(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
2020 年 11 月 12 日 (12.11.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/224364 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/196 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12N 15/867* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/083442

(22) 国际申请日: 2020 年 4 月 7 日 (07.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910386493.X 2019年5月9日 (09.05.2019) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 夏宏光 (XIA, HongGuang); 中国浙江省杭州市余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。岑旭峰 (CEN, XuFeng); 中国浙江省杭州市余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。许正平 (XU, Zhengping); 中国浙江省杭州市余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。盛静浩 (SHENG, Jinghao); 中国浙江省杭州市余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 上海上谷知识产权代理有限公司 (SHANGHAI GOOIP CO., LTD.); 中国上海市徐汇区田林路487号26号楼512室, Shanghai 200233 (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, 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))。

(54) **Title:** APPLICATION OF MCL1 PROTEIN INHIBITOR IN PREPARATION OF DRUG FOR TREATING INFLAMMATION AND NEURODEGENERATIVE DISEASE

(54) 发明名称: MCL1蛋白抑制剂在制备治疗炎症及神经退行性疾病药物中的应用

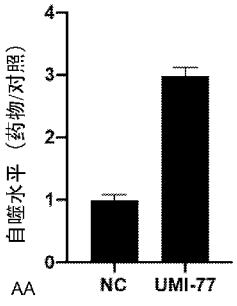


图 3

AA Autophagy level (drug control)

(57) **Abstract:** Provided is an application of an MCL1 protein inhibitor in the preparation of a drug for treating inflammation and a neurodegenerative disease. The effect of the MCL1 inhibitor UMI-77 for inducing mitochondrial autophagy is proposed. According to the effects thereof on acute hepatitis, inflammatory bowel disease, and APP/PS1 mouse models, UMI-77 has a significant inhibitory effect on inflammation, and can significantly ameliorate Alzheimer's disease.

(57) 摘要: MCL1蛋白抑制剂在制备治疗炎症及神经退行性疾病药物中的应用。提出了MCL1抑制剂UMI-77对线粒体自噬的诱导作用，通过对急性肝炎，炎症性肠病和APP/PS1小鼠模型中的效果来看，UMI-77对炎症有显著的抑制效果，对阿尔兹海默症有显著缓解效果。

WO 2020/224364 A1

MCL1 蛋白抑制剂在制备治疗炎症及神经退行性疾病药物中的应用

技术领域

本发明属于炎症治疗技术领域，具体地说，涉及一种 UMI-77 及其衍生物作为线粒体自噬诱导剂在制备治疗炎症及神经退行性疾病药物中的应用。

背景技术

线粒体自噬在炎症的抑制过程中发挥重要作用，而炎症是机体对抗感染的基本策略，同时也是导致疾病加重的主要原因，如某些神经退行性疾病，阿尔兹海默症。因此，筛选新的安全有效的线粒体自噬诱导剂是可能的抑制炎症，缓解疾病的治疗策略。现有的线粒体自噬诱导剂主要原理为破坏线粒体的功能，使细胞被迫发生线粒体自噬。虽然可以诱导线粒体自噬，但由于具有较大的毒性，并不能在临床应用中发挥作用。

目前并没有发现MCL1抑制剂可以作为线粒体自噬诱导剂，也没有以线粒体自噬诱导剂或者MCL1蛋白抑制剂为靶点的药物治疗炎症和阿尔兹海默症。

发明内容

本发明的目的在于提供一种线粒体自噬诱导剂及其应用。

本发明的第一方面，提供了一种 MCL1 蛋白抑制剂的用途，用于制备药物或组合物，所述药物或组合物用于选自下组的一种或多种用途：

（1）诱导线粒体自噬；

（2）预防或抑制炎症；

（3）预防或治疗炎症相关疾病； 和

（4）预防或治疗神经退行性疾病。

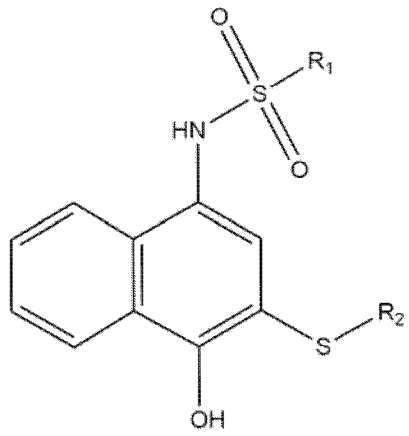
另一优选例中，所述炎症包括选自下组的组织中的炎症：脂肪组织、肾脏组织、肝脏组织、肌肉组织、皮肤组织、胰腺组织、肺组织、血管、心脏、骨骼、大脑、脊髓、视网膜、胃肠道组织、生殖系统，或其组合。

在另一优选例中，所述炎症包括肝炎（如急性肝炎）、肠炎（如溃疡性肠炎）、自身免疫疾病(如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎)、代谢疾病炎症（如糖尿病引起的肾炎）。

在另一优选例中，所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）、亨廷顿病（HD）、肌萎缩性侧索硬化（ALS）、多发性硬化症（MS）、不同类型脊髓小脑共济失调（SCA）、Pick 病。

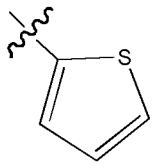
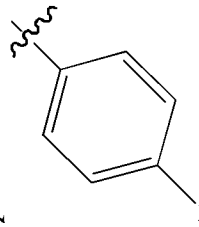
在另一优选例中，所述 MCL1 蛋白抑制剂包括专利文献 US2014/0235702A1 中公开的具有 MCL1 蛋白抑制活性的化合物。

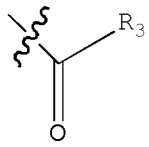
在另一优选例中，所述 MCL1 蛋白抑制剂为结构如式 I 所示的化合物或其药学可接受的盐：



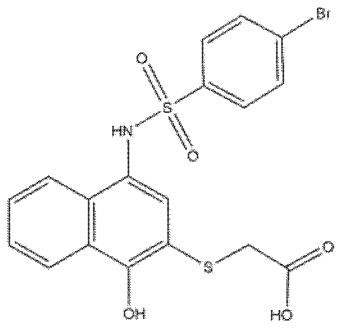
，I

其中，

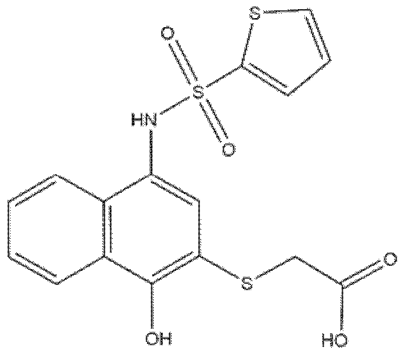
R1 为  、或 ，X 为卤素；

R2 为 ，R_3 为 H、卤素、或羟基。

在另一优选例中，所述 MCL1 蛋白抑制剂为化合物 UMI-77 或 UMI-59：



，UMI-77；



，UMI-59。

在另一优选例中，所述药物或组合物含有安全有效量的 MCL1 蛋白抑制剂，和药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述药物或组合物还包括抗氧化剂。

在另一优选例中，所述药物或组合物为单元剂型。

在另一优选例中，所述药物或组合物包括胃肠给药剂型或胃肠外给药剂型。

在另一优选例中，所述药物或组合物包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、糖浆、 乳剂、悬浮剂、注射剂、贴剂、滴剂、膏剂、栓剂或喷雾剂。

在另一优选例中，所述药物或组合物的施用方式包括口服、肌肉注射、静脉注射、静脉滴注、喷雾、或腹腔注射。

在另一优选例中，所述安全有效量指的是 5-1000mg/kg；优选的为 50-1000mg/kg。

在另一优选例中，所述的安全有效量包括 50-200mg/kg(小鼠)，或 500-1000mg/kg (人)。

在另一优选例中，所述的安全有效量为 100-700mg/kg，更优选地为 500-700mg/kg。

本发明的第二方面，提供了一种诱导线粒体自噬的方法，包括步骤：给需要的对象（如体外培养的细胞）施用 MCL1 蛋白抑制剂。所述 MCL1 蛋白抑制剂如上所述。

在另一优选例中，所述方法为体外非治疗性的方法。

在另一优选例中，所述 MCL1 蛋白抑制剂的浓度为约 0.001μM-1000 μM，优选地为约 0.1uM-100 μM。

本发明的第三方面，提供了一种促进 MCL1 蛋白和 LC3A 蛋白相互作用的方法，其中包括步骤：在包含 MCL1 蛋白和 LC3A 蛋白的体系中，施加 MCL1 蛋白抑制剂。所述 MCL1 蛋白抑制剂如上所述。

在另一优选例中，所述包含 MCL1 蛋白和 LC3A 蛋白的体系为细胞培养

液。

本发明的第四方面，提供了一种抑制炎症或治疗炎症相关疾病的组合物，所述组合物包括 MCL1 蛋白抑制剂。所述 MCL1 蛋白抑制剂如上所述。

在另一优选例中，所述组合物还包括药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述组合物还包括抗氧化剂。

本发明的第五方面，提供了一种预防或治疗神经退行性疾病的方法，所述方法包括步骤：给需要的对象施用安全有效量的 MCL1 蛋白抑制剂。所述 MCL1 蛋白抑制剂如上所述。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 是本发明验证人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 系统是否可以指征线粒体自噬；

图 2 是本发明对 2000 多个 FDA 批准的药进行高通量筛选；颜色深浅代表 586nm 激发荧光与阴性对照对比的强弱；颜色越深代表线粒体自噬诱导越强；

图 3 是本发明 33 个阳性药物二次验证，柱形图代表线粒体自噬诱导程度高低，越高代表诱导越强；实线是阴性对照基准线，虚线是 1.5 倍上升线；

图 4 是本发明 UMI-77 诱导线粒体标记蛋白 Tom20 和 Tim23 降解；

图 5 是本发明 UMI-77 处理细胞免疫杂交（western blot）检测 Caspase 3 的结果；

图 6 是本发明人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 系统在 UMI-77 处理下诱导线粒体自噬结果；图像为 biotek cytation3 拍摄,放大倍数 4X；红色(EM586 对应的上下两幅图）为 mtkeima586nm 激发荧光，代表发生线粒体自噬的线

粒体。绿色（EM469 对应的上下两幅图）为 488nm 激发荧光代表正常线粒体；

图 7 是本发明人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 细胞用 UMI-77 处理后活细胞拍摄激光共聚焦图片观察线粒体和溶酶体共定位；

图 8 是本发明 UMI-77 处理 HEK293T 和 Hela 细胞导致的线粒体通过溶酶体发生降解；

图 9 是本发明透射电子显微镜检测 UMI-77 处理 HEK293T 细胞后线粒体的结果；

图 10 是本发明小鼠血液检测谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活力测定结果，UMI-77 抑制肝细胞破损；

图 11 是本发明 HE（苏木精-伊红）染色小鼠肝脏切片显示 UMI-77 恢复肝细胞正常形态；

图 12 是本发明 UMI-77 诱导线粒体降解需要 MCL1 蛋白；

图 13 是本发明Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit试剂盒（购自 Sigma-Aldrich，#DUO92101）检测 MCL1 和 LC3A 相互作用；

图 14 是本发明免疫共沉淀实验显示 UMI-77 诱导 LC3A 和 MCL1 相互作用增强；

图 15 是本发明免疫共沉淀显示 MCL1 与 LC3A 相互作用通过 LIR motif 实现；

图 16 是本发明小鼠炎症性肠病模型及 UMI77 处理实验流程图；

图 17 是本发明小鼠体重统计结果，在 DSS 诱导小鼠炎症性肠病模型中，UMI77 可以显著性减缓体重下降幅度，提示其可以保护炎症性肠病；

图 18 是本发明小鼠疾病活动指数统计结果，疾病活动指数基于体重变化、小鼠便血和粪便性状计算获得；

图 19 是本发明小鼠结直肠代表性图，小鼠结直肠长度统计结果；

图 20 是本发明小鼠结直肠 HE 染色图，小鼠结直肠组织病理评分；

图 21 是本发明小鼠结直肠组织中炎症因子表达水平；

图 22 是本发明定位巡航实验记录每组小鼠的逃避潜伏期；

图 23 是本发明空间搜索实验记录小鼠穿过原平台的次数；

图 24 是本发明空间搜索实验记录有代表性小鼠的运动轨迹。

具体实施方式

本发明人通过广泛而深入的研究，意外发现MCL1蛋白抑制剂能够诱导线粒体自噬，并促进 MCL1 蛋白和 LC3A 蛋白相互作用。实验结果表明，MCL1蛋白抑制剂对炎症有显著的抑制效果，进而能够用于炎症相关疾病的预防或治疗。而且发现，MCL1蛋白抑制剂对阿尔兹海默症的治疗效果显著，因此能够用于神经退行性疾病的预防和治疗。在此基础上，完成了本发明。

在描述本发明之前，应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件，因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案，并且不意图是限制性的，本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

除非另外定义，否则本文中所用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。如本文所用，在提到具体列举的数值中使用时，术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于 1%。例如，如本文所用，表述“约 100”包括 99 和 101 和之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料，本文在此处例举优选的方法和材料。

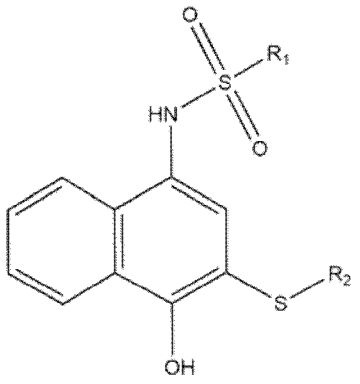
Mcl-1 及其抑制剂

Mcl-1(myeloid cell leukemia-1)蛋白是 Bcl-2(B-cell lymphoma-2)蛋白家族中重要的抗凋亡蛋白成员之一,在多种肿瘤细胞中过表达。Mcl-1 蛋白的过表达不仅与肿瘤的发生发展密切相关,还会导致肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性,因此以 Mcl-1 为靶点的小分子抑制剂是未来抗肿瘤药物研发的重点之一。

但是目前并没有发现MCL1抑制剂可以作为线粒体自噬诱导剂，也没有以线粒体自噬诱导剂或者MCL1蛋白抑制剂为靶点的药物治疗炎症和阿尔兹海默症。

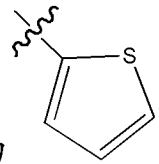
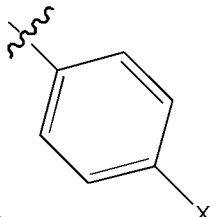
在本发明优选地实施方式中，所述 MCL1 蛋白抑制剂包括专利文献US2014/0235702A1 中公开的具有 MCL1 蛋白抑制活性的化合物。

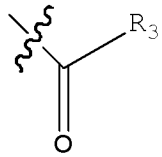
在另一优选例中，所述 MCL1 蛋白抑制剂的结构如式 I 所示：



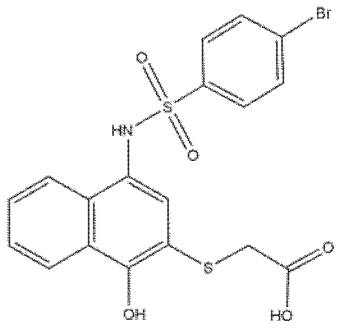
，I

其中，

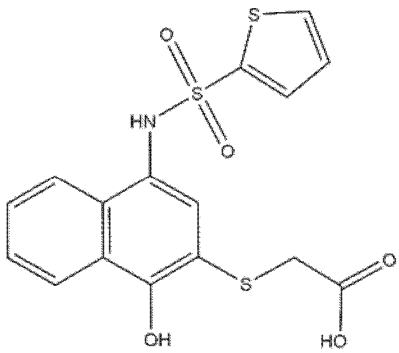
R1 为 、或 ，X 为卤素（如氟、氯、溴、碘，优选为溴）；

R2 为 ，R_3 为 H、卤素、或羟基。

在另一优选例中，所述 MCL1 蛋白抑制剂为化合物 UMI-77 或 UMI-59：



，UMI-77；



，UMI-59。

可用于本发明的 MCL1 蛋白抑制剂包括化合物本身或其衍生物，所述的衍生物的例子有化合物的多晶型、或其药学上可接受的盐，例如盐酸盐、

硫酸盐、磷酸盐、磺酸盐、碳酸盐、醋酸盐、酒石酸盐、甲酸盐、乙酸盐或羟乙基磺酸盐等。这些衍生物的制备通常可以通过常规技术手段获得，且其作用和效果可以根据细胞实验或等效性实验测试获得，均在本领域技术人员可以理解和预期的范围内。

本发明 MCL1 蛋白抑制剂或其衍生物可以直接用于所需的对象，或与药学上可接受的载体混合或经制备后，以组合物的形式进行施用。可用于本发明的 MCL1 蛋白抑制剂或其衍生物的施用剂量通常为 5-150mg/kg/d，例如 50-120mg/kg/d，优选为 80-90mg/kg/d。而该施用的剂量在临床医师或实验室人员的可预期范围内，例如可通过有效性、安全性测试，对其剂 量进行适当的调整，从而获得最优的施用剂量。

在本发明的一个优选地实施方式中，本发明提供了一种 UMI-77 作为线粒体自噬诱导剂在制备治疗炎症和神经退行性疾病药物中的应用。

具体地，本发明公开了一种 UMI-77 作为线粒体自噬诱导剂在制备治疗炎症及神经退行性疾病药物中的应用。

可选地，UMI-77 诱导线粒体进入溶酶体发生线粒体自噬。

可选地，炎症为急性肝炎或者炎症性肠病。

可选地，神经退行性疾病为阿尔兹海默症。

本发明还公开了一种人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 稳定细胞株，该细胞株于 2019 年 3 月 7 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号为：CCTCC NO:C201940。

本发明还公开了一种人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 稳定细胞株的构建方法，包括以下步骤：

1）慢病毒质粒准备：mtkeima 序列合成后通过酶切连接方法，连入慢病毒质粒 pCDH 中形成 pCDH-mtkeima，抽提无内毒素的质粒 pCDH-mtkeima，慢病毒包装质粒 pMD2.0G 和 psPAX2；

2）慢病毒制备：HEK293T 细胞以 $1*10^6$ 个/ml 密度种于 15cm 培养皿中，24 小时后转染三个质粒 pCDH-mtkeima，pMD2.0G 和 psPAX2，每个质粒 10μg；分别在转染后 48 小时和 72 小时，收集上清，合并上清并用 0.45μm 滤膜过滤，以每 30ml 过滤上清加入 7.5ml 病毒浓缩溶液的比例，加入适量的浓缩溶液，混匀后，以每隔 30 分钟颠倒混匀 3-5 次，共进行 4 次；4℃放置过夜，第二天 4000g，4℃离心 20 分钟，倒掉上清，用 1ml PBS 重悬病毒沉

淀，-80℃保存；

3）慢病毒感染：HEK293T 细胞以 5*10^5 个/ml 种于 10cm 培养皿中，24 小时后，将制作好的慢病毒从-80℃中取出，充分溶解后滴入细胞培养物中，48 小时后观察感染率，感染率大于 90%评价为合格，向合格的感染细胞培养物中加入 1μg/ml 的嘌呤霉素清除未感染的细胞，2-3 天后换液传代细胞，扩大培养，冻存细胞，得到人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 稳定细胞株。

药物或组合物

如本文所用，术语“药物或组合物”是指将用于特定目的而被施用的组合物，包括药物组合物或保健品组合物。

如本文所用，术语“活性成分”指的是 MCL1 蛋白抑制剂或其衍生物。

本发明活性成分或药物组合物的施用方式没有特别限制，代表性的施用方式包括（但并不限于）：口服、肌肉注射、静脉注射、静脉滴注、灌肠、喷雾、外敷、或腹腔注射。

用于口服给药的固体剂型包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、或胶囊剂。在这些固体剂型中，活性成分与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合，如柠檬酸钠或磷酸二钙，或与下 述成分混合：(a)填料或增容剂，例如，淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸；(b)粘合剂， 例如，羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶；(c)保湿剂，例如， 甘油；(d)崩解剂，例如，琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳 酸钠；(e)缓溶剂，例如石蜡；(f)吸收加速剂，例如，季胺化合物；(g)润湿剂，例如鲸蜡醇和 单硬脂酸甘油酯；(h)吸附剂，例如，高岭土；和(i)润滑剂，例如，滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、 固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠，或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中，剂型也可包含缓冲剂。

固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备，如肠衣和 其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂，并且，这种组合物中活性成分或化合物的释 放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。可采用的包埋组分的实例是聚合物质和 蜡类物质。必要时，活性成分也可与上述赋形剂中的一种或多种形成微胶囊形式。

用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮剂、糖浆或酊剂。 除了活性成分外，液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂，如水或其它溶剂，增溶 剂和乳化剂，例知，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺 以及油，特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物 等。

除了这些惰性稀释剂外，组合物也可包含助剂，如润湿剂、乳化剂和悬

浮剂、甜味 剂、矫味剂和香料。

除了活性成分外，悬浮液可包含悬浮剂，例如，乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山 梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、 悬浮液或乳液，和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和 非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

用于局部给药的本发明化合物的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷雾剂和吸入剂。 活性成分在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂，或必要时可能需要 的推进剂一起混合。

本发明化合物可以单独给药，或者与其他药学上可接受的化合物联合给药。

使用药物组合物时，是将安全有效量的本发明化合物适用于需要治疗的哺乳动物（如人），其中施用时剂量为药学上认为的有效给药剂量，对于60kg体重的人而言，日给药剂量通常为约1～2000mg，优选约6～600mg。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因 素，这些都是熟练医师技能范围之内的。通常其中“安全有效量”指的是：化合物的量足以明显改善病情，而不至于产生严重的副作用。

应用

本发明提供了 MCL1 蛋白抑制剂的临床新应用，即用于抑制炎症、预防或治疗炎症相关疾病，预防或治疗神经退行性疾病。本发明人发现MCL1蛋白抑制剂能够显著抑制炎症，并且对神经退行性疾病表现出了优异的治疗效果。

而用于细胞实验时，本发明活性成分还可以用于诱导培养中的细胞的诱导线粒体自噬，或者促进MCL1蛋白和LC3A蛋白相互作用。通常，培养的细胞中，所添加的本发明活性成分的浓度大约为0.001μM-1000μM，优选地为 0.01-100μM，该浓度可以根据所需达到的效果对添加的浓度进行进一步调整和验证，这均在本领域技术人员可以常规获得的范围内。

本发明中，术语“调节”包括治疗、预防或干扰。

术语“治疗”是指基于治愈、缓解、改善、减轻、影响治疗对象疾病、症状、疾病体质(predisposition)的目的而给予需要治疗的对象本发明的活性成分。

术语“治疗对象”是指鼠、人及其他哺乳动物。

术语“炎症”指有一种或多种以下病症特征。如疼痛、发热、发红、肿大、暂时性或永久性功能缺失。炎症有很多表现形式，包括但不限于，急性、

粘性、萎缩性、卡他性、慢性、硬化、弥漫性、散布性、渗出性、含纤维性、成纤维性、局部、肉芽肿、增生性、肥大性、间质性、转移性、坏死性、闭塞性、实质性、可塑性、产生性、增殖性、假膜性、化脓性、致硬化性、浆液纤维蛋白性、血浆性、单纯性、特异性、亚急性、催脓性、毒性、外伤性、和/或溃疡性。更进一步的，炎症还包括，但不限于以下血管表象(多动脉炎，颞动脉炎)；关节表象(关节炎——结晶性、骨骼性、牛皮癣、反应性、风湿性、赖特性)；胃肠道表象(结肠炎)；皮肤(皮炎)；或多种组织和器官的表象(全身性红斑狼疮)。

所述炎症包括选自下组的组织中的炎症：脂肪组织、肝脏组织、肌肉组织、皮肤组织、胰腺组织、肺组织、血管、心脏、骨骼、大脑、脊髓、视网膜、胃肠道组织、生殖系统，或其组合。

术语“炎症相关疾病”包括：多发性硬化症、炎症性肠病、关节炎、肝纤维化、肺纤维化等。

术语“神经退行性疾病” 包括：阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）、亨廷顿病（HD）、肌萎缩性侧索硬化（ALS）、不同类型脊髓小脑共济失调（SCA）、Pick 病等。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1）本发明通过建立线粒体自噬的高通量筛选模型，通过 mtkeima 蛋白的特性，可以方便的指征线粒体自噬；筛选到可以温和诱导线粒体自噬的诱导剂 UMI-77；UMI-77 为 MCL1 蛋白的特异性抑制剂。

2）本发明 MCL1 抑制剂 UMI-77 对线粒体自噬的诱导作用，MCL1 抑制剂 UMI-77 作为线粒体自噬诱导剂的新功能。同时 MCL1 抑制剂都可以作为线粒体自噬诱导剂的可能性。

3）本发明 UMI-77 对与炎症的显著抑制效果；通过对急性肝炎和炎症性肠病小鼠模型中的效果来看，UMI-77 对炎症有显著的抑制效果。

4）本发明 UMI-77 对阿尔兹海默症的治疗效果显著；通过对 APP/PS1 小鼠模型中的效果来看，UMI-77 对阿尔兹海默症有显著的改善效果。

当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

下面结合具体实施例，进一步详陈本发明。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。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如美国 Sambrook. J 等著《分子克隆实验室指南》（黄培堂等译，北京：科学出版社，2002 年）中所述的条件，或按照制造厂

商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

实施例 1 线粒体自噬的高通量筛选模型的建立：

本发明利用 Keima 荧光蛋白和线粒体定位序列融合成 mtKeima 蛋白，并以此构建人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 稳定细胞株；构建步骤：

1）慢病毒质粒准备：mtkeima 序列根据北京博尔迈生物技术有限公司(MBL BEIJING BIOTECH CO., LTD) 公司质粒 pMitophagy Keima-Red mPark2 (Hyg)中提供的 MT-mKeima-Red 序列全基因合成后通过酶切连接方法，连入慢病毒质粒 pCDH 中形成 pCDH-mtkeima，抽提无内毒素的质粒 pCDH-mtkeima，慢病毒包装质粒 pMD2.0G 和 psPAX2。

2）慢病毒制备：HEK293T 细胞以 $1*10^6$ 个/ml 密度种于 15cm 培养皿中，24 小时后转染三个质粒 pCDH-mtkeima，pMD2.0G 和 psPAX2，每个质粒 10μg。分别在转染后 48 小时和 72 小时，收集上清，合并上清并用 0.45μm 滤膜过滤，以每 30ml 过滤上清加入 7.5ml 病毒浓缩溶液的比例，加入适量的浓缩溶液，混匀后，以每隔 30 分钟颠倒混匀 3-5 次，共进行 4 次。4℃放置过夜。第二天 4000g，4℃离心 20 分钟，倒掉上清，用 1ml PBS（磷酸缓冲液）重悬病毒沉淀。-80℃保存。

3）慢病毒感染：HEK293T 细胞以 $5*10^5$ 个/ml 种于 10cm 培养皿中，24 小时后，将制作好的慢病毒从负 80 度冰箱中取出，充分溶解后滴入细胞培养物中，48 小时后观察感染率，感染率大于 90%评价为合格。向合格的感染细胞培养物中加入 1μg/ml 的嘌呤霉素清除未感染的细胞，2-3 天后换液传代细胞，扩大培养，冻存细胞，得到人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 稳定细胞株，其细胞株于 2019 年 3 月 7 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号为：CCTCC NO：C201940。

利用 keima 蛋白在酸性条件下激发光为 586nm，中性条件下激发光为 440nm 指征线粒体自噬的发生，并利用高通量成像系统 biotek cytation3 和软件分析，以（586nm 阳性细胞数/440nm 全细胞数）为指标进行高通量定量分析。

1、实验方法：人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 细胞以 $1.5*10^5$ 个/ml 种于 96 孔黑色酶标板中，每孔种 100μl，24 小时后替换培养基为 KH buffer 和 PBS，每个处理 3 个重复，于 37℃，5%CO_2 培养条件下，处理 4 小时后，

直接于 biotek cytation3 拍照。以 469nm 激发光做对焦通道，每孔拍摄 4 张图片，利用仪器软件处理图像。

如图 1 所示，KH buffer 和 PBS 为阳性对照，可以诱导自噬（包括线粒体自噬），KH buffer(KH 缓冲液)和 PBS（磷酸缓冲液）处理细胞后，586nm 激发的荧光明显上升，而 NC（未作处理的）没有明显上升。

2、实验方法：人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 细胞以 $1.5*10^5$ 个/ml 种于 96 孔黑色酶标板中，每孔种 100μl。24 小时后替换阳性对照孔培养基为 KHbuffer 和 PBS，每个处理 3 个重复。用安捷伦 bravo 自动化液体处理平台高通量加入 FDA 批准的药物，每孔加入 10μM 的药物，于 37℃，5%CO_2 培养条件下，处理 6 小时后，直接于 biotek cytation3 拍照。以 469nm 激发光做对焦通道，每孔拍摄 4 张图片，利用仪器软件处理图像。并以（586nm 阳性细胞数/469nm 全细胞数）为指标进行统计分析，Graphpad 处理数据以热图展示。

如图 2 所示，对 2000 多个 FDA 批准的药进行高通量筛选，图像处理后，以（586nm 阳性细胞数/440nm 全细胞数）为指标进行统计分析，以热图方式展示。红色深浅代表 586nm 激发荧光与阴性对照对比的强弱。红色越强代表线粒体自噬诱导越强。

如图 3 所示，UMI-77 诱导线粒体自噬（mtkeima 信号），柱形图代表线粒体自噬诱导程度高低，越高代表诱导越强。

实施例 2 有效线粒体自噬诱导剂 UMI-77 的确证：

1、实验方法：HEK293T 细胞以 $2*10^5$ 个/ml，Hela 细胞和 U2OS 细胞以 $1.5*10^5$ 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml。每个细胞种 6 个孔。24 小时后，分别在 0 小时，3 小时，6 小时，9 小时加入 UMI-77，终浓度为 5μM。在 12 小时统一用 250μl 2XSDS 上样缓冲液收样。100℃加热 10 分钟。免疫杂交：每个样品上样 10μl，电泳 90V2h；转膜 300mA，1h。5%脱脂牛奶室温封闭 1h，抗体(Tom20 抗体购自Cell Signaling Technology，#42406S；Tim23 抗体购自 Proteintech，#11123-1-AP；Tubulin 抗体购自杭州华安生物技术有限公司，#M1305-2；Calnexin 抗体购自Cell Signaling Technology，#2433S) 以一定稀释比（Tubulin 抗体为 1：5000，其余为 1：1000）4 度孵育过夜，PBST（磷酸盐缓冲液+0.1%Tween20）洗涤 3 遍每次 10 分钟。二抗（Goat anti-Mouse

IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific,#31430;Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31460）以 1：20000 稀释比室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 遍每次 10 分钟。ECL 显色。

如图 4 所示，免疫杂交（western blot）检测发现，UMI-77 在 HEK293T，Hela 和 U2OS 细胞中以时间依赖的方式导致线粒体标记蛋白 Tom20 和 Tim23 降解，而不影响内质网标记蛋白 Calnexin 的降解。

2、实验方法：U2OS 细胞以 1.5*10^5 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml，5 个孔。24 小时后，分别在 0 小时，12 小时，24 小时，36 小时加入 UMI-77，终浓度为 7.5μM。在 48 小时统一用 250μl 2XSDS 上样缓冲液收样。收样前 3 小时加入星形孢菌素终浓度 1μM。100 度加热 10 分钟。免疫杂交：每个样品上样 10μl，电泳 90V2h；转膜 300mA，1h。5%脱脂牛奶封闭 1h，抗体（Tom20 抗体购自Cell Signaling Technology，#42406S；Caspase 3 抗体购自Cell Signaling Technology，#9662；LC3B 抗体购自 Sigma-Aldrich，#L8918；LC3C 抗体购自 Proteintech，#18726-1-AP；Tubulin 抗体购自杭州华安生物技术有限公司，#M1305-2）以一定稀释比（Tubulin 抗体为 1：5000，其余为 1：1000）4 度孵育过夜，PBST 洗涤 3 遍每次 10min。二抗（Goat anti-Mouse IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31430；Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31460）以 1：20000 稀释比室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 遍每次 10 分钟。ECL 显色。

如图 5 所示，免疫杂交（western blot）检测发现，UMI-77 在 U2OS 细胞中并没有诱导细胞凋亡关键蛋白 Caspase3 的激活。STS 为星形孢菌素(Staurosporine)，是一种细胞凋亡诱导剂，在本实验中作为阳性对照。

3、实验方法：人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 细胞以 1.5*10^5 个/ml 种于 96 孔黑色酶标板中，每孔 100μl；24 小时后加入 UMI-77 终浓度 10μM，设置 3 个重复；于 37 度，5%CO_2 培养条件下，处理 6 小时后，直接于 biotek cytation3 拍照。以 469nm 激发光做对焦通道，每孔拍摄 4 张图片，利用仪器软件处理图像。

如图 6 所示，验证人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 系统是否可以在 UMI-77 处理下诱导 586nm 激发荧光上升。UMI-77 处理人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 细胞后，586nm 激发的荧光明显上升，而 NC（未作处理的）没有明显上升，因此，UMI-77 可以诱导线粒体进入溶酶体发生线粒体

自噬。

4、实验方法：人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 细胞以 $1.5*10^5$ 个/ml 种于活细胞专用培养皿中，每皿 2ml。24 小时后用 LysoGreen（溶酶体特异探针）（1000X）染色 30 分钟，替换新鲜培养基后，加入 UMI-77，终浓度 10μM, 30 分钟后置于 Zesis LSM 880 with AiryScan 激光共聚焦显微镜下活细胞培养，并连续拍摄 1 小时，每隔 30 秒拍一张照片。取 240 秒到 450 秒照片呈现。

如图 7 所示，加入 UMI-77 处理后线粒体被溶酶体包裹，发生共定位；没有处理的细胞没有任何共定位。

5、实验方法：HEK293T 细胞以 $2*10^5$ 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml，5 个孔。Hela 细胞以 $1.5*10^5$ 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml，5 个孔。24 小时后，加入 UMI-77，终浓度为 5μM，处理 24 小时，在收样前 12 小时加入 MG132 2μM，E64D 2μM 和氯化铵 20mM，Leupeptin（亮抑蛋白酶肽）50μM。在 24 小时统一用 250μl 2XSDS 上样缓冲液收样。100 度加热 10 分钟。免疫杂交：每个样品上样 10μl，电泳 90V 2h；转膜 300mA，1h。5%脱脂牛奶封闭 1h，抗体(Tom20 抗体购自 Cell Signaling Technology，#42406S；Tim23 抗体购自 Proteintech，#11123-1-AP；Tubulin 抗体购自杭州华安生物技术有限公司，#M1305-2) 以一定稀释比（Tubulin 抗体为 1：5000，其余为 1：1000）4 度孵育过夜，PBST 洗涤 3 遍每次 10min。二抗（Goat anti-Mouse IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31430；Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31460）以 1：20000 稀释比室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 遍每次 10 分钟，ECL 显色。

如图 8 所示，加入溶酶体抑制剂后阻止了 UMI-77 介导的线粒体标记蛋白降解，而蛋白酶体抑制剂 MG132 并没有阻止。

6、实验方法：HEK293T 细胞以 2*105 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml，5 个孔。24 小时后，加入 UMI-77，终浓度为 5μM，处理 24 小时，在收样前 12 小时加入 E64D 2μM 和氯化铵 20mM，Leupeptin（亮抑蛋白酶肽）50μM。用戊二醛固定后进行电镜样品制备检测。

如图 9 所示，UMI-77 处理后在溶酶体抑制剂存在情况下，明显观察到线粒体被自噬溶酶体包裹。

筛选得到的有效线粒自噬诱导剂 UMI-77 具有以下特点：

1）线粒体标记蛋白 Tom20 和 Tim23 降解，同时其他细胞器的标记蛋白不降解，如内质网的标记蛋白 Calnexin 不降解；

2）线粒体与溶酶体共定位，如用荧光标记线粒体和溶酶体，活细胞观察其共定位增加；

3）线粒体降解通过溶酶体通路，如加入溶酶体抑制剂 E64D 或氯化铵和 Leupeptin（亮抑蛋白酶肽）可以阻止线粒体标记蛋白 Tom20 和 Tim23 的降解；

4）线粒体会被自噬溶酶体膜包裹，如用电镜观察可以看到多个线粒体被自噬溶酶体包裹。

实施例 3 线粒体自噬诱导剂 UMI-77 用于炎症的治疗的应用

1、实验方法：C57BL/6 遗传背景的雄性 4-8 周龄小鼠购于南京模式动物中心。分为 4 组，每组 6 只，正常饲养 1 周适应后进行实验。全部药物溶于 2%DMSO+30%PEG400+水的溶剂中。对每只小鼠称重，按照体重以 UMI-77 30mg/kg，Nec1 2.5mg/kg 腹腔注射药物 200μl。LPS 诱导组腹腔注射 200μl 溶剂。NC 组不做处理。20 分钟后注射 LPS/D-Gal（脂多糖/D-半乳糖胺）浓度（LPS：100μg/kg，D-Gal：400mg/kg）。6 小时后，眼球采血，并取出肝脏多聚甲醛固定。新鲜血液室温静置 30 分钟后，2000 转每分钟，离心 10 分钟，取上清，用全自动生化分析仪测定 ALT（谷丙转氨酶），AST（谷草转氨酶）活力。肝脏固定后做 HE（苏木精—伊红）染色。

如图 10 所示，LPS/D-Gal（脂多糖/D-半乳糖胺）诱导小鼠急性肝炎模型中，UMI-77 可以显著抑制肝损伤。Nec1 为已知的 RIPK1 蛋白抑制剂，UMI-77 的效果好于 Nec1。

如图 11 所示，LPS/D-Gal（脂多糖/D-半乳糖胺）诱导小鼠急性肝炎模型中，UMI-77 可以显著抑制肝损伤。UMI-77 恢复肝细胞的完整性。

实施例 4 UMI-77 通过诱导 MCL1 与 LC3A（自噬标记物蛋白）相互作用诱导线粒体自噬

1、实验方法：

1)MCL1shRNA 载体的构建。

根据网站 https://dharmacon.horizondiscovery.com 上设计两个 MCL1

shRNA 序列，并在两端加入 BamHI 和 EcoRI 酶切位点，送交上海生工生物合成。合成好的序列退火后连入 pLV3 载体形成 pLV3-M2，pLV3-M5。

2）HEK293T 细胞以 2*10^5 个/ml，Hela 细胞以 1.5*10^5 个/ml 的密度种于 6 孔板中，每孔 2ml。每个细胞种 6 个孔。转染 pLV3-M2，pLV3-M5 入细胞，每个孔转入 1μg shRNA 质粒。转染方法：预先分别混合 50μl 无血清的 DMEM 培养基和 1μg DNA，50μl 无血清的 DMEM 培养基和 2μl lip2000。最后将两个组分混合，室温静置 20 分钟，滴入培养基中。转染 48 小时后，加入 UMI-77 5μM，处理 12 小时后统一用 250μl 2X SDS 上样缓冲液收样。100 度加热 10 分钟。免疫杂交：每个样品上样 10μl，电泳 90V 2h；转膜 300mA，1h。5%脱脂牛奶室温封闭 1h，抗体(Tom20 抗体购自 Cell Signaling Technology，#42406S；Tim23 抗体购自 Proteintech，#11123-1-AP；Tubulin 抗体购自杭州华安生物技术有限公司，#M1305-2，MCL1 抗体购自杭州华安生物技术有限公司，#ET1606-14)以一定稀释比（Tubulin 抗体为 1：5000，其余为 1：1000）4 度孵育过夜，PBST（磷酸盐缓冲液+0.1% Tween 20）洗涤 3 遍每次 10 分钟。二抗（Goat anti-Mouse IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31430；Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31460）以 1：20000 稀释比室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 遍每次 10 分钟。ECL 显色。

由图 12 可知，基因敲低实验后免疫杂交显示，MCL1 蛋白被 RNA 干扰后表达量下降，此时再加入 UMI-77 后不能诱导线粒体标记蛋白 Tom20 和 Tim23 的降解。

2、实验方法：HEK293T 细胞以 2*10^5 个/ml，接种于 12 孔板，每孔 1ml，并预先在板中铺入免疫荧光载玻片。24 小时后，加入 UMI-77 10μM 处理 5 小时，去除培养基，用 PBS 洗涤两遍，加入适量的 4%多聚甲醛固定 20 分钟。用 PBS 洗涤两遍，用Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit试剂盒（购自 Sigma-Aldrich，#DUO92101）中的 Blocking 溶液封闭 60 分钟，37 度。之后用上述试剂盒中的抗体稀释液稀释抗体 （MCL1 抗体购自 santa cruz，#sc-69840，1：200 稀释），LC3A 抗体购自 Abcam，#ab62720，1：500 稀释），4 度孵育过夜。用试剂盒中的洗涤试剂 A 洗涤片子 2 遍，每次 10 分钟。按照试剂盒的说明孵育二抗 Anti-rabbit-PLUS 和 Anti-mouse-MINUS,37 度 60 分钟。之后同样用洗涤试剂 A 洗涤片子 2 遍，按照试剂盒的说明用连

接酶 37 度连接 30 分钟。之后同样用洗涤试剂 A 洗涤片子 2 遍，按照试剂盒的说明等温扩增 37 度 120 分钟。最后用洗涤试剂 B 洗涤，用带有 DNA 染料 DAPI 的封片试剂封片。biotek Cytation3 拍照，并用软件分析荧光强度和个数。

由图 13 可知，用Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit试剂盒（购自 Sigma-Aldrich，#DUO92101）在 HEK293T 细胞中检测内源的 MCL1 与 LC3A 相互作用。红色的点代表相互作用，红色点越多或者荧光强度变强说明其相互作用越强。UMI-77 可以明显诱导红点变多，说明 MCL1 和 LC3A 相互作用增强。

3、实验方法：HEK293T 细胞以 $2*10^5$ 个/ml，接种于 10cm 培养皿。24 小时后，共转染 pCMV3-MCL1-3xFlag 和 pCDNA3.1-HA-LC3A 或 pCDNA3.1-HA-LC3B 质粒，每个各 4μg。转染方法：预先分别混合 500μl 无血清的 DMEM 培养基和 8μg DNA，500μl 无血清的 DMEM 培养基和 16μl PEI（聚乙烯亚胺）转染试剂。最后将两个组分混合，室温静置 20 分钟，滴入培养基中。转染 24 小时后加入 UMI-77 10μM 处理 5 小时后，用 PBS 洗涤细胞两遍。用 RIPA（20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4, 1mM EDTA）裂解液每个样品 1ml， 4 度裂解 30 分钟。用枪头将细胞刮下，连同液体一同转移到 1.5ml 离心管中，4 度 12000g 离心 10 分钟，取上清转移到新管中。从裂解好的上清中取出 50μl 样品加入等体积的 2X SDS 上样缓冲液收样，100 度煮沸 10 分钟，作为 Input 样品。取适量的偶联有 Flag 抗体的琼脂糖凝胶，用 RIPA 裂解液洗涤 3 遍，每次 2000rpm 离心 3 分钟。将剩余的制备好的细胞裂解上清与预处理的偶联有 Flag 抗体的琼脂糖凝胶混合，4 度混合过夜。第二天，2000rpm 离心 3 分钟收取琼脂糖凝胶，并用 RIPA 洗涤 3 遍，每次 2000rpm 离心 3 分钟。最后收集琼脂糖凝胶用 30μl 的 2X SDS 上样缓冲液重悬，100 度煮沸 10 分钟。免疫杂交：每个样品上样 10μl，电泳 90V 2h；转膜 300mA，1h。5%脱脂牛奶室温封闭 1h，抗体（Flag 抗体购自杭州华安生物有限公司，#0912-1，HA 抗体购自杭州华安生物有限公司，#0906-1）以 1：5000 稀释比 4 度孵育过夜，PBST（磷酸盐缓冲液+0.1% Tween 20）洗涤 3 遍每次 10 分钟。二抗（Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31460）以 1：20000 稀释比室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 遍每次 10 分钟。ECL 显色。

由图 14 可知,免疫共沉淀实验显示 UMI-77 诱导 LC3A 和 MCL1 相互作用增强。

4、实验方法：HEK293T 细胞以 $2*10^5$ 个/ml，接种于 10cm 培养皿。24 小时后，共转染 pCMV3-MCL1-3xFlag 以及突变体和 pCDNA3.1-HA-LC3A 质粒，每个各 4μg。转染方法：预先分别混合 500μl 无血清的 DMEM 培养基和 8μg DNA，500μl 无血清的 DMEM 培养基和 16μl PEI（聚乙烯亚胺）转染试剂。最后将两个组分混合，室温静置 20 分钟，滴入培养基中。转染 24 小时后加入 UMI-77 10μM 处理 5 小时后，用 PBS 洗涤细胞两遍。用 RIPA 裂解液每个样品 1ml， 4 度裂解 30 分钟。用枪头将细胞刮下，连同液体一同转移到 1.5ml 离心管中，4 度 12000g 离心 10 分钟，取上清转移到新管中。从裂解好的上清中取出 50μl 样品加入等体积的 2X SDS 上样缓冲液收样,100 度煮沸 10 分钟，作为 Input 样品。取适量的偶联有 Flag 抗体的琼脂糖凝胶，用 RIPA 裂解液洗涤 3 遍，每次 2000rpm 离心 3 分钟。将剩余的制备好的细胞裂解上清与预处理的偶联有 Flag 抗体的琼脂糖凝胶混合，4 度混合过夜。第二天，2000rpm 离心 3 分钟收取琼脂糖凝胶，并用 RIPA 洗涤 3 遍，每次 2000rpm 离心 3 分钟。最后收集琼脂糖凝胶用 30μl 的 2X SDS 上样缓冲液重悬，100 度煮沸 10 分钟。免疫杂交：每个样品上样 10μl，电泳 90V 2h；转膜 300mA，1h。5%脱脂牛奶室温封闭 1h，抗体（Flag 抗体购自杭州华安生物有限公司，#0912-1，HA 抗体购自杭州华安生物有限公司，#0906-1）以 1：5000 稀释比 4 度孵育过夜，PBST（磷酸盐缓冲液+0.1% Tween 20）洗涤 3 遍每次 10 分钟。二抗（Goat anti-Rabbit IgG(H+L)二抗购自 Thermo Fisher Scientific，#31460）以 1：20000 稀释比室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 遍每次 10 分钟。ECL 显色。

由图 15 可知,将 MCL1 含有的两个 LIR motif 分别突变。第一个 LIR motif 突变为四种形式：W261A, I264A, W261A/I264A, ΔLIR.第二个 LIR motif 突变为三种形式：F318A，V321A，F318A/V321A。第一个 LIR motif 突变后显著影响了 MCL1 和 LC3A 的相互作用。第二个 LIR motif 几乎没有影响。

实施例 5 UMI77 对小鼠炎症性肠病保护作用

实验方法：C57BL/6 遗传背景的 7-8 周龄雄性野生型小鼠自由饮用 2%DSS 溶液（溶液需新鲜配制）6 天后，改换饮用正常水至实验结束。实验

过程中，每天皮下注射UMI77（5 mg/kg 体重）；同时，每天记录小鼠体重变化、粪便形状和便血情况。实验中，粪便性状和便血情况评分参考文献 *Nat Protoc. 2007;2(3):541-6*；组织病理学评分分为炎性细胞浸润评分和组织损伤评分参考文献 *Immunity. 2010;32(3):379-91*，最终计算疾病活动指数。

实验结束，以 CO_2 处死小鼠后，离断自盲肠至肛门的全部肠段，拍照并测量长度。然后，取中间约 1 cm 肠段放入包埋盒中浸入 10%中性福尔马林以制备病理标本，用于 HE 染色；剩余肠段用 50mL 注射器以预冷的生理盐水进行冲洗，洗尽肠腔内剩余液体后，用小剪刀剪碎、混匀，锡箔纸包裹后液氮急冻，全部操作控制在小鼠死后 10 分钟以内完成。用 Trizol 裂解组织，按照 Trizol 说明书提取 RNA；得到的 RNA 用 ABI 公司的逆转录试剂盒进行逆转录反应；SYBR Green 法检测逆转录产物中炎症因子 Cxcl1、G-CSF、IL6、IL-1β、S100A8 和 TNF-α，以管家基因 Actin 为内参，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算和分析。

由图 16-图 21 可知，UMI77 可以显著性减缓体重下降幅度，降低疾病活动指数，恢复肠组织及其细胞正常状态，降低炎症因子表达，提示其可以保护炎症性肠病。

实施例 6　UMI-77 恢复 APP/PS1 模型老鼠的空间记忆学习能力

实验方法：目前通用的其中一个阿尔兹海默疾病的小鼠模型为 APP/PS1 小鼠。遗传背景为 C57BL/6 的 APP/PS1 小鼠和对照鼠购自于南京模式动物中心。分为三组，对照组，APP/PS1 模型组，APP/PS1 模型给药组，每组 5-7 只。APP/PS1 4 月龄时开始腹腔注射给药 UMI-77 13mg/kg。隔天给药，持续 4 个月，之后进行水迷宫实验。实验主要分为两部分：定位巡航实验和空间搜索实验。定位巡航实验用于测量小鼠对水迷宫的学习和记忆能力获取。空间搜索实验测量小鼠对平台空间位置记忆的保持能力。

定位巡航实验：将含有二氧化钛水的水池分为 4 个象限（西北，东北，西南，东南），平台置于东南象限水下 1cm 左右。将小鼠头朝池壁放入水中，放入位置按照西北，东北，东南，西南的顺序放入 4 次。记录每次小鼠找到水下平台的时间。如果时间超过 60 秒，则引导小鼠到平台上，让其停留 20 秒，并记录此次找到平台时间为 60 秒。每只小鼠每天训练 4 次，一共训练 4 天，记录找到平台的时间（逃避潜伏期）。

由图 22 可知，颜色越深代表逃避潜伏期越长，越浅代表逃避潜伏期越短。从图中可以看到，随着训练时间的增加，每组小鼠的逃避潜伏期都有所下降，说明小鼠获得了空间位置的信息。但在训练过程中，APP/PS1 小鼠的逃避潜伏前明显长于对照小鼠和给药小鼠，说明 APP/PS1 小鼠空间学习能力受损，在用 UMI-77 治疗后，能力恢复且优于野生型。总体上，用 UMI-77 治疗的 APP/PS1 小鼠的空间学习和记忆能力明显好于 APP/PS1 小鼠。（$P<0.05$,差异显著）。

空间搜索实验：定位巡航实验结束 24 小时后，将平台撤除，开始 60 秒的空间搜索实验。将小鼠由原先平台象限的对侧放入水中，记录小鼠穿过原先平台位置的次数和运动轨迹。

由图 23 可知，APP/PS1 小鼠穿过原平台的次数显著低于对照小鼠，说明其空间记忆保持能力受损。（$P<0.05$,差异显著）。用 UMI-77 治疗后的 APP/PS1 小鼠的穿过次数明显多于 APP/PS1 小鼠。（$P<0.01$,差异显著）说明 UMI-77 可以明显提高 APP/PS1 小鼠的空间记忆保持能力。由图 24 可知，图中圆圈为原平台位置。对照组和给药组都有不同次数的穿过平台，APP/PS1 小鼠并没有穿过平台。

阿尔兹海默症是一种严重的神经退行性疾病，目前并无特效药治疗。在之前的研究中发现阿尔兹海默症患者大脑中存在大量的淀粉样蛋白堆积和损伤线粒体堆积。目前已知的临床药物主要是针对淀粉样蛋白的清除和降解。UMI-77 可以诱导线粒体自噬，帮助清除损伤线粒体，预示其对于治疗阿尔兹海默症的潜力。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，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 书

1、UMI-77 作为线粒体自噬诱导剂在制备治疗炎症及神经退行性疾病药物中的应用。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述炎症为急性肝炎或者炎症性肠病。

3、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述神经退行性疾病为阿尔兹海默症。

4、一种人胚肾转化细胞 HEK293Tmtkeima 稳定细胞株，其特征在于，该细胞株于 2019 年 3 月 7 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号为：CCTCC NO:C201940。

5、一种 MCL1 蛋白抑制剂的用途，其特征在于，用于制备药物或组合物，所述药物或组合物用于选自下组的一种或多种用途：

（1）诱导线粒体自噬；

（2）预防或抑制炎症；

（3）预防或治疗炎症相关疾病； 和

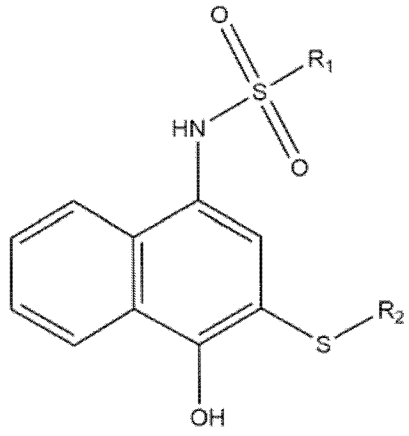
（4）预防或治疗神经退行性疾病。

6、如权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述炎症包括选自下组的组织中的炎症：脂肪组织、肝脏组织、肌肉组织、皮肤组织、胰腺组织、肺组织、血管、心脏、骨骼、大脑、脊髓、视网膜、胃肠道组织、生殖系统，或其组合。

7、如权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述神经退行性疾病包括选自下组的疾病：阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）、亨廷顿病（HD）、肌萎缩性侧索硬化（ALS）、不同类型脊髓小脑共济失调（SCA）、和 Pick 病。

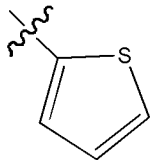
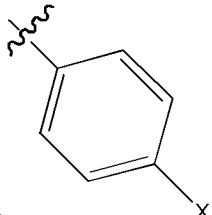
8、如权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述炎症相关疾病包括选自下组的疾病：急性肝炎、溃疡性肠炎、和自身免疫疾病。

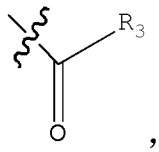
9、如权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述 MCL1 蛋白抑制剂为结构如式 I 所示的化合物或其药学可接受的盐：



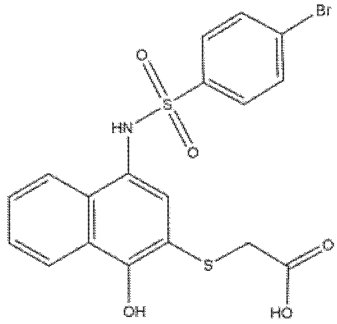
，I

其中，

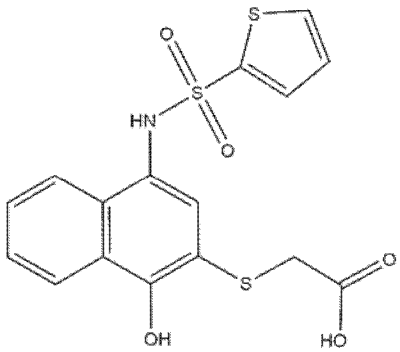
R1 为 、或 ，X 为卤素；

R2 为 ，R_3 为 H、卤素、或羟基。

10、如权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 MCL1 蛋白抑制剂为化合物 UMI-77、化合物 UMI-59 或其药学可接受的盐：



，UMI-77；



，UMI-59。

11、如权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述药物或组合物含有安全有效量的 MCL1 蛋白抑制剂，和药学上可接受的载体。

12、一种诱导线粒体自噬的方法，其特征在于，包括步骤：给需要的对

象施用 MCL1 蛋白抑制剂。

13、一种促进 MCL1 蛋白和 LC3A 蛋白相互作用的方法，其特征在于，包括步骤：在包含 MCL1 蛋白和 LC3A 蛋白的体系中，施加 MCL1 蛋白抑制剂。

14、一种抑制炎症或治疗炎症相关疾病的组合物，其特征在于，所述组合物包括 MCL1 蛋白抑制剂。

15、一种预防或治疗神经退行性疾病的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：给需要的对象施用安全有效量的 MCL1 蛋白抑制剂。

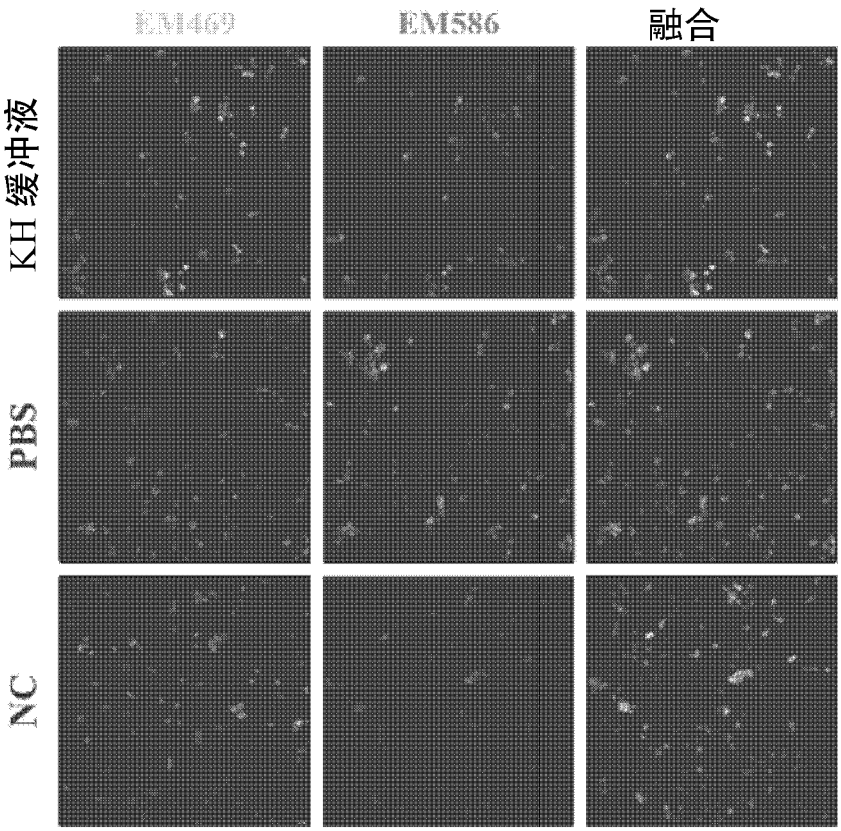


图 1

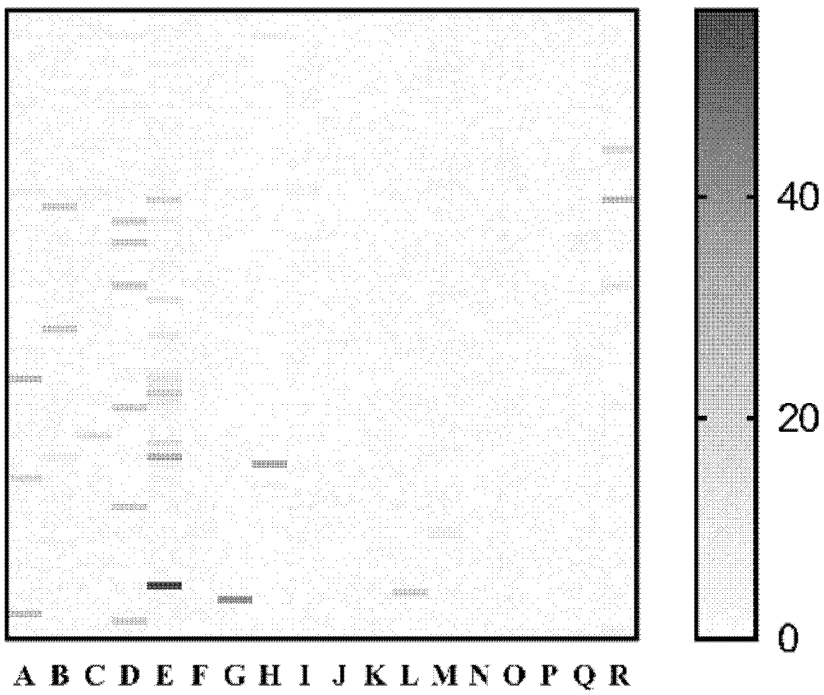


图 2

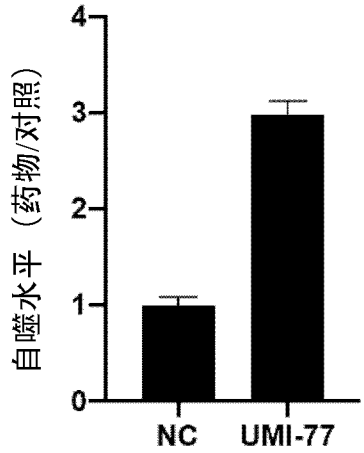

自噬水平（药物/对照）
4
3
2
1
0
NC
UMI-77

图 3

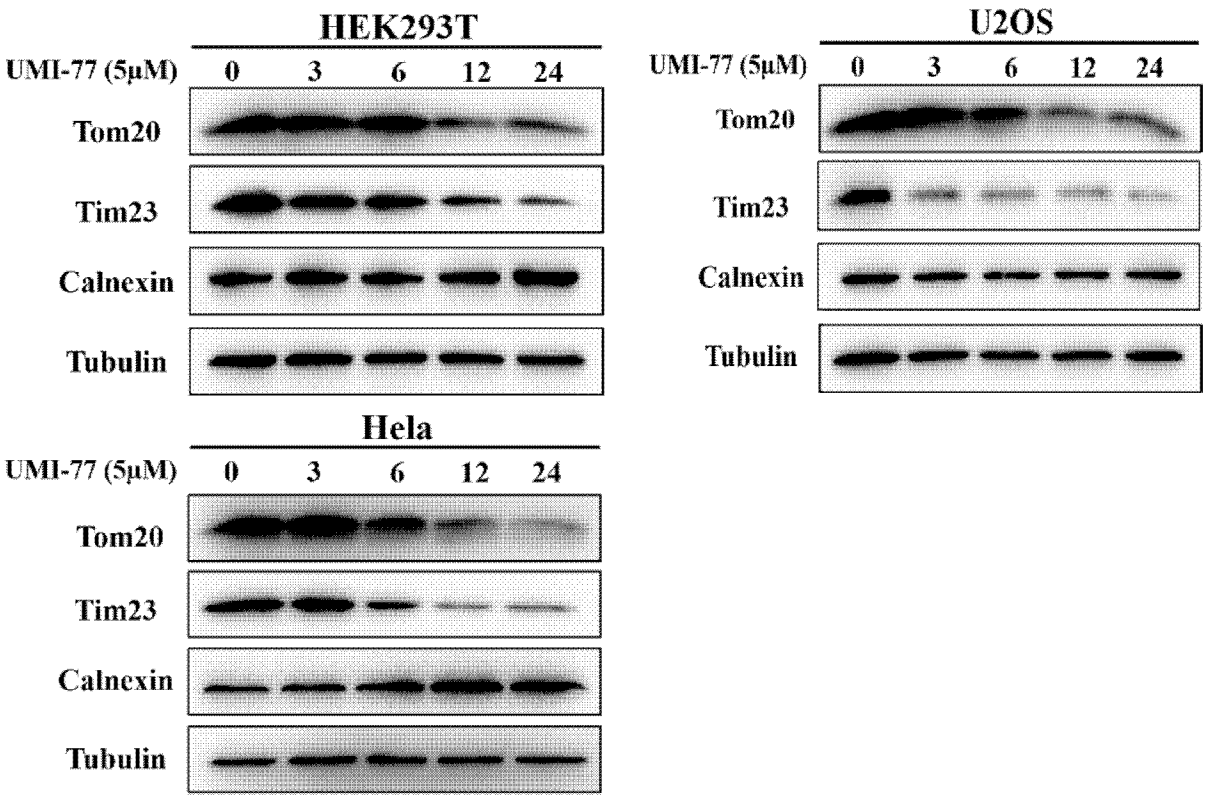

HEK293T
UMI-77 (5μM) 0 3 6 12 24
Tom20
Tim23
Calnexin
Tubulin
U2OS
UMI-77 (5μM) 0 3 6 12 24
Tom20
Tim23
Calnexin
Tubulin
Hela
UMI-77 (5μM) 0 3 6 12 24
Tom20
Tim23
Calnexin
Tubulin

图 4

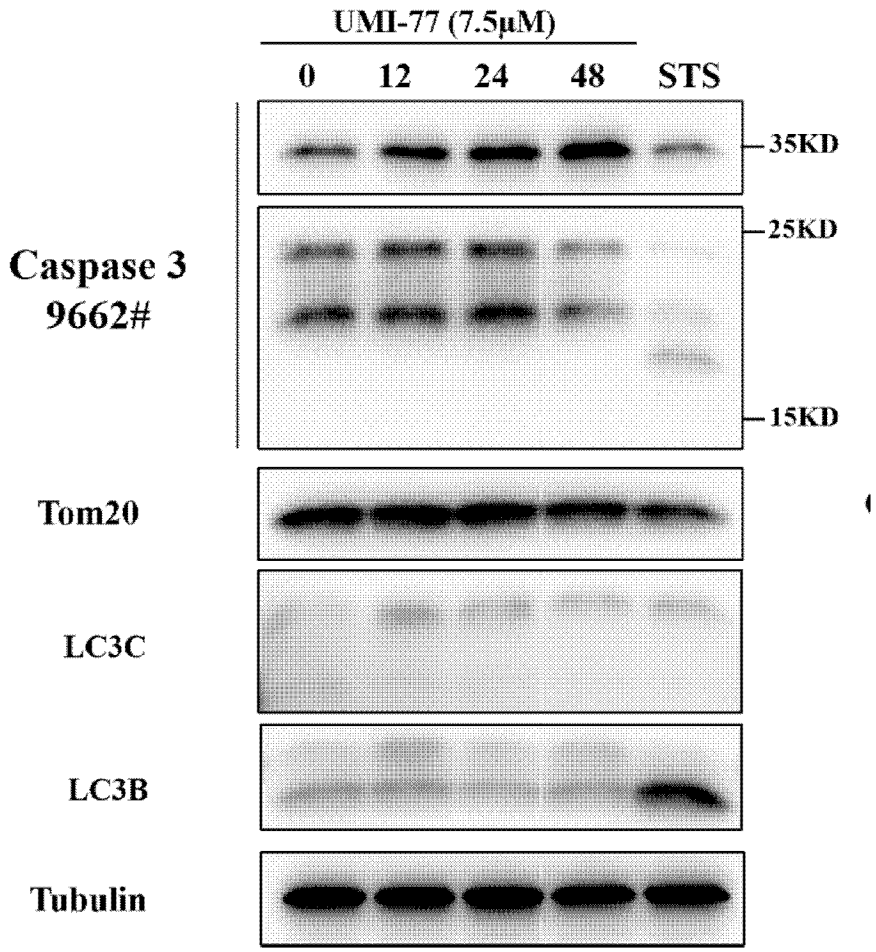

UMI-77 (7.5μM)
0
12
24
48
STS
35KD
25KD
15KD
Caspase 3
9662#
Tom20
LC3C
LC3B
Tubulin

图 5

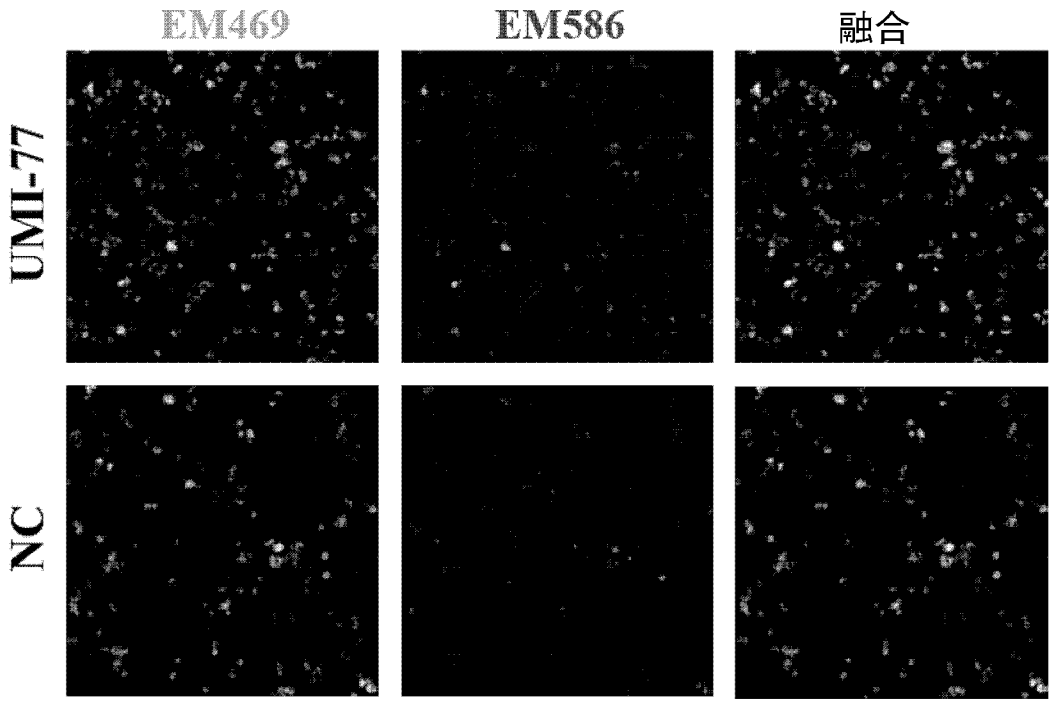

EM469
EM586
融合
UMI-77
NC

图 6

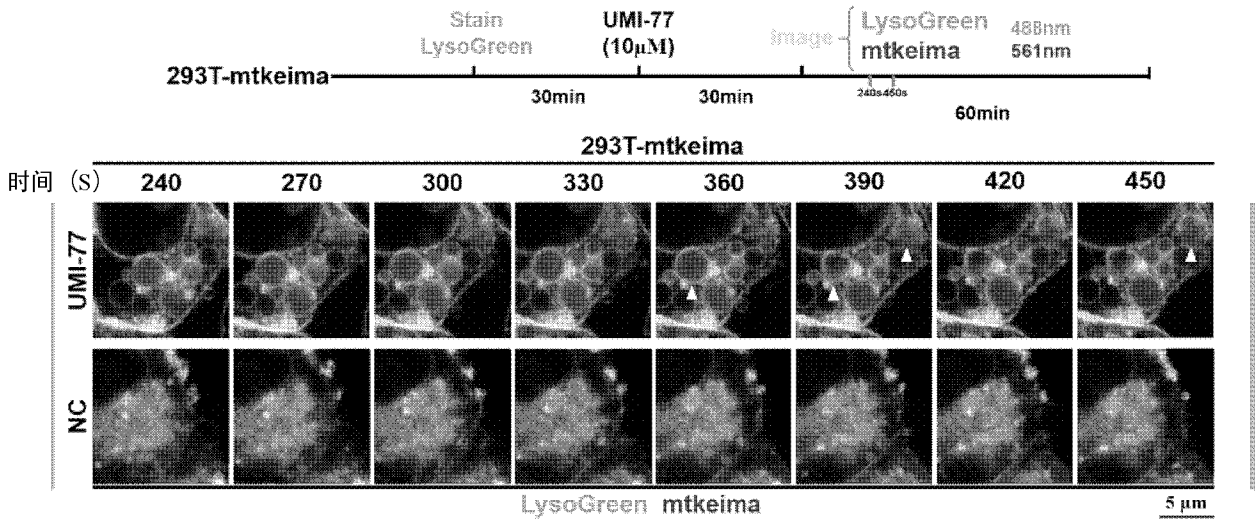

Stain
LysoGreen
UMI-77
(10μM)
Image
LysoGreen 488nm
mtkeima 561nm
293T-mtkeima
30min
30min
240s 450s
60min
293T-mtkeima
时间（S）
240
270
300
330
360
390
420
450
UMI-77
NC
LysoGreen mtkeima
5 μm

图 7

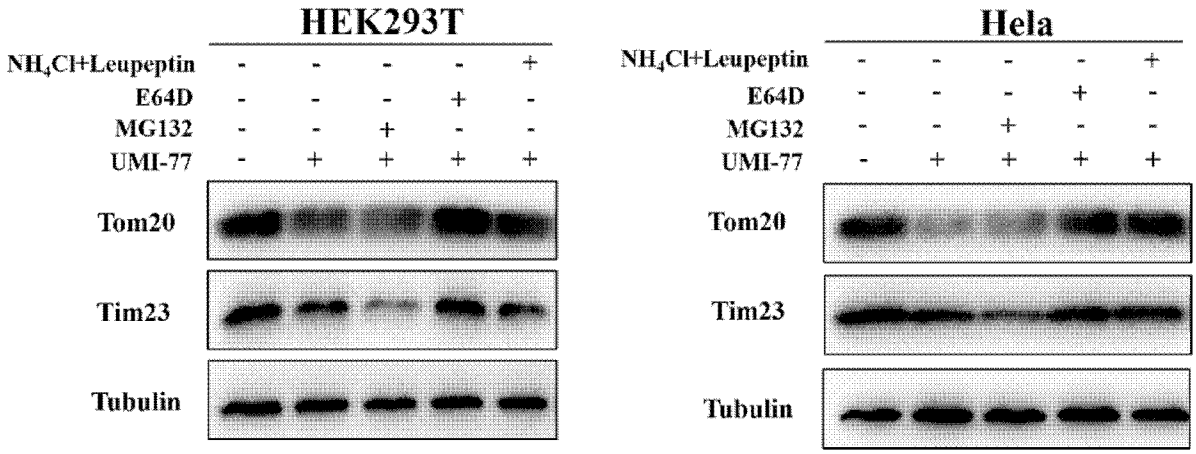

HEK293T
NH4Cl+Leupeptin - - - - +
E64D - - - + -
MG132 - - + - -
UMI-77 - + + + +
Tom20
Tim23
Tubulin
Hela
NH4Cl+Leupeptin - - - - +
E64D - - - + -
MG132 - - + - -
UMI-77 - + + + +
Tom20
Tim23
Tubulin

图 8

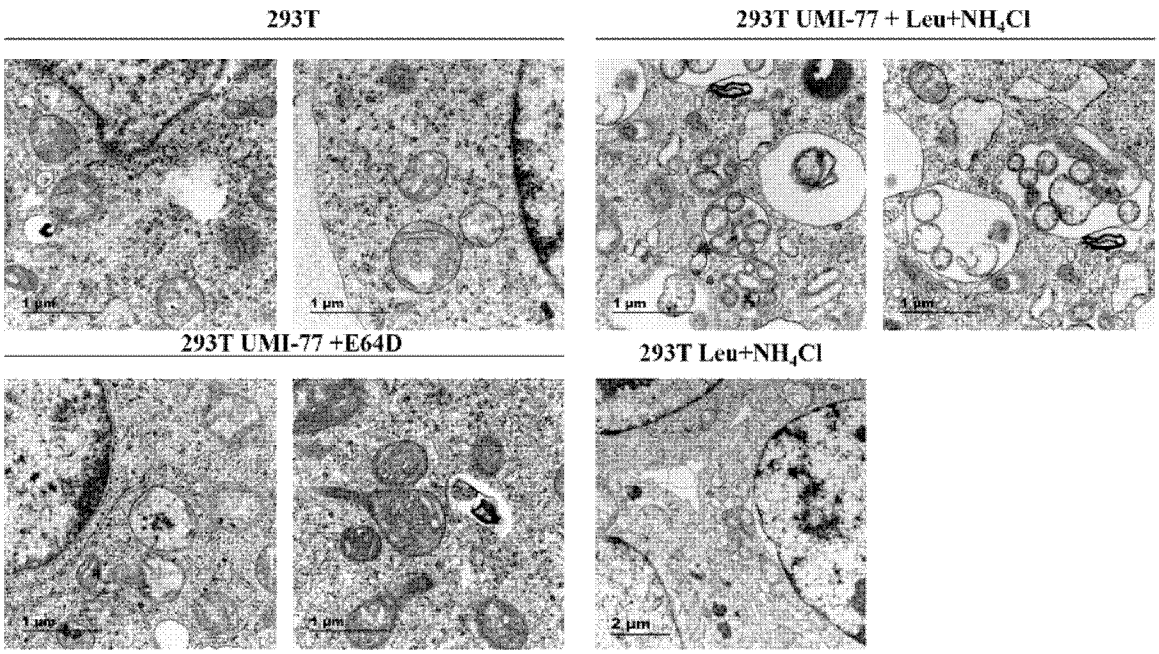

293T
293T UMI-77 + Leu+NH4Cl
1 μm
1 μm
1 μm
1 μm
293T UMI-77 +E64D
293T Leu+NH4Cl
1 μm
1 μm
2 μm

图 9

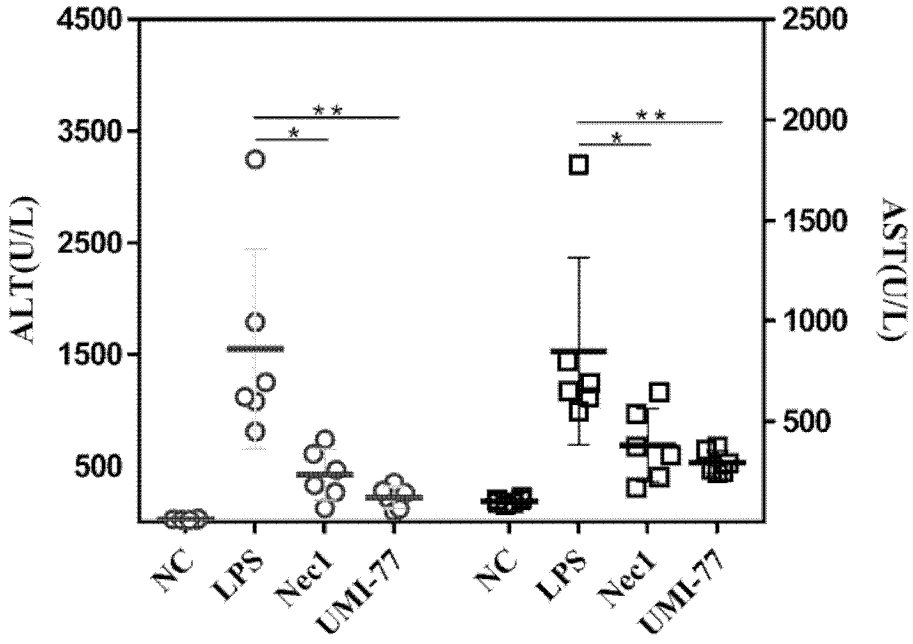

4500
3500
2500
1500
500
ALT(U/L)
2500
2000
1500
1000
500
AST(U/L)
**
*
**
*
NC
LPS
Nec1
UMI-77
NC
LPS
Nec1
UMI-77

图 10

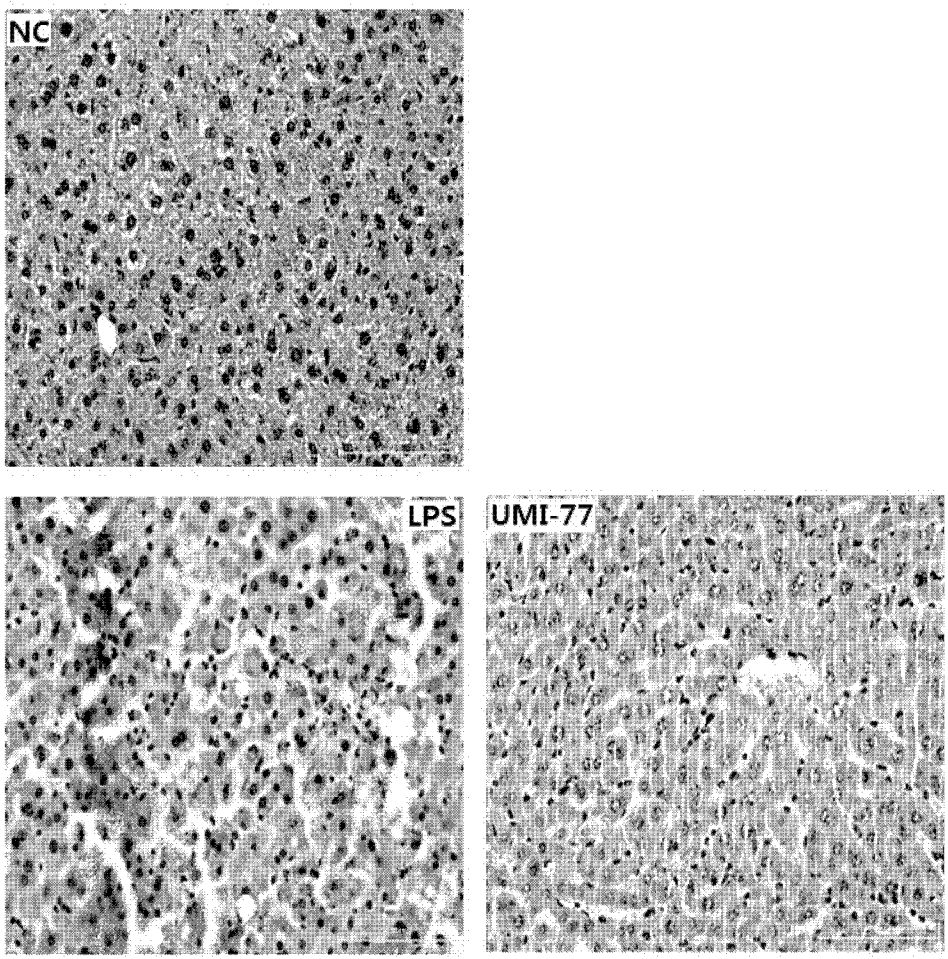

NC
LPS
UMI-77

图 11

5

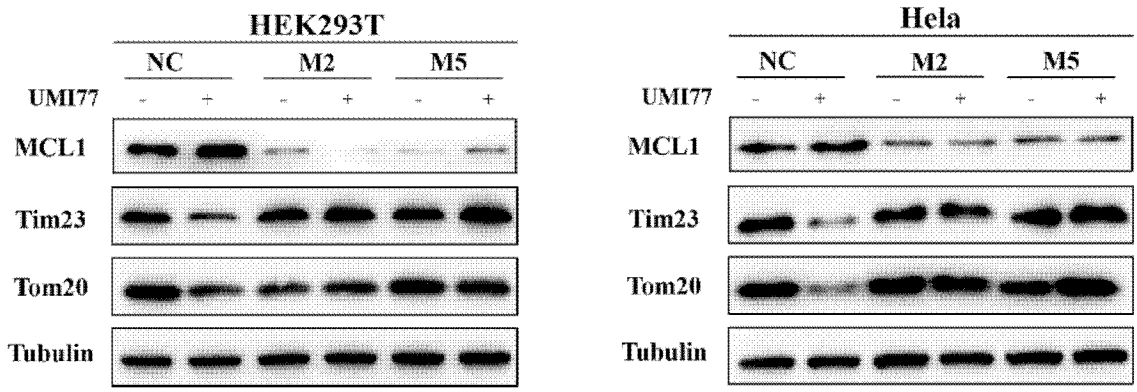

HEK293T
NC
M2
M5
UMI77
- + - + - +
MCL1
Tim23
Tom20
Tubulin
Hela
NC
M2
M5
UMI77
- + - + - +
MCL1
Tim23
Tom20
Tubulin

图 12

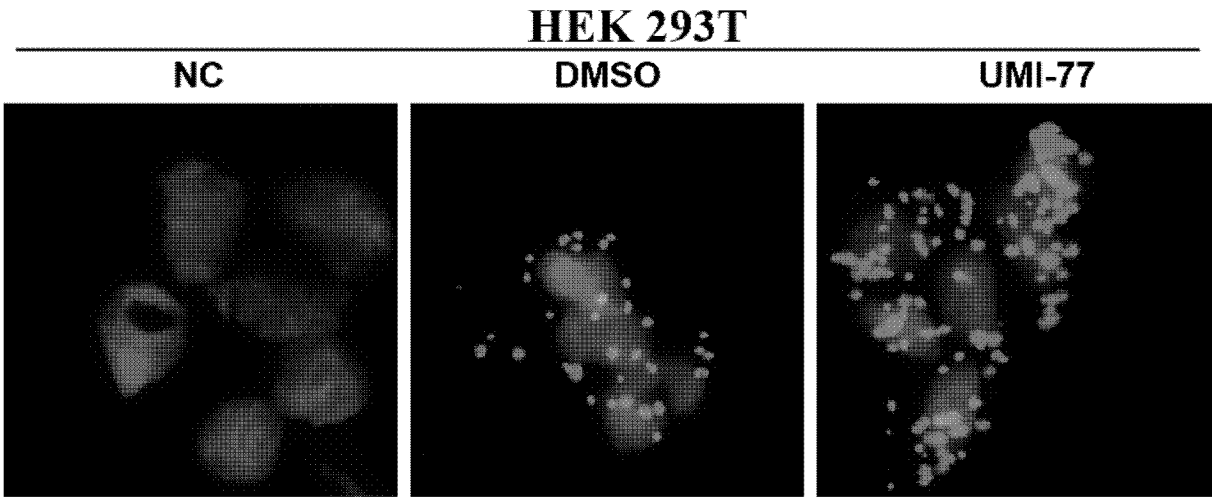

HEK 293T
NC
DMSO
UMI-77

图 13

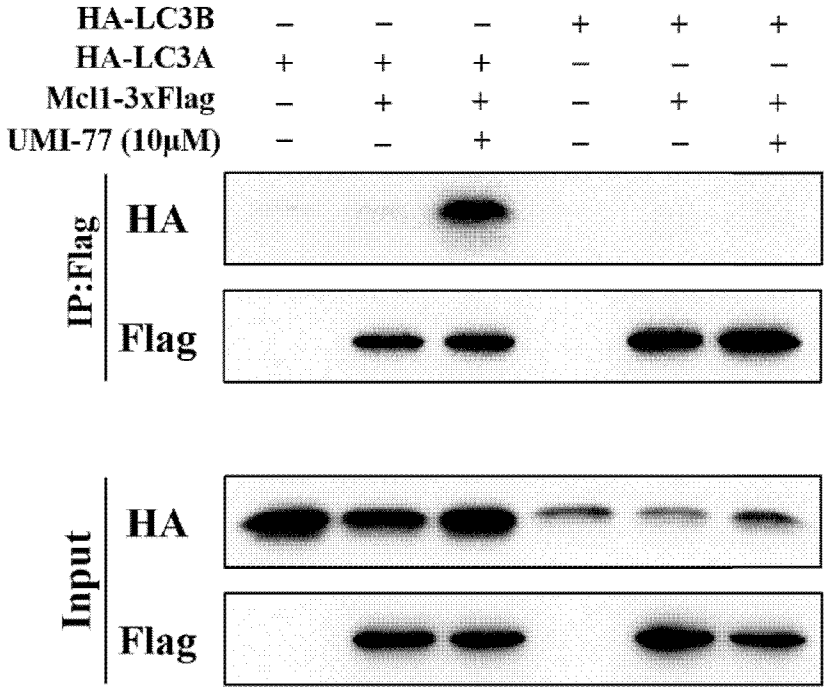

HA-LC3B – – – + + +
HA-LC3A + + + – – –
Mcl1-3xFlag – + + – + +
UMI-77 (10μM) – – + – – +
IP:Flag
HA
Flag
Input
HA
Flag

图 14

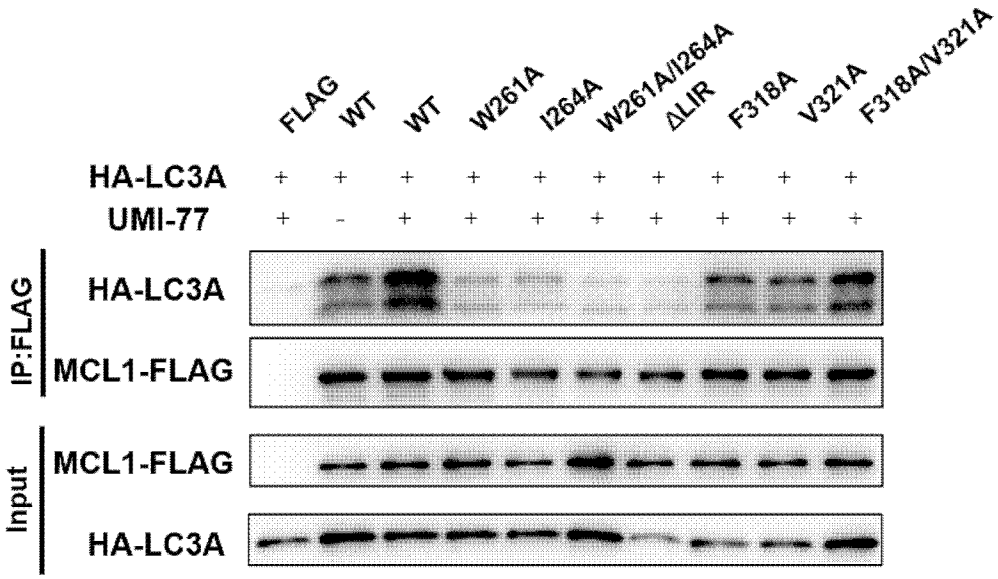

FLAG
WT
WT
W261A
I264A
W261A/I264A
ΔLIR
F318A
V321A
F318A/V321A
HA-LC3A + + + + + + + + + +
UMI-77 + - + + + + + + + +
IP:FLAG
HA-LC3A
MCL1-FLAG
Input
MCL1-FLAG
HA-LC3A

图 15

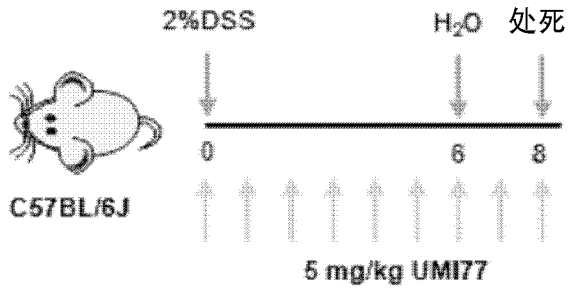

2%DSS
H2O
处死
0
6
8
C57BL/6J
5 mg/kg UMI77

图 16

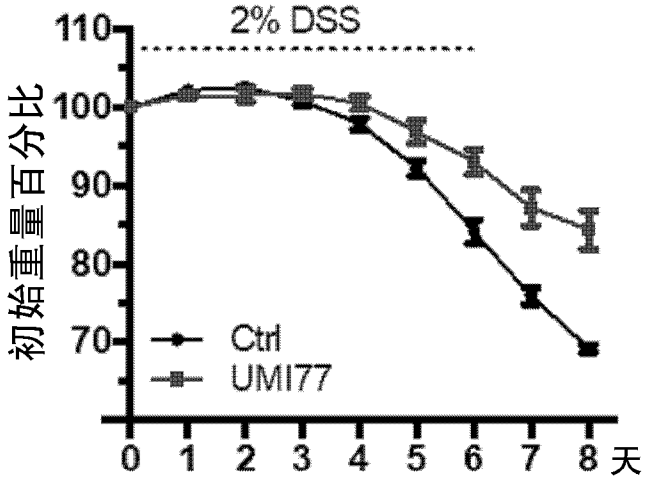

2% DSS
初始重量百分比
110
100
90
80
70
Ctrl
UMI77
0 1 2 3 4 5 6 7 8 天

图 17

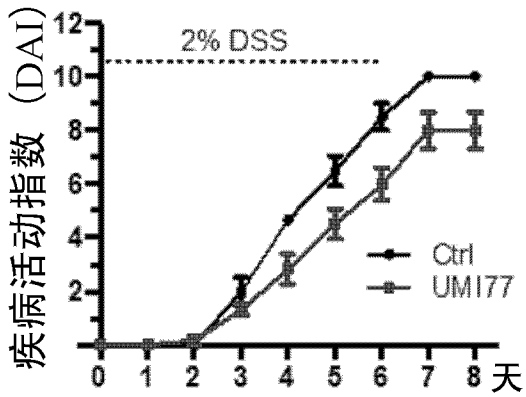

疾病活动指数（DAI）
2% DSS
Ctrl
UMI77
0 1 2 3 4 5 6 7 8 天

图 18

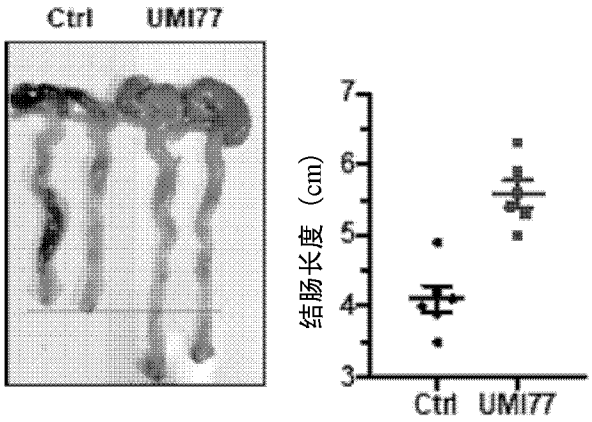

Ctrl
UMI77
结肠长度（cm）
Ctrl UMI77

图 19

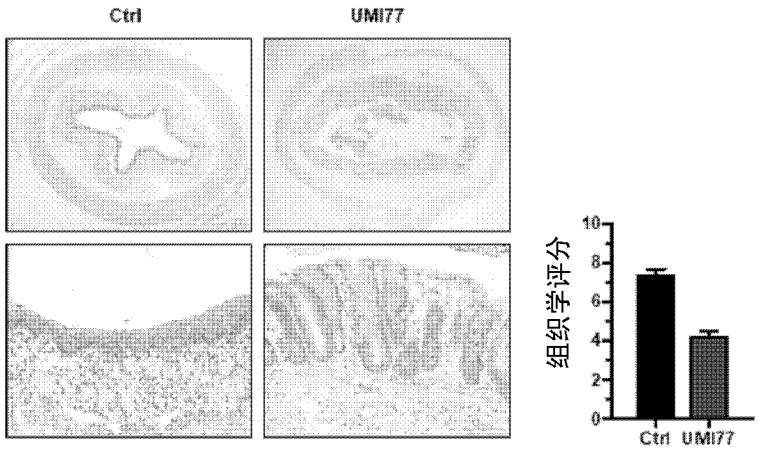

Ctrl
UMI77
组织学评分
Ctrl UMI77

图 20

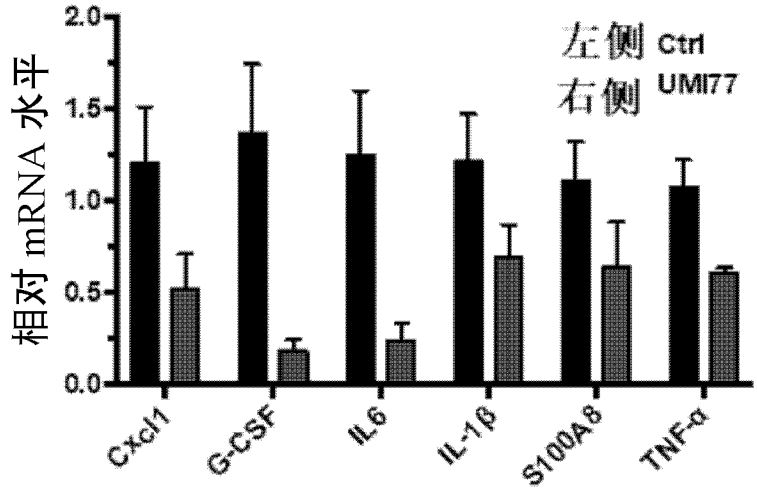

相对 mRNA 水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
左侧 Ctrl
右侧 UMI77
Cxcl1
G-CSF
IL6
IL-1β
S100A8
TNF-α

图 21

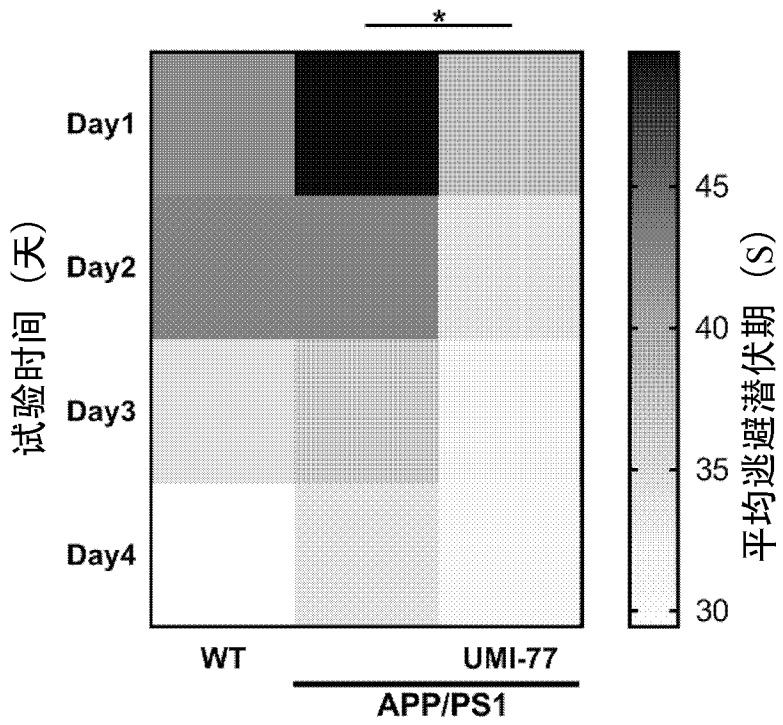

*
试验时间（天）
Day1
Day2
Day3
Day4
45
40
35
30
平均逃避潜伏期（S）
WT
UMI-77
APP/PS1

图 22

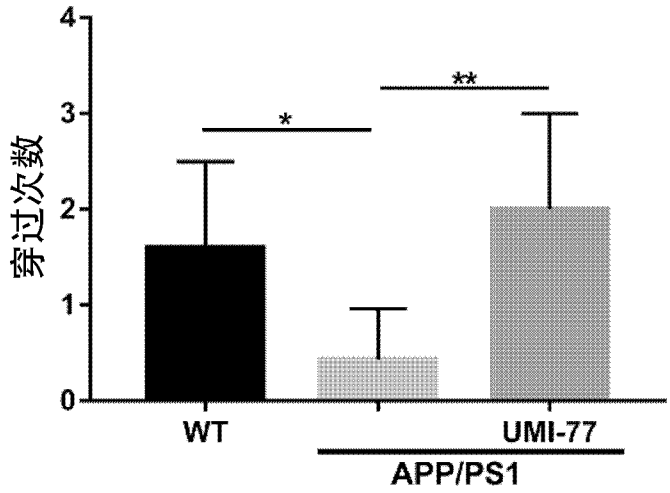


图 23

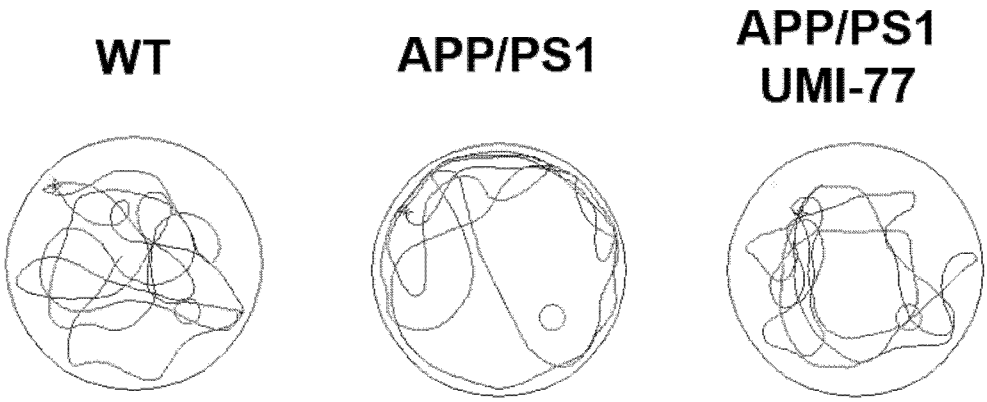


图 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/083442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/196(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(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; C12N

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

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

DWPI; SIPOABS; CNKI; CNABS; STN on the Web: 浙江大学, 夏宏光, UMI-77, UMI-59, 线粒体自噬, 炎症, 神经退行性, HEK293K, 胚肾转化细胞, mtkeima, keima, 阿尔茨海默, MCL1, MCL-1, 帕金森, mitophagy, inflam+, ALZHEIMER, parkinson, neurodegenerat+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014235702 A1 (UNIV. WAYNE STATE et al.) 21 August 2014 (2014-08-21) abstract, figure 1, description paragraphs 36, 79	1-2, 5-6, 8-11, 14
X	WO 2017027845 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER et al.) 16 February 2017 (2017-02-16) abstract, claims 1-73	5-6, 8, 11, 14
X	WO 2017152076 A1 (UNIV. VANDERBILT) 08 September 2017 (2017-09-08) abstract, claims 1-33	5-6, 8, 11, 14
X	WO 2017027841 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER et al.) 16 February 2017 (2017-02-16) abstract, claims 1-92	5-6, 8, 11, 14
X	陈洪丞成等 (CHEN, Hongchengcheng et al.). "基于Keima光蛋白的线粒体自噬评价体系的建立 (Establishment of the evaluation system for mitophagy based on the fluorescent protein Keima)" *感染, 炎症, 修复 (Infection, Inflammation, Repair),* Vol. 18, No. 4, 31 December 2017 (2017-12-31), pp. 195-198	4

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 June 2020	**08 July 2020**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/083442

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	张宇程等 (ZHANG, Yucheng). "泛素连接酶HOIL-1L在线粒体自噬中的功能与机制研究 (Novel Function of E3 Ubiquitin Ligase Hoil-1 in Mitophagy)" *中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑 (China Master's Theses Full-text Database, Basic Science),* No. 01, 15 January 2016 (2016-01-15), pages A006-13	4
A	HOLLVILLE, E. et al. "Bcl-2 Family Proteins Participate in Mitochondrial Quality Control by Regulating Parkin/PINK1-Dependent Mitophagy." *Molecular Cell,* Vol. 55, 07 August 2014 (2014-08-07), pages 1-16	1-15
A	胡磊等 (HU, Lei et al.0. "线粒体自噬的研究进展 (Research Advances of Mitophagy)" *中国细胞生物学学报 (CHINESE JOURNAL OF CELL BIOLOGY),* Vol. 40, No. 4, 31 December 2018 (2018-12-31), pp. 594-601	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/083442

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **12-13**, **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 12-13 and 15 relate to a method for inducing mitophagy, a method for promoting MCL1 protein and LC3A protein interaction, and a method for preventing or treating a neurodegenerative disease, which do not satisfy the criteria of PCT Rule 39.1(iv). The search has been performed on the basis that the subject matter names are a use of an MCL1 protein inhibitor in preparing a drug which induces mitophagy, a use of an MCL1 protein inhibitor in preparing a drug which promotes MCL1 protein and LC3A protein interaction, and a use of an MCL1 protein inhibitor in preparing a drug which prevents or treats a neurodegenerative disease.

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/083442

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2014235702	A1	21 August 2014	WO	2013052943	A2	11 April 2013
				US	9486422	B2	08 November 2016
				WO	2013052943	A3	20 June 2013
WO	2017027845	A1	16 February 2017	CA	2990477	A1	16 February 2017
				WO	2017027841	A1	16 February 2017
				AU	2016306694	A1	18 January 2018
				JP	2018529649	A	11 October 2018
				US	2018237406	A1	23 August 2018
				EP	3334713	A1	20 June 2018
				US	2018237407	A1	23 August 2018
				CN	108349924	A	31 July 2018
WO	2017152076	A1	08 September 2017	KR	20180118199	A	30 October 2018
				EP	3423435	A4	14 August 2019
				CA	3016182	A1	08 September 2017
				BR	112018067775	A2	09 April 2019
				EP	3423435	A1	09 January 2019
				AU	2017228385	A1	06 September 2018
				CN	109153643	A	04 January 2019
				MX	2018010678	A	17 January 2019
				EA	201891988	A1	28 February 2019
				PH	12018501877	A1	04 February 2019
				JP	2019513697	A	30 May 2019
				IL	261231	D0	31 October 2018
				CL	2018002516	A1	01 February 2019
WO	2017027841	A1	16 February 2017	CA	2990477	A1	16 February 2017
				AU	2016306694	A1	18 January 2018
				JP	2018529649	A	11 October 2018
				US	2018237406	A1	23 August 2018
				EP	3334713	A1	20 June 2018
				US	2018237407	A1	23 August 2018
				CN	108349924	A	31 July 2018
				WO	2017027845	A1	16 February 2017

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/083442

A. 主题的分类

A61K 31/196(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(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; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

DWPI; SIPOABS; CNKI; CNABS; STN on the Web:浙江大学，夏宏光，UMI-77，UMI-59，线粒体自噬，炎症，神经退行性，HEK293K, 胚肾转化细胞，mtkeima, keima, 阿尔茨海默，MCL1，MCL-1，帕金森，mitophagy，inflam+, ALZHEIMER, parkinson,neurodegenerat+

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	US 2014235702 A1 (UNIV. WAYNE STATE等) 2014年 8月 21日 (2014-08-21) 说明书摘要，图1，说明书第36段、第79段	1-2，5-6，8-11，14
X	WO 2017027845 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER等) 2017年 2月 16日 (2017-02-16) 说明书摘要，权利要求1-73	5-6，8，11，14
X	WO 2017152076 A1 (UNIV. VANDERBILT) 2017年 9月 8日 (2017-09-08) 说明书摘要，权利要求1-33	5-6，8，11，14
X	WO 2017027841 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER等) 2017年 2月 16日 (2017-02-16) 说明书摘要，权利要求1-92	5-6，8，11，14
X	陈洪丞成等. "基于Keima光蛋白的线粒体自噬评价体系的建立" 《感染、炎症、修复》，第18卷，第4期，2017年 12月 31日 (2017-12-31)， 第195-198页	4

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 6月 23日	2020年 7月 8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 崔传明 电话号码 (86-10)53961869

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	张宇程等. "泛素连接酶HOIL-1L在线粒体自噬中的功能与机制研究" 《中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑》, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016-01-15), 第A006-13页	4
A	HOLLVILLE, E.等. "Bcl-2 Family Proteins Participate in Mitochondrial Quality Control by Regulating Parkin/PINK1-Dependent Mitophagy." Molecular Cell, 第55卷, 2014年 8月 7日 (2014-08-07), 第1-16页	1-15
A	胡磊等. "线粒体自噬的研究进展" 《中国细胞生物学学报》, 第40卷, 第4期, 2018年 12月 31日 (2018-12-31), 第594-601页	1-15

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/083442

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 12-13，15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求12-13和15涉及一种诱导线粒体自噬的方法、一种促进MCL1蛋白和LC3A蛋白相互作用的方法和一种预防或治疗神经退行性疾病的方法，不符合PCT实施细则39.1(iv)的规定，基于主题名称为MCL1蛋白抑制剂在制备诱导线粒体自噬的药物的用途、MCL1蛋白抑制剂在制备促进MCL1蛋白和LC3A蛋白相互作用的药物中的用途和MCL1蛋白抑制剂在制备预防或治疗神经退行性疾病的药物的用途进行检索。

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

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/083442

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)
US	2014235702	A1	2014年 8月 21日	WO	2013052943	A2	2013年 4月 11日
				US	9486422	B2	2016年 11月 8日
				WO	2013052943	A3	2013年 6月 20日
WO	2017027845	A1	2017年 2月 16日	CA	2990477	A1	2017年 2月 16日
				WO	2017027841	A1	2017年 2月 16日
				AU	2016306694	A1	2018年 1月 18日
				JP	2018529649	A	2018年 10月 11日
				US	2018237406	A1	2018年 8月 23日
				EP	3334713	A1	2018年 6月 20日
				US	2018237407	A1	2018年 8月 23日
				CN	108349924	A	2018年 7月 31日
WO	2017152076	A1	2017年 9月 8日	KR	20180118199	A	2018年 10月 30日
				EP	3423435	A4	2019年 8月 14日
				CA	3016182	A1	2017年 9月 8日
				BR	112018067775	A2	2019年 4月 9日
				EP	3423435	A1	2019年 1月 9日
				AU	2017228385	A1	2018年 9月 6日
				CN	109153643	A	2019年 1月 4日
				MX	2018010678	A	2019年 1月 17日
				EA	201891988	A1	2019年 2月 28日
				PH	12018501877	A1	2019年 2月 4日
				JP	2019513697	A	2019年 5月 30日
				IL	261231	D0	2018年 10月 31日
				CL	2018002516	A1	2019年 2月 1日
WO	2017027841	A1	2017年 2月 16日	CA	2990477	A1	2017年 2月 16日
				AU	2016306694	A1	2018年 1月 18日
				JP	2018529649	A	2018年 10月 11日
				US	2018237406	A1	2018年 8月 23日
				EP	3334713	A1	2018年 6月 20日
				US	2018237407	A1	2018年 8月 23日
				CN	108349924	A	2018年 7月 31日
				WO	2017027845	A1	2017年 2月 16日