(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 2 月 18 日 (18.02.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/027181 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 33/26 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/120582

(22) 国际申请日: 2019 年 11 月 25 日 (25.11.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910737794.2 2019年8月9日 (09.08.2019) CN

(71) 申请人: 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区双清路 30 号, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 程功 (CHENG, Gong); 中国北京市海淀区双清路30号清华大学生物技术馆4301室, Beijing 100084 (CN)。 朱毅斌 (ZHU, Yibin); 中国北京市海淀区双清路30号清华大学生物技术馆4301室, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) **Title:** USE OF IRON-CONTAINING MATERIAL IN PREPARATION OF PRODUCT FOR INHIBITING TRANSMISSION OF DENGUE VIRUS

(54) **发明名称**: 含铁物质在制备抑制登革病毒传播的产品中的应用

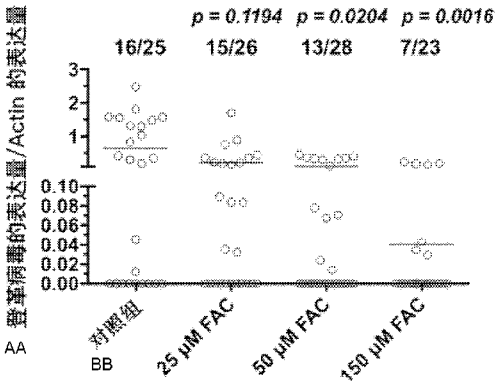

图 1

AA Expression quantity of dengue virus/expression quantity of Actin
BB Control group

(57) **Abstract:** Disclosed is the use of an iron-containing material in the preparation of a product for inhibiting the transmission of dengue virus and/or inhibiting the susceptibility of mosquitoes to dengue virus. Hosts with different iron statuses that have been bitten by Aedes aegypti and infected with the dengue virus have different viral infection rates, and the susceptibility of Aedes aegypti to the dengue virus is negatively correlated with an iron status of the blood of a host. The iron supplementation for an iron-deficient mouse model can reduce the susceptibility of same to dengue virus triggered by Aedes aegypti, indicating that an iron-containing material can reduce the ability of Aedes aegypti to carry a virus and can block the spread of the virus.

(57) **摘要**: 含铁物质在制备抑制登革病毒传播和/或抑制蚊虫对登革病毒的易感性的产品中的应用。埃及伊蚊叮咬不同铁状态的被登革病毒感染的宿主出现不同的病毒感染率，埃及伊蚊对登革病毒的易感性与宿主血液的铁状态呈负相关性。对缺铁小鼠模型进行补铁可降低埃及伊蚊引发登革病毒的易感性，表明含铁物质可降低埃及伊蚊携带病毒的能力和阻断病毒的传播。

WO 2021/027181 A1

[见续页]

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

含铁物质在制备抑制登革病毒传播的产品中的应用

技术领域

本发明涉及含铁物质在制备抑制登革病毒传播的产品中的应用。

背景技术

埃及伊蚊是一类以吸血获取和传播病毒的昆虫，是引发“登革热”的祸首。“登革热”是热带和亚热带地区流行的以蚊虫为媒介的急性传染病，具有传播快、发病率高等特点，由蚊虫所传播的病毒会表现出脑炎、脑膜炎、出血热等临床症状，每年导致上亿人次的感染以及数十万的死亡病例，对世界公共卫生造成严重的危害。

补铁是一种对缺铁、低铁人群普遍适用的医学方法，但目前为止还没有关于补铁能有效降低埃及伊蚊对登革病毒的易感性的相关报道。

发明公开

本发明所要解决的技术问题为如何抑制登革病毒的传播。

为解决上述技术问题，本发明首先公开了含铁物质在制备抑制登革病毒传播的产品中的应用。

本发明进一步公开了含铁物质在制备抑制蚊虫对登革病毒的易感性的产品中的应用。

本发明还提供了一种抑制登革病毒传播的方法。

本发明抑制登革病毒传播的方法，包括给被登革病毒感染的宿主施用上述含铁物质，从而抑制登革病毒的传播。

本发明进一步还提供了一种抑制蚊虫对登革病毒的易感性的方法，包括给被登革病毒感染的宿主施用上述含铁物质，从而抑制蚊虫对登革病毒的易感性。

上文中，所述含铁物质的活性成分为含铁化合物；所述含铁物质可以为纯净物或混合物；具体的，所述含铁物质可以为补铁剂。

上文中，所述含铁物质的活性成分可为柠檬酸铁铵。

上文中，所述产品可为食品、药品或保健品等等。

所述产品除含有含铁化合物外，还可含有适宜的载体或赋形剂。这里的载体材料包括但不限于水溶性载体材料（如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、有机酸等）、难溶性载体材料（如乙基纤维素、胆固醇硬脂酸酯等）、肠溶性载体材料（如醋酸纤维素酞酸酯和羧甲乙纤维素等）。其中优选的是水溶性载体材料。使用这些材料可以制成多种剂型，包括但不限于片剂、胶囊、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、脂质体、透皮剂、口含片、栓剂、冻干粉针剂等。可以是普通制剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。为了将单位给药剂型制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关

于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶土、微晶纤维素、硅酸铝等；湿润剂与粘合剂，如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇、淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、紫胶、甲基纤维素、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等；崩解剂，例如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯、山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等；崩解抑制剂，例如蔗糖、三硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化油等；吸收促进剂，例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等；润滑剂，例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液体石蜡、聚乙二醇等。还可以将片剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。为了将单位给药剂型制成丸剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、Gelucire、高岭土、滑石粉等；粘合剂如阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等；崩解剂，如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。为了将单位给药剂型制成栓剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如聚乙二醇、卵磷脂、可可脂、高级醇、高级醇的酯、明胶、半合成甘油酯等。为了将单位给药剂型制成注射用制剂，如溶液剂、乳剂、冻干粉针剂和混悬剂，可以使用本领域常用的所有稀释剂，例如，水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH 调节剂等。此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。使用上述剂型可以经注射给药，包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射和腔内注射等；腔道给药，如经直肠和阴道；呼吸道给药，如经鼻腔；粘膜给药。

上文中，所述蚊虫为埃及伊蚊或其他具有传播病毒能力的蚊虫。

上文中，所述登革病毒为登革 2 型病毒（dengue virus type-2, DENV-2）。

上文中，所述被登革病毒感染的宿主可为缺铁或低铁动物，可为哺乳动物，如人和鼠。

附图说明

图1为柠檬酸铁铵对登革病毒在埃及伊蚊体内的感染率的影响；每个空心圆点代表一只埃及伊蚊。

图2为缺铁小鼠对登革病毒在埃及伊蚊体内的感染率的影响；每个空心圆点代表一只埃及伊蚊。

图3为缺铁小鼠与正常小鼠的血清铁测定，每个空心圆代表一只小鼠。

图4为缺铁小鼠补铁对埃及伊蚊肠组织的登革病毒感染率的影响；每个空心

圆点代表一只埃及伊蚊。

图5为缺铁小鼠补铁对埃及伊蚊唾液腺的登革病毒感染率的影响；每个空心圆点代表一只埃及伊蚊。

实施发明的最佳方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

下述实施例中埃及伊蚊（Aedes aegypti）在文献“Colpitts TM et al. Alterations in the Aedes aegypti Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses. 2011, PloSPathog 7(9): e1002189.”中公开过，公众可从清华大学医学院获得。

下述实施例中登革2型病毒（dengue virus type-2, DENV-2）的New Guinea C株在文献“Liu et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. 2016, Nat Microbiol 1(9): 16087.”中公开过，公众可从清华大学医学院获得。

下述实施例中柠檬酸铁铵购买于Sigma公司，产品目录号为F5879。

下述实施例中正常饲料购买于南通特洛菲饲料科技有限公司，货号：TP0306C。

下述实施例中缺铁饲料购买于南通特洛菲饲料科技有限公司，货号：TP0306。

实施例1、体外膜饲喂系统饲喂柠檬酸铁铵抑制登革病毒在埃及伊蚊体内的易感性

体外膜饲喂系统饲喂柠檬酸铁铵可以降低埃及伊蚊对登革病毒的感染率，具体试验如下：

1、将埃及伊蚊分成4组，即对照组、25μM FAC组、50μM FAC组和150μM FAC组，分别进行如下处理：

对照组：每只埃及伊蚊通过体外膜饲喂系统饲喂人抗凝全血样本和登革 2 型病毒（DENV-2）上清（1:1 体积比）的混合液；

25μM FAC组：每只埃及伊蚊通过体外膜饲喂系统饲喂含有柠檬酸铁铵（FAC）的人抗凝全血样本和登革2型病毒（DENV-2）上清（1:1体积比）的混合液，所述柠檬酸铁铵在所述混合液中的浓度为25μM。

50μM FAC组：每只埃及伊蚊通过体外膜饲喂系统饲喂含有柠檬酸铁铵（FAC）的人抗凝全血样本和登革2型病毒（DENV-2）上清（1:1体积比）的混合液，所述柠檬酸铁铵在所述混合液中的浓度为50μM。

150μM FAC组：每只埃及伊蚊通过体外膜饲喂系统饲喂含有柠檬酸铁铵(FAC)的人抗凝全血样本和登革2型病毒（DENV-2）上清（1:1体积比）的混合液，所

述柠檬酸铁铵在所述混合液中的浓度为150μM。

2、饲喂八天后，提取埃及伊蚊的总RNA，反转录为cDNA，利用SYBR RT-PCR试剂盒以埃及伊蚊的Actin作为基因内参检测埃及伊蚊体内的登革2型病毒基因的相对表达量。根据不同组别中埃及伊蚊体内的登革2型病毒基因的相对表达量判断埃及伊蚊是否感染登革病毒。以登革病毒表达量/Actin的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001作为是否感染的临界值，即登革病毒表达量/Actin的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001表示埃及伊蚊成功感染登革病毒。

其中，用于检测登革2型病毒的引物如下：

上游引物：5'- CATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCA-3'（序列1）；

下游引物：5'- CAGATCTCTGATGAATAACCAACG-3' （序列 2）。

所用 Actin 基因的引物如下：

上游引物：5'- GAACACCCAGTCCTGCTGACA -3' （序列 3）；

下游引物：5'- TGCGTCATCTTCTCACGGTTAG-3' （序列 4）。

对照组（图中以“对照组”表示）、25μM FAC 组（图中以“25μM FAC”表示）、50μM FAC 组（图中以“50μM FAC”表示）和 150μM FAC 组（图中以“150μM FAC”表示）的埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒的感染情况如图 1 所示。结果显示：随着蚊虫饲喂柠檬酸铁铵的浓度逐渐上升，埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒感染率出现显著下降，表明埃及伊蚊饲喂柠檬酸铁铵可以降低登革 2 型病毒在埃及伊蚊体内的病毒感染效率。

实施例 2、缺铁小鼠模型显著提高登革病毒在埃及伊蚊体内的易感性

在埃及伊蚊吸血过程中宿主体内的病毒颗粒和大量血液进入埃及伊蚊体内，因此，本发明采用如下方法进行缺铁小鼠模型对登革病毒在埃及伊蚊体内的感染率试验：

一、制备正常对照小鼠和缺铁 AG6 小鼠

将四周龄 AG6 小鼠，体重是 15 g，随机分成 2 组，即正常组和缺铁小鼠组，每组 4 只，分别进行如下处理：

正常组：四周龄 AG6 小鼠饲喂正常饲料五周；

缺铁小鼠组：四周龄 AG6 小鼠饲喂将缺铁饲料五周。

二、两组小鼠饲喂五周之后，第 0 天通过小鼠足垫注射感染登革 2 型病毒，从第一天到第五天每天由干净的埃及伊蚊（无感染登革 2 型病毒的干净埃及伊蚊）对小鼠进行叮咬吸血，收集吸血完毕的埃及伊蚊进行培养，正常组和缺铁小鼠均得到五组埃及伊蚊，即 1d.p.i.组、2d.p.i.组、3d.p.i.组、4d.p.i.组和 5d.p.i.组。

三、埃及伊蚊叮咬小鼠八天后，提取埃及伊蚊的总 RNA，反转录为 cDNA，利用 SYBR RT-PCR 试剂盒以埃及伊蚊的 Actin 作为基因内参检测埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒基因的相对表达量。根据不同组别中埃及伊蚊体内的登革 2 型

病毒基因的相对表达量判断埃及伊蚊是否感染登革病毒。以登革病毒表达量/Actin 的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001 作为是否感染的临界值，即登革病毒表达量/Actin 的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001 表示埃及伊蚊成功感染登革病毒。

其中，用于检测登革 2 型病毒的引物如下：

上游引物：5’- CATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCA-3’；

下游引物：5’- CAGATCTCTGATGAATAACCAACG-3’。

所用 Actin 基因的引物如下：

上游引物：5’- GAACACCCAGTCCTGCTGACA -3’；

下游引物：5’- TGCGTCATCTTCTCACGGTTAG-3’。

正常组和缺铁小鼠组对应的五组埃及伊蚊的登革病毒感染率如表 1 和图 2 所示，结果显示：缺铁小鼠组中五组埃及伊蚊（图中分别以“1d.p.i.”“2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”“5d.p.i.”表示)的登革病毒感染率均高于正常组中对应的五组埃及伊蚊（图中分别以“1d.p.i.”“2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”“5d.p.i.”表示）的登革病毒感染率，其中，三组埃及伊蚊（图中分别以 “2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”表示）达到了显著性的水平，表明宿主的铁含量对埃及伊蚊对登革病毒的易感性造成显著影响，低铁或缺铁宿主可提高埃及伊蚊对登革病毒的易感性。

表 1 缺铁小鼠模型对登革病毒在埃及伊蚊的感染率情况

	1d.p.i. 组		2d.p.i. 组		3d.p.i. 组		4d.p.i. 组		5d.p.i. 组	
	正常组	缺铁小鼠组	正常组	缺铁小鼠组	正常组	缺铁小鼠组	正常组	缺铁小鼠组	正常组	缺铁小鼠组
N	38	42	43	43	42	47	41	47	38	46
n	3	6	10	20	28	41	17	32	6	14
W%	7.9	14.3	23.3	46.5	66.7	87.2	41.5	68.1	15.8	30.4

注：N 表示埃及伊蚊总数，n 表示被登革病毒感染的埃及伊蚊数，W 表示感染率

实施例 3、对感染宿主进行补铁可显著抑制登革病毒在埃及伊蚊体内的易感性

在埃及伊蚊吸血过程中宿主体内的病毒颗粒和大量血液进入埃及伊蚊体内，因此，本发明采用如下方法进行对感染宿主补铁后对登革病毒在埃及伊蚊体内的感染率试验：

一、制备缺铁 AG6 小鼠

将四周龄 AG6 小鼠饲喂缺铁饲料五周，得到九周龄缺铁 AG6 小鼠，对饲喂第三周、第四周和第五周的小鼠的血清铁进行测定，结果如图 3 所示，与正常组小鼠相比，饲喂缺铁饲料五周后小鼠血清铁浓度明显降低，说明构建了缺铁小鼠。

二、对步骤一的九周龄缺铁 AG6 小鼠每只足垫注射感染登革 2 型病毒，随后将感染登革病毒的九周龄缺铁 AG6 小鼠，体重是 25 g，随机分成 2 组，即对照组和补铁组，每组 4 只，分别进行如下注射处理：

对照组：每只九周龄 AG6 小鼠通过尾静脉注射质量百分含量为 0.01%生理盐水，每只小鼠 50μL。

补铁组：每只九周龄 AG6 小鼠通过尾静脉注射含量为 60μg/mL 柠檬酸铁铵溶液，每只小鼠 50μL。

将经过上述注射处理的对照组和补铁组小鼠，从第一天到第五天每天由干净的埃及伊蚊（无感染登革 2 型病毒的干净埃及伊蚊）对小鼠进行叮咬吸血（第一天尾静脉注射 15 分钟之后，埃及伊蚊对小鼠进行叮咬），收集吸血完毕的埃及伊蚊进行培养，对照组和补铁组分别得到五组埃及伊蚊，即 1d.p.i.组、2d.p.i.组、3d.p.i.组、4d.p.i.组和 5d.p.i.组，每组分为两小组（第一小组和第二小组）。

三、第一小组埃及伊蚊叮咬小鼠八天后，分离埃及伊蚊的中肠组织，提取肠的总 RNA，反转录为 cDNA，利用 SYBR RT-PCR 试剂盒以埃及伊蚊的 Actin 作为基因内参检测埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒 E 基因的相对表达量。根据不同组别中埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒 E 基因的相对表达量判断埃及伊蚊是否感染登革病毒。以登革病毒表达量/Actin 的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001 作为是否感染的临界值，即登革病毒表达量/Actin 的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001 表示埃及伊蚊成功感染登革病毒。

其中，用于检测登革 2 型病毒的引物如下：

上游引物：5’- CATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCA-3’；

下游引物：5’- CAGATCTCTGATGAATAACCAACG-3’。

所用 Actin 基因的引物如下：

上游引物：5’- GAACACCCAGTCCTGCTGACA -3’；

下游引物：5’- TGCGTCATCTTCTCACGGTTAG-3’。

对照组和补铁组对应的五组埃及伊蚊的登革病毒感染率如表 2 和图 4 所示，结果显示：补铁组中五组埃及伊蚊（图中分别以“1d.p.i.”“2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”“5d.p.i.”表示）中肠的登革病毒感染率均低于对照组对应的五组埃及伊蚊（图中分别以“1d.p.i.”“2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”“5d.p.i.”表示）的登革病毒感染率，其中，三组埃及伊蚊（图中分别以 “2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”表示）达到了显著性的水平，表明对感染宿主进行补铁可显著抑制埃及伊蚊对登革病毒的易感性，从而达到防控登革病毒传播的目的。

表 2 感染宿主补铁后对登革病毒在埃及伊蚊肠组织的感染率情况

	1d.p.i. 组		2d.p.i. 组		3d.p.i. 组		4d.p.i. 组		5d.p.i. 组	
	对 照	补 铁	对 照	补 铁	对 照	补 铁	对 照	补 铁	对 照	补 铁

	组	组	组	组	组	组	组	组	组	组
N	45	42	44	44	47	46	48	48	43	44
n	5	1	20	10	42	33	35	24	16	9
W%	11.1	2.4	45.5	22.7	89.4	71.7	72.9	50.0	37.2	20.5

注：N 表示埃及伊蚊总数，n 表示被登革病毒感染的埃及伊蚊数，W 表示感染率

四、第二小组埃及伊蚊叮咬小鼠十四天后，分离埃及伊蚊的唾液腺，提取唾液腺的总 RNA，反转录为 cDNA，利用 SYBR RT-PCR 试剂盒以埃及伊蚊的 Actin 作为基因内参检测埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒基因的相对表达量。根据不同组别中埃及伊蚊体内的登革 2 型病毒基因的相对表达量判断埃及伊蚊是否感染登革病毒。以登革病毒表达量/Actin 的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001 作为是否感染的临界值，即登革病毒表达量/Actin 的表达量的比值（即相对表达量）≧0.001 表示埃及伊蚊成功感染登革病毒。

其中，用于检测登革 2 型病毒的引物如下：

上游引物：5’- CATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCA-3’；

下游引物：5’- CAGATCTCTGATGAATAACCAACG-3’。

所用 Actin 基因的引物如下：

上游引物：5’- GAACACCCAGTCCTGCTGACA -3’；

下游引物：5’- TGCGTCATCTTCTCACGGTTAG-3’。

对照组和补铁组对应的五组埃及伊蚊的唾液登革病毒感染率如表 3 和图 5 所示，每个空心圆点代表一只埃及伊蚊唾液腺。结果显示补铁组中五组埃及伊蚊（图中分别以“1d.p.i.”“2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”“5d.p.i.”表示）唾液腺的登革病毒感染率均显著低于对照组对应的五组埃及伊蚊（图中分别以“1d.p.i.”“2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”“5d.p.i.”表示）的登革病毒感染率，其中，三组埃及伊蚊（图中分别以 “2d.p.i.”“3d.p.i.”“4d.p.i.”表示）达到了显著性的水平，表明对感染宿主进行补铁可显著抑制埃及伊蚊对登革病毒的传播能力。

表 3 感染宿主补铁后对登革病毒在埃及伊蚊唾液腺的感染率情况

	1d.p.i. 组		2d.p.i. 组		3d.p.i. 组		4d.p.i. 组		5d.p.i. 组	
	对照组	补铁组	对照组	补铁组	对照组	补铁组	对照组	补铁组	对照组	补铁组
N	46	43	45	46	47	48	48	48	41	45
n	1	0	7	1	28	17	12	4	5	1
W%	2.2	0	15.6	2.2	59.6	35.4	25.0	8.3	12.2	2.2

注：N 表示埃及伊蚊总数，n 表示被登革病毒感染的埃及伊蚊数，W 表示感染率

以上结果表明，对被登革病毒感染的宿主进行补铁能有效抑制蚊虫对登革

病毒传播能力和蚊虫对登革病毒的易感性。

工业应用

本发明埃及伊蚊叮咬不同铁状态的登革病毒感染宿主出现显著差异的病毒感染率，埃及伊蚊对登革病毒的易感性与宿主血液的铁状态呈显著负相关性，即埃及伊蚊叮咬低铁状态的感染宿主更易感染病毒。通过建立缺铁小鼠模型证实，对缺铁小鼠模型进行补铁（柠檬酸铁铵）可有效降低埃及伊蚊引发登革病毒的易感性，因此，含铁物质（柠檬酸铁铵）可降低埃及伊蚊携带病毒的能力和阻断病毒在自然界中的传播。

权利要求

1、含铁物质在制备抑制登革病毒传播和/或抑制蚊虫对登革病毒的易感性的产品中的应用。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述含铁物质的活性成分为含铁化合物。

3、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于：所述含铁物质为补铁剂。

4、根据权利要求1所述的应用，其特征在于：所述含铁物质的活性成分为柠檬酸铁铵。

5、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述产品为药品、食品或保健品。

6、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述蚊虫为埃及伊蚊或其他具有传播病毒能力的蚊虫。

7、一种抑制登革病毒传播的方法，其特征在于：所述方法包括给被登革病毒感染的宿主施用权利要求 1-6 任一中所述的含铁物质，从而抑制登革病毒的传播。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述被登革病毒感染的宿主为缺铁或低铁动物。

9、一种抑制蚊虫对登革病毒的易感性的方法，其特征在于：所述方法包括给被登革病毒感染的宿主施用权利要求 1-6 任一中所述的含铁物质，从而抑制蚊虫对登革病毒的易感性。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：所述被登革病毒感染的宿主为缺铁或低铁动物。

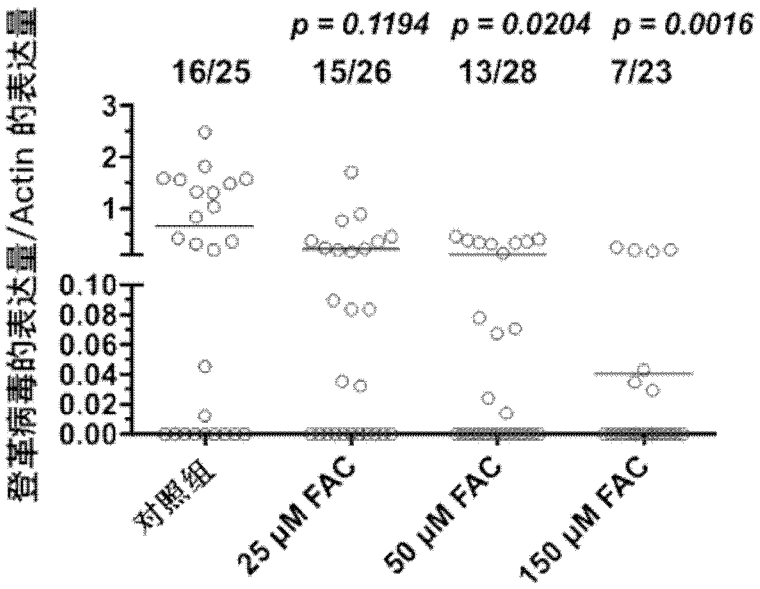
p = 0.1194
p = 0.0204
p = 0.0016
16/25
15/26
13/28
7/23
登革病毒的表达量/Actin 的表达量
3
2
1
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
对照组
25 μM FAC
50 μM FAC
150 μM FAC

图 1

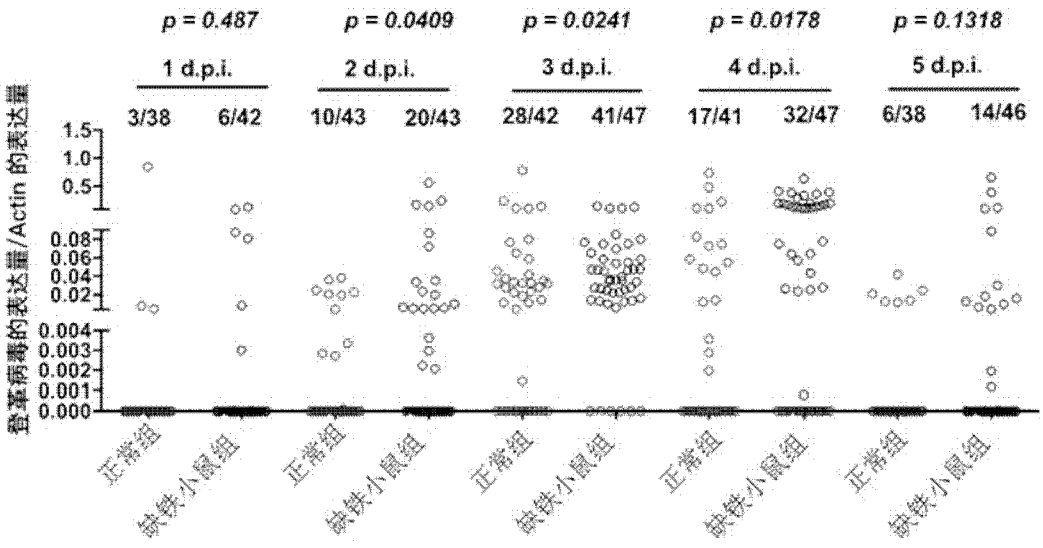
p = 0.487
p = 0.0409
p = 0.0241
p = 0.0178
p = 0.1318
1 d.p.i.
2 d.p.i.
3 d.p.i.
4 d.p.i.
5 d.p.i.
3/38
6/42
10/43
20/43
28/42
41/47
17/41
32/47
6/38
14/46
登革病毒的表达量/Actin 的表达量
1.5
1.0
0.5
0.08
0.06
0.04
0.02
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
正常组
缺铁小鼠组
正常组
缺铁小鼠组
正常组
缺铁小鼠组
正常组
缺铁小鼠组
正常组
缺铁小鼠组

图 2

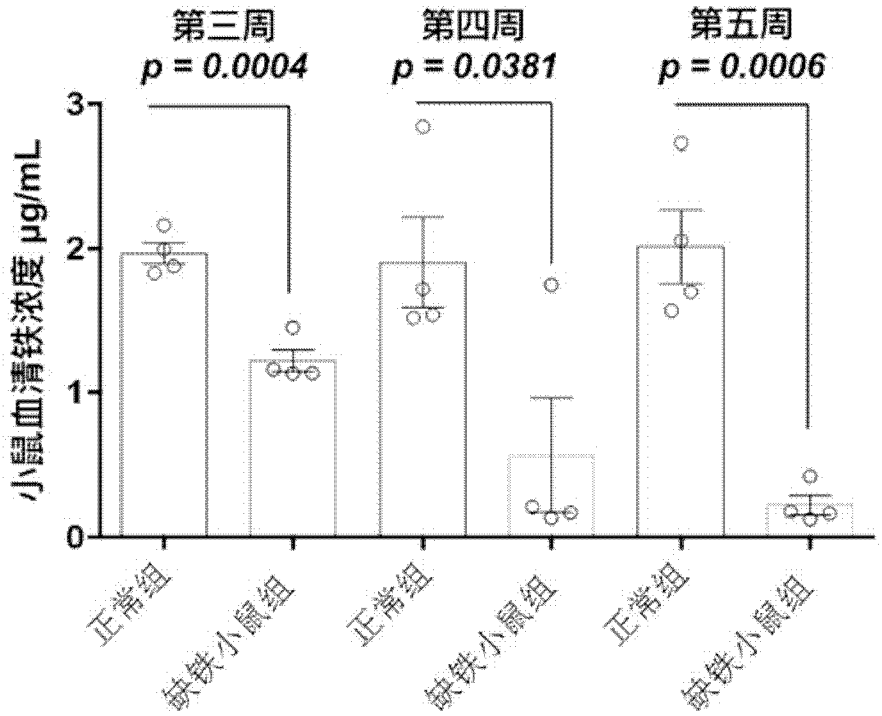
第三周
p = 0.0004
第四周
p = 0.0381
第五周
p = 0.0006
小鼠血清铁浓度 μg/mL
3
2
1
0
正常组
缺铁小鼠组
正常组
缺铁小鼠组
正常组
缺铁小鼠组

图 3

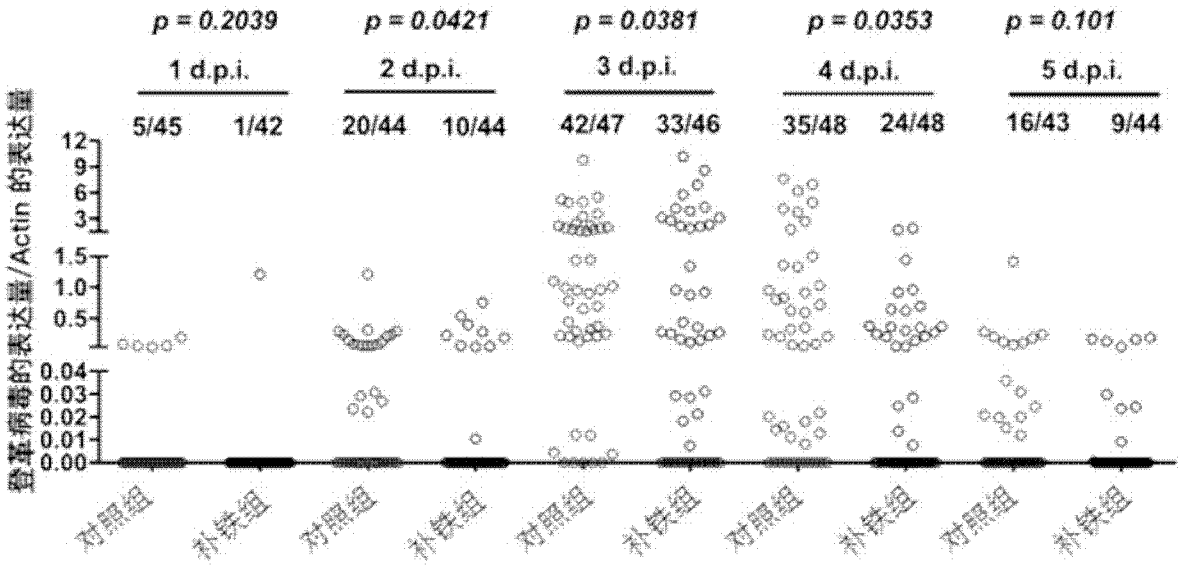
p = 0.2039
1 d.p.i.
5/45
1/42
p = 0.0421
2 d.p.i.
20/44
10/44
p = 0.0381
3 d.p.i.
42/47
33/46
p = 0.0353
4 d.p.i.
35/48
24/48
p = 0.101
5 d.p.i.
16/43
9/44
猪繁病毒的表达量/Actin 的表达量
12
9
6
3
1.5
1.0
0.5
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
对照组
补铁组
对照组
补铁组
对照组
补铁组
对照组
补铁组
对照组
补铁组

图 4

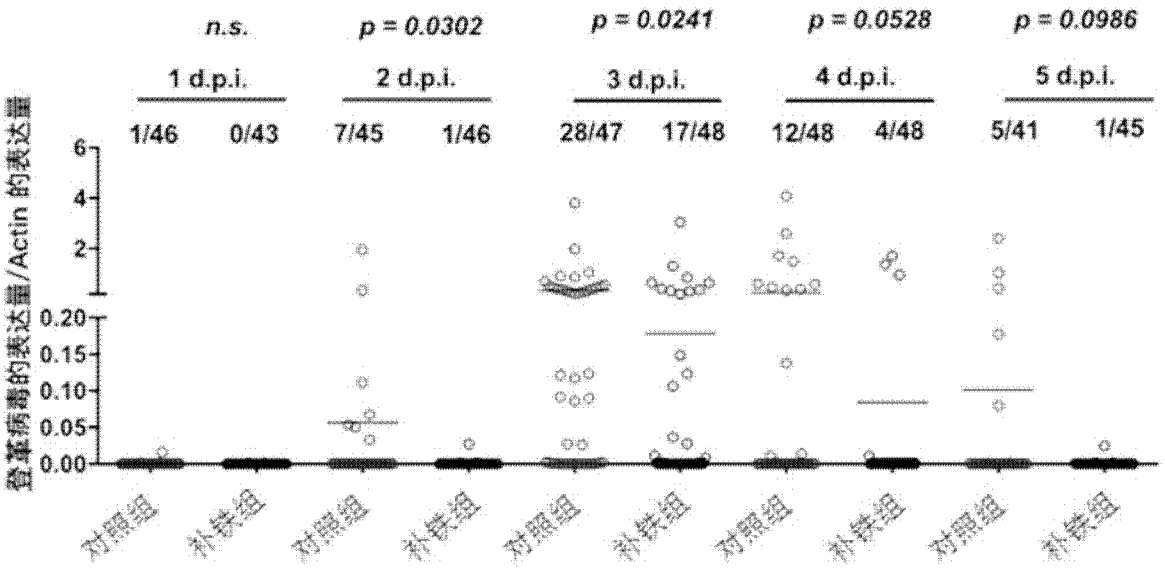
n.s.
p = 0.0302
p = 0.0241
p = 0.0528
p = 0.0986
1 d.p.i.
2 d.p.i.
3 d.p.i.
4 d.p.i.
5 d.p.i.
1/46
0/43
7/45
1/46
28/47
17/48
12/48
4/48
5/41
1/45
登革病毒的表达量/Actin 的表达量
6
4
2
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
对照组
补铁组
对照组
补铁组
对照组
补铁组
对照组
补铁组
对照组
补铁组

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/120582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/26(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

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

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

CNABS; DWPI; SIPOABS; JPABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; 万方数据知识服务平台; Web of Science; Elsevier Science; Wiley InterScience; ACS; PubMed; 百度学术: 铁, 铁剂, iron, Fe, ferri, ferralia, chalybeate, 柠檬酸铁铵, 枸橼酸铁铵, 柠檬酸铵铁, 柠檬酸铁胺, ferric, ferril, FAC, 000-031-19, 1185-57-5, 登革病毒, 登革2型, dengue, DENV, DENV-2, 登革热, DF, 登革出血热, DHF, 登革休克综合征, DSS, 蚊虫, 蚊子, mosquito, 伊蚊, 埃及伊蚊, 白纹伊蚊, Aedes, Aedes aegypti, Stegomyia, Aedes albopictus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108014129 A (INSTITUT PASTEUR OF SHANGHAI, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 11 May 2018 (2018-05-11) claims 1, 3, 8, 10, description, paragraphs 0110-0115, 0120-0122	1-10
X	WO 9511033 A1 (COMMONWEALTH SCI & IND RES ORG et al.) 27 April 1995 (1995-04-27) claims 1, 22, description, page 1 lines 6-11 and page 2 lines 13-14	1, 2, 5-10
X	WO 2015145380 A2 (UNIV FEDERAL MINAS GERAIS) 01 October 2015 (2015-10-01) claims 1, 4, description, paragraph 023	1-2, 6
A	CHEN, Hong et al. "Changes in Element Content in Aedes albopictus Infected by Dengue Virus Type II" *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases,* Vol. 20, No. 3, 30 June 2002 (2002-06-30), ISSN: 1000-7423, pages 171-173, abstract	1-10

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 May 2020	**14 May 2020**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/120582

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUCHEMIN, J.B. et al. "Iron Availability Affects West Nile Virus Infection in Its Mosquito Vector." *Virology Journal.*, Vol. 14, 05 June 2017 (2017-06-05), ISSN: 1743-422X, 103, abstract	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/120582

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/120582

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **7-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 7-8 set forth a method for inhibiting the spread of dengue virus, and claims 9-10 set forth a method for inhibiting the susceptibility of mosquitos to dengue virus. The methods belong to subject matter which does not require a search, as stipulated by PCT Rule 39.1(iv). The subject matter as amended by the applicant is expected to be: an application of an iron-containing substance in preparing a product which inhibits the spread of dengue virus or inhibits the susceptibility of mosquitos to dengue virus. The international search report is formed on the basis of the described reasonably expected amended subject matter. This international search report is provided based on the subject matter amended by the above reasonable expectation.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/120582

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 108014129 A	11 May 2018	None	
WO 9511033 A1	27 April 1995	AU 7985394 A	08 May 1995
WO 2015145380 A2	01 October 2015	WO 2015145380 A3	11 February 2016
		BR 132014011499 E2	27 December 2016
		BR 132015006676 E2	09 October 2018
		BR 132014007098 E2	04 December 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/120582

A. 主题的分类

A61K 33/26(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS;DWPI;SIPOABS;JPABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;USTXT;JPTXT;CNKI;万方数据知识服务平台;Web of Science;Elsevier Science;Wiley InterScience;ACS;PubMed;百度学术：铁，铁剂，iron，Fe，ferri，ferralia，chalybeate，柠檬酸铁铵，枸橼酸铁铵，柠檬酸铵铁，柠檬酸铁胺，ferric，ferril，FAC，000-031-19，1185-57-5，登革病毒，登革2型，dengue，DENV，DENV-2，登革热，DF，登革出血热，DHF，登革休克综合征，DSS，蚊虫，蚊子，mosquito，伊蚊，埃及伊蚊，白纹伊蚊，Aedes，Aedes aegypti，Stegomyia，Aedes albopictus

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 108014129 A (中国科学院上海巴斯德研究所) 2018年 5月 11日 (2018-05-11) 权利要求1、3、8、10，说明书第0110-0115、0120-0122段	1-10
X	WO 9511033 A1 (COMMONWEALTH SCI & IND RES ORG等) 1995年 4月 27日 (1995-04-27) 权利要求1、22，说明书第1页第6-11行和第2页第13-14行	1，2，5-10
X	WO 2015145380 A2 (UNIV FEDERAL MINAS GERAIS) 2015年 10月 1日 (2015-10-01) 权利要求1、4，说明书第023段	1-2，6
A	陈虹等. "白纹伊蚊感染登革病毒II型后的元素含量变化" 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 第20卷，第3期，2002年 6月 30日 (2002-06-30)，ISSN：1000-7423, 第171-173页，具体参见摘要	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 5月 8日	2020年 5月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	江炜
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(010)-62411147

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	DUCHEMIN, J.B.等. "Iron Availability Affects West Nile Virus Infection in Its Mosquito Vector." Virology Journal., 第14卷, 2017年 6月 5日 (2017-06-05), ISSN: 1743-422X, 103, 具体参见摘要	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/120582

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 7-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求7-8要求保护一种抑制登革病毒传播的方法，权利要求9-10要求保护一种抑制蚊虫对登革病毒的易感性的方法，属于PCT细则第39条第(iv)项规定的无需检索的主题。预期申请人可能修改的主题为：含铁物质在制备抑制登革病毒传播或抑制蚊虫对登革病毒的易感性的产品中的应用。本国际检索报告是基于上述合理预期修改的主题做出的。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/120582

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108014129	A	2018年 5月 11日	无			
WO	9511033	A1	1995年 4月 27日	AU	7985394	A	1995年 5月 8日
WO	2015145380	A2	2015年 10月 1日	WO	2015145380	A3	2016年 2月 11日
				BR	132014011499	E2	2016年 12月 27日
				BR	132015006676	E2	2018年 10月 9日
				BR	132014007098	E2	2018年 12月 4日