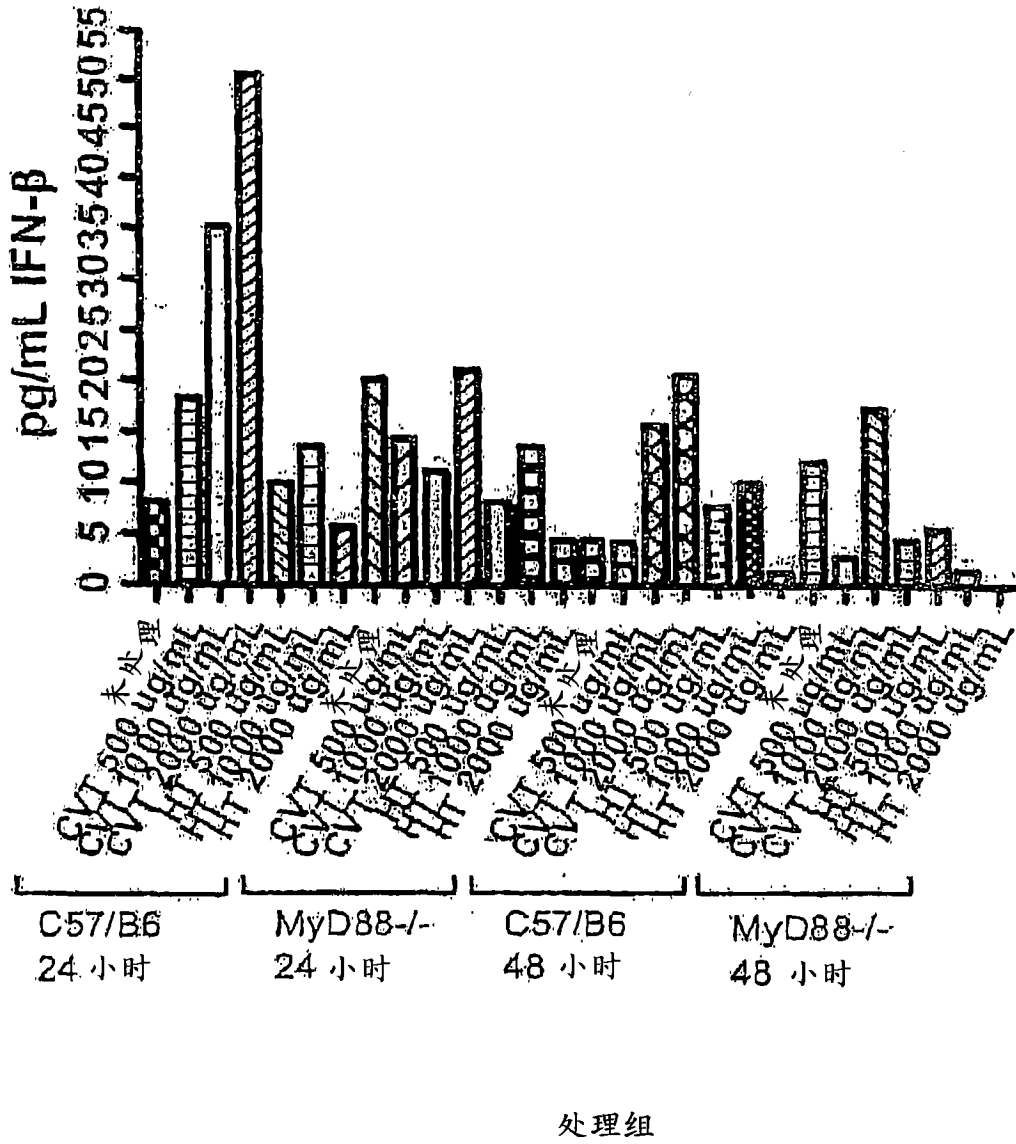


图 13B

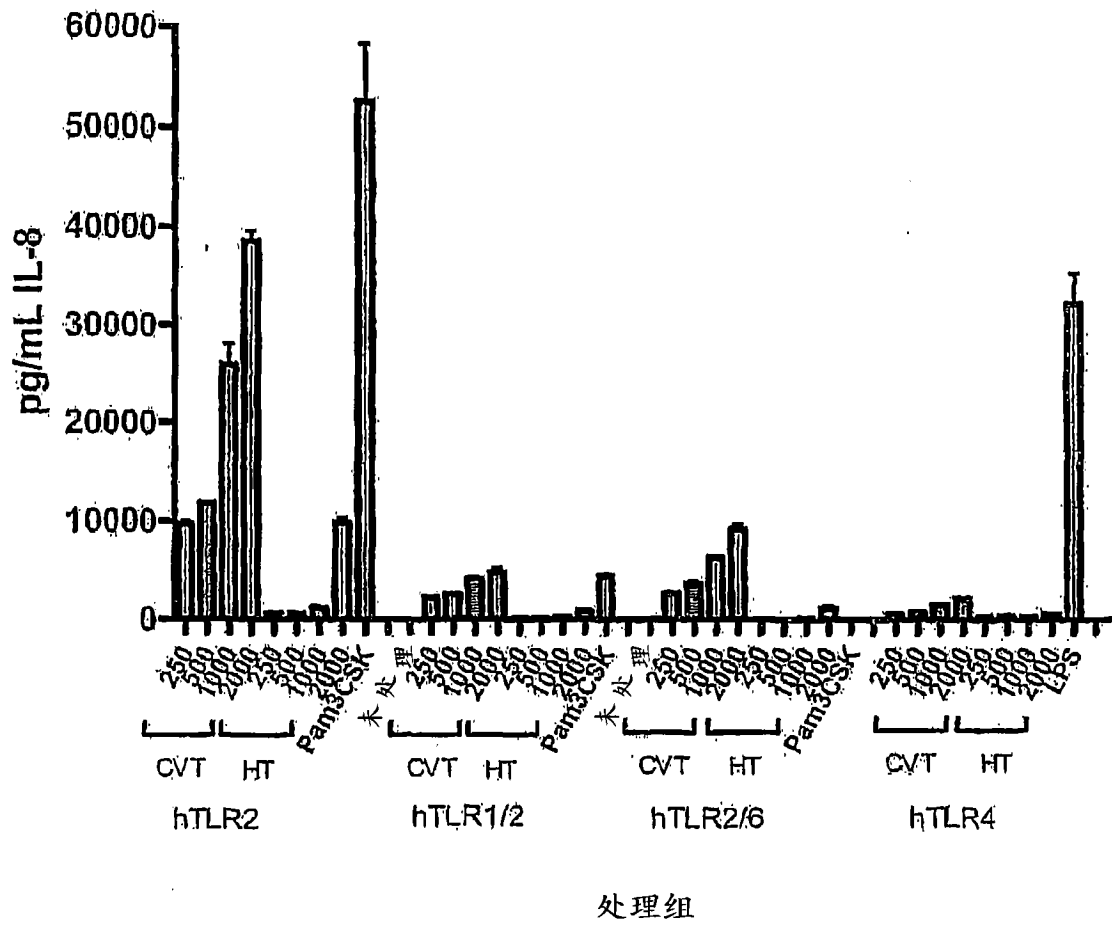


图 14

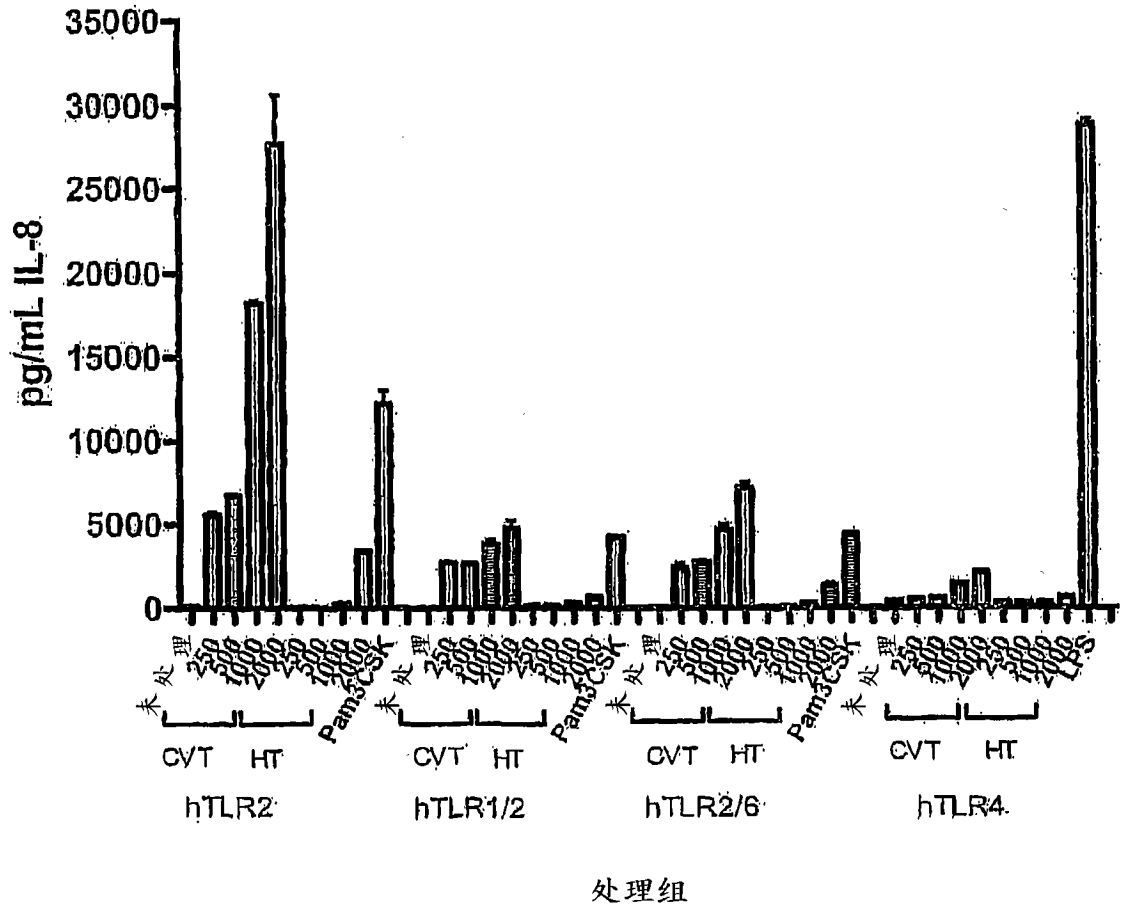


图 15

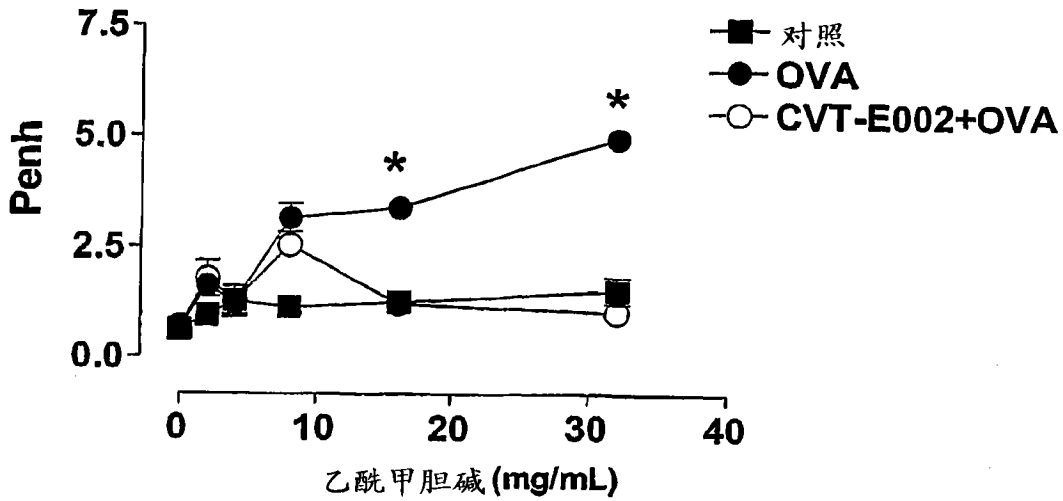


图 16A

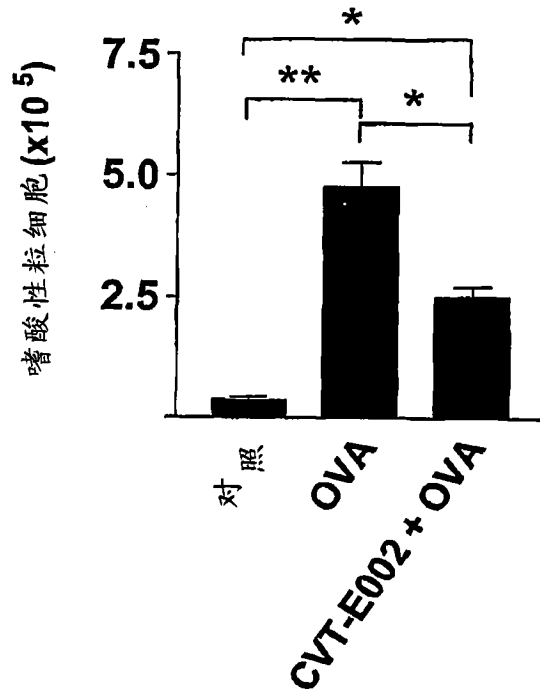


图 16B

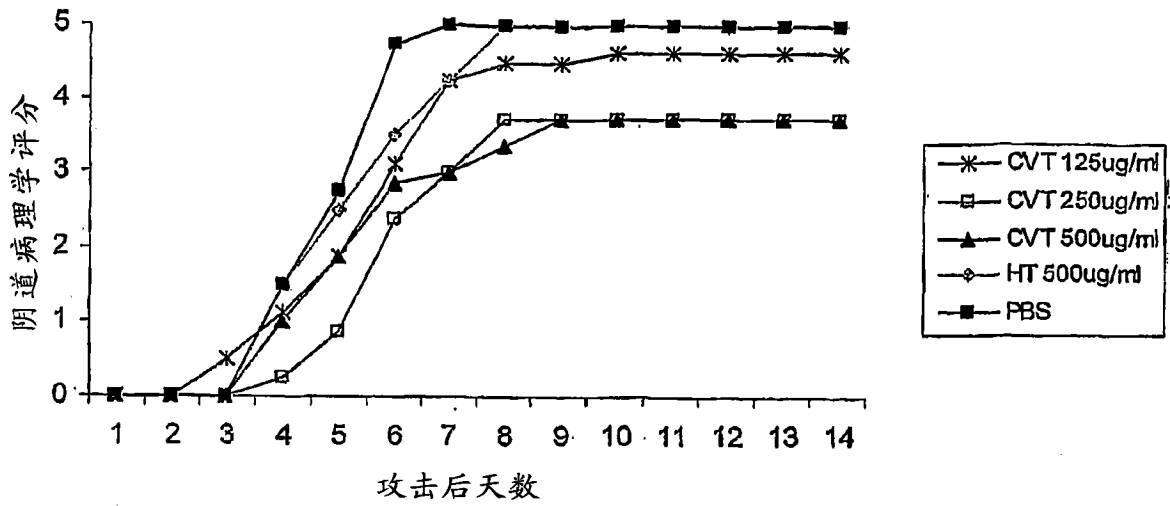


图 17A

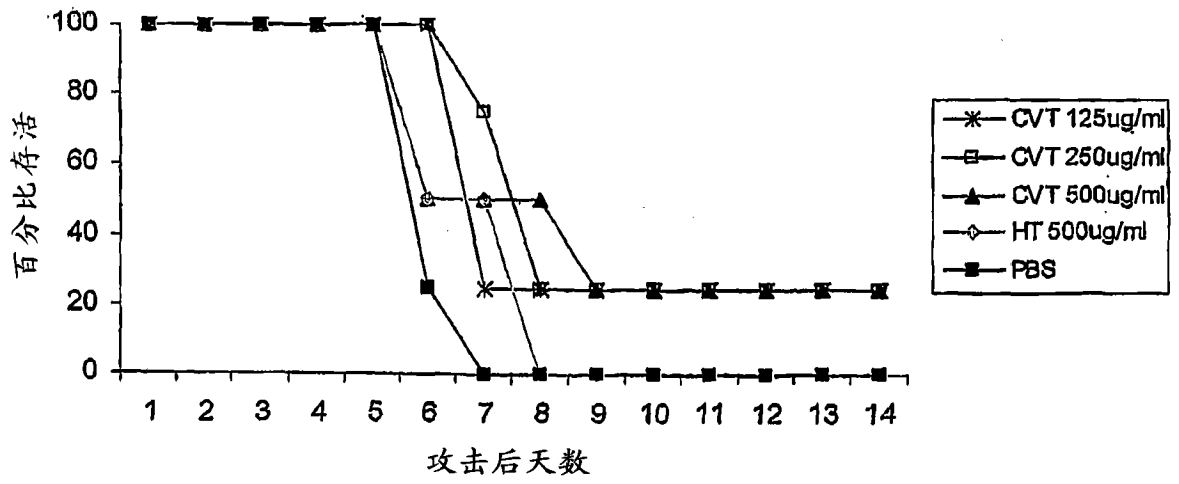


图 17B