



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0908541-6 A2



(22) Data do Depósito: 27/02/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 03/09/2009

(54) Título: ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES INATAS E ADAPTATIVAS POR UM EXTRATO DE GINSENG

(51) Int. Cl.: A61K 36/25; A61P 37/04.

(30) Prioridade Unionista: 29/02/2008 US 61/064,354.

(71) Depositante(es): AFEXA LIFE SCIENCES INC.

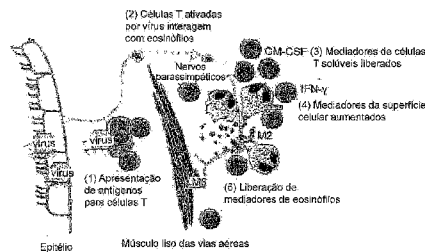
(72) Inventor(es): DARRYL J. ADAMKO; KENNETH L. ROSENTHAL; JACQUELINE SHAN; YINGQI WU; SHARLA SUTHERLAND.

(86) Pedido PCT: PCT IB2009000379 de 27/02/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/106975 de 03/09/2009

(85) Data da Fase Nacional: 27/08/2010

(57) Resumo: "ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES INATAS E ADAPTATIVAS POR UM EXTRATO DE GINSENG". ... A presente invenção refere-se a frações de ginseng e a métodos para ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição em um indivíduo, administrando ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma fração de ginseng, uma composição farmacêutica que compreende a fração em combinação com outro medicamento ou com um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, ou um item alimentício que compreende a fração. A fração pode ser fabricada a partir de *Panax quinquefolius* ou pode ser selecionada entre CVT-E002, PQ2, e PQ223 e frações purificadas a partir de CVT-E002, P02, e P0223.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES INATAS E ADAPTATIVAS POR UM EXTRATO DE GINSENG**".

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a frações de ginseng e métodos para ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição em um indivíduo, administrando ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma fração de ginseng, uma composição farmacêutica ou item alimentar que compreende a fração. Tais condições incluem alergi-  
10 as, asma, infecções virais e microbianas, e câncer. As frações de ginseng podem ser usadas como adjuvantes de vacinas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Um extrato solúvel em água patenteado das raízes de ginseng norte-americano (*Panax quinquefolium*), CVT-E002, está comercialmente  
15 disponível como COLD-FX®. Este extrato difere de outros produtos de ginseng asiáticos ou norte-americanos no teor de polissacarídeos e ginsenosídeos, consistindo principalmente em poli(furanosil-piranosil-saccarídeos. A qualidade de batelada a batelada do produto é certificada por tecnologia ChemBioPrint®, o que assegura sua consistência química bem como farma-  
20 cológica. Este extrato natural patenteado é conhecido por ter efeitos imunomoduladores (Wang *et al.* 2001, 2004). CVT-E002 intensifica a proliferação de células esplênicas do camundongo, e aumenta a produção de interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos peritoneais *in vitro*. A administração de CVT-E002 a camun-  
25 dongos aumentou os níveis séricos de anticorpos de imunoglobulina G (IgG) (Wang *et al.*, 2001) e a dosagem diária de CVT- E002 a camundongos com leucemia induzida por vírus aumentou as proporções de macrófagos e células NK na medula óssea e baço, e ao mesmo tempo, reduzindo os números de células leucêmicas (Miller, 2006). Em um estudo recente sobre células  
30 mononucleares do sangue periférico (PBMC) cultivadas com vírus influenza, CVT-E002 foi eficaz em intensificar a produção de IL-2 e interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Jing *et al.*, submetido). IL-2 e IFN $\gamma$  são citocinas de células T NK importan-

tes e estão associados a respostas imunes adaptativas específicas de vírus. Em um estudo clínico, uma suplementação de dose diária baixa de COLD-FX® a adultos saudáveis aumentou a proporção de células NK no plasma (Predy *et al.*, 2006).

5                    Sendo primeira linha de defesa contra patógenos microbianos, macrófagos e também células NK são componentes importantes de imunidade inata. Estas células atuam imediatamente para limitar a proliferação e disseminação de agentes infecciosos através da liberação de agentes antimicrobianos tais como citocinas, interferons e quimiocinas e por suas atividades fagocíticas ou citocíticas.

10                    Estudos pré-clínicos sugeriram o uso potencial de CVT-E002 para a profilaxia de infecções respiratórias superiores relacionadas a vírus, e um ensaio clínico que envolveu 198 idosos hospitalizados foi conduzido. Este estudo demonstrou que a administração diária de CVT-E002 por 4 meses

15                    durante uma ocasião de influenza reduziu o risco relativo de enfermidade respiratória aguda devido ao vírus influenza sincicial respiratório em até 89% (McElhaney *et al.*, 2004). Outro estudo demonstrou também que CVT-E002 reduziu significativamente a recorrência de infecções respiratórias em 323 adultos saudáveis de meia-idade (Predy *et al.*, 2005). O tratamento com CVT-

20                    E002 reduziu também a gravidade e duração de sintomas relacionados a infecções do trato respiratório superior em adultos saudáveis. Em um ensaio duplo-cego randomizado controlado com placebo de 43 adultos residentes na comunidade com 65 anos de idade ou mais velhos, a ingestão diária de CVT-E002 reduziu o risco relativo e a duração de sintomas respiratórios em

25                    48% e 55%, respectivamente. A administração diária de CVT-E002 demonstrou ser um meio terapêutico natural e seguro de prevenção de enfermidade respiratória em idosos saudáveis.

30                    O sistema imunológico de mamíferos desenvolveu múltiplos sistemas defensivos divididos e interativos para proteger contra infecções, que foram amplamente divididos em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos e atua quase imediatamente para limitar a proliferação precoce e dissemina-

ção de agentes infecciosos através da ativação de células fagocíticas e apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos, e iniciação de respostas inflamatórias através da liberação de uma série de citocinas, quimiocinas e fatores antimicrobianos, tais como interferons e defensinas. A imunidade inata é evolutivamente remota e por muitos anos seu estudo foi largamente ignorado por imunologistas como relativamente inespecífica. Para a maior parte, os seres humanos são protegidos contra infecção pelo sistema imunológico inato. Caso organismos infecciosos penetrem em defesas imunes inatas, as defesas inatas facilitam e orientam a geração de respostas imunes adaptativas que são direcionadas contra determinantes altamente específicos que são expressados singularmente pelo patógeno invasor. Estas respostas são dependentes do rearranjo de genes receptores de antígenos específicos em células B e células T, e resultam na produção de anticorpos específicos de antígenos de alta afinidade (imunidade humoral) e imunidade de células ou mediada por células. Os anticorpos facilitam a remoção, destruição ou neutralização de patógenos extracelulares e suas toxinas. As respostas imunes medidas por células T ajudam a eliminar ou controlar patógenos intracelulares. Em contraste com respostas imunes inatas, as respostas imunes adaptativas têm o ícone de memória imunológica específica.

Estudos anteriores tentaram determinar como o sistema imunológico do hospedeiro detecta infecção e como ele discrimina entre própria e patógenos ou não-própria infecciosa. A descoberta e caracterização de receptores do tipo Toll (TLRs) proporcionaram grande discernimento em reconhecimento imunológico inato e estabeleceram um papel fundamental do sistema imunológico inato em defesa do hospedeiro contra infecção (Akira *et al.*, 2006; Hargreaves e Medzhitov, 2005; Kawai e Akira, 2006; Philpott e Girardin, 2004; Seth *et al.*, 2006). Os TLRs são moléculas importantes na imunidade inata e adaptativa. O sistema imunológico inato usa múltiplas famílias de receptores de reconhecimento de padrões codificados por linhagem germinal (PRRs) para detectar infecção e disparar uma série de mecanismos de defesa antimicrobianos (Janeway e Medzhitov, 1998). Estes PRRs são evo-

lutivamente altamente conservados entre as espécies de plantas e moscas-das-frutas a mamíferos. A estratégia da reconhecimento imunológico inato baseia-se na detecção estruturas conservadas e essenciais presentes em muitos tipos de microorganismos e ausentes de células hospedeiras (Janeway, 1992; Janeway e Medzhitov, 1999). Como os alvos do reconhecimento imune inato são padrões moleculares conservados, eles são denominados padrões associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs têm características importantes que os tornam alvos ideais para a percepção imune inata. Os PAMPs são produzidos apenas por microorganismos e não por células hospedeiras. Esta é a base para a discriminação de próprios e não-próprios infecciosos. Os PAMPs são conservados entre microorganismos de uma dada classe, permitindo que um número limitado de PRRs detecte a presença de uma grande classe de patógenos invasores. Por exemplo, um padrão em LPS permite que um único PRR detecte a presença de quaisquer bactérias gram-negativas. Os PAMPs são essenciais para a sobrevivência microbiana e qualquer mutação ou perda de PAMPs é letal para o organismo ou reduz grandemente sua aptidão adaptativa. Estes novos discernimentos no reconhecimento imune inato estão revolucionando o entendimento da defesa imune, patogênese, e tratamento e prevenção de doenças infecciosas.

Os TLRs representam uma família de PRRs que são evolutivamente receptores transmembrana conservados que detectam PAMPs e funcionam como receptores de sinalização. Os TLRs foram descobertos em drosófilas onde eles desempenham um papel no desenvolvimento orientação ventral/dorsal das moscas-das-frutas (Stein *et al.*, 1991). Quando este gene foi mutado, descobriu-se que as moscas que desenvolveram eram "toll" que é uma gíria alemã para louca ou "incomum". Além disso, as moscas com mutação de Tolls demonstraram ser altamente suscetíveis a infecções fúngicas (Lemaitre *et al.*, 1996). Até hoje, 11 TLRs foram identificados em mamíferos, cada um percebendo um conjunto diferente de estímulos microbianos e ativando vias de sinalização distintas e fatores de transcrição que acionam respostas específicas contra os patógenos (Kawai e Akira, 2005). Os TLRs são glicoproteínas de membrana integral tipo I caracteriza-

das por domínios extracelulares que contêm vários números de modelos com repetições ricas em leucina (LRR), um domínio transmembrana e um domínio sinalizador citoplasmático homólogo àquele do receptor de interleucina-1 (IL-1R), denominado domínio de homologia Toll/IL-1R (TIR) (O'Neil, 2006). Os domínios LRR são constituídos de 19 a 25 modelos LRR tandem, tendo cada um deles um comprimento de 24 a 29 aminoácidos.

TLR4, o primeiro TLR de mamífero TLR descoberto, comprovou ser o receptor há muito tempo buscado para lipopolissacarídeos bacterianos gram-negativos (LPS) (Medzhitov *et al.*, 1997; Poltorak *et al.*, 1998). TLR2 reconhece peptidoglicano, além de lipoproteínas e lipopeptídeos de bactérias gram-positivas e micoplasma (Takeda *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 1999). TLR2 pode formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6 para discriminar entre diacil- e triacil-lipopeptídeos, respectivamente (Takeda *et al.*, 2003). Além disso, TLR2 em colaboração com o receptor não-TLR dectina-1 medeia a resposta a zymosan, encontrado na parede celular de leveduras (Gantner *et al.*, 2003). TLR5 reconhece flagelina, um componente proteico de flagelas bacterianas (Hayashi *et al.*, 2001). TLR11, um parente próximo de TLR5, foi encontrado de forma abundante expressado trato genitourinário de camundongos e foi associado à proteção contra bactérias uropatogênicas (Zhang *et al.*, 2004), e demonstrou recentemente reconhecer uma proteína semelhante a profilina a partir do protozoário parasita *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky *et al.*, 2005). TLR3, 7, 8 e 9 reconhecem ácidos nucleicos e não são expressados sobre a superfície celular, mas expressados exclusivamente em compartimentos endossômicos (Latz *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2003). TLR3 está envolvido no reconhecimento de RNA de filamento duplo (dsRNA) gerado durante infecção viral (Alexopoulou *et al.*, 2001), enquanto que TLR 7 e 8 proximamente relacionados reconhecem RNA viral de filamento único (ssRNA) rico em guanina ou uridina (Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004) e moléculas sintéticas semelhantes a imidazoquinolina, imiquimod e resiquimod (R-848) (Hemmi *et al.*, 2002; Jurk *et al.*, 2002). TLR9 medeia o reconhecimento de modelos de DNA CpG não-metilado bacteriano e viral (Hemmi *et al.*, 2000) e recentemente demonstrou também reconhecer

componentes patogênicos não-DNA, tal como hemozoína de parasitas maláricos (Coban *et al.*, 2005). TLR10 desempenha um papel na via inflamatória mediada por patógenos, reconhecimento de patógenos e ativação de imunidade inata, mas o ligante TLR10 é presentemente desconhecido.

5 Os TLRs podem ser divididos também em seis subfamílias principais, baseado na similaridade de sequências (Roach *et al.*, 2005), cada um reconhecendo PAMPS relacionados. A subfamília que consiste em TLR1, TLR2 e TLR6 reconhece lipopeptídeos, TLR3 reconhece dsRNA, TLR4 reconhece LPS, TLR5 reconhece flagelina, e a subfamília TLR9 que inclui  
10 TLR7 e TLR8 altamente relacionados reconhece ácidos nucleicos. O importante é que a localização subcelular de TLRs se correlaciona com a natureza de seus ligantes, ao invés de similaridade de sequências (Hargreaves e Medzhitov, 2005). TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10 estão presentes sobre a membrana plasmática superficial onde eles estão envolvidos na via inflamatória mediada por patógenos e/ou reconhecem componentes bacterianos e virais, enquanto que os TLRs antivirais, TLR3, 7, 8, e 9, são expressados em endossomas intracelulares. Como os ácidos nucleicos reconhecidos por TLRs antivirais são encontrados também em vertebrados, e sua localização em endossomas limita sua reatividade para ácidos nucleicos próprios (Barton *et al.*, 2006). TLR1 está presente sobre a superfície celular e é um receptor para bactérias uropatogênicas e protozoários parasitas.  
15

A sinalização por TLRs é complexa e foi revisada alhures (Akira e Takeda, 2004; O'Neill, 2006). Resumidamente, todos TLRs com a exceção do sinal de TLR3 através do fator 88 de diferenciação mieloide de molécula adaptadora (MyD88), uma proteína citoplasmática que contém um domínio de TIR e um domínio de morte. Enfim, NF- $\kappa$ B e MAPKs são ativados a jusante de TRAF6 levando à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12. Além de MyD88, o sinal de TLR3 e TLR4 através de TRIF, outro adaptador que contém TIR que é  
25 necessário para a produção de genes de interferons do tipo I e dependentes de interferons do tipo I.  
30

Os TLRs são expressados em uma série de células imunes e

não-imunes. Os macrófagos murinos expressam TLR1 -9, refletindo sua importância na iniciação de respostas pró-inflamatórias. As DCs plasmacitoides (pDCs) que produzem grandes quantidades de interferons tipo I durante infecções virais expressam TLR7 e 9. Todas DCs convencionais no camundongo expressam TLR1, 2, 4, 6, 8 e 9, enquanto que TLR3 fica confinado ao subconjunto CD8+ e CD4- CD8- DC (Iwasaki e Medzhitov, 2004). Em humanos, a expressão de TLR9 é restrita a pDCs e células B (Bauer *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001).

Há grande interesse no entendimento da expressão de TLRs em células epiteliais (ECs) de mucosas que servem como a primeira linha de defesa contra a maioria das infecções. Em estudos recentes (Yao X-D *et al.*, 2007), concentrou-se em entender a expressão e regulação de TLRs em ECs no trato genital de camundongos e humanos. Microdissecção por captura a laser (LCM) foi usada para demonstrar que o ciclo estral em camundongos fêmeos influencia profundamente a expressão de TLRs no epitélio vaginal. A expressão do RNAm de essencialmente todos TLRs exceto TLR11 foi aumentada significativamente durante o diestro e especialmente após o tratamento com a progestina de longa atuação Depo-Provera (Yao X-D *et al.*, manuscrito submetido). Estas descobertas contribuem para a compreensão de defesa imune inata contra infecções transmitidas sexualmente, e aumentam a qualidade da saúde reprodutiva das fêmeas.

A distribuição de ligantes de TLRs em mucosas, incluindo oligodesoxinucleotídeos CpG (ODN que é um ligante para TLR9), dsRNA, e flagelina, podem induzir um efeito antiviral inato que pode proteger camundongos contra desafio intravaginal (IVAG) com HSV-2 (Ashkar e Rosenthal, 2002). Estudos demonstraram que a administração intranasal de glicoproteína do envelope purificada (gB) de HSV-2 mais ODN CpG como um adjuvante induziu forte IgA e IgG específica de Gb no trato vaginal (persistindo durante o ciclo estral inteiro), bem como CTL específico de gB sistêmico e genital, e protegeu contra infecção letal por FVAG HSV-2 (Gallichan *et al.*, 2001). Subsequentemente, demonstrou-se que a imunização intranasal com HW-1 depletado de gp120 inativado mais ODN CpG induziu IgA anti-HTV no

trato genital e respostas imunes mediadas por células T específicas de HIV, incluindo a produção de quimiocinas IFN $\gamma$  e  $\beta$  (Dumais *et al.*, 2002). Além disso, camundongos imunizados por via intranasal com HIV-1 mais CpG induziram células T CD8+ no trato genital, proporcionando proteção cruzada  
5 contra desafio de clades com vírus da varicela recombinações que expressam HIV-1 gag de diferentes clades (Jiang *et al.*, 2005). Mais recentemente, embora o trato genital tenha sido considerado como sendo um local indutivo imune fraco, especialmente depois da imunização com antígenos não-replicantes, a imunização intravaginal (IVAG) de camundongos fêmeas com  
10 a subunidade recombinante HSV-2 gB mais CpG induziu níveis mais altos de anticorpos de IgG e IgA específicos de Gb no soro e em lavagens vaginais versus camundongos imunizados com o antígeno isoladamente e os camundongos imunizados com gB mais CpG estavam mais bem protegidos contra infecção por HSV-2 (Kwant e Rosenthal., 2004). Assim sendo, é possível induzir respostas imunes protetoras depois da imunização IVAG com  
15 um antígeno proteína com subunidade não-replicante desde que um adjuvante de mucosa apropriado seja usado.

Estudos recentes demonstraram que PAMPs, incluindo DNA CpG, dsRNA, e LPS eram capazes de inibir o vírus do herpes simples tipo 2 (HSV-2) e o vírus da estomatite vesicular (VSV) *in vitro* (Ashkar *et al.*, 2003  
20 Sc 2004). Uma única dose de ODN CpG distribuída por via transmucosa para a mucosa vaginal, na ausência de qualquer antígeno, protegeu contra infecção genital com doses letais de HSV-2. Esta proteção foi mediada pelo sistema imunológico inato, pois ela ocorreu em camundongos *knockout* que  
25 careciam de células B e T. A distribuição IVAG local IVAG de ODN CpG resultou em rápida proliferação de e espessamento no epitélio vaginal e indução de um estado antiviral dependente de TLR-9 que não bloqueou a entrada do vírus, mas inibiu a replicação viral em células epiteliais vaginais (Ashkar *et al.*, 2003). A administração para a mucosa de dsRNA, o ligante de  
30 TLR3, protegeu contra infecção vaginal por HSV-2 sem a inflamação local ou sistêmica observada com ODN CpG (Ashkar *et al.*, 2004). Portanto, a distribuição local do ligante de TLR3 pode ser um meio mais seguro para prote-

ger contra infecção viral genital.

Os TLRs induzem uma série de respostas dependendo do tipo de célula na qual elas são ativadas (Ashkar e Rosenthal, 2002; Iwasaki e Medzhitov, 2004). Por exemplo, o tratamento de DCs com DNA CpG que atua através de TLR9 ativa as DCs para amadurecer, incluindo a regulação ascendente de MHC classe II e moléculas co-estimuladoras, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, e intensificação da apresentação de antígenos. Similarmente, o tratamento de células B com CpG induz sua ativação e proliferação, secreção de anticorpo bem como IL-6 e IL-10, e as células B ficam resistentes à apoptose. A ativação de células imunes por intermédio de DNA CpG induz uma resposta dominada por Th1.

Os mecanismos pelo quais os PRRs medeiam a defesa do hospedeiro contra patógenos são o cerne de intensa pesquisa. Devido à sua capacidade de intensificar respostas imunes inatas, há uma necessidade de se obter estratégias inusitadas para usar ligantes, agonistas ou antagonistas sintéticos de PRRs (isto é, "produtos imunológicos inatos") como agentes autônomos para proporcionar proteção ou tratamento contra infecção por bactérias intracelulares, parasitas e vírus. Além disso, a ativação do sistema imunológico inato através de PRRs, usando seus respectivos ligantes ou agonistas representa uma estratégia para intensificar respostas imunes contra patógenos específicos, tornando-os agentes que sinalizam por intermédio de PRRs adjuvantes potenciais de vacinas.

Há uma necessidade de se obter uma fração ou composição herbácea natural, que ativa especificamente as respostas imunes inatas e adaptativas para tratar condições associadas tais como alergias, asma, infecções virais e microbianas, e câncer sem causar efeitos colaterais prejudiciais ou desconforto. Os tipos de respostas imunes são bem conhecidos. Respostas Th1 são caracterizadas pela geração de células T exterminadoras e certos anticorpos em resposta a patógenos intracelulares e defeitos intracelulares tais como cânceres. Respostas Th2 combatem patógenos extracelulares. Reações alérgicas ocorrem em resposta a substâncias ambientais (isto é, alérgenos), e são o resultado de respostas Th2 específicas. As

respostas Th2 são caracterizadas pela geração de outros tipos específicos de anticorpos e são típicas de reações alérgicas, nas quais um alérgeno é erroneamente tido como patógeno sobre a superfície da mucosa e dispara uma resposta que resulta em sintomas tais como olhos lacrimejantes, inflamação das vias aéreas e contração células musculares das vias aéreas nos pulmões. A ativação de TLRs induz as células apresentadoras de antígenos a produzirem citocinas que favorecem respostas imunes Th1, prevenindo ou reduzindo desta forma o desenvolvimento de respostas Th2 prejudiciais devido à exposição a alérgenos.

10 As alergias são caracterizadas especificamente pela ativação excessiva de leucócitos denominados mastócitos e basófilos por IgE, resultando em uma resposta inflamatória extrema. Quando uma pessoa suscetível a alergias é inicialmente exposta a um alérgeno, grandes quantidades do anticorpo de IgE específico correspondente são produzidas. As moléculas de  
15 IgE aderem à superfície de mastócitos (no tecido) ou basófilos (na circulação). Os mastócitos são encontrados nos pulmões, pele, língua, e revestimentos do nariz e trato intestinal. Quando um anticorpo de IgE sobre um mastócito ou basófilo encontra seu alérgeno específico, o anticorpo de IgE sinaliza para o mastócito ou basófilo liberar produtos químicos tais como his-  
20 tamina, heparina, e substâncias que ativam plaquetas sanguíneas e atraem células secundárias tais como eosinófilos e neutrófilos. O mastócito ou basófilo ativado sintetiza novos mediadores, incluindo prostaglandinas e leucotrienos. Estes mediadores químicos causam os sintomas associados a alergias, incluindo respiração dificultosa e sibilante, espirro, olhos gotejantes e  
25 coceira. As reações alérgicas comuns incluem eczema, urticárias, febre do feno, asma, alergias alimentares, e reações ao veneno de insetos picadores tais como vespas e abelhas.

Uma exacerbação de asma é uma deterioração séria na função pulmonar de um paciente, resultando frequentemente em hospitalização e  
30 mesmo morte. A asma ocorre quando as principais passagens de ar dos pulmões, os tubos brônquicos, ficam inflamadas. Os músculos das paredes brônquicas estreitam, e as células nos pulmões produzem mais muco estreiti-

tando ainda mais as vias aéreas, causando respiração sibilante leve até dificuldade severa em respirar. A asma é frequentemente disparada por uma infecção viral respiratória, tal como o resfriado comum, mas outros irritantes tais como fumaça de cigarro, ácaros da poeira, caspa de animais, pólen de plantas, poluição do ar, desodorantes e perfume podem tornar os sintomas mais frequentes, severos, e incontroláveis. Outros disparadores de asma incluem exercício, ar frio, e tensão emocional. A maioria das exacerbações de asma é precipitada por infecções virais comuns das vias aéreas. Em crianças, sendo atópicas e tendo uma infecção viral, são dois fatores de risco importantes para serem admitidas em um hospital devido a enfermidade de respiração dificultosa e sibilante. Embora a importância clínica de ataques de asma e especificamente a exacerbação viral da asma seja evidente, as razões pelas quais os pacientes com asma se tornam tão enfermas depois de serem infectadas pelos vírus do resfriado comum permanecem sendo pouco entendidas.

Normalmente, as infecções virais causam um influxo de neutrófilos para dentro das vias aéreas com um componente de células mononucleares grandes de predominantemente células T CD8+. Entretanto, ficou evidente que as infecções virais podem produzir uma série de respostas inflamatórias, incluindo eosinofilia das vias aéreas, dependendo das condições preexistentes do hospedeiro. Em indivíduos atópicos, a infecção experimental por rinovírus aumenta o recrutamento de eosinófilos para as vias áreas depois do desafio pelo antígeno e causa maior reatividade das vias aéreas em comparação com indivíduos não alérgicos. Depois da infecção intranasal por rinovírus, biópsias das vias aéreas inferiores de indivíduos asmáticos contêm maior quantidade de eosinófilos, o que persiste mesmo na convalescência. Em pacientes com asma, a presença de eosinófilos nas vias aéreas durante os períodos de exacerbações foi bem estabelecida. A descoberta de eosinófilos nas vias aéreas durante a exacerbação da asma se torna um tanto paradoxal, considerando que estas exacerbações são frequentemente disparadas por infecção viral. Embora a associação de eosinófilos e seus produtos de desgranulação nas vias aéreas tenha sido descrita durante in-

fecção viral em pacientes com asma, não se sabe se os eosinófilos estão ativos em resposta ao vírus e como esta ativação poderia ocorrer.

Para que uma exacerbação de asma ocorra, o a atual compreensão sugere que células efectoras (isto é, eosinófilos, mastócitos, basófilos, neutrófilos) podem ser ativadas. A figura 1 ilustra um modelo de liberação de mediadores de eosinófilos, induzida por vírus nas vias aéreas, que resulta em hiper-reatividade das vias aéreas por intermédio de disfunção do controle neural do músculo liso das vias aéreas. O vírus ou antígeno de vírus é apresentado para células T de memória. Células T ativadas (CD4) liberam um fator de desgranulação solúvel desconhecido, similarmente a uma citocina, tal como GM-CSF. Estas células T podem também expressar ligantes da superfície celular, por exemplo, ICAM-1. Os eosinófilos respondem ao mediador solúvel, ligantes da superfície celular, ou uma combinação deles com liberação de vários mediadores de eosinófilos (isto é, a proteína básica importante de eosinófilos, eosinófilo peroxidase, RANTES).

Em asmáticos, a liberação de mediadores de eosinófilos, induzida pelo vírus nas vias aéreas se correlaciona com o desenvolvimento de exacerbação de asma. Para que o eosinófilo seja envolvido no desenvolvimento de exacerbações de asma induzida por vírus, ele deve responder ao vírus indiretamente por intermédio de outra célula ou diretamente. Este processo representaria a liberação de mediadores de eosinófilos, induzida por vírus.

Médicos ocidentais têm sido relutantes em prescrever remédios herbáceos devido à falta de pesquisa científica das suas propriedades preventivas e terapêuticas. Entretanto, os remédios herbáceos não requerem o tempo extenso de desenvolvimento e os altos custos normalmente encontrados com fármacos sintéticos. Além disso, eles estão facilmente disponíveis e oferecem ao indivíduo uma alternativa mais confortável e não dispendiosa com mínimos efeitos colaterais em comparação com medicações receitadas ou vacinas.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um méto-

do para tratar uma condição suscetível ao tratamento por ativação de sinalização de imunidade inata em um indivíduo que necessita esse tratamento, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de pelo menos uma fração de ginseng. Em uma modalidade, a condição é selecionada entre uma alergia, asma, infecção viral, infecção microbiana ou câncer. Em uma modalidade, a infecção viral é de um vírus respiratório ou transmitido pela mucosa, incluindo, porém sem limitações, vírus influenza, coronavírus, vírus do herpes, vírus sincicial respiratório, rabdovírus, ou vírus da imunodeficiência humana.

10 Em uma modalidade, a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado entre *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegator*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidi-*  
15 *is*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, ou ginseng vermelho. Em uma modalidade, a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração é selecionada entre CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> ou frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>. Em uma modalidade, a fração é CVT-E002. Em uma modalidade, CVT-E002 modula a transdução de sinais a partir de um receptor semelhante a Toll. Em uma modalidade, o receptor  
20 semelhante a Toll é o receptor semelhante a Toll 2. Em uma modalidade, o receptor semelhante a Toll é um heterodímero do receptor semelhante a Toll 2 e do receptor semelhante a Toll 6. Em uma modalidade, o receptor semelhante a Toll é um heterodímero do receptor semelhante a Toll 2 e do receptor semelhante a Toll 1. Em uma modalidade, o receptor semelhante a Toll é  
25 receptor semelhante a Toll 4. Em uma modalidade, CVT-E002 induz a regulação ascendente de linfócitos e células apresentadoras de antígenos, secreção de citocinas, secreção de fatores antivirais, ou combinações deles.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a uma fração de ginseng para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição. Em uma modalidade, a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado entre *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax*

30

*notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, ou ginseng vermelho. Em uma modalidade, a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração é selecionada entre CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> ou frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>. Em uma modalidade, a fração é CVT-E002.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende uma fração de ginseng em combinação com outro medicamento ou com um ou mais carreadores farmacêuticamente aceitáveis, incluindo itens alimentícios para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição. Em uma modalidade, a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado entre *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, e ginseng vermelho. Em uma modalidade, a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração é selecionada entre CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> ou frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>. Em uma modalidade, a fração é CVT-E002.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um item alimentício que compreende uma fração de ginseng para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição. Em uma modalidade, a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado entre *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, ou ginseng vermelho. Em uma modalidade, a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração é selecionada entre CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> ou frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>. Em uma modalidade, a fração é CVT-E002.

Em outra modalidade, a presente invenção refere-se ao uso de uma fração de ginseng para a preparação de uma composição farmacêutica ou um item alimentício para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição. Em uma modalidade, a  
5 condição é selecionada entre uma alergia, asma, infecção viral, infecção microbiana ou câncer. Em uma modalidade, a infecção viral é de um vírus respiratório ou transmitido pela mucosa, incluindo, porém sem limitações, vírus influenza, coronavírus, vírus do herpes, vírus sincicial respiratório, rabdovírus, ou vírus da imunodeficiência humana. Em uma modalidade, a fração é  
10 fabricada a partir de um ginseng selecionado entre *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, ou ginseng vermelho. Em uma modalidade, a fração é uma fração de  
15 *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração é selecionada entre CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>23</sub> ou frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>23</sub>. Em uma modalidade, a fração é CVT-E002.

Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método para ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou  
20 melhorar uma condição em um indivíduo que necessita dessa ativação, administrando uma fração de ginseng ou uma composição farmacêutica que compreende a fração em combinação com outro medicamento ou com um ou mais carreadores farmacêuticamente aceitáveis, incluindo itens alimentícios, ao indivíduo.

25 Em ainda outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método para prevenir, tratar ou melhorar uma condição associada à ativação da sinalização de imunidade inata, compreendendo modular a transdução de sinais a partir de receptores semelhantes a Toll, administrando uma fração de ginseng a um indivíduo que necessita dela.

### 30 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra um modelo de trabalho de liberação de mediadores de eosinófilos, induzida por vírus nas vias aéreas.

A figura 2 ilustra a liberação de eosinófilo peroxidase a partir de eosinófilos humanos depois de cocultura com vírus parainfluenza e várias combinações de linfócitos autólogos, células dendríticas, e macrófagos ( $p < 0,001$ ). Cada barra é a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de pelo menos doze experimentos usando diferentes doadores.

A figura 3 ilustra que a proliferação de linfócitos (medida pela incorporação de  $H^3$ -timidina) ocorre depois de seis dias de cultura ( $34^\circ C$ , 5% de  $CO_2$ ) com vírus parainfluenza e células apresentadoras de antígeno (isto é, macrófagos e células dendríticas). Cada barra é a média + erro padrão da média (SEM) de pelo menos cinco experimentos usando diferentes doadores para o vírus ativo. Resultados similares foram obtidos com RSV (dados não ilustrados).

A figura 4 ilustra os resultados de citometria de fluxo para caracterizar linfócitos em co-cultura com células dendríticas.

A figura 5 ilustra uma tabela que lista citocinas/quimiocinas medidas por ELIS A/Searchlight,  $n=1$ . As setas representam valores em relação ao respectivo controle apropriado.

A figura 6 ilustra a que proliferação de linfócitos (visualizada por microscopia luminosa e medida por incorporação de  $H^3$ -timina) ocorre depois de seis dias em cultura ( $34^\circ C$ , 5% de  $CO_2$ ) com linfócitos, CVT-E002 e células dendríticas.

As figuras 7A-D ilustram os resultados da análise por citometria de fluxo da apresentação de antígeno e maturação de DCs. A figura 7A ilustra as subpopulações de células. A figura 7B ilustra os resultados da triagem de células quanto à absorção de DQ-OVA e degradação sob diferentes condições. Os valores representam a porcentagem de células dentro de cada categoria que são DQ-OVA positivas. A figura 7C ilustra a avaliação da maturação de DCs por meio de tamanho e granularidade (os valores representam a porcentagem de células totais presentes em cada categoria). A figura 7D são imagens da citometria de fluxo, representando as subpopulações de DC sem (à esquerda) e com (à direita) tratamento com CVT-E002.

As figuras 8A e 8B ilustram que o tratamento com CVT-E002 es-

estimula a produção de IL-6 (figura 8A) e IFN- $\beta$  (figura 8B) em células RAW264.7 *in vitro*.

A figura 9 ilustra que o tratamento com CVT-E002 estimula a produção de óxido nítrico *in vitro*.

5 A figura 10 ilustra a produção de IL-6 por monócitos/macrófagos humanos primários depois da incubação com CVT-E002.

As figuras 11A e 11B ilustram que CVT-E002 inibe significativamente a replicação de VSV *in vitro*.

10 A figura 12 ilustra a produção de IL-6 durante o tratamento com CVT-E002 ou HT-1001 de macrófagos peritoneais de MyD88 $^{-/-}$  e C57BL/6.

As figuras 13A e 13B ilustram a produção de IL-6 (figura 13A) ou IFN- $\beta$  (figura 13B) durante o tratamento com CVT-E002 ou HT-1001 de macrófagos peritoneais de C57BL/6 e MyD88 $^{-/-}$ .

15 A figura 14 ilustra que o tratamento com CVT-E002 durante um período de 24 horas estimula a produção de IL-8 em células 293 transfectadas com hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 e hTLR4 (Controles Pam3CSK/LPS). hTLR4 representa a co-expressão de hTLR4 com MDR e CD14.

20 A figura 15 ilustra que o tratamento com CVT-E002 durante um período de 48 horas estimula a produção de IL-8 em células 293 transfectadas com hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 e hTLR4 (Controles Pam3CSK/LPS). hTLR4 representa a co-expressão de TLR4 com MDR e CD 14.

25 As figuras 16A e 16B ilustram que o tratamento com CVT-E002 inibe o desenvolvimento de hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) (figura 16A) e diminui a quantidade de inflamação eosinofílica das vias aéreas (figura 16B).

30 As figuras 17A e B demonstram que a distribuição de CVT-E002 para interfaces de mucosas oferece proteção contra um vírus (HS V-2) distribuído para as mesmas superfícies de mucosas. A figura 17A ilustra as pontuações de patologia vaginal de camundongos C57BL/6 que receberam CVT-E002, HTIOOI ou PBS rVAG após desafio com HS V-2 IVAG. A figura 17B ilustra a sobrevivência percentual de camundongos C57BL/6 que receberam CVT-E002, HTIOOI ou PBS IVAG após desafio com HSV-2 IVAG.

Aspectos e vantagens adicionais da presente invenção ficarão evidentes a partir da descrição que se segue. Deve-se entender, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indicando modalidades preferidas da invenção, são fornecidos meramente a título ilustrativo, pois várias mudanças e modificações dentro do espírito e âmbito da invenção ficarão evidentes para os versados nessas técnicas a partir desta descrição detalhada.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Quando se descreve a presente invenção, todos os termos não definidos têm seus significados comuns reconhecidos nessas técnicas. Como a descrição que se segue é de uma modalidade específica ou uso específico da invenção, pretende-se que seja meramente ilustrativa e não limitativa da invenção reivindicada. A descrição que se segue pretende cobrir todas alternativas, modificações e equivalentes que estão incluídas no espírito e âmbito da invenção, como definida nas reivindicações apensadas.

Como aqui utilizados e nas reivindicações, os termos e frases enunciadas abaixo têm os significados que se seguem.

"Biocompatível" significa não gerar qualquer resposta indesejável significativa do hospedeiro para a utilidade pretendida. Mais preferivelmente, os materiais biocompatíveis são atóxicos para a utilidade pretendida. Assim sendo, para utilidade humana, biocompatível é mais preferivelmente atóxico para os seres humanos ou tecidos humanos.

"Carreador" significa um veículo apropriado que é biocompatível e farmacologicamente aceitável, incluindo, por exemplo, um ou mais diluentes sólidos, semissólidos, ou líquidos, excipientes, adjuvantes, sabores, ou substâncias de encapsulação que são apropriadas para administração.

"Indivíduo" significa seres humanos ou outros vertebrados. O indivíduo pode ser uma criança ou um adulto.

Um "alimento funcional" é similar em aparência, ou pode ser um alimento convencional que é consumido como parte de uma dieta usual, e demonstra ter benefícios fisiológicos e/ou reduzir o risco de doença além das funções nutricionais básicas, isto é, eles contêm um ingrediente ativo.

Um "produto nutracêutico" é um produto isolado ou purificado a partir de alimentos, que é comercializado genericamente em formas medicinais associadas com alimentos. Um produto nutracêutico deve ter um benefício fisiológico ou proporcionar proteção contra doença.

5 Um "adjuvante de vacina" significa qualquer substância ou composto capaz de promover uma resposta imune aumentada ou intensificada quando adicionado a uma vacina.

Uma "vacina" significa qualquer composto ou preparação de antígenos desenhada para estimular uma resposta imune normal. A vacina pode ser profilática ou terapêutica.

10 "Quantidade eficaz" e/ou "quantidade terapêutica" significa uma dosagem suficiente para proporcionar prevenção, tratamento e/ou melhora do estado doentio que está sendo tratado. Ela variará dependendo do paciente, da doença e do tratamento que está sendo efetuado. Por exemplo, no caso de uma infecção viral, uma "quantidade eficaz" é aquela quantidade necessária para melhorar substancialmente a possibilidade de tratar a infecção, particularmente àquela quantidade que melhora a possibilidade e prevenir infecção ou eliminar infecção com sucesso quando ela ocorreu.

20 Uma "fração" significa uma preparação concentrada obtida a partir da extração de uma planta ou parte de planta com um solvente apropriado, tal como, por exemplo, água, etanol, uma mistura deles, óleos ou qualquer outro solvente apropriado bem conhecido nessas técnicas de extração vegetal. A fração ou extrato pode ser usado como está caso seja farmacologicamente aceitável, ou o solvente das soluções resultantes é removido e o resíduo é usado como está depois de elaboração adicional, por exemplo, depois de resolver ou recolocar em suspensão em um solvente apropriado. O termo "planta" significa a planta integral e partes da planta que compreendem os ingredientes ativos, por exemplo, as folhas, hastes, frutos ou raízes.

30 "Ginseng" significa qualquer variedade e tipo de ginseng, incluindo, porém sem limitações, aqueles listados abaixo.

TABELA 1. Variedades e Tipos de Ginseng

## Nomes Latinos / Nomes Comuns

Os versados nessas técnicas devem entender que há muitos outros gêneros de plantas do gênero *Panax* pertencentes ao espécime das araliáceas a partir das quais as frações de ginseng podem ser obtidas e usadas dentro do contexto da presente invenção. O termo "ginseng" inclui também ginseng selvagem ou processado. O ginseng selvagem é ginseng que não foi plantado e cultivado domesticamente, mas cresce naturalmente e é colhido de qualquer lugar onde ele é encontrado crescendo. O ginseng processado inclui, por exemplo, ginseng fresco ou verde, ginseng branco, e ginseng vermelho. O ginseng fresco ou verde é ginseng bruto colhido no campo. O ginseng branco é obtido desidratando o ginseng fresco, e o ginseng vermelho é obtido cozinhando no vapor o ginseng fresco, e em seguida, desidratando o ginseng cozido no vapor.

Uma "fração de ginseng" or "frações de ginseng" significa frações de qualquer variedade e tipo de ginseng listado na tabela 1 ou descrito acima, e subfrações obtidas a partir destas frações de ginseng, que apresentam a atividade de ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição em um indivíduo, verificada conduzindo uma ou mais avaliações farmacológicas *in vitro* ou *in vivo*.

"CVT-E002" significa uma fração de ginseng exemplificativa obtida a partir de *Panax quinquefolius*, e que tem propriedades imunorreguladoras (como descrito anteriormente nas patentes n<sup>os</sup> US 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 e 7.413.756, que são aqui incorporadas como referência. CVT-E002 apresenta a atividade adicional de ativar respostas imunes inatas e adaptativas, como aqui descrito.

"PQ<sub>2</sub>" significa uma fração de ginseng exemplificativa obtida a partir de *Panax quinquefolius*, e que tem propriedades imunorreguladoras como descrito anteriormente nas patentes n<sup>os</sup> US 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 e 7.413.756, que são aqui incorporadas como referência.

"PQ223" significa uma fração de ginseng exemplificativa obtida a partir de *Panax quinquefolius*, e que tem propriedades imunorreguladoras como descrito anteriormente nas patentes n<sup>os</sup> US 6.432.454; 7.067.160;

7.186.423 e 7.413.756, que são aqui incorporadas como referência.

Os versados nessas técnicas devem avaliar que frações de plantas ou partes de plantas diferentes de ginseng, ou frações sintéticas que podem ser igualmente bem usadas no presente contexto, estão dentro do âmbito da presente invenção, desde que suas propriedades químicas e atividades sejam suficientemente similares às da fração de ginseng aqui utilizada.

A presente invenção refere-se a uma fração de ginseng, ou uma composição farmacêutica ou item alimentício que compreende a fração, para ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição. Além disso, a presente invenção refere-se a uma fração de ginseng, ou uma composição farmacêutica ou item alimentício que compreende a fração, para a ativação do sistema imunológico inato e adaptativo através de receptores de reconhecimento de padrões (PPRs), tais como os receptores semelhantes a Toll, para tratar, prevenir ou melhorar várias condições em um indivíduo. Tais condições incluem, porém sem limitações, infecções virais e microbianas, alergias, asma, e câncer. Que seja do conhecimento dos inventores, esta é a primeira vez que uma fração derivada de planta natural demonstrou ativar especificamente o sistema imunológico de mamíferos por intermédio de PRRs. Em uma modalidade, a fração de ginseng é uma fração de *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração de ginseng é selecionada no grupo que consiste em CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>. Em uma modalidade, a fração de ginseng é CVT-E002.

A fração de ginseng é preparada tipicamente primeiramente desidratando e pulverizando a planta ou parte da planta de ginseng, e depois realizando um processo de extração, usando um solvente apropriado, tipicamente água, etanol, mistura de etanol/água, metanol, butanol, isobutanol, acetona, hexano, éter de petróleo ou outros solventes orgânicos. A fração ou extrato pode ser então evaporado ainda mais e, assim sendo, concentrado para produzir um extrato desidratado por meio de atomização, secagem em forno a vácuo, ou secagem por congelamento. Os processos para fabricar frações de ginseng exemplificativas selecionadas no grupo que consiste em

CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>, a partir de um extrato solúvel em água da parte da raiz de *Panax quinquefolius* foram descritos anteriormente nas Patentes N<sup>os</sup> U.S. 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 e 7.413,756, cujos teores são aqui incorporados como referência.

Depois de preparada, a fração de ginseng é avaliada para determinar e confirmar a atividade de ativar respostas imunes inatas e adaptativas conduzindo uma ou mais avaliações farmacológicas *in vitro* ou *in vivo*. Na presente invenção, tais avaliações incluem, porém sem limitações, um estudo *in vitro* dos efeitos de uma fração de ginseng exemplificativa, CVT-E002, sobre a replicação de vírus (vide Exemplos 1 e 2) e a função de células dendríticas (vide Exemplo 3). Para a presente invenção, quaisquer avaliações farmacológicas são apropriadas, desde que elas se concentrem na indicação das atividades em qualquer uma das frações de ginseng, uma amostra representativa de um lote da fração de ginseng caso seja de fabricação em larga escala, ou uma subtração da fração de ginseng. A qualidade de lote a lote do produto pode ser certificada pela Tecnologia ChemBio-Print®, que assegura sua consistência química bem como farmacológica, como descrito na patente N<sup>o</sup> U.S. 6.156.291 que é aqui incorporada como referência.

Além disso, a presente invenção refere-se ao uso da fração de ginseng isoladamente ou em combinação com outro medicamento, na preparação de uma composição farmacêutica ou um item alimentício apropriado para ativar respostas imunes inatas e adaptativas, para tratar, prevenir ou melhorar uma condição em um indivíduo. Em uma modalidade, a fração de ginseng é uma fração de *Panax quinquefolius*. Em uma modalidade, a fração de ginseng é selecionada no grupo que consiste em CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>. Em uma modalidade, a fração de ginseng é CVT-E002.

Além disso, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende a fração de ginseng em combinação com um carreador farmacêuticamente aceitável. Os versados nessas técnicas estão

familiarizados com qualquer carreador farmacêuticamente aceitável que seria útil a este respeito, e portanto, o procedimento para fabricar as composições farmacêuticas de acordo com a invenção não serão discutidos detalhadamente. Adequadamente, as composições farmacêuticas podem ser na  
5 forma de comprimidos, cápsulas, líquidos, pastilhas, loções, aerossol, soluções apropriadas para injeção, ou supositórios.

As composições orais podem incluir um diluente inerte ou um carreador comestível. Para o propósito de administração terapêutica oral, a fração de ginseng pode ser incorporada com excipientes e usada na forma  
10 de comprimidos, trociscos, ou cápsulas, por exemplo, cápsulas de gelatina. As composições orais podem ser preparadas também usando um carreador fluido para uso como um colutório. Agentes aglutinantes farmacêuticamente compatíveis ou outros materiais veículos podem ser incluídos como parte da composição. Tais agentes aglutinantes e veículos podem ser um ligante tal  
15 como celulose microcristalina, goma de tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente desintegrador tal como ácido algínico, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio; um deslizante tal como dióxido de silício coloidal; um agente edulcorante tal como sacarose ou sacarina; ou um sabor.

20 Para administração por inalação, os compostos são distribuídos na forma de um *spray* de aerossol a partir de um recipiente ou embalagem pressurizada que contém um propelente apropriado, por exemplo, um gás tal como dióxido de carbono, ou um nebulizador.

A administração sistêmica pode ser também por meio transmucosa ou transdérmica. Para administração transmucosa ou transdérmica, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na  
25 formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica. A administração transmucosa pode ser realizada através do uso de *sprays* nasais, supositórios ou enemas de retenção para distribuição retal. Os supositórios  
30 podem incluir bases de supositórios convencionais tais como manteiga de cacau e outros glicerídeos. Para administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em pomadas, unguentos, géis, ou cremes como é do

conhecimento geral nessa técnica.

A fração de ginseng pode ser preparada também com veículos que protegerão os agentes ativos contra a rápida eliminação do corpo, tal como uma formulação com liberação controlada, incluindo implantes, revestimentos e sistemas de distribuição microencapsulados.

A fração de ginseng pode ser usada isoladamente ou em combinação com outro medicamento. As frações de ginseng da invenção são especialmente apropriadas para coadministração com um agente quimioterápico ou um suplemento para terapia de radiação, pois pacientes com câncer reconhecidamente têm séria supressão do sistema imunológico. As frações de ginseng podem ser usadas também como imunomoduladores ou adjuvantes de vacinas.

Diversos itens alimentícios sólidos, semissólidos ou líquidos podem ser preparados para incluir a fração de ginseng como um ingrediente ativo. Os exemplos não limitativos desses itens alimentícios incluem flocos de cereais, massas, produtos de confeitaria (por exemplo, biscoitos, bolos, caramelos, gomas, balas), barras nutritivas, de salgadinhos ou substitutas de refeições, iogurte, gelatina, geleia, pudins, sopas, uma base de frutas ou vegetais, bebidas (por exemplo, sucos, refrigerantes, bebidas energéticas esportivas, água engarrafada, leite, produtos de soja), e alimentos para crianças e bebês (por exemplo, papinhas, leite em pó modificado, alimento para bebês). Além disso, a fração de ginseng pode ser usada como um ingrediente ativo em alimentos funcionais, nutracêuticos, ou suplementos dietéticos.

As formulações da fração de ginseng pode perder alguma atividade com o envelhecimento e, assim sendo, são preparadas em formas estáveis ou preparadas na hora para administração, por exemplo, na forma de *kit* com múltiplos componentes, de modo a evitar o envelhecimento e para maximizar a eficácia da fração de ginseng. Os kits ou recipientes apropriados são bem conhecidos por manter as fases de formulações separadas até a hora do uso. Por exemplo, um *kit* que contém a fração de ginseng na forma de pó pode ser embalado separadamente de um carreador estéril, tal como solução salina, álcool ou água, e possivelmente outros ingredientes

em quantidades de dosagem específicas para misturar na hora do uso. A fração de ginseng pode ser fornecida em um "saquinho de chá", bolsa ou sachê, para gerar formulações líquidas na hora do uso. O saquinho de chá é vantajoso pelo fato de que a bolsa pode servir como um filtro para particula-  
5 dos pequenos do pó que podem ser prejudiciais com certos tipos de administração (por exemplo, por intermédio de injeção ou infusão). Os particula- dos podem ser também removidos, por exemplo, por filtração.

As dosagens das frações de ginseng de acordo com a invenção dependem da condição específica a ser tratada, bem como da idade, sexo e  
10 estado geral da saúde do paciente. Entretanto, dosagens apropriadas podem ser encontradas na faixa entre 1 e 5.000 mg/kg de peso corporal por dia, com entre 1 e 10 doses diárias. A dosagem preferida é 400 mg por dia para uso crônico ou preventivo. Para usos agudos, doses significativamente mais altas são administradas inicialmente. Por exemplo, 1.800 mg poderiam  
15 ser administrados no primeiro dia divididos em três doses, 1.200 mg poderiam ser administrados no segundo dia, divididos em três doses, e 900 mg poderiam ser administrados no terceiro dia, divididos em três doses. Depois disso, 200-400 mg poderiam ser administrados diariamente até que os sintomas sejam reduzidos. As frações de ginseng podem ser administradas por  
20 via oral, por intermédio de injeção ou infusão, por via tópica, nasal, ocular, vaginal ou retal.

A fração de ginseng desta invenção eficaz na ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar várias condições em um indivíduo. Adicionalmente, como a fração de ginseng é  
25 preparada a partir de um produto natural comestível, o potencial para efeitos colaterais é diminuído. A capacidade de uma fração de ginseng estimular respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar infecção viral, alergia e asma é discutida abaixo e/ou demonstrada nos exemplos usando uma fração de ginseng exemplificativa, CVT-E002.

30 CVT-E002 modula a atividade do sistema imunológico inato para produzir fatores inflamatórios e antivirais. O tratamento de células de murino monocíticas *in vitro* com CVT-E002 e subsequente exposição ao vírus do

herpes simples tipo 2 ou vírus da estomatite vesicular resultou em níveis significativamente elevados de produção de IL-6, interferon- $\beta$  e óxido nítrico de uma maneira dependente da dose, enquanto que as culturas não tratadas e do controle ficaram negativas.

5                   (Exemplo 1, figuras SA<sub>5</sub> 8B e 9). Similarmente, a incubação de monócitos/macrófagos humanos primários com CVT-E002 por quarenta horas resultou na produção significativa dependente da dose de IL-6 (figura 10).

10                   Usando o vírus da estomatite vesicular marcado com proteína fluorescente verde (VSV-GFP), CVT-E002 inibiu significativamente a replicação do vírus *in vitro* (figuras 1 IA e 1 IB). CVT-E002 pode proteger contra uma série de infecções virais transmitidas sexualmente, incluindo HIV-1. Os resultados aqui descritos fundamentam a aplicação tópica de CVT-E002 para ativar rapidamente o sistema imunológico inato e induzir um estado anti-  
15                   ral local que protege superfícies da mucosa contra infecção por agentes sexualmente transmitidos. Esta abordagem pode ser mais segura e menos suscetível à seleção de patógenos resistentes, pois usaria mais "microbicidas naturais" e as respostas imunes inatas evolutivamente remotas para proteção.

20                   A sinalização por todos TLRs (exceto TLR3) ocorre através do gene 88 de respostas primárias de diferenciação mieloide (MyD88), uma proteína adaptadora que ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Para determinar se as respostas de citocinas depois do tratamento com CVT-E002 eram dependentes da sinalização de MyD88, culturas de macrófagos peritoneais  
25                   foram estabelecidas a partir de camundongos C57B1/6 do tipo selvagem ou *nocautes* de MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>) e tratadas com ou sem CVT-E002 (Exemplo 4). A produção de IL-6 e também IFN- $\beta$  depois do tratamento com CVT-E002 foi dependente de MyD88, indicando que CVT-E002 ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias e antivirais em células imunes, baseado na estimulação da sinalização de TLR.  
30

                    Para determinar quais TLRs são ativados por CVT-E002, foram utilizadas células HEK293 que foram construídas para expressar de forma

estável genes de TLRs humanos específicos (Exemplo 5, figuras 14 e 15). Embora CVT-E002 não tivesse estimulado a produção de IL-8 a partir de células que expressam hTLR4 isoladamente, os resultados indicam que CVT-E002 estimulou a produção de IL-8 a partir de células que expressam hTLR4 e MD2-CD14 de uma maneira dependente da dose em dois pontos no tempo diferentes. O interessante é que CVT-E002 estimulou também células que expressam TLR2 humano de uma maneira dependente da dose. Como TLR2 pode formar também heterodímeros com TLR1 e TLR6, a estimulação de células que expressam TLR2 isoladamente ou hTLR2/1 e hTLR2/6 foi comparada. A incubação com CVT-E002 resultou na produção de IL-8 dependente da dose em cada uma destas linhagens de células, embora as células que expressam hTLR2 isoladamente produzissem consistentemente níveis significativamente mais altos de IL-8. Em experimentos que comparam todas quatro linhagens de células com contagens equivalentes de células, a maior parte da ativação imune inata de CVT foi por intermédio de TLR2. Usando células que expressam TLRs individuais, descobriu-se que CVT-E002 demonstra um sinal mínimo por intermédio de TLR4, que é o PPR inato para lipopolissacarídeo (LPS) (figura 14). Globalmente, os resultados sugerem que as frações de ginseng (por exemplo, CVT-E002) podem ativar o sistema imunológico imune por intermédio de TLRs. Isto pode ser responsável pelos seus efeitos protetores anti-infecciosos e indica que as frações de ginseng podem ser úteis como adjuvantes de vacinas potenciais para ajudar a estimular imunidade inata e adaptativa contra os ingredientes da vacina, tornando desta forma a vacina mais eficaz.

Tendo em vista a capacidade de CVT-E002 para ativar respostas imunes inatas e/ou adaptativas para inibir a replicação do vírus, os inventores descobriram que CVT-E002 é útil também na prevenção, tratamento ou melhora de outras condições associadas à ativação da sinalização de imunidade, incluindo, porém sem limitações, alergias e asma.

Baseado em modelos de alérgenos/antígenos *in vitro*, um sistema de cocultura de células incubando vírus das vias aéreas com leucócitos humanos isolados foi desenvolvido usando o vírus parainfluenza tipo I (PIV)

e o vírus sincicial respiratório (RSV). Estes vírus foram escolhidos porque eles são vírus ssRNA das vias aéreas que frequentemente infectam humanos na totalidade das suas vidas, e estão associados a exacerbações de asma.

5                    Como ilustrado na figura 2, os vírus na presença de eosinófilos não induzem diretamente a liberação de eosinófilo peroxidase (EPO). Ao invés disso, os vírus induzem a liberação de EPO apenas quando os eosinófilos são incubados com combinações específicas de linfócitos, células dendríticas e macrófagos (isto é, os dois últimos sendo células apresentadoras de antígenos). As células apresentadoras de antígenos isoladamente com vírus e eosinófilos não induzem a liberação de EPO. Nenhuma liberação de EPO ocorre em qualquer combinação na ausência de vírus. Assim sendo, vírus cultivados com células apresentadoras de antígenos, parece ativar linfócitos para induzir a liberação de EPO a partir de eosinófilos. A inativação por UV do vírus não impede este efeito.

15                    A liberação de EPO foi escolhida como uma medida da liberação de mediadores por causa da sua importância na função de eosinófilos, suas propriedades antivirais, e experiência em medi-la. Quando PIV ou RSV são incubados com eosinófilos isoladamente, nenhuma liberação de EPO é observada, sugerindo que a desgranulação direta de eosinófilos não é possível. Resultados negativos similares foram observados por outros usando rinovírus. Os doadores de leucócitos são adultos com passado atópico que apresentam eosinofilia do sangue periférico. Como PIV e RSV são infecções comuns, estes doadores teriam imunidade para este vírus na forma de células T de memória. No presente modelo, a proliferação de linfócitos ocorre em resposta a PIV e RSV, mas novamente apenas quando cocultivados com células apresentadoras de antígenos. Como ilustrado na figura 3, a proliferação de linfócitos ocorreu depois de seis dias em cultura com vírus parainfluenza e células apresentadoras de antígenos (isto é, macrófagos e células dendríticas), com maior proliferação observada com células dendríticas em comparação com macrófagos. Fito-hemaglutinina (PHA, 5µg/mL) com linfócitos isoladamente serviu como controle positivo. A produção de citocinas

(IFN- $\gamma$  e GMCSF) foi encontrada nesta cocultura, embora sua origem ou relevância para a indução da liberação de EPO não tenha sido determinada.

Similar aos resultados para estimulação de vírus, CVT-E002 não pôde induzir a proliferação de linfócitos; entretanto, uma forte resposta proliferativa é observada quando CVT-E002 é cultivado com células dendríticas (Exemplos 2 e 3). A proliferação de linfócitos ocorre depois de seis dias em cultura com linfócitos, CVT-E002 e células dendríticas. Pode haver um ligeiro aumento na proliferação quando CVT-E002 é adicionado aos poços com vírus. Usando citometria de fluxo para caracterizar as células, uma expressão aumentada de HLA-DR em células dendríticas estimuladas por CVT-E002 foi observada. Os linfócitos em proliferação eram CD4 positivos e demonstraram expressão aumentada do marcador de ativação CD25. A estimulação de LPS serviu como controle positivo. Sem CVT-E002 ou vírus, nem a proliferação nem a regulação ascendente de CD25 foi observada a partir de células dendríticas com linfócitos. A estimulação por CVT-E002 induziu expressão aumentada de CD25 a partir de linfócitos CD4+, similar àquela observada na infecção pelo vírus isoladamente. A combinação aumentou ainda mais a expressão.

Asma atópica/alérgica é uma doença Th2. CVT-E002 é capaz de produzir respostas Th1 (Exemplo 2, figura 5) e esta tendência de Th1 tem o potencial para inibir a resposta Th2, e assim sendo, pode ser usada como terapêutica para doenças atópicas/alérgicas. Em um modelo amplamente utilizado de asma atópica/alérgica, pelo qual camundongos foram sensibilizados com OVA intraperitoneal e alume e depois desafiados com OVA para iniciar doença alérgica nas vias aéreas, CVT-E002 foi capaz de prevenir o desenvolvimento de AHR e diminuir a quantidade de inflamação eosinofílica das vias aéreas (Exemplo 7, figuras 16a e 16b). Nos animais não sensibilizados do controle nenhuma doença atópica/alérgica estava presente, enquanto que os camundongos que foram sensibilizados, e receberam solução salina por gavagem, e depois desafiados com OVA desenvolveram uma forte doença atópica/alérgica nas vias aéreas, consistindo em inflamação eosinofílica das vias aéreas e AHR. Em camundongos do teste sensibilizados

para OVA, CVT-E002 dado por gavagem, e depois desafiados com OVA, inflamação eosinofílica das vias aéreas e também AHR para metacolina inalada foram inibidas.

CVT-E002 pode ser útil no tratamento de asma causada por infecções virais respiratórias ou outros irritantes e disparadores. Embora a maioria dos adultos venha a ser exposta às mesmas infecções virais comuns a cada ano, um subconjunto de pacientes com asma reagirá com função pulmonar diminuída. As propriedades de CVT-E002 podem ser benéficas para tais pacientes. Como aqui descrito e nos exemplos, CVT-E002 pode ser útil para modular a resposta à infecção viral em pacientes com asma por inibir a replicação do vírus e/ou por favorecer uma resposta imune Th1. A inibição da replicação do vírus é benéfica, pois ela baixa o grau de inflamação e subsequente obstrução das vias aéreas. A promoção de uma resposta imune Th1 é benéfica, pois ela contrabalança a resposta Th2 envolvida em reações atópicas.

Além do tratamento de asma em virtude de infecções virais respiratórias, CVT-E002 pode ser eficaz também para o tratamento de asma por outros irritantes e disparadores. Tais irritantes e disparadores incluem, porém sem limitações, alérgenos dentro de casa, tais como ácaros domésticos, animais peludos, baratas e fungos; alérgenos ao ar livre, tais como pólen e mofo; poluentes do ar dentro de casa, tais como fumaça de cigarro; poluentes do ar ao ar livre tais como ozônio, óxidos de nitrogênio, aerossóis ácidos e particulados; exposições ocupacionais; alimentos e aditivos alimentícios; fármacos tais como aspirina e fármacos anti-inflamatórios não esteroides e beta- bloqueadores; rinite; sinusite; polipose; refluxo gastroesofágico; oscilações hormonais; ar frio seco; e exercício.

As propriedades imunomoduladoras de CVT-E002 podem ser benéficas também para pacientes, pois CVT-E002 intensifica a liberação de citocinas, os interferons a partir de linfócitos e/ou células dendríticas e está envolvido na interação de linfócitos e células apresentadoras de antígenos.

Na descrição acima e nos exemplos que se seguem, deve-se entender que a menção da modalidade preferida de CVT-E002 é meramente

exemplificativa e a utilidade descrita em atividades seriam apropriadas para todas frações de ginseng que têm a atividade desejada.

A invenção será agora elucidada ainda mais pelos exemplos que se seguem.

5 **Exemplo 1** – Efeito de CVT-E002 sobre a replicação de vírus *in vitro*

A capacidade de várias doses de CVT-E002 para inibir replicação viral em células monocíticas murinas *in vitro* foi investigada. Várias doses (0, 10, 100 e 500 µg/mL) de CVT-E002 e HT-1001 (uma fração de ginseng exemplificativa que compreende os ginsenosídeos Rb1 e Rg1 e descrita na Patente Nº U.S. 6.083.932) como controle (250-2.000 µg) foram dissolvidas em tampão de PBS e diluídas até concentrações finais em meio completo de cultura de tecidos, e adicionadas a células de macrófagos murinos RAW-264 a 37 °C *in vitro*. Depois do tratamento das células por 24 ou 48 horas, as culturas de células tratadas e não tratadas foram expostas ao vírus do herpes simples tipo 2 (HSV-2) ou ao vírus da estomatite vesicular (VSV). A replicação viral foi avaliada usando ensaios com placas. Os sobrenadantes de culturas com CVT-E002 e do controle foram coletados em vários tempos depois do tratamento e avaliados quanto a IFNs<sub>5</sub> tipo I, TNFα, IL-6 e óxido nítrico (NO) usando ELISA. Níveis significativamente elevados de IL-6 (figura 8A), IFNβ (figura SB) e NO (figura 9) foram produzidos por células RAW depois do tratamento com CVT-E002 de uma maneira dependente da dose. As culturas não tratadas e do controle estavam negativas. Dados sobre a produção de citocinas e titulação viral foram examinados para correlações.

25 CVT-E002 foi testado também quanto à estimulação de TNFα e IFNα. TNFα foi elevado em grupos tratados com CVT-E002 e HT-1001. Os resultados de IFNα não eram confiáveis, possivelmente devido a uma análise ELISA deficiente (dados não ilustrados). O importante é que a incubação de culturas de monócitos/macrófagos humanos primários com CVT-E002 resultou na produção significativa dependente da dose de IL-6 (figura 10). VSV geneticamente manipulado para expressar proteína fluorescente verde (VSV-GFP) também foi utilizado para demonstrar que CVT-E002 inibiu signi-

ficativamente a replicação do vírus *in vitro* (figuras 1 IA e 11 B).

**Exemplo 2** - Mecanismo pelo qual a atividade antiviral é induzida por CVT-E002

Células dendríticas (DCs) foram cocultivadas com linfócitos, e foi usada citometria de fluxo para caracterizar os linfócitos. A estimulação de LPS foi usada como um controle positivo. RSV e PrV demonstraram induzir a proliferação de células T CD3+CD4+CD25+ na presença de células dendríticas (DCs) (figura 4, n=3 cada). Em comparação com DCs não infectadas, cultivadas com linfócitos, RSV induz a produção de interferons  $\alpha$  e  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , RANTES, IL-1, 2, 4, 10, 12, 13, e 15 (figura 5, n=1). Os dados são representados em relação aos respectivos controles não infectados (dado um valor de 1). CVT-E002 com células T isoladamente induziu a liberação de EFN $\gamma$  e ILI 2. CVT-E002 com DCs isoladamente induziu a liberação de TNF, IFN $\gamma$ , IL-1, 10, 12, e 15. Adicionando CVT-E002 à cultura de células com vírus aumentou muito a liberação de citocinas/quimiocinas. Além disso, em comparação com células não infectadas, CVT-E002 pôde induzir a proliferação de linfócitos na presença de DCs sem vírus (figura 6).

**Exemplo 3** – Efeito de CVT-E002 sobre a função de células dendríticas

Células dendríticas (DCs) foram derivadas a partir de monócitos sanguíneos pelo tratamento com GM-CSF e IL-4 por sete dias. As DCs foram incubadas na presença ou ausência de 5 mg/mL de DQ-Ovoalbumina (DQ-OVA) autoextinguida e CVT-E002. DQ-OVA é um corante fluorescente anexado à ovoalbumina. A fluorescência de DQ-OVA é extinguida como uma molécula intacta, mas quando degradada através da apresentação do antígeno por DCs, o corante fluorescente é liberado e a emissão é permitida.

A figura 7A ilustra as subpopulações de células. As células "semelhantes a DC" são consistentes por tamanho e granulação com células dendríticas maduras, enquanto que "não-DC" são DC imaturas bem como monócitos e células T refratárias à diferenciação. Células tratadas com LPS foram usadas como controle positivo para maturação de DCs. Usando citometria de fluxo para determinar tamanho e granulação, pareceu haver uma subpopulação de monócitos, que acredita-se representarem um fenótipo i-

maturado (não-DC) em comparação com a DC madura (semelhante a DC). Esta impressão se baseia em experiência anterior de coloração com CDI I<sub>c</sub> e HLA-DR (dados não ilustrados).

5 As DCs incorporaram DQ-OVA como indicado por fluorescência (figura 7B). O interessante é que CVT-E002 intensificou o sinal global de DQ-OVA de uma maneira dependente da dose (todas as células OVA+). Embora a população semelhante a DC seja 100% OVA positiva, a população imatura parece capturar a ovoalbumina melhor depois de CVT-E002 (Não-DC OVA+, figura 7B).

10 O tratamento com CVT-E002 desloca o número de monócitos da população não-DC para a semelhante a DC madura (coleção de DCs maduras) (figuras 7C e 7D). Uma fenotipagem preliminar destas populações com coloração de CDI I<sub>c</sub> e MHC II confirma a impressão dos inventores de maturidade versus imaturidade. Estes dados sugerem que CVT-E002 melhora a  
15 função e maturidade de DCs além dos dados de citocinas de DC.

**Exemplo 4 – Capacidade de CVT-E002 para ativar o fator nuclear kapa B (NF-κB) e sinalizar por intermédio de MyD88**

Para determinar se CVT-E002 ativa respostas imunes inatas por intermédio da interação com TLRs, as capacidades de CVT-E002 para ativar  
20 NF-κB e para sinalizar por intermédio de MyD88 foram examinadas. Macrófagos peritoneais foram isolados a partir de camundongos normais (C57B1/6 do tipo selvagem) e camundongos carecedores de MyD88 (isto é, camundongos nocautes de MyD88 designados como "MyD88-/-").

Depois de 24 horas de incubação *in vitro* para permitir anexação  
25 às placas de cultura, os macrófagos foram lavados, tratados com várias doses de CVT-E002 ou HT-1001, e incubados por mais 24 horas. HT-1001 foi usado como controle. Os sobrenadantes foram coletados e avaliados quanto à produção de IL-1<sub>5</sub>, IL-6, IFNβ e NO usando ELISA. DNA CpG (MyD88-dependente) e dsRNA (um ligante independente de MyD88 para TLR3) foram incluídos como controles positivo e negativo, respectivamente. Adicionalmente, plasmídeos foram construídos com o promotor de NF-κB que  
30 aciona um gene repórter, LacZ. As células transfectadas com este plasmídeo

foram tratadas com várias doses de CVT-E002 e avaliadas quanto à produção dos produtos do gene repórter.

Os resultados demonstram que CVT-E002 induziu níveis significativos da citocina pró-inflamatória IL-6 e do fator antiviral tipo I. A produção de IFN $\beta$  em macrófagos peritoneais de apenas tipo selvagem, mas não camundongos MyD88 $^{-/-}$  (figuras 12, 13A e 13B). As culturas não tratadas ou tratadas com HT-1001 eram negativas. Estes resultados indicam que a estimulação induzida por CVT-E002 de IL-6 e IFN $\beta$  é dependente de MyD88 e indicam que CVT-E002 ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias e antivirais em células imunes de vertebrados por intermédio de TLRs.

#### **Exemplo 5 – Identificação de TLR utilizado por CVT-E002**

Para identificar os TLRs que podem ser receptores para CVT-E002, foram construídas células para expressar apenas receptores TLR individuais. Estas células foram tratadas *in vitro* com doses ótimas de CVT-E002 e ligantes/agonistas de TLR do controle, e os sobrenadantes destas células foram usados para medir a produção de IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e NO. Para assegurar que as células que expressam cada TLR individual sejam funcionais, os controles positivos foram incluídos usando ligantes/agonistas conhecidos para cada TLR. Os resultados indicam que CVT-E002 não sinaliza por intermédio de TLR4 isoladamente. O tratamento com CVT-E002 por 24 horas estimulou a produção de IL-8 em células 293 transfectadas com hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 e hTLR4 (Controles Pam3CSK/LPS) (figura 14). O tratamento com CVT-E002 por 48 horas estimulou a produção de IL-8 em células 293 transfectadas com hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 e hTLR4 (Controles Pam3CSK/LPS) (figura 15). hTLR4 representa co-expressão de TLR4 com MDR e CD 14. Para ambos períodos de tempo, aumentos significativos na produção de IL-8 foram observados para todos receptores.

#### **Exemplo 6 – Efeito da distribuição através da mucosa de CVT-E002**

CVT-E002 ou controles foram distribuídos para camundongos por via oral na sua dieta, ou por via intranasal ou intravaginal. Os camundongos foram subsequentemente desafiados por via intranasal ou intravaginal com várias doses de HSV-2 ou vírus da estomatite vesicular sensível a

interferon (VSV). A proteção contra infecção viral foi avaliada medindo o peso corporal, monitorando a patologia bruta, e medindo as titulações dos vírus do desafio no pulmão e lavagens genitais e tecidos usando ensaios com placas em vários pontos no tempo depois do desafio com vírus (dias 1-3 e 6 dias depois da infecção) (figuras 17A e 17B).

**Exemplo 7** – Capacidade de CVT-E002 para inibir o desenvolvimento de hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) e para diminuir a quantidade de inflamação eosinofílica das vias aéreas

Camundongos OVA e CVT-E002+OVA foram sensibilizados duas vezes com OVA e alume por injeções intraperitoneais, enquanto que os animais do controle não receberam qualquer imunização. Sete dias depois das imunizações finais, os animais do controle e os camundongos CVT-E002+OVA receberam 200 mg/kg do composto CVT-E002 por gavagem por sete dias consecutivos. 24 horas depois da gavagem final, todos os camundongos foram desafiados duas vezes com 50 µg OVA intranasal e avaliados quanto a AHR e inflamação das vias aéreas 24 h depois do segundo desafio. A pausa expiratória (Penh) foi medida por pletismografia de corpo inteiro para determinar AHR em resposta a desafio com metacolina (n=3) \*P < 0,05 em comparação com OVA ou grupos do controle (figura 16A). A inflamação das vias aéreas foi determinada pelo número de eosinófilos no fluido BAL (n=3). \*P < 0,05 em comparação com OVA ou grupos do controle (figura 16B).

Como deve ficar evidente para os versados na técnica, várias modificações, adaptações e variações da descrição específica precedente podem ser feitas sem fugir do escopo da invenção aqui reivindicada.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para prevenir, tratar ou melhorar uma condição suscetível a prevenção, tratamento ou melhora pela ativação da sinalização de imunidade inata em um indivíduo que necessita de tal tratamento, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de pelo menos uma fração de ginseng.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, onde a condição é selecionada no grupo que consiste em alergia, asma, infecção viral., infecção microbiana e câncer.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, onde a infecção viral é causada por um vírus respiratório ou transmitido pela mucosa, incluindo influenza, coronavírus, herpes, vírus sincicial respiratório, rabdovírus, e vírus da imunodeficiência humana.
4. Método, de acordo com a reivindicação 2, onde a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado no grupo que consiste em *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schin-seng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, e ginseng vermelho.
5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*.
6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a fração é selecionada no grupo que consiste em CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações purificadas de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a fração é CVT-E002.
8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que CVT-E002 modula a transdução de sinais a partir de um receptor semelhante a Toll.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o receptor semelhante a Toll é o receptor semelhante a Toll 2.
10. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o receptor semelhante a Toll é um heterodímero do receptor semelhante a Toll 2 recep-

tor semelhante a Toll 6.

11. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o receptor semelhante a Toll é um heterodímero do receptor semelhante a Toll 2 e do receptor semelhante a Toll 1.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o receptor semelhante a Toll é o receptor semelhante a Toll 4.

10 13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que CVT-E002 induz a regulação ascendente de linfócitos e células apresentadoras de antígenos, secreção de citocinas, secreção de fatores antivirais ou combinações dos mesmos.

14. Fração de ginseng para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição.

15 15. Fração de acordo com a reivindicação 14, em que a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado no grupo que consiste em *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, e ginseng vermelho.

20 16. Fração de acordo com a reivindicação 15, em que a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*.

17. Fração de acordo com a reivindicação 16, em que a fração é selecionada no grupo que consiste em CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>.

25 18. Fração de acordo com a reivindicação 17, em que a fração é CVT-E002.

30 19. Composição farmacêutica que compreende a fração como definida na reivindicação 14, em combinação com outro medicamento ou com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo itens alimentícios, para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição.

20. Composição de acordo com a reivindicação 19, em que a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado no grupo que consiste

em *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, e ginseng vermelho.

5                   21. Composição de acordo com a reivindicação 20, em que a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*.

                    22. Composição de acordo com a reivindicação 21, em que a fração é selecionada no grupo que consiste em CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>.

10                   23. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a fração é CVT-E002.

                    24. Uso da fração de ginseng como definida na reivindicação 14, para a preparação de uma composição farmacêutica ou um item alimentício para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição.

15                   25. Uso de acordo com a reivindicação 24, em que a condição é selecionada no grupo que consiste em alergia, asma, infecção viral, infecção microbiana e câncer.

                    26. Uso de acordo com a reivindicação 25, em que a infecção é causada por um vírus respiratório ou transmitido pela mucosa, incluindo influenza, coronavírus, herpes, vírus sincicial respiratório, *Rhabdoviridae*, e vírus da imunodeficiência humana.

20                   27. Uso de acordo com a reivindicação 25, em que a fração é fabricada a partir de um ginseng selecionado no grupo que consiste em *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidiis*, ginseng verde ou fresco, ginseng branco, e ginseng vermelho.

25                   28. Uso de acordo com a reivindicação 27, em que a fração é uma fração de *Panax quinquefolius*.

30                   29. Uso de acordo com a reivindicação 28, em que a fração é selecionada no grupo que consiste em CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, PQ<sub>223</sub> e frações pu-

rificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub> e PQ<sub>223</sub>.

30. Uso de acordo com a reivindicação 29, em que a fração é CVT-E002.

31. Método para ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição em um indivíduo que necessita de tal ativação, compreendendo administrar uma fração de ginseng como definida na reivindicação 14, ao indivíduo.

32. Método prevenir, tratar ou melhorar uma condição associada à ativação da sinalização de imunidade inata, compreendendo modular a transdução de sinais a partir de receptores semelhantes a Toll administrando uma fração de ginseng como definida na reivindicação 14, a um indivíduo que necessita de tal prevenção, tratamento ou melhora.

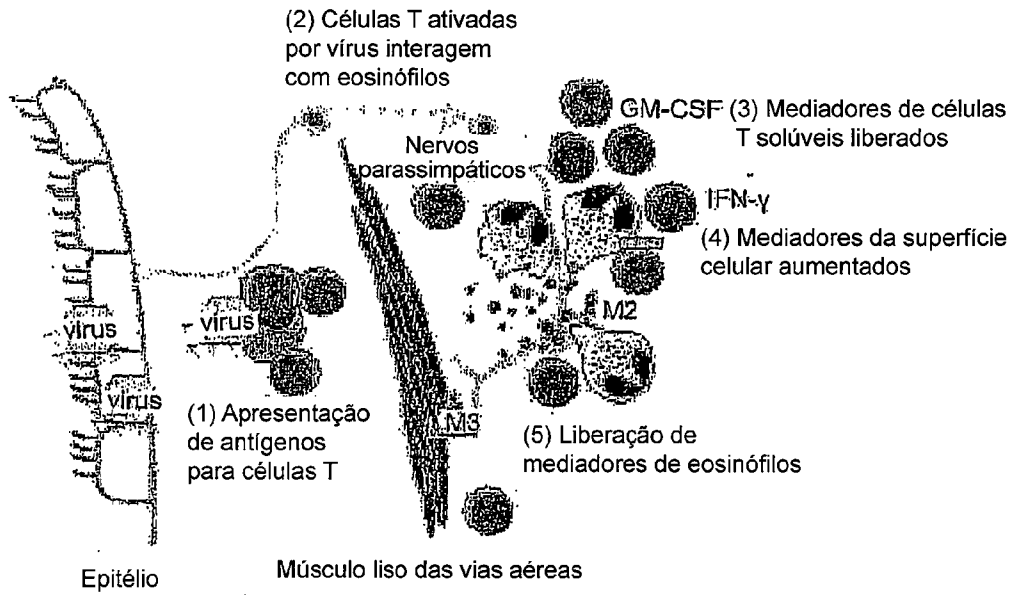


FIG. 1

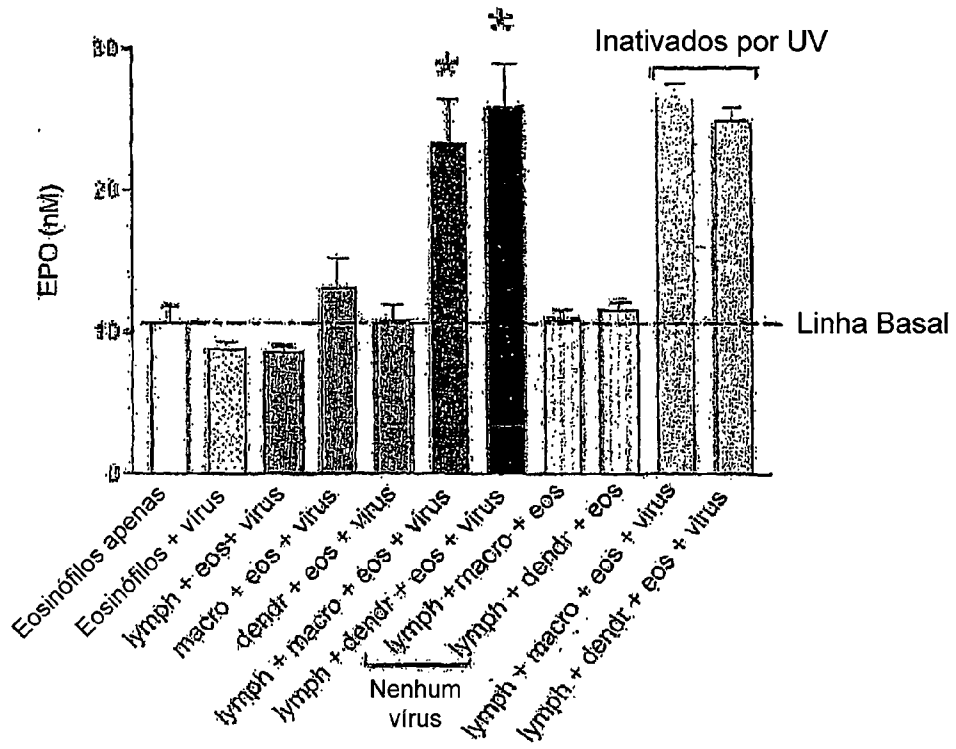


FIG. 2

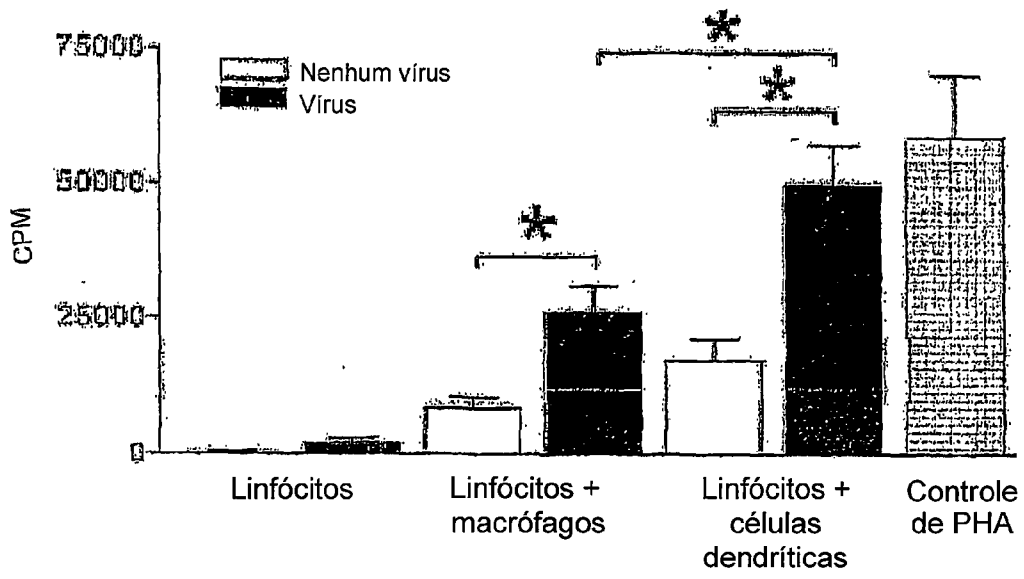


FIG. 3

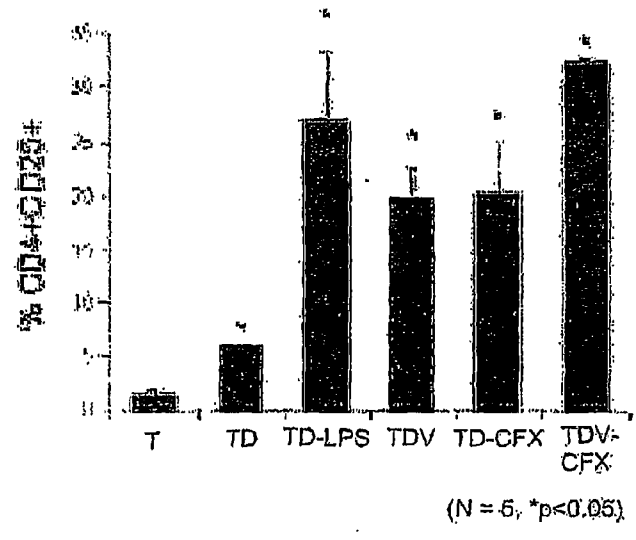
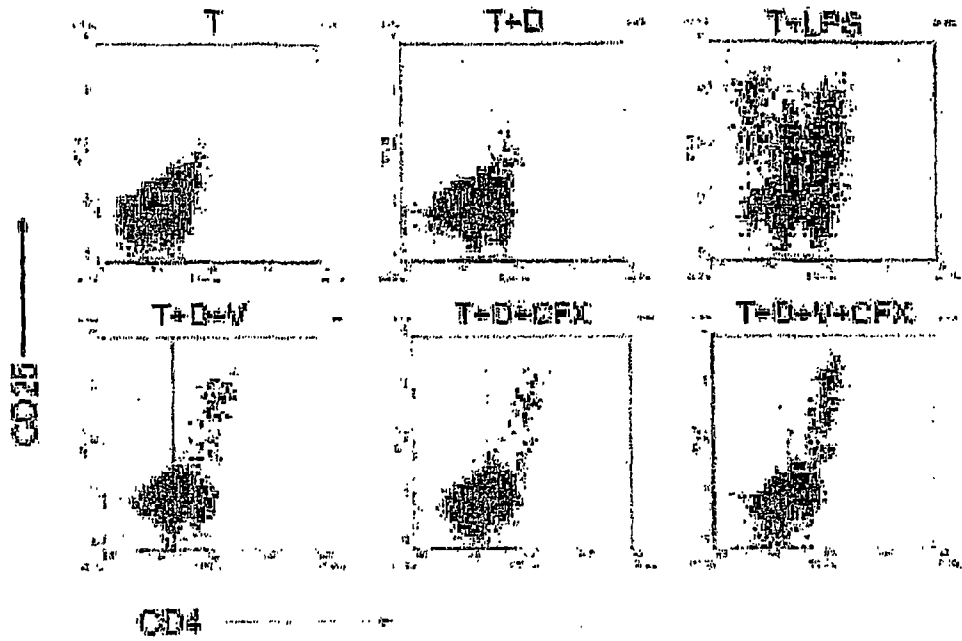
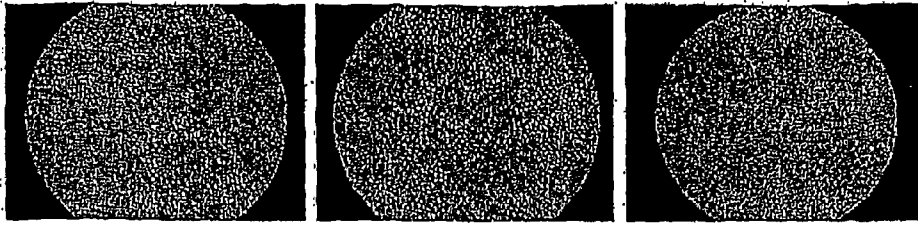


FIG. 4

	IL1b	IL2	IL4	IL10	IL12p70	IL13	IL15	IFNa	IFNg	TNF	RANTES	GMCSF
Células T apenas	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T + LPS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T + PHA	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T + Cold-FX™	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T + RV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T + RSV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T + RIV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
DC apenas	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
DC + LPS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
DC + ColdFX	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + LPS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + ColdFX	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + RV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + RSV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + RIV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + ColdFX + RV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + ColdFX + RSV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + ColdFX + RIV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + PIV	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Células T+ DC + PIV + ColdFX500	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Em relação ao controle	Mais do que 10 X > 5X < 10X						↑ Mais do que 0,5/menos do que 2X Mais do que 0,25/menos do que 0,5					

FIG. 5



Linfócitos  
+ CVT-E002

Linfócitos +  
células dendríticas

Linfócitos  
+ CVT-E002  
+ células dendríticas

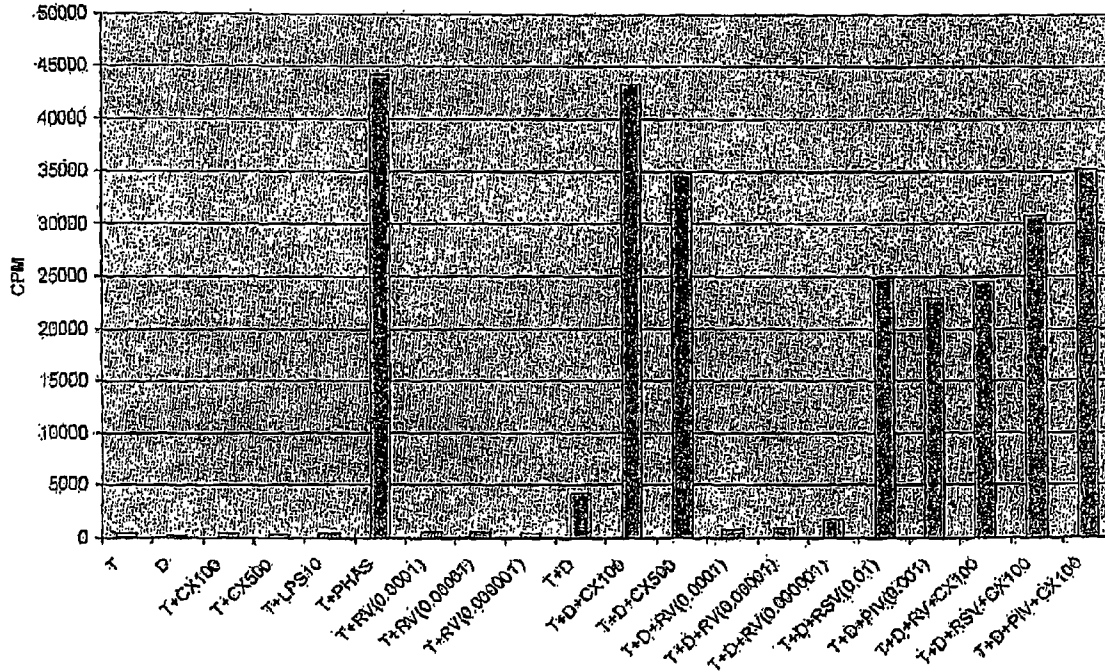


FIG. 6

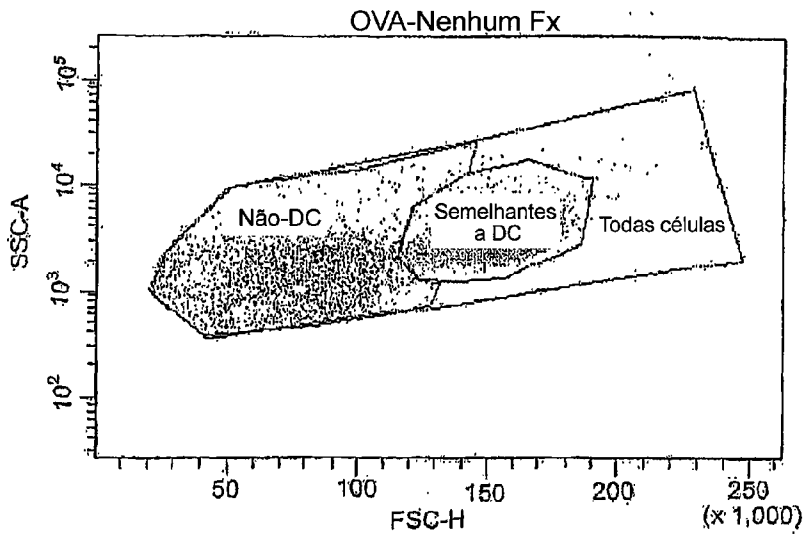


FIG. 7A

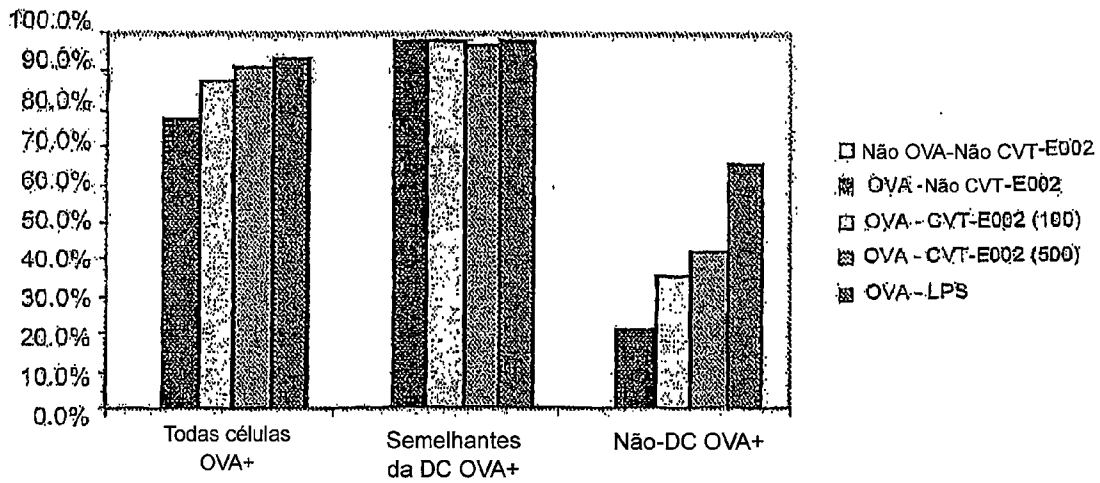


FIG. 7B

8/20

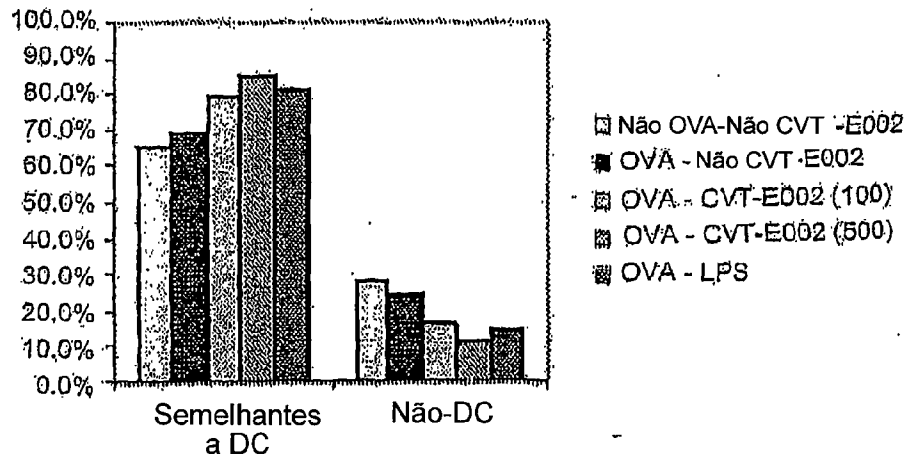


FIG. 7C

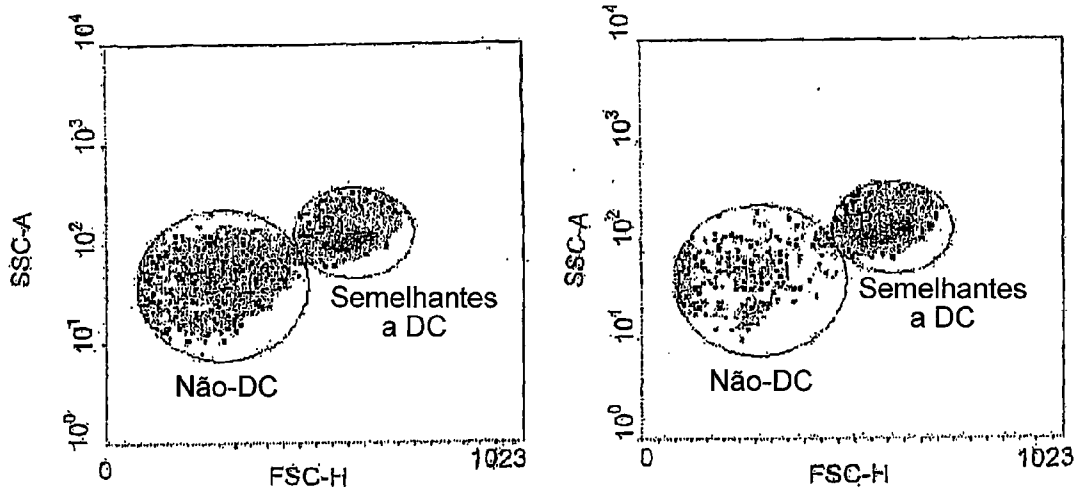


FIG. 7D

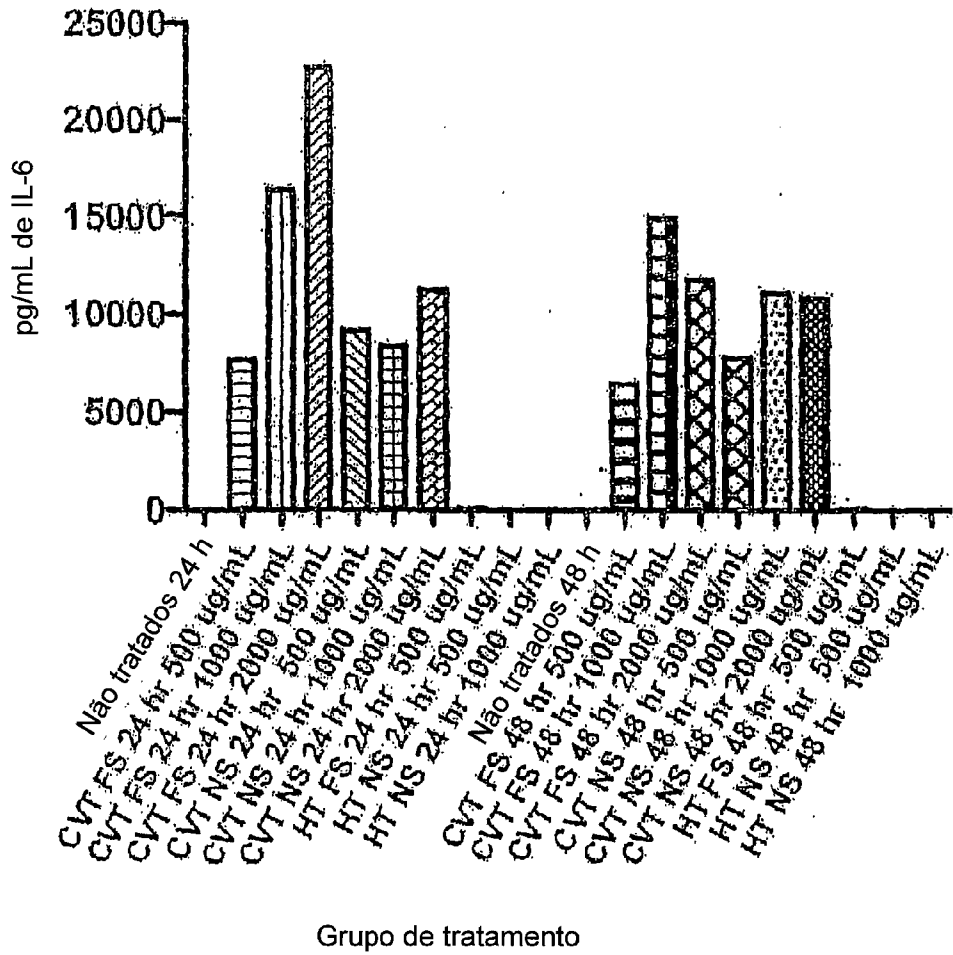


FIG. 8A

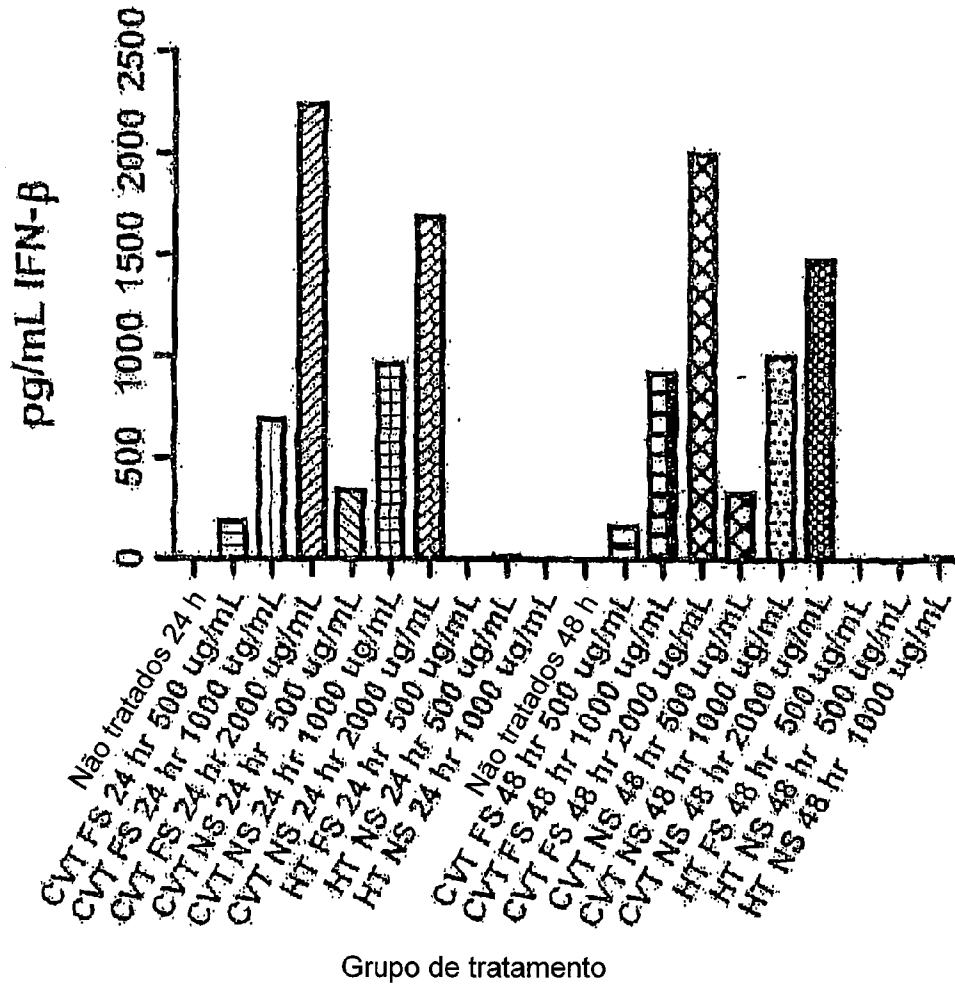


FIG. 8B

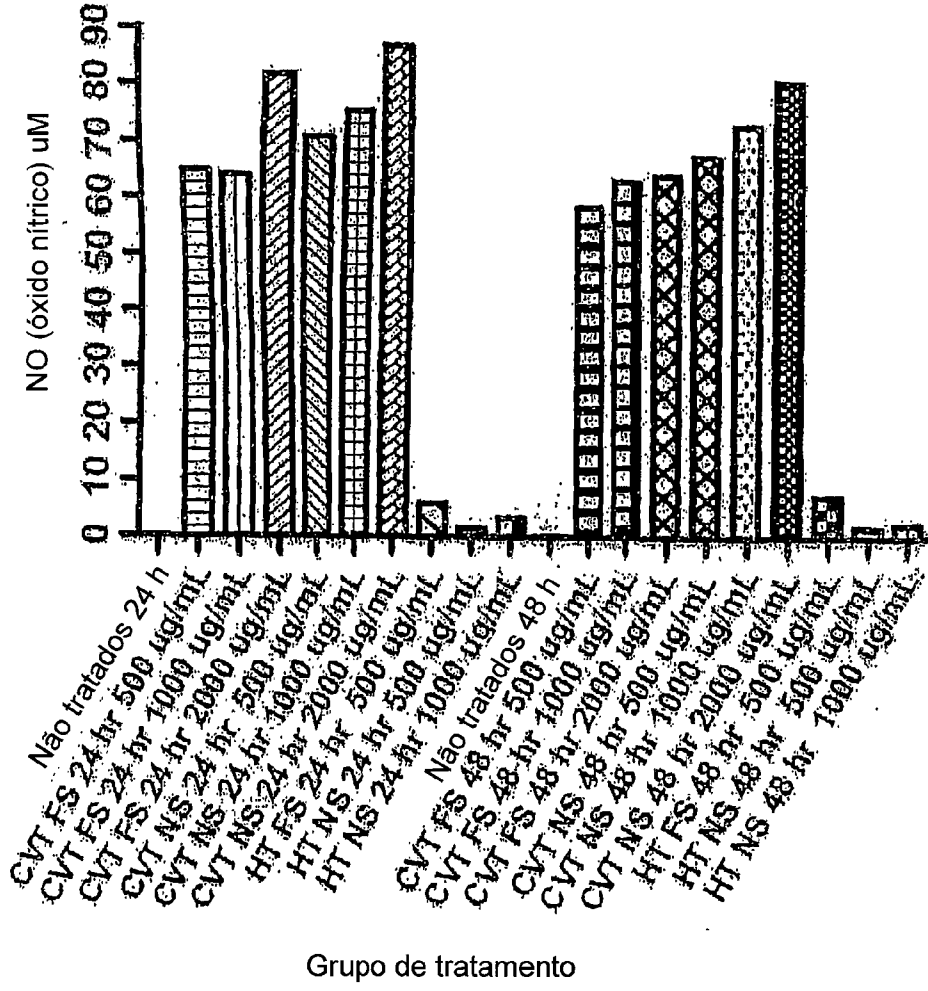


FIG. 9

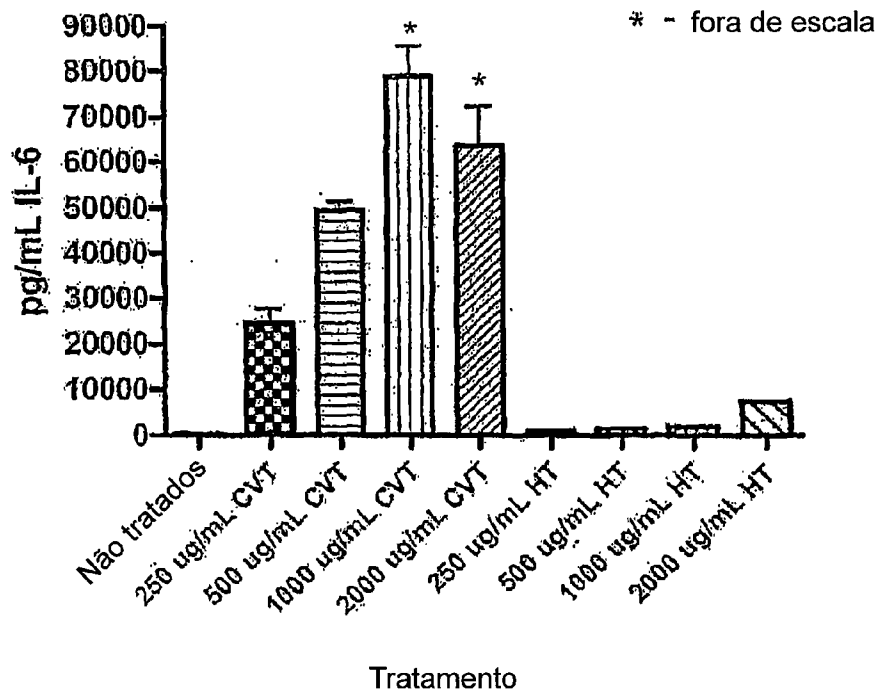
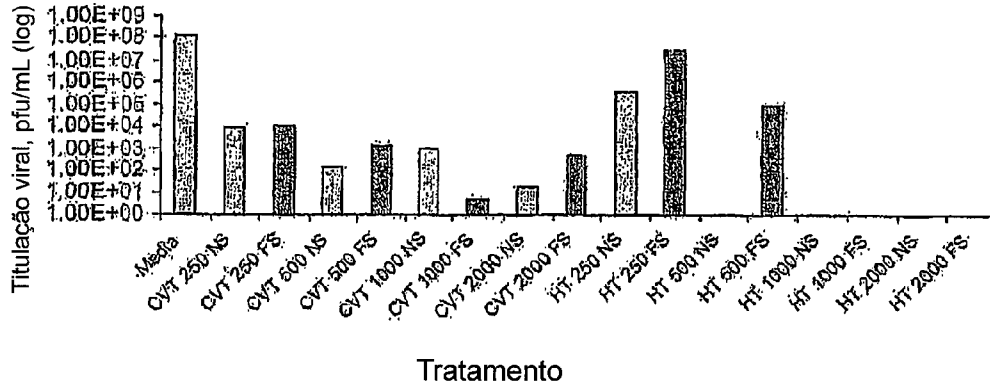


FIG. 10

A.



B.

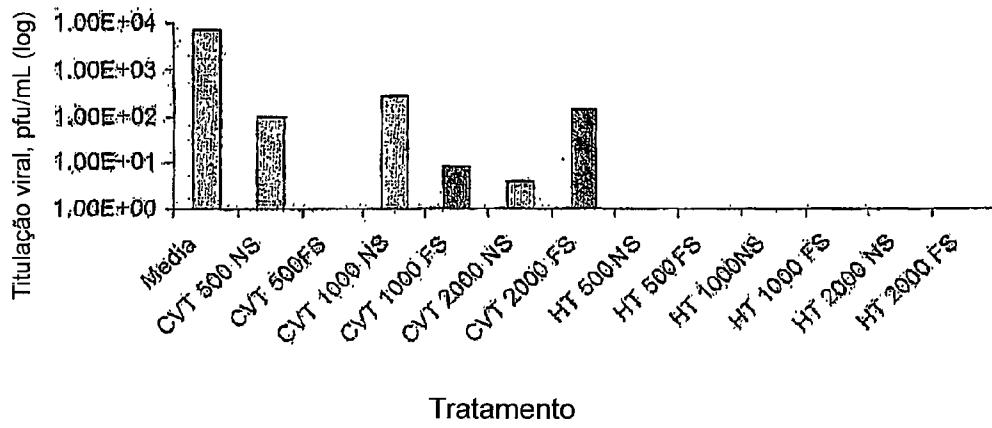


FIG. 11

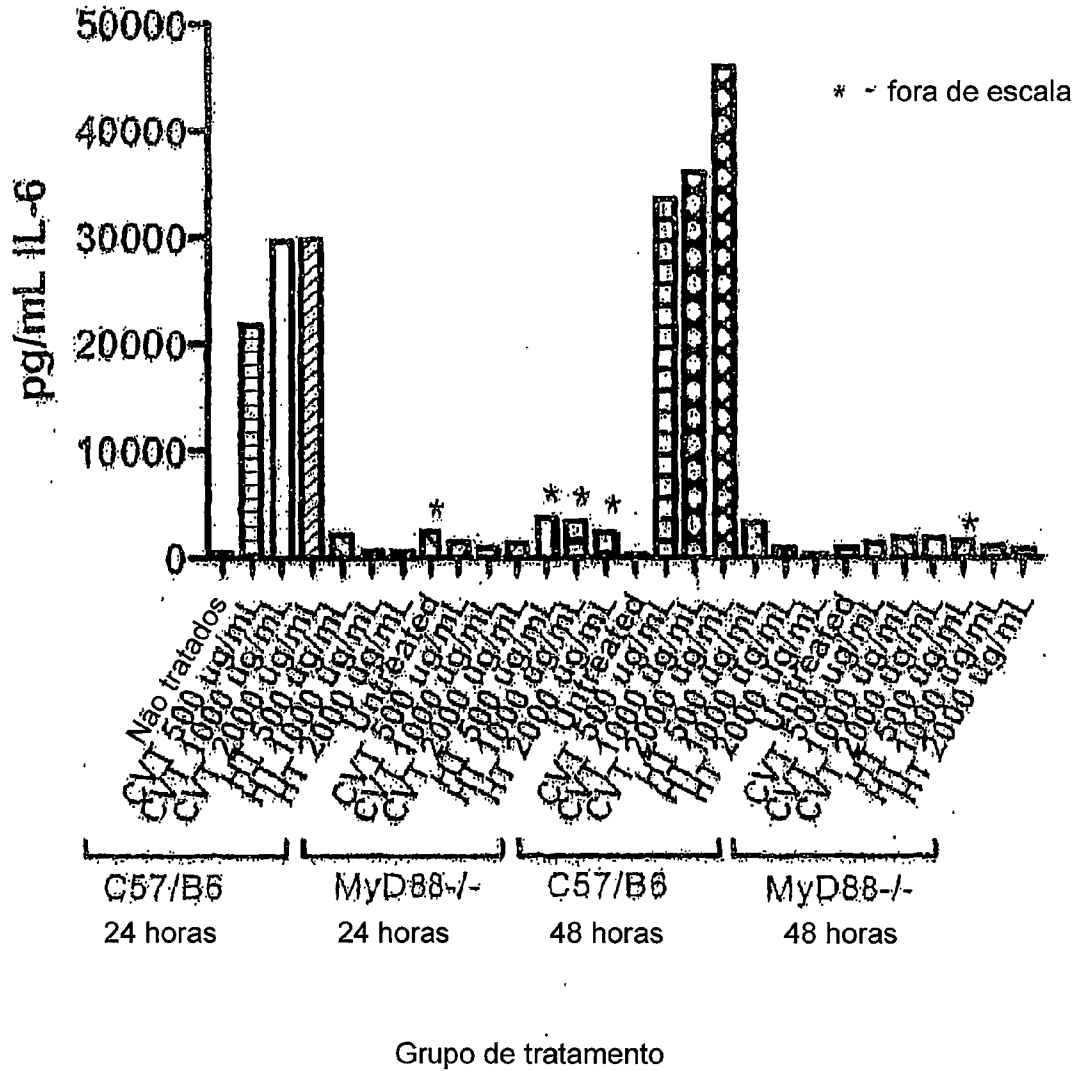


FIG. 12

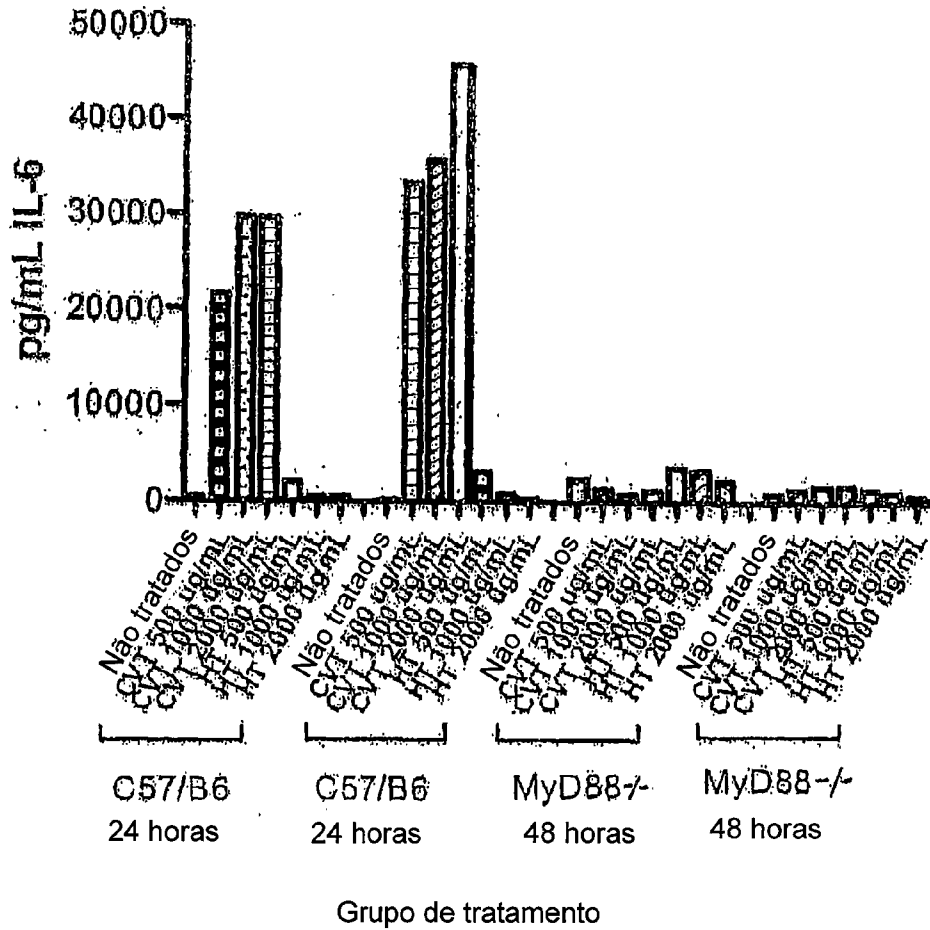


FIG. 13A

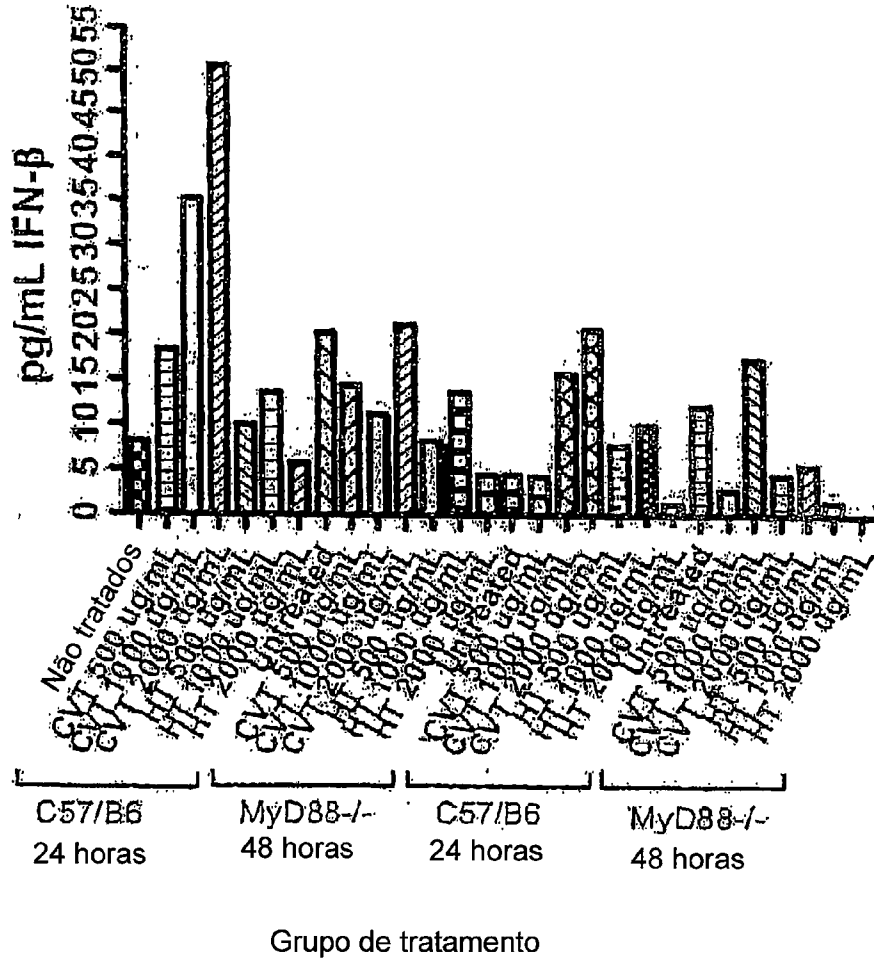


FIG. 13B

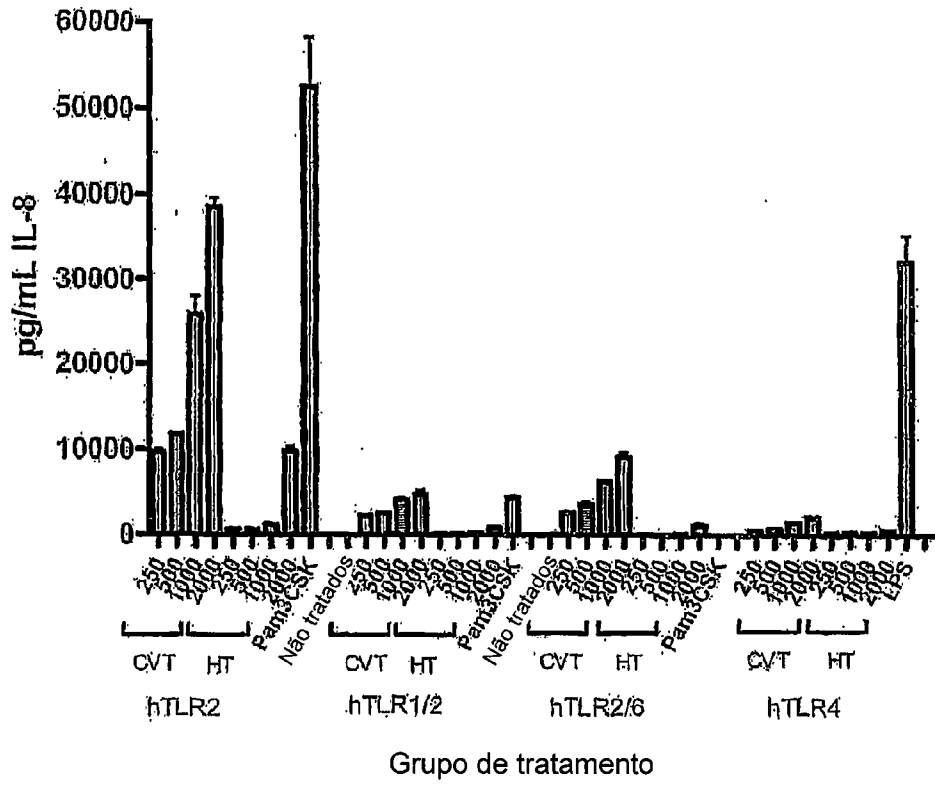
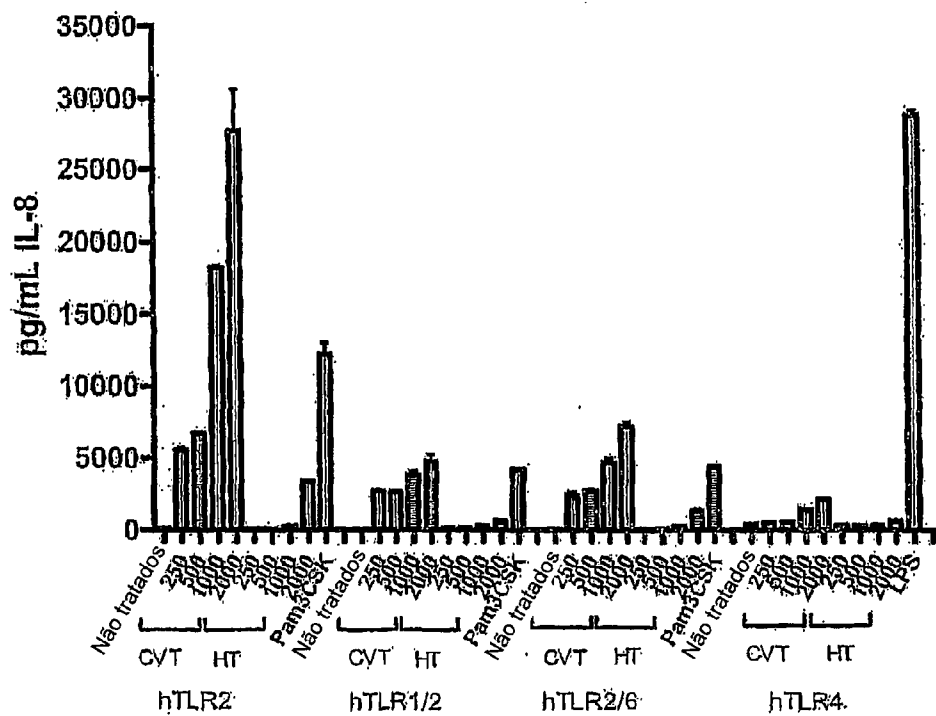


FIG. 14



Grupo de tratamento

FIG. 15

19/20

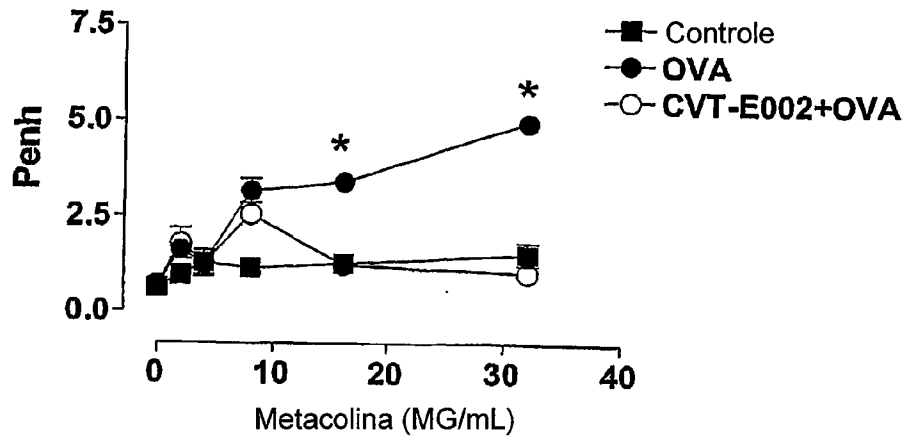


FIG. 16A

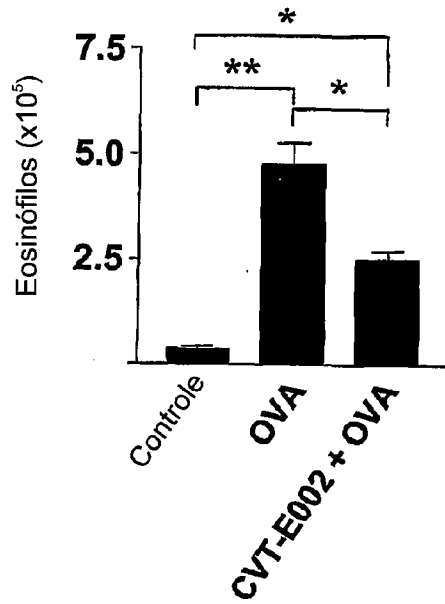


FIG. 16B

20/20

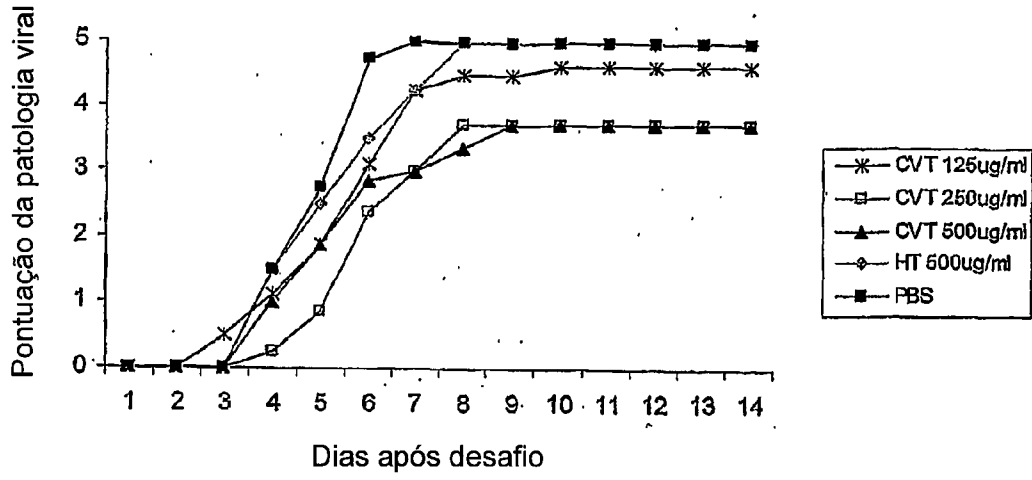


FIG. 17A

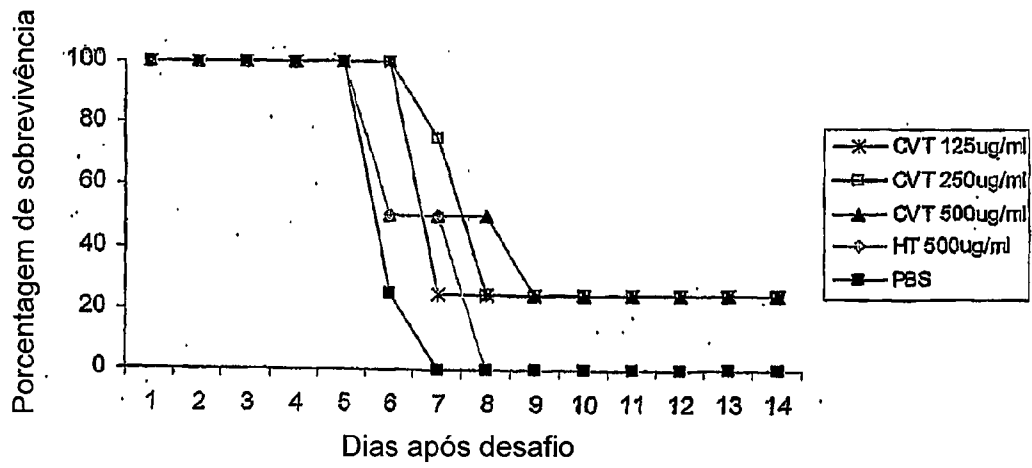


FIG. 17B

## RESUMO

Patente de Invenção: "ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES INATAS E ADAPTATIVAS POR UM EXTRATO DE GINSENG".

A presente invenção refere-se a frações de ginseng e a métodos para ativar respostas imunes inatas e adaptativas para prevenir, tratar ou melhorar uma condição em um indivíduo, administrando ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma fração de ginseng, uma composição farmacêutica que compreende a fração em combinação com outro medicamento ou com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, ou um item alimentício que compreende a fração. A fração pode ser fabricada a partir de *Panax quinquefolius* ou pode ser selecionada entre CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, e PQ<sub>223</sub> e frações purificadas a partir de CVT-E002, PQ<sub>2</sub>, e PQ<sub>223</sub>.