

(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
2016 年 12 月 22 日 (22.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/201692 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/14 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/081932
- (22) 国际申请日: 2015 年 6 月 19 日 (19.06.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。
- (72) 发明人: 潘婷 (PAN, Ting); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。 周南 (ZHOU, Nan); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。 张辉 (ZHANG, Hui); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。
- (74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司 (YOGO PATENT & TRADE MARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路 191 号中石化大厦 B 塔 3912 室, Guangdong 510620 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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))。

(54) Title: USE OF TEICOPLANIN ANTI-MIDDLE EAST RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS

(54) 发明名称: 一种替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒中的应用

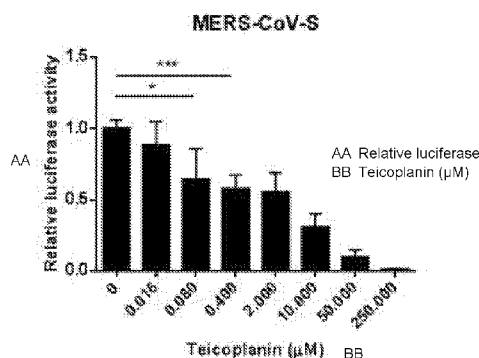


图 1

(57) Abstract: Disclosed is the use of a teicoplanin anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus.

(57) 摘要: 替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒中的应用。

WO 2016/201692 A1

一种替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒中的应用

技术领域

- 5 本发明涉及抗病毒药物的新应用，更具体地，涉及一种替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）以及严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）中的应用。

背景技术

- 中东呼吸综合征，是 2012 年发现的一种由新型冠状病毒引起的急性呼吸道
- 10 疾病，2013 年 5 月 23 日，世界卫生组织将这种新型冠状病毒感染命名为“中东呼吸综合征”。该病毒首现于沙特，继而在中东其他国家及欧洲等地区蔓延，2015 年初在韩国报告了首例确诊病例，并引起进一步传播。5 月 29 日，根据我国国家卫生和计划生育委员会通报，广东省惠州市出现首例输入性中东呼吸综合征确诊病例。

- 15 中东呼吸综合征冠状病毒是从动物传染给人的人兽共患病毒，然后该病毒的起源尚不完全清楚。就目前的报告病例统计发现，该病毒的感染病死率约为 36%。然而，目前世界上仍缺乏有效的抗中东呼吸综合征冠状病毒的疫苗和药物。

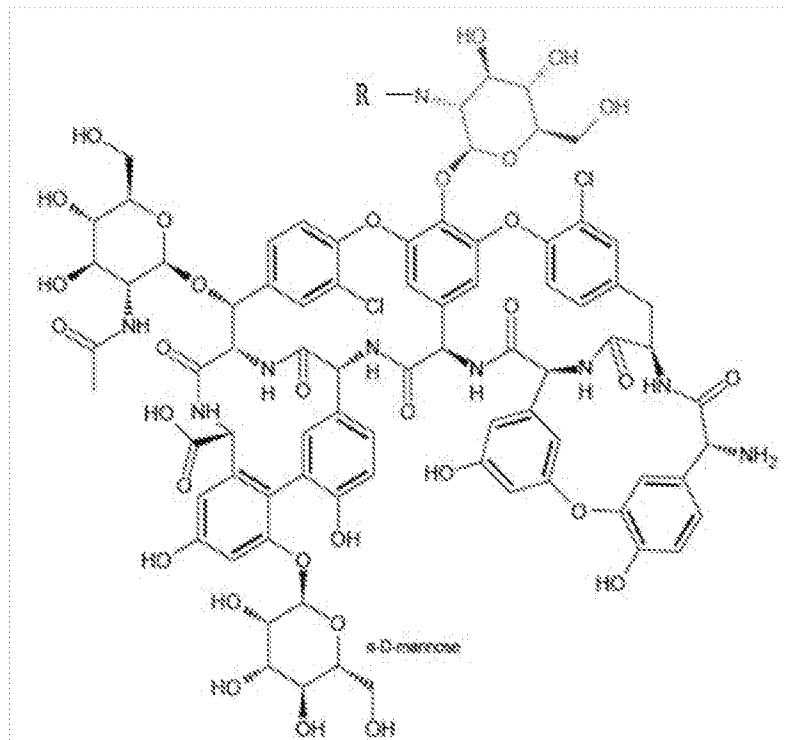
发明内容

- 目前针对中东呼吸综合征冠状病毒，市场尚没有明确抗病毒药物可以使用，
- 20 并有效抑制该病毒。

本发明提供一种老药新的应用, 本发明发现替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 中的应用。

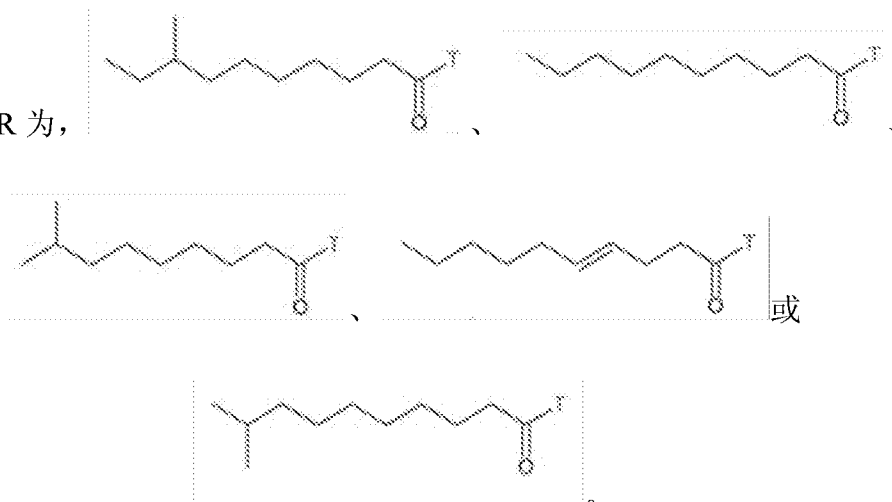
替考拉宁, 又名太古霉素, 1975 年被首次发现。它是特定的游动放线菌, 经发酵、提取后得到的一种万古霉素族糖肽类抗生素, 为多个化学结构非常相似

5 的化合物组成的抗生素混合物。其中含有如下结构式的化合物, 如式 I 所示:



式 I ,

所述的 R 为,



10 所述的替考拉宁能够抑制中东呼吸综合征冠状病毒的包膜蛋白

MERS-CoV-S。

所述的替考拉宁抑制中东呼吸综合征冠状病毒进入宿主细胞。

本发明利用 pHIV-luciferase、pCMV- Δ R8.2 和 MERS-CoV-S 质粒转染至 293T 细胞，包装出可以表达中东呼吸综合征冠状病毒包膜蛋白的假病毒，再用这些假病毒来感染相应的靶细胞，从而模拟中东呼吸综合征冠状病毒感染宿主细胞的一种状态。

然后，本发明运用此种假病毒包装的细胞模型，筛选上千个已经上市使用的化合物库，发现了抗菌素替考拉宁可以有效的抑制中东呼吸综合征冠状病毒感染宿主细胞的现象，其 IC₅₀ 约为 940nM。

另外，本发明发现，替考拉宁也能够抑制严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV），其通过抑制 SARS 病毒进入宿主细胞发挥作用，IC₅₀ 约为 1.18 μ M。

本发明的优点在于：

1. 本发明根据模拟中东呼吸综合征冠状病毒感染宿主细胞的一种状态，并利用该假病毒包装的细胞模型，发现了抗菌素替考拉宁可以有效的抑制中东呼吸综合征冠状病毒感染 293T 细胞的现象，经多个实验证实，该抗菌素替考拉宁具有良好的抗病毒作用，IC₅₀ 约为 940nM。

2. 该抗菌素替考拉宁对人体的安全性早已经过了临床实践的检验，我们目前确定了替考拉宁抗中东呼吸综合征冠状病毒的明显药效，即可在国家药监局紧急备案和批准后，直接用于临床治疗的第一线，避免了新药研发的漫长周期，这

为我们进一步的研发抗中东呼吸综合征冠状病毒提供的强有力的理论基础和实践基础，具有重要的开发价值和推广意义。

3. 根据本发明的研究发现替考拉宁对中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）和严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）的包膜蛋白有抑制作用。

附图说明

图 1 不同浓度的抗菌素替考拉宁对中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）包膜蛋白 S 的抑制效果。

图 2 不同浓度的抗菌素替考拉宁对水疱性口炎病毒包膜 VSV-G 的抑制效果。

- 10 图 3 不同浓度的抗菌素替考拉宁对严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）包膜蛋白 S 的抑制效果。

图 4 不同浓度的抗菌素替考拉宁对 A 型流感病毒的抑制效果。

具体实施方式

- 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。除非特别说明，本发明采用的试剂、设备和方法为本技术领域常规市购的试剂、设备和常规使用的方法。

本发明所使用的替考拉宁均采购自上海蓝木化工有限公司（其是美国 Selleck Chemicals 在上海设立的子公司）。

实施例 1 不同浓度的化合物抗菌素替考拉宁对中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）包膜蛋白 S 的抑制效果

- 20 （1）包病毒：将 4.5 μ g pHIV-luciferase、4.5 μ g pCMV- Δ R8.2 和 10 μ g

MERS-CoV-S 质粒转染至 293T 细胞 (10 cm dish), 48 小时后, 收集病毒上清, 测 p24。

- (2) 针对 MERS-CoV-S 的化合物筛选: 将 p24-normalized MERS-CoV-S 假病毒上清 (含 8 μ g/ml Polybrene) 感染 96 孔板中的 293T 细胞, 同时加入不同浓度的替考拉宁化合物。

(3) 换液: 感染 12 小时后, 更换新鲜的 DMEM 培养基。

(4) 检测 luciferase 活性: 感染 48 小时后, 每孔用 PBS 洗一次, 然后加入 100 μ l 裂解液, 震荡 30 min, 取 10 μ l 裂解液检测 luciferase 活性。

- 根据实施例 1 的结果图 1 说明, 抗菌素替考拉宁可以特异性的作用于中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 包膜蛋白 S, 抑制 MERS-CoV 病毒的进入, 并由此计算出替考拉宁抑制 MERS-CoV-S 的 IC₅₀ 约为 940nM。

实施例 2 不同浓度的化合物抗菌素替考拉宁对水疱性口炎病毒包膜 VSV-G 的抑制效果

- (1) 包病毒: 将 4.5 μ g pHIV-luciferase、4.5 μ g pCMV- Δ R8.2 和 10 μ g VSV-G 质粒转染至 293T 细胞 (10 cm dish), 48 小时后, 收集病毒上清, 测 p24。

(2) 针对 VSV-G 的化合物筛选: 将 p24-normalized VSV-G 假病毒上清 (含 8 μ g/ml Polybrene) 感染 96 孔板中的 293T 细胞, 同时加入不同浓度的替考拉宁化合物。

(3) 换液: 感染 12 小时后, 换新鲜的 DMEM 培养基。

- (4) 检测 luciferase 活性: 感染 48 小时后, 每孔用 PBS 洗一次, 然后加入

100 μ l 裂解液，震荡 30min,取 10 μ l 裂解液检测 luciferase 活性。

根据实施例 2 的结果图 2 说明，抗菌素替考拉宁对 VSV-G 的包膜蛋白没有任何抑制作用。

实施例 3 不同浓度的化合物抗菌素替考拉宁对严重急性呼吸综合征冠状病毒

5 (SARS-CoV) 包膜蛋白 S 的抑制效果

(1) 包病毒：将 6.5 μ g pHIV-luciferase、8 μ g pCMV- Δ R8.2 和 20 μ g SARS-CoV-S 质粒转染至 293T 细胞 (10 cm dish)，48 小时后，收集病毒上清，测 p24。

(2) 针对 SARS-CoV-S 的化合物筛选：将 p24-normalized SARS-CoV-S 假病毒上清 (含 8 μ g/ml Polybrene) 感染 96 孔板中的 293T 细胞，同时加入不同浓度的替考拉宁化合物。

(3) 换液：感染 12 小时后，更换新鲜的 DMEM 培养基。

(4) 检测 luciferase 活性：感染 48 小时后，每孔用 PBS 洗一次，然后加入 100 μ l 裂解液，震荡 30 min，取 10 μ l 裂解液检测 luciferase 活性。

15 根据实施例 3 的结果图 3 说明，抗菌素替考拉宁可以特异性的作用于严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 包膜蛋白 S，抑制 SARS-CoV 病毒的进入，并由此计算出替考拉宁抑制 SARS-CoV-S 的 IC₅₀ 约为 1.18 μ M。

实施例 4 不同浓度的化合物抗菌素替考拉宁对 A 型流感病毒的抑制效果

(1) 加药与感染：将 5×10^4 A549 细胞铺于 24 孔板中，于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 小时后，加入不同浓度的化合物，并且每孔以 MOI=0.1 的 A 型流感病毒进行感染，

感染 4 小时后换液，24 小时后收取上清液。

- (2) 测定空斑形成单位 (Plaque-forming unit, PFU): 准备细胞融合度 $\geq 95\%$ 的 MDCK 细胞 12 孔培养板, 弃去细胞培养液, 用 PBS 洗 2 遍, 将收取的上清液 10 倍梯度稀释至需要的稀释度, 每个细胞孔接种 500 μl 上清稀释液, 置于 37°C
- 5 孵育 1 小时。将 2 $\times$ MEM 培养基置于 37°C 下预热, 同时配置 2% 低熔点琼脂糖凝胶, 完全溶解后置于 50°C 水浴锅中防止凝固。1 小时后弃去病毒上清液, 用 PBS 清洗 2 次, 2% 低熔点琼脂糖凝胶和 2 $\times$ MEM 培养基 1:1 混合并加入终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 TPCK 胰酶、0.2% 牛血清白蛋白 (BSA) 及 100U/ml 的青-链霉素,
- 10 混匀。每孔加入 1 ml 琼脂糖-MEM 培养基, 待其完全凝固后, 倒扣放置于 37°C 的 CO₂ 培养箱, 48 小时后对空斑进行观察计数。

根据实施例 4 的结果图 4 说明, 抗菌素替考拉宁对 A 型流感病毒没有任何抑制作用。

权 利 要 求 书

1. 一种替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒中的应用，其特征在于，所述的替考拉宁抑制中东呼吸综合征冠状病毒的包膜蛋白 S。
- 5 3. 根据权利要求 1 所述的替考拉宁在抗中东呼吸综合征冠状病毒中的应用，其特征在于，所述的替考拉宁抑制中东呼吸综合征冠状病毒进入宿主细胞。
4. 一种替考拉宁在制备抗严重急性呼吸综合征冠状病毒药物中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的替考拉宁在制备抗严重急性呼吸综合征冠状病毒药物中的应用，其特征在于，所述的替考拉宁类化合物抑制严重急性呼吸综合征冠状病毒进入宿主细胞中的应用。
- 10 6. 一种替考拉宁在抗中东呼吸综合征和严重急性呼吸综合征冠状病毒药物中的应用，其特征在于，所述的替考拉宁抑制冠状病毒进入宿主细胞。

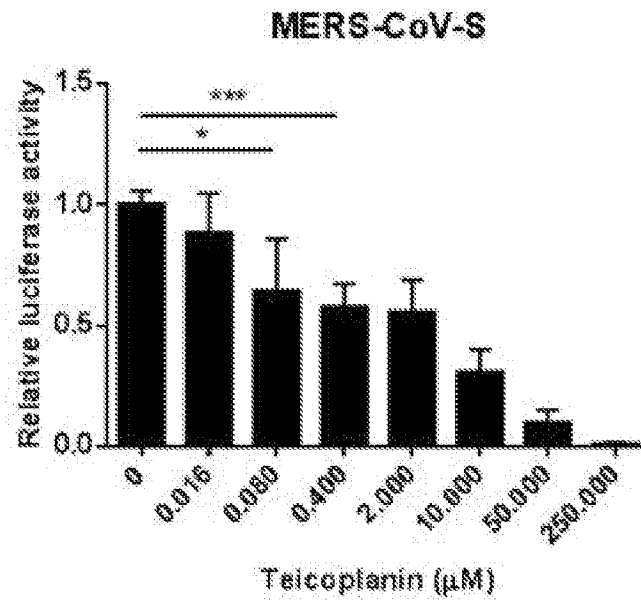


图 1

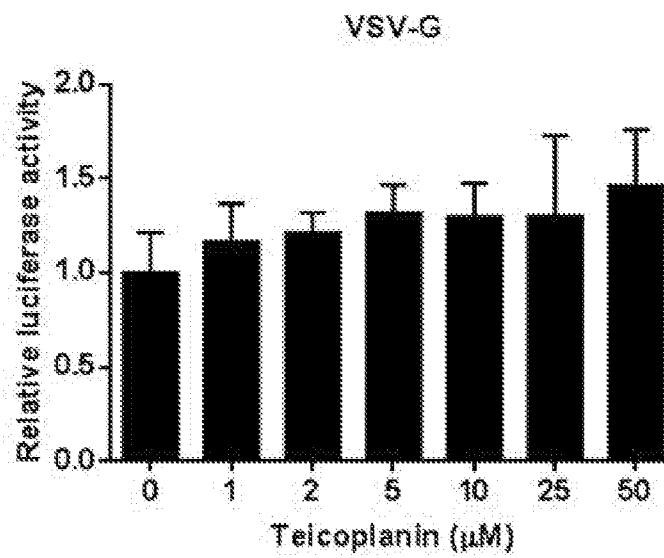


图 2

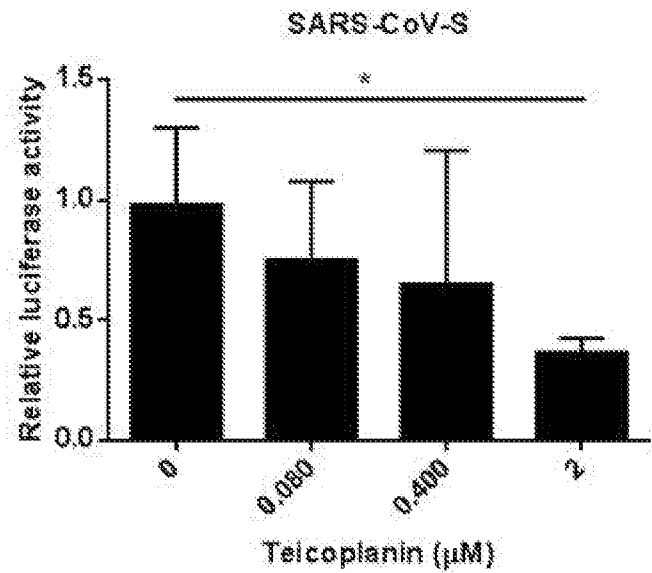


图 3

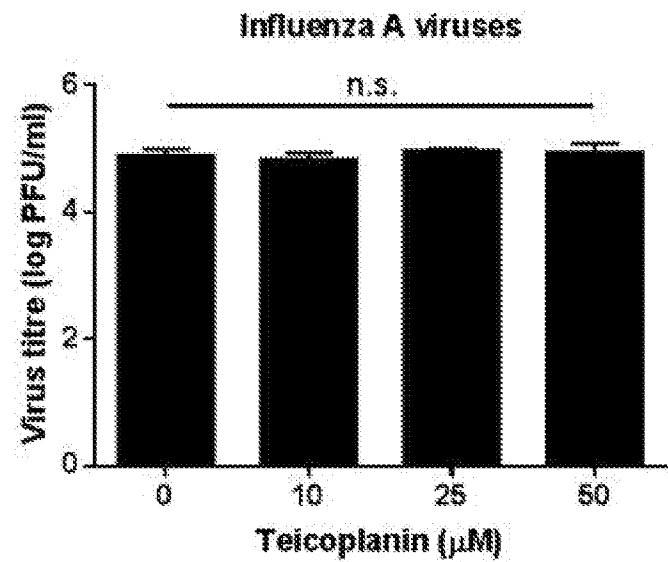


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/081932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/14 (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)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, CNKI, ISI web of Knowledge, EMBASE, Google Scholar: teicoplanin, teicomycin, targocid, glycopeptide, antibiotic, middle east respiratory syndrome, MERS, severe acute respiratory syndrome, SARS, coronavirus, MERS-CoV, SARS-CoV

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1741810 A (K.U. LEUVEN RESEARCH AND DEVELOPMENT) 01 March 2006 (01.03.2006), see claims 1-5	4, 5
X	BALZARINI, J. et al., "Inhibition of feline (FIPV) and human (SARS) coronavirus by semisynthetic derivatives of glycopeptide antibiotics", Antiviral Research, 31 October 2006 (31.10.2006), vol. 72, no. 1, pages 20-33, see the abstract, page 25, the right column, paragraph 1	4, 5
A	JU, Yongjing et al., "Research advances in glycopeptide antibiotics", Journal of China Pharmaceutical University, 31 December 2008 (31.12.2008), vol. 39, no. 2, pages 188-192	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 15 March 2016	Date of mailing of the international search report 24 March 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer XING, Ying Telephone No. (86-10) 62411044

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/081932

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1741810 A	01 March 2006	GB 0220235 D0	09 October 2002
		AU 2003260198 A1	19 March 2004
		JP 2006503015 A	26 January 2006
		KR 20060091049 A	17 August 2006
		WO 2004019970 A2	11 March 2004
		IN 200701836 P2	10 August 2007
		US 2005250677 A1	10 November 2005
		WO 2004019970 A3	22 July 2004
		IN 200500528 P2	24 February 2006
		EP 1534316 A2	01 June 2005
		IN 216350 B	14 March 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/081932

A. 主题的分类

A61K 38/14(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))

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, CNKI, ISI web of Knowledge, EMBASE, Google Scholar: 替考拉宁, 太古霉素, 肽可霉素, 壁霉素, 糖肽类, 抗生素, 中东呼吸综合征, 严重急性呼吸(窘迫)综合征, 冠状病毒, 冠形病毒, teicoplanin, teicomycin, targocid, glycopeptide, antibiotic, middle east respiratory syndrome, MERS, severe acute respiratory syndrome, SARS, coronavirus, MERS-CoV, SARS-CoV

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 1741810 A (鲁汶天主教大学研究开发部) 2006年 3月 1日 (2006 - 03 - 01) 参见权利要求1-5	4, 5
X	Jan Balzarini, 等. "Inhibition of feline (FIPV) and human (SARS) coronavirus by semisynthetic derivatives of glycopeptide antibiotics" Antiviral Research, 第72卷, 第1期, 2006年 10月 31日 (2006 - 10 - 31), 第20-33页 参见摘要, 第25页右栏第1段	4, 5
A	鞠永静, 马淑涛. "糖肽类抗生素的研究进展" 中国药科大学学报, 第39卷, 第2期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第188-192页	1-6

☐ 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

2016年 3月 15日

国际检索报告邮寄日期

2016年 3月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

幸颖

电话号码 (86-10)62411044

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/081932

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	1741810	A	2006年 3月 1日	GB	0220235	D0	2002年 10月 9日
				AU	2003260198	A1	2004年 3月 19日
				JP	2006503015	A	2006年 1月 26日
				KR	20060091049	A	2006年 8月 17日
				WO	2004019970	A2	2004年 3月 11日
				IN	200701836	P2	2007年 8月 10日
				US	2005250677	A1	2005年 11月 10日
				WO	2004019970	A3	2004年 7月 22日
				IN	200500528	P2	2006年 2月 24日
				EP	1534316	A2	2005年 6月 1日
				IN	216350	B	2008年 3月 14日
.....							

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)