

(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
2022 年 1 月 13 日 (13.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/007408 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/7076 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/077156

(22) 国际申请日: 2021 年 2 月 22 日 (22.02.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010653756.1 2020 年 7 月 8 日 (08.07.2020) CN

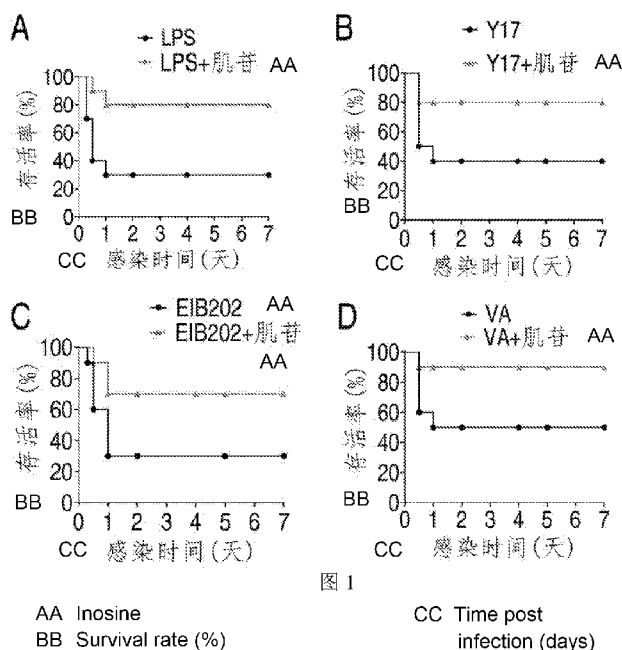
(71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 李惠 (LI, Hui); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。 彭博 (PENG, Bo); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。 彭宣宪 (PENG, Xuanxian); 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。 蒋明 (JIANG, Ming); 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 AND TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路中石化大厦 B 塔 4416 室, Guangdong 510620 (CN)。

(54) Title: APPLICATION OF INOSINE IN PREPARATION OF ANTI-INFECTIVE MEDICAMENT

(54) 发明名称: 肌苷在制备抗感染药物中的应用



(57) Abstract: An application of inosine in preparation of an anti-infective medicament. Inosine can bind to proline hydroxylase to degrade hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) protein and adjust IL-1 β factors and complements 3C in an organism, so that the IL-1 β factor content of the organism under the influence of LPS stimulation or bacterial infection is remarkably reduced, the complement 3C content is remarkably increased, and the immunity of the organism is improved; therefore, the survival rate of infected organisms is increased.

(57) 摘要: 肌苷在制备抗感染的药物中的应用。肌苷可以与脯氨酸羟化酶结合, 降解缺氧诱导因子蛋白(HIF-1 α)蛋白, 调节机体中的IL-1 β 因子、补体3C, 使在LPS刺激或细菌感染影响下的生物体的IL-1 β 因子含量显著降低, 补体3C含量显著增加, 提高机体自身的抵抗力, 从而提高被感染生物的存活率。

(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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

肌苷在制备抗感染药物中的应用

技术领域

- 5 本发明属于生物医药技术领域。更具体地，涉及肌苷在制备抗感染药物中的应用。

背景技术

- 肌苷（Inosine），也称为次黄苷、次黄嘌呤核苷等，是由次黄嘌呤与核糖结合而成的核苷类化合物。肌苷是人体的正常成分，为腺嘌呤的前体，能直接透
10 过细胞膜进入体细胞，参与体内的正常代谢，如蛋白质合成、核酸代谢、能量代谢等。临床上肌苷常用作辅酶类药物，主要用于急、慢性肝炎的辅助治疗，同时也可以用于治疗白细胞减少、血小板减少、心力衰竭、中心视网膜炎、视神经萎缩等。

- 细菌感染是致病菌或条件致病菌侵入宿主中生长繁殖，产生毒素和其他代谢
15 产物所引起的疾病。目前临床上治疗宿主感染的药物主要为抗生素，可作用于细菌的 DNA、RNA 和蛋白质合成系统的特定环节，干扰细菌的代谢作用，从而妨碍细菌的生命活动或抑制细菌生长，如 β -内酰胺类抗生素（青霉素类、头孢菌素类等）、氟喹诺酮类抗生素（环丙沙星、氧氟沙星等）、大环内酯类抗生素（罗红霉素、克拉霉素）、氨基糖苷类抗生素（丁氨卡那霉素等）等。但是现有技术
20 常用抗生素主要是通过干扰细菌的代谢来抑制细菌的生长繁殖，而细菌在生长繁殖的过程中在抗生素的选择压力下，会逐渐产生耐药性，使得针对细菌感染的治疗更加困难。因此，提供一种提高宿主抵抗细菌感染的药物，具有更加重要的意义。

25 发明内容

本发明要解决的技术问题是克服现有技术缺少提高宿主抵抗细菌感染药物的缺陷和不足，提供一种全新的肌苷在制备提高宿主抵抗细菌感染药物中的应用。

本发明的目的是提供肌苷在制备抗感染药物中的应用。

- 30 本发明另一目的是提供一种含有有效量肌苷的抗感染药物。

本发明上述目的通过以下技术方案实现：

本发明研究发现，肌苷可以与脯氨酸羟化酶结合，调节机体中的细胞因子，如 IL-1 β 因子、补体 3C。实验证明，生物体在 LPS 刺激或细菌感染影响下，细胞因子 IL-1 β 因子含量会显著增加，补体 3C 含量则显著降低；摄入肌苷后，肌苷可以与脯氨酸羟化酶结合，可以降解缺氧诱导因子（HIF-1 α ）蛋白，显著抑制 IL-1 β 因子含量增加，同时促进补体 3C 含量增加，提高机体自身的抵抗力，从而提高被感染生物的存活率。

进一步地，所述肌苷包括肌苷，肌苷的可药用的盐和酯，选择性取代的类似物，肌苷立体异构体、几何异构体、水合物、溶剂化物或药学上可接受的盐或前药。

另外的，本发明还提供了一种含有有效量肌苷的抗感染药物。

进一步地，所述药物为口服剂型或注射剂型。

更进一步地，所述药物除了对人类治疗有益以外，还可应用于兽医治疗宠物、引进品种的动物和农场的动物，包括哺乳动物，啮齿类动物等等。另外一些动物的实例包括马、狗和猫等。

进一步地，实验证明所述药物也可以应用于鱼类感染的治疗，显著提高感染鱼类的存活率。

本发明具有以下有益效果：

本发明研究结果显示，肌苷可以与脯氨酸羟化酶结合，降解缺氧诱导因子（HIF-1 α ）蛋白，调节机体中的 IL-1 β 因子、补体 3C，使在 LPS 刺激或细菌感染影响下的生物体的 IL-1 β 因子含量显著降低，补体 3C 含量显著增加，提高机体自身的抵抗力，从而提高被感染生物的存活率，在抗感染的治疗中具有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 中肌苷提高细菌感染小鼠的存活率数据统计图，其中，A-LPS 刺激，B-大肠杆菌 Y17 感染，C-迟缓爱德华氏菌 EIB202 感染，D-溶藻弧菌 VA。

图 2 为本发明实施例 1 中肌苷对小鼠血液中 IL-1 β 因子、补体 C3 含量影响的数据统计图。

图 3 为本发明实施例 1 中死亡和存活小鼠血液中 IL-1 β 因子、补体 C3 含量统计图。

图 4 为本发明实施例 2 中外源肌苷对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达影响的数据统计图。

5 图 5 为本发明实施例 2 中不同浓度外源肌苷对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达影响的数据统计图。

图 6 为本发明实施例 2 中外源肌苷对小鼠巨噬细胞 Raw264.7-ASC 的 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达影响的数据统计图。

图 7 为本发明实施例 3 中肌苷与脯氨酸羟化酶的结合情况统计图。

10 图 8 为本发明实施例 3 中肌苷对缺氧诱导因子 HIF-1 α 蛋白表达影响的数据统计图。

图 9 为本发明实施例 3 中外源肌苷与脯氨酸羟化酶抑制剂对 *il1b* 和 *c3* 基因表达影响的数据统计图。

15 图 10 为本发明实施例 3 中外源肌苷与 PHD 基因缺失细胞对 *il1b* 和 *c3* 基因表达影响的数据统计图。

图 11 为本发明实施例 4 中外源添加肌苷对鱼类迟缓爱德华氏菌感染的存活率影响的数据统计图。

图 12 为本发明实施例 4 中外源肌苷对鱼类迟缓爱德华氏菌感染的 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达影响的数据统计图。

20

具体实施方式

以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明，本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

25 其中，IL-1 β 因子、补体 C3 为蛋白质，斜体的 *il1b* 和补体 *c3* 为基因。

除非特别说明，以下实施例所用试剂和材料均为市购。

实施例 1 肌苷提高小鼠对细菌感染的抵抗能力

1.1 肌苷提高细菌感染小鼠的存活率

30 从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出保存的细菌甘油菌株，全部加入到 100mL 的 LB 培养基中（250mL 培养瓶），恒温（溶藻弧菌和迟缓爱德华氏菌为 30 $^{\circ}$ C，大肠杆菌 Y17

为 37℃) 200rpm 培养。待细菌生长至 OD600 约 1.0 时, 离心收集细菌, 弃上清。用生理盐水洗涤 3 次备用。

Balb/c 小鼠 (5-8 周龄, 体重 21±3 g) 先喂养一周使其适应试验环境后, 随机分成 4 组 (LPS 和 3 种细菌各为 1 组), 每组 40 只小鼠。每组中 20 只小鼠按照 300 mg/kg 剂量采用肌肉注射方式注射肌苷, 另外 20 只小鼠肌肉注射相同体积的生理盐水。3 小时后, 4 组小鼠分别以腹腔注射方式进行 LPS 刺激或 3 种细菌感染。剂量分别为: LPS 75mg/kg, 迟缓爱德华氏菌 EIB202 为 5×10^7 CFU/只、溶藻弧菌 VA 为 3×10^8 CFU/只、人源大肠杆菌 Y17 为 2×10^6 CFU/只。观察 7 天, 统计小鼠的死亡情况, 并计算小鼠存活率。计算公式为: 小鼠存活数量/小鼠总数×100%, 结果参见图 1。

由图可见, 注射肌苷小鼠组, 其存活率明显高于未注射肌苷的对照组小鼠, 说明肌苷可以提高细菌感染小鼠的存活率。具体情况如下: 注射肌苷后再注射 LPS 组的小鼠存活率为 80%, 而未注射肌苷仅注射 LPS 组的小鼠存活率仅为 25%, 存活率提高了 55%, 具有明显差异 (图 1A); 注射肌苷后再用大肠杆菌 Y17 感染组小鼠的存活率为 80%, 而未注射肌苷仅大肠杆菌 Y17 感染组小鼠的存活率仅为 40%, 存活率提高了 40%, 具有明显差异 (图 1B); 注射肌苷后再用迟缓爱德华氏菌 EIB202 感染组的小鼠存活率为 70%, 而未注射肌苷仅迟缓爱德华氏菌感染组的小鼠存活率仅为 30%, 存活率提高了 40%, 具有明显差异 (图 1C); 注射肌苷后再用溶藻弧菌感染组的小鼠存活率为 80%, 而未注射肌苷仅溶藻弧菌感染组的小鼠存活率仅为 50%, 存活率提高了 30%, 具有明显差异 (图 1D)。

1.2 肌苷对小鼠血液中 IL-1 β 因子、补体 C3 含量的影响

现有技术研究发现, 炎症因子紊乱会引起自身免疫性疾病导致死亡 (Shaw et al. Trends in Molecular Medicine, 2011, 17(2): 57-64; Mao et al. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 2566; Gabay et al. Nature Reviews Rheumatology, 2010, 6(4): 232-241), 血液中的 IL-1 β 因子和补体 C3 含量都与机体免疫功能、细菌感染后机体的存活率密切相关。

将 80 只小鼠随机分成 4 组 (LPS 和 3 种细菌各 1 组), 每组 20 只。每组中 10 只小鼠按照 300 mg/kg 剂量采用肌肉注射方式注射肌苷, 另外 10 只小鼠注射相同体积的生理盐水。3 小时后, 4 组小鼠分别以腹腔注射进行 LPS 刺激或 3 种细菌感染。剂量分别为: LPS 是 5mg/kg, 3 种细菌感染剂量都为 1×10^4 CFU/只。

LPS 刺激后 2 小时，溶藻弧菌和 Y17 感染后 12 小时，EIB202 感染后 16 小时，采用眼眶取血方式采集每只小鼠血液，用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 因子和补体 C3 的含量，结果参见图 2。

从图中可以看出，小鼠注射肌苷组，不管是 LPS 刺激还是大肠杆菌 Y17、溶藻弧菌 VA 或迟缓爱德华菌 EIB202 感染，其血液中 IL-1 β 因子含量都显著低于未注射肌苷组；而补体 C3 含量却显著高于未注射肌苷组。具体情况如下：注射肌苷后再注射 LPS 组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 222.43pg/mL，补体 C3 含量为 81.6 μ g/mL，而未注射肌苷组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 716.53 pg/mL，补体 C3 的含量为 32.43 μ g/mL，IL-1 β 因子含量降低了 3.22 倍，而补体 C3 含量增加了 2.52 倍，两组间均具有明显差异；注射肌苷后再用大肠杆菌 Y17 感染组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 180.54 pg/mL，补体 C3 含量为 96.39 μ g/mL，而未注射肌苷组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 511.08 pg/mL，补体 C3 含量为 30.54 μ g/mL，IL-1 β 因子含量降低了 2.83 倍，而补体 C3 含量增加了 3.16 倍，两组间均具有明显差异；注射肌苷后再用溶藻弧菌感染组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 48.68 pg/mL，补体 C3 含量为 68.57 μ g/mL，而未注射肌苷组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 322.15 pg/mL，补体 C3 的含量为 26.29 μ g/mL，IL-1 β 因子含量降低了 6.62 倍，而补体 C3 含量增加了 2.61 倍，两组间均具有明显差异；注射肌苷后再用迟缓爱德华菌感染组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 89.97 pg/mL，补体 C3 含量为 65.65 μ g/mL，而未注射肌苷组小鼠血液 IL-1 β 因子含量为 424.23 pg/mL，补体 C3 含量为 42.02 μ g/mL，IL-1 β 因子含量降低了 4.72 倍，而补体 C3 含量增加了 1.56 倍，两组间均具有明显差异。

这些结果说明，肌苷通过降低宿主血液 IL-1 β 因子的含量，升高补体 C3 的含量，从而提高了细菌感染后小鼠的存活率。

1.3 死亡和存活小鼠血液中 IL-1 β 因子、补体 C3 含量的检测

将 30 只昆明小鼠随机分成 2 组：溶藻弧菌攻毒组 20 只，生理盐水对照组 10 只。溶藻弧菌腹腔攻毒剂量为 3×10^8 CFU/只，对照组腹腔注射同等剂量生理盐水。6 小时后采用眼眶取血，并将每只小鼠及相应的血液样本做好标记，样品 -80 $^{\circ}$ C 保存用于后期 IL-1 β 和 C3 含量测定。然后继续观察小鼠 7 天，记录每只小鼠的存活情况。结果发现，20 只攻毒小鼠中有 12 只存活，8 只死亡。采用 ELISA 方法测定每只小鼠 IL-1 β 因子和补体 C3 含量，并将死亡和存活小鼠的 IL-1 β 因

子和补体 C3 含量各自归为 1 组，将结果统计得图 3。

由图可见，死亡小鼠血液中 IL-1 β 因子含量均值为 360.11pg/mL，而存活组小鼠血液中 IL-1 β 因子含量均值为 290.06 pg/mL，死亡小鼠血液中 IL-1 β 因子含量显著高于存活小鼠。死亡小鼠血液中补体 C3 含量均值为 9.29 μ g/mL，而存活组小鼠血液中补体 C3 含量均值为 15.36 μ g/mL，死亡小鼠血液中补体 C3 含量显著低于存活小鼠。

这些结果说明，IL-1 β 因子和补体 C3 的含量高低与细菌感染后小鼠的存活和死亡有关，IL-1 β 因子含量过高或补体 C3 含量过低的小鼠易死亡。

实施例 2 外源肌苷对小鼠巨噬细胞 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达的影响

2.1 外源肌苷对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达的影响

将 RAW264.7 细胞从液氮中取出，迅速放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中溶解，用低糖 DMEM（含 10%FBS）在 CO₂ 培养箱中培养。两天后换液。当细胞生长密度达到 80~90%左右时，用 0.0025%EDTA 消化细胞，再以 1×10^6 /每孔的数量将细胞加入 6 孔板中进行铺板。

将铺好的细胞放入 CO₂ 培养箱中培养 12 小时后，加入浓度为 5mM 的肌苷，对照组加入等体积的细胞培养基。再继续培养 12 小时后，用 100ng/ml LPS 刺激 2、8 和 24 小时，分别收集细胞，提取总 RNA。每个条件 4 个重复。采用荧光定量 PCR 检测 *il1b* 和补体 *c3* 基因的表达情况。这 2 个基因引物分别为：*il1b*（上游：tcaggcaggcagtagtctc，下游：gaggatgggctcttcttcaa），补体 *c3*（上游：catcctgcactcaggtagt，下游：gcattagatccctgagtgc），结果参见图 4。

由图可见，小鼠巨噬细胞受到 LPS 刺激后，外源添加肌苷与不添加肌苷比较，*il1b* 表达下降，而 *c3* 表达增加。具体情况如下：LPS 刺激后 2 小时，添加肌苷的细胞 *il1b* 表达下降 3.05 倍，而 *c3* 表达基本不变；LPS 刺激后 8 小时，添加肌苷的细胞 *il1b* 表达下降 5.15 倍，而 *c3* 表达增加 1.81 倍；LPS 刺激后 24 小时，添加肌苷的细胞 *il1b* 表达下降 1.98 倍，而 *c3* 表达增加 1.81 倍。

这些结果说明小鼠巨噬细胞在受到外源肌苷作用后，对 LPS 刺激表现出和小鼠同样的反应，即肌苷可以抑制小鼠巨噬细胞 *il1b* 的表达，而促进小鼠巨噬细胞 *c3* 的表达。

2.2 不同浓度外源肌苷对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 *il1b* 和补体 *c3* 基因表达的影响

将铺好的 RAW264.7 细胞放入培养箱培养 12 小时后，分别加入浓度为 0.63mM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM 和 10 mM 的肌苷，对照组仅加细胞培养基，每组 4 个重复。再继续培养 12 小时，然后用 100ng/ml 的 LPS 刺激 8 小时。收集细胞，提取每个样品的 RNA。荧光定量检测外源添加不同浓度肌苷情况下，

5 LPS 刺激后 *il1b* 和补体 *c3* 的表达情况，结果统计参见图 5。

由图可见，小鼠巨噬细胞受到 LPS 刺激后，外源添加肌苷与不添加肌苷比较，*il1b* 表达降低，且随着肌苷浓度的增加而逐渐下降；补体 *c3* 表达上升，且随着添加肌苷浓度的增加而逐渐上升。具体情况为：相对于不添加肌苷组，加入 0.625mM 肌苷后 *il1b* 下降了 2.988 倍，补体 *c3* 上升了 1.076 倍；加入 1.25mM 肌
10 苷后 *il1b* 下降了 4.506 倍，*c3* 后上升 1.385 了倍；加入 2.5mM 肌苷后 *il1b* 下降了 4.875 倍，*c3* 上升了 1.441 倍；加入 5mM 肌苷后 *il1b* 下降了 7.672 倍，*c3* 上升了 2.060 倍；加入 10mM 肌苷后 *il1b* 下降了 13.803 倍，*c3* 上升了 2.099 倍，相互间具有显著差异。

2.3 外源肌苷对小鼠巨噬细胞 Raw264.7-ASC 的 IL-1 β 因子和补体 C3 的影响

15 参考 2.1 的过程培养 Raw264.7-ASC 细胞，以 1×10^6 /每孔的数量将细胞加入 6 孔板中进行铺板。将铺好的细胞放入培养箱培养 12 小时，加入浓度为 5 mM 的肌苷，对照组加入细胞培养基，每组 4 个重复。再继续培养 12 小时后，用 100ng/ml 的 LPS 刺激 8 小时，加入 10 μ M 的尼日利亚菌素培养 2 小时，收集上清培养液。ELISA 测定上清中的 IL-1 β 因子和补体 C3 的含量，结果参见图 6。

20 由图可见，仅 LPS 刺激细胞，IL-1 β 蛋白的分泌量 2919pg/mL，而添加肌苷再受到 LPS 刺激的细胞，IL-1 β 蛋白的分泌量降低到 1007pg/mL，下降了 2.9 倍。而补体 C3 蛋白的分泌情况正相反。仅 LPS 刺激细胞，补体 C3 分泌量为 8.32 μ g/mL，而添加肌苷再受到 LPS 刺激的细胞，补体 C3 分泌量为 19.9 μ g/ mL，上升了 2.4 倍。相互间具有显著差异。

25 这些结果说明，外源肌苷可使受到 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞 *il1b* 基因表达下降，IL-1 β 蛋白分泌减少，而补体 *c3* 基因表达上升，补体 C3 蛋白分泌增加。
实施例 3 外源肌苷通过与脯氨酸羟化酶结合影响缺氧诱导因子的稳定性来调节 *il1b* 和 *c3* 的表达

现有技术研究发现，LPS 引起的 *il1b* 的升高与缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 有关
30 (Palsson-Mcdermott et al. Cell metabolism.2015, 21(1): 65-80; Sumbayev VV.

FEBS letters.2008, 582(2): 319-326)；脯氨酸羟化酶(PHD)可以降解 HIF-1 α 蛋白，破坏其稳定性(Couvelard et al. Clinical Cancer Research.2008, 14(20): 6634-6639)。肌苷调节 *il1b* 和 *c3* 的表达可能与脯氨酸羟化酶有关，因此，本发明检测了肌苷和脯氨酸羟化酶间的关系，以及 LPS 刺激后细胞中 hif-1 α ，*il1b* 和 *c3* 的表达情况。

3.1 肌苷与脯氨酸羟化酶的相互作用

将 30 μ L DMSO 加入 NT 染料（浓度为 430 μ M）染料中，完全溶解后，用 DMSO 稀释至 30 μ M 后，将纯化的脯氨酸羟化酶 PHD 蛋白（浓度 10 μ M）或者标签蛋白 His tag（阴性对照）与 NT 染料等体积混匀（总体积 200 μ L），室温孵育 30min。然后加入分离柱中，当最后一滴液体从分离柱中流出后，加入 PBS 磷酸盐缓冲液，在柱子底部收集蛋白样品，至 600 μ L 左右即停止收集，然后用 NT. LabelFree 微量热泳动(MST)分子间相互作用分析仪(德国 Nano Temper 公司)检测染料和蛋白结合的丰度来判断蛋白是否结合至染料上。将结合了染料的 PHD 蛋白加到 200 μ L 离心管中，进行梯度稀释。在每个离心管中加入 500 μ M 肌苷，室温孵育 30min，Nano Temper 上机检测，结果参见图 7。

由图可见，阴性对照标签蛋白 His tag 与肌苷不结合，而脯氨酸羟化酶可以与肌苷结合，其结合常数 K_d 值为 15.5mM。

3.2 肌苷对缺氧诱导因子 HIF-1 α 蛋白表达的影响

将铺好的 RAW264.7 细胞放入培养箱培养 12 小时后，加入浓度为 0.6mM、2.5 mM 和 10 mM 的肌苷，对照组加入细胞培养基。再继续培养 12 小时后，用 100ng/ml LPS 刺激 8 小时，分别收集细胞，提取其总蛋白质，进行 SDS-PAGE 电泳。将总蛋白质电转至 PVDF 膜上后，用兔抗缺氧诱导因子 HIF-1 α 抗体（美国 Abcam 生物公司）和鼠抗兔二抗抗体（厦门博生生物有限公司）进行孵育，检测缺氧诱导因子蛋白 HIF-1 α 表达情况，结果参见图 8。

由图可见，随着添加肌苷浓度的增加，缺氧诱导因子 HIF-1 α 蛋白的表达逐渐下降，甚至无法检测到。具体情况如下：RAW264.7 细胞受到 LPS 刺激后，缺氧诱导因子蛋白的表达最高，而添加 0.6 和 2.5 mM 肌苷后，缺氧诱导因子蛋白的表达下降，添加 10 mM 肌苷后，缺氧诱导因子蛋白甚至不表达。

3.3 外源肌苷与脯氨酸羟化酶结合对 *il1b* 和 *c3* 基因表达的影响

(1) 将 Raw264.7 细胞，以 1×10^6 /每孔数量铺板到 6 孔板中，放入细胞培养

箱培养 12 小时。加入 0.005mM、0.05mM 和 0.5mM 的脯氨酸羟化酶抑制剂 DMOG 处理 2 小时后，再加入 5 mM 的肌苷，对照组加入细胞培养基。再继续培养 12 小时后，用 100ng/ml 的 LPS 刺激 8 小时。每组 4 个重复。分别收集细胞，提取总 RNA。荧光定量 PCR 检测 *il1b* 和 *c3* 基因的表达情况，结果见图 9。

5 由图可见，Raw264.7 细胞受到 LPS 刺激后 *il1b* 表达升高，而肌苷抑制了 *il1b* 表达，抑制倍数为 12 倍。Raw264.7 细胞受到 LPS 刺激后，加入脯氨酸羟化酶抑制剂 DMOG，则促进 *il1b* 的表达，最高可达 3.3 倍；而加入抑制剂同时再加入肌苷，则 *il1b* 的表达降低，当脯氨酸羟化酶抑制剂 DMOG 为 0.5mM 时，加入肌苷是未加肌苷的 89%。

10 同时，Raw264.7 细胞受到 LPS 刺激后 *c3* 表达也升高，再加入肌苷使 *il1b* 表达继续增加 1.66 倍。Raw264.7 细胞受到 LPS 刺激后，如加入脯氨酸羟化酶抑制剂 DMOG，则抑制 *c3* 表达；而加入抑制剂同时再加入肌苷，则 *c3* 的表达上调，当脯氨酸羟化酶抑制剂 DMOG 为 0.5mM 时，加入肌苷是未加肌苷的 1.9 倍。

15 (2) 将 Raw264.7-PHD^{-/-}细胞 (PHD 基因缺失细胞) 以 1×10^6 /每孔数量铺板到 6 孔板中，放入细胞培养箱培养 12 小时。加入 5 mM 的肌苷，对照组加入细胞培养基，每组 4 个重复。继续培养 12 小时后，用 100ng/ml 的 LPS 刺激 8 小时，收集细胞，提取每个样品的总 RNA。荧光定量 PCR 检测 *il1b* 和 *c3* 的表达情况，结果参见图 10。

20 由图可见，脯氨酸羟化酶 PHD 缺失后，*il1b* 表达增加，而补体 *c3* 表达下降，而脯氨酸羟化酶 PHD 缺失株添加肌苷后，肌苷对 *il1b* 表达的抑制效果和对补体 *c3* 表达的促进效果均消失。

25 上述结果说明，如果脯氨酸羟化酶 PHD 受到了抑制或者细胞缺少这个酶，那么细胞受到 LPS 刺激后，即使再加入肌苷，由于肌苷与脯氨酸羟化酶 PHD 结合减少，或者无法与脯氨酸羟化酶 PHD 结合，从而不能影响缺氧诱导因子的稳定性，这样就无法抑制 *il1b* 表达和促进 *c3* 表达。也就是说明肌苷首先必须与脯氨酸羟化酶 PHD 结合，才能影响缺氧诱导因子的稳定性，从而实现对 *il1b* 和 *c3* 表达的调节。

实施例 4 肌苷提高鱼类对迟缓爱德华菌感染的抵抗能力

4.1 外源添加肌苷提高鱼类对迟缓爱德华氏菌感染的存活率影响

30 将试验用鱼 (鲫鱼，草鱼和罗非鱼) 在实验室喂养一周，使其适应试验环境

后,各随机分成4组。先采用肌肉注射方式每尾鱼注射体积10 μ L的肌苷(鲫鱼和草鱼剂量分别为25 μ g、50 μ g和100 μ g,罗非鱼剂量分别为10 μ g、20 μ g和40 μ g),每天2次。对照组注射相同体积的生理盐水。3天后,采用肌肉注射迟缓爱德华氏菌(1×10^5 CFU/鲫鱼, 1×10^6 CFU/草鱼, 1×10^5 CFU/罗非鱼)。连续观察15天,统计死亡鱼的数量,并计算存活率,结果统计参见图11。

由图可知,随着肌苷注射量的增加,鲫鱼、草鱼和罗非鱼感染迟缓爱德华氏菌后存活率逐渐增加。具体为:鲫鱼在未注射肌苷的情况下,存活率为40%,注射25 μ g肌苷后存活率为57%,注射50 μ g肌苷后存活率为73%,注射100 μ g肌苷后存活率为77%,存活率提高了17-37%。草鱼在未注射肌苷的情况下,存活率为40%,注射25 μ g肌苷后存活率为43%,注射50 μ g肌苷后存活率为53%,注射100 μ g肌苷后存活率为80%,存活率提高了3-40%。罗非鱼在未注射肌苷的情况下,存活率为60%,注射10 μ g肌苷后存活率为63%,注射20 μ g肌苷后存活率为70%,注射40 μ g肌苷后存活率为77%,存活率提高了3-17%。

4.2 外源肌苷对鱼类感染迟缓爱德华氏菌后的免疫因子影响

将每种鱼各分组2组,迟缓爱德华氏菌感染组,肌苷+迟缓爱德华氏菌感染组。先采用肌肉注射方式每尾鱼注射10 μ L的肌苷(含量分别为50 μ g),对照组注射相同体积的生理盐水。每天2次。对照组注射相同体积的生理盐水。三天后,采用肌肉注射迟缓爱德华氏菌(1×10^4 CFU/鲫鱼, 1×10^5 CFU/草鱼, 1×10^4 CFU/罗非鱼)。6小时后,收集鱼的脾脏样品,每组4个生物学重复,荧光定量PCR检测免疫基因*illb*和*c3*的表达情况。引物如下:鲫鱼:*illb1*(上游atgctgctcaactcat,下游ctggcccttattttgttgag),*illb2*(上游caaagcgatcctcttcattt,下游attcgggtcatcagtttta),*C3*(上游tggggatggatctgaaaca,下游tgcccatgatgaggtacga)。草鱼:*illb*(上游gccatttccaagagtaact,下游aacggattcaaaagtgttatta),*C3*(上游atacatcggtcatcactgaac,下游cccaaaggatattatgaag)。罗非鱼:*illb*(上游aaggcacaacctctatctg,下游tgtcgcgtttgtagaagaga),*c3*(上游atgttacctaacacccaag,下游gctctccatacaggtacgtg),结果数据统计参见图12。

由图可见,肌苷促进*c3*表达,而抑制*illb*表达。具体情况为:相对于单独注射细菌组,草鱼在注射肌苷后*illb*下降了2倍,补体*c3*上升了3倍。鲫鱼在注射肌苷后*illb1*下降了3.2倍,*illb2*下降了5倍,补体*c3*上升了2.5倍。罗非鱼在注射肌苷后*illb*下降了4倍,补体*c3*上升了3.9倍。

这些结果说明，肌苷可提高宿主抗细菌感染在鱼类模型上也是适用的。

上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1、肌苷在制备抗感染药物中的应用。

2、根据权利要求 1 所述应用，其特征在于，所述肌苷可以与脯氨酸羟化酶结合调节细胞因子。

5 3、根据权利要求 2 所述应用，其特征在于，所述细胞因子为 IL-1 β 因子。

4、根据权利要求 3 所述应用，其特征在于，所述肌苷可以抑制所述 IL-1 β 因子含量增加。

5、根据权利要求 2 所述应用，其特征在于，所述细胞因子为补体 3C。

10 6、根据权利要求 5 所述应用，其特征在于，所述肌苷可以促进所述补体 3C 含量增加。

7、根据权利要求 1~6 任一所述应用，其特征在于，所述抗感染药物可以提高被感染生物的存活率。

15 8、根据权利要求 7 所述应用，其特征在于，所述肌苷包括肌苷，肌苷的可药用的盐和酯，选择性取代的类似物，肌苷立体异构体、几何异构体、水合物、溶剂化物或药学上可接受的盐或前药。

9、一种抗感染药物，其特征在于，含有有效量的肌苷。

10、根据权利要求 9 所述药物，其特征在于，所述药物为口服剂型或注射剂型。

20

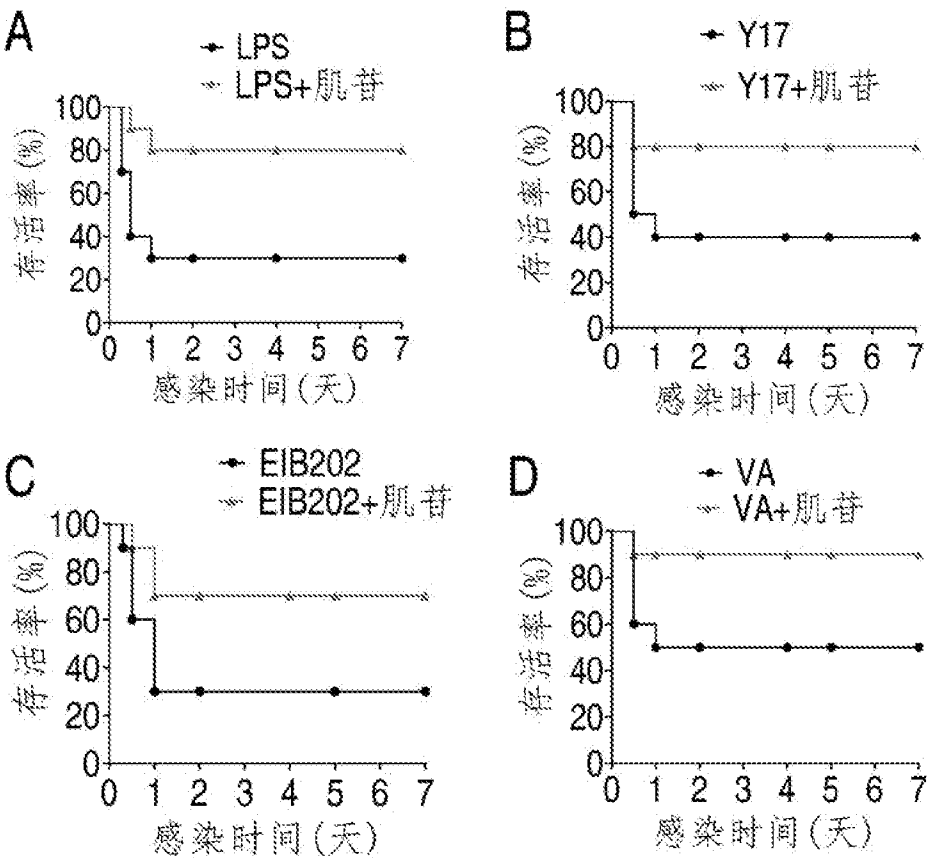


图 1

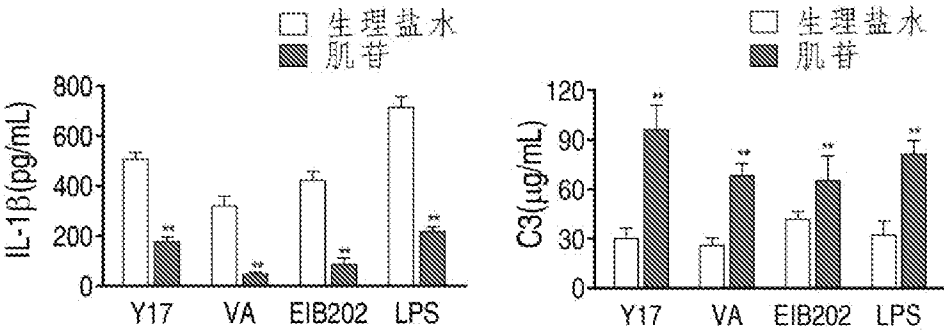


图 2

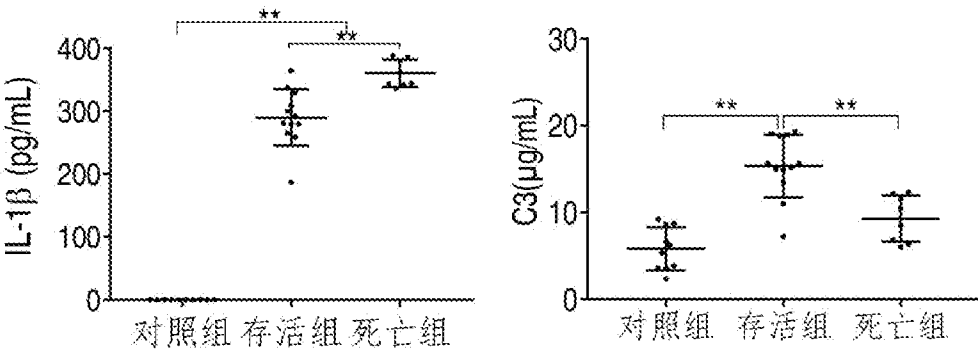


图 3

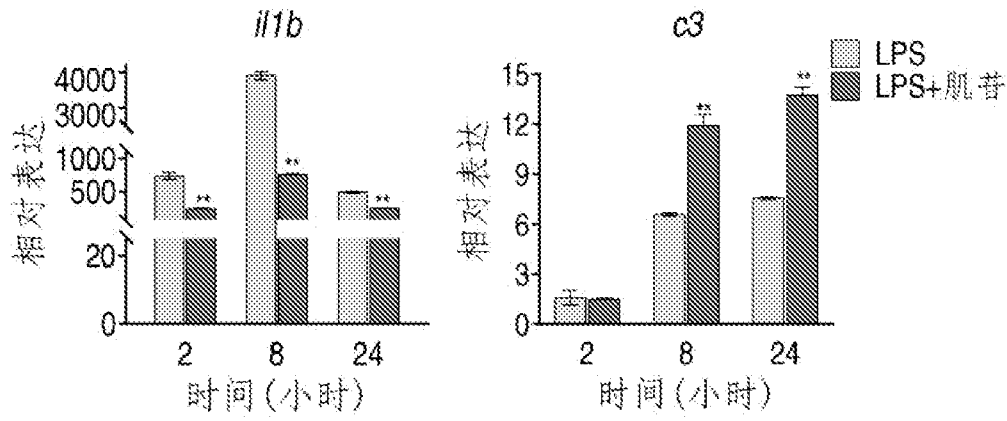


图 4

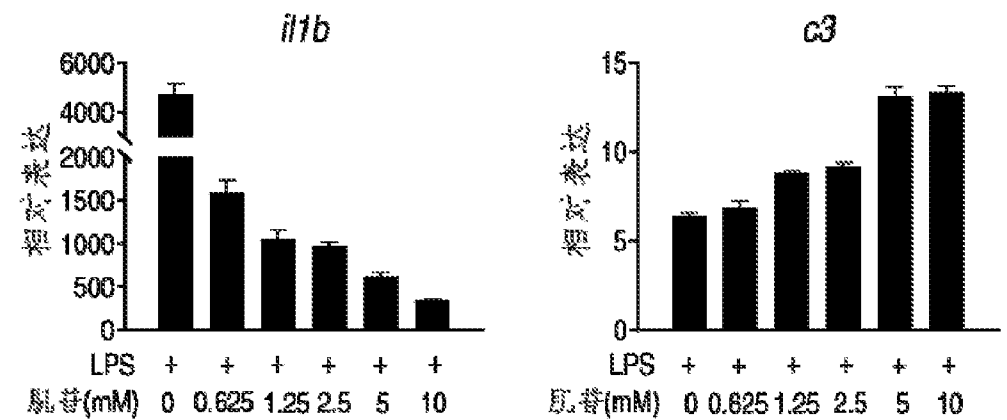


图 5

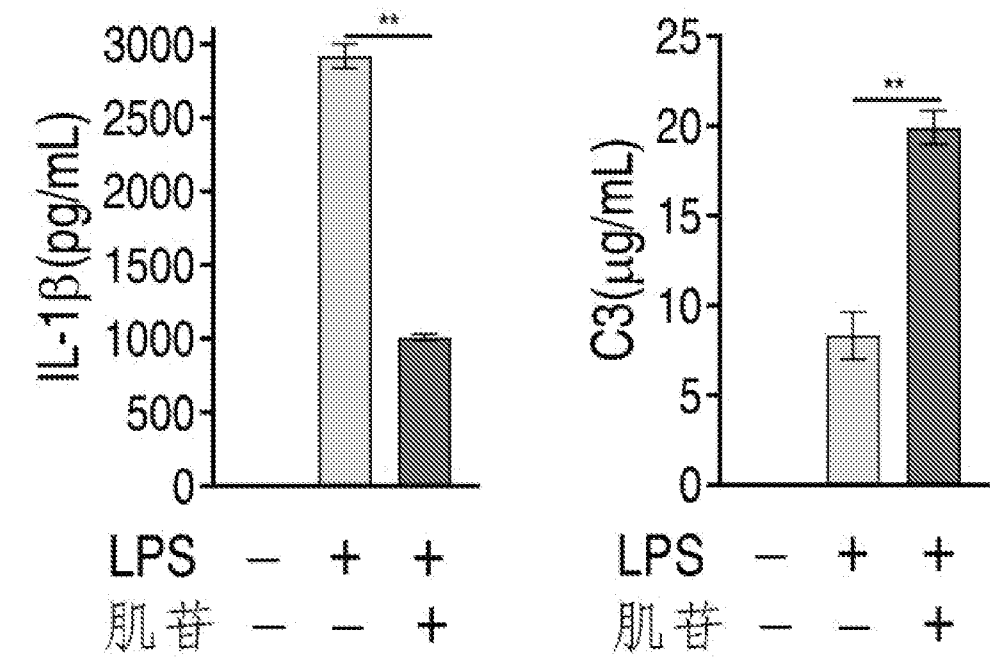


图 6

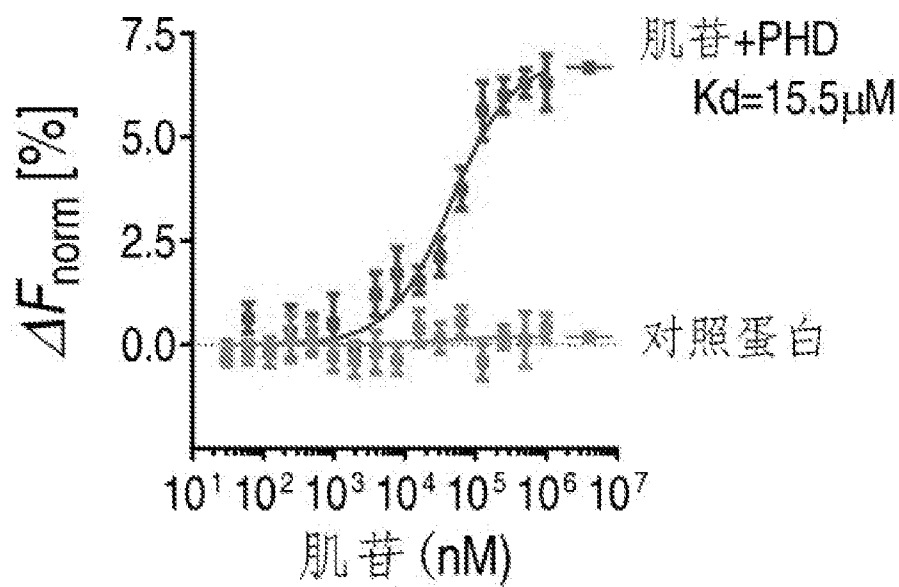


图 7

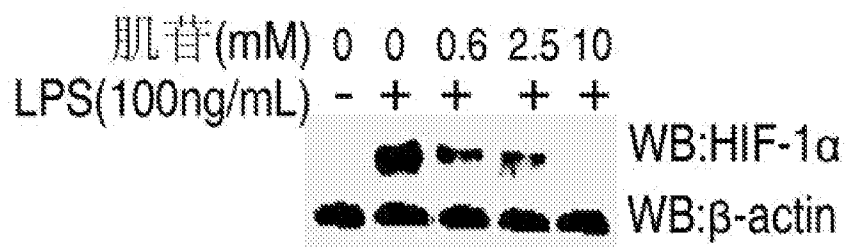


图 8

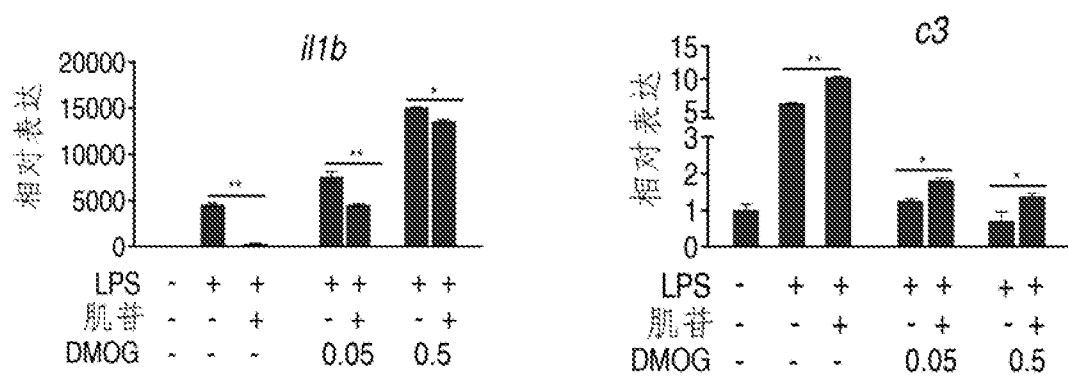


图 9

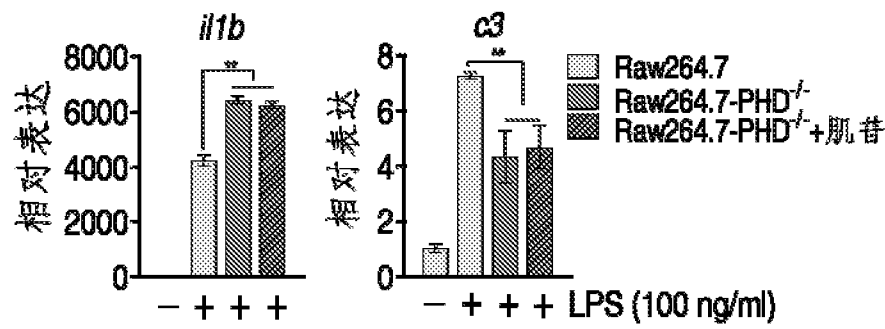


图 10

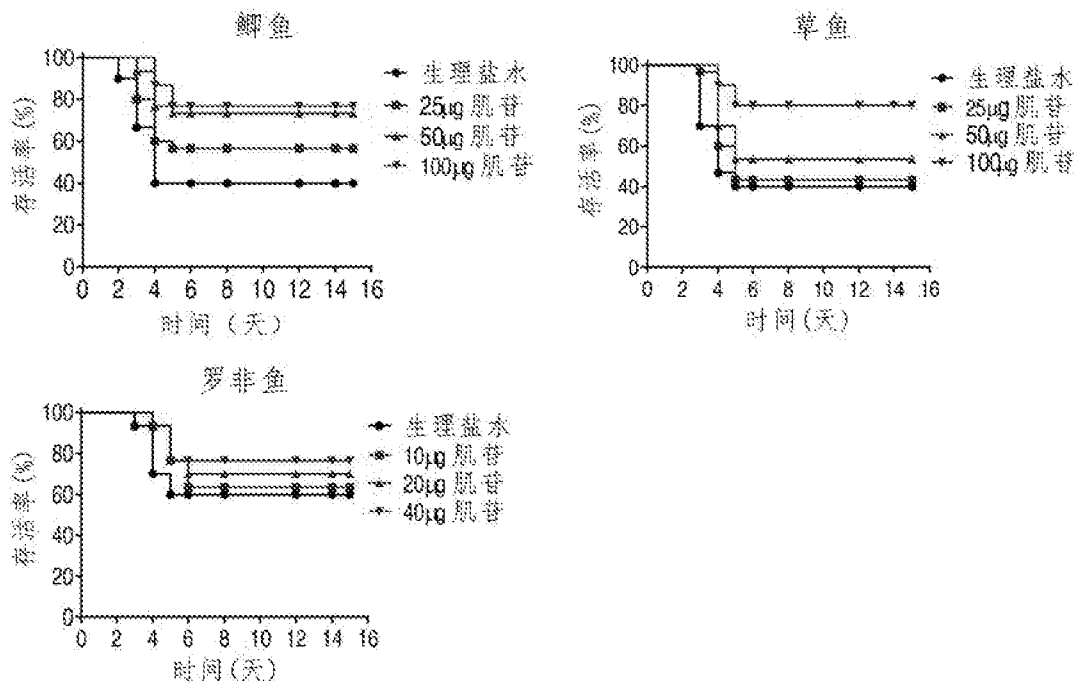


图 11

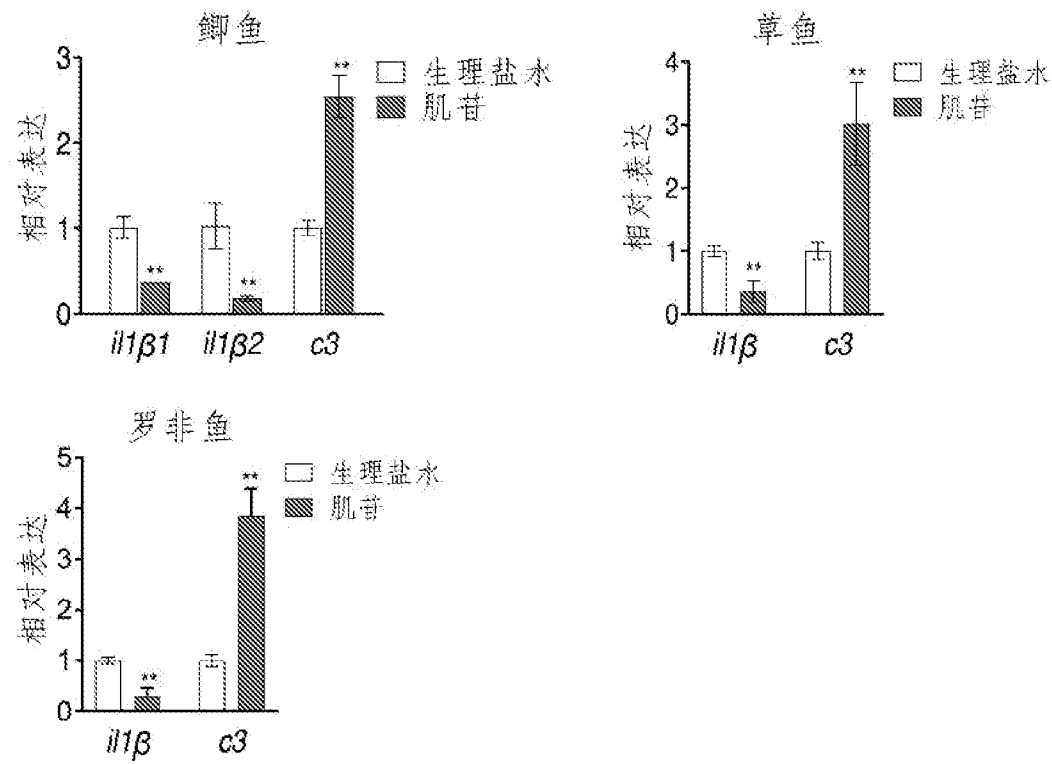


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/077156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7076(2006.01)i; A61P 31/04(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)

VEN; CNABS; CNTXT; CNKI; web of science: 肌苷, 次黄苷, 次黄嘌呤核苷, 细菌, 病毒, 感染, 炎症, 免疫, inosine, inflammatory, bacteria, virus, immun+, cytokine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111904972 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 10 November 2020 (2020-11-10) entire document	1-10
X	US 2002052420 A1 (George Hasko, Csaba Szabo) 02 May 2002 (2002-05-02) description paragraphs 7-10, 62-64	1-10
X	韩保民 (HAN, Baomin). "肌苷的临床药理学研究及应用进展 (Non-official translation: Progress on Clinical Pharmacological Research and Uses of Inosine)" 《中级医刊》 (Chinese Journal of Medicine), Vol. 26, No. 1, 31 January 1991 (1991-01-31), ISSN: 1008-1070, page 47 right-hand column lines 27-33, page 48 left-hand column lines 13-17, right-hand column lines 1-3	1-10
X	余传隆 等 (YU, Chuanlong et al.). "肌苷 (Inosine)" 《中国临床药物大辞典》 (Non-official translation: Chinese Dictionary of Clinical Drugs), 31 August 2018 (2018-08-31), page 2088 right-hand column lines 10-15	9-10
X	WO 2018089835 A1 (LA JOLLA INST ALLERGY AND IMMUNOLOGY) 17 May 2018 (2018-05-17) claims 25-26, 30-31, 39	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

10 May 2021

Date of mailing of the international search report

20 May 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/077156

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	György Haskó et al. "Inosine Inhibits Inflammatory Cytokine Production by a Posttranscriptional Mechanism and Protects Against Endotoxin-Induced Shock" <i>The Journal of Immunology</i> , Vol. 164, No. 2, 15 January 2000 (2000-01-15), ISSN: 0022-1767, page 1018, "Discussion"	1-10
X	CN 104606219 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 13 May 2015 (2015-05-13) claim 2	9-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/077156

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111904972	A	10 November 2020	None			
US	2002052420	A1	02 May 2002	None			
WO	2018089835	A1	17 May 2018	US	2019282580	A1	19 September 2019
CN	104606219	A	13 May 2015	CN	104606219	B	05 January 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/077156

A. 主题的分类

A61K 31/7076(2006.01)i; A61P 31/04(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))

VEN; CNABS; CNTXT; CNKI; web of science; 肌苷, 次黄苷, 次黄嘌呤核苷, 细菌, 病毒, 感染, 炎症, 免疫, inosine, inflammatory, bacteria, virus, immun+, cytokine

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
PX	CN 111904972 A (中山大学) 2020年 11月 10日 (2020 - 11 - 10) 全文	1-10
X	US 2002052420 A1 (George Hasko, Csaba Szabo) 2002年 5月 2日 (2002 - 05 - 02) 说明书第7-10、62-64段	1-10
X	韩保民. “肌苷的临床药理学研究及应用进展” 《中级医刊》, 第26卷, 第1期, 1991年 1月 31日 (1991 - 01 - 31), ISSN: 1008-1070, 第47页右栏第27-33行, 第48页左栏第13-17行、右栏第1-3行	1-10
X	余传隆等. “肌苷” 《中国临床药物大辞典》, 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31), 第2088页右栏第10-15行	9-10
X	WO 2018089835 A1 (LA JOLLA INST ALLERGY AND IMMUNOLOGY) 2018年 5月 17日 (2018 - 05 - 17) 权利要求25-26、30-31、39	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

2021年 5月 10日

国际检索报告邮寄日期

2021年 5月 20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

传真号 (86-10)62019451

受权官员

胡嘉蕴

电话号码 62411086

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	György Haskó等. "Inosine Inhibits Inflammatory Cytokine Production by a Posttranscriptional Mechanism and Protects Against Endotoxin-Induced Shock" 《The Journal of Immunology》，第164卷，第2期，2000年 1月 15日 (2000 - 01 - 15)， ISSN: 0022-1767, 第1018页 "Discussion" 项下	1-10
X	CN 104606219 A (中山大学) 2015年 5月 13日 (2015 - 05 - 13) 权利要求2	9-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/077156

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	111904972	A	2020年 11月 10日	无	
US	2002052420	A1	2002年 5月 2日	无	
WO	2018089835	A1	2018年 5月 17日	US 2019282580	A1 2019年 9月 19日
CN	104606219	A	2015年 5月 13日	CN 104606219	B 2018年 1月 5日