

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 532**

51 Int. Cl.:

A61K 36/25 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009** **E 09716101 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2268295**

54 Título: **Activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas por parte de un extracto de ginseng**

30 Prioridad:

29.02.2008 US 64354 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2015

73 Titular/es:

VALEANT CANADA LP (100.0%)
2150 Boul. St-Elzéar Ouest
Laval, QC H7L 4A8, CA

72 Inventor/es:

ADAMKO, DARRYL J.;
ROSENTHAL, KENNETH L.;
SHAN, JACQUELINE;
WU, YINGQI y
SUTHERLAND, SHARLA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 539 532 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas por parte de un extracto de ginseng

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a las fracciones de ginseng para la activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar una infección de las vías respiratorias y/o hipersensibilidad de las vías respiratorias.

Antecedentes de la invención

10 Un extracto soluble en agua patentado, de las raíces del ginseng de Norteamérica (*Panax quinquefolium*), CVT-E002, está comercialmente disponible como COLD-FX^{MR}. Este extracto se diferencia de otros productos asiáticos y americanos de ginseng en el contenido de polisacáridos y ginsenósidos, que consisten principalmente de poli-
 15 furanosil-piranosil-sacáridos. La calidad lote a lote del producto es certificada mediante tecnología ChemBioPrint^{MR}, la cual asegura su consistencia tanto química como farmacológica. Se sabe que este extracto natural patentado tiene efectos inmunomoduladores (Wang y colaboradores, 2001, 2004). CVT-E002 mejora la proliferación de células del bazo en ratones, e incrementa la producción de interleucina 1 (IL-1), IL-6, factor de necrosis de tumor (TNF)- α y
 20 óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos del peritoneo *in vitro*. La administración de CVT-E002 a ratones incrementó los niveles de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) en suero (Wang y colaboradores, 2001), y la dosificación diaria de CVT-E002 a ratones con leucemia inducida viral incrementó las proporciones de macrófagos y células NK en la médula ósea y el bazo mientras reducía la cantidad de células leucémicas (Miller, 2006). En un estudio reciente sobre células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) cultivadas con el virus de la influenza vivo, CVT-E002 fue efectivo en mejorar la producción de IL-2 e interferón γ (IFN γ) (Jing y colaboradores, presentado). IL-2 e IFN γ son citoquinas principales de células T y NK y se asocian con respuestas inmunitarias adaptativas específicas de virus. En un estudio clínico, el complemento diario de dosis bajas de COLD-FX^{MR} a
 25 adultos saludables incrementó la proporción de células NK en plasma (Predy y colaboradores, 2006).

Al ser la primera línea de defensa contra patógenos microbianos, tanto los macrófagos como las células NK son componentes importantes de la inmunidad innata. Estas células actúan inmediatamente para limitar la proliferación y
 30 esparcimiento de agentes infecciosos a través de la liberación de agentes antimicrobianos tales como citoquinas, interferones y quimiocinas y por sus actividades fagocíticas y citolíticas.

Ya que estudios preclínicos sugirieron el uso potencial de CVT-E002 para la profilaxis de infecciones relacionadas con virus del tracto respiratorio superior, se efectuó un ensayo clínico que involucró 198 adultos mayores
 35 institucionalizados. Este estudio demostró que la administración diaria de CVT-E002 por 4 meses durante una temporada de influenza, redujo el riesgo relativo de contraer una enfermedad respiratoria aguda debida a la influenza y al virus sincitial respiratorio hasta en un 89% (McElhaney y colaboradores, 2004). Otro estudio también demostró que CVT-E002 redujo significativamente la recurrencia de infecciones respiratorias en 323 adultos saludables de edades intermedias (Predy y colaboradores, 2005). El tratamiento con CVT-E002 también redujo la
 40 severidad y duración de los síntomas relacionados con infecciones del tracto respiratorio superior en adultos saludables. En un estudio controlado por placebo, doble ciego aleatorio, de 43 adultos residentes en comunidad con una edad de 65 años o mayor, la ingesta diaria de CVT-E002 redujo el riesgo relativo y la duración de los síntomas respiratorios en un 48% y 55%, respectivamente. La administración diaria de CVT-E002 demostró ser un medio terapéutico seguro y natural de prevención de una enfermedad respiratoria aguda en adultos mayores saludables.

40 El sistema inmunitario de los mamíferos ha desarrollado múltiples sistemas de defensa, en capas e interactivos para protección contra las infecciones, que se ha dividido en general en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos microbianos y actúa casi inmediatamente para limitar la proliferación temprana y el esparcimiento de los agentes infecciosos a través de la activación de células fagocitarias y que presentan antígenos, tales como las células dendríticas y los macrófagos, y el inicio de respuestas
 45 inflamatorias a través de la liberación de una variedad de citoquinas, quimiocinas y factores antimicrobianos, tales como interferones y defensinas. La inmunidad innata es evolutivamente muy antigua y durante muchos años su estudio fue en gran medida ignorado por los inmunólogos por ser relativamente no específico. Para la mayoría, los seres humanos están protegidos contra la infección por el sistema inmunitario innato. Si organismos infecciosos penetran las defensas inmunitarias innatas, las defensas innatas facilitan y guían la generación de respuestas inmunitarias adaptativas que se dirigen contra determinantes altamente específicos que se expresan únicamente por el patógeno invasor. Estas respuestas dependen del reordenamiento de genes específicos del receptor del antígeno en células B y células T, y resultan en la producción de anticuerpos específicos del antígeno de alta afinidad (inmunidad humoral) e inmunidad mediada por células o células T. Los anticuerpos facilitan la remoción, destrucción o neutralización de patógenos extracelulares y sus toxinas. Las respuestas inmunitarias mediadas por células T
 50 ayudan a eliminar o controlar los patógenos intracelulares. En contraste a las respuestas inmunitarias innatas, las respuestas inmunitarias adaptativas tienen el rasgo distintivo de la memoria inmunitaria específica.

Estudios previos han intentado determinar cómo detecta el sistema inmunitario innato del huésped la infección y cómo la discrimina entre propia y por patógenos o infecciosa no propia. El descubrimiento y caracterización de los receptores tipo Toll (TLR) ha proporcionado una gran comprensión del reconocimiento inmunitario innato y estableció el papel clave del sistema inmunitario innato en la defensa del huésped contra la infección (Akira y colaboradores, 2006; Hargreaves y Medzhitov, 2005; Kawai y Akira, 2006; Philpott y Girardin, 2004; Seth y colaboradores, 2006). Los TLR son moléculas clave en la inmunidad innata y adaptativa. El sistema inmunitario innato usa múltiples familias de receptores de reconocimiento de patrones codificados por líneas germinales (PRR) para detectar la infección y activar una variedad de mecanismos de defensa antimicrobianos (Janeway y Medzhitov, 1998). Estos PRR son evolutivamente altamente conservados entre especies de plantas y moscas de la fruta hasta mamíferos. La estrategia de reconocimiento inmune innato se basa en la detección de estructuras esenciales y altamente conservadas presentes en muchos tipos de microorganismos y ausentes de las células huésped (Janeway, 1992; Janeway y Medzhitov, 1999). Ya que los objetivos del reconocimiento inmunitario innato son patrones moleculares conservados, se denominan patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP). Los PAMP tienen características importantes que los hacen objetivos ideales para detectar la inmunidad innata. Los PAMP son producidos únicamente por microorganismos, y no por células huésped. Esta es la base para la discriminación de propios e infecciosos no propios. Los PAMP están conservados entre microorganismos de una clase dada, permitiendo a un número limitado de PRR detectar la presencia de una amplia clase de patógenos invasores. Por ejemplo, un patrón en LPS permite que un solo PRR detecte la presencia de cualquier bacteria Gram negativa. Los PAMP son esenciales para la supervivencia microbiana y cualquier mutación o pérdida de los PAMP es o bien letal para el organismo o reduce grandemente su aptitud adaptativa. Esta nueva comprensión en el reconocimiento inmunitario innato están revolucionando el entendimiento sobre la defensa inmunitaria, la patogénesis, y el tratamiento y la prevención de las enfermedades infecciosas.

Los TLR representan una familia de PRR que son receptores transmembrana evolutivamente conservados que detectan PAMP y funcionan como receptores de la señalización. Los TLR se descubrieron en *Drosophila* donde juegan un papel en el desarrollo de la orientación ventral/dorsal de las moscas de la fruta (Stein y colaboradores, 1991). Cuando este gen fue mutado, se encontró que las moscas que se desarrollaron estaban "toll", que es el modismo alemán para loco o "exaltado". Además, se encontró que las moscas con la mutación de los Toll eran altamente susceptibles a infecciones por hongos (Lemaitre y colaboradores, 1996). Hasta ahora, se han identificado 11 TLR en mamíferos, detectando cada uno un conjunto diferente de estímulos microbianos y activando diferentes rutas de señalización y factores de transcripción que provocan respuestas específicas contra los patógenos (Kawai y Akira, 2005). Los TLR son glicoproteínas de membrana integrales de tipo I caracterizadas por dominios extracelulares que contienen diferentes cantidades de motivos de repetición ricos en leucina (LRR), un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático homólogo a aquel del receptor de interleucina 1 (IL-1R), denominado el dominio de homología Toll/IL-1R (TIR) (O'Neill, 2006). Los dominios de LRR están compuestos de 19-25 motivos de LRR en tándem, cada uno de los cuales tiene 24-29 aminoácidos de longitud.

El TLR4, el primer TLR de mamífero descubierto, probó ser el receptor largamente buscado para el lipopolisacárido bacteriano Gram negativo (LPS) (Medzhitov y colaboradores, 1997; Poltorak y colaboradores, 1998). El TLR2 reconoce los peptidoglicanos, además, de las lipoproteínas y los lipopéptidos de bacterias Gram positivas y micoplasma (Takeda y colaboradores, 2003; Takeuchi y colaboradores, 1999). El TLR2 puede formar heterodímeros con TLR1 o TLR6 para discriminar entre lipopéptidos de diacilo y triacilo, respectivamente (Takeda y colaboradores, 2003). Además, TLR2 en colaboración con el receptor que no es TLR de detecta 1 media la respuesta al zimosán, encontrada en la pared celular de levadura (Gantner y colaboradores, 2003). El TLR5 reconoce la flagelina, una proteína componente de los flagelos bacterianos (Hayashi y colaboradores, 2001). El TLR11, un pariente cercano del TLR5, se encontró que era abundantemente expresado en el tracto urogenital de ratones y se asoció con la protección contra las bacterias uropatógenas (Zhang y colaboradores, 2004), y se demostró recientemente que reconoce la proteína de tipo profilina del parásito protozoario *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky y colaboradores, 2005). TLR3, 7, 8 y 9 reconocen ácidos nucleicos y no son expresados en la superficie de la célula, sino se expresan exclusivamente en los compartimientos del endosoma (Latz y colaboradores, 2004; Matsumoto y colaboradores, 2003). El TLR3 está involucrado en el reconocimiento del ARN bicatenario (ARNbi) generado durante la infección viral (Alexopoulou y colaboradores, 2001), mientras que los TLR 7 y 8 estrechamente relacionados reconocen los ARN(mc) monocatenarios ricos en guanosina o uridina (Diebold y colaboradores, 2004; Heil y colaboradores, 2004) y las moléculas sintéticas de tipo imidazoquinolina, imiquimod y resiquimod (R-848) (Hemmi y colaboradores, 2002; Jurk y colaboradores, 2002). El TLR9 media el reconocimiento de los motivos de ADN CpG no metilados bacterianos y virales (Hemmi y colaboradores, 2000) y también se demostró recientemente que reconocen componentes no patógenos diferentes del ADN, tales como la hemozoína de los parásitos del paludismo (Coban y colaboradores, 2005). El TLR10 juega un papel en la ruta de la inflamación mediada por patógenos, el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata, pero el ligando de TLR10 es actualmente desconocido.

Los TLR también pueden dividirse en seis subfamilias principales con base en la similitud de secuencias (Roach y colaboradores, 2005), cada una reconociendo PAMP relacionados. La subfamilia que consiste de TLR1, TLR2 y TLR6 reconoce lipopéptidos, TLR3 reconoce a ARNbi, TLR4 LPS, TLR5 flagelina, y la subfamilia de TLR9 que incluye los TLR7 y TLR8 altamente relacionados reconoce ácidos nucleicos. De manera importante, la localización subcelular de los TLR se correlaciona con la naturaleza de sus ligandos, en vez de con la similitud de secuencias

(Hargreaves y Medzhitov, 2005). Los TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 están presentes en la membrana de la superficie del plasma donde están involucrados en la ruta de inflamación mediada por patógenos y/o reconocen componentes bacterianos y virales, mientras que los TLR antivirales, TLR 3, 7, 8, y 9 se expresan en endosomas intracelulares. Ya que los ácidos nucleicos reconocidos por los TLR antivirales también se encuentran en los vertebrados, su localización en los endosomas limita su reactividad a los propios ácidos nucleicos (Barton y colaboradores, 2006). El TLR11 está presente en la superficie de la célula y es un receptor para las bacterias uropatógenas y los parásitos protozoarios.

La señalización por los TLR es compleja y ha sido revisada en otra parte (Akira y Takeda, 2004; O'Neill, 2006). En resumen, todos los TLR con excepción de TLR3 señalizan a través de la molécula adaptadora, el factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88), una proteína citoplasmática que contiene un dominio del TIR y un dominio de muerte. Finalmente, NF- κ B y las MAPK se activan secuencia abajo de TRAF6 lo que conduce a la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12. Además de MyD88, TLR3 y TLR4 señalizan a través de TRIF, otro adaptador que contiene TIR que se requiere para la producción de interferones de tipo I y genes dependientes del interferón de tipo I.

Los TLR se expresan en una variedad de células inmunitarias y no inmunitarias. Los macrófagos murinos expresan TLR1-9, lo que refleja su importancia en el inicio de las respuestas proinflamatorias. Los DC plasmacitoides (pDC) que producen grandes cantidades de interferones de tipo I durante las infecciones virales expresan TLR7 y 9. Todos los DC convencionales en el ratón expresan TLR1, 2, 4, 6, 8 y 9, mientras que TLR3 está confinado al subconjunto DC de CD8+ y CD4- CD8- (Iwasaki y Medzhitov, 2004). En los humanos, la expresión de TLR9 se restringe a pDC y a células B (Bauer y colaboradores, 2001; Krug y colaboradores, 2001).

Existe un gran interés en la comprensión de la expresión de los TLR en las células epiteliales de la mucosa (EC) que sirven como la primera línea de defensa contra la mayoría de las infecciones. En nuestros estudios recientes (Yao X-D y colaboradores, 2007), nos hemos concentrado en la comprensión de la expresión y regulación de los TLR en EC en el tracto genital de ratones y humanos. Se usó microdissección de captura láser (LCM) para mostrar que el ciclo estral en ratones hembra tiene profunda influencia en la expresión de los TLR en el epitelio vaginal. La expresión del ARNm de esencialmente todos los TLR excepto de TLR11 se incrementó significativamente durante el diestrus y especialmente después del tratamiento con la progestina de acción prolongada Depo-Provera (Yao X-D y colaboradores, manuscrito enviado). Estos hallazgos contribuyen a nuestra comprensión de la defensa inmunitaria innata contra las infecciones de transmisión sexual, y potenciar la calidad de la salud reproductiva femenina.

La liberación por parte de la mucosa de los ligandos de TLR, incluyendo los oligodesoxinucleótidos CpG (ODN que es un ligando para TLR9), ARNbi, y flagelina, pueden inducir un efecto antiviral innato que puede proteger a los ratones contra la estimulación intravaginal (IVAG) con HSV-2 (Ashkar y Rosenthal, 2002). Los estudios han demostrado que la administración intranasal de la glicoproteína de la envoltura purificada (gB) de HSV-2 más ODN con CpG como adyuvante indujo una fuerte IgA e IgG específica de gB en el tracto vaginal (que persiste a lo largo del ciclo estral) así como CTL específico de gB sistémico y genital, y protegió contra la infección letal por HSV-2 IVAG (Gallichan y colaboradores, 2001). Posteriormente, se demostró que la inmunización intranasal con VIH-1 agotado en gp120 inactivado más ODN con CpG indujo IgA anti-VIH en el tracto genital y respuestas inmunitarias mediadas por células T específicas del VIH, incluyendo la producción de IFN γ y β -quimiocinas (Dumais y colaboradores, 2002). Además, los ratones inmunizados por vía intranasal con VIH-1 más CpG indujeron células T CD8+ en el tracto genital, proporcionando una protección de clado cruzada contra la estimulación IVAG con virus vacuna recombinantes que expresan *gag* para VIH-1 de diferentes clados (Jiang y colaboradores, 2005). Más recientemente, aunque el tracto genital ha sido considerado como un sitio inductivo inmunitario pobre, especialmente después de la inmunización con antígenos no replicantes, la inmunización intravaginal (IVAG) de ratones hembra con la subunidad recombinante gB de HSV-2 más CpG indujo niveles mayores de anticuerpos IgG e IgA específicos de gB en suero y lavados vaginales versus los ratones inmunizados solo con antígeno y los ratones inmunizados con gB más CpG estuvieron mejor protegidos contra la infección vaginal con HSV-2 (Kwant y Rosenthal, 2004). Por lo tanto, es posible inducir respuestas inmunitarias protectoras después de la inmunización con IVAG con un antígeno de proteína de subunidad no replicante ya que se usa un adyuvante apropiado de la mucosa.

Estudios recientes han demostrado que los PAMP que incluyen ADN con CpG, ARNbi, y LPS fueron capaces de inhibir al virus tipo 2 del herpes simple (HSV-2) y el virus de estomatitis vesicular (VSV) *in vitro* (Ashkar y colaboradores, 2003 & 2004). Una dosis única de ODN con CpG suministrada a través de la mucosa a la mucosa vaginal, en ausencia de cualquier antígeno viral, protegió contra la infección genital con dosis letales de HSV-2. Esta protección estuvo mediada por el sistema inmunitario innato, ya que sucedió en ratones con genes inactivados que carecen de células B y T. El suministro local IVAG de ODN con CpG resultó en una rápida proliferación y el engrosamiento del epitelio vaginal y la inducción de un estado antiviral dependiente de TLR-9 que no bloqueó la entrada del virus pero que inhibió la replicación viral en células epiteliales vaginales (Ashkar y colaboradores, 2003). La liberación por la mucosa del ARNbi, el ligando para TLR3, protegió contra la infección genital por HSV-2 sin la inflamación local o sistémica observada con ODN con CpG (Ashkar y colaboradores, 2004). Por lo tanto, la liberación local del ligando TLR3 puede ser un medio más seguro de protección contra la infección viral genital.

Los TLR inducen un intervalo de respuestas dependiendo del tipo de células en las cuales se activan (Ashkar y Rosenthal, 2002; Iwasaki y Medzhitov, 2004). Por ejemplo, el tratamiento de DC con ADN con CpG que actúa a través de TLR9 activa los DC hasta la madurez, incluyendo la sobreexpresión de las moléculas MHC de clase II y moléculas coestimuladoras, así como la producción de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y la mejora de la presentación de antígenos. En forma similar, el tratamiento de células B con CpG induce su activación y proliferación, secreción de anticuerpos así como IL-6 e IL-10 y las células B se hacen resistentes a la apoptosis. La activación de células inmunitarias a través del ADN con CpG induce una respuesta dominada por Th1.

Los mecanismos por los cuales los PRR median la defensa del huésped contra los patógenos son el foco de una investigación intensa. Debido a su capacidad de potenciar respuestas inmunitarias innatas, existe la necesidad de estrategias novedosas para usar ligandos, agonistas o antagonistas sintéticos de PRR (es decir, "inmunológicos innatos") como agentes autónomos para proporcionar protección o tratamiento contra la infección con bacterias, parásitos y virus intracelulares. Además, la activación del sistema inmunitario innato a través de los PRR utilizando sus respectivos ligandos o agonistas representa una estrategia para potenciar respuestas inmunitarias contra patógenos específicos, elaborando agentes que señalizan a través de los PRR, adyuvantes de vacuna potenciales.

Existe la necesidad de una fracción o composición herbal natural, que active específicamente las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas para tratar condiciones asociadas tales como alergias, asma, infecciones virales y microbianas, y cáncer sin provocar los efectos secundarios perjudiciales o incomodidad. Los tipos de respuestas inmunitarias son bien conocidos. Las respuestas de Th1 se caracterizan por la generación de células T asesinas y ciertos anticuerpos en respuesta a patógenos intracelulares y defectos intracelulares tales como cánceres. Las respuestas de Th2 combaten los patógenos extracelulares. Las reacciones alérgicas se presentan en respuesta a sustancias ambientales (es decir, alérgenos), y son el resultado de respuestas específicas de Th2. Las respuestas de Th2 se caracterizan por la generación de otros tipos específicos de anticuerpos y son típicas de las reacciones alérgicas, en las cuales el alérgeno es confundido con un patógeno en la superficie de la mucosa y activa una respuesta inmune que resulta en síntomas tales como ojos llorosos, inflamación de las vías respiratorias y contracción de las células musculares de las vías respiratorias en los pulmones. La activación de TLR induce células que presentan antígenos para producir citoquinas que favorecen las respuestas inmunitarias del tipo Th1, con lo que se evita o reduce el desarrollo de respuestas perjudiciales de Th2 debidas a exposición a los alérgenos.

Las alergias se caracterizan específicamente por la activación excesiva de glóbulos blancos denominados mastocitos y basófilos por IgE, lo que resulta en una respuesta inflamatoria extrema. Cuando una persona propensa a alergias es expuesta inicialmente a un alérgeno, se elaboran grandes cantidades del anticuerpo IgE específico correspondiente. Las moléculas de IgE se unen a la superficie de los mastocitos (en el tejido) o basófilos (en la circulación). Los mastocitos se encuentran en los pulmones, piel, lengua y revestimientos de la nariz y el tracto intestinal. Cuando un anticuerpo IgE en un basófilo o mastocito encuentra su alérgeno específico, el anticuerpo IgE señala al mastocito o basófilo para liberar compuestos químicos tales como histamina, heparina, y sustancias que activan las plaquetas sanguíneas y atraen células secundarias tales como eosinófilos y neutrófilos. El mastocito o basófilo activado también sintetiza nuevos mediadores, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos. Estos mediadores químicos provocan los síntomas asociados con las alergias, que incluyen sibilancia, estornudos, ojos llorosos, y comezón. Las reacciones alérgicas comunes incluyen eccema, urticaria, fiebre del heno, asma, alergias por alimentos, y reacciones a venenos de insectos picadores tales como avispas y abejas.

Una exacerbación del asma es un deterioro serio en la función pulmonar de un paciente que resulta a menudo en la hospitalización e incluso la muerte. El asma se presenta cuando se inflaman los conductos principales del aire de los pulmones, los tubos bronquiales. Los músculos de las paredes bronquiales se endurecen, y las células en los pulmones producen moco adicional estrechando aún más las vías respiratorias, provocando desde una sibilancia menor hasta una dificultad severa en la respiración. El asma se activa con frecuencia por una infección viral respiratoria, tal como el resfriado común, pero otros agentes irritantes tales como humo de cigarrillo, ácaros del polvo, caspa de los animales, polen de plantas, contaminación del aire, desodorantes y perfume, pueden hacer más frecuentes, severos e incontrolables los síntomas del asma. Otros activadores del asma incluyen el ejercicio, aire frío, y estrés emocional. La mayoría de las exacerbaciones del asma se precipitan por infecciones comunes por virus en las vías respiratorias. En los niños, ser atópicos y tener una infección por virus son ambos factores principales de riesgo para ser admitidos en un hospital por una enfermedad con sibilancia. Aunque está clara la importancia clínica de los ataques de asma y específicamente la exacerbación viral del asma, las razones por las que los pacientes con asma se enferman tanto después de un virus de resfriado común siguen siendo pobremente entendidas.

Normalmente, las infecciones virales provocan una afluencia de neutrófilos en las vías respiratorias con un gran componente celular mononuclear de células T, predominantemente CD8+. Sin embargo, se ha vuelto evidente que las infecciones virales pueden producir un intervalo de respuestas inflamatorias, incluyendo eosinofilia de las vías respiratorias, dependiendo de la condición preexistente del huésped. En individuos atópicos, la infección experimental por rinovirus incrementa el reclutamiento de los eosinófilos hacia las vías respiratorias después del reto de estimulación por los antígenos y provoca una mayor reactividad en las vías respiratorias en comparación con los individuos no alérgicos. Después de la infección intranasal con rinovirus, las biopsias de las vías respiratorias

inferiores de individuos asmáticos contienen mayor número de eosinófilos, que persisten incluso en la convalecencia. En pacientes con asma, la presencia de eosinófilos en las vías respiratorias durante los periodos de exacerbaciones ha sido bien establecida. El hallazgo de eosinófilos en las vías respiratorias durante la exacerbación del asma se vuelve de alguna manera paradójico, considerando que estas exacerbaciones se disparan a menudo por una infección viral. Aunque la asociación de los eosinófilos y sus productos de degranulación en las vías respiratorias ha sido descrita durante la infección por virus en pacientes con asma, se desconoce si los eosinófilos están activos en respuesta a los virus y como puede ocurrir esta activación.

Para que ocurra una exacerbación por asma, la comprensión actual sugiere que se pueden activar las células efectoras (es decir, los eosinófilos, mastocitos, basófilos, neutrófilos). La Figura 1 ilustra un modelo de liberación mediador de eosinófilos inducido por virus en las vías respiratorias lo cual resulta en una hiperreactividad de las vías respiratorias por medio de la disfunción del control neuronal del músculo liso de las vías respiratorias. El virus o el antígeno viral está presente en las células T de memoria. Las células T activadas (CD4) liberan un factor de degranulación soluble desconocido, probablemente una citoquina tal como GM-CSF. Estas células T también pueden expresar ligandos de la superficie de la célula, por ejemplo, ICAM-1. Los eosinófilos responden al mediador soluble, ligandos de la superficie de la célula, o combinación de los mismos con la liberación de diversos mediadores eosinófilos (es decir, proteína básica principal de los eosinófilos, eosinofil peroxidasa, RANTES).

En los asmáticos, la liberación del mediador de eosinófilos inducida por virus en las vías respiratorias se correlaciona con el desarrollo de la exacerbación del asma. Para que se involucre a los eosinófilos en el desarrollo de exacerbaciones del asma inducidas por virus, deben responder al virus ya sea indirectamente a través de otra célula o directamente. Este proceso representaría la liberación del mediador de eosinófilos inducida por virus.

Los médicos occidentales han sido renuentes a recetar medicinas herbales debido a la falta de investigación científica sobre sus propiedades preventivas y terapéuticas. Sin embargo, las medicinas herbales no requieren un tiempo de desarrollo prolongado y los altos costos que se encuentran normalmente en los fármacos sintéticos. Además, están fácilmente disponibles y le ofrecen al sujeto una alternativa más cómoda y asequible con efectos secundarios mínimos en comparación con los medicamentos o vacunas por prescripción.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona una fracción de *Panax quinquefolius* para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejoría de una inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias en un sujeto que tiene una afección caracterizada por la inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias, en donde la fracción se prepara a partir de un extracto soluble en agua de una porción de la raíz de *Panax quinquefolius*, y en donde la fracción es sustancialmente idéntica a una fracción seleccionada del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃, una fracción purificada de CVT-E002, una fracción purificada de PQ₂ y una fracción purificada de PQ₂₂₃, en donde CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃ son como se describen en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454, 7.067.160, 7.186.423 y 7.413.756.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de una fracción de *Panax quinquefolius* para la preparación de una composición farmacéutica o un producto alimenticio para prevenir, tratar o mejorar la inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias en un sujeto que tiene una condición caracterizada por la inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias, en donde la fracción se prepara a partir de un extracto soluble en agua de la parte de raíz de *Panax quinquefolius*, y en donde la fracción es sustancialmente idéntica a una fracción seleccionada del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃, una fracción purificada de CVT-E002, una fracción purificada de PQ₂ y una fracción purificada de PQ₂₂₃, en donde CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃ son como se describen en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454, 7.067.160, 7.186.423 y 7.413.756.

En el primer aspecto y el segundo aspecto, la condición puede ser una alergia o puede ser asma.

La fracción se puede seleccionar del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ y una fracción purificada a partir de CVT-E002, una fracción purificada a partir de PQ₂ y una fracción purificada a partir de PQ₂₂₃.

En algunas realizaciones, la fracción modula la transducción de la señal de un receptor tipo Toll. El receptor tipo Toll puede ser un receptor tipo Toll 2, un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y un receptor tipo Toll 6, un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y un receptor tipo Toll 1 o un receptor tipo Toll 4.

La fracción para uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede proporcionarse en combinación con otro medicamento o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo los productos alimenticios.

En el segundo aspecto de la invención, la composición farmacéutica o el producto alimenticio pueden ser para uso en combinación con otro medicamento o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo los productos alimenticios.

- 5 En la presente invención se divulga un método para tratar una condición susceptible de tratamiento por la activación de la señalización de la inmunidad innata en un sujeto que requiera de tal tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de al menos una fracción de ginseng. La condición se puede seleccionar entre una alergia, asma, infección viral, infección microbiana o cáncer. La infección viral puede ser un virus respiratorio o un virus transmitido por a través de las mucosas, incluyendo, pero sin limitarse a, influenza, corona virus, herpes, virus respiratorio sincitial, Rhabdoviridae, o virus de la inmunodeficiencia humana.
- 10 La fracción puede ser elaborada a partir de un ginseng seleccionado a partir de *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidus*, ginseng verde o fresco, ginseng blanco, o fracción ginseng. La fracción puede ser seleccionada de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ o de fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃. CVT-E002 puede modular la transducción de la señal de un receptor tipo Toll. El receptor tipo
- 15 Toll puede ser un receptor tipo Toll 2. El receptor tipo Toll puede ser un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y del receptor tipo Toll 6. El receptor tipo Toll puede ser un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y del receptor tipo Toll 1. El receptor tipo Toll puede ser un receptor tipo Toll 4. CVT-E002 puede inducir sobreexpresión de linfocitos y células presentadoras de antígeno, secreción de citoquinas, la secreción de factores antivirales, o combinaciones de los mismos.
- 20 Una fracción de ginseng para la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa para prevenir, tratar o mejorar una condición también se divulga en la presente invención. La fracción puede ser elaborada a partir de un ginseng seleccionado de *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidus*, ginseng verde o fresco, ginseng blanco, o ginseng rojo. La fracción puede ser una fracción de *Panax quinquefolius*.
- 25 La fracción se puede seleccionar de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ o fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃.
- También se divulga aquí una composición farmacéutica que comprende una fracción ginseng en combinación con otro medicamento o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables que incluyen productos alimenticios para la activación de respuestas inmunes innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar una condición. La fracción se puede elaborar a partir de un ginseng seleccionado de *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidus*, ginseng verde o fresco, ginseng blanco, o ginseng rojo. La fracción se puede seleccionar de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ o fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃.
- 30
- También se describe en la presente invención un producto alimenticio que comprende una fracción de ginseng para la activación de respuestas inmunes innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar una condición. La fracción se puede elaborar a partir de un ginseng seleccionado de *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidus*, ginseng verde o fresco, ginseng blanco, o ginseng rojo. La fracción puede ser una fracción de *Panax quinquefolius*. La fracción se puede seleccionar de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ o fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃.
- 35
- También se describe en la presente invención el uso de una fracción de ginseng para la preparación de una composición farmacéutica o un producto alimenticio para la activación de respuestas inmunes innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar una condición. La condición se puede seleccionar entre una alergia, asma, infección viral, infección microbiana o cáncer. La infección viral puede ser por un virus respiratorio o transmitida a través de las mucosas incluyendo la influenza, virus corona, herpes, virus sincitial respiratorio, Rhabdoviridae, y el virus de la inmunodeficiencia humana. La fracción se puede elaborar a partir de un ginseng seleccionado de *Panax quinquefolius*, *Panax trifolia*, *Panax ginseng*, *Panax japonicus*, *Panax schinseng*, *Panax notoginseng*, *Panax pseudoginseng*, *Panax vietnamensis*, *Panax elegatior*, *Panax wangianus*, *Panax bipinratifidus*, ginseng verde o fresco, ginseng blanco o ginseng rojo. La fracción se puede seleccionar de a partir de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ o fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃.
- 40
- 45
- 50 En la presente invención se divulga un método para la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa para prevenir, tratar o mejorar una condición en un sujeto que requiera de tal activación mediante la administración al sujeto de una fracción de ginseng o una composición farmacéutica que comprende el fracción en combinación con otro medicamento o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables incluyendo productos alimenticios.

También se divulga un método para prevenir, tratar o mejorar una condición asociada con la activación de la señalización de la inmunidad innata que comprende la modulación de la transducción de la señal de los receptores tipo Toll mediante la administración de una fracción de ginseng a un sujeto que lo requiera.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 muestra un modelo de trabajo de la liberación del mediador eosinófilo inducido por virus en las vías respiratorias.
- 10 La Figura 2 muestra la liberación de eosinófilo peroxidasa por parte de eosinófilos humanos después del cultivo conjunto con virus de parainfluenza y diferentes combinaciones de linfocitos autólogos, células dendríticas, y macrófagos ($p < 0,001$). Cada barra es la media $\pm$ SEM (error estándar de la media) de al menos doce experimentos usando diferentes donadores.
- 15 La Figura 3 muestra que la proliferación de linfocitos (como se mide mediante la incorporación de H^3 -timidina) se presenta después de seis días en cultivo ($34^{\circ}C$, 5% de CO_2) con virus de parainfluenza y células que presentan antígeno (es decir, macrófagos y células dendríticas). Cada barra es la media $\pm$ SEM de al menos cinco experimentos usando diferentes donadores para el virus activo. Se obtuvieron resultados similares con RSV (datos no mostrados).
- La Figura 4 muestra los resultados de citometría de flujo para caracterizar linfocitos en cultivo conjunto con células dendríticas.
- La Figura 5 muestra una tabla que enumera citoquinas/quimiocinas medidas por ELISA/Proyector, $n = 1$, las flechas representan los valores con relación al control respectivo apropiado.
- 20 La Figura 6 muestra que la proliferación de linfocitos (como se visualiza mediante un microscopio de luz y medido por la incorporación de H^3 -timina) se presenta después de seis días en cultivo ($34^{\circ}C$, 5% de CO_2) con linfocitos, CVT-E002 y células dendríticas.
- 25 Las Figuras 7A-D muestran los resultados del análisis por citometría de flujo de la presentación de antígeno y maduración de DC. La Figura 7A muestra las subpoblaciones de células. La Figura 7B muestra los resultados de la selección de células por la incorporación y degradación de DQ-OVA bajo condiciones diferentes. Los valores representan el porcentaje de células dentro de cada categoría que son positivas para DQ-OVA. La Figura 7C muestra la evaluación de maduración de DC por medio del tamaño y la granularidad (los valores representan el porcentaje de células totales presentes en cada categoría). La Figura 7D son imágenes de citometría de flujo que representan las subpoblaciones de DC sin (izquierda) y con (derecha) tratamiento de CVT-E002.
- 30 Las Figuras 8A y 8B muestran que el tratamiento con CVT-E002 estimula la producción de IL-6 (Figura 8A) y de IFN- β (Figura 8B) en células RAW264.7 *in vitro*.
- La Figura 9 muestra que el tratamiento con CVT-E002 estimula la producción de óxido nítrico (NO) *in vitro*.
- La Figura 10 muestra la producción de IL-6 por monocitos/macrófagos humanos primarios después de la incubación con CVT-E002.
- 35 Las Figuras 11A y 11B muestran que CVT-E002 inhibe significativamente la replicación de VSV *in vitro*.
- La Figura 12 muestra la producción de IL-6 durante el tratamiento con CVT-E002 o HT-1001 de macrófagos peritoneales C57/B6 y MyD88-/-.
- Las Figuras 13A y 13B muestran la producción de IL-6 (Figura 13A) o IFN- β (Figura 13B) durante el tratamiento con CVT-E002 o HT-1001 de macrófagos peritoneales C57/B6 y MyD88-/-.
- 40 La Figura 14 muestra que el tratamiento con CVT-E002 durante un periodo de 24 horas estimula la producción de IL-8 en células 293 transfectadas con hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 y hTLR4 (controles de Pam3CSK/LPS). hTLR4 representa la coexpresión de hTLR4 con MDR y CD14.
- 45 La Figura 15 muestra que el tratamiento con CVT-E002 durante un periodo de 48 horas estimula la producción de IL-8 en células 293 transfectadas con hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 y hTLR4 (controles de Pam3CSK/LPS). hTLR4 representa la coexpresión de hTLR4 con MDR y CD 14.

Las Figuras 16A y 16B muestran que el tratamiento con CVT-E002 inhibe el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) (Figura 16A) y reduce la cantidad de inflamación de las vías respiratorias eosinofílicas (Figura 16B).

- 5 La Figura 17A y 17B demuestra que el suministro de CVT-E002 a las interfaces mucosas ofrece protección de un virus (HSV-2) suministrado a las mismas superficies mucosas. La Figura 17A muestra los puntajes de patología vaginal de ratones C57BL/6 a los que se les suministró CVT-E002, HT-1001 o PBS IVAG seguido por una estimulación IVGA con HSV-2. La Figura 17B es el porcentaje de supervivencia de ratones C57BL/6 a los que se les suministró CVT-E002, HT-1001 o PBS IVAG seguido por una estimulación IVAG con HSV-2.

- 10 Aspectos y ventajas adicionales en vista de la descripción serán evidentes a partir de la descripción que se presenta a continuación. Se entenderá, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan sólo a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención, se suministran únicamente a manera de ejemplo.

Descripción detallada de la invención

- 15 Cuando se describe la presente invención, todos los términos no definidos en el presente documento tienen sus significados comunes reconocidos en la técnica. En la medida en que la siguiente descripción sea de una realización específica o un uso particular de la invención, se pretende que sólo sea ilustrativa, y no limitante de la invención reivindicada.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, los términos y frases expuestos a continuación tienen los siguientes significados.

- 20 “Biocompatible” significa que no genera una respuesta indeseable significativa por parte del huésped para la utilidad pretendida. Más preferiblemente, los materiales biocompatibles son no tóxicos para la utilidad pretendida. Por lo tanto, para utilidad en humanos, biocompatible es más preferiblemente no tóxico para humanos o tejidos humanos.

- 25 “Portador” significa un vehículo apropiado que es biocompatible y farmacéuticamente aceptable, incluyendo por ejemplo, uno o más diluyentes, excipientes, adyuvantes, saborizantes, o sustancias de encapsulación sólidas, semisólidas o líquidas que son adecuadas para administración.

“Sujeto” significa seres humanos u otros vertebrados. El sujeto puede ser un niño o un adulto.

Un “alimento funcional” es similar en apariencia a, o puede ser, un alimento convencional que se consume como parte de una dieta usual, y se demuestra que tienen beneficios fisiológicos y/o reduce el riesgo de enfermedad, más allá de las funciones nutricionales básicas, es decir, contienen un ingrediente activo.

- 30 Un “nutracéutico” es un producto aislado o purificado a partir de alimentos que se vende generalmente en formas medicinales no asociadas usualmente con alimentos. Un nutracéutico debe tener un beneficio fisiológico o proporcionar protección contra una enfermedad.

Un “adyuvante de vacuna” significa cualquier sustancia o compuesto capaz de promover una respuesta inmunitaria mejorada o aumentada cuando se agrega a una vacuna.

- 35 Una “vacuna” significa cualquier compuesto o preparación de antígenos diseñado para estimular una respuesta inmunitaria normal. La vacuna puede ser profiláctica o terapéutica.

- 40 “Cantidad efectiva” y/o “cantidad terapéutica” significan una dosificación suficiente para proporcionar prevención, tratamiento y/o mejoría del estado de enfermedad que está siendo tratado. Esto variará dependiendo del paciente, la enfermedad y el tratamiento que está siendo efectuado. Por ejemplo, en caso de una infección viral, una “cantidad efectiva” es aquella cantidad necesaria para mejorar sustancialmente la probabilidad de tratar la infección, en particular aquella cantidad que mejora la probabilidad de prevenir exitosamente la infección o eliminar la infección cuando se ha presentado.

- 45 Una “fracción” se entiende que se refiere a una preparación concentrada obtenida a partir de la extracción de una planta o parte de la planta con un disolvente adecuado tal como, por ejemplo, agua, etanol, una mezcla de los mismos, aceites o cualquier otro disolvente apropiado bien conocido en el estado de la técnica de extracción de plantas. La fracción o extracto se puede usar como tal si es farmacológicamente aceptable, o el disolvente de las soluciones resultantes se remueve y el residuo se usa como tal o después de un procedimiento adicional, por ejemplo, después de resolver o volver a suspender en un disolvente apropiado. El término “planta” se entiende que

significa la planta entera y partes de la planta que comprenden los ingredientes activos, por ejemplo, las hojas, los tallos, los frutos o las raíces.

“Ginseng” hace referencia a cualquier variedad y tipo de ginseng incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos enlistados a continuación.

5

Tabla 1. Variedades y tipos de Ginseng

Nombre(s) latinos	Nombre(s) común(es)
<i>Panax quinquefolius</i>	Norteamericano / canadiense
<i>Panax trifolia</i>	Región oriental de Norteamérica
<i>Panax ginseng</i>	Ginseng asiático
<i>Panax japonicus</i>	Ginseng coreano
<i>Panax schinseng</i>	Ginseng oriental
<i>Panax notoginseng</i>	Ginseng japonés
<i>Panax pseudoginseng</i>	Ginseng chino
<i>Panax vietnamensis</i>	Ginseng nepalés
<i>Panax elegatior</i>	Ginseng vietnamita
<i>Panax wangianus</i>	Ginseng silvestre
<i>Panax bipinratifidus</i>	Ginseng verde o fresco
	Ginseng rojo
	Ginseng blanco
	Xi Yang Shen
	Ren Shen / Gao Li Shen
	Tienchi / Sanchi
	Sâm Ngoc Linh

Se entenderá por parte de aquellos capacitados en la técnica que existen muchos otros géneros de plantas del género *Panax* que pertenecen a las Araliáceas de las cuales pueden obtenerse y usarse fracciones de ginseng. El término “ginseng” también incluye ginseng silvestre o procesado. El ginseng silvestre es ginseng que no ha sido plantado y cultivado en forma doméstica, sino que crece naturalmente y es cosechado donde quiera que se encuentre cultivado. El ginseng procesado incluye, por ejemplo, ginseng fresco o verde, ginseng blanco, y ginseng rojo. El ginseng fresco o verde es ginseng en bruto cosechado en el campo. El ginseng blanco se obtiene al secar ginseng fresco, y el ginseng rojo se obtiene al ahumar ginseng fresco seguido por secado del ginseng tratado con vapor.

10

15

Una “fracción de ginseng” o “fracciones de ginseng” pretende referirse a fracciones elaboradas a partir de cualquier variedad y tipo de ginseng como se enumera en la Tabla 1 o se describió anteriormente, y subfracciones obtenidas a partir de estas fracciones de ginseng, que exhiben la actividad de respuestas inmunitarias adaptativas e innatas de activación para prevenir, tratar o mejorar una condición en un sujeto, como se verifica por medio de la realización de una o más evaluaciones farmacológicas *in vitro* o *in vivo*.

"CVT-E002" se refiere a un ejemplo de una fracción de ginseng obtenida a partir de *Panax quinquefolius*, y que tiene propiedades inmunorreguladoras (como se describió previamente en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 y 7.413.756). CVT-E002 exhibe la actividad adicional de activar respuestas inmunitarias adaptativas e innatas como se describe en la presente invención.

"PQ₂" se refiere a un ejemplo de una fracción de ginseng que se obtiene a partir de *Panax quinquefolius*, y que tienen propiedades inmunorreguladoras como se describió previamente en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 y 7.413.756.

"PQ₂₂₃" se refiere a un ejemplo de una fracción de ginseng que se obtiene a partir de *Panax quinquefolius*, y que tiene propiedades inmunorreguladoras como se describió previamente en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 y 7.413.756.

En la presente invención se divulga una fracción de ginseng, o una composición farmacéutica o un producto alimenticio que comprende la fracción, para activación de las repuestas inmunes innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar una condición. Además, se divulga una fracción de ginseng, o una composición farmacéutica o producto alimenticio que comprende la fracción, para la activación del sistema inmunitario innato y adaptativo a través de receptores de reconocimiento del patrón (PPR), tales como los receptores tipo Toll, para tratar, prevenir o mejorar diferentes condiciones en un sujeto. Tales afecciones incluyen, pero no se limitan a, infecciones virales y microbianas, alergias, asma, y cáncer. Conforme al conocimiento de los inventores, esta es la primera vez que se ha mostrado que una fracción derivada de una planta natural activa específicamente el sistema inmunitario innato del mamífero a través de PRR. En la presente invención, la fracción de ginseng es una fracción de *Panax quinquefolius* seleccionada del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ y fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃. En una realización, la fracción de ginseng es CVT-E002.

La fracción de ginseng se prepara típicamente al secar primero y pulverizar la planta de ginseng o partes de la planta y luego realizar un proceso de extracción usando un disolvente apropiado, típicamente agua, etanol, mezcla de etanol/agua, metanol, butanol, isobutanol, acetona, hexano, éter de petróleo u otros disolventes orgánicos. La fracción o extracto puede ser luego evaporada adicionalmente y por lo tanto concentrada para producir un extracto seco por medio de secado por aspersión, secado en horno al vacío, o secado por liofilización. Los procesos para la elaboración de ejemplos de fracciones de ginseng seleccionadas del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ y fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃, de un extracto soluble en agua de la porción de la raíz de *Panax quinquefolius* han sido descritos previamente en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454; 7.067.160; 7.186.423 y 7.413.756.

Una vez preparada, se evalúa la fracción de ginseng para valorar y confirmar la actividad de activación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas mediante la realización una o más evaluaciones farmacológicas *in vitro* o *in vivo*. Tales evaluaciones incluyen, pero no se limitan a, un estudio *in vitro* de los efectos de un ejemplo de una fracción de ginseng, CVT-E002, en la replicación del virus (véanse los Ejemplos 1 y 2) y la función celular dendrítica (véase el Ejemplo 3). Cualquiera de las evaluaciones farmacológicas es adecuada, siempre y cuando se enfoquen en la indicación de las actividades anteriores ya sea en la fracción de ginseng, una muestra representativa de un lote de la fracción de ginseng en el evento de una fabricación a gran escala, o en una subfracción de la fracción de ginseng. La calidad lote a lote del producto puede ser certificada por la tecnología ChemBioPrint^{MR}, que garantiza su consistencia química así como farmacológica, como se describe en la patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6.156.291.

También se divulga en el presente documento el uso de la fracción de ginseng sola o en combinación con otro medicamento, en la preparación de una composición farmacéutica o un producto alimenticio apropiado para la activación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, para tratar, prevenir o mejorar una condición en un sujeto. La fracción de ginseng puede ser una fracción de *Panax quinquefolius*. La fracción de ginseng se puede seleccionar del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃ y fracciones purificadas de CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃.

En la presente invención se divulga una composición farmacéutica que comprende una fracción de ginseng en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Aquellos expertos en la técnica están familiarizados con cualquier portador farmacéuticamente aceptable que pudiera ser útil en este sentido, y por lo tanto no se discutirá en detalle el procedimiento para la elaboración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. De forma conveniente, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de tabletas, cápsulas, líquidos, pastillas para chupar, lociones, aerosoles, soluciones adecuadas para ser inyectadas o supositorios.

Las composiciones orales pueden incluir un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, la fracción de ginseng puede ser incorporada con excipientes y usarse en la forma de tabletas, pastillas, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un portador fluido para uso como un enjuague bucal. Los agentes de aglutinación farmacéuticamente compatibles u otros materiales portadores pueden incluirse como parte de la composición. Tales

agentes aglutinantes y portadores pueden ser un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante.

- 5 Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en la forma de un atomizador en aerosol a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

- 10 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para administración transmucosal o transdérmica, se usan agentes de penetración apropiados para la barrera que va a ser permeada en la formulación. Tales agentes de penetración se conocen generalmente en el arte. La administración transmucosal puede realizarse a través del uso de atomizadores nasales, supositorios o enemas de retención para suministro rectal. Los supositorios pueden incluir bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao y otros glicéridos. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles, o cremas como se conoce generalmente en el arte.

- 15 La fracción de ginseng también puede prepararse con portadores que protegerán los agentes activos contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, recubrimientos y sistemas de suministro microencapsulados.

- 20 La fracción de ginseng puede usarse sola o en combinación con otro medicamento. Las fracciones de ginseng de la invención son especialmente apropiadas para administración conjunta con un agente quimioterapéutico o como un suplemento para terapia de radiación, ya que se sabe que los pacientes con cáncer tienen una supresión seria del sistema inmunitario. Las fracciones de ginseng también pueden usarse como inmunomoduladores o adyuvantes para vacunas.

- 25 Pueden prepararse diversos productos alimenticios sólidos, semisólidos o líquidos para incluir la fracción de ginseng como un ingrediente activo. Los ejemplos no limitantes de tales productos alimenticios incluye cereal, pasta, productos de confitería (por ejemplo, galletas, tartas, caramelos, gomas, caramelos duros), nutritivos, barras de reemplazo de comida o aperitivos, yogurt, gelatina, jalea, budines, sopas, una base de frutas o vegetales, bebidas (por ejemplo, jugos, refrescos, bebidas energéticas deportivas, agua embotellada, leche, productos de soja), y alimentos para niños y bebés (por ejemplo, fórmulas infantiles, leche en polvo modificada, alimento para bebés). Además, la fracción de ginseng puede usarse como ingrediente activo en alimentos funcionales, nutracéuticos, o
30 suplementos dietéticos.

- Las formulaciones de la fracción de ginseng puede perder alguna actividad con el añejamiento y por lo tanto o bien se preparan en formas estables, o se preparan frescas para administración, por ejemplo en forma de un kit de múltiples componentes para evitar el añejamiento y para maximizar la efectividad de la fracción de ginseng. Los kits o contenedores apropiados son bien conocidos por mantener las fases de las formulaciones separadas hasta el momento de uso. Por ejemplo, un kit que contiene la fracción de ginseng en forma de polvo puede empacarse en forma separada del portador estéril tal como una solución salina, alcohol o agua, y posiblemente otros ingredientes en cantidades específicas de dosificación para mezclar al momento de uso. La fracción de ginseng puede ser suministrada en un infusor tipo "bolsa de té", bolsita o saquito, para generar formulaciones líquidas al momento del uso. El infusor tipo bolsa de té es ventajoso ya que la bolsita puede servir como filtro para las partículas pequeñas del polvo que pueden ser perjudiciales con ciertos tipos de administración (por ejemplo, por medio de inyección o infusión). Las partículas también pueden removerse, por ejemplo, por filtración.

- 45 Las dosificaciones de fracciones de ginseng de acuerdo con la invención dependen de la condición particular que va a ser tratada, así como la edad, el sexo y la condición de salud general del paciente. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas pueden encontrarse en el intervalo entre 1 y 5000 mg/kg de peso corporal por día, con entre 1 y 10 dosis diarias. La dosificación preferida es de 400 mg diarios para uso crónico o preventivo. Para usos agudos, se administran inicialmente dosis significativamente más altas. Por ejemplo, podrían administrarse 1800 mg el primer día dividido en tres dosis, podrían administrarse 1200 mg el segundo día dividido en tres dosis y podrían administrarse 900 mg el tercer día dividido en tres dosis. Posteriormente, podrían administrarse 200-400 mg diariamente hasta que se reduzcan los síntomas. Las fracciones de ginseng pueden administrarse oralmente, por
50 medio de inyección o infusión, en forma tópica, en forma nasal, en forma ocular, en forma vaginal o en forma rectal.

- La fracción de ginseng de esta invención es efectiva en la activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar diferentes condiciones en un sujeto. Adicionalmente, ya que la fracción de ginseng se prepara a partir de un producto comestible natural, se reduce el potencial de efectos secundarios. A continuación se discute la capacidad de una fracción de ginseng para estimular las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas para prevenir, tratar o mejorar una infección viral, alergia y asma, y/o se demuestra en los Ejemplos usando un ejemplo de una fracción de ginseng, CVT-E002.

CVT-E002 modula la actividad del sistema inmunitario innato para producir factores inflamatorios y antivirales, El tratamiento de células monocíticas de murino *in vitro* con CVT-E002 y la posterior exposición al virus del herpes simple tipo 2 o a estomatitis vesicular resulta en niveles significativamente elevados de IL-6, interferón β y producción de óxido nítrico en una forma dependiente de la dosis, mientras que los cultivos tratados y no tratados de control y fueron negativos (Ejemplo 1, Figuras 8A, 8B y 9). En forma similar, la incubación de monocitos/macrófagos humanos primarios con CVT-E002 durante cuarenta horas resulta en una producción significativa dependiente de la dosis de IL-6 (Figura 10).

Usando el virus de estomatitis vesicular etiquetado con proteína fluorescente verde (VSV-GFP), CVT-E002 inhibe significativamente la replicación del virus *in vitro* (Figuras 11A y 11B). CVT-E002 puede proteger contra una variedad de infecciones virales transmitidas sexualmente, incluyendo VIH-1. Los resultados descritos en la presente invención soportan la aplicación tópica de CVT-E002 para activar rápidamente el sistema inmunitario innato de la mucosa e inducir un estado antiviral local que protege las superficies de la mucosa contra una infección con agentes transmitidos sexualmente. Este enfoque puede ser más seguro y menos susceptible a la selección de patógenos resistentes ya que utilizaría más "microbicidas naturales" y las respuestas inmunitarias innatas de la mucosa evolucionariamente antiguas para protección.

La señalización por todos los TLR (excepto TLR3) ocurre a través del gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), una proteína adaptadora que activa el factor de transcripción NF- κ B. Para determinar si las respuestas de citoquina después del tratamiento con CVT-E002 eran dependientes en la señalización con MyD88, se establecieron cultivos de macrófagos peritoneales de ratones con genes desactivados MyD88 (MyD88-/-) o de tipo silvestre C57B1/6 y se los trató con o sin CVT-E002 (Ejemplo 4). La producción tanto de IL-6 como de IFN- β después del tratamiento con CVT-E002 fue dependiente de MyD88, indicando que CVT-E002 activa la producción de citoquinas proinflamatorias y antivirales en células inmunitarias con base en la estimulación de la señalización de TLR.

Para determinar cuáles TLR se activan por CVT-E002, se utilizaron células HEK293 que se construyeron para expresar establemente genes para TLR humano específico (Ejemplo 5, Figuras 14 y 15). Aunque CVT-E002 no estimuló la producción de IL-8 a partir de células que expresan solo hTLR4, los resultados muestran que CVT-E002 estimuló la producción de IL-8 a partir de células que expresan hTLR4 y MD2-CD14 en una forma dependiente de la dosis en dos diferentes momentos. De forma interesante, CVT-E002 también estimuló células que expresan TLR2 humano en una forma dependiente de la dosis. Ya que TLR2 también puede formar heterodímeros con TLR1 y TLR6, se comparó la estimulación de células que expresan solo hTLR2 o hTLR2/1 y hTLR2/6. La incubación con CVT-E002 resultó en la producción de IL-8 en forma dependiente de la dosis en cada una de estas líneas celulares, aunque las células que expresan solo hTLR2 produjeron consistentemente niveles significativamente mayores de IL-8. En los experimentos que comparan las cuatro líneas con recuentos equivalentes de células, el volumen de activación inmune innata de CVT fue a través de TLR2. Usando las células que expresan TLR individuales, se encontró que CVT-E002 demuestra una señal mínima a través de TLR4, que es el PRR innato para el lipopolisacárido (LPS) (Figura 14). En general, los resultados sugieren que las fracciones de ginseng (por ejemplo, CVT-E002) pueden activar el sistema inmunitario innato por medio de TLR. Esto puede contar para sus efectos protectores antiinfecciosos e indica que las fracciones de ginseng pueden ser útiles como adyuvantes potenciales para vacunas para ayudar a estimular la inmunidad adaptativa e innata contra los ingredientes de la vacuna, haciendo por lo tanto más efectiva la vacuna.

En vista de la capacidad de CVT-E002 para activar las respuestas inmunitarias adaptativas y/o innatas para inhibir la replicación del virus, los inventores han encontrado que CVT-E002 también es útil en la prevención, tratamiento o mejoría de otras condiciones asociadas con la activación de la señalización de inmunidad innata incluyendo, pero sin limitarse a, alergias y asma.

Con base en los modelos *in vitro* de alérgeno/antígeno, se ha desarrollado un sistema de cultivo celular conjunto que incuba los virus de las vías respiratorias con glóbulos blancos humanos aislados usando virus de parainfluenza tipo I

(PIV) y virus sincitial respiratorio (RSV). Estos virus se eligieron debido a que son virus de las vías respiratorias de ARNm que frecuentemente infectan a humanos a lo largo de sus vidas, y se asocian con exacerbaciones del asma.

Como se muestra en la Figura 2, los virus en presencia de eosinófilos no inducen directamente la liberación de eosinófilo peroxidasa (EPO). Por el contrario, los virus inducen liberación de EPO solo cuando los eosinófilos se incuban con combinaciones particulares de linfocitos, células dendríticas, y macrófagos (es decir, los últimos dos son células que presentan antígeno). Las células que presentan antígeno solo con virus y eosinófilos no inducen liberación de EPO. No ocurre liberación de EPO en ninguna combinación en ausencia del virus. De esta manera, el virus cultivado con células que presentan antígeno, parecen activar los linfocitos para inducir la liberación de EPO a partir de eosinófilos. La inactivación UV del virus no previene este efecto.

La liberación de EPO se escogió como una medida de la liberación mediadora debido a su importancia en la función del eosinófilo, sus propiedades antivirales, y la experiencia en su medición. Cuando PIV o RSV se incuban solo con eosinófilos, no se observa liberación de EPO, sugiriendo que no es posible la degranulación directa del eosinófilo. Se observaron resultados negativos similares por parte de otros usando rinovirus. Los donadores de leucocitos son adultos con antecedente atópico que exhiben eosinofilia de sangre periférica. Ya que PIV y RSV son infecciones comunes, estos donadores deberían tener inmunidad a este virus en la forma de células T de memoria. En el presente modelo, la proliferación de linfocitos ocurre en respuesta a PIV y RSV pero de nuevo únicamente cuando se cultiva conjuntamente con células que presentan antígeno. Como se muestra en la Figura 3, la proliferación de linfocitos ocurre después de seis días en cultivo con el virus de parainfluenza y células que presentan antígeno (es decir, macrófagos y células dendríticas), con mayor proliferación observada con células dendríticas comparado con los macrófagos. La fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/ml) con linfocitos solo sirvió como control positivo. La producción de citoquinas (IFN-γ y GM-CSF) se encontró en este cultivo conjunto, aunque su fuente o relevancia para la inducción de liberación de EPO no se ha determinado.

Similar a los resultados para la estimulación del virus, CVT-E002 no puede inducir directamente la proliferación de linfocitos; sin embargo, se observa una fuerte respuesta proliferativa cuando CVT-E002 se cultiva con células dendríticas (Ejemplos 2 y 3). La proliferación de linfocitos se presenta después de seis días en cultivo con linfocitos, CVT-E002 y células dendríticas. Puede existir un ligero incremento en la proliferación cuando se agrega CVT-E002 a los pozos con virus. Usando citometría de flujo para caracterizar las células, se observó una mayor expresión de HLA-DR en células dendríticas estimuladas con CVT-E002. La proliferación de linfocitos fue positiva para CD4 y demostró mayor expresión del marcador de activación CD25. La estimulación LPS sirvió como control positivo. Sin CVT-E002 o virus, no se observó ni proliferación ni sobreexpresión de CD25 del cultivo conjunto de células dendríticas con linfocitos. La estimulación con CVT-E002 indujo una mayor expresión de CD25 de linfocitos CD4+ similar a aquella apreciada en la infección solo con virus. La combinación aumentó adicionalmente la expresión.

El asma atópica/alérgica es una enfermedad por Th2. CVT-E002 es capaz de producir respuestas de Th1 (ejemplo 2, Figura 5) y esta tendencia hacia Th1 tiene el potencial para inhibir la respuesta de Th2 y por lo tanto se usa como compuesto terapéutico para enfermedades atópicas/alérgicas. En un modelo ampliamente usado de asma atópica/alérgica, por medio del cual se sensibilizaron los ratones con OVA i.p. y alumbre y luego se los retó con OVA para iniciar la enfermedad alérgica en las vías respiratorias, CVT-E002 fue capaz de prevenir el desarrollo de AHR y disminuir la cantidad de inflamación de las vías respiratorias eosinofílicas (Ejemplo 7, Figuras 16a y 16b). En los animales de control no sensibilizados no se presentó enfermedad atópica/alérgica mientras que los ratones que fueron sensibilizados, que recibieron solución salina por sonda, y luego fueron estimulados con OVA, desarrollaron una enfermedad atópica/alérgica robusta en las vías respiratorias que consiste de inflamación de las vías respiratorias eosinofílicas y AHR. En ratones de prueba sensibilizados con OVA, que recibieron CVT-E002 por sonda, y luego fueron estimulados con OVA, se inhibieron tanto la inflamación de las vías respiratorias eosinofílicas como AHR con metacolina inhalada.

CVT-E002 puede ser útil en el tratamiento de asma que es provocada ya sea por infecciones víales respiratorias u otros irritantes o por activadores. Aunque la mayoría de los adultos se verán expuestos a las mismas infecciones por virus comunes cada año, un subconjunto de pacientes con asma reaccionará con una función pulmonar disminuida. Las propiedades de CVT-E002 pueden ser beneficiosas para tales pacientes. Como se describe en la presente invención y en los Ejemplos, CVT-E002 puede ser útil para modular la respuesta a la infección por virus en los pacientes con asma al inhibir la replicación del virus y/o al favorecer una respuesta inmune de Th1. La inhibición de la replicación del virus es beneficiosa, ya que disminuye el grado de inflamación y posterior obstrucción de las vías aéreas. La promoción de una respuesta inmune por Th1 es beneficiosa ya que contrarresta la respuesta de Th2 involucrada en las reacciones atópicas.

Además del tratamiento del asma debida a infecciones víales respiratorias, CVT-E002 también puede ser efectivo para el tratamiento de asma provocado por otros irritantes y activadores. Tales irritantes y activadores incluyen, pero no se limitan a, alérgenos de interiores tales como ácaros domésticos, animales peludos, cucarachas y hongos; alérgenos de exteriores tales como polen y mohos; contaminantes del aire en interiores tales como el humo de cigarrillo; contaminante de aire del exterior tales como ozono, óxidos de nitrógeno, aerosoles ácidos y partículas; exposiciones ocupacionales; alimentos y aditivos para alimentos; fármacos tales como aspirina y fármacos antiinflamatorios no esteroideos y bloqueadores beta; rinitis; sinusitis; poliposis; reflujo gastroesofágico; fluctuaciones hormonales; aire frío seco; y ejercicio.

Las propiedades inmunomoduladoras de CVT-E002 también pueden ser beneficiosas para pacientes, ya que CVT-E002 potencia la liberación de citoquinas, los interferones de linfocitos y/o células dendríticas y está involucrado en la interacción de linfocitos y células que presentan antígeno.

En la descripción anterior y los siguientes ejemplos se debe entender que la mención de la modalidad preferida de CVT-E002 es solamente un ejemplo y la utilidad descrita en actividades deberá ser apropiada para todas las fracciones de ginseng que tengan la actividad deseada.

La invención ahora será aclarada además mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1 - Efecto de CVT-E002 en la replicación del virus *in vitro*

Se investigó la capacidad de diferentes dosis de CVT-E002 para inhibir la replicación del virus en células monocíticas de murino *in vitro*. Se disolvieron diferentes dosis (0, 10, 100 y 500 µg/ml) de CVT-E002 y HT-1001 (un ejemplo de una fracción de ginseng que comprende ginsenósidos Rb1 y Rg1 y descritos en la patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6.083.932) como control (250-2000 µg) en solución reguladora de PBS y se diluyeron hasta las concentraciones finales en medio de cultivo de tejido completo y se agregaron a células de macrófago de murino RAW-264 a 37°C *in vitro*. Después del tratamiento de las células durante 24 o 48 horas, se expusieron los cultivos celulares tratados y no tratados a virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) o a virus de estomatitis vesicular (VSV). La replicación del virus se evaluó usando ensayos en placa. Los sobrenadantes de CVT-E002 y de cultivos de control se recolectaron en diferentes momentos después del tratamiento y se evaluaron para IFN tipo I, TNFα, IL-6 y óxido nítrico (NO) usando ELISA. Las células RAW produjeron niveles significativamente elevados de IL-6 (Figura 8A), IFNβ (Figura 8B) y NO (Figura 9) después del tratamiento con CVT-E002 en una forma dependiente de la dosis. Los cultivos no tratados y tratados con control fueron negativos. Los datos de la producción de citoquina y el título viral se examinaron para las correlaciones.

CVT-E002 también se probó para la estimulación de TNFα e IFNα. TNFα se elevó tanto en grupos tratados con CVT-E002 como con HT-1001. Los resultados de IFNα fueron variables, posiblemente debido a un ELISA pobre (datos no mostrados). De manera importante, la incubación de cultivos de monocitos/macrófagos humanos primarios con CVT-E002 dio como resultado una producción significativa dependiente de la dosis de IL-6 (Figura 10). También se utilizó el VSV modificado genéticamente para expresar la proteína fluorescente verde (VSV-GFP), para mostrar que CVT-E002 inhibió significativamente la replicación del virus *in vitro* (Figuras 11A y 11B).

Ejemplo 2 - Mecanismo por medio del cual se induce la actividad antiviral por CVT-E002

Se cultivaron conjuntamente células dendríticas (DC) con linfocitos y se usó citometría de flujo para caracterizar los linfocitos. La estimulación LPS se usó como control positivo. Se encontró que RSV y PIV indujeron proliferación de células T CD3+CD4+CD25+ en presencia de células dendríticas (DC) (Figura 4, n = 3 cada una). Comparado con DC no infectadas cultivadas con linfocitos, RSV induce la producción de interferones α y γ, TNFα, RANTES, IL-1, 2, 4, 10, 12, 13, y 15 (Figura 5, n = 1). Los datos se representaron en relación con los controles no infectados respectivos (dando un valor de 1). CVT-E002 con células T solamente induce la liberación de IFNγ e IL12. CVT-E002 con DC solamente indujo la liberación de TNF, IFNγ, IL-1, 10, 12, y 15. Al agregar CVT-E002 al cultivo celular con virus se aumenta mucho la liberación de citoquina/quimiocina. Además, comparado con células no infectadas, CVT-E002 puede inducir la proliferación de linfocitos en presencia de DC sin virus (Figura 6).

Ejemplo 3 - Efecto de CVT-E002 sobre la función de las células dendríticas

Las células dendríticas (DC) se derivaron de monocitos sanguíneos por el tratamiento con GM-CSF e IL-4 durante siete días. Las DC se incubaron en presencia o en ausencia de 5 mg/ml de DQ-Ovoalbúmina autoinactivada (DQ-OVA) y CVT-E002. DQ-OVA es un pigmento fluorescente unido a ovoalbúmina. La fluorescencia de DQ-OVA se inactiva como una molécula intacta, pero cuando se degrada a través de la presentación de antígeno por las DC, el pigmento fluorescente se libera y se permite la emisión.

La Figura 7A muestra las subpoblaciones de células. Las células "tipo DC" son consistentes en tamaño y granularidad con células dendríticas maduras mientras que "No DC" son DC inmaduras así como monocitos refractarios a la diferenciación y células T. Las células tratadas con LPS se usaron como un control positivo para la maduración de DC. Usando citometría de flujo para determinar el tamaño y granularidad, parecen ser una subpoblación de monocitos, que se considera que representan un fenotipo inmaduro (No DC) comparado con DC maduras (tipo DC). Esta impresión se basa en la experiencia previa de la tinción con CD11c y HLA-DR (datos no mostrados).

Las DC incorporaron DQ-OVA como se exhibió por la fluorescencia (Figura 7B). De forma interesante, CVT-E002 potenció la señal total de DQ-OVA en una forma dependiente de la dosis (todas las células OVA+). Aunque la población tipo DC es 100% positiva para OVA, la población inmadura parece incorporar mejor la ovoalbúmina después de CVT-E002 (No DC OVA+, Figura 7B).

El tratamiento con CVT-E002 cambia el número de monocitos de la población no DC a la tipo DC madura (combinación de DC maduras) (Figuras 7C y 7D). La fenotipificación preliminar de estas poblaciones con CD11c y coloración con MHC II confirma nuestra impresión de madurez versus inmadurez. Estos datos sugieren que CVT-E002 mejora la función de DC y la madurez además de los datos de citoquina de DC.

Ejemplo 4 - Capacidad de CVT-E002 para activar el factor nuclear kappa B (NF-κB) y para señalización a través de MyD88.

Para determinar si CVT-E002 activa las respuestas inmunitarias innatas a través de la interacción con los TLR, se examinaron las capacidades de CVT-E002 para activar NF-κB y para señalización a través de MyD88. Se aislaron los macrófagos peritoneales de ratones normales (C57B1/6 de tipo silvestre) y de ratones que carecían de MyD88 (es decir, ratones con genes inactivados MyD88 designados como "MyD88^{-/-}"). Después de 24 horas de incubación *in vitro* para permitir la unión a las placas de cultivo, se lavaron los macrófagos, se los trató con diferentes dosis de CVT-E002 o HT-1001, y se incubaron por 24 horas adicionales. Se uso HT-1001 como control. Se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la producción de IL-1, IL-6, IFNβ y NO usando ELISA. Se incluyeron el ADN con CpG (dependiente de MyD88) y ARNbi (un ligando independiente de MyD88 para TLR3) como controles positivos y negativos, respectivamente. Adicionalmente, se construyeron plásmidos con el promotor NF-κB que dirige un gen reportero, LacZ. Las células transfectadas con este plásmido se trataron con diferentes dosis de CVT-E002 y se evaluó la producción del producto del gen reportero.

Los resultados demuestran que CVT-E002 indujo niveles significativos de la citoquina proinflamatoria IL-6 y la producción del factor antiviral IFNβ tipo I en macrófagos peritoneales solamente a partir de ratones de tipo silvestre, pero no de ratones MyD88^{-/-} (Figuras 12, 13A y 13B). Los cultivos tratados con HT-1001 o sin tratar fueron negativos. Estos resultados muestran que la estimulación inducida con CVT-E002 de IL-6 e IFNβ es dependiente de MyD88, e indica que CVT-E002 activa la producción de citoquinas proinflamatorias y antivirales en células inmunitarias de vertebrados a través de los TLR.

Ejemplo 5 - Identificación del TLR utilizado por CVT-E002

Para identificar los TLR que pueden ser receptores para CVT-E002, se construyeron células para expresar solamente los receptores individuales de TLR. Estas células fueron tratadas *in vitro* con dosis óptimas de CVT-E002 y ligandos/agonistas de TLR de control, y los sobrenadantes de estas células fueron usadas para medir la producción de IL-1, IL-6, TNFα y NO. Para garantizar que las células que expresan cada TLR individual eran funcionales, se incluyeron controles positivos usando ligandos/agonistas conocidos para cada TLR. Los resultados indican que CVT-E002 no hace la señalización solamente a través de TLR4. El tratamiento con CVT-E002 durante 24 horas estimuló la producción de IL-8 en células 293 transfectadas con hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 y hTLR4 (Controles Pam3CSK/LPS) (Figura 14). El tratamiento con CVT-E002 durante 48 horas estimuló la producción de IL-8 en células 293 transfectadas con hTLR2, hTLR1/2, hTLR2/6 y hTLR4 (Controles Pam3CSK/LPS) (Figura 15). hTLR4 representa la coexpresión de hTLR4 con MDR y CD 14. Para ambos periodos de tiempo, se observaron incrementos significativos en la producción de IL-8 para todos los receptores.

Ejemplo 6 - Efecto del suministro a la mucosa de CVT-E002

Se suministraron CVT-E002 o controles a los ratones en forma oral en su dieta, en forma intranasal o en forma intravaginal. Los ratones fueron posteriormente estimulados por vía intranasal o intravaginal con diversas dosis de HSV-2 o virus de estomatitis vesicular sensible al interferón (VSV). La protección contra la infección viral se evaluó mediante la medición del peso corporal, controlando la patología macroscópicamente, y midiendo los títulos de los virus de la estimulación en lavados genitales y de pulmón y en tejidos usando ensayos en placas en diferentes momentos después de la estimulación con el virus (días 1-3 y 6 días después de la infección) (Figura 17A y 17B).

Ejemplo 7 - Capacidad de CVT-E002 para inhibir el desarrollo de la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) y para disminuir la cantidad de inflamación eosinofílica de las vías respiratorias

Se sensibilizaron ratones OVA y CVT-E002+OVA dos veces con inyecciones i.p. de OVA y alumbre mientras que los animales de control no recibieron inmunización. Siete días después de las inmunizaciones finales, los animales de control y los ratones CVT-E002+OVA recibieron 200 mg/kg del compuesto CVT-E002 mediante una sonda durante siete días consecutivos. 24 horas después de la alimentación final por sonda, todos los ratones fueron estimulados dos veces en forma i.n. con 50 µg de OVA y evaluados por AHR y la inflamación de las vías respiratorias 24 h después de la segunda estimulación. Se midió la pausa potenciada (Penh) por pletismografía de cuerpo completo para determinar AHR en respuesta a la estimulación con metacolina (n=3) *P < 0,05 en comparación con los grupos con OVA o de control (Figura 16A). La inflamación de las vías respiratorias se determinó por el número de eosinófilos en fluido BAL (n = 3). *P < 0,05 en comparación con los grupos con OVA o de control (Figura 16B).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una fracción de *Panax quinquefolius* para uso en la prevención, tratamiento o mejoría de la inflamación de las vías respiratorias y/o hiperreactividad de las vías respiratorias en un sujeto que tiene una condición **caracterizada por** la inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias, en donde la fracción se prepara a partir de un extracto soluble en agua de la porción de la raíz de *Panax quinquefolius*, y en donde la fracción es sustancialmente idéntica a una fracción seleccionada de entre el grupo que consiste en CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃, una fracción purificada de CVT-E002, una fracción purificada de PQ₂ y una fracción purificada de PQ₂₂₃, en donde CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃ son como se describen en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454, 7.067.160, 7.186.423 y 7.413.756.
- 10 2. La fracción para el uso de la reivindicación 1, en donde la condición es una alergia.
3. La fracción para el uso de la reivindicación 1, en donde la condición es asma.
4. La fracción para el uso de cualquier reivindicación precedente, que se selecciona del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃, y una fracción purificada de CVT-E002, una fracción purificada de PQ₂ y una fracción purificada de PQ₂₂₃.
- 15 5. La fracción para el uso de la reivindicación 5, en donde la fracción es CVT-E002.
6. La fracción para el uso de cualquier reivindicación precedente, en donde la fracción modula la transducción de la señal de un receptor tipo Toll.
7. La fracción para el uso de la reivindicación 6, en donde el receptor tipo Toll es un receptor tipo Toll 2, un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y un receptor tipo Toll 6, un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y un receptor tipo Toll 1 o un receptor tipo Toll 4.
- 20 8. La fracción para el uso de cualquier reivindicación precedente en combinación con otro medicamento o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo productos alimenticios.
9. El uso de una fracción de *Panax quinquefolius* para la preparación de una composición farmacéutica o un producto alimenticio para prevenir, tratar o mejorar la inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias en un sujeto que tiene una condición **caracterizada por** la inflamación de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias, en donde la fracción se prepara a partir de un extracto soluble en agua de la porción de la raíz de *Panax quinquefolius*, y en donde la fracción es sustancialmente idéntica a una fracción seleccionada de entre el grupo que consiste en CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃, una fracción purificada de CVT-E002, una fracción purificada de PQ₂ y una fracción purificada de PQ₂₂₃, en donde CVT-E002, PQ₂ y PQ₂₂₃ son como se describen en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6.432.454, 7.067.160, 7.186.423 y 7.413.756.
- 25 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la condición es una alergia.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la condición es asma.
12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la fracción se selecciona del grupo que consiste de CVT-E002, PQ₂, PQ₂₂₃, una fracción purificada de CVT-E002, una fracción purificada de PQ₂ y una fracción purificada de PQ₂₂₃.
- 35 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la fracción es CVT-E002.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde la fracción modula la transducción de la señal de un receptor tipo Toll.
- 40 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el receptor tipo Toll es un receptor tipo Toll 2, un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y un receptor tipo Toll 6, un heterodímero del receptor tipo Toll 2 y un receptor tipo Toll 1 o un receptor tipo Toll 4.
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde la composición farmacéutica o el producto alimenticio es para uso en combinación con otro medicamento o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo productos alimenticios.
- 45

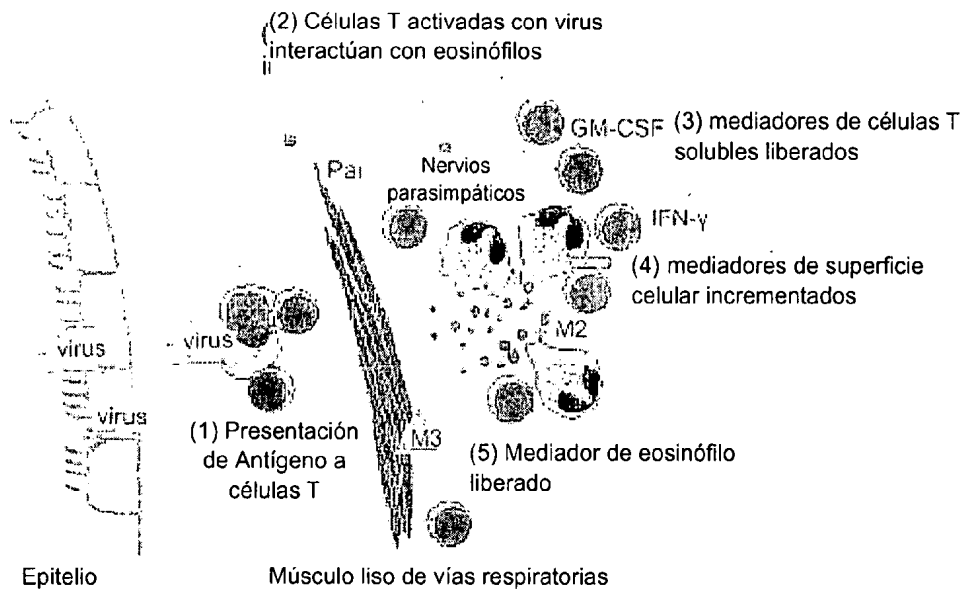


FIGURA 1

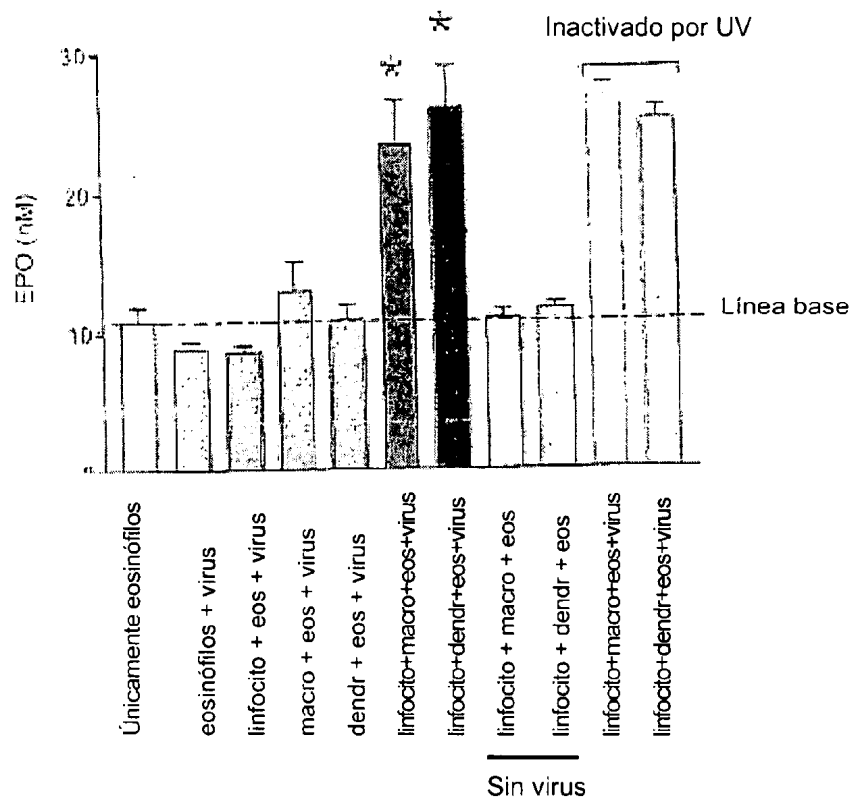


FIGURA 2

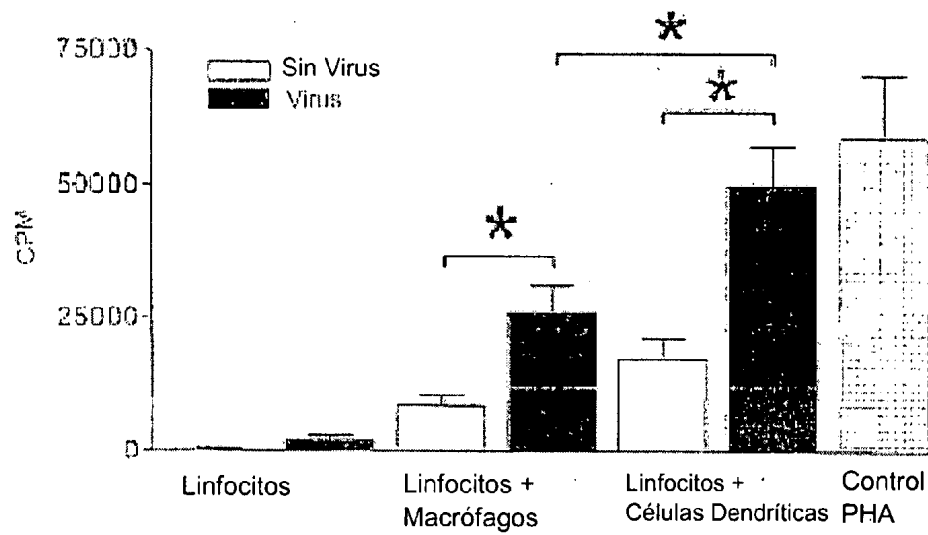


FIGURA 3

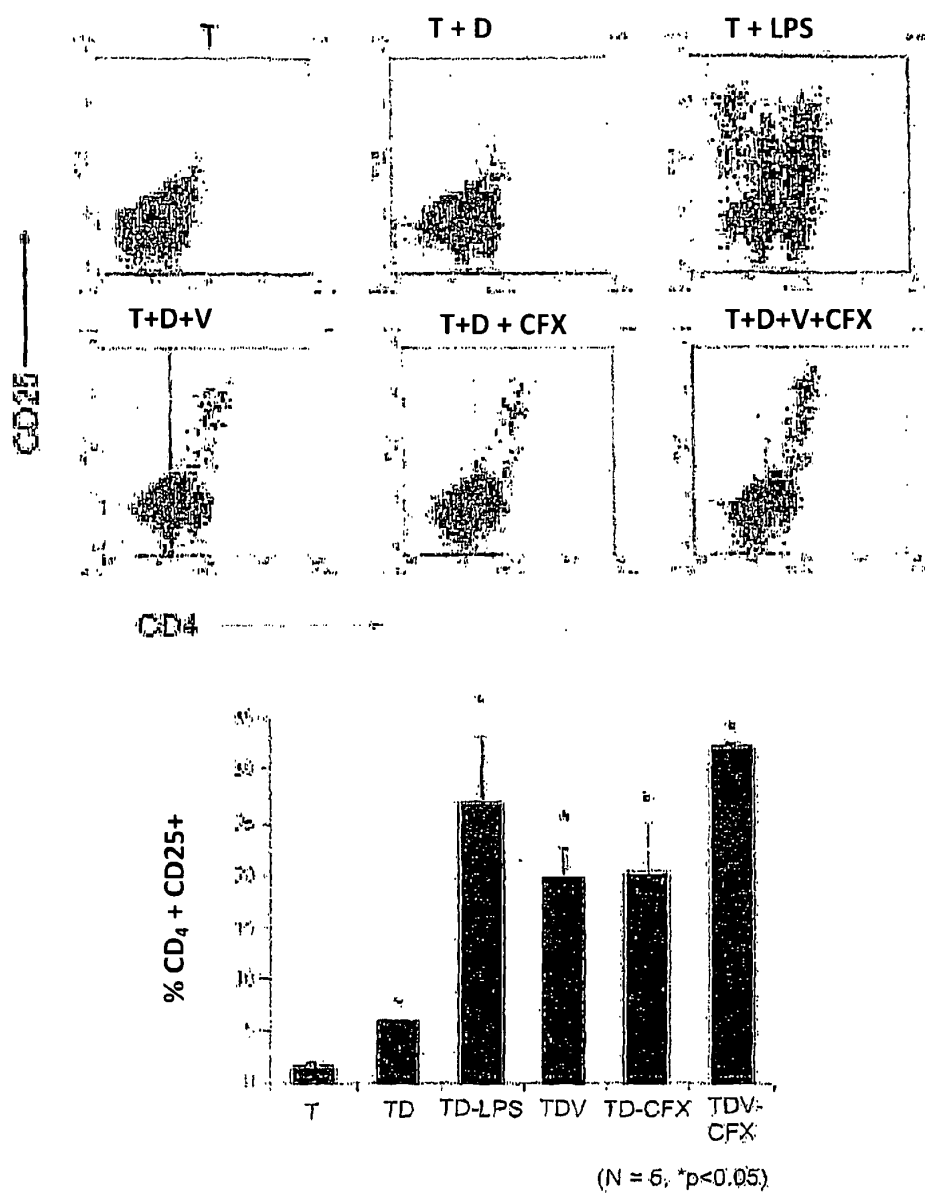


FIG. 4

	IL1b	IL2	IL4	IL10	IL12p70	IL13	IL15	IFNa	IFNg	TNF	RANTES	GMCSF
Solo célula T	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
célula T + LPS	↑	≈	≈	↑	↑	↑	↑	≈	↑	≈	≈	
célula T + PHA	≈	↑		↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	
célula T + FX Frio	≈	≈	≈	↑	↑↑	↑↑	↑	≈	↑↑↑	≈	↑	
célula T+RV	≈	↑	≈	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑	≈	
célula T + RSV	≈	≈	↑	↑	≈	≈	≈	≈	↑↑	↑	≈	
célula T+PIV	↑↑	≈	≈	↑	↑	≈	≈	≈	↑↑↑	≈	≈	
Solo DC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
DC + LPS	↑	≈	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	≈	↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	
DC + FX Frio	↑	≈	↑	↑↑↑	↑	≈	↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑	
célula T + DC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
célula T + DC + LPS	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	
célula T + DC + FX Frio	↑↑	↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	
célula T + DC + RV	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	
célula T+DC+RV+FXFrio	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	
célula T + DC + RSV	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	
célula T + DC + RSV + FX Frio	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	
célula T + DC + PIV	↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑	
célula T + DC + PIV + FX500 Frio	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	
Relativo a Control	↑↑↑	Más de 10X < 5X < 10X					≈	Más de 0.5, Menos de 2X				
	↑↑						↓	Más de 0.25, menos de 0.5				

FIGURA 5

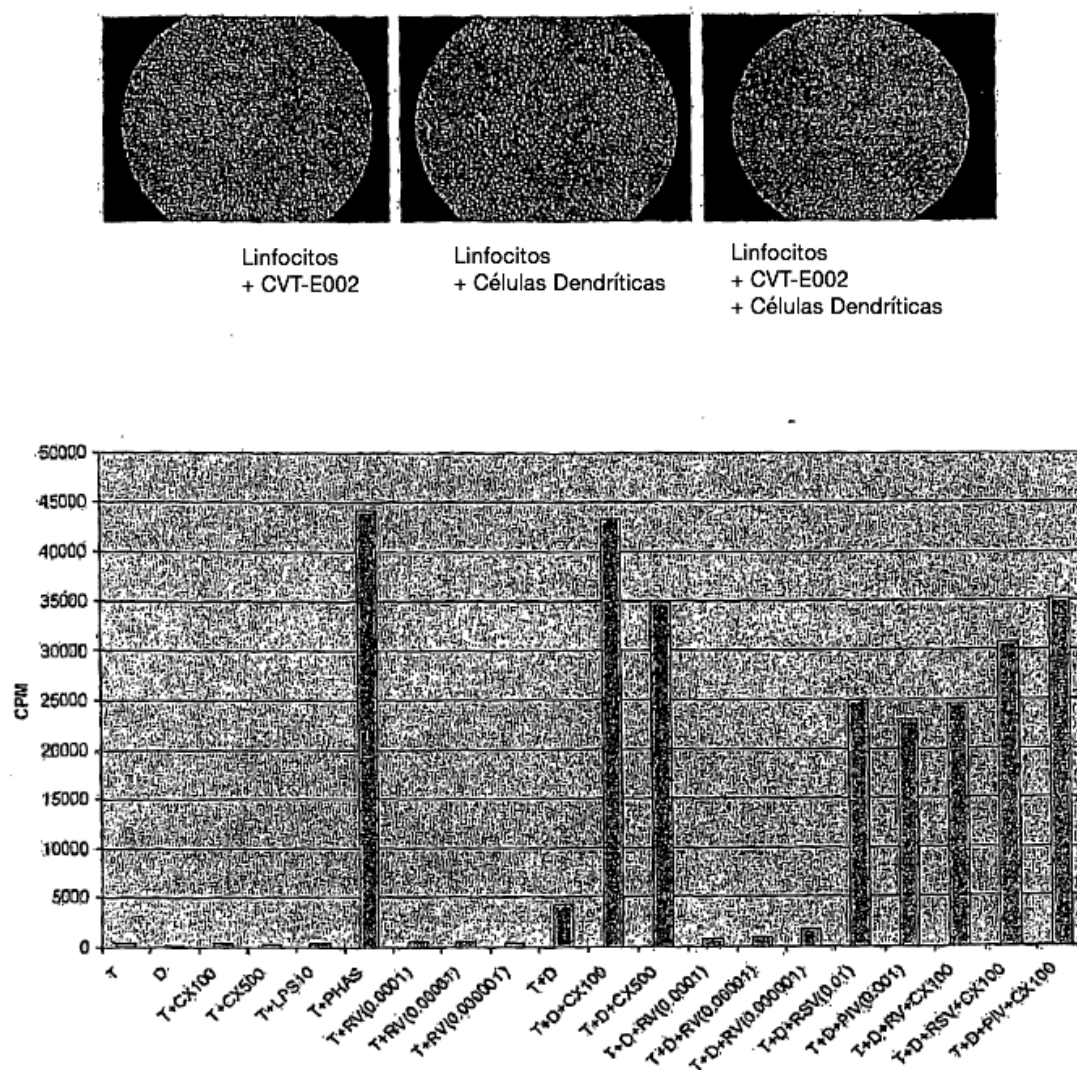


FIG. 6

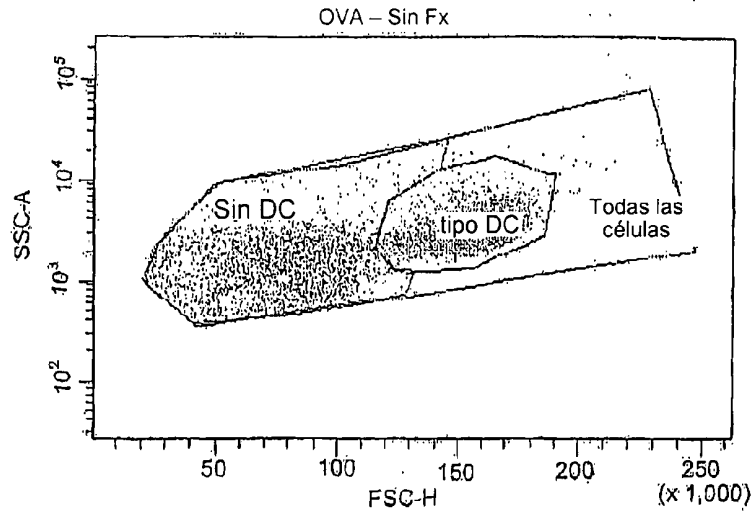


FIG. 7A

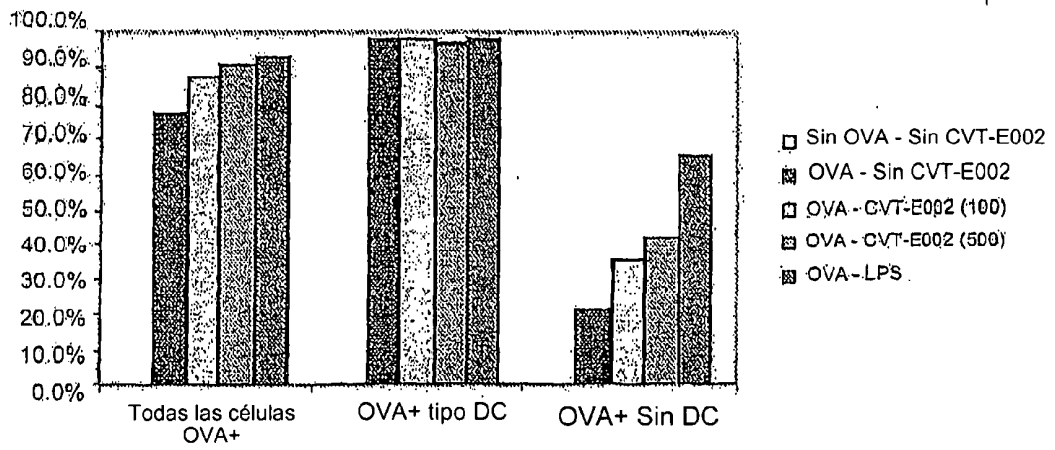


FIG. 7B

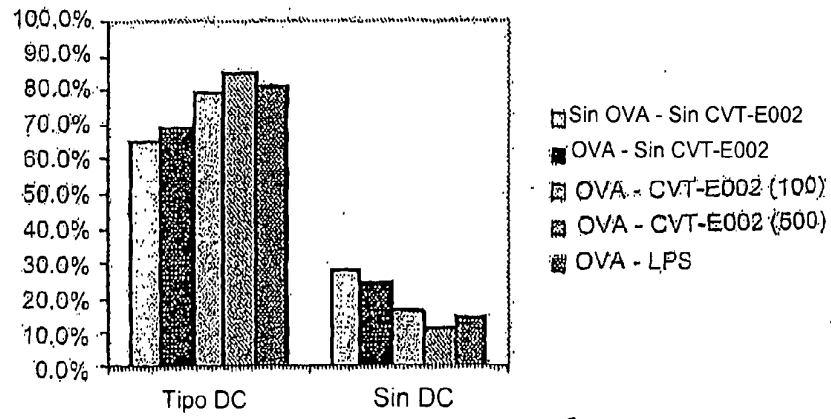


FIG. 7C

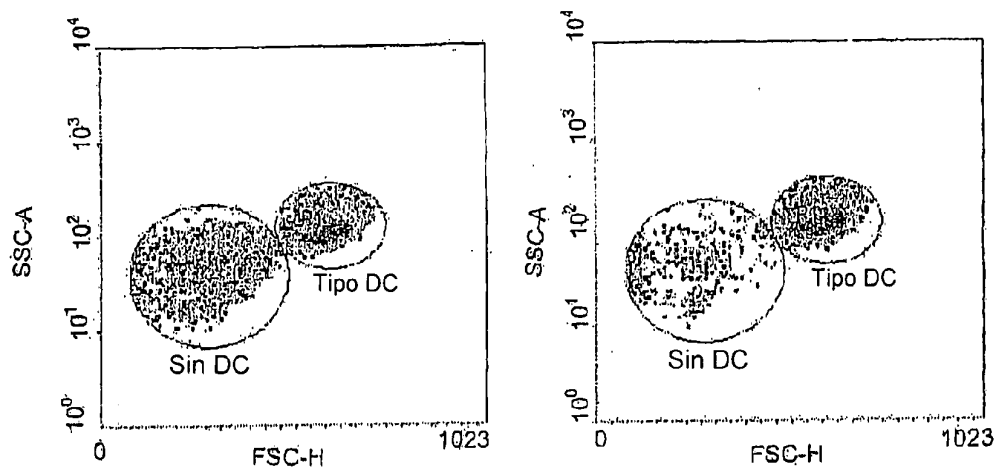


FIG. 7D

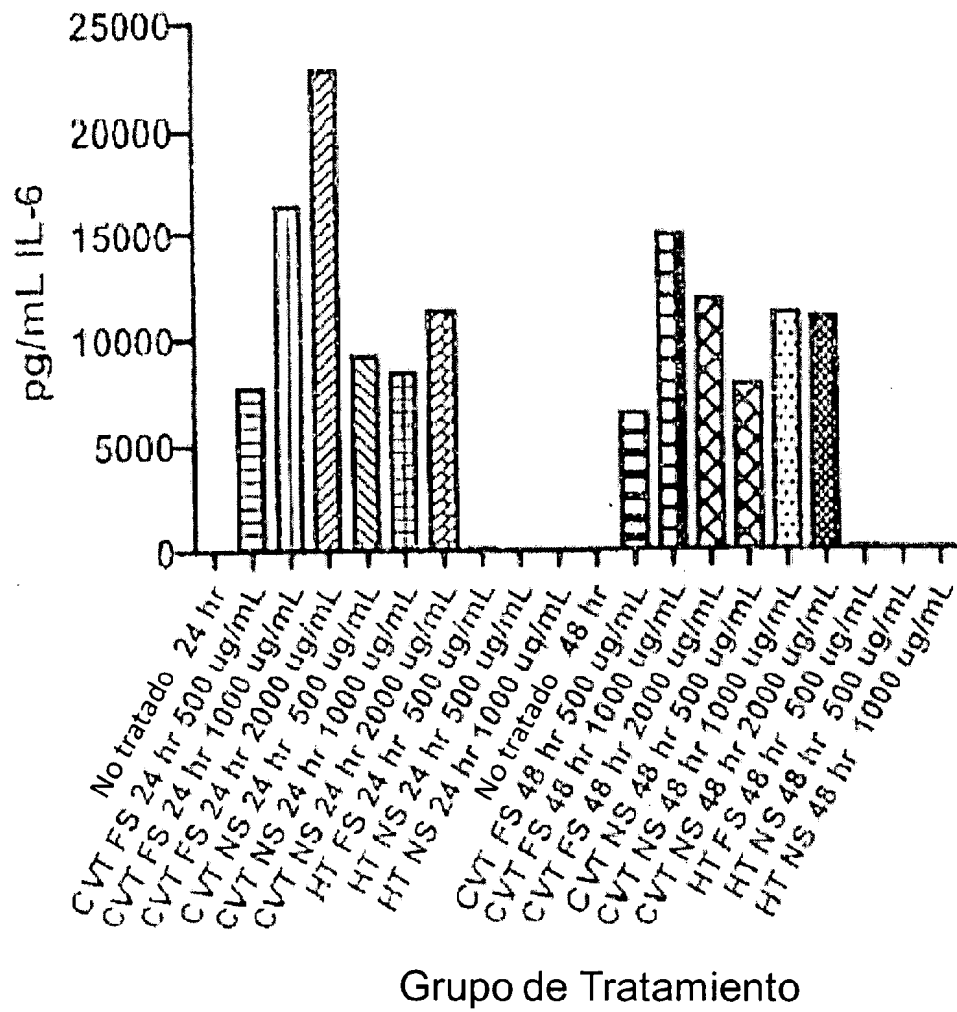


FIGURA 8A

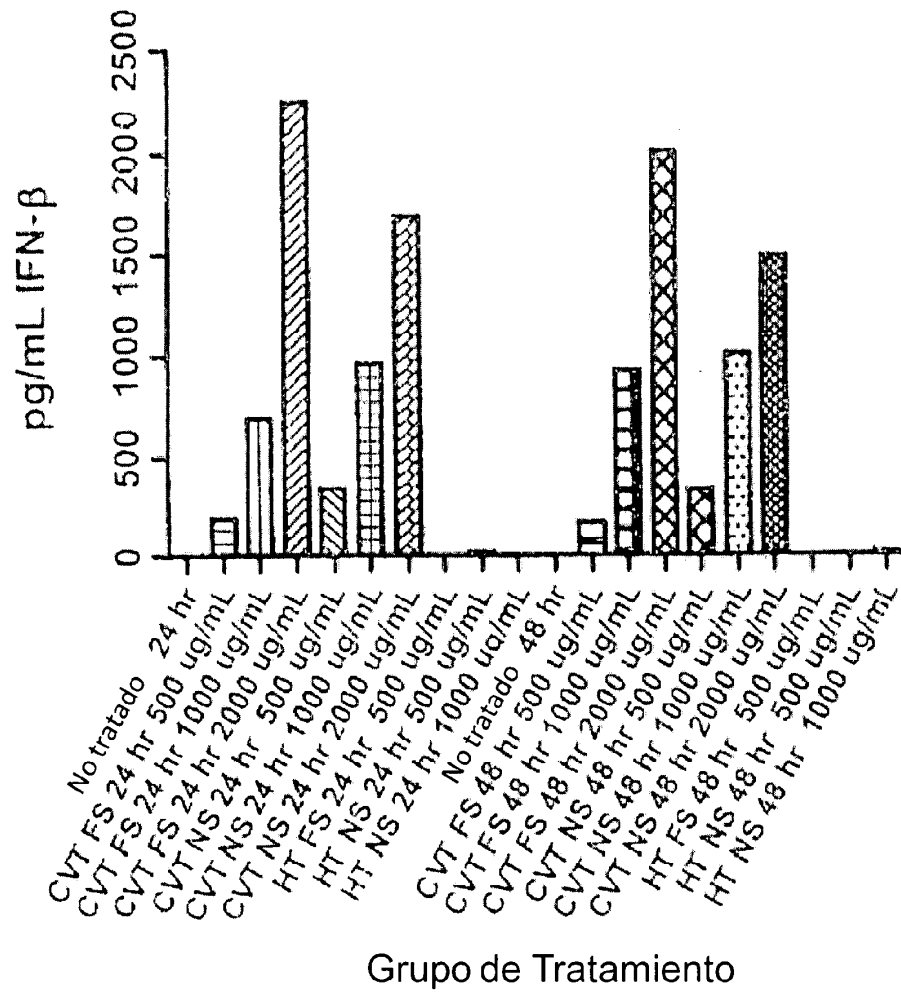


FIGURA 8B

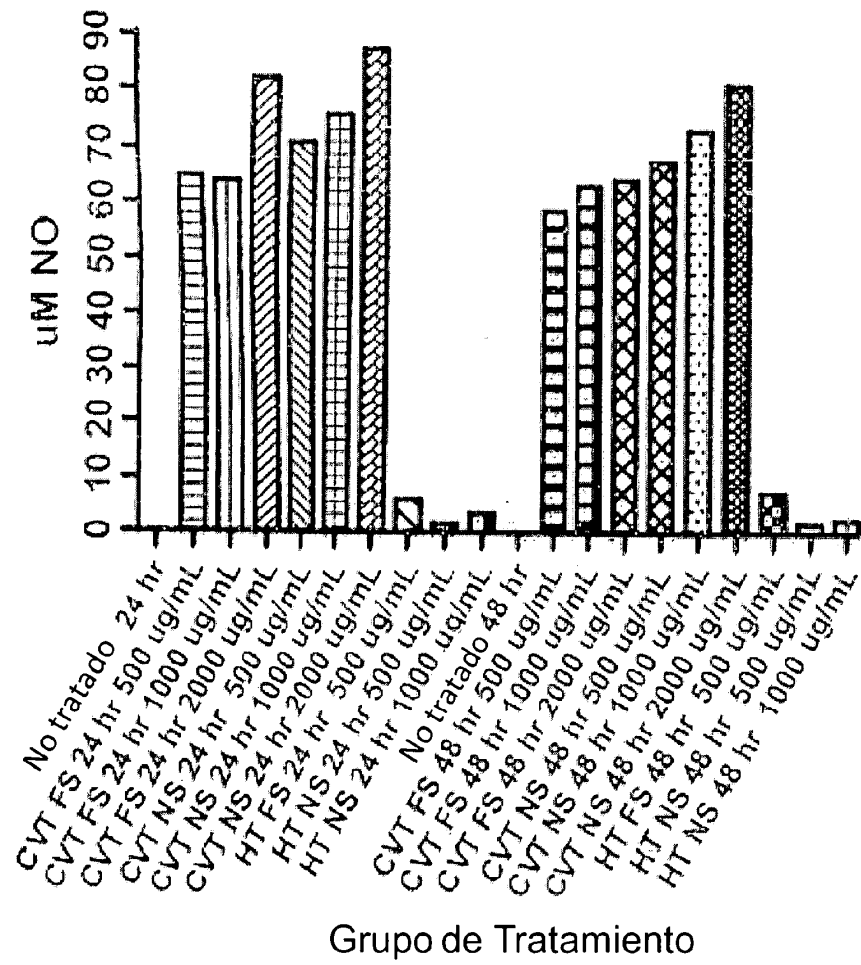


FIGURA 9

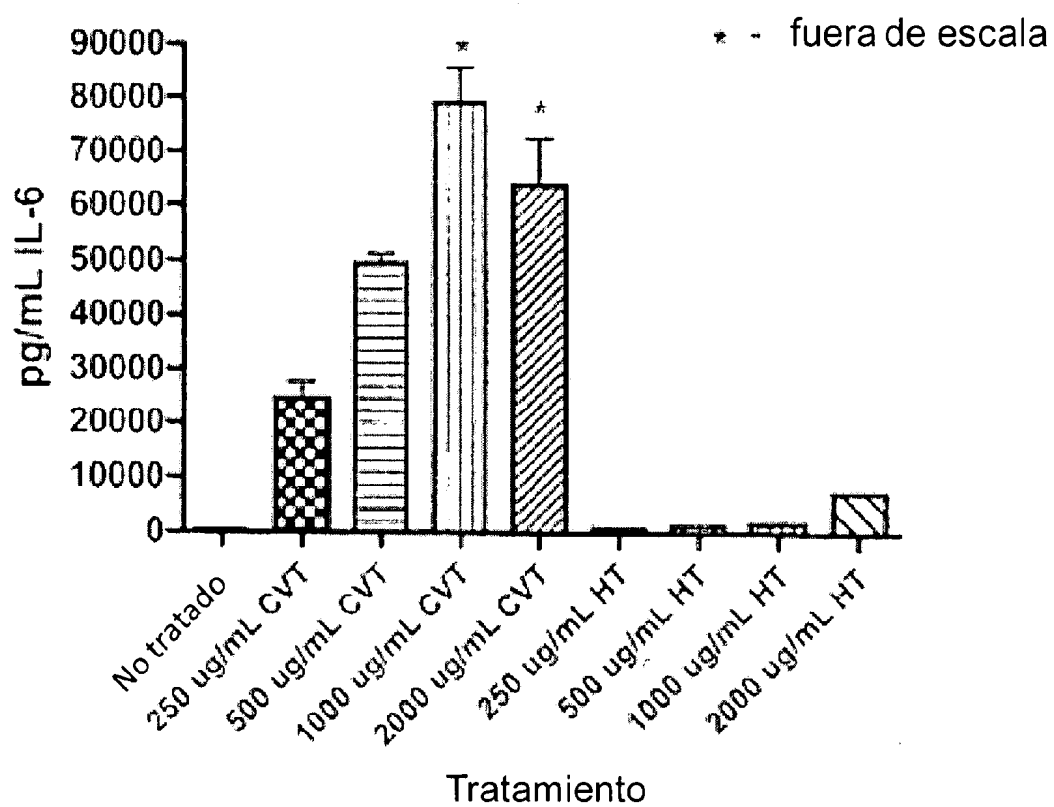


FIGURA 10

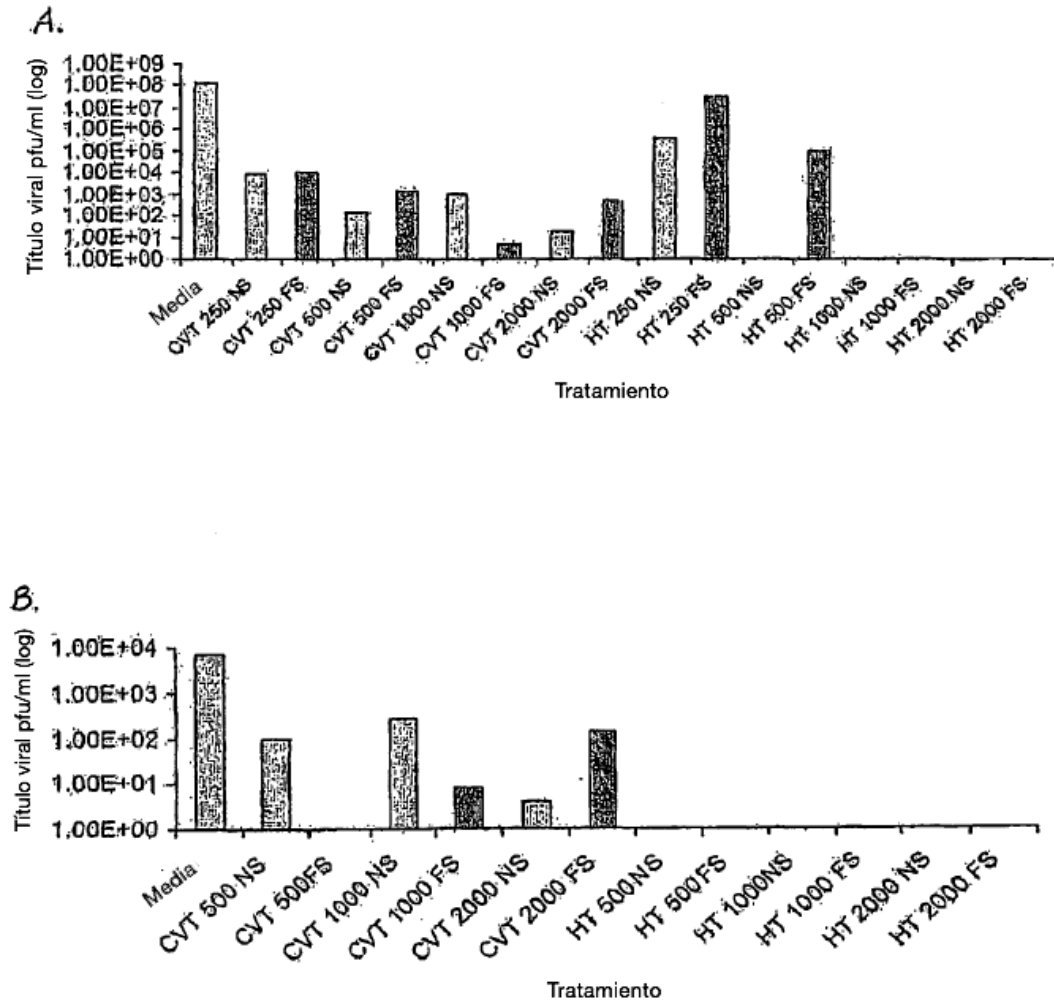


FIGURA 11

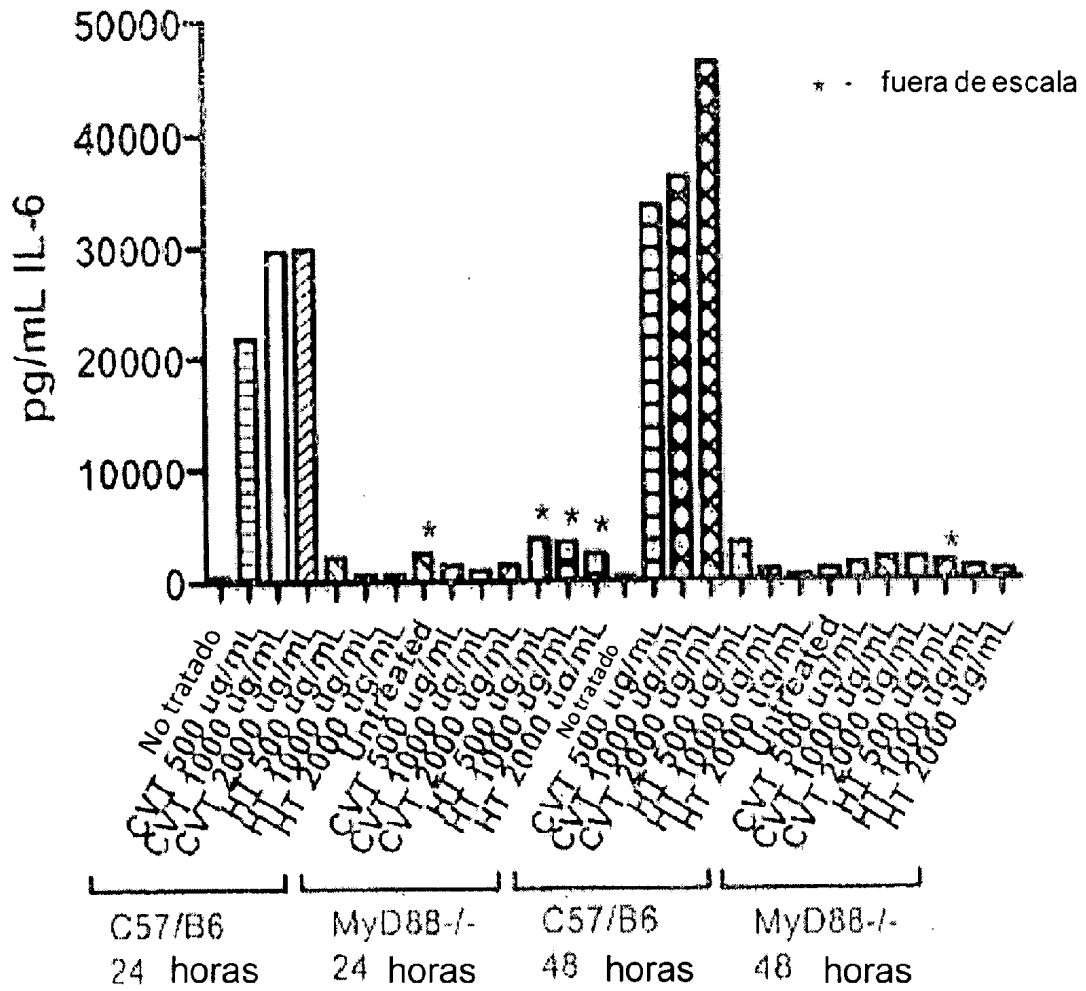


FIGURA 12

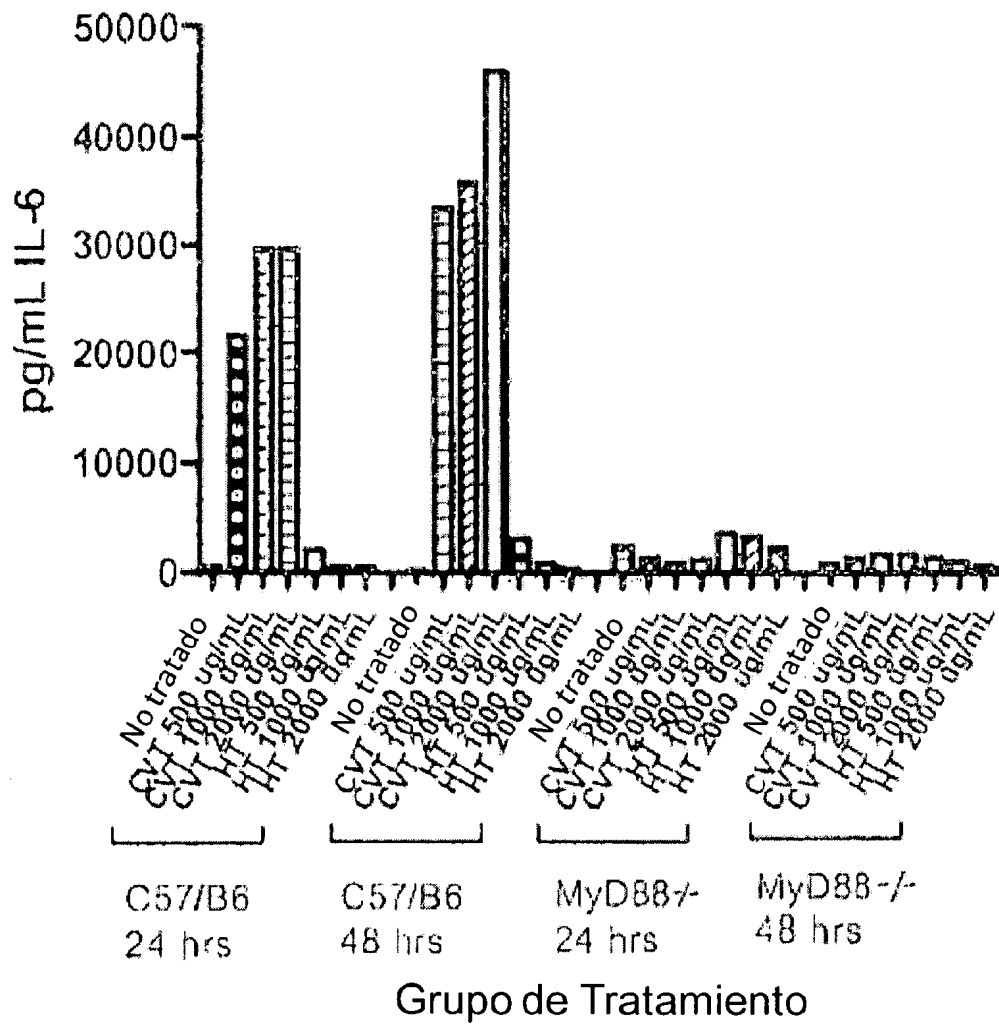


FIGURA 13A

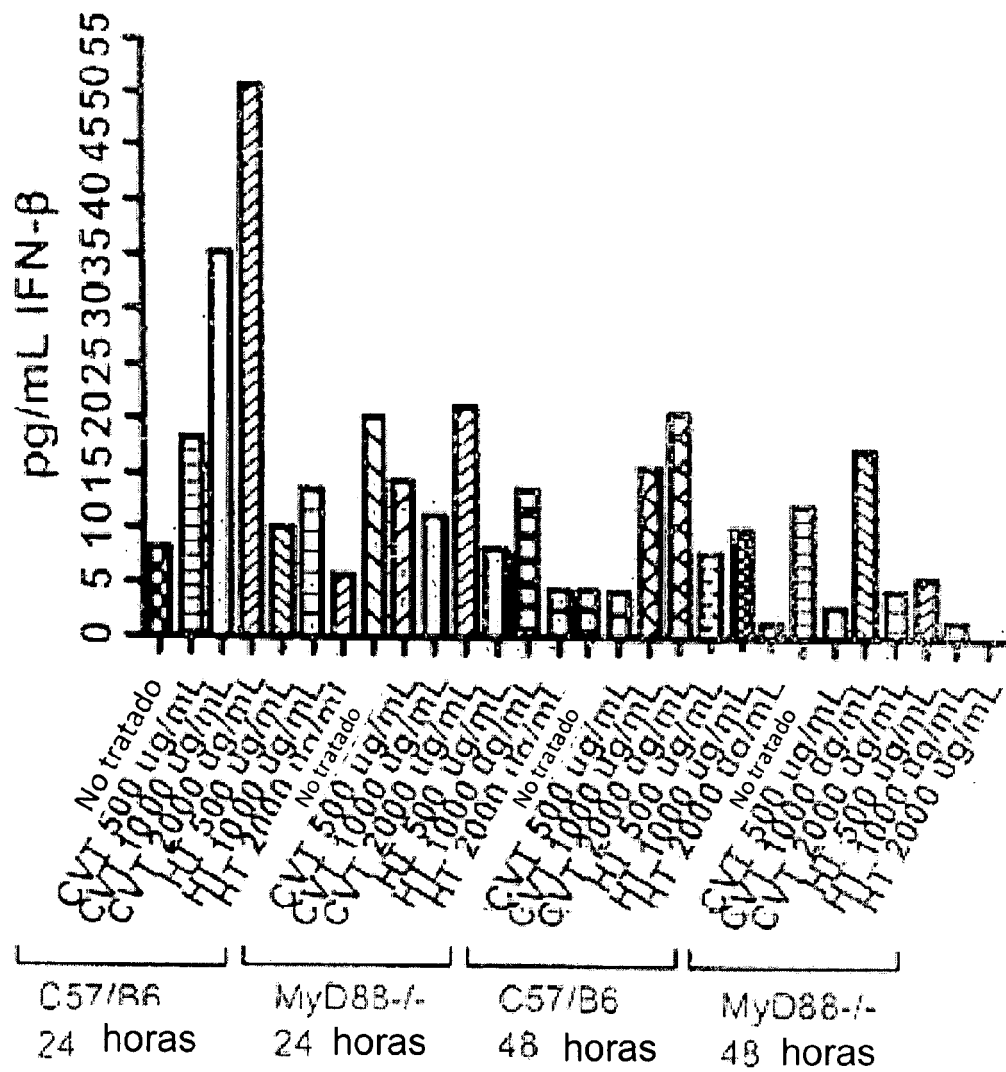


FIGURA 13B

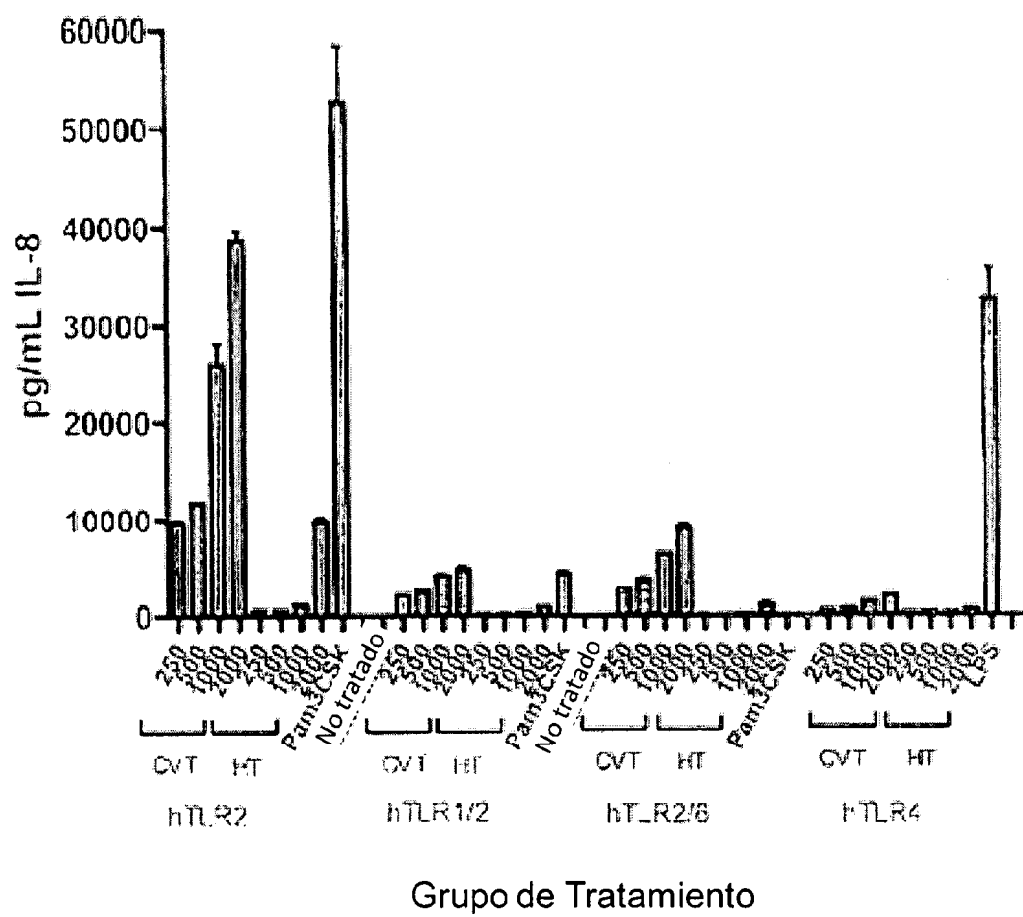


FIGURA 14

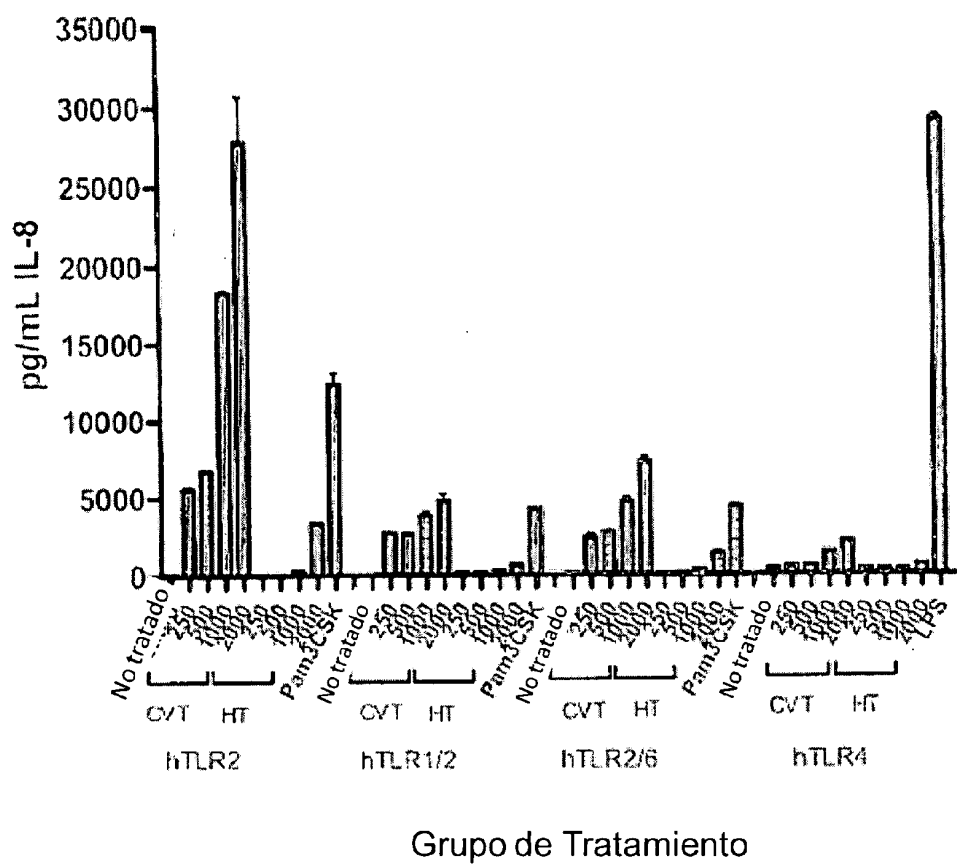


FIGURA 15

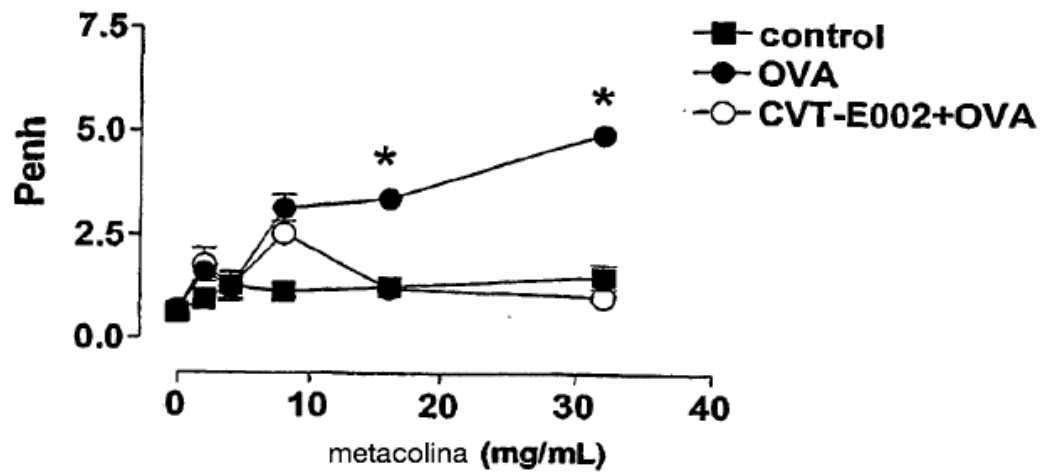


FIG. 16A

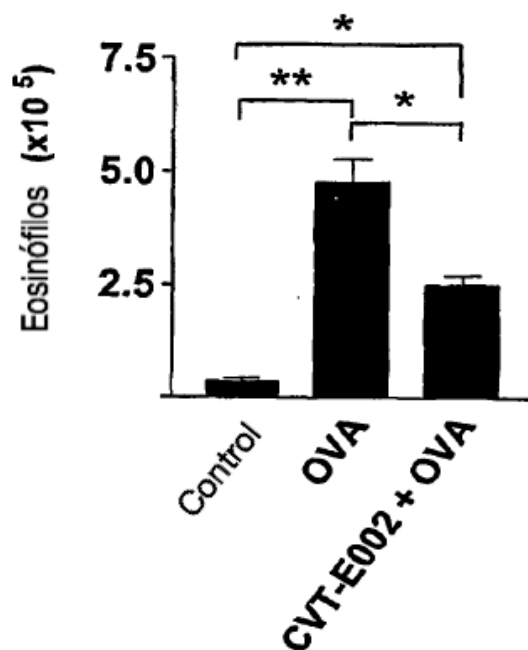


FIG. 16B

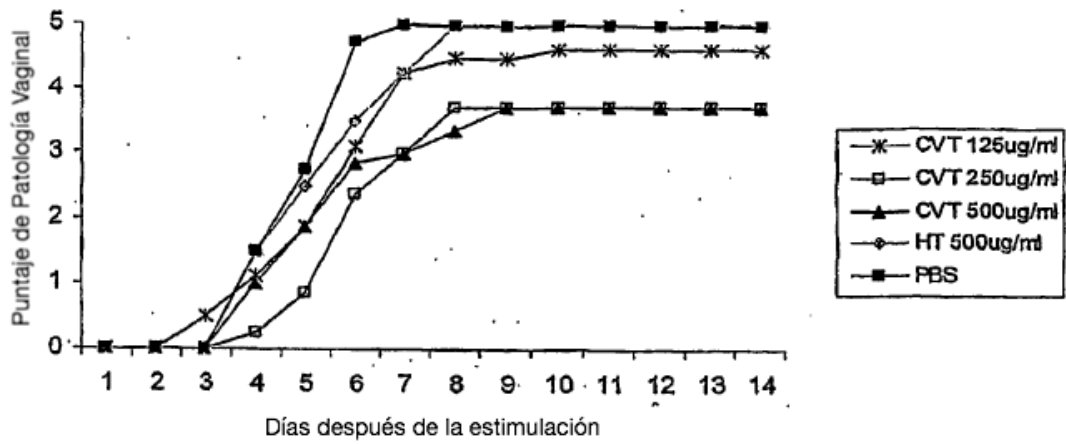


FIG. 17A

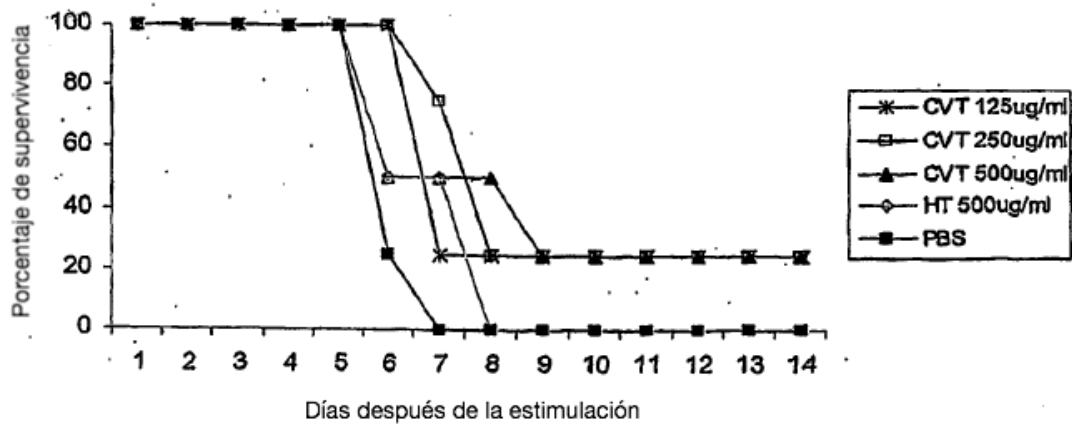


FIG. 17B