

(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
2025 年 6 月 5 日 (05.06.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/112010 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 401/06 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01) **G01N 21/64** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/135725

(22) 国际申请日: 2023 年 11 月 30 日 (30.11.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(72) 发明人: 宋国芬 (SONG, Guofen); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。王怀雨 (WANG, Huaiyu); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。李鹏辉 (LI, Penghui); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (JIAQUAN IP LAW); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西100号富力盈泰广场A栋910 510627 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: AUTOPHAGY REGULATOR, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种自噬调节剂及其制备方法和应用

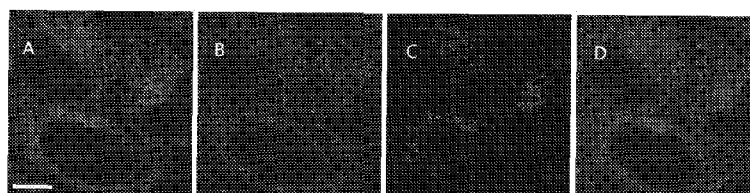


图 1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are an autophagy regulator, a preparation method therefor, and a use thereof. A dual-targeting fluorescent organic small-molecule autophagy activator and autophagy inhibitor and the use thereof aim to solve the problems of single targeting, no cell selectivity, and poor cancer cell killing effects in autophagy regulation within the prior art.

(57) 摘要: 本发明公开了一种自噬调节剂及其制备方法和应用, 本发明的双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂及其应用, 旨在解决现有技术中自噬调节靶向单一且无细胞选择性、杀癌细胞疗效不佳的问题。



WO 2025/112010 A1

一种自噬调节剂及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及探针领域，尤其涉及一种自噬调节剂及其制备方法和应用。

背景技术

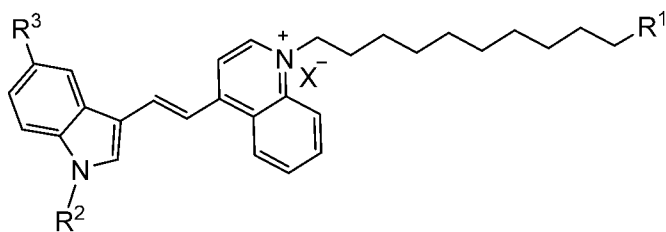
自噬是溶酶体或液泡的自我消化以及细胞内容物的降解和回收，对维持细胞体内平衡和能量平衡至关重要。同时它具有广泛的生物学作用，包括细胞器重塑、蛋白质和细胞器质量控制、抑制肿瘤、消灭病原体、免疫和炎症调节和细胞生存等等。研究表明自噬过程中的功能失常关系着多种疾病，包括癌症、神经退行性疾病、糖尿病、自身免疫病和心血管疾病等。因此，自噬调节对于治疗多种疾病意义重大。目前各种疾病中关于自噬的靶向药物也在进一步的研发之中。

目前已有的自噬调节剂包括雷帕霉素、氯喹等，只能单一地激活自噬或者抑制自噬，并且与靶标结合后不产生荧光，不能进行荧光观测。特别是用于肿瘤治疗时，疗效和肿瘤选择性都有待提高。

发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明提出一种双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂及其应用，旨在解决现有技术中自噬调节靶向单一且无细胞选择性、杀癌细胞疗效不佳的问题。

根据本发明的第一方面实施例的一种自噬调节剂，所述自噬调节剂为具有如式(I)所示结构的化合物，或其药学上可接受的盐：



式 I;

其中，所述 R^1 选自氢或 C1-C4 的烷基的任意一种；所述 R^2 选自氢或 C1-C4 的烷基的任意一种；所述 R^3 选自氢、C1-C4 的烷基、C1-C4 的烷氧基的任意一种；所述 X 选自卤素原子、 BF_4 、 ClO_4 中的任意一种。

根据本发明的一些实施例，所述自噬调节剂为自噬激活剂和自噬抑制剂。

本发明的自噬调节剂的自噬调节的方法为：将样品细胞与所述自噬调节剂混合孵育，破坏所述样品细胞的线粒体，引发线粒体自噬；破坏所述样品细胞的溶酶体，抑制自噬流。

本发明中的自噬调节剂破坏上述样品细胞的线粒体的步骤中，所述线粒体膜电位降低。

本发明中的自噬调节剂破坏上述样品细胞的溶酶体的步骤中，所述溶酶体 pH 升高。

本发明提供的自噬调节剂为一种双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂，与目前已有的自噬调节剂比，本发明所述双靶向的荧光有机小分子的独特之处在于可以同时激活线粒体自噬并破坏溶酶体功能，抑制自噬流，从而杀死癌细胞；亦是一类新型的线粒体/溶酶体荧光探针，与目前已有的线粒体和溶酶体荧光探针相比，可以同时靶向线粒体和溶酶体。并发射红色荧光，成像线粒体和溶酶体形态、数量和分布，同时膜通透性好、复染兼容性好。

本发明所提供的双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂，一方面可作为自噬调节剂激活线粒体自噬并抑制自噬流，从而可作为抗癌药物杀癌细胞；另一方面可作为荧光探针进行标记细胞中线粒体和溶酶体的形态、数量和分布，能够为线粒体和溶酶体相关的生理和病理学研究以及临床诊断提供简捷、直观的生物检测试剂，应用广泛，作用效果佳。

根据本发明的一些实施例，所述卤素原子选自碘、溴和氯中的任意一种。

根据本发明的一些实施例，所述 R^1 中，所述 C1-C4 的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任意一种。

根据本发明的一些实施例，所述 R^2 中，所述 C1-C4 的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任意一种。

根据本发明的一些实施例，所述 R^3 中，所述 C1-C4 的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任意一种。

根据本发明的一些实施例，所述 C1-C4 的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的任意一种。

根据本发明的一些实施例，所述自噬调节剂包括(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐。

本发明中， R^1 选自乙基， R^2 选自氢，所述 R^3 选自甲氧基，所述 X 选自碘时，得到的所述不依赖线粒体膜电位的自噬调节剂为(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐。

根据本发明的第二方面实施例的一种所述的自噬调节剂的制备方法，所述制备方法包括如下步骤：

S1.将 4-甲基喹啉（式 II）与卤代长链烷（式 III）置于溶剂中，回流反应生成 1-长链烷基-4-甲基喹啉盐（式 IV）；

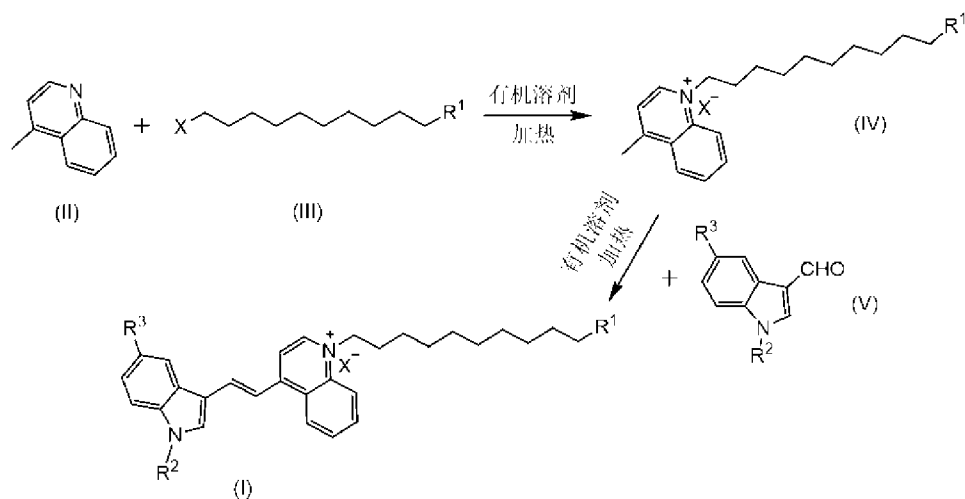
S2.将 1-长链烷基-4-甲基喹啉盐、吲哚-3-甲醛（式 V）和催化剂混合、回流反应后除杂；所述催化剂包括哌啶。

根据本发明的一些实施例，所述溶剂包括乙醇。

根据本发明的一些实施例，所述吲哚-3-甲醛与 4-甲基喹啉的摩尔比为 1：（1.0~2.0）。

根据本发明的一些实施例，步骤 S1 中，所述回流反应的时间为 3~4 天。

根据本发明的一些实施例，步骤 S2 中，所述回流反应的时间为 1~2 天。



根据本发明的一些优选地实施例，所述吲哚-3-甲醛选自 5-甲氧基-3-甲酰基吲哚；所述卤代烷选自碘十二烷，以 5-甲氧基-3-甲酰基吲哚、碘十二烷作为反应物，自噬调节剂的制备方法如下：

S01.配制 4-甲基喹啉和碘十二烷的乙醇混合溶液；

S02.加热搅拌回流反应三天；

S03.加入 5-甲氧基-3-甲酰基吲哚的乙醇溶液；

S04.在乙醇混合溶液中加入催化剂哌啶，将加了哌啶的乙醇混合溶液于 85℃ 加热回流搅拌反应一天，缓慢冷却至室温，得到墨绿色晶体或者待提纯有机固体产物；

S05.将待提纯有机固体产物进行柱层析色谱提纯，淋洗剂使用二氯甲烷/甲醇，干燥得到墨绿色晶体和墨红色粉末，墨绿色晶体和墨红色粉末为双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂，双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂为 (E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吲哚-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐。

根据本发明的第三方面实施例的一种自噬调节剂在制备应用于细胞自噬调节的相关生命

活动产品中的应用。

本发明中，所述双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂用于非诊断和治疗方法的进行细胞自噬调节，本申请双靶向的荧光有机小分子，能够靶向细胞的线粒体和溶酶体，线粒体膜电位下降甚至丧失，引起线粒体自噬，产生了大量自噬小体泡；同时溶酶体 pH 上升，不能与自噬小体融合形成自噬溶酶体，抑制自噬流的完成，实现自噬的双重调节。

根据本发明的第四方面实施例的一种自噬调节剂在制备应用于靶向线粒体或靶向溶酶体的产品中的应用。

根据本发明的第五方面实施例的自噬调节剂在制备应用于线粒体成像或溶酶体成像的产品中的应用。

本发明中自噬调节剂进行线粒体/溶酶体荧光成像的方法包括：将样品细胞与自噬调节剂混合孵育，自噬调节剂与所述样品细胞的线粒体和溶酶体结合，荧光强度增强，实现线粒体和溶酶体的荧光成像。

本发明提供的一种双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂进行线粒体/溶酶体荧光成像的应用，与已有的线粒体和溶酶体荧光探针相比，双靶向的荧光有机小分子能够同时靶向细胞线粒体和溶酶体，与线粒体和溶酶体结合以后，荧光大大增强，实现了同时荧光成像线粒体和溶酶体的应用。

本发明中的所述双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂用于非诊断和治疗目的的线粒体/溶酶体荧光成像，本申请双靶向的荧光有机小分子本身不发荧光，与线粒体和溶酶体结合以后，荧光大大增强，实现了同时荧光成像线粒体和溶酶体的应用。

根据本发明的第六方面实施例的一种治疗肿瘤的药物，所述药物包括细胞自噬调节类药物，所述细胞自噬调节类药物包括所述的自噬调节剂。

根据本发明的一些实施例，所述肿瘤包括白蛋白受体过表达的肿瘤。

根据本发明的一些实施例，所述白蛋白受体过表达的肿瘤包括宫颈癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、胰腺癌和肝癌等。

根据本发明的一些实施例，所述药物包括可注射组合物或用于口服的组合物。

根据本发明的一些实施例，所述组合物包括双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂和药学上可接受的其他载体，其中，载体包括但不限于各种药物辅料。

本发明中自噬调节剂进行杀癌细胞的方法包括：将样品细胞与自噬调节剂混合孵育，激活线粒体自噬，抑制溶酶体功能和自噬，诱导所述样品细胞死亡。

本发明中的自噬调节剂与已有的自噬调节剂相比，双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼

自噬抑制剂具有双靶向作用，能够同时靶向细胞线粒体和溶酶体，激活线粒体自噬和抑制溶酶体功能，最终导致细胞死亡，可利用此双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂杀癌细胞，实现了双靶向的荧光有机小分子自噬激活兼自噬抑制剂作为自噬调节和杀癌细胞的应用。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图1是本申请实施例3提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐与线粒体绿色荧光探针(MitoTracker Green)、溶酶体深红色荧光探针(LysoBrite NIR)对HeLa细胞的共染色荧光显微照片。

图2是本申请实施例4提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对HeLa细胞处理后的罗丹明123染色的荧光显微照片。

图3是本申请实施例5提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对HeLa细胞处理后的溶酶体绿色荧光探针(Lysosensor Green DND-189)染色的荧光显微照片。

图4是本申请实施例6提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对HeLa细胞处理后的5-氯甲基荧光素二乙酸酯(绿色活细胞示踪探针CellTracker™ Green CMFDA)染色的荧光显微照片。

图5是本申请测试例6提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐和CCCP分别对HeLa细胞处理后的线粒体和溶酶体的染色荧光显微照片。

图6是本申请测试例7提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对HeLa细胞分别在37℃和4℃下孵化后的荧光显微照片。

图7是本申请测试例8提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对正常细胞球HEK293和癌细胞球HeLa孵化前后的显微照片。

图8是本申请测试例9提供的(*E*)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐与白蛋白作用的荧光光谱与双对数拟合曲线。

具体实施方式

为了使本申请要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合实施例，对本申请进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本申请，并不用于限定本申请。

本申请中，术语“和/或”，描述关联对象的关联关系，表示可以存在三种关系，例如，A 和/或 B，可以表示：单独存在 A，同时存在 A 和 B，单独存在 B 的情况。其中 A，B 可以是单数或者复数。字符“/”一般表示前后关联对象是一种“或”的关系。

本申请中，“至少一个”是指一个或者多个，“多个”是指两个或两个以上。“以下至少一项(个)”或其类似表达，是指的这些项中的任意组合，包括单项(个)或复数项(个)的任意组合。例如，“a，b，或 c 中的至少一项(个)”，或，“a，b，和 c 中的至少一项(个)”，均可以表示：a，b，c，a-b(即 a 和 b)，a-c，b-c，或 a-b-c，其中 a，b，c 分别可以是单个，也可以是多个。

应理解，在本申请的各种实施例中，上述各过程的序号的大小并不意味着执行顺序的先后，部分或全部步骤可以并行执行或先后执行，各过程的执行顺序应以其功能和内在逻辑确定，而不对本申请实施例的实施过程构成任何限定。

在本申请实施例中使用的术语是仅仅出于描述特定实施例的目的，而非旨在限制本申请。在本申请实施例和所附权利要求书中所使用的单数形式的“一种”、“所述”和“该”也旨在包括多数形式，除非上下文清楚地表示其他含义。

本申请实施例说明书中所提到的相关成分的重量不仅仅可以指代各组分的具体含量，也可以表示各组分间重量的比例关系，因此，只要是按照本申请实施例说明书相关组分的含量按比例放大或缩小均在本申请实施例说明书公开的范围之内。具体地，本申请实施例说明书中所述的质量可以是 μg 、 mg 、 g 、 kg 等化工领域公知的质量单位。

实施例 1

本实施例提供了一种(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐的合成：

首先将 200 μL 4-甲基喹啉和 393 μL 碘十二烷溶于 10mL 乙醇，85 $^{\circ}\text{C}$ 加热搅拌回流反应三天；接着加入含有 0.263g 5-甲氧基-3-甲酰基吡啶的乙醇溶液，搅拌均匀后加 5 滴吡啶，溶液逐渐变红色；85 $^{\circ}\text{C}$ 回流反应一天后，缓慢冷却，过滤，少量异丙醇洗涤，得墨绿色晶粒或墨红色粉末，或者蒸出多余溶剂，冷却，产物用二氯甲烷/甲醇作淋洗剂柱层析色谱提纯，得墨绿色晶体和墨红色粉末，产率约 27%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 12.11 (s, 1H), 9.12 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 8.97 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.63 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 8.44 (m, 3H), 8.18 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.99 (m, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.42 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.90 (dd, $J=4.0$, 8.0 Hz, 1H), 4.85 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.91 (m, 2H), 1.37 (m, 2H),

1.21 (m, 16H), 0.83 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 155.71, 154.17, 146.15, 139.13, 138.31, 135.12, 132.60, 132.44, 128.80, 127.28, 126.96, 126.15, 119.29, 115.08, 113.87, 113.81, 112.95, 112.80, 102.69, 56.18, 56.07, 31.76, 29.66, 29.47, 29.36, 29.33, 29.18, 28.98, 26.27, 22.57, 14.43. HRMS: calculated 469.32, found 469.32.

为了拓展更多具有类似功能的化合物, 本发明中保持分子母核骨架不变, R^3 还可选自氢、C1-C4 的烷基、C1-C4 的烷氧基的任意一种, R^2 选自氢或 C1-C4 的烷基的任意一种。据发明人研究, 本发明中的自噬调节剂的功能由共轭有机阳离子基团所决定, 与阴离子 X^- 无关; R^2 选自氢或 C1-C4 的烷基的任意一种; R^3 选自氢、C1-C4 的烷基、C1-C4 的烷氧基的任意一种, 在这个范围内的改变不影响分子的功能; 但是 R^1 相连的碳链长度对分子的靶向性和蛋白结合作用影响较大, 例如吲哚辛烷基喹啉盐与白蛋白结合作用弱, 仍以自由扩散方式进入细胞, 随着喹啉碳链的增加 (由癸烷基到十四烷基), 与白蛋白的结合作用增强, 以主动运输的方式进入细胞。

测试例 1

HeLa 和 HEK293 细胞和细胞球的培养:

将癌细胞 HeLa 和正常细胞 HEK293 使用完全培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基), 在 37°C 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3 天传代 1 次。

待细胞生长到对数期, 转移到共聚焦皿培养: 将 T25 细胞培养瓶中长满的细胞先用 PBS 洗, 再用 1 mL 胰酶消化 1~2 分钟 (HeLa 使用 0.25 % 胰酶, HEK293 使用 0.025 % 胰酶), 去除胰酶, 加入新鲜培养基吹打均匀并细胞计数, 以培养基的添加量控制细胞密度, (1) 接种至共聚焦玻底培养皿中, 放入 5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞生长至覆盖率约为 70% 用于细胞成像实验; (2) 接种到低吸附 U 底 96 孔板中培养, 待细胞球直径至 $\sim 800\ \mu\text{m}$ 用于药物抗肿瘤评估。

测试例 2

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吲哚-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对 HeLa 细胞的染色观察

将测试例 1 制备的长满 HeLa 细胞的爬片用 PBS 洗两遍后, 然后进行以下染色步骤: (1) 用 $0.5\ \mu\text{M}$ 商业线粒体绿色荧光探针 (MitoTracker Green) 溶液孵化 30 min, PBS 清洗; (2) 用 $0.5\ \mu\text{M}$ 商业溶酶体近红外荧光探针 (LysoBrite NIR) 溶液孵化 30 min, PBS 清洗; (3) 用 $2\ \mu\text{M}$ (E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吲哚-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐荧光探针溶液孵化 30 min, DMEM 清洗。将染色后的细胞样品使用共聚焦荧光显微镜进行多通道荧光共定位观察。

结果如图 1 所示, 图 1 (A) 为实施例 1 所合成分子的红色荧光图, 图 1 (B) 为商业线粒体绿色荧光探针的荧光图, 图 1 (C) 为商业溶酶体近红外荧光探针的荧光图, 图 1 (D) 为图 1 (A) 和图 1 (B)、图 1 (C) 的叠加图。图 1 (A) 覆盖了图 1 (B) 与图 1 (C) 两个区域, 图 1 (A) 和图 1 (B) 与图 1 (C) 的加和重叠得很好, 说明实施例 1 所合成分子的荧光分布于线粒体和溶酶体两个细胞器。此结果证明(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐可用于靶向线粒体和溶酶体, 也可用于线粒体和溶酶体的同时荧光成像。

测试例 3

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对 HeLa 细胞处理前后的线粒体膜电位变化

将测试例 1 制备的分别长满 HeLa 细胞的两组玻底培养皿 PBS 洗后用 5 μM 罗丹明 123 在 CO_2 培养箱中避光孵化 30 min, 再用 PBS 洗, 一组用浓度为 10 μM 的实施例 1 所合成分子的培养基溶液避光孵化 30 min, 另一组置于加同等量 DMSO 的培养基中作空白对照样品。PBS 洗后将孵化后的细胞在激光扫描共聚焦显微镜下观察, 记录两组细胞中罗丹明 123 的荧光亮度变化。

结果分析:

测试例 3 的实验结果见图 2, 图 2 是实施例 1 所合成分子对 HeLa 细胞处理前后的线粒体膜电位探针罗丹明 123 的荧光显微照片, 图 2 (A) 为空白对照样品组细胞的荧光显微照片; 图 2 (B) 为图 2 (A) 对应的明场显微照片; 图 2 (C) 为实施例 1 所合成分子处理过的细胞的罗丹明 123 的荧光显微照片; 图 2 (D) 为图 2 (C) 对应的明场显微照片。从图 2 (A) 和图 2 (C) 中可以得知, 实施例 1 所合成分子处理后的细胞, 罗丹明 123 的荧光大大减弱(图 2 (C)), 表明实施例 1 所合成分子处理后的细胞线粒体膜电位显著降低, 即线粒体受损。

测试例 4

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对 HeLa 细胞处理前后的溶酶体 pH 变化

将测试例 1 制备的分别长满 HeLa 细胞的两组玻底培养皿 PBS 洗后用 2 μM 溶酶体绿色荧光探针 (LysoSensor Green DND-189) 在 CO_2 培养箱中避光孵化 30 min, 再用 PBS 洗, 一组用浓度为 10 μM 的实施例 1 所合成分子的培养基溶液避光孵化 30 min, 另一组置于加同等量 DMSO 的培养基中作空白对照样品。将孵化后的细胞 PBS 洗后置于 DMEM 中, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察记录两组细胞中溶酶体绿色荧光探针的荧光亮度变化。

结果分析:

测试例 4 的实验结果见图 3, 图 3 是实施例 1 所合成分子对 HeLa 细胞处理前后的溶酶体绿色荧光探针 (LysoSensor Green DND-189) 的荧光显微照片, 图 3 (A) 为空白对照样品组细胞的荧光显微照片; 图 3 (B) 为图 3 (A) 对应的明场显微照片; 图 3 (C) 为实施例 1 所合成分子处理过的细胞的溶酶体绿色荧光探针的荧光显微照片; 图 3 (D) 为图 3 (C) 对应的明场显微照片。LysoSensor Green DND-189 荧光会随 pH 的降低而增强, 从图 3 (A) 和图 3 (C) 中可以得知, 实施例 1 所合成分子处理后的细胞, 溶酶体绿色荧光探针的荧光大大减弱 (图 3 (C)), 表明实施例 1 所合成分子处理后的细胞溶酶体 pH 显著升高, 影响自噬流中溶酶体的消化功能。

测试例 5

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对 HeLa 细胞处理前后的自噬泡和自噬体的成像

将测试例 1 制备的分别长满 HeLa 细胞的两组玻底培养皿 PBS 洗后, 一组用浓度为 10 μ M 的实施例 1 所合成分子的培养基溶液避光孵化 90 min, 另一组置于加同等量 DMSO 的培养基中作空白对照样品。随后用 5 μ M 绿色活细胞示踪探针 (Cell-Tracker Green CMFDA) 避光孵化 30 min, 将孵化后的细胞 PBS 洗后置于 DMEM 中, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察记录两组细胞中绿色活细胞示踪探针的荧光分布。

结果分析:

测试例 5 的实验结果见图 4。图 4 是实施例 1 所合成分子对 HeLa 细胞处理前后的绿色活细胞示踪探针 (Cell-Tracker Green CMFDA) 的荧光显微照片, 图 4 (A) 为空白对照样品组细胞的荧光显微照片; 图 4 (B) 为实施例 1 所合成分子处理过的细胞的绿色活细胞示踪探针的荧光显微照片。对比图 4 (A) 和图 4 (B), 实施例 1 所合成分子处理后的细胞, 细胞质中产生大量的空泡 (自噬泡和自噬体), 表明实施例 1 所合成分子能够激活细胞自噬。

测试例 6

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对 HeLa 细胞处理后的线粒体与溶酶体的融合

将测试例 1 制备的分别长满 HeLa 细胞的两组玻底培养皿 PBS 洗后, 先后用 1 μ M 线粒体绿色荧光探针 (MitoTracker Green) 和 1 μ M 溶酶体深红探针 (LysoBrite NIR) 分别避光孵化 30 min; 随后, 一组用 20 μ M CCCP 的 PBS 溶液孵化~5h 作线粒体自噬阳性对照样品, 另一组用浓度为 10 μ M 的实施例 1 所合成分子的培养基溶液避光孵化相同时间。将孵化后的细胞 PBS 洗后置于 DMEM 中, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察记录两组细胞中线粒体绿色荧

光探针和溶酶体深红探针的荧光分布。

结果分析：

测试例 6 的实验结果见图 5。图 5 是实施例 1 所合成分子对 HeLa 细胞处理后的线粒体和溶酶体的荧光显微照片，图 5 (A) 为阳性对照样品组细胞的线粒体荧光显微照片；图 5 (B) 为阳性对照样品组细胞的溶酶体荧光显微照片；图 5 (C) 为图 1 (A) 和图 1 (B) 的叠加图；图 5 (D) 为实施例 1 所合成分子处理后的细胞的线粒体荧光显微照片；图 5 (E) 为实施例 1 所合成分子处理后的细胞的溶酶体荧光显微照片；图 5 (F) 为图 1 (D) 和图 1 (E) 的叠加图。图 5 (A) 和图 5 (B) 的荧光重叠性很好，在线粒体自噬后期线粒体和溶酶体融合；图 5 (D) 和图 5 (E) 的荧光几乎完全不重叠，说明实施例 1 所合成分子处理后的细胞自噬激活以后，在自噬后期线粒体和溶酶体不能融合；对比图 5 (C) 和图 5 (F)，表明实施例 1 所合成分子能够阻止细胞线粒体和溶酶体的融合，抑制自噬流。

测试例 7

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐进入细胞的方式验证

将测试例 1 制备的分别长满 HeLa 细胞的两组玻底培养皿 PBS 洗后，一组用 2 μ M 实施例 1 所合成分子的完全培养基溶液在 37 $^{\circ}$ C 下避光孵化 30min，另一组用 2 μ M 的实施例 1 所合成分子的完全培养基溶液在 4 $^{\circ}$ C 下避光孵化相同时间。将孵化后的细胞 PBS 洗后置于 DMEM 中，使用激光扫描共聚焦显微镜观察记录两组细胞中的红色荧光分布 (EX561nm, EM600-700nm)。

结果分析：

测试例 7 的试验结果见图 6。图 6 (A) 和 6 (B) 为分别在 37 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 下 (E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐孵化处理过的 HeLa 细胞的红色荧光显微照片。对比可以看出，图 6 (A) 的荧光强度显著大于图 6 (B) 的荧光，说明 (E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐进入细胞的方式主要为主动运输。

测试例 8

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐对 HEK293 和 HeLa 细胞球给药后的生长变化

将测试例 1 制备得到的两组 HEK293 细胞球和两组 HeLa 细胞球在显微镜下拍照后，一组 HEK293 和 HeLa 细胞球置于 10 μ M 的实施例 1 所合成分子的完全培养基溶液培养作为实验组，另一组 HEK293 和 HeLa 细胞球置于同等体积 DMSO 的完全培养基溶液培养作为空白对照组，24h 后再使用显微镜拍照，观察细胞球的形貌尺寸变化。

结果分析：

测试例 8 的试验结果见图 7。图 7 (A) 和 7 (B) 为 HEK293 细胞球孵化给药前的明场显微照片；图 7 (C) 和 7 (D) 为 HeLa 细胞球孵化给药前的明场显微照片；图 7 (E) 和 7 (G) 分别为 HEK293 细胞球和 HeLa 细胞球空白对照组 24h 后的明场显微照片；图 7 (F) 和 7 (H) 分别为 HEK293 细胞球和 HeLa 细胞球孵化给药 24h 后的明场显微照片。对比图 7 (A)、7 (B)、7 (E)、7 (F) 可以看出，与空白对照组相比，给药实验组 HEK293 细胞球的尺寸和形状变化不明显，说明 10 μM 实施例 1 所合成分子对正常细胞 HEK293 细胞球的生长抑制不明显；而对比图 7 (C)、7 (D)、7 (G)、7 (H) 可以看出，空白对照组 HeLa 细胞球 24 小时后尺寸明显变大，实验给药组 HeLa 细胞球 24h 后尺寸与空白对照组比要小的多，与用药之前的细胞球相比变小，而且细胞球附近有很多细胞碎片，说明 10 μM 实施例 1 所合成分子对癌细胞 HeLa 细胞球的生长有显著的抑制和破坏效果。结果表明，实施例 1 所合成分子具有显著的选择性杀癌细胞的效果。

测试例 9

(E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-)-乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐与白蛋白的结合常数

向牛血清白蛋白的 PBS 溶液中加入不同浓度的实施例 1 所合成的分子 (0-15 μM)，然后使用荧光光谱仪测得白蛋白的荧光光谱 (280nmEX)。

结果分析：

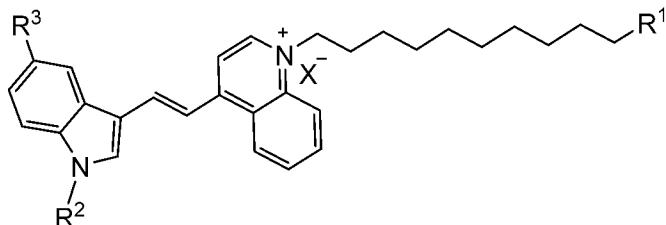
测试例 9 的试验结果见图 8。图 8(A) 为加入不同浓度的实施例 1 所合成的分子 (0-15 μM) 的白蛋白的荧光光谱，图 8 (B) 为根据图 8 (A) 做的荧光强度降低程度与实施例 1 所合成分子浓度的双对数拟合曲线。从图 8 (A) 可以看出，随着加入实施例 1 所合成分子的浓度的增加，白蛋白的荧光峰逐渐降低，根据拟合曲线图 8 (B) 得出实施例 1 所合成的分子与白蛋白的结合常数高达 1.35×10^8 。

综上，本申请提供的一种提供了一种双靶向的荧光有机小分子自噬调节剂及其应用，与已有的自噬激活剂和自噬抑制剂相比，本发明双靶向的荧光有机小分子自噬调节剂可同时靶向线粒体和溶酶体，一方面破坏线粒体激活线粒体自噬，另一方面使溶酶体 pH 碱化，阻止线粒体和溶酶体的融合，抑制自噬流。通过激活自噬并抑制自噬流，实现杀癌细胞的作用。另外，靶向线粒体和溶酶体后荧光大大增强，实现了线粒体和溶酶体的同步荧光可视化。

以上所述仅为本申请的较佳实施例而已，并不用以限制本申请，凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本申请的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种自噬调节剂，其特征在于，所述自噬调节剂为具有如式(I)所示结构的化合物，或其药学上可接受的盐：



式 I;

其中，所述 R^1 选自氢或 C1-C4 的烷基的任意一种；所述 R^2 选自氢或 C1-C4 的烷基的任意一种；所述 R^3 选自氢、C1-C4 的烷基、C1-C4 的烷氧基的任意一种；所述 X 选自卤素原子、 BF_4 、 ClO_4 中的任意一种。

2、根据权利要求 1 所述的自噬调节剂，其特征在于，所述 R^1 中，所述 C1-C4 的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任意一种。

3、根据权利要求 1 所述的自噬调节剂，其特征在于，所述 R^2 中，所述 C1-C4 的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任意一种。

4、根据权利要求 1 所述的自噬调节剂，其特征在于，所述 R^3 中，所述 C1-C4 的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任意一种；所述 C1-C4 的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的任意一种。

5、根据权利要求 1~4 中任一所述的自噬调节剂，其特征在于，所述自噬调节剂包括 (E)-4-(2-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)乙烯基)-1-正十二烷基喹啉碘盐。

6、一种如权利要求 1~5 中任一项所述的自噬调节剂的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括如下步骤：

S1. 将 4-甲基喹啉与卤代长链烷置于溶剂中，回流反应生成 1-长链烷基-4-甲基喹啉盐；

S2. 将 1-长链烷基-4-甲基喹啉盐、吡啶-3-甲醛和催化剂混合、回流反应后除杂；

所述催化剂包括吡啶。

7、一种如权利要求 1~5 中任一项所述自噬调节剂在制备应用于细胞自噬调节的相关生命活动产品中的应用。

8、一种如权利要求 1~5 中任一项所述自噬调节剂在制备应用于靶向线粒体或靶向溶酶体的产品中的应用。

9、一种如权利要求 1~5 中任一项所述自噬调节剂在制备应用于线粒体成像或溶酶体成像的产品中的应用。

10、一种治疗肿瘤的药物，其特征在于，药物包括细胞自噬调节类药物，所述细胞自噬调节类药物包括如权利要求 1~4 中任一项所述的自噬调节剂。

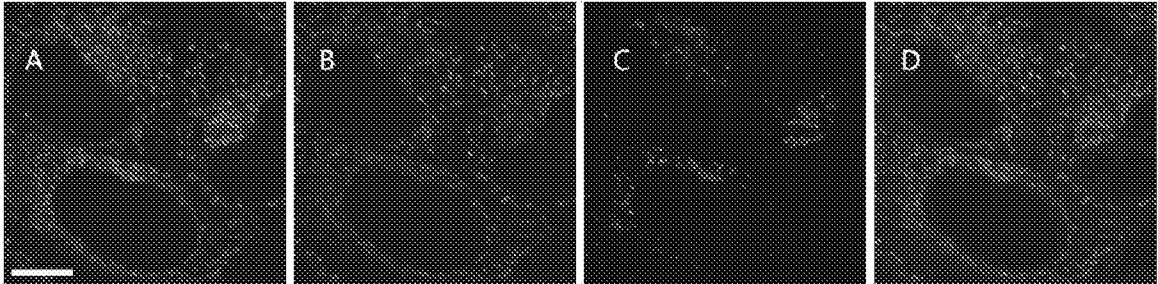


图 1

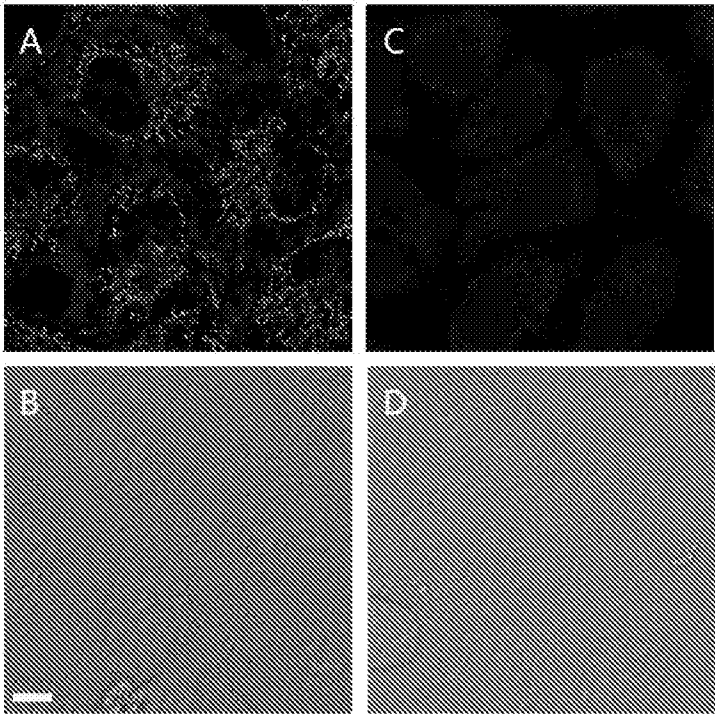


图 2

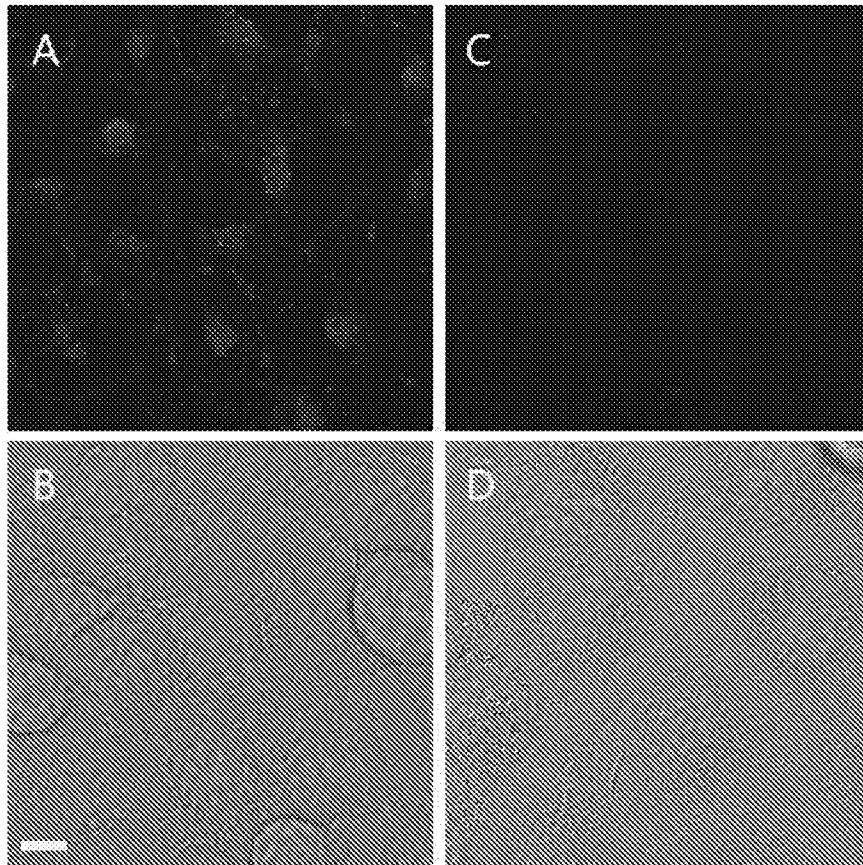


图 3

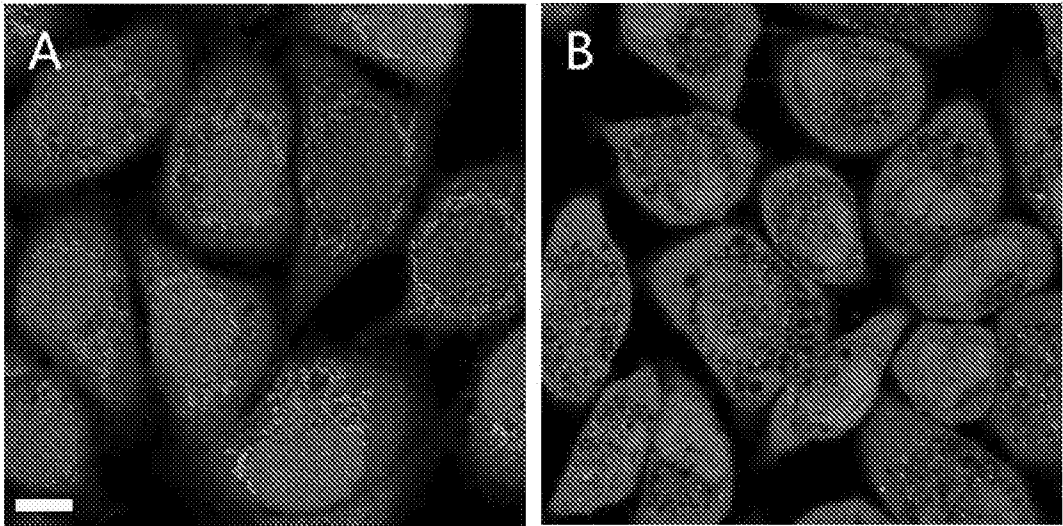


图 4

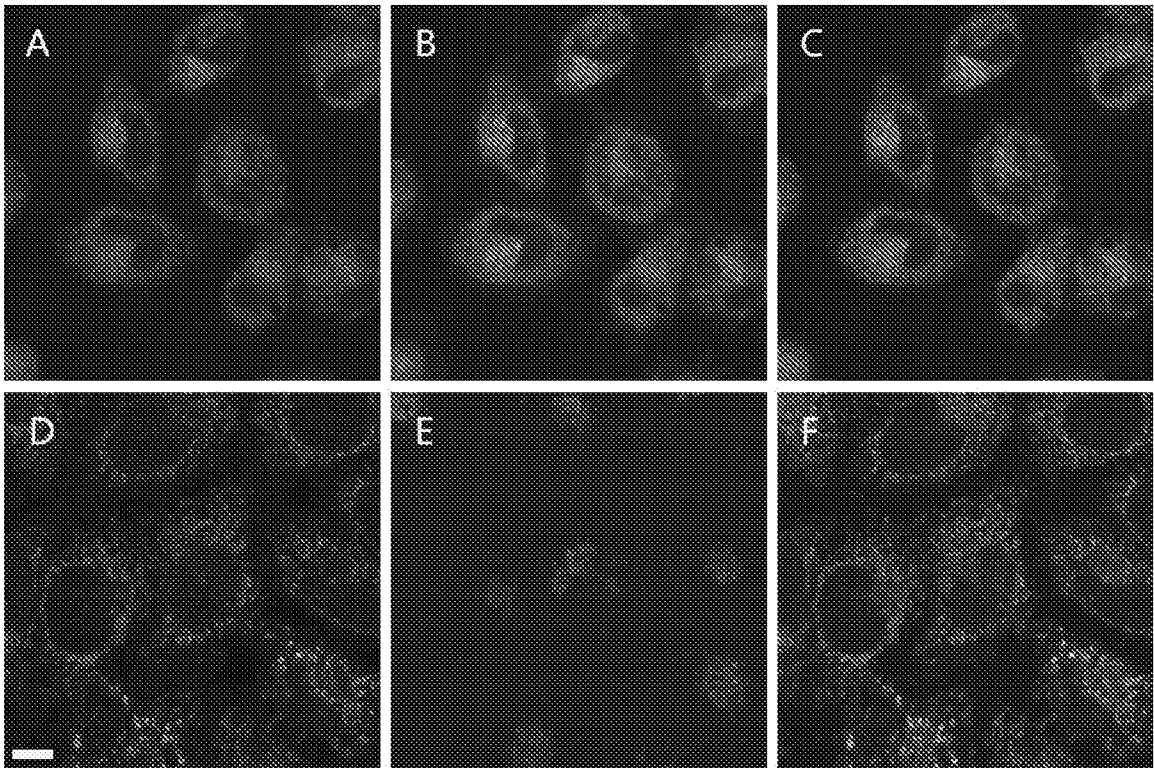


图 5

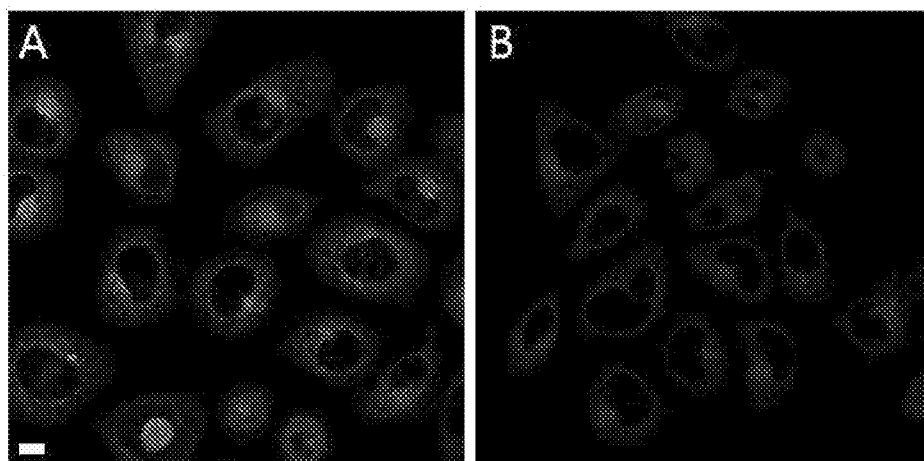


图 6

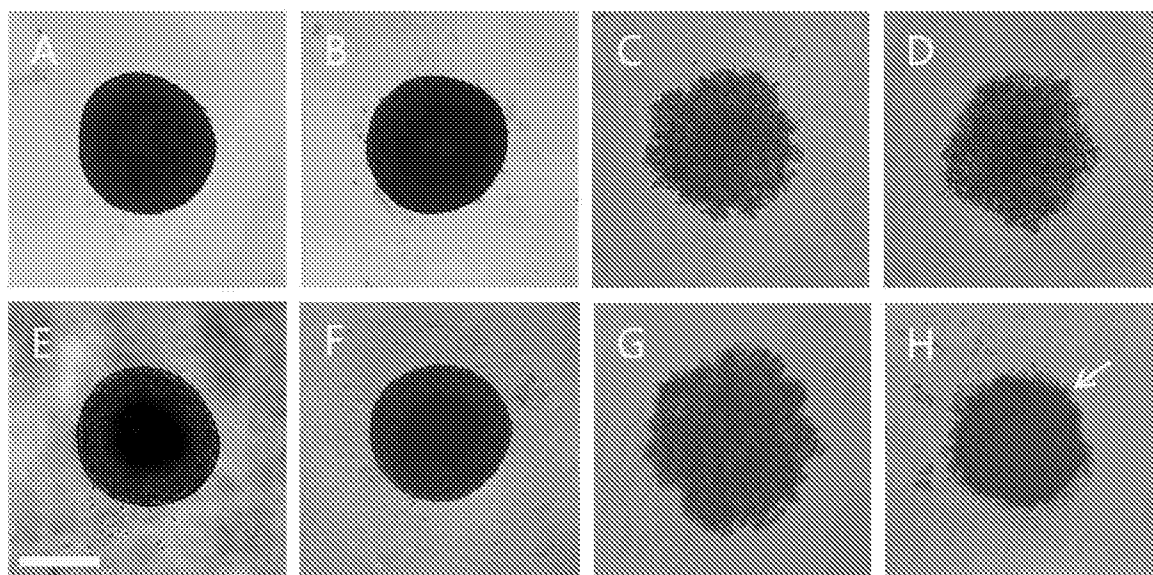


图 7

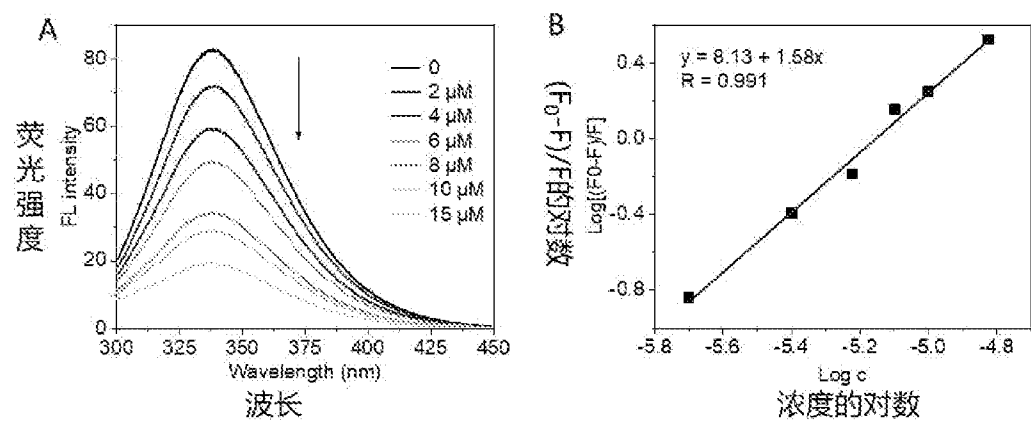


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/135725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D401/06(2006.01)i; A61K31/4709(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; G01N21/64(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)

IPC: C07D A61K A61P G01N

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)

CNTXT, CNKI, ENTXT, ISI, CAPLUS (STN), REGISTRY (STN): 深圳先进技术研究院, 宋国芬, 王怀雨, 李鹏辉, 自噬, 线粒体, 瘤, 癌, structural formula search, autophagy, mitochondria, tumor, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SONG, Guofen et al. "Mitochondria/RNA Cascade-Targeted and Fluorescence-Switchable Photosensitizer for Photodynamic Therapy Augmentation and Real-Time Efficacy Self-Monitoring" <i>Sensors and Actuators: B. Chemical</i> , Vol. 369, 20 June 2022 (2022-06-20), page 132260	1-10
X	CN 112402608 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 26 February 2021 (2021-02-26) description, paragraphs 5-63, and embodiments 1-13	1-10
A	CN 106833623 A (GUANGDONG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 13 June 2017 (2017-06-13) description, paragraphs 6-84, and embodiments 1-17	1-10
A	US 2020378979 A1 (UNIVERSITY OF GUELPH) 03 December 2020 (2020-12-03) description, paragraphs 8-103, and embodiments 1-4	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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

18 July 2024

Date of mailing of the international search report

25 July 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/135725

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LU, Yujing et al. "Selective Visualization of DNA G-Quadruplex Structures in Live Cells with 1-Methylquinolinium-Based Molecular Probes: The Importance of Indolyl Moiety Position Towards Specificity" <i>Dyes and Pigments</i> , Vol. 143, 20 April 2017 (2017-04-20), pages 331-341	1-10
A	KRIEG, R. et al. "N,N-dialkylaminostyryl Dyes: Specific and Highly Fluorescent Substrates of Peroxidase and Their Application in Histochemistry" <i>Journal of Molecular Histology</i> , Vol. 39, No. 2, 29 November 2007 (2007-11-29), pages 169-191	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/135725

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112402608	A	26 February 2021	CN	112402608	B	07 September 2021
				WO	2021110094	A1	10 June 2021
				US	2022143184	A1	12 May 2022
				CN	111116550	A	08 May 2020
				CN	111116550	B	23 April 2021
				WO	2021109862	A1	10 June 2021
CN	106833623	A	13 June 2017	CN	106833623	B	06 August 2019
US	2020378979	A1	03 December 2020	US	11215619	B2	04 January 2022
				CA	3063152	A1	30 November 2020

A. 主题的分类

C07D401/06(2006.01)i; A61K31/4709(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; G01N21/64(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)

IPC: C07D A61K A61P G01N

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))

CNTEXT,CNKI,ENTXT,ISI,CAPLUS(STN),REGISTRY(STN); 深圳先进技术研究院, 宋国芬, 王怀雨, 李鹏辉, 自噬, 线粒体, 瘤, 癌, 结构式检索, autophagy, mitochondria, tumor, cancer

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	SONG, Guofen等. "Mitochondria/RNA cascade-targeted and fluorescence-switchable photosensitizer for photodynamic therapy augmentation and real-time efficacy self-monitoring" Sensors and Actuators: B. Chemical, 第369卷, 2022年6月20日 (2022 - 06 - 20), 第132260页	1-10
X	CN 112402608 A (深圳先进技术研究院) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 说明书第5-63段、实施例1-13	1-10
A	CN 106833623 A (广东工业大学) 2017年6月13日 (2017 - 06 - 13) 说明书第6-84段、实施例1-17	1-10
A	US 2020378979 A1 (UNIVERSITY OF GUELPH) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 说明书第8-103段、实施例1-4	1-10
A	LU, Yujing等. "Selective visualization of DNA G-quadruplex structures in live cells with 1-methylquinolinium-based molecular probes: The importance of indolyl moiety position towards specificity" Dyes and Pigments, 第143卷, 2017年4月20日 (2017 - 04 - 20), 第331-341页	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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2024年7月18日

国际检索报告邮寄日期

2024年7月25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

彭英桂

电话号码 (+86) 010-53962150

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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	KRIEG, R.等. "N,N-dialkylaminostyryl dyes: Specific and highly fluorescent substrates of pe- roxidase and their application in histochemistry" Journal of Molecular Histology, 第39卷, 第2期, 2007年11月29日 (2007 - 11 - 29), 第169-191页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/135725

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	112402608	A	2021年2月26日	CN	112402608	B	2021年9月7日
				WO	2021110094	A1	2021年6月10日
				US	2022143184	A1	2022年5月12日
				CN	111116550	A	2020年5月8日
				CN	111116550	B	2021年4月23日
				WO	2021109862	A1	2021年6月10日
CN	106833623	A	2017年6月13日	CN	106833623	B	2019年8月6日
US	2020378979	A1	2020年12月3日	US	11215619	B2	2022年1月4日
				CA	3063152	A1	2020年11月30日