

(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
2018年11月29日 (29.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/214813 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/122 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/087449

(22) 国际申请日: 2018年5月18日 (18.05.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710364918.8 2017年5月22日 (22.05.2017) CN

(71) 申请人: 苏州偶领生物医药有限公司 (SUZHOU AUTOPHARM BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 罗成 (LUO, Cheng); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。姚志艺 (YAO, Zhiyi); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。谢雨礼 (XIE, Yuli); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。万伟 (WAN, Wei); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。乐立艳 (YUE,

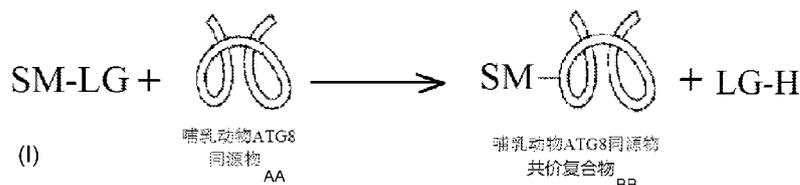
Liyan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。张元元 (ZHANG, Yuanyuan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。蒋华良 (JIANG, Hualiang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。陈凯先 (CHEN, Kaixian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D栋10楼, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京金信知识产权代理有限公司 (KINGSOUND & PARTNERS); 中国北京市海淀区紫竹院路116号嘉豪国际中心B座11层, Beijing 100097 (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, 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。

(54) Title: METHOD FOR COVALENT BOND MODIFYING MAMMALIAN ATG8 HOMOLOGUE

(54) 发明名称: 一种共价键修饰哺乳动物ATG8同源物的方法



AA Mammalian ATG8 homologue
BB Mammalian ATG8 homologue covalent complex

(57) Abstract: Provided is a method for covalently modifying a mammalian ATG8 homologue, comprising providing a compound SM-LG, wherein the compound SM-LG comprises a part SM- capable of regulating the mammalian ATG8 homologue and a leaving part -LG. The compound SM-LG reacts with the mammalian ATG8 homologue to produce a mammalian ATG8 homologue covalent complex. Also provided are a mammalian ATG8 homologue covalent complex obtained by the method and a use thereof.

(57) 摘要: 提供一种共价修饰哺乳动物ATG8同源物的方法 (I), 包括: 提供一个化合物SM-LG, 所述化合物SM-LG包括具有调节哺乳动物ATG8同源物的功能的部分SM-和离去部分-LG; 所述化合物SM-LG与哺乳动物ATG8同源物反应产生哺乳动物ATG8同源物共价复合物。还提供由该方法得到的哺乳动物ATG8同源共价复合物及其用途。

(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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))

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))。

一种共价键修饰哺乳动物 ATG8 同源物的方法

技术领域

本发明涉及哺乳动物 ATG8 同源物的调节方法，具体涉及一种共价键修饰哺乳动物 ATG8 同源物的方法，由该方法得到的哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物及其用途。

5 背景技术

细胞自噬是一种细胞内降解的通路，是将细胞内受损或失去功能的蛋白质以及细胞器运输至溶酶体，并进行消化和降解的过程。在生物进化中，细胞自噬是一种保守的过程，从酵母到植物细胞再到哺乳动物，都存在这样的过程。

10 现有的研究表明，细胞自噬在维持生理功能如饥饿时提供营养、清除细胞内容物、抗原呈递等方面起着重要的作用，并在癌症、感染性疾病、神经退行性疾病等扮演着重要的角色。

细胞自噬在肿瘤的发生发展中起到双刃剑的作用：在肿瘤发生早期，自噬缺陷会增加基因组的不稳定性，促进癌变过程；肿瘤快速生长和转移阶段，自噬可以抵抗应激条件抑制失巢凋亡，维持肿瘤细胞生存。虽然自噬与肿瘤之间的关系在肿瘤发生发展的不同阶段不同，针对进展晚期以及化疗耐药的癌症，细胞自噬调节剂的开发将有重大的价值。

15 目前共有 30 余项临床试验，单独使用羟氯喹、氯喹或与其他抗肿瘤药物联用评价细胞自噬的抑制对难治性、复发性为主的实体瘤的治疗效果，相关结果可在 clinicaltrials.gov 官网查询。不过，由于缺乏明确的分子靶标，抗溶酶体抑制剂的副作用以及化学空间改造的方向不明会严重限制该类细胞自噬抑制剂的进一步发展。

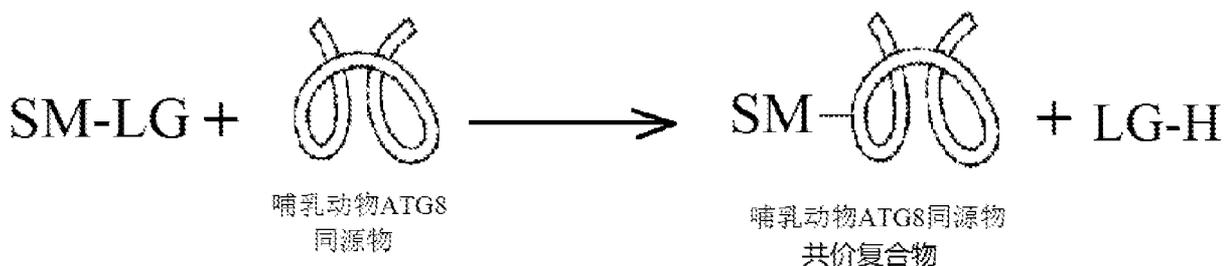
20 目前靶向细胞自噬的小分子调节剂主要限于 mTOR 和溶酶体调节剂，针对细胞自噬相关蛋白，如 ATG4 和 ULK1 的小分子调节剂的研究依然处于开发的早期。ATG8 及其哺乳动物同源家族蛋白 LC3, GABARAP 和 GATE-16 子家族是最重要的细胞自噬相关蛋白。在人体内，LC3 家族有 LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP 家族有 GABARAPL 和 GABARAPL1, GATE-16 家族有 GABARAPL2。在 ATG8 的哺乳动物同源蛋白中，LC3B 无疑是研究得最为深入的一个，它被认为是细胞自噬的标志物。

25 开发共价键修饰哺乳动物 ATG8 同源物的方法有利于研究调节其自身的蛋白功能及其在细胞自噬中的作用机制，有利于开发调节细胞自噬调节剂及与细胞自噬相关疾病的药物的开发。

发明内容

30 本发明提供了一种调节哺乳动物 ATG8 同源物的方法，包括：提供化合物 SM-LG，所述化合物 SM-LG 包括具有调节哺乳动物 ATG8 同源物的功能的部分 SM- 和离去部分 -LG；

所述化合物 SM-LG 与哺乳动物 ATG8 同源物反应产生哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物。

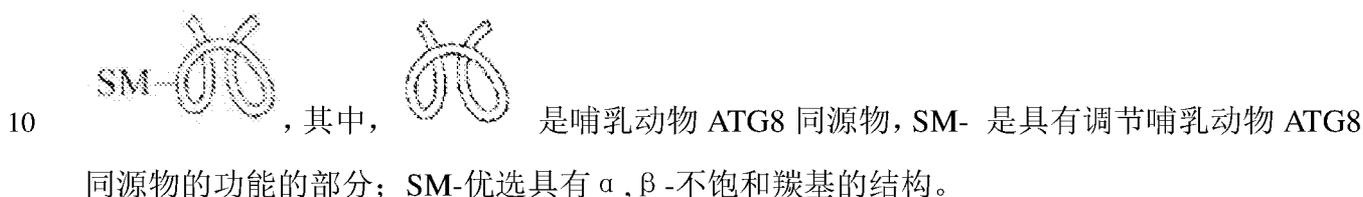


在本发明的一个更具体的实施方案中，所述化合物 SM-LG 与哺乳动物 ATG8 同源物的反应是取代反应。

5 在本发明的一个更具体的实施方案中，所述化合物 SM-LG 与哺乳动物 ATG8 同源物的反应是亲核取代反应。

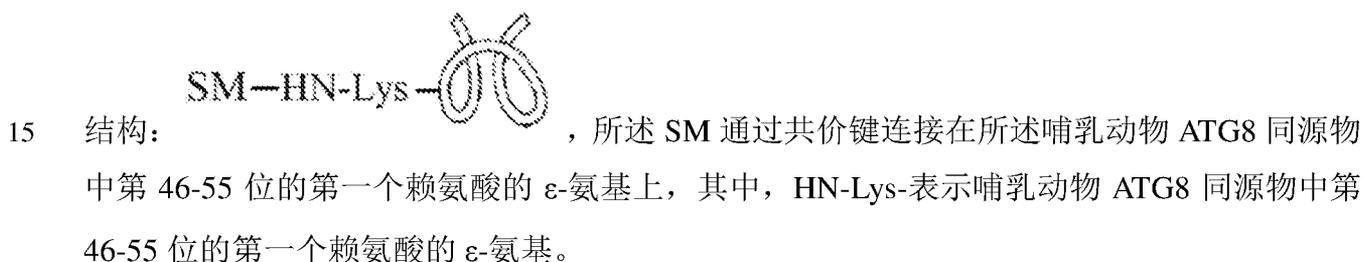
在本发明的一个更具体的实施方案中，所述 LG-H 是一个小分子化合物，优选是水分子；SM-具有 α, β -不饱和羰基的结构。

本发明也提供了一种哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，具有以下的结构：



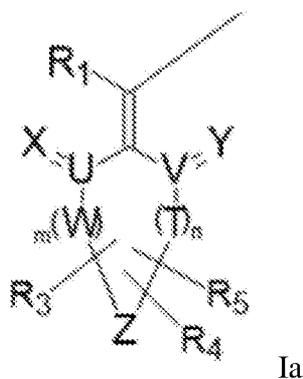
在所述哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物中，所述 SM- 通过共价键连接在所述哺乳动物 ATG8 同源物上。

在本发明的一个更具体的实施方案中，所述哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物有以下的



在本发明的一个更具体的实施方案中，所述哺乳动物 ATG8 同源物是 LC3B，优选地，SM- 通过共价键连接到 LC3B 的第 49 位的赖氨酸的 ϵ -氨基上。

20 在本发明的一个更具体的实施方案中，所述 SM 具有如下通式 Ia 所示的结构：



在通式 Ia 中：

X 和 Y 各自独立地选自 O, S, NR_a, NOH 和 CH₂;

U 和 V 各自独立地选自 C, S, SO 和 POR_a;

5 W、Z 和 T 各自独立地选自 O, S, SO, SO₂, N, NR_a, CO, C, CR_a 和 CH₂;

R_a 为氢或 C1-6 烷基;

m 为 0, 1, 2 或 3;

n 为 0, 1, 2 或 3;

R₁ 选自氢, 氘, 未取代或用选自羟基和卤素的取代基取代的 C1-6 烷基, 和未取代或用
10 选自卤素、羟基、C1-C6 烷基和 C1-C6 杂烷基的取代基取代的苯基;

R₃、R₄ 和 R₅ 各自独立地选自氢, 羟基, 氨基, 卤素, 氰基, 硝基, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, 未取代或用选自羟基、卤素和 C1-6 烷氧基的取代基取代的 C1-6 烷基, C1-6
15 杂烷基, C2-6 烯基, C2-6 炔基, 取代或未取代的-CONH₂-(C6-10 芳基), 取代或未取代的
-CH=CH-(C6-10 芳基), 取代或未取代的 C6-10 芳基, 取代或未取代的 5-10 元杂芳基, 取代
或未取代的 C3-10 环烷基, 取代或未取代的 C3-10 环烯基, 取代或未取代的 3-10 元杂环烷
基, 取代或未取代的 3-7 元杂环烯基, 取代或未取代的 C6-10 芳基 C1-6 烷基, 取代或未取
代的 C1-6 烷基 C6-10 芳基, 取代或未取代的 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基, 和取代或未取代的
C1-6 烷基 5-10 元杂芳基;

或者 R₃、R₄ 和 R₅ 中的两个相邻基团连接形成取代或未取代的 C6-10 芳基, 取代或未取
20 代的 5-10 元杂芳基, 取代或未取代的 C3-10 环烷基或取代或未取代的 3-10 元杂环烷基;

所述“取代或未取代”中的“取代”表示被一个或多个选自氢, 羟基, 氨基, 氰基, 硝基,
羧基, 卤素, C1-6 烷基, C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基中的取代基取代;

并且满足下列条件之一:

(1) 当 W、Z 或 T 上被 R₃、R₄ 和 R₅ 中的一个取代时, 该 W、Z 或 T 是 N 或 CH;

25 (2) 当 W、Z 或 T 上被 R₃、R₄ 和 R₅ 中的一个基团取代且该基团与 R₃、R₄ 和 R₅ 中的
另一个连接形成取代或未取代的 C6-10 芳基或取代或未取代的 5-10 元杂芳基时, 该 W、Z

或 T 是 C；例如，当 W 被 R₃ 取代且 R₃ 与相邻的 R₄ 连接形成未取代或取代的 C6-10 芳基或未取代或取代的 5-10 元杂芳基时，W 是 C；

(3) 当 W、Z 或 T 上被 R₃、R₄ 和 R₅ 中的二个取代时，该 W、Z 或 T 是 C。

在本发明的一个更具体的实施方案中，通式 Ia 中，

5 X 和 Y 各自独立地选自 O，S 和 NH；

U 和 V 各自独立地选自 C 和 S；

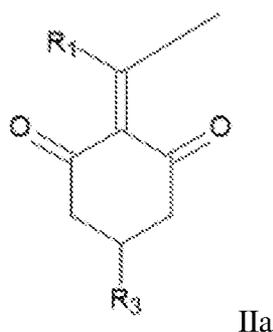
W、Z 和 T 各自独立地选自 O, N, NR_a, CO, C, CR_a 和 CH₂；

m 为 0, 1 或 2；优选为 0 或 1；

n 为 0, 1 或 2；优选为 0 或 1；和/或

10 R₁ 选自氢和氘。

在本发明的一个更具体的实施方案中，所述通式 Ia 为如下通式 IIa：



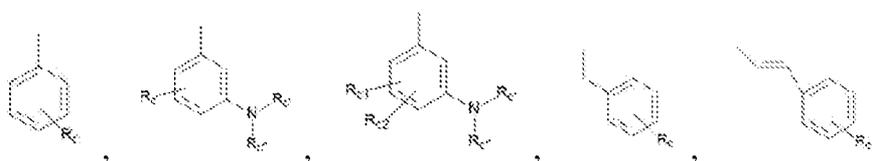
其中，R₁ 选自氢，氘，未取代或用选自羟基和卤素的取代基取代的 C1-6 烷基，和未取代或用选自卤素、羟基、C1-C6 烷基和 C1-C6 杂烷基的取代基取代的苯基；

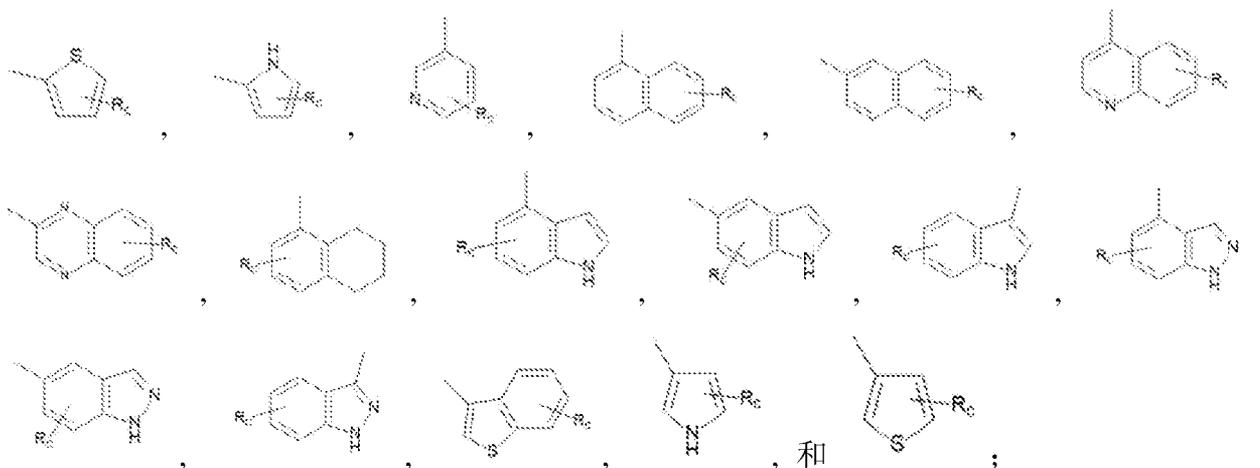
15 R₃ 选自氢，羟基，氨基，卤素，氰基，硝基，羧基，甲酰基，酰胺基，酯基，未取代或用选自羟基、卤素和 C1-6 烷氧基的取代基取代的 C1-6 烷基，C1-6 杂烷基，C2-6 烯基，C2-6 炔基，取代或未取代的-CONH₂-(C6-10 芳基)，取代或未取代的-CH=CH-(C6-10 芳基)，取代或未取代的 C6-10 芳基，取代或未取代的 5-10 元杂芳基，取代或未取代的 C3-10 环烷基，取代或未取代的 C3-10 环烯基，取代或未取代的 3-10 元杂环烷基，取代或未取代的 3-7 元杂
20 环烯基，取代或未取代的 C6-10 芳基 C1-6 烷基，取代或未取代的 C1-6 烷基 C6-10 芳基，取代或未取代的 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基，和取代或未取代的 C1-6 烷基 5-10 元杂芳基；

所述“取代或未取代”中的“取代”表示被一个或多个选自氢，羟基，氨基，氰基，硝基，羧基，卤素，C1-6 烷基，C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基中的取代基取代。

在本发明的一个更具体的实施方案中，

25 R₃ 选自如下基团：





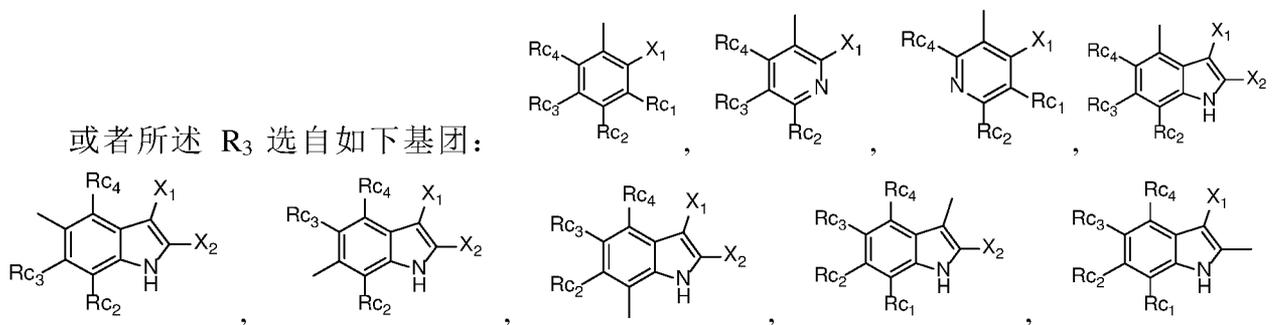
其中，

- 5 各 R_c , R_{c1} , R_{c2} , $R_{c'}$ 和 $R_{c''}$ 独立地选自氢, 羟基, 氨基, NR_aR_a' , 卤素, 氰基, 硝基, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C1-6 烷氧基烷基, C2-6 烯基, C2-6 炔基, C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 3-7 元杂环烯基, C1-6 烷基 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基或 C1-6 烷基 5-10 元杂芳基; 优选选自氢, 羟基, 氨基, NR_aR_a' , 卤素, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基,
- 10 C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 取代或未取代的苯基或吡啶基;

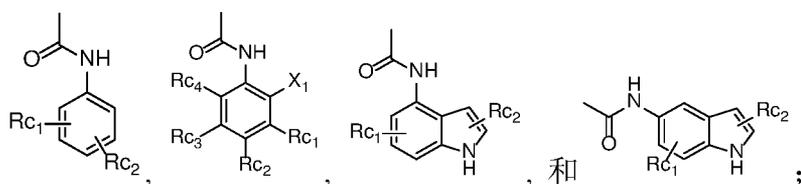
R_a 为氢或 C1-6 烷基;

或者 R_{c1} 和 R_{c2} 连接形成 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基或 3-10 元杂环烷基;

或者所述 R_3 选自如下基团:



15



其中, X_1 为 F, Cl, Br, I 或三氟甲基;

X_2 为 H, F, Cl, Br 或 I;

- 20 R_{c1} , R_{c2} , R_{c3} 和 R_{c4} 各自独立地选自氢, 羟基, 氨基, NR_aR_a' , 卤素, 氰基, 硝基, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基,

C1-6 烷氧基烷基, C2-6 烯基, C2-6 炔基, C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 3-7 元杂环烯基, C1-6 烷基 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基, 和 C1-6 烷基 5-10 元杂芳基; 优选选自氢, 羟基, 氨基, NRaRa', 卤素, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 取代或未取代的苯基或吡啶基;

R_a 为氢或 C1-6 烷基;

或者 R_{c1} 和 R_{c2}, 或 R_{c2} 和 R_{c3}, 或 R_{c3} 和 R_{c4} 连接形成 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 和 3-10 元杂环烷基。

蛋白热迁移实验的数据也将表明以上哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物的蛋白质热力学稳定性与哺乳动物 ATG8 同源物的蛋白质热力学稳定性不同。哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物的熔解温度比哺乳动物 ATG8 同源物的熔解温度可以高 2°C 以上。优选的话, 以上共价复合物的熔解温度比 LC3B 的熔解温度可以高 5°C 以上。

在本发明的一个更具体的实施方案中, 所述哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物熔解温度比哺乳动物 ATG8 同源物高至少 2°C, 优选是高至少 5°C。

哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物的蛋白质热力学稳定性可以用于检测哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物, 及与哺乳动物 ATG8 同源物有关的疾病的诊断和治疗。

哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物可以在与哺乳动物 ATG8 同源物有关的疾病的诊断和治疗中起作用。比如说, 这个共价复合物可以作为生物标记物, 用于与哺乳动物 ATG8 同源物有关的疾病的诊断和治疗。

因此, 本发明还提供所述哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物用于制备诊断和治疗疾病的试剂的用途, 所述疾病选自: 肿瘤, 心血管疾病, 自身免疫性疾病, 神经退行性疾病, 高血压, 骨组织细胞及骨类疾病, 克罗恩氏病, 急性肾损伤, 脑缺血, 视网膜疾病, 支气管哮喘, Vici 综合征, 以及感染性疾病。所述肿瘤可以选自肝癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、大肠癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

本发明还提供一种诊断和治疗疾病的方法, 所述方法使用所述哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物, 所述疾病选自: 肿瘤, 心血管疾病, 自身免疫性疾病, 神经退行性疾病, 高血压, 骨组织细胞及骨类疾病, 克罗恩氏病, 急性肾损伤, 脑缺血, 视网膜疾病, 支气管哮喘, Vici 综合征, 以及感染性疾病。所述肿瘤可以选自肝癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、大肠癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

附图说明

图 1A 显示了化合物 A-LC3B 共价复合物; 图 1B 显示了化合物 I-LC3B 共价复合物。

图中显示了被修饰的第 49 位赖氨酸与周围氨基酸的相互作用（黑色虚线；距离单位为埃）。

图 2 显示了化合物 A 对 LC3B 第 49 位赖氨酸的选择性。

图 3 显示了叠合的 LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 和 GABARAPL2 (PDB ID: 3WAL, 3VTU, 3WAM, 1GNU, 2R2Q 和 4CO7) 中保守的第 46-55 位的第一个赖氨酸。

图 4 是证明化合物 B 共价修饰 LC3B 第 49 位赖氨酸的质谱，(A) 反应机理；(B) b 类型和 y 类型离子。

图 5 是证明化合物 C 共价修饰 LC3B 第 49 位赖氨酸的质谱，(A) 反应机理；(B) b 类型和 y 类型离子。

图 6 是证明化合物 D 共价修饰 LC3B 第 49 位赖氨酸的质谱，(A) 反应机理；(B) b 类型和 y 类型离子。

图 7 显示了化合物 B 对细胞自噬的影响，(A) LC3-I/LC3-II 蛋白的免疫印迹检测；(B) 免疫荧光染色和荧光显微镜拍照。

具体实施方式

以下将详细描述本发明。当然，在不背离本发明精神及其实质的情况下，熟悉本领域的技术人员可根据本发明作出各种相应的改变和变形，但这些相应的改变和变形都应属于本发明所附的权利要求的保护范围。

本发明提供了一种调节哺乳动物 ATG8 同源物的方法，包括：提供化合物 SM-LG，所述化合物 SM-LG 包括具有调节哺乳动物 ATG8 同源物的功能的部分 SM- 和离去部分 -LG；所述化合物 SM-LG 与哺乳动物 ATG8 同源物反应产生哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，离去部分-LG 和氢离子结合，形成了小分子化合物 LG-H。所述方法体现了在通过以哺乳动物 ATG8 同源物为靶点来治疗相关疾病的方面的进展。

通过荧光偏振 (FP) 法测试实验 (在本申请后面有详细描述) 来筛选对 LC3B 有活性的化合物，筛选得到了一类化合物 SM-LG，其中，SM- 为具有调节哺乳动物 ATG8 同源物的功能的部分，-LG 为在与调节哺乳动物 ATG8 同源物反应过程中离去的部分。这类化合物对 LC3B 有时间依赖性的抑制。

在本发明的一个更具体的实施方案中，化合物 SM-LG 中，所述 SM- 部分如上所定义。

在本发明的一个更具体的实施方案中，化合物 SM-LG 中，-LG 表示-J-K-M-Q，其中

J 为 NR_a , NOR_a , O, S 或 $\text{—N} \begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \end{array}$ ，其中

 为含至少一个氮原子的 3-10 元亚杂环烷基或 3-7 元亚杂环烯基;

K 为共价键, NR_a , CR_cR_c' 或 $CR_cR_c \cdot CR_cR_c'$;

M 为共价键, CR_cR_c' , 3-10 元亚杂环烷基, 3-7 元亚杂环烯基或 5-10 元亚杂芳基;

Q 为氢, C1-6 烷基, C1-6 羟基烷基, $-(CH_2)_p-C(O)R_b$, $-(CH_2)_p-C(O)NHR_b$, $-(CH_2)_p-C(S)R_b$,

5 $-(CH_2)_p-C(S)NHR_b$, $-(CH_2)_p-SO_2R_b$ 或 $-(CH_2)_p-SO_2NHR_b$,

其中,

p 为 0, 1, 2 或 3; 优选为 0, 1 或 2, 更优选为 0 或 1;

各 R_b 独立地为 C1-6 烷基, C2-6 烯基, NHR_a , NR_aR_a' , 取代或未取代的苯基或取代或未取代 3-7 元杂环基,

10 R_a 和 R_a' 各自独立地为氢或 C1-6 烷基,

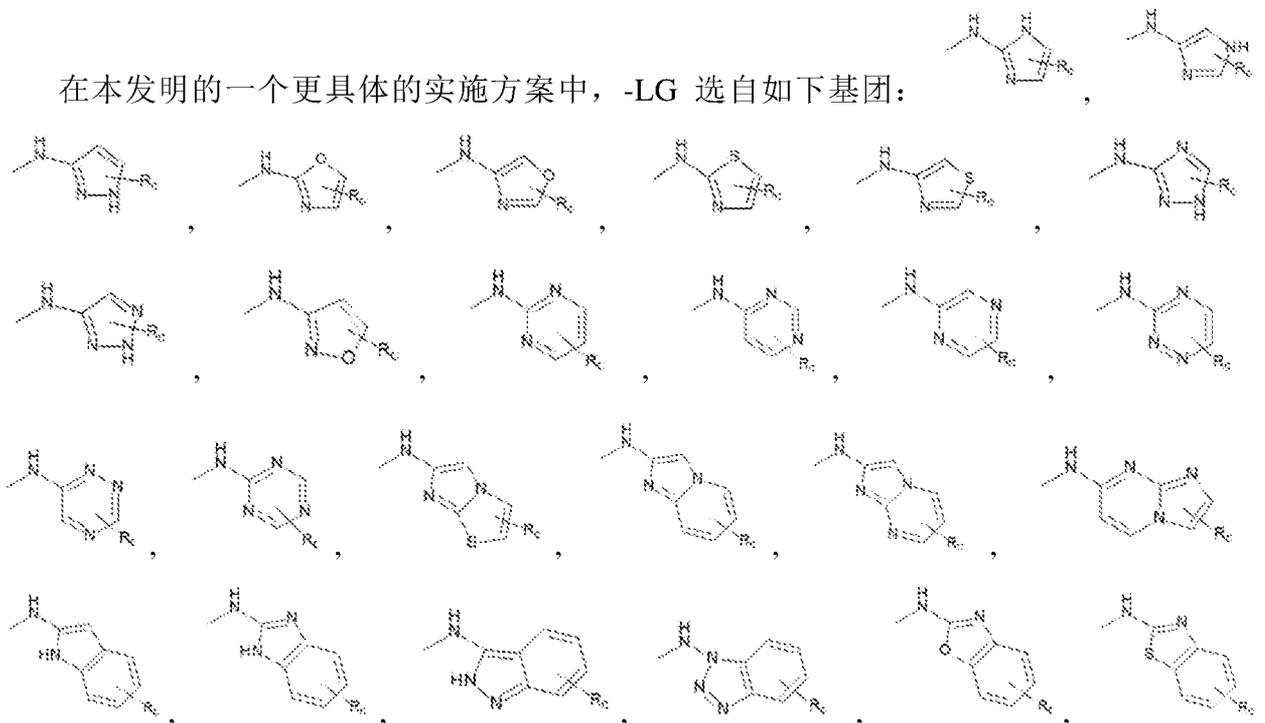
R_c 和 R_c' 各自独立地选自氢, 羟基, 氨基, 氰基, 硝基, 羧基, 卤素, C1-6 烷基, C1-6 卤代烷基和 C1-6 羟基烷基。

当 -LG 是 -J-K-M-Q 时, 共价复合物形成后, LG-H 就成为 H-J-K-M-Q。H-J-K-M-Q 是本申请中提及的小分子化合物。

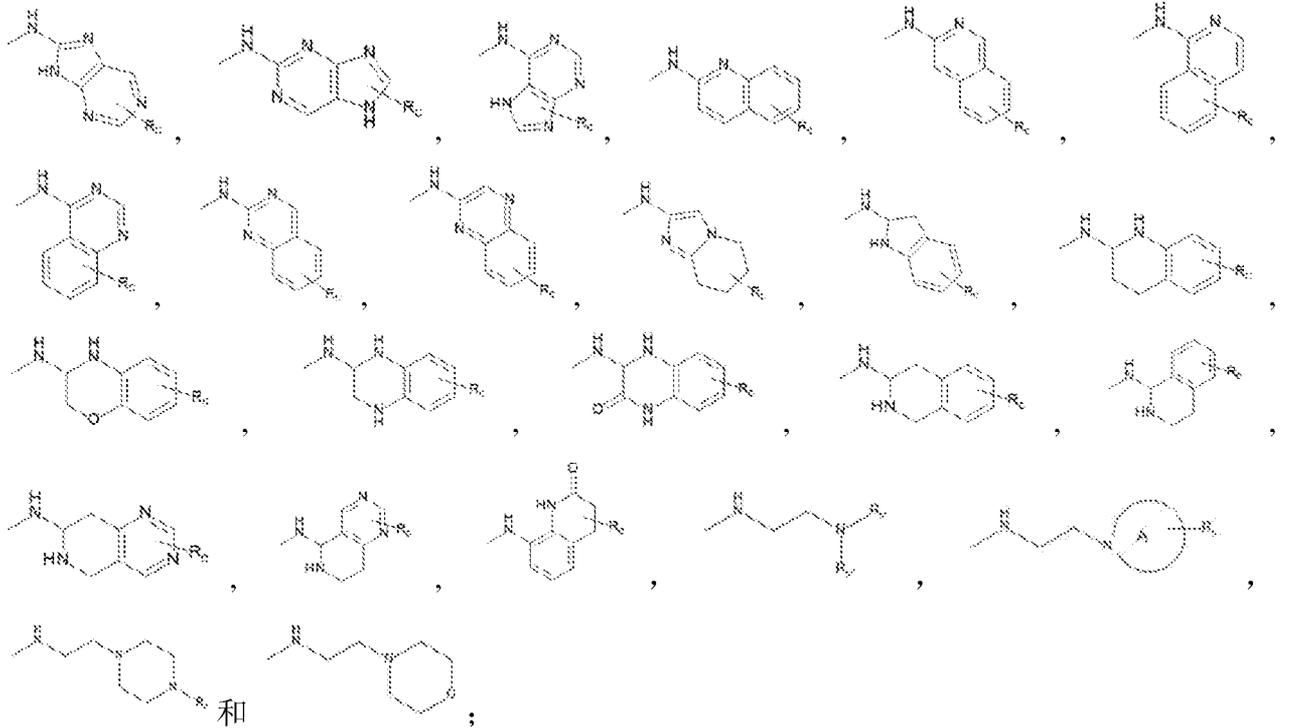
15 在本发明的一个更具体的实施方案中, 化合物 SM-LG 中, -LG 表示-OH。

当 -LG 是 -OH 时, 共价复合物形成后, LG-H 就成为 H_2O (水分子)。

在本发明的一个更具体的实施方案中, -LG 选自如下基团:



20

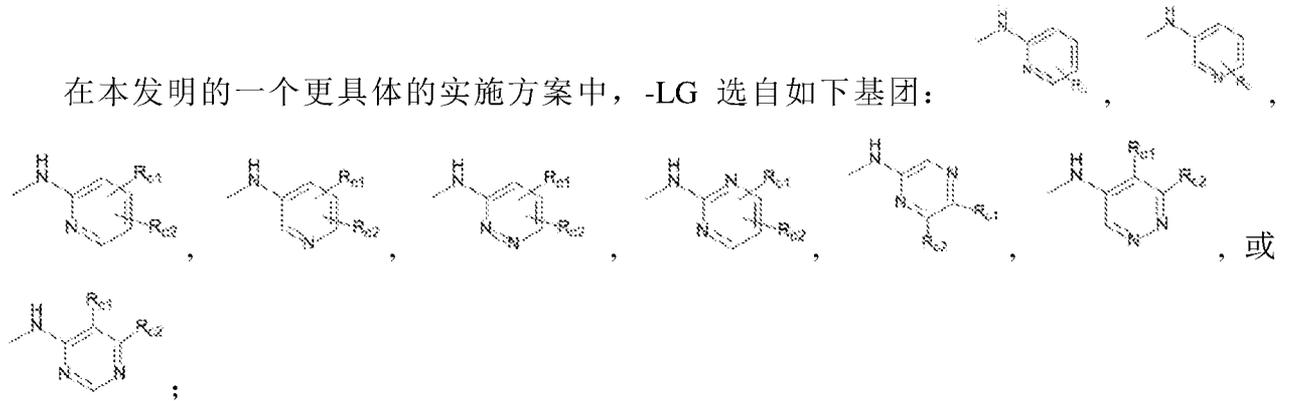


其中，

$-N(A)$ 为含至少一个氮原子的 3-10 元亚杂环烷基或 3-7 元亚杂环烯基；

R_c , R_c' 和 R_c'' 各自独立地选自氢，羟基，氨基，氰基，硝基，羧基，卤素，C1-6 烷基，C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基。

10 在本发明的一个更具体的实施方案中，-LG 选自如下基团：



其中，

15 R_c 选自氢，羟基，氨基，氰基，硝基，羧基，卤素，C1-6 烷基，C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基；

R_{c1} 和 R_{c2} 可以连接形成 C6-10 芳基，5-10 元杂芳基，C3-10 环烷基或 3-10 元杂环烷基。

本发明使用的术语具有其在本技术领域的一般含义，在有抵触的情况下，适用本申请中的定义。化学名称、通用名称和化学结构可以互换使用以描述相同的结构。无论术语是单独使用还是与其他术语组合使用，这些定义都适用。因此，“C1-6 烷基”的定义适用于“C1-6 烷

基”以及“C1-6 羟基烷基”、“C1-6 卤代烷基”、“C6-10 芳基 C1-6 烷基”、“C1-6 烷基 C6-10 芳基”、“C1-6 烷氧基”等的“C1-6 烷基”部分。

“卤素”(或卤代基)是指氟、氯、溴或碘。

“C1-6 烷基”是指含有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基, 优选为 1 至 4 个碳原子的直链或支链烷基。支链是指一个或多个碳原子的烷基如甲基、乙基或丙基等与直链烷基连接。优选的 C1-6 烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基和叔丁基等。

“C1-6 卤代烷基”是指如上定义的 C1-6 烷基中含有一个或多个卤素原子取代基。

“C1-6 杂烷基”是指如上定义的 C1-6 烷基中含有一个或多个选自以下基团中的取代基: O、S、N、-(S=O)-、-(O=S=O)-等。

“C2-6 烯基”是指含有 2 至 6 个碳原子的直链或支链的烯基, 优选含有 2 至 4 个碳原子。支链是指一个或多个 C1-6 烷基连接到直链 C2-6 烯基链上。优选的 C2-6 烯基包括但不限于乙烯基、丙烯基、正丁烯基、3-甲基丁烯基、正戊烯基等。

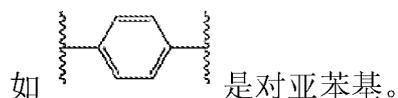
“C1-6 亚烷基”是指通过从上述定义的 C1-6 烷基除去一个氢原子得到的二价基团。优选的 C1-6 亚烷基包括但不限于亚甲基、亚乙基和亚丙基等。一般地, 其可以任选且等同地在此表示为-(C1-6 烷基)-, 例如-CH₂CH₂-是亚乙基。

“C2-6 炔基”是指含有 2 至 6 个碳原子的直链或支链炔基, 优选含有 2 至 6 个碳原子, 更优选含有 2 至 4 个碳原子。支链表示一个或多个含有 2 至 4 个碳原子的烷基连接到直链炔基链上。优选的 C2-6 炔基包括但不限于乙炔基、丙炔基、2-丁炔基和 3-甲基丁炔基等。

“亚 C2-6 烯基”是指通过从上述定义的 C2-6 烯基中除去一个氢原子而获得的双官能团。优选的亚 C2-6 烯基包括但不限于-CH=CH-, -C(CH₃)=CH-, -CH=CHCH₂- 等。

“C6-10 芳基”是指含有 6 至 10 个碳原子的芳族单环或多环系统。优选的 C6-10 芳基包括但不限于苯基和萘基。

“C6-10 亚芳基”是指通过从上述定义的 C6-10 芳基除去一个氢原子得到的二价基团, 例



“5-10 元杂芳基”是指含有 5 至 10 个环原子的芳族单环或多环基团, 所述 5-10 元杂芳基包含选自 N、O 和 S 中的 1 至 4 个杂原子。优选的 5-10 元杂芳基含有 5 至 6 个环原子。5-10 元杂芳基的氮原子可以任选地被氧化成相应的 N-氧化物。优选的 5-10 元杂芳基包括但不限于吡啶基、吡嗪基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、吡啶酮、噁唑基、异噻唑基、噁唑基、噁二唑基、噻唑基、噻二唑基、吡唑基、呋咕基(furazanyl)、吡咯基、三唑基、1,2,4-噻二唑基、哒嗪基、喹啉基、酞嗪基、羟吡啶基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑并[2,1-b]噻唑基、苯并

呋咕基(benzofurazanyl)、吡啶基、氮杂吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、喹啉基、咪唑基、噻吩并吡啶基、喹啉基、噻吩并嘧啶基、吡咯并吡啶基、咪唑并吡啶、异喹啉基、苯并吡啶基、1,2,4-三嗪基、苯并噻唑基其氧化物等。术语“5-10 元杂芳基”也指部分饱和的 5-10 元杂芳基，例如四氢异喹啉基，四氢喹啉基等。

5 “C3-10 环烷基”是指环上含有 3 至 10 个碳原子，优选 3 至 6 个碳原子的非芳族饱和单环或多环基团。优选的单环 C3-10 环烷基包括但不限于环丙基、环戊基、环己基、环庚基等。优选的多环环烷基包括但不限于[1.1.1]-双环戊烷基、1-癸酰基、降冰片基、金刚烷基等。

“C3-10 环烯基”是指环上含有 3 至 10 个碳原子的非芳族单环或多环基团，其含有至少一个环内碳-碳双键。优选环上含有 3 至 7 个碳原子，更优选含有 5 至 7 个碳原子。优选的环
10 烯基包括但不限于环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烷-1,3-二烯基、降冰片烯基等。

“3-10 元杂环烷基”或“3-10 元杂环基”是指含有 3 至 10 个环原子，优选 5 至 10 个环原子，优选 5 至 6 个环原子的非芳族单环或多环基团，其中，所述 3-10 元杂环基包含选自 N、O 和 S 中的 1 至 4 个杂原子。所述 3-10 元杂环基的氮或硫原子可以任选地氧化成相应的 N-氧
15 化物、S-氧化物或 S-二氧化物。因此本发明中术语“氧化物”是指相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S-二氧化物。“3-10 元杂环基”还包括环上相同碳原子上的两个可用氢原子同时被单一的基团=O 取代(即形成羰基)，这样的=O 基团在本发明中可以称为“氧代”。优选的单环 3-10 元杂环烷基包括但不限于哌啶基、氧杂环丁烷基、吡咯基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、噻唑
20 烷基、1,4-二噁烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、内酰胺基(如吡咯烷酮基)、具有 3 至 10 个环原子的内酯基及其氧化物。

“3-7 元杂环烯基”是指含有 3 至 7 个环原子，优选 5 至 6 个环原子的非芳族单环或多环基团，其中，所述 3-7 元杂环烯基包含选自 N、O 和 S 中的 1 至 4 个杂原子并且含有至少一个碳-碳双键或碳-氮双键。在基团名称中包含的氮杂、氧杂或硫杂是指至少一个氮、氧或硫
25 原子分别地作为环原子。3-7 元杂环烯基的氮或硫原子可以任选被氧化成相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S-二氧化物。优选的 3-7 元杂环烯基包括但不限于 1,2,3,4-四氢吡啶基、1,2-二氢吡啶基、1,4-二氢吡啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、1,4,5,6-四氢嘧啶基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、2-咪唑啉基、2-吡唑啉基、二氢咪唑基、二氢噁唑基、二氢恶二唑基、二氢噻唑基、3,4-二氢-2H-吡喃基、二氢呋喃基、氟代二氢呋喃基及其氧化物等。“3-7 元杂环烯基”还可包
括环上相同碳原子上的两个可用氢原子同时被单一的基团=O 取代(即形成羰基)。

30 “C6-10 芳基 C1-6 烷基”是指由上述定义的 C6-10 芳基取代上述定义的 C1-6 烷基上的一个氢形成的基团。优选的 C6-10 芳基 C1-6 烷基包括但不限于苄基、2-苯乙基和萘甲基。所

述 C6-10 芳基 C1-6 烷基通过 C1-6 烷基与母体部分键接。类似地，“5-10 元杂芳基 C1-6 烷基”，“C3-10 环烷基 C1-6 烷基”，“C3-10 环烯基 C1-6 烷基”，“3-10 元杂环烷基 C1-6 烷基”，“3-7 元杂环烯基 C1-6 烷基”等是指由上述定义的 5-10 元杂芳基，C3-10 环烷基，C3-10 环烯基，3-10 元杂环烷基，3-7 元杂环烯基等通过 C1-6 烷基与母体部分键接。

5 “C1-6 烷基 C6-10 芳基”是指由上述定义的 C1-6 烷基取代上述定义的 C6-10 芳基上的一个氢形成的基团。优选 C1-6 烷基 C6-10 芳基包括但不限于甲基。所述 C1-6 烷基 C6-10 芳基通过 C6-10 芳基与母体部分键接。

“5-10 元杂芳基 C1-6 烷基”是指由上述定义的 5-10 元杂芳基取代上述定义的 C1-6 烷基上的一个氢形成的基团。优选的 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基包括但不限于吡啶基甲基和喹啉-3-基甲基。所述 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基通过 C1-6 烷基与母体部分键接。

“C1-6 羟基烷基”是指被羟基取代的 C1-6 烷基基团，其中 C1-6 烷基如上所述。优选的 C1-6 羟基烷基包括但不限于羟甲基和 2-羟乙基。

“C1-6 烷氧基”是指 C1-6 烷基-O-基团，其中 C1-6 烷基如上所述。优选的 C1-6 烷氧基包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基和正丁氧基。通过氧与母体部分键接。“C1-6 烷氧基烷基”是指衍生自本发明所定义的 C1-6 烷氧基和 C1-6 烷基的基团，通过 C1-6 烷基与母体部分键接。

“酯基”是指由具有 1-20 个碳原子的脂肪族或芳香族羧酸与具有 1-20 个碳原子的伯、仲或叔醇经酯化反应形成的酯中除去一个氢原子而获得的基团。优选的酯基包括但不限于甲酯基，乙酯基，异丙酯基，叔丁酯基，苯酯基。

20 “酰胺基”是指由具有 1-20 个碳原子的脂肪族或芳香族羧酸与具有 1-20 个碳原子的伯或仲胺经酰胺化反应组成的酰胺中除去一个氢原子而获得的基团。

“亚杂环烷基”，“亚杂环烯基”或“亚杂芳基”是指由上述相应的杂环烷基，杂环烯基或杂芳基中再失去一个氢原子形成的二价基团。

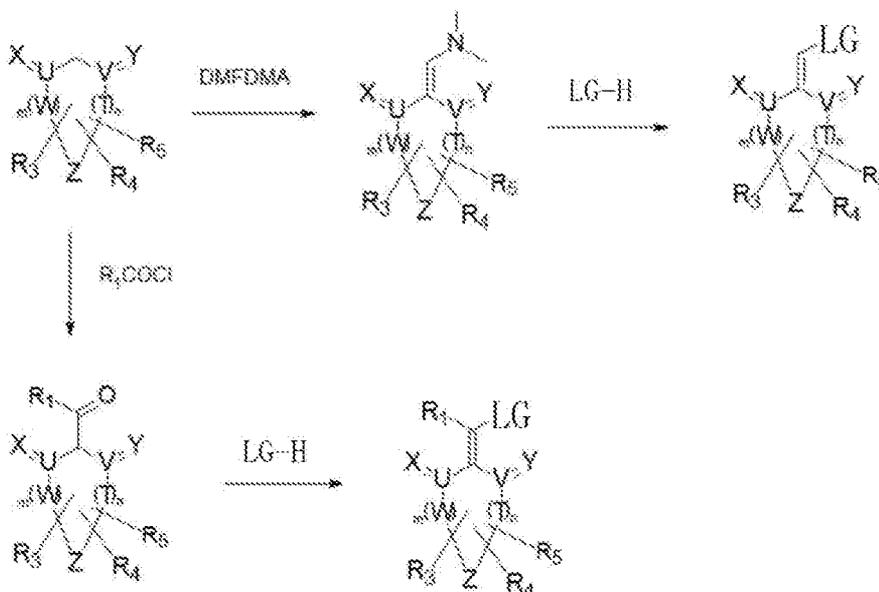
25 本发明任何前述官能团可以是未经取代或被本发明所述取代基取代。术语“取代的”(或取代)是指将指定原子上的一個或多个氢原子替换为从指定基团中选择的基团，条件是不超出指定原子的正常价态，并且取代产生稳定的化合物。只有当所述组合形成稳定化合物时，所述取代基和/或变量的组合才是允许的；“稳定化合物”或“稳定结构”是指具有能够从反应混合物中分离至有用纯度和配置成有效治疗剂的具有充分稳定性的化合物。

30 术语“取代的”表示特定基团是被一个或多个取代基取代。取代基包括，不局限于，氢，羟基，氨基，氰基，硝基，羧基，卤素，C1-6 烷基，C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基。二个相邻取代基可以连接形成 C6-10 芳基，5-10 元杂芳基，C3-10 环烷基或 3-10 元杂环烷基。

C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 3-7 元杂环烯基等基团上的取代包括在基团的任何环部分的取代。

在本申请中, 如果一个基团是“共价键”, 那表明这个基团“不存在”, 其相连的二个基团通过一个共价键相连。比如说, 在“-J-K-M-Q”取代基中, 如果 K 是共价键, 那这个取代基就成为“-J-M-Q”。

上述化合物 SM-LG 可以通过本领域中类似已知的各种方法制备, 下述反应流程为制备上述化合物的一般反应流程的可选方案:



其中, 各基团定义如上所述, DMFDMA 为 N,N-二甲基甲酰胺二甲缩醛。

10 化合物 SM-LG 可以通过本领域普通技术人员已知的一些参考文献中描述的方法来制备。这些参考文献包括例如: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 24(16), 3764-3771, 2014; Chemistry - A European Journal, 20(9), 2445-2448, 2014; Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20(2), 1029-1045, 2012; Journal of Organic Chemistry, 82(5), 2630-2640, 2017; Tetrahedron Letters, 49 (2008), 4725-4727; Journal of Organic Chemistry, 78(9), 4563-4567, 2013; 15 Heterocycles, 28(2), 1015-35, 1989; Journal of Medicinal Chemistry, 57(10), 3924-3938, 2014; Journal of Organic Chemistry, 66(24), 8000-8009, 2001; and Tetrahedron Letters, 56(45), 6287-6289, 2015.

部分化合物 SM-LG 对 LC3B 的抑制活性的 IC₅₀ 值在相同申请人同日向中国国家知识产权局提交的题为“用作自噬调节剂的化合物及其制备方法和用途”和“一类异吲哚酮-酰亚胺环-1,3-二酮-2-烯化合物、其组合物和用途”的发明专利申请中列出, 在此全部引用作为参考。

实施例

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。所述实施例的示例在附图中示出。应理解,

这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。本发明还可有其他多种实施例，在不背离本发明精神及其实质的情况下，熟悉本领域的技术人员可根据本发明作出各种相应的改变和变形，但这些相应的改变和变形都应属于本发明所附的权利要求的保护范围。

本领域的技术人员将容易理解的是，可使用以下制备方法的条件和过程的已知变型来制备这些化合物。

本发明中用到的起始反应物未经特别说明，均为商业购买。

LC3B 是哺乳动物 ATG8 同源物中被研究最多的一种，也是哺乳动物细胞自噬的标志物。在本申请中，“LC3B”，“MAP1LC3B”，和“微管相关蛋白 1 轻链 3 β ”都是用于描述同一蛋白。在本申请实例中使用的 LC3B 的蛋白序列如下：

蛋白	序列	实验
LC3B	SEQ ID NO:1	全长蛋白模板
GST-LC3B	SEQ ID NO:2	荧光偏振实验
LC3B(1-125)	SEQ ID NO:3	蛋白热迁移实验、质谱分析
LC3B(2-119)	SEQ ID NO:4	晶体复合物结构与解析
N 末端 FITC 标记肽	SEQ ID NO:5	荧光偏振实验
LBP2	SEQ ID NO:6	蛋白热迁移实验
K8A	SEQ ID NO:7	蛋白热迁移实验
K30A	SEQ ID NO:8	蛋白热迁移实验
K39A	SEQ ID NO:9	蛋白热迁移实验
K42A	SEQ ID NO:10	蛋白热迁移实验
K49A	SEQ ID NO:11	蛋白热迁移实验
K51A	SEQ ID NO:12	蛋白热迁移实验
K65A	SEQ ID NO:13	蛋白热迁移实验
K103A	SEQ ID NO:14	蛋白热迁移实验
K122A	SEQ ID NO:15	蛋白热迁移实验

10

载体构建

编码人源 LC3B (SEQ ID NO:1)的 cDNA 购买自 Addgene (NCBI 检索号 NP_073729.1). 对该模板进行 PCR 扩增后分别构建至质粒表达载体 pGEX-6P-1 或 pGEX-4T-1 上。

蛋白表达与纯化

GST-LC3B (1-125) (SEQ ID NO:2)和各个突变体蛋白由 DE3 感受态细胞在 16°C 条件下

IPTG 诱导表达。收集并重悬 DE3 感受态细胞后超声破碎、离心后将上清挂柱 (GSTrap FF, GE), 随后用含有谷胱甘肽的洗脱液洗脱, 再进一步用凝胶柱层析得到目的蛋白。该融合蛋白直接用于荧光偏振实验。蛋白热迁移实验、质谱分析以及蛋白结晶实验的所用到的蛋白是将上述方法得到的 GST-融合蛋白用 PP 酶或凝血酶酶切后进一步凝胶过滤层析得到。

5 荧光偏振 (FP) 法测试实验

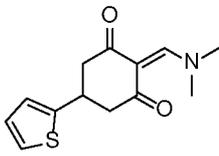
重组蛋白 GST-LC3B(终浓度 180nM)(SEQ ID NO:2)和 N 末端 FITC 标记肽(SEQ ID NO:5, 终浓度 18nM)置于 FP 缓冲液 (50mM HEPES pH7.5, 0.1mg/ml BSA 和 1mM DTT) 中, 向其中加入使用 FP 缓冲液连续梯度稀释的化合物, 然后将上述混合物于 25°C 下在避光孵育。监测荧光偏振值 (PerkinElmer Envision, 发射光波长 480nm; 吸收光波长 535nm), 并用 GraphPad Prism 6.0 程序计算 IC₅₀ 值。

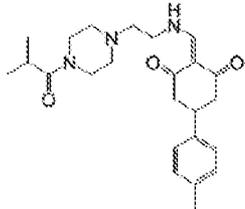
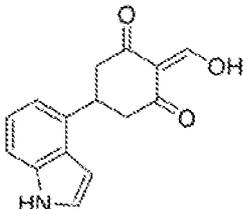
化合物的 IC₅₀ 值表示方法: 100μM < IC₅₀ ≤ 1mM 被认为对 LC3B 的活性较低(+); 化合物 15μM < IC₅₀ ≤ 100μM 被认为是对 LC3B 的活性中等(++); 3μM < IC₅₀ ≤ 15μM 被认为对 LC3B 活性较高(+++); IC₅₀ ≤ 3μM 被认为对 LC3B 具有高活性(++++)。

蛋白热迁移实验

15 蛋白热迁移实验采用 Quant Studio 6 Flex Real-Time PCR 系统, 测试化合物对蛋白质热力学稳定性的影响。将蛋白质 LC3B(1-125)(SEQ ID NO:3)及各突变体蛋白(SEQ ID NO:7-15) (终浓度 4μM)、环境敏感染料 (5×SYPRO orange, Invitrogen) 和化合物 (终浓度 40μM) 在缓冲液 (50mM HEPES pH7.5, 1mM DTT) 中混合至总体积为 20μL。将样品以 3% 的升温速率从 25°C 加热至 95°C。监测荧光强度的变化, 并使用蛋白质热转移软件 1.1 (ABI) 版本
20 计算每个熔解温度 (T_m), 以 ΔT 表示, 单位为 °C。ΔT 的增长说明蛋白质热力学稳定性增加, 也说明了化合物 SM-LG 与 LC3B 共价结合形成 LC3B 共价复合物。LC3B 共价复合物的热力学稳定性比 LC3B 的热力学稳定性高。部分对 LC3B 的抑制活性较高的化合物的荧光偏振实验和蛋白热迁移实验的数据在表 1 中列出。

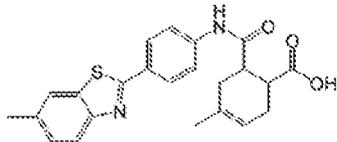
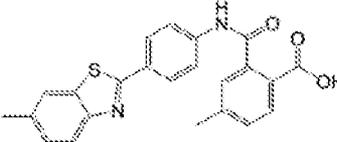
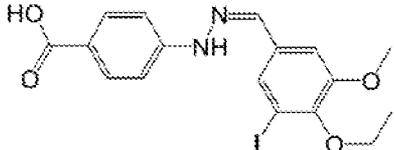
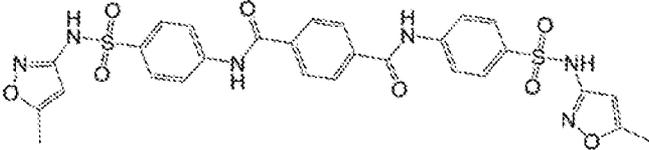
表 1: 荧光偏振实验和蛋白热迁移实验数据

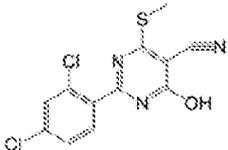
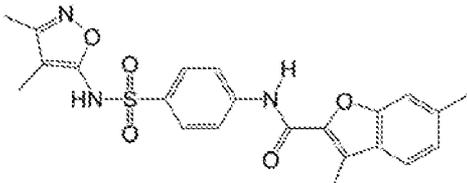
化合物	结构	名称	¹ H NMR	IC ₅₀ (μM)	ΔT (°C)
A		2-((二甲基氨基)亚甲基)-5-(噻吩-2-基)环己烷-1,3-二酮	(400 MHz, CDCl ₃) δ 8.08 (s, 1H), 7.19 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.99 – 6.92 (m, 1H), 6.88 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.71 – 3.59 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 2.92 (m, 2H), 2.74 (m, 2H).	1.56	10.37

H		5- 苯 基 -2-(((2-(4-(2- 甲基丙酰基) 哌 嗪 -1- 基) 乙 基)氨基) 亚甲基)环己 烷-1,3-二酮	¹ H NMR (400 MHz, dmsO) δ 11.03 – 10.95 (m, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 14.6 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 7.14 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 3.75 – 3.70 (m, 6H), 3.35 – 3.30 (m, 1H), 2.80 – 2.64 (m, 3H), 2.59 – 2.56 (m, 8H), 2.27 (s, 3H), 1.10 (d, 6H); MS: 412.2 [M+H].	5.00	10.21
I		2-(羟基亚甲 基)- 5-(1H- 吲 哚 -4- 基) 环 己 烷 -1,3- 二 酮	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.17 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 7.30 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.05 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 6.89 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 3.94 – 3.81 (m, 1H), 3.14 – 3.00 (m, 2H), 2.7-2.73 (m, 2H); MS: 254.1 [M-H].	0.51	13.4

部分对 LC3B 的抑制有一定活性的对比化合物的荧光偏振实验和蛋白热迁移实验的数据在表 2 中列出。对比化合物是研究中发现的,对 LC3B 的抑制有一定的活性,IC₅₀ 在 25-50 μM 之间。对比化合物和对 LC3B 的抑制活性较高的本发明化合物的主要区别是对比化合物没有 “α,β-不饱和羰基” 的结构。

表 2: 荧光偏振实验和蛋白热迁移实验数据

对比化合物	结构式	IC ₅₀ (μM)	ΔT (°C)
1		46	0
2		50	0
3		28	2.1
4		28	1.8

5		25	0
6		47	0

以上荧光偏振实验的数据表明本发明化合物 SM-LG 相对于对比化合物对 LC3B 具有更高的活性，蛋白热迁移实验的数据说明本发明化合物 SM-LG 与 LC3B 共价结合形成蛋白质热力学稳定性更高的 LC3B 共价复合物，而用对比化合物处理 LC3B 后，蛋白质热力学稳定性基本没有增加，表明对比化合物没有与 LC3B 共价结合形成 LC3B 共价复合物。因为对比化合物和对 LC3B 的抑制活性较高的本发明化合物的主要区别是对比化合物没有“ α, β -不饱和羰基”的结构，所以本发明化合物 SM-LG 与 LC3B 共价结合形成 LC3B 共价复合物是有特异性的，“ α, β -不饱和羰基”的结构很有可能对本发明化合物 SM-LG 与 LC3B 共价结合形成 LC3B 共价复合物的过程起重要作用。

10 LC3B 蛋白和小分子的晶体复合物结构的结晶与解析

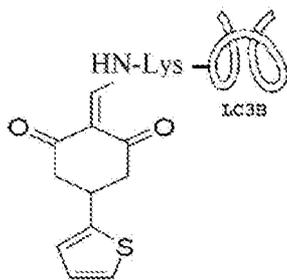
为了验证化合物 SM-LG 与 LC3B 共价结合形成 LC3B 共价复合物，将化合物 A 和化合物 I 用于后续蛋白结晶实验和结构解析。

采用坐滴法得到了 LC3B (2-119) (SEQ ID NO:4) 的空蛋白晶体，随后将晶体捞出放在含有终浓度 1-5mM 的化合物 A 的池液中浸泡。衍射数据在上海同步辐射光源 19U1 线站收集。

15 衍射数据用 XDS 软件进行积分，而后用 CCP4 中的 Aimless 模块压缩，以 PDB 编号 3VTU 的 LC3B 蛋白结构作为模板采用 Phaser 模块进行分子置换得到初始相位信息，进而用 PHENIX 和 COOT 做最后的精修。

图 1A 展示了化合物 A 与 LC3B 的共价复合物；图 1B 展示了化合物 I 与 LC3B 的共价复合物。化合物 A 和化合物 I 与 LC3B 的第 49 位赖氨酸残基(ϵ -氨基) 共价连接。被修饰的 20 49 位赖氨酸残基与周围氨基酸残基的相互作用（黑色虚线，距离单位为埃）如图 1A 和图 1B 所示。

在 LC3B 的 L 口袋附近，第 52 位赖氨酸和第 70 位精氨酸为化合物 A 和化合物 I 的 α, β -不饱和羰基部分的稳定结合构象提供了强碱性环境。在该碱性环境下， α, β -不饱和羰基部分与第 49 位赖氨酸残基反应，随后化合物 A 的含 N 的离去部分离去，形成了化合物 A 与 25 LC3B 共价复合物和化合物 I 与 LC3B 的共价复合物。该共价复合物形如下述结构：

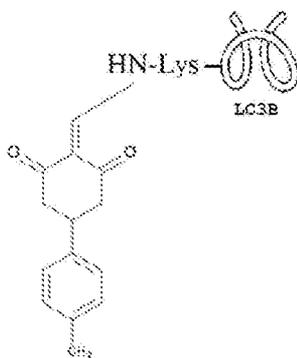


(以化合物 A 与 LC3B 共价复合物为例), 在该结构中, HN-Lys- 表示 LC3B 第 49 位赖氨酸的 ϵ -氨基。

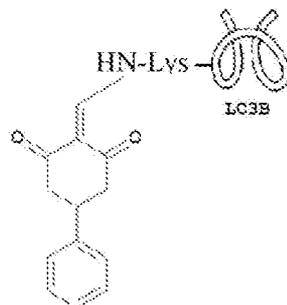
化合物 A 与 LC3B 的共价复合物, 化合物 I 与 LC3B 的共价复合物, 和其他类似的共价复合物可以在与 LC3B 有关的疾病的诊断和治疗中起作用。比如说, 这个共价复合物可以作为生物标记物, 用于与 LC3B 有关的疾病的诊断和治疗。

在化合物 A 与 LC3B 共价复合物的结构中, 阳离子- π 相互作用的存在使得噻吩环部分被第 30 位离子化 (用 H^{++} 计算) 的赖氨酸锁定。另外, 被修饰的第 49 位赖氨酸能与 LC3B 的第 53 位亮氨酸、第 51 位的赖氨酸和第 70 位的精氨酸分别形成氢键, 这与化合物良好亲和力和构象稳定密切相关。化合物 I 与 LC3B 共价复合物的结构也有类似的特性。

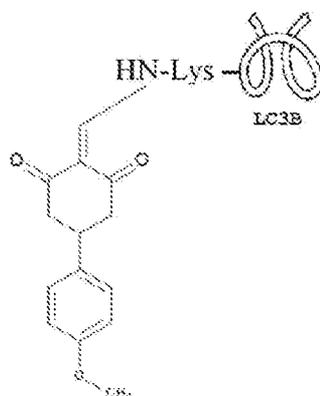
与化合物 A 类似, 化合物 B, C, D, E, F, 和 G 也可以与 LC3B 的第 49 位赖氨酸残基(ϵ -氨基) 共价连接, 形成共价复合物。其中化合物 B, C, 和 D 的形成的共价复合物如下。



化合物 B 与 LC3B 的共价复合物



化合物 C 与 LC3B 的共价复合物



化合物 D 与 LC3B 的共价复合物

以上三个共价复合物也经过质谱数据确认，质谱的分析数据如图 4-6 所示，将在下面详细讨论。

- 5 这三个共价复合物也可以在与 LC3B 有关的疾病的诊断和治疗中起作用。比如说，这个共价复合物可以作为生物标记物，用于与 LC3B 有关的疾病的诊断和治疗。

蛋白热迁移实验的数据也表明以上哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物的蛋白质热力学稳定性与 LC3B 的蛋白质热力学稳定性不同。以上共价复合物的熔解温度比 LC3B 的熔解温度高 2°C 以上。优选的话，以上共价复合物的熔解温度比 LC3B 的熔解温度高 5°C 以上。共价复合物的蛋白质热力学稳定性可以用于检测共价复合物，及与 LC3B 有关的疾病的诊断和

10 治疗。

化合物 A 对 LC3B 的第 49 位赖氨酸的选择性

LC3B 一共有 9 个赖氨酸，为了探究化合物 A 的位点选择性，所有 9 个赖氨酸分别被突变为丙氨酸(K8A, K30A, K39A, K42A, K49A, K51A, K65A, K103A, K122A; SEQ ID

15 NO:7-15)。针对所有突变体的蛋白热迁移分析发现，除了 K49A 突变体，化合物 A 均能引起其他所有突变体的明显热迁移。而阳性对照多肽，LBP2 (SEQ ID NO:6) 均能引起所有突变体的明显热迁移。

选择性数据证实化合物 A 能选择性地修饰第 49 位赖氨酸，并不会修饰 LC3B 的其他赖氨酸。

20 LC3B 的第 49 位赖氨酸存在于 ATG8 的哺乳动物同源家族的所有蛋白。图 3 显示了第 46-55 位的第一个赖氨酸在哺乳动物同源家族蛋白中 (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 和 GABARAPL2; PDB 号分别为 3WAL, 3VTU, 3WAM, 1GNU, 2R2Q 和 4CO7) 高度保守。因此化合物 SM-LG 能有效共价修饰 ATG8 哺乳动物同源家族蛋白的第 46-55 位的第一个赖氨酸。

25 以下的文献作为实施上述实施例的参考文献。

- Kabsch, W. XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)
- M. D. Winn et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta. Cryst. D67, 235-242 (2011)
- Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta
5 Crystallogr. D 60, 2126–2132(2004)
- Adams, P. D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic
structure determination. Acta Crystallogr. D 58, 1948–1954 (2002)

质谱分析

10 为了进一步确证共价结合, LC3B(1-125) (SEQ ID NO:3) 蛋白分别与化合物 **B**, **C** 和 **D** 孵育进行质谱分析。

化合物和蛋白孵育给定时间后, 跑胶电泳分离, 合适大小的蛋白用胰蛋白酶消化。产生的多肽溶解后上样至与 EASY-nLC 1000 系统偶联的 C18 反相柱。多肽经洗脱后进行质谱分析和 Mascot 搜索。

15 如图 4 所示, 质谱分析确认化合物 **B** 共价修饰 LC3B 的第 49 位赖氨酸。(A) 反应机理; (B) b 类型和 y 类型离子。根据与 y3 和 b8 质量分析推断修饰发生在第 49 位赖氨酸上, 化合物 **B** 修饰上的部分对应 $C_{14}H_{12}O_2$ 的化学组成。

如图 5 所示, 质谱分析确认化合物 **C** 共价修饰 LC3B 的第 49 位赖氨酸。(A) 反应机理; (B) b 类型和 y 类型离子。根据与 y3 和 b8 质量分析推断修饰发生在第 49 位赖氨酸上, 化合物 **C** 修饰上的部分对应 $C_{13}H_{10}O_2$ 的化学组成。

20 如图 6 所示, 质谱分析确认化合物 **D** 共价修饰 LC3B 的第 49 位赖氨酸。(A) 反应机理; (B) b 类型和 y 类型离子。根据与 y3 质量分析推断发生修饰, 化合物 **D** 修饰上的部分对应 $C_{14}H_{12}O_3$ 的化学组成。

如图 4、5 和 6 所示, 质谱分析数据确证了化合物 SM-LG 对 LC3B 蛋白的共价修饰。

细胞自噬

25 为了探究化合物对细胞自噬功能的影响, 将 HeLa 细胞接种至 6 孔板中, 培养过夜, 加入 30 μ M 或 100 μ M 的化合物 **B** 处理 12h, 之后换无血清的培养基饥饿处理 24 小时。吸除培养基, 用 PBS 洗一遍, 加入 SDS-PAGE 用 2 \times 上样缓冲液裂解细胞。样品在 99 $^{\circ}$ C 煮沸 10 分钟, 经 SDS-PAGE 分离后, 使用 LC3B 抗体 (Novus) 进行 LC3-I/LC3-II 检测。

如图 7A 所示, LC3B 随化合物处理时间延长而出现累积。

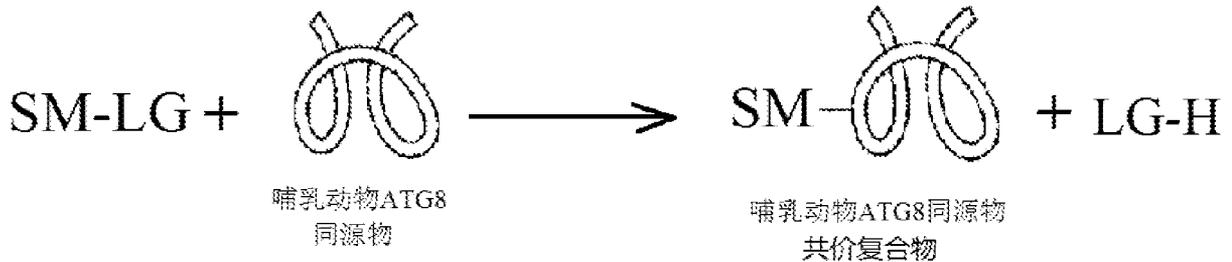
30 为了进一步探究化合物对细胞自噬体的影响, 将 HeLa 细胞接种至 6 孔板中的玻璃盖玻片上, 培养至细胞状态良好, 加入 30 μ M 或 100 μ M 的化合物 **B** 处理 12 小时, 之后换无血

清的培养基饥饿处理 24 小时。细胞先预冷 10 分钟后用 0.2% 的 Triton X-100 打孔处理，室温放置 10 分钟。然后用含 2.5% BSA 的 PBS 封闭处理后放置 4 度抗 LC3B 一抗孵育过夜，后用荧光二抗识别一抗并用 DAPI 对细胞核进行染色，置于显微镜下拍照。如图 7B 所示，相对对照组、化合物 38 处理后细胞自噬体出现累积，且浓度越高，累积越多。

- 5 应理解，在不脱离本发明范围和精神的情况下，本领域技术人员可以对本发明进行各种改动或修改，这对于本领域技术人员是显而易见的，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求

1、一种调节哺乳动物 ATG8 同源物的方法，包括：



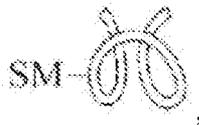
5 提供一个化合物 SM-LG，所述化合物 SM-LG 包括具有调节哺乳动物 ATG8 同源物的功能的部分 SM- 和离去部分-LG ；

所述化合物 SM-LG 与哺乳动物 ATG8 同源物反应产生哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述化合物 SM-LG 与哺乳动物 ATG8 同源物的反应是取代反应，优选是亲核取代反应。

10 3、根据权利要求 1 所述的方法，其中，LG-H 是一个小分子化合物，优选是水分子；SM-具有 α, β -不饱和羰基的结构。

4、一种哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，具有以下的结构：



其中，

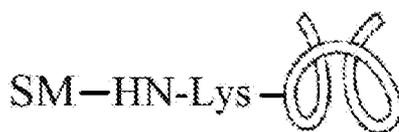


15 是哺乳动物 ATG8 同源物，

SM- 是具有调节哺乳动物 ATG8 同源物的功能的部分，优选具有 α, β -不饱和羰基的结构。

5、根据权利要求 1，2，或 3 所述的方法或根据权利要求 4 所述的哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，其中，SM- 通过共价键连接在所述哺乳动物 ATG8 同源物上。

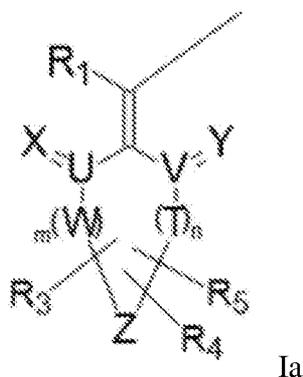
20 6、根据权利要求 5 所述的方法或哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，其中，SM- 通过共价键连接到所述哺乳动物 ATG8 同源物中第 46-55 位的第一个赖氨酸的 ϵ -氨基上，如下式所示：



其中，HN-Lys-表示哺乳动物 ATG8 同源物中第 46-55 位的第一个赖氨酸的 ϵ -氨基。

7、根据权利要求 6 所述的方法或哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，其中，所述哺乳动物 ATG8 同源物是 LC3B，优选地，SM- 通过共价键连接到 LC3B 的第 49 位的赖氨酸的 ϵ -氨基上。

8、根据权利要求 1-7 中任一项所述的方法或哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，其中，所述 SM- 具有如下通式 Ia 所示的结构：



Ia

在通式 Ia 中：

10 X 和 Y 各自独立地选自 O, S, NR_a , NOH 和 CH_2 ;

U 和 V 各自独立地选自 C, S, SO 和 POR_a ;

W、Z 和 T 各自独立地选自 O, S, SO, SO_2 , N, NR_a , CO, C, CR_a , 和 CH_2 ;

R_a 为氢或 C1-6 烷基;

m 为 0, 1, 2 或 3;

15 n 为 0, 1, 2 或 3;

R_1 选自氢, 氘, 未取代或用选自羟基和卤素的取代基取代的 C1-6 烷基, 和未取代或用选自卤素、羟基、C1-C6 烷基和 C1-C6 杂烷基的取代基取代的苯基;

20 R_3 、 R_4 和 R_5 各自独立地选自氢, 羟基, 氨基, 卤素, 氰基, 硝基, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, 未取代或用选自羟基、卤素和 C1-6 烷氧基的取代基取代的 C1-6 烷基, C1-6 杂烷基, C2-6 烯基, C2-6 炔基, 取代或未取代的 $-\text{CONH}_2$ -(C6-10 芳基), 取代或未取代的 $-\text{CH}=\text{CH}$ -(C6-10 芳基), 取代或未取代的 C6-10 芳基, 取代或未取代的 5-10 元杂芳基, 取代或未取代的 C3-10 环烷基, 取代或未取代的 C3-10 环烯基, 取代或未取代的 3-10 元杂环烷基, 取代或未取代的 3-7 元杂环烯基, 取代或未取代的 C6-10 芳基 C1-6 烷基, 取代或未取代的 C1-6 烷基 C6-10 芳基, 取代或未取代的 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基, 和取代或未取代的

C1-6 烷基 5-10 元杂芳基；

或者 R₃、R₄ 和 R₅ 中的两个相邻基团连接形成取代或未取代的 C6-10 芳基，取代或未取代的 5-10 元杂芳基，取代或未取代的 C3-10 环烷基或取代或未取代的 3-10 元杂环烷基；

所述“取代或未取代”中的“取代”表示被一个或多个选自氢，羟基，氨基，氰基，硝基，羧基，卤素，C1-6 烷基，C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基中的取代基取代；

并且满足下列条件之一：

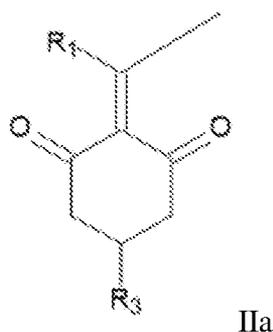
(1) 当 W、Z 或 T 上被 R₃、R₄ 和 R₅ 中的一个取代时，该 W、Z 或 T 是 N 或 CH；

(2) 当 W、Z 或 T 上被 R₃、R₄ 和 R₅ 中的一个基团取代且该基团与 R₃、R₄ 和 R₅ 中另一个相邻基团连接形成取代或未取代的 C6-10 芳基或取代或未取代的 5-10 元杂芳基时，该

W、Z 或 T 是 C；

(3) 当 W、Z 或 T 上被 R₃、R₄ 和 R₅ 中的二个取代时，该 W、Z 或 T 是 C。

9、根据权利要求 8 所述的方法或哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，其中，所述通式 Ia 为如下通式 IIa：



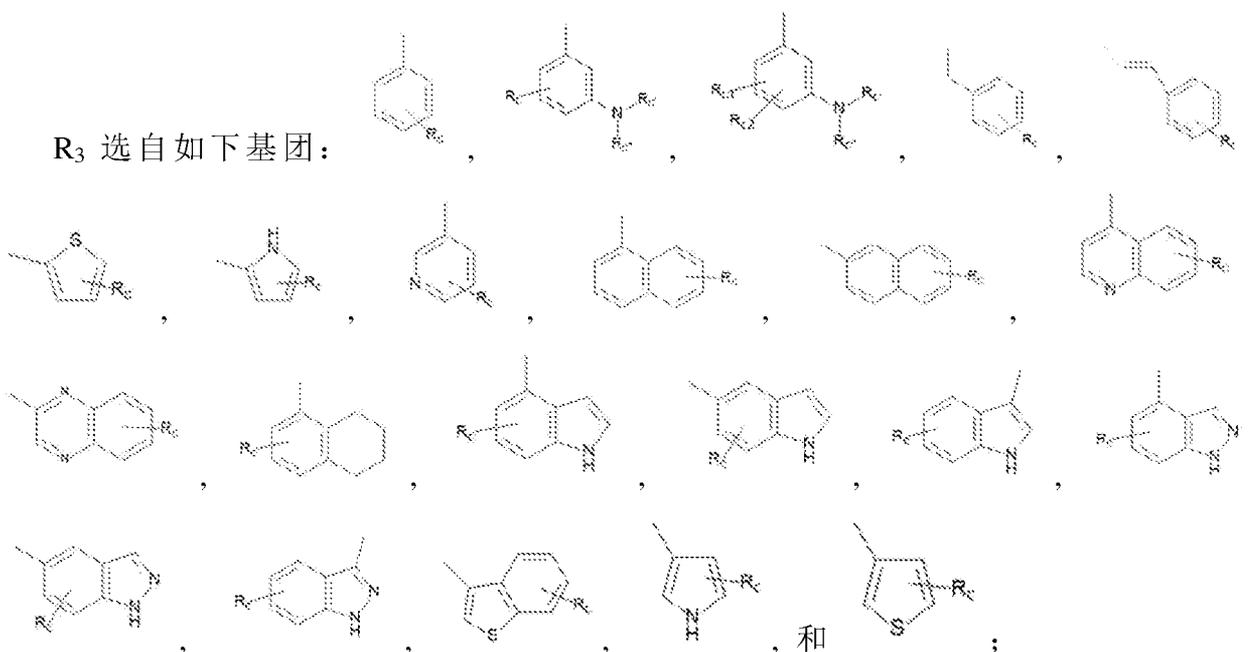
其中，R₁ 选自氢，氘，未取代或用选自羟基和卤素的取代基取代的 C1-6 烷基，和未取代或用选自卤素、羟基、C1-C6 烷基和 C1-C6 杂烷基的取代基取代的苯基；

R₃ 选自氢，羟基，氨基，卤素，氰基，硝基，羧基，甲酰基，酰胺基，酯基，未取代或用选自羟基、卤素和 C1-6 烷氧基的取代基取代的 C1-6 烷基，C1-6 杂烷基，C2-6 烯基，C2-6 炔基，取代或未取代的-CONH₂-(C6-10 芳基)，取代或未取代的-CH=CH-(C6-10 芳基)，取代或未取代的 C6-10 芳基，取代或未取代的 5-10 元杂芳基，取代或未取代的 C3-10 环烷基，取代或未取代的 C3-10 环烯基，取代或未取代的 3-10 元杂环烷基，取代或未取代的 3-7 元杂环烯基，取代或未取代的 C6-10 芳基 C1-6 烷基，取代或未取代的 C1-6 烷基 C6-10 芳基，取代或未取代的 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基，和取代或未取代的 C1-6 烷基 5-10 元杂芳基；

所述“取代或未取代”中的“取代”表示被一个或多个选自氢，羟基，氨基，氰基，硝基，羧基，卤素，C1-6 烷基，C1-6 卤代烷基或 C1-6 羟基烷基中的取代基取代。

10、根据权利要求 9 所述的方法或哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物，其中，

R₃ 选自如下基团：



5 其中，

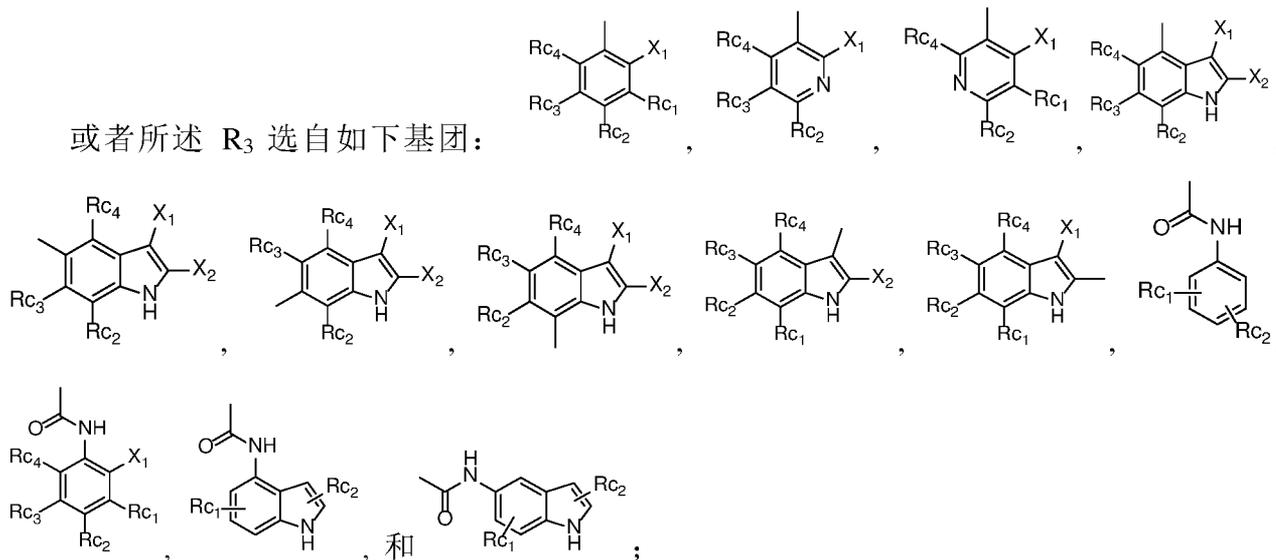
各 R_c, R_{c1}, R_{c2}, R_{c'}和 R_{c''}独立地选自氢, 羟基, 氨基, NR_aR_{a'}, 卤素, 氰基, 硝基, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C1-6 烷氧基烷基, C2-6 烯基, C2-6 炔基, C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 3-7 元杂环烯基, C1-6 烷基 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基或 C1-6 烷基

10 5-10 元杂芳基; 优选选自氢, 羟基, 氨基, NR_aR_{a'}, 卤素, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 取代或未取代的苯基或吡啶基;

R_a 为氢或 C1-6 烷基;

或者 R_{c1} 和 R_{c2} 连接形成 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基或 3-10 元杂环烷基;

15 或者所述 R₃ 选自如下基团：



其中, X₁ 为 F, Cl, Br, I 或三氟甲基;

X₂ 为 H, F, Cl, Br 或 I;

R_{c1}、R_{c2}、R_{c3} 和 R_{c4} 各自独立地选自氢, 羟基, 氨基, NRaRa', 卤素, 氰基, 硝基, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C1-6 烷氧基烷基, C2-6 烯基, C2-6 炔基, C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 3-7 元杂环烯基, C1-6 烷基 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基 C1-6 烷基, 和 C1-6 烷基 5-10 元杂芳基; 优选选自氢, 羟基, 氨基, NRaRa', 卤素, 羧基, 甲酰基, 酰胺基, 酯基, C1-6 卤代烷基, C1-6 羟基烷基, C1-6 杂烷基, C1-6 烷氧基, C3-10 环烷基, 3-10 元杂环烷基, 取代或未取代的苯基或吡啶基;

R_a 为氢或 C1-6 烷基;

10 或者 R_{c1} 和 R_{c2}, 或 R_{c2} 和 R_{c3}, 或 R_{c3} 和 R_{c4} 连接形成 C6-10 芳基, 5-10 元杂芳基, C3-10 环烷基, 和 3-10 元杂环烷基。

11、根据权利要求 1-10 中任一项所述的方法或哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物, 其中, 所述哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物熔解温度比哺乳动物 ATG8 同源物高至少 2 °C, 优选是高至少 5 °C。

15 12、根据权利要求 4-11 中任一项所述的哺乳动物 ATG8 同源物共价复合物用于制备诊断和治疗疾病的试剂的用途, 所述疾病选自: 肿瘤, 心血管疾病, 自身免疫性疾病, 神经退行性疾病, 高血压, 骨组织细胞及骨类疾病, 克罗恩氏病, 急性肾损伤, 脑缺血, 视网膜疾病, 支气管哮喘, Vici 综合征, 以及感染性疾病。

20 13、根据权利要求 12 所述的用途, 其中, 所述肿瘤选自肝癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、大肠癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

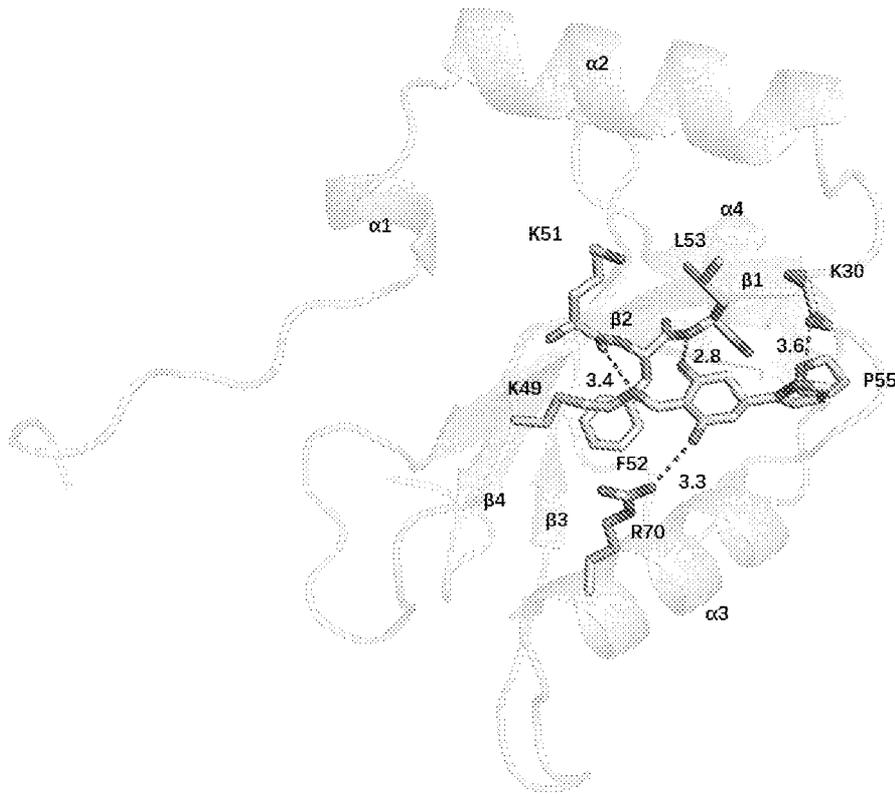


图 1A

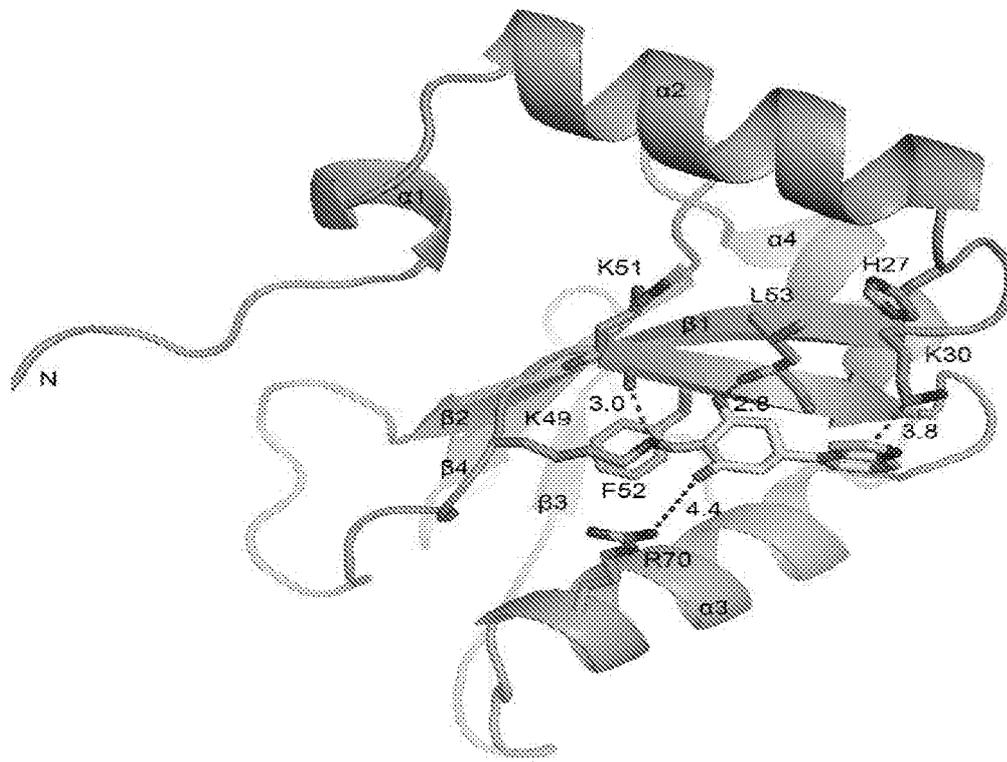


图 1B

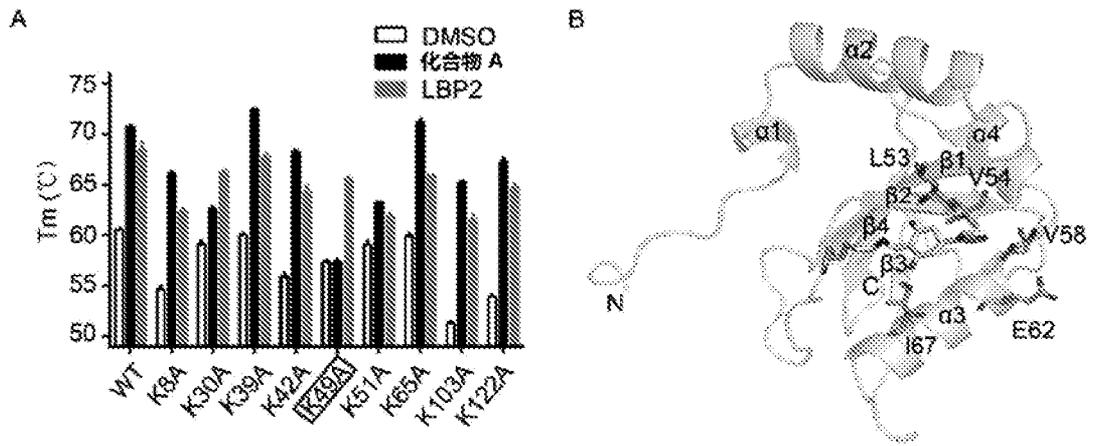


图 2

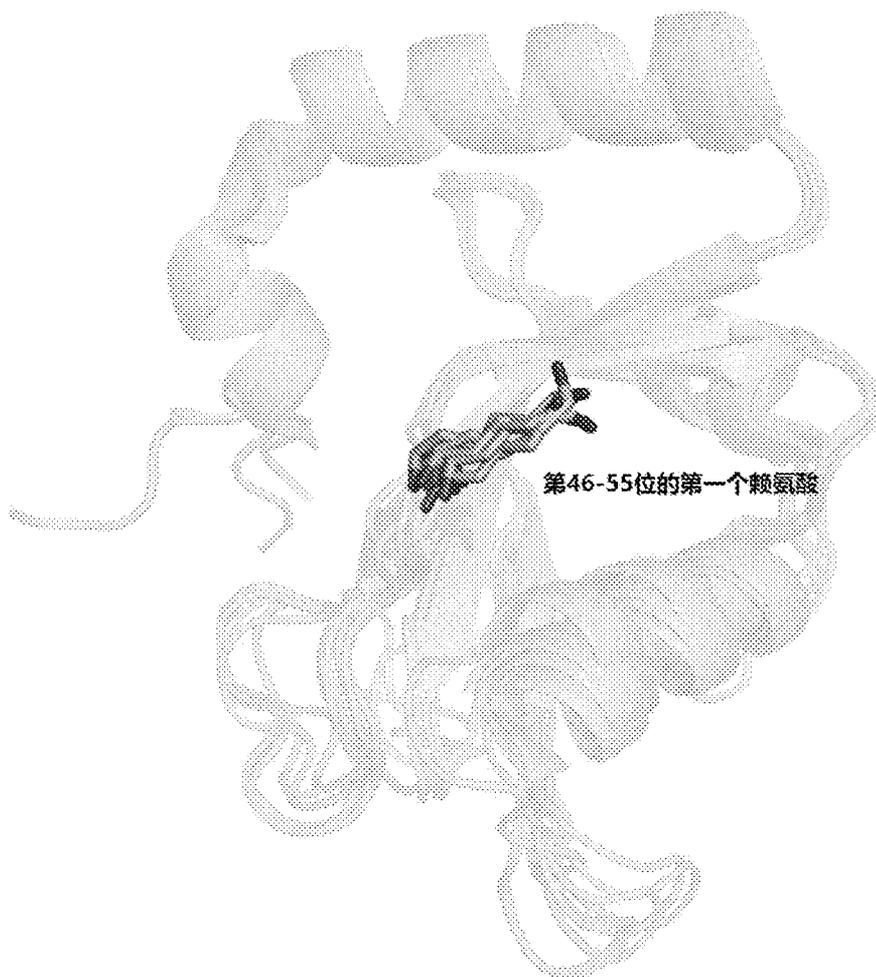


图 3

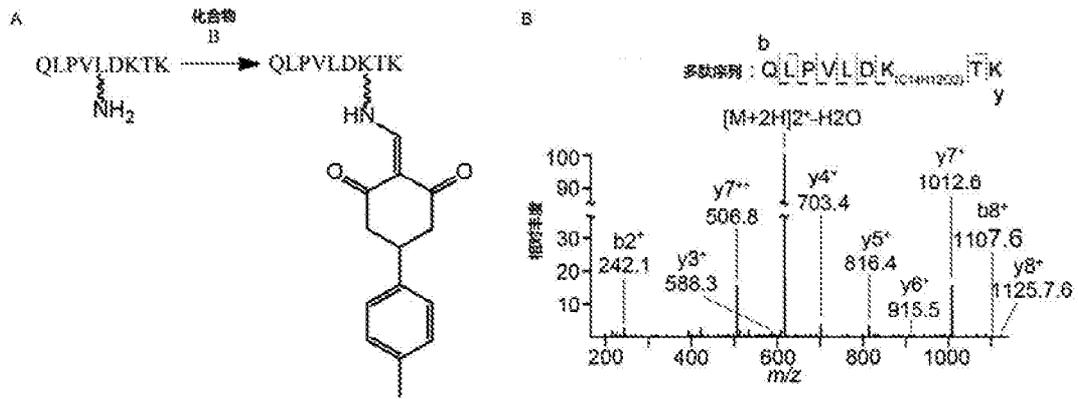


图 4

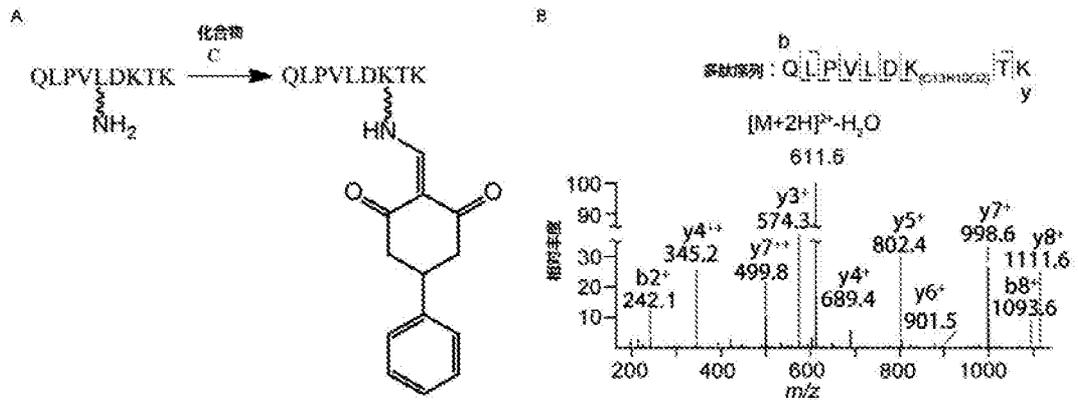


图 5

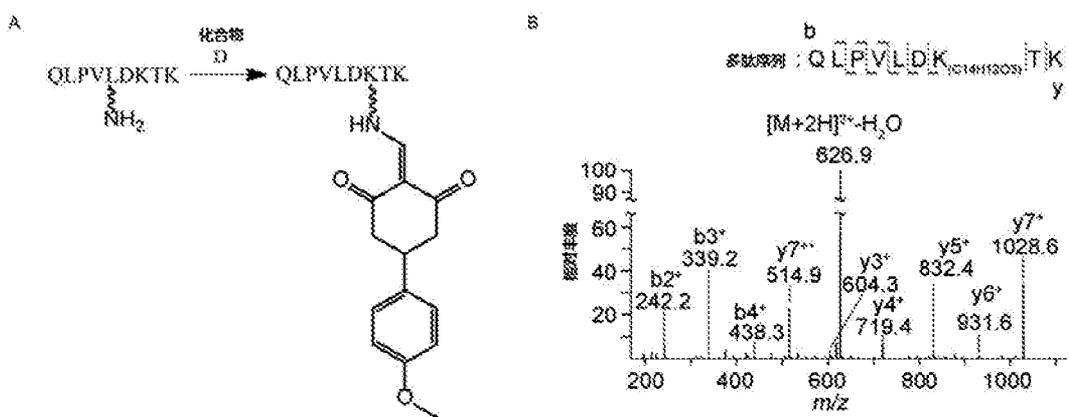


图 6

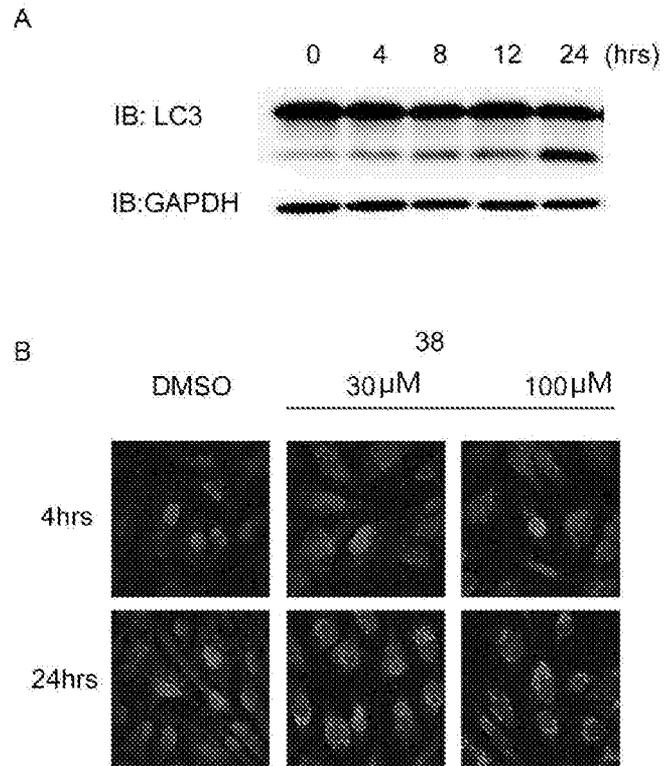


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/087449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/122(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 14/47(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 31/-, A61P 25/-, A61P 35/-, C07K 14/-

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)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI: 苏州偶领生物医药有限公司, 罗成, 姚志艺, 谢雨礼, 万伟, 乐立艳, 张元元, 蒋华良, 陈凯先, 共价键, 哺乳动物, 复合物, 癌症, ATG8, LC3, LC3B, autophagy, inhibitors, targeting, cyclohexane s dione

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102574816 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE ET AL.) 11 July 2012 (2012-07-11) claims 41-43, description, paragraph [0043], and figures 1-25	1-7
Y	CN 102574816 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE ET AL.) 11 July 2012 (2012-07-11) claims 41-43, description, paragraph [0043], and figures 1-25	8-13
Y	CANELA, M.D. et al. "Targeting the Colchicine Site in Tubulin through Cyclohexanedione Derivatives" <i>RSC Advances</i> , No. no. 6, 09 February 2016 (2016-02-09), 19492-19506	8-13
A	WO 2011019636 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. ET AL.) 17 February 2011 (2011-02-17) entire document	1-13
A	WO 2015164850 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 29 October 2015 (2015-10-29) entire document	1-13

 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

01 August 2018

Date of mailing of the international search report

24 August 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/087449**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011117588 A1 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) 19 May 2011 (2011-05-19) entire document	1-13
A	US 2009163545 A1 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 25 June 2009 (2009-06-25) entire document	1-13
A	CN 104042612 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM ET AL.) 17 September 2014 (2014-09-17) entire document	1-13
A	CN 105143263 A (AMGEN INC.) 09 December 2015 (2015-12-09) entire document	1-13
A	CANELA, M.D. et al. "Targeting the Colchicine Site in Tubulin through Cyclohexanedione Derivatives" <i>RSC Advances</i> , No. no. 6, 09 February 2016 (2016-02-09), 19492-19506	1-7
A	WO 2011033389 A2 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVE ET AL.) 24 March 2011 (2011-03-24) entire document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/087449

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102574816	A	11 July 2012	WO	2011011522	A2	27 January 2011
				PH	12012500097	A1	27 January 2011
				MX	2012000940	A	08 May 2012
				CA	2767772	A1	27 January 2011
				AU	2010276223	A1	08 March 2012
				KR	20120100886	A	12 September 2012
				PE	07982012	A1	27 July 2012
				EP	2456761	A2	30 May 2012
				BR	112012001316	A2	08 August 2017
				IN	1478DEN2012	A	05 June 2015
				JP	2013500255	A	07 January 2013
				IL	217502	D0	29 February 2012
				ZA	201201224	B	31 October 2012
				RU	2012105914	A	27 August 2013
				WO	2011011522	A3	25 August 2011
				SG	177486	A1	28 February 2012
				US	2012258975	A1	11 October 2012
WO	2011019636	A2	17 February 2011	WO	2011019636	A3	18 August 2011
				US	2012141491	A1	07 June 2012
WO	2015164850	A1	29 October 2015	US	2017044150	A1	16 February 2017
US	2011117588	A1	19 May 2011	WO	2009044846	A1	09 April 2009
				EP	2194141	A1	09 June 2010
				JP	5062578	B2	31 October 2012
				JP	WO2009044846	A1	10 February 2011
				EP	2194141	A4	20 October 2010
				CA	2697988	A1	09 April 2009
US	2009163545	A1	25 June 2009	JP	2011507910	A	10 March 2011
				AU	2008345225	A1	09 July 2009
				WO	2009086303	A2	09 July 2009
				WO	2009086303	A3	30 December 2009
				CA	2709784	A1	09 July 2009
				US	8642660	B2	04 February 2014
				EP	2219646	A2	25 August 2010
				EP	2219646	A4	22 December 2010
CN	104042612	A	17 September 2014	EP	2365802	A2	21 September 2011
				CA	2743491	C	11 October 2016
				US	2012064143	A1	15 March 2012
				WO	2010056754	A2	20 May 2010
				CA	2937492	A1	20 May 2010
				WO	2010056754	A3	19 August 2010
				HK	1202076	A1	18 September 2015
				CN	102292078	A	21 December 2011
				PT	2365802	T	14 November 2017
				EP	2365802	B1	02 August 2017
				CA	2743491	A1	20 May 2010
				ES	2645692	T3	07 December 2017
				DK	2365802	T3	13 November 2017
				EP	2365802	A4	20 June 2012
CN	105143263	A	09 December 2015	IL	239219	A	30 July 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/087449

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		BR 112015012933 A2	12 September 2017
		AU 2013355172 A1	11 June 2015
		TN 2015000247 A1	03 October 2016
		WO 2014089335 A2	12 June 2014
		CL 2015001507 A1	18 December 2015
		HK 1212711 A1	17 June 2016
		AU 2013355172 A2	06 August 2015
		WO 2014089335 A3	28 August 2014
		IL 239219 D0	30 July 2015
		US 2015344583 A1	03 December 2015
		PH 12015501284 A1	24 August 2015
		SG 11201504248W A	29 June 2015
		EA 201591091 A1	29 February 2016
		AP 201508507 D0	30 June 2015
		CA 2894257 A1	12 June 2014
		AR 093867 A1	24 June 2015
		KR 20150093744 A	18 August 2015
		AU 2013355172 A9	13 August 2015
		PE 11462015 A1	21 August 2015
		MX 2015007170 A	12 October 2015
		JP 2016500256 A	12 January 2016
		ZA 201504023 B	28 April 2016
		AP 201508507 A0	30 June 2015
		EP 2928922 A2	14 October 2015
		UY 35173 A	30 May 2014
		TW 201425336 A	01 July 2014
WO 2011033389 A2	24 March 2011	EP 2301347 A1	30 March 2011
		EP 2477491 B1	17 May 2017
		US 2012283101 A1	08 November 2012
		WO 2011033389 A3	10 November 2011
		ES 2641958 T3	14 November 2017
		EP 2477491 A2	25 July 2012
		BR 112012006173 A2	08 September 2015
		CA 2772737 C	05 June 2018
		US 9028855 B2	12 May 2015
		CA 2772737 A1	24 March 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/087449

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 31/122(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K 31/-, A61P 25/-, A61P 35/-, C07K 14/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI; 苏州偶领生物医药有限公司, 罗成, 姚志艺, 谢雨礼, 万伟, 乐立艳, 张元元, 蒋华良, 陈凯先, 共价键, 哺乳动物, 复合物, 癌症, ATG8, LC3, LC3B, autophagy, inhibitors, targeting, cyclohexane s dione</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102574816 A (哈佛大学校长及研究员协会 等) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 权利要求41-43, 说明书第[0043]段, 附图1-25</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102574816 A (哈佛大学校长及研究员协会 等) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 权利要求41-43, 说明书第[0043]段, 附图1-25</td> <td>8-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CANELA, Mar'ia-Dolores, et al. "Targeting the colchicine site in tubulin through cyclohexanedione derivatives" RSC Advances, 第6期, 2016年 2月 9日 (2016 - 02 - 09), 19492-19506</td> <td>8-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2011019636 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. 等) 2011年 2月 17日 (2011 - 02 - 17) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015164850 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2015年 10月 29日 (2015 - 10 - 29) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102574816 A (哈佛大学校长及研究员协会 等) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 权利要求41-43, 说明书第[0043]段, 附图1-25	1-7	Y	CN 102574816 A (哈佛大学校长及研究员协会 等) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 权利要求41-43, 说明书第[0043]段, 附图1-25	8-13	Y	CANELA, Mar'ia-Dolores, et al. "Targeting the colchicine site in tubulin through cyclohexanedione derivatives" RSC Advances, 第6期, 2016年 2月 9日 (2016 - 02 - 09), 19492-19506	8-13	A	WO 2011019636 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. 等) 2011年 2月 17日 (2011 - 02 - 17) 全文	1-13	A	WO 2015164850 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2015年 10月 29日 (2015 - 10 - 29) 全文	1-13
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 102574816 A (哈佛大学校长及研究员协会 等) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 权利要求41-43, 说明书第[0043]段, 附图1-25	1-7																		
Y	CN 102574816 A (哈佛大学校长及研究员协会 等) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 权利要求41-43, 说明书第[0043]段, 附图1-25	8-13																		
Y	CANELA, Mar'ia-Dolores, et al. "Targeting the colchicine site in tubulin through cyclohexanedione derivatives" RSC Advances, 第6期, 2016年 2月 9日 (2016 - 02 - 09), 19492-19506	8-13																		
A	WO 2011019636 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. 等) 2011年 2月 17日 (2011 - 02 - 17) 全文	1-13																		
A	WO 2015164850 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2015年 10月 29日 (2015 - 10 - 29) 全文	1-13																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2018年 8月 1日	2018年 8月 24日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																			
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	王险																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53962307																			

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	US 2011117588 A1 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) 2011年 5月 19日 (2011 - 05 - 19) 全文	1-13
A	US 2009163545 A1 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 2009年 6月 25日 (2009 - 06 - 25) 全文	1-13
A	CN 104042612 A (得克萨斯大学体系董事会 等) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-13
A	CN 105143263 A (安姆根有限公司) 2015年 12月 9日 (2015 - 12 - 09) 全文	1-13
A	CANELA, María-Dolores, et al. "Targeting the colchicine site in tubulin through cyclohexanedione derivatives" RSC Advances, 第6期, 2016年 2月 9日 (2016 - 02 - 09), 19492-19506	1-7
A	WO 2011033389 A2 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES 等) 2011年 3月 24日 (2011 - 03 - 24) 全文	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/087449

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	102574816	A	2012年 7月 11日	WO	2011011522	A2	2011年 1月 27日
				PH	12012500097	A1	2011年 1月 27日
				MX	2012000940	A	2012年 5月 8日
				CA	2767772	A1	2011年 1月 27日
				AU	2010276223	A1	2012年 3月 8日
				KR	20120100886	A	2012年 9月 12日
				PE	07982012	A1	2012年 7月 27日
				EP	2456761	A2	2012年 5月 30日
				BR	112012001316	A2	2017年 8月 8日
				IN	1478DEN2012	A	2015年 6月 5日
				JP	2013500255	A	2013年 1月 7日
				IL	217502	D0	2012年 2月 29日
				ZA	201201224	B	2012年 10月 31日
				RU	2012105914	A	2013年 8月 27日
				WO	2011011522	A3	2011年 8月 25日
				SG	177486	A1	2012年 2月 28日
				US	2012258975	A1	2012年 10月 11日
WO	2011019636	A2	2011年 2月 17日	WO	2011019636	A3	2011年 8月 18日
				US	2012141491	A1	2012年 6月 7日
WO	2015164850	A1	2015年 10月 29日	US	2017044150	A1	2017年 2月 16日
US	2011117588	A1	2011年 5月 19日	WO	2009044846	A1	2009年 4月 9日
				EP	2194141	A1	2010年 6月 9日
				JP	5062578	B2	2012年 10月 31日
				JP	WO2009044846	A1	2011年 2月 10日
				EP	2194141	A4	2010年 10月 20日
				CA	2697988	A1	2009年 4月 9日
US	2009163545	A1	2009年 6月 25日	JP	2011507910	A	2011年 3月 10日
				AU	2008345225	A1	2009年 7月 9日
				WO	2009086303	A2	2009年 7月 9日
				WO	2009086303	A3	2009年 12月 30日
				CA	2709784	A1	2009年 7月 9日
				US	8642660	B2	2014年 2月 4日
				EP	2219646	A2	2010年 8月 25日
				EP	2219646	A4	2010年 12月 22日
CN	104042612	A	2014年 9月 17日	EP	2365802	A2	2011年 9月 21日
				CA	2743491	C	2016年 10月 11日
				US	2012064143	A1	2012年 3月 15日
				WO	2010056754	A2	2010年 5月 20日
				CA	2937492	A1	2010年 5月 20日
				WO	2010056754	A3	2010年 8月 19日
				HK	1202076	A1	2015年 9月 18日
				CN	102292078	A	2011年 12月 21日
				PT	2365802	T	2017年 11月 14日
				EP	2365802	B1	2017年 8月 2日
				CA	2743491	A1	2010年 5月 20日
				ES	2645692	T3	2017年 12月 7日
				DK	2365802	T3	2017年 11月 13日
				EP	2365802	A4	2012年 6月 20日
CN	105143263	A	2015年 12月 9日	IL	239219	A	2015年 7月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/087449

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)
		BR 112015012933 A2	2017年 9月 12日
		AU 2013355172 A1	2015年 6月 11日
		TN 2015000247 A1	2016年 10月 3日
		WO 2014089335 A2	2014年 6月 12日
		CL 2015001507 A1	2015年 12月 18日
		HK 1212711 A1	2016年 6月 17日
		AU 2013355172 A2	2015年 8月 6日
		WO 2014089335 A3	2014年 8月 28日
		IL 239219 D0	2015年 7月 30日
		US 2015344583 A1	2015年 12月 3日
		PH 12015501284 A1	2015年 8月 24日
		SG 11201504248W A	2015年 6月 29日
		EA 201591091 A1	2016年 2月 29日
		AP 201508507 D0	2015年 6月 30日
		CA 2894257 A1	2014年 6月 12日
		AR 093867 A1	2015年 6月 24日
		KR 20150093744 A	2015年 8月 18日
		AU 2013355172 A9	2015年 8月 13日
		PE 11462015 A1	2015年 8月 21日
		MX 2015007170 A	2015年 10月 12日
		JP 2016500256 A	2016年 1月 12日
		ZA 201504023 B	2016年 4月 28日
		AP 201508507 A0	2015年 6月 30日
		EP 2928922 A2	2015年 10月 14日
		UY 35173 A	2014年 5月 30日
		TW 201425336 A	2014年 7月 1日
WO 2011033389 A2	2011年 3月 24日	EP 2301347 A1	2011年 3月 30日
		EP 2477491 B1	2017年 5月 17日
		US 2012283101 A1	2012年 11月 8日
		WO 2011033389 A3	2011年 11月 10日
		ES 2641958 T3	2017年 11月 14日
		EP 2477491 A2	2012年 7月 25日
		BR 112012006173 A2	2015年 9月 8日
		CA 2772737 C	2018年 6月 5日
		US 9028855 B2	2015年 5月 12日
		CA 2772737 A1	2011年 3月 24日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)