

(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 7 月 30 日 (30.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/151229 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 417/14 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/104300
- (22) 国际申请日: 2019 年 9 月 4 日 (04.09.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910076670.4 2019 年 1 月 26 日 (26.01.2019) CN
- (71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。
- (72) 发明人: 尤启冬 (YOU, Qidong); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。姜正羽 (JIANG, Zhengyu); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。汪艳 (WANG, Yan); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。金雨辉 (JIN, Yuhui); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。陆滕辰 (LU, Mengchen); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。徐晓莉 (XU, Xiaoli); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。郭小可 (GUO, Xiaoke); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道 639 号, Jiangsu 211198 (CN)。
- (74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江

苏省南京市白下区中山东路 198 号龙台国际大厦 1912 室, Jiangsu 210005 (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。
- (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: PROTEOLYSIS TARGETING CHIMERIC MOLECULE, PREPARATION METHOD, AND APPLICATION

(54) 发明名称: 一种蛋白靶向降解嵌合分子、制备方法及应用

(57) Abstract: Disclosed are a proteolysis targeting chimeric molecule, a preparation method, and an application. The provided proteolysis targeting chimeric molecule can inhibit the expression of BCR-ABL and/or CRBN protein in BCR-ABL and/or CRBN positive leukemia K562 cells to varying degrees, and thus can be used for preparing a drug for treating BCR-ABL and/or CRBN positive leukemia, wherein the proteolysis targeting chimeric molecule when $n = 3$ has excellent photoisomerization activity, and can be used for prepare a reagent or drug for degrading BCR-ABL and/or CRBN protein by light regulation. Also provided is a method for synthesizing this series of proteolysis targeting chimeric molecules.

(57) 摘要: 公开了一种蛋白靶向降解嵌合分子、制备方法及应用。提供的蛋白靶向降解嵌合分子可不同程度地抑制 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病 K562 细胞中 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的表达, 因而可以用于制备治疗 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病的药物, 其中, $n = 3$ 的蛋白靶向降解嵌合分子具有优异的光致异构化活性, 可以用于制备光照调控降解 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的试剂或药物; 还提供了一种合成该系列蛋白靶向降解嵌合分子的方法。

WO 2020/151229 A1

一种蛋白靶向降解嵌合分子、制备方法及应用

技术领域

本发明属于化学领域，具体涉及一种蛋白靶向降解嵌合分子、制备方法及应用。

背景技术

蛋白靶向降解嵌合（PROTAC）是一项新兴技术，该技术能够利用泛素-蛋白酶体系统，通过招募特定蛋白的 E3 泛素连接酶诱导某一蛋白的泛素化降解，进而调节该蛋白的浓度。相比于传统的小分子抑制剂，PROTAC 技术能够更有效的作用于那些非成药性蛋白。

临床研究表明，BCR-ABL 融合蛋白普遍存在于慢性粒细胞白血病（CML）病例中。同时，ABL 和 BCR-ABL 蛋白也是最早用于 PROTAC 研究的靶标之一。2016 年，CREWS 课题组率先利用 PROTAC 策略成功下调了 K562 白血病细胞中 BCR-ABL 融合蛋白的表达水平，他们设计的 PROTAC 小分子能够在低浓度下同时降解 BCR-ABL 和 ABL 蛋白。

然而，相关研究表明，ABL 参与生长因子与细胞因子应答，同时与细胞粘附，DNA 损伤，氧化应激等多条信号通路有关。ABL 被激活以刺激细胞增殖或分化，存活或死亡，撤回或迁移，ABL 基因的敲除会导致细胞周期功能异常。

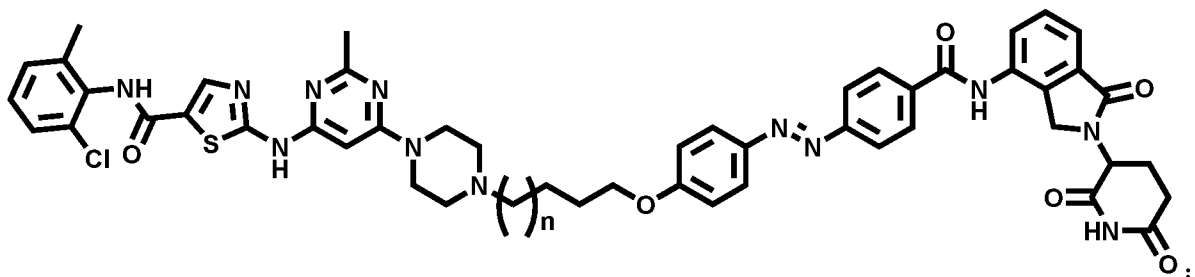
但是，如何调控 PROTAC 分子才能避免 ABL 蛋白的过度降解呢？这就亟需解决一个技术难题，即如何调控 PROTAC 分子介导的目标蛋白降解过程。

发明内容

本发明旨在克服现有技术的不足，提供一种可调节的 PROTAC 分子，以可逆、迅速、简易地利用 PROTAC 策略下调 K562 白血病细胞中 BCR-ABL 和 ABL 蛋白的表达水平；同时，本发明还旨在提供一种合成制备该 PROTAC 分子的可行方法。

本发明上述目的通过如下技术方案实现：

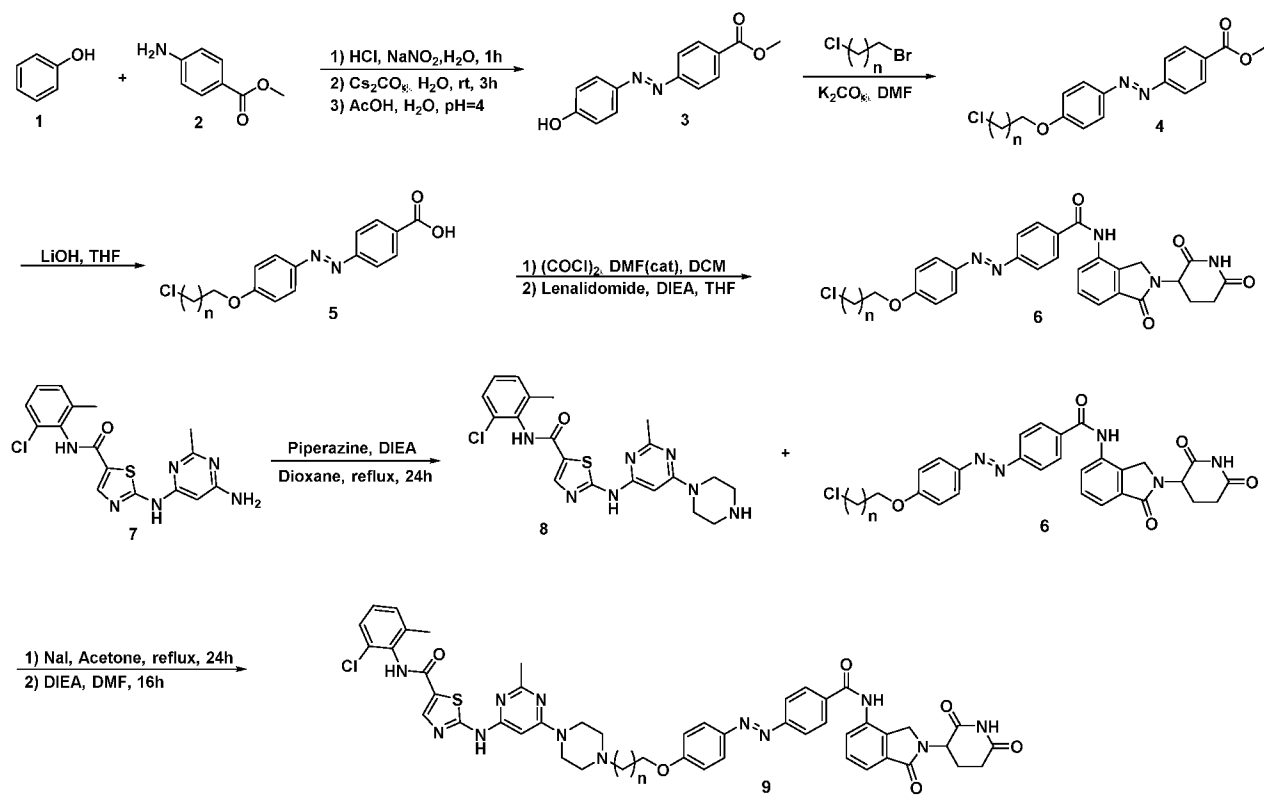
一种蛋白靶向降解嵌合分子，化学结构式如下：



其中，n 为 1~5 中任一自然数。

优选地，n=3。

上述蛋白靶向降解嵌合分子的合成方法，合成路线如下：



其中, n 为 1~5 中任一自然数。

上述蛋白靶向降解嵌合分子在制备治疗 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病的药物中的应用。

上述 $n=3$ 的蛋白靶向降解嵌合分子在制备光照调控降解 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的试剂或药物方面的应用。

有益效果:

本发明提供的蛋白靶向降解嵌合分子可不同程度地抑制 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病 K562 细胞中 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的表达, 因而可以用于制备治疗 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病的药物, 其中, $n=3$ 的蛋白靶向降解嵌合分子具有优异的光致异构化活性, 可以用于制备光照调控降解 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的试剂或药物; 本发明还提供了一种合成该系列蛋白靶向降解嵌合分子的方法。

附图说明

图 1: 化合物 4C 的光致异构化示意图;

图 2: 化合物 2C~6C 的化学结构及对 BCR-ABL 和 CRBN 阳性 K562 细胞株中 ABL 和 BCR-ABL 蛋白降解活性的免疫印迹检测图;

图 3: A) 化合物 4C-trans 和 cis 构型的紫外-可见吸收光谱; B) 化合物 4C 在周期实验, 经 UV-C 照射后在 $\lambda = 361\text{nm}$ 处检测吸光度; C) 化合物 4C-trans 经紫外照射后紫外-可见吸收光谱随时间的变化; D) 化合物 4C-cis 经白光照射后紫外-可见吸收光谱随时间的变化;

图 4: A) 化合物 4C-trans 对 K562 细胞系的抗细胞增殖活性测定; B) 化合物 4C-trans 对 A549、HCT116、MCF-7 和 K562 细胞系的细胞活力测定; C) 250nM 浓度下化合物 4C-trans 免疫印迹的时效实验; D) 给药 24 小时后, 化合物 4C-trans 免疫印迹的量效实验;

图 5: A) 孵育 24 小时后, 化合物 4C-trans 的免疫印迹-量效实验 B) 250nM 浓度下化合物 4C-trans 的免疫印迹-时效实验; C) 孵育 24 小时后, 化合物 4C-cis 的免疫印迹-量效实验; D) 250nM 浓度下化合物 4C-cis 的免疫印迹-时效实验;

图 6 为化合物 4C-trans 处理过的 K562 细胞分别在黑暗 (VIS 组) 和紫外光照条件 (每 4 小时照射一次) 下, BCR-ABL 蛋白浓度随时间的变化;

图 7 为不同浓度化合物 4C-trans 对 ABL 基因表达的影响;

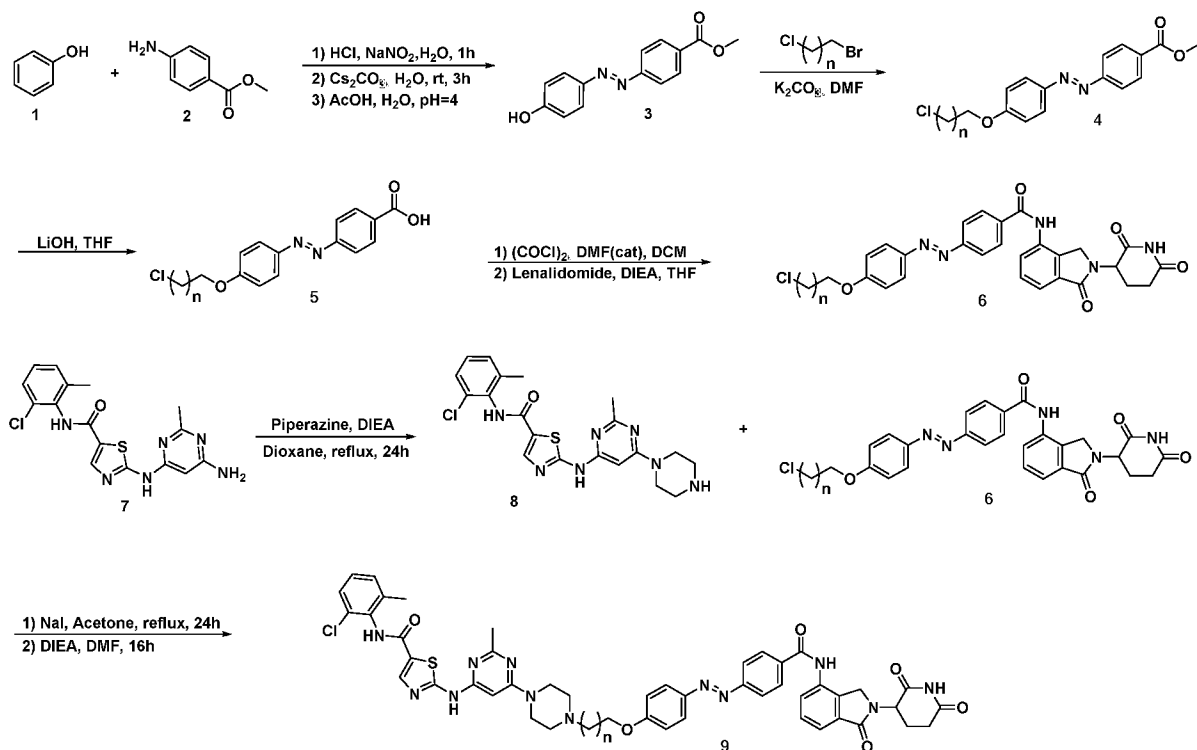
图 8 为 500nM 浓度的化合物 4C-trans 对 ABL 基因表达影响随时间变化曲线。

具体实施方式

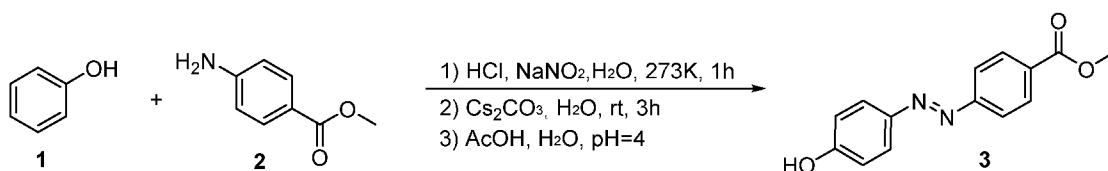
下面结合附图和实施例具体介绍本发明实质性内容, 但并不以此限定本发明的保护范围。实施例中, 提到的室温或代表室温的缩写 rt 均指常温。

实施例 1: PROTAC 分子的合成和结构确证

合成路线图:

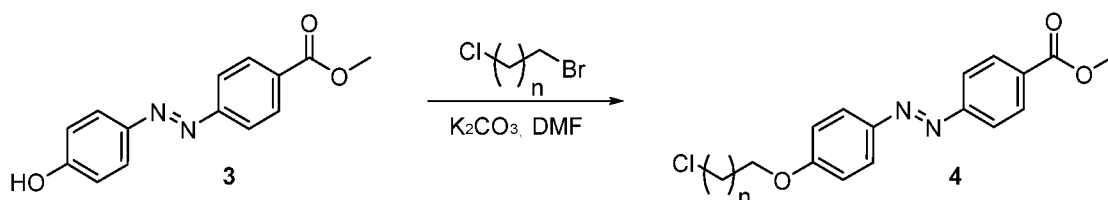


(E)-4-((4-羟基苯基)二氮烯基)苯甲酸甲酯(3)

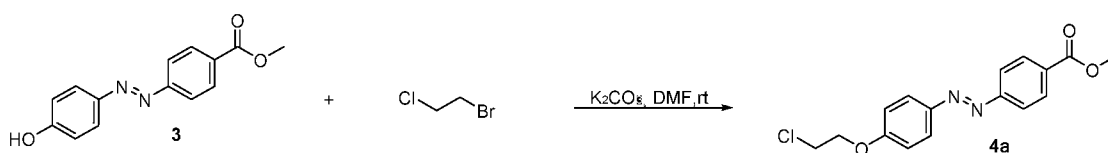


将化合物 2(11.54g, 76.1mmol)溶于水(135ml)中, 加入 HCl(15.8ml, 190mmol), 冰浴下冷却至 5°C。向反应液中缓慢滴加预冷的亚硝酸钠(5.03g, 79.8mmol)水溶液(35ml), 5°C下搅拌 1 小时。将苯酚(1)(7.52g, 79.9mmol), K₂CO₃(15.0g, 108.5mmol)的水溶液(120ml)滴加到反应液中(10min 滴完), 室温下搅拌 3 小时。用稀醋酸调节至 pH=4, 有大量棕黄色固体析出。抽滤, 滤饼依次用水和甲醇洗涤, 得到棕色固体 3(15.65g, 80.3%)。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.57 (s, 1H), 8.18 – 8.09 (m, 2H), 7.96 – 7.80 (m, 4H), 6.97 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H).

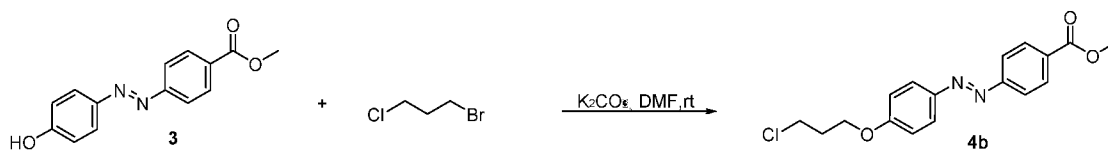


将化合物 3(2.56g, 10mmol)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(20ml)中, 加入 1-溴-2-氯乙烷(1.03ml, 12mmol)和碳酸钾(4.14g, 30mmol), 室温反应 20h。向反应液中加入 200mL 水, 大量棕黄色固体析出。抽滤, 滤饼用 10ml 水洗涤 3 次, 干燥后得到橘黄色固体 4。



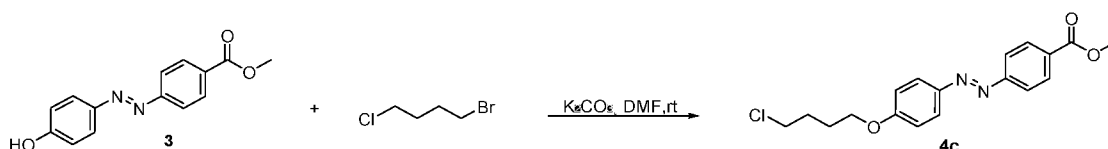
(E)-4 - ((4-(2-氯乙氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸甲酯(4a)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 – 8.06 (m, 2H), 7.98 – 7.81 (m, 4H), 7.29 – 7.09 (m, 2H), 4.38 (t, J = 11.2 Hz, 2H), 4.08 – 3.94 (m, 2H), 3.90 (s, 3H).



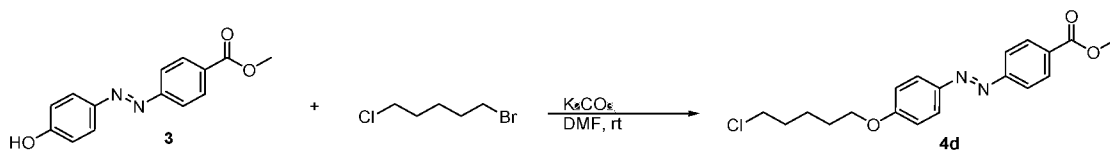
(E)-4-((4-(3-氯丙氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸甲酯(4b)

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.24 – 8.12 (m, 2H), 8.01 – 7.86 (m, 4H), 7.09 – 6.97 (m, 2H), 4.21 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.77 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.28 (p, J = 6.0 Hz, 2H).

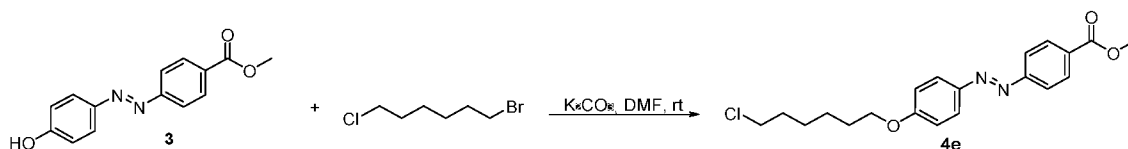


(E)-4-((4-(4-氯丁氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸甲酯(4c)

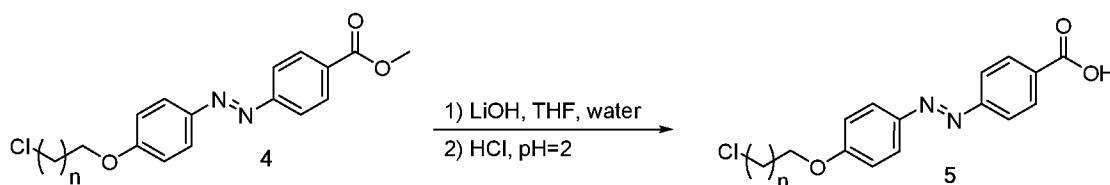
¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.17 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.92 (dd, J = 11.4, 8.5 Hz, 4H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.09 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.63 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 2.01 (p, J = 2.9 Hz, 4H).

*(E)*-4-((4-((5-氯戊基)氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸甲酯(4d)

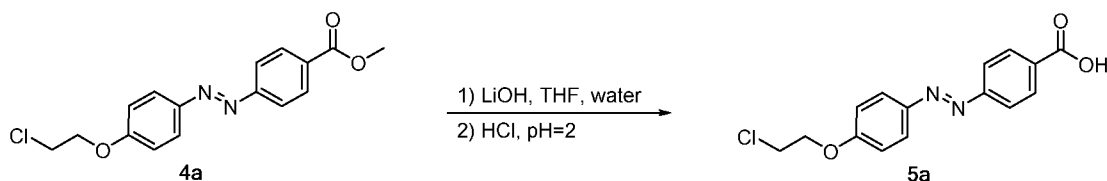
¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.17 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.99 – 7.85 (m, 4H), 7.06 – 6.96 (m, 2H), 4.07 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.95 – 1.80 (m, 4H), 1.66 (ddt, J = 14.5, 9.7, 5.7 Hz, 2H).

*(E)*-4-((4-((6-氯己基)氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸甲酯(4e)

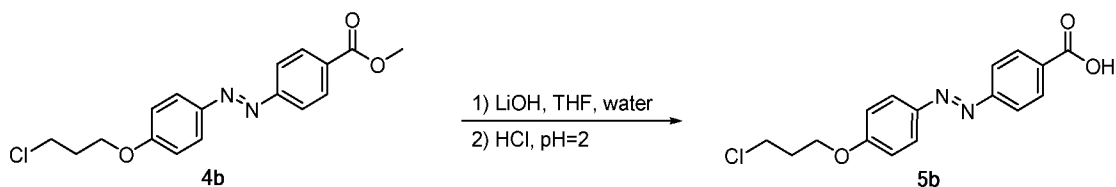
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.17 – 4.05 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 1.84-1.66 (m, 4H), 1.56-1.38 (m, 4H).



将化合物 4(5mmol)溶于 10ml 四氢呋喃中, 缓慢加入 10ml 氢氧化锂(600mg, 25mmol)水溶液, 室温下搅拌过夜。反应完成后在搅拌下向反应液中加入 200mL 水, 用稀盐酸调节体系至 pH = 2, 有大量橙色固体析出。抽滤得粗品, 滤饼用水洗涤 3 次, 干燥后得到橙色固体 5。

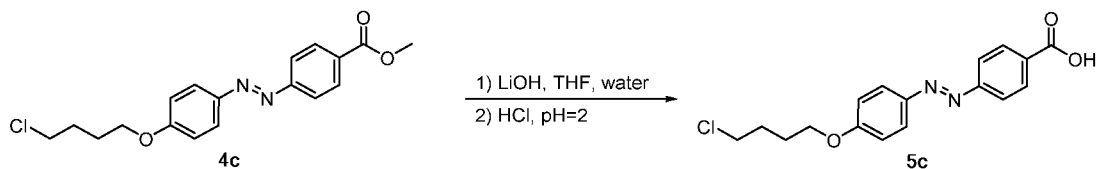
*(E)*-4-((4-(2-氯乙氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸(5a)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.40 – 12.80 (s, 1H), 8.32 – 8.10 (m, 2H), 8.06 – 7.81 (m, 4H), 7.29 – 7.09 (m, 2H), 4.38 (t, J = 10.8 Hz, 2H), 4.12 – 3.92 (m, 2H).



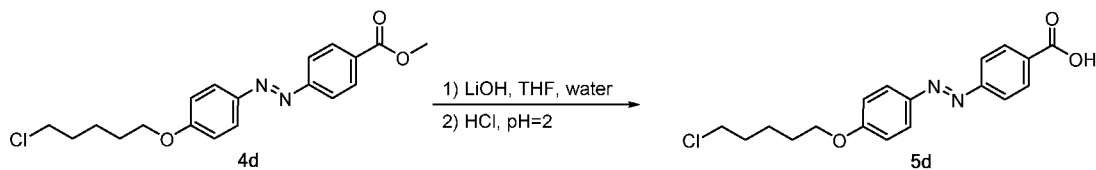
(E)-4-((4-(2-氯丙氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸(5b)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.06 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.76 (s, 2H), 4.21 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.82 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.22 (p, J = 6.4 Hz, 2H).



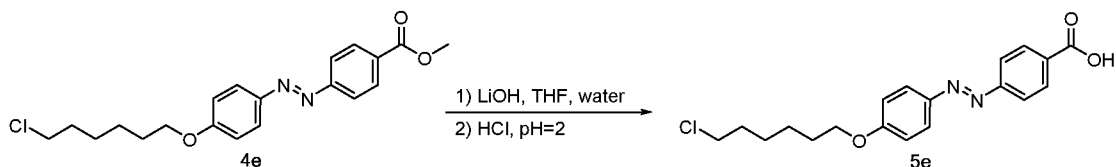
(E)-4-((4-(2-氯丁氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸 (5c)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.13 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 1.97 – 1.77 (m, 4H).



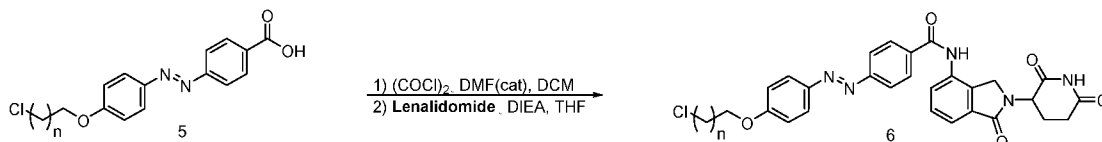
(E)-4-((4-(2-氯戊氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸(5d)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.09 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.86 (dd, J = 25.2, 8.2 Hz, 4H), 7.13 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.68 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 1.79 (dq, J = 12.5, 5.6 Hz, 4H), 1.57 (q, J = 7.9 Hz, 2H).

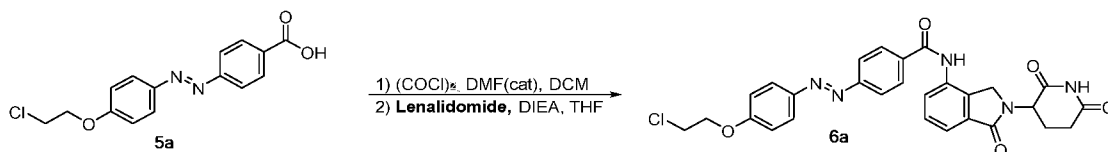


(E)-4-((4-(2-氯己氧基)苯基)二氮烯基)苯甲酸 (5e)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.04 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.07 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.64 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.75 (s, 4H), 1.46 (s, 4H).

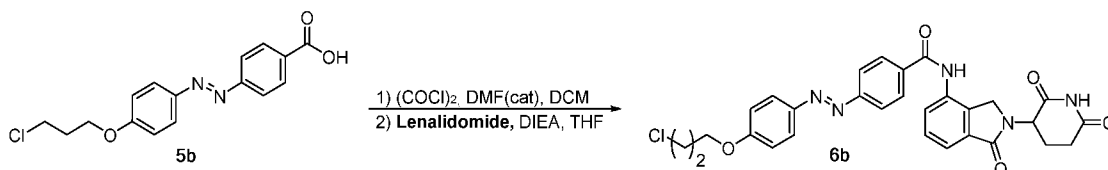


将化合物 5(2.0mmol)溶于无水四氢呋喃(10ml)中,加入草酰氯(338ul, 4.0mmol),加 1 滴 N, N-二甲基甲酰胺,室温下搅拌 30 分钟。减压蒸馏后,将体系溶于无水四氢呋喃(5ml)中,冰浴下逐滴加入来那度胺(518.5mg, 2.0mmol)和 DIEA(992ul, 6.0mmol)的四氢呋喃(20ml)溶液,室温下搅拌过夜。反应完全后,减压蒸馏获得棕色固体,粗品用甲醇重结晶,得到化合物 6,为橙色固体。



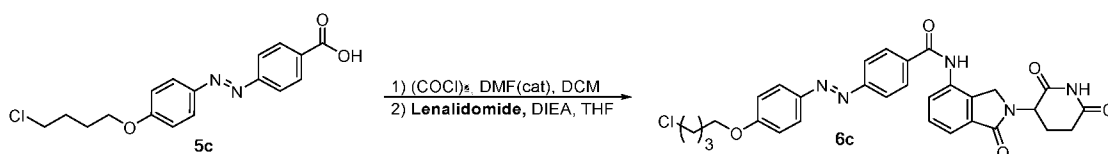
(E)-4-((4-(2-氯乙氧基)苯基)二氮烯基)-N-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)苯甲酰胺(6a)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.96 (s, 1H), 10.48 (s, 1H), 8.18 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.96 (dt, J = 8.9, 4.2 Hz, 4H), 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.65 – 7.55 (m, 2H), 7.26 – 7.14 (m, 2H), 5.15 (dd, J = 13.2, 5.2 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 4.40 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 4.00 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.99 – 2.81 (m, 1H), 2.67 – 2.54 (m, 1H), 2.45 – 2.27 (m, 1H), 2.07 – 1.93 (m, 1H).



(E)-4-((4-(2-氯丙氧基)苯基)二氮烯基)-N-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)苯甲酰胺(6b)

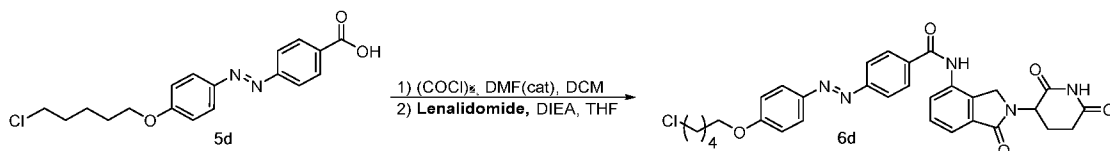
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 8.19 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.97 (dd, J = 8.4, 5.8 Hz, 4H), 7.77 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (dt, J = 15.2, 7.5 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.17 (dd, J = 13.2, 5.0 Hz, 1H), 4.54 – 4.38 (m, 2H), 4.23 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.83 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.99 – 2.82 (m, 1H), 2.64 – 2.54 (m, 1H), 2.45 – 2.34 (m, 1H), 2.23 (p, J = 6.5 Hz, 2H), 2.04 – 1.97 (m, 1H).



(E)-4-((4-(2-氯丁氧基)苯基)二氮烯基)-N-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)苯甲酰胺 (6c)

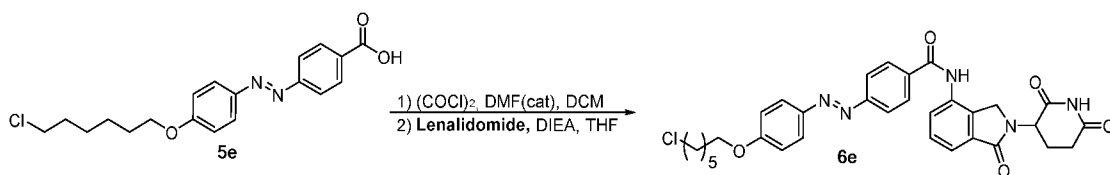
¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆) δ 11.01 (s, 1H), 10.53 (s, 1H), 8.15 (dd, J = 18.7, 8.2 Hz, 2H), 7.94 (dd, J = 11.3, 8.3 Hz, 4H), 7.77 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.60 (dt, J = 14.9, 7.4 Hz, 2H), 7.16

(dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 2H), 5.17 (dd, $J = 13.5, 4.9$ Hz, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 3.73 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.99 – 2.85 (m, 1H), 2.66 – 2.55 (m, 1H), 2.48 – 2.33 (m, 1H), 2.07 – 1.98 (m, 1H), 1.96 – 1.79 (m, 4H).



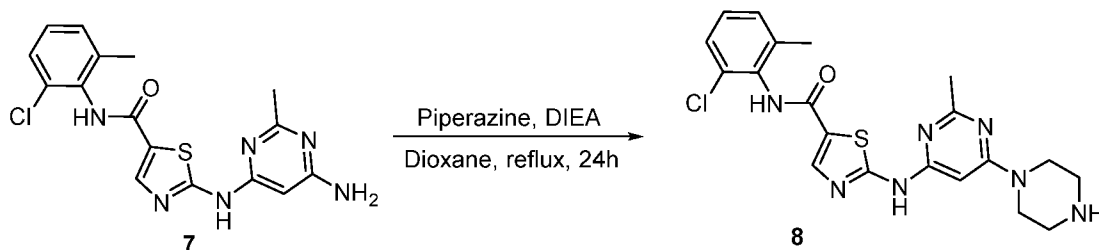
(*E*)-4-((4-(2-氯戊氧基)苯基)二氮烯基)-*N*-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)苯甲酰胺(6d)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.90 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.87 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.51 (dt, $J = 15.1, 7.5$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.07 (dd, $J = 13.1, 5.2$ Hz, 1H), 4.43 – 4.33 (m, 2H), 4.03 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.90 – 2.80 (m, 1H), 2.62 – 2.48 (m, 1H), 2.46 – 2.32 (m, 1H), 1.99 – 1.87 (m, 1H), 1.70 (d, $J = 9.7$ Hz, 4H), 1.47 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H).



(*E*)-4-((4-(2-氯己氧基)苯基)二氮烯基)-*N*-(2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚-4-基)苯甲酰胺(6e)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.00 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.95 (t, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.60 (dt, $J = 15.0, 7.4$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 5.16 (dd, $J = 13.1, 5.1$ Hz, 1H), 4.54 – 4.40 (m, 2H), 4.10 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.96 – 2.84 (m, 1H), 2.68 – 2.52 (m, 1H), 2.46 – 2.33 (m, 1H), 2.04 – 1.98 (m, 1H), 1.88 – 1.62 (m, 4H), 1.47 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H).

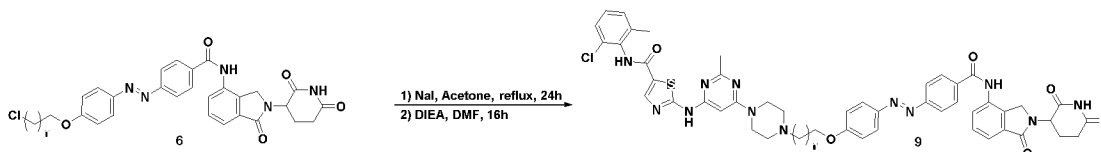


N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-(2-甲基-6-(哌嗪-1-基)嘧啶-4-基氨基)噻唑-5-甲酰胺 (8)

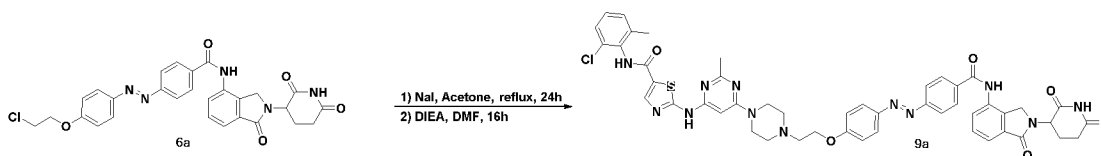
将 2-(6-氯-2-甲基嘧啶-4-基氨基)-*N*-(2-氯-6-甲基苯基)噻唑-5-甲酰胺, 7(1.00g, 2.54mmol), 哌嗪(2.19g, 25.4mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(0.84mL, 5.07mmol)溶于无水 1,4-二氧六环(30ml)

中, 回流 12 小时。减压蒸馏所得的油状物依次用水/甲醇、甲醇/醚洗涤, 得灰白色固体, 粗品用乙醚重结晶得到化合物 8(0.82g, 73%)。

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.88 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.40 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.02 (s, 1H), 3.44 (s, 4H), 2.74 (s, 4H), 2.40 (d, $J = 3.0$ Hz, 3H), 2.23 (d, $J = 2.9$ Hz, 3H).

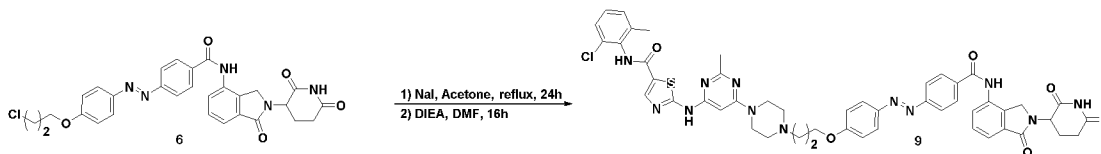


向中间体 6 (0.11mmol)的丙酮(10ml)溶液中加入碘化钠(83mg, 0.55mmol), 回流 24 小时, 减压蒸馏得橘黄色固体。将固体溶于 DMF (20ml) 中, 并依次加入化合物 8(43mg, 0.10mmol) 和 DIEA(96 μL , 0.57mmol), 80 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 16 小时。将反应液冷却至室温, 加入 200mL 水, 有大量橙黄色固体析出, 抽滤后粗品经 TLC 纯化(MeOH / DCM, 1/50 至 1/25), 得到化合物 9, 橙色固体。



(E)-N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-((6-(4-(2-(4-((4-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-oxoisindolin-4-基)氨基甲酰基)苯基)二氮烯基)苯氧基)乙基)哌嗪-1-基)-2-甲基嘧啶-4-基)氨基)噻唑-5-甲酰胺(9a)

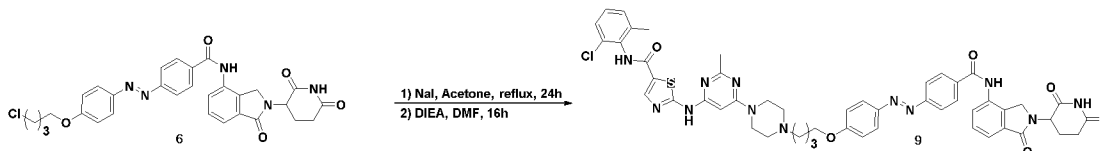
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.47 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.26 – 8.13 (m, 3H), 8.06 – 7.85 (m, 4H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.68 – 7.46 (m, 2H), 7.38 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.32 – 7.15 (m, 4H), 6.05 (s, 1H), 5.15 (dd, $J = 13.2, 5.2$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 16.4$ Hz, 2H), 4.25 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.59 – 3.46 (m, 4H), 2.99 – 2.88 (m, 1H), 2.77 – 2.67 (m, 1H), 2.63 – 2.53 (m, 4H), 2.40 (s, 3H), 2.36 – 2.30 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.06 – 1.91 (m, 1H). MS(ESI): calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{45}\text{ClN}_{12}\text{O}_6\text{S}$, 952.30; m/z : $[\text{M}]^+ = 953.3036$



(E)-N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-((6-(4-(3-(4-((4-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-oxoisindolin-4-基)氨基甲酰基)苯基)二氮烯基)苯氧基)丙基)哌嗪-1-基)-2-甲基嘧啶-4-基)氨基)噻唑-5-甲酰胺(9b)

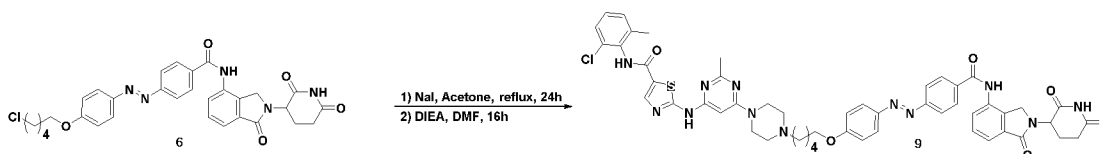
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) 11.47 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.25 – 8.11 (m, 3H), 7.95 (dd, $J = 8.5, 5.9$ Hz, 4H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 13.7, 7.4$ Hz, 2H), 7.38 (dd, $J = 7.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.31 – 7.12 (m, 4H), 6.04 (s, 1H), 5.15 (dd, $J = 13.2, 5.2$ Hz,

1H), 4.46 (s, 2H), 4.23 – 4.12 (m, 2H), 3.59 – 3.46 (m, 4H), 2.96 – 2.85 (m, 1H), 2.63 – 2.60 (m, 1H), 2.57 – 2.49 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 2.32 – 2.25 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.07 – 1.88 (m, 3H). MS(ESI): calcd for $C_{49}H_{47}ClN_{12}O_6S$, 966.32; m/z $[M]^+$: 967.3325



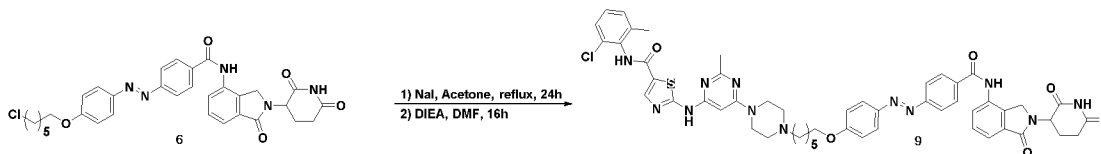
(E)-N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-((6-(4-(4-(4-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1- oxoisindolin-4-基)氨甲酰基)苯基)二氮烯基)苯氧基)丁基)哌嗪-1-基)-2-甲基咪唑-4-基)氨基)噻唑-5-甲酰胺 (9c)

^1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.41 (s, 1H), 10.96 (s, 1H), 10.44 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.30 – 8.09 (m, 3H), 7.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 7.80 (dd, $J = 18.2, 7.5$ Hz, 1H), 7.58 (h, $J = 8.5, 7.9$ Hz, 3H), 7.38 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.05 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 5.15 (dd, $J = 13.6, 5.2$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 17.5$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.55 – 3.49 (m, 4H), 3.05 – 2.79 (m, 1H), 2.66 – 2.54 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.43 – 2.33 (m, 4H), 2.32 – 2.26 (m, 1H), 2.25 – 2.19 (s, 3H), 2.10 – 1.95 (m, 1H), 1.89 – 1.71 (m, 2H), 1.63 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H). MS(ESI): calcd for $C_{50}H_{49}ClN_{12}O_6S$, 980.33; m/z : $[M]^+$ = 981.33728



(E)-N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-((6-(4-(5-(4-((4-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1- oxoisindolin-4-基)氨甲酰基)苯基)二氮烯基)苯氧基)戊基)哌嗪-1-基)-2-甲基咪唑-4-基)氨基)噻唑-5-甲酰胺(9d)

^1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.46 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.25 – 8.12 (m, 3H), 7.95 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 13.6, 7.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.03 (s, 1H), 5.15 (dd, $J = 12.2, 5.2$ Hz, 1H), 4.50 – 4.37 (m, 2H), 4.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.60 – 3.41 (m, 4H), 2.98 – 2.82 (m, 1H), 2.64 – 2.53 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.41 – 2.34(m, 4H), 2.33 – 2.27 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.01 – 1.94 (m, 1H), 1.85 – 1.70 (m, 2H), 1.57 – 1.43 (s, 4H). MS(ESI): calcd for $C_{51}H_{51}ClN_{12}O_6S$ 994.35; m/z : $[M]^+$ = 995.3535



(E)-N-(2-氯-6-甲基苯基)-2-((6-(4-(6-(4-((4-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基) - 1-oxoisindolin-4-基)氨甲酰基)苯基)二氮烯基)苯氧基)己基)哌嗪-1-基)-2-甲基咪唑-4-基)氨基)噻唑-5-甲酰胺

(9e)

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.39 (s, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.25 – 8.02 (m, 3H), 7.90 (t, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.73 (p, $J = 10.2, 8.7$ Hz, 1H), 7.54 (dt, $J = 15.6, 7.8$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.00 (s, 1H), 5.11 (dd, $J = 13.1, 5.2$ Hz, 1H), 4.50 – 4.34 (m, 2H), 4.04 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.46 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 2.96 – 2.78 (m, 1H), 2.61 – 2.53 (m, 1H), 2.41 – 2.31 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.21 – 2.11 (m, 4H), 2.01 – 1.87 (m, 1H), 1.79 – 1.64 (m, 2H), 1.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.34 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H). MS (ESI): calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{53}\text{ClN}_{12}\text{O}_6\text{S}$ 1008.36; m/z : $[\text{M}]^+ = 1009.36956$

实施例 2：效果实施例

最初，研究人员合成了 2C 化合物（图 2A），这是连接链最短（ $n=1$ ）的小分子，并使用 BCR-ABL 和 CRBN 阳性的 K562 细胞株，通过免疫印迹测试化合物在细胞中对 ABL 和 BCR-ABL 蛋白的降解情况。给药 36 小时后，WB 结果显示化合物 2C 能够剂量依赖性地下调 BCR-ABL 蛋白的水平，在 100nM 浓度下的 ABL 蛋白和 BCR-ABL 融合蛋白水平的显著降低（图 2B）。随后，研究人员尝试延长连接链（提高 n 值）。结果表明，随着接头延伸直至 4 个碳原子时，化合物的降解活性持续提高，但链长进一步延伸后活性逐渐降低。在这些 PROTAC 分子中，化合物 4C 降解 BCR-ABL 融合蛋白显示出最佳活性（图 2C）。图 2D 为 3C 化合物对 K562 细胞株中 ABL 和 BCR-ABL 蛋白降解作用的量效关系；图 2E 为 4C 化合物对 K562 细胞株中 ABL 和 BCR-ABL 蛋白降解作用的量效关系；图 2F 为 5C 化合物对 K562 细胞株中 ABL 和 BCR-ABL 蛋白降解作用的量效关系；图 2G 为 6C 化合物对 K562 细胞株中 ABL 和 BCR-ABL 蛋白降解作用的量效关系。

上述试验表明，蛋白靶向降解嵌合分子 2C、3C、4C、5C、6C 均可不同程度地抑制 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病 K562 细胞中 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的表达，因而可以用于制备治疗 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病的药物。

实施例 3：效果实施例

研究发现，化合物 4C 具有良好的光致异构化活性。化合物 4C 经 200-275nm 紫外光（UV-C）照射后，在 345-425nm 间 trans-偶氮苯基团的特征吸收峰消失，这表明化合物由 trans 构型转变为 cis 构型（图 3A）。随后，我们通过紫外-可见吸收光谱探究了化合物 4C 的光动力学特征。结果显示：在 361nm 是化合物 4C-trans 中偶氮基团的最大吸收（ λ_{max} ）。经紫外照射后，361nm 处的峰逐渐降低，这表明该化合物逐渐由 trans 构型转为 cis 构型。361nm 处的吸光度-时间的曲线图表明：经紫外照射 1 小时，化合物基本完全转化为 cis 构型（图 3B）。cis 构型的化合物 4C 经白光照射，逐渐转化为 trans 构型（图 3C）。此外，由于化合物 4C 是

T 型光开关, cis 构型在黑暗条件下经自发热弛豫转化为 trans 构型, 在 25°C 时 T_{1/2} 约为 10 小时。随后, 我们测试了光敏开关的可逆性, 结果表明: 化合物 4C 在经紫外和白光轮流照射 5 次后依然相对稳定。

研究人员进一步评价了化合物 4C 的细胞活性。在抗 K562 细胞增殖活性测试中, 化合物 4C 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 68nM (图 4A); 在细胞活力测试中, 化合物 4C 的半数有效浓度 (EC₅₀) 为 28nM (图 4B); 此外, 化合物 4C 基本不影响非 BCR-ABL 依赖的肿瘤细胞系, 如 A549, HCT116, HEK293T 和 MCF-7 乳腺癌 (图 4B)。由此可见, 化合物 4C 对 BCR-ABL 依赖的 K562 细胞系有着良好的选择性。

其中, 抗 K562 细胞增殖活性测试的操作方法如下:

在 96 孔板中配制 100μL 的 K562 细胞悬液及 10μL 不同浓度的待测化合物。将培养板放在培养箱孵育 48 小时 (37°C, 5% CO₂)。向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

细胞毒性活力 (%) = [A(加药)-A(空白)]/[A(0 加药)-A(空白)] × 100, 其中:

A(加药): 具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A(空白): 具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A(0 加药): 具有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

其中, K562 细胞活力测试的操作方法如下:

将 50uL 的 K562, MCF-7, HCT116 和 A549 的细胞悬液加入 96 孔板上孵育 12 小时, 将 10uL 化合物加入孔中, 孵育 48 小时后。按 CellTiter-Glo® 发光细胞活力测定试剂盒 (Promega) 操作。使用 GraphPad Prism 6 中的非线性回归分析数据。

为测试化合物 4C 对 K562 细胞中 c-ABL 和 BCR-ABL 蛋白的降解效果, 研究人员进行了免疫印迹实验。时效实验显示: 经 250nM 化合物 4C 孵育 4 小时后 ABL 明显降低, 10 小时后 BCR-ABL 和 c-ABL 蛋白均显着降解, 32 小时后 ABL 和 BCR-ABL 的达到最大降解, 48 小时后, K562 细胞出现明显凋亡。为了排除化合物 4C 影响 ABL 基因产生假阳性的可能, 研究人员在 K562 细胞中使用 RT-qPCR 研究了 ABL 基因的表达。结果如图 7、图 8 所示。量效实验显示: 与对照组相比, 经不同浓度的化合物 4C 处理 36 小时后的 K562 细胞中, ABL 基因的 mRNA 水平没有显着变化; 时效实验显示, K562 细胞经 500nM 的化合物 4C 孵育 48 小时中未观察到 ABL 基因的 mRNA 水平有显着降低。

免疫印迹实验的操作方法如下:

A. 溶液和试剂

使用反渗透去离子水(RODI) 或同等级别的水制备溶液。

1* PBS: 加入 50 ml 20*PBS 至 950 ml dH₂O 并混合。

1* TBS: 加入 100 ml 10*TBS 至 900 ml dH₂O 并混合。

1*电泳缓冲液: 添加 100 ml 10*电泳缓冲液至 900 ml dH₂O 中并混合。

1*转移缓冲液: 将 100 ml 10*转移缓冲液添加至 100 ml 甲醇+800 ml dH₂O 中, 并混合。

1*TBST: 将 100 ml 10X TBST 添加至 900 ml dH₂O 中并混合。

封闭缓冲液: 含 5% w/v 脱脂奶粉的 1* TBST;

洗涤缓冲液: 1*BST。

一抗稀释缓冲液: 含 5% 脱脂奶粉的 1*TBST; 要制备 20 ml, 添加 1.0 g 脱脂奶粉至 20ml 1* TBST, 然后充分混匀。

HRP 偶联二抗: Anti-rabbit IgG、HRP-linked Antibody (#7074)。

检测试剂: SignalFire™ ECL Reagent (#6883)。

B. 蛋白质印迹

制备样品:

给药后的 K562 细胞孵育 24 小时处理。

从培养物中吸出培养基; 用 1* PBS 洗涤细胞; 吸出。

加入弱效 RIPA 裂解液 (100 μ l) 来裂解细胞, 裂解 40min。

13000rpm、4℃、15min 离心, 取 80 μ l 上清液并加入 20 μ l 上样缓冲液, 并在 100℃下加热 8 分钟; 放在冰上冷却。

上样 10 μ L 到 10%的 SDS-PAGE 凝胶上。湿法转至 PVDF 膜上。

C. 膜封闭和抗体孵育

I. 膜封闭

将膜置于 25 ml 封闭缓冲液中, 在室温下封闭 1 小时。

用 15ml TBST 洗涤三次, 每次 5 分钟。

II. 一抗孵育

将膜和一抗 (按照产品说明书中建议的适当稀释度和稀释液) 置于 10 ml 一抗稀释缓冲液中在 4℃下孵育过夜并不时轻轻晃动。

用 15ml TBST 洗涤三次, 每次 5 分钟。

使用 10 ml 封闭缓冲液稀释 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074, 按 1:2000 的比例) 和 anti-biotin, HRP-linked Antibody (#7075, 按 1:1000-1:3000 的比例) 用以检测生物素化蛋白标准品。将膜与稀释液一起孵育, 在室温下轻轻摇晃孵育 1 小时。

用 15mlTBST 洗涤三次, 每次 5 分钟。

继续进行检测（D 部分）。

D. 蛋白质检测

使用说明：

在 TBST 中清洗与膜结合的 HRP (Antibody Conjugate) 三次，持续 5 分钟。

将显色液与膜一起孵育 1 分钟，倒掉多余溶液（膜将保持湿润）并曝光。

RT-qPCR 实验的操作方法如下：

根据 NCBI 数据库中的相关基因信息，选择编码序列，委托金斯瑞生物科技有限公司设计合成引物，序列如下：

引物名称	序列(5'to3')	碱基数	引物用途	纯化方式
BCR/ABLb3a2sens	TCCACTCAGCCACTGGATTTAA	22	real time PCR	PAGE
e antisense	TGAGGCTCAAAGTCAGATGCTA CT	24	real time PCR	PAGE

收集于 1.5m L 离心管中的 K 562 细胞重悬液短暂离心，吸去培养上清后加入适量 Trizol 试剂并反复吹打以裂解细胞，室温静置 5 min；向上述裂解液中加入 0.2 倍体积的氯仿，涡旋 15s 后，于室温静置 3 min；12000rpm、4℃离心 15min，从离心机中小心取出离心管，吸取上层水相转移至新的离心管中；加入等体积的异丙醇，混匀后室温静置 10min；12000rpm、4℃离心 15min 此时试管底部出现白色的 RNA 沉淀；小心弃去上清，加入 1mL 的 75%乙醇(0.1%，DEPC 水配制)，上下颠倒均匀；10min；12000rpm、4℃离心 15min，为了 RNA 沉淀尽快在空气中干燥加入可 500μL 无水乙醇除水；待白色状核酸刚好消失时，加入适量的 0.1%DEPC 水重悬，混匀后，用分光光度计检测所提取 RNA 样品的纯度和浓度，RNA 溶液的 A260/A280 的比值即为 RNA 纯度，比值范围 1.8 到 2.1。

按下表配置 cDNA，轻弹管底将溶液混合，6000rpm 短暂离心。混合液在加入逆转录酶 MMLV 之前先 70℃干浴 3 分钟，取出后立即冰水浴至管内外温度一致，然后加逆转录酶 0.5 ul，37℃水浴 60 分钟。取出后立即 95℃干浴 3 分钟，得到逆转录终溶液即为 cDNA 溶液，保存于-80℃待用。

取 0.2ml 薄壁 PCR 管，分别编号。向各管中加入 2×qPCR TaqMix12.5ul,10uM 各基因正反向引物混合物 0.5ul,对应的 cDNA 各 1ul。一管中不加模板用作阴性对照。各管补加水至 25ul。混匀,置于 SLAN 荧光定量 PCR 仪中。95℃ 5min 预变性后,95℃ 15s→65℃ 35s(荧光检测),40 cycles。

序号	反应物	剂量
1	逆转录 buffer	2 ul

2	上游引物	0.2 ul
3	下游引物	0.2 ul
4	dNTP	0.1 ul
5	逆转录酶	0.5 ul
6	DEPC 水	5 ul
7	RNA 模版	2 ul
8	总体积	10 ul

接下来，我们测试了化合物 4C 的不同构型对 ABL 和 BCR-ABL 蛋白降解活性的差异。免疫印迹的结果表明：trans 构型的 4C 化合物在 25nM 浓度下能够轻微降解 BCR-ABL 融合蛋白，500nM 浓度下超过 80% 的 BCR-ABL 和几乎所有 ABL 蛋白被降解（图 5A）。在相同条件下，cis 构型的 4C 化合物在 250nM 浓度下对 BCR-ABL 蛋白没有明显降解（图 5C）。时效实验显示：trans 构型的化合物 4C 在 250nM 浓度下，4 小时后观察到 BCR-ABL 略微减少，10 小时后 BCR-ABL 融合蛋白明显减少，32 小时后超过 90% BCR-ABL 融合蛋白被降解（图 5B）；相同条件下的 cis 构型化合物 4C 在孵育 32 小时后没有观察到 BCR-ABL 的显著减少（图 5D）。以上结果均证明化合物 4C 的 trans 和 cis 构型在降解活性上有很大差异，仅有 trans 构型能有效降解 BCR-ABL 蛋白。免疫印迹实验的操作方法同前述。

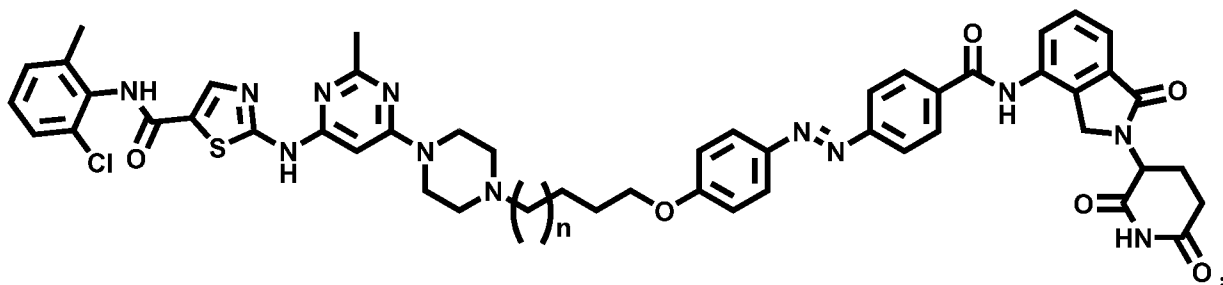
为模拟光控过程，研究人员用化合物 4C-trans 处理 K562 细胞 24 小时，然后将这些细胞移至新鲜培养基中并分成 2 组：一组置于暗室中（VIS 组），另一组分别在孵育 0、4、8、12、16、24 小时后经紫外照射，以此模拟光致异构化过程（UV 组）。结果显示：黑暗组中，BCR-ABL 融合蛋白维持在低水平，ABL 几乎消失（图 6-VIS），而在 UV 组中，ABL 和 BCR-ABL 水平随时间推移而增加（图 6-UV）。这些结果均证明：经紫外照射变构后的 4C 化合物失去了降解活性，通过紫外照射，我们可以随时终止 PROTAC 降解过程。

模拟光控的具体操作方法如下：

将终浓度 100nM 化合物 4C-trans 加入 K562 细胞中，37℃ 孵育 24 小时；洗去培养基并用 1*PBS 洗涤 2 次，后将细胞转移至新鲜的 1640 培养基中（10%FBS，1*谷氨酰胺）培养，并分成两组：一组置于暗室中，另一组每 4 小时用 UV-C 灯照射 30min；分别在转移并孵育 0、4、8、16、24 小时后收集细胞，细胞后处理与免疫印迹相同。

上述实施例的作用在于具体介绍本发明的实质性内容，但本领域技术人员应当知道，不应将本发明的保护范围局限于该具体实施例。

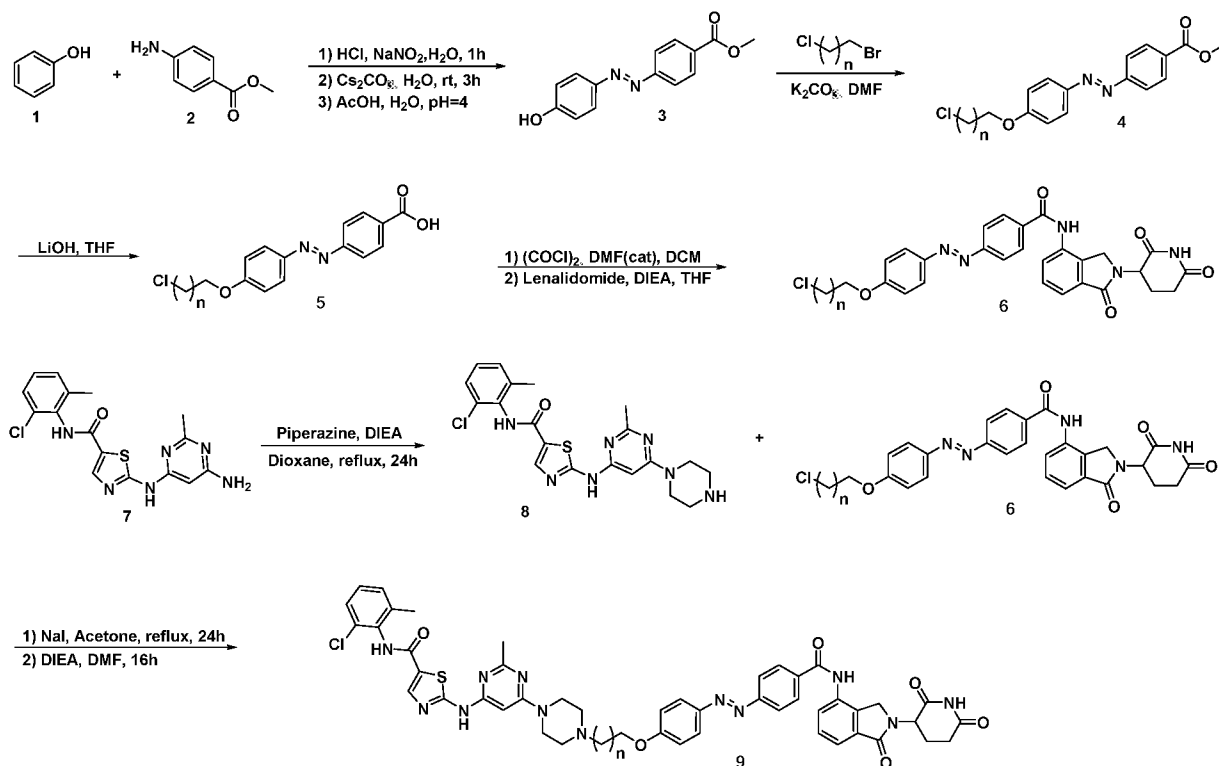
1. 一种蛋白靶向降解嵌合分子，其特征在于，化学结构式如下：



其中，n 为 1~5 任一自然数。

2. 根据权利要求 1 所述的蛋白靶向降解嵌合分子，其特征在于：n=3。

3. 权利要求 1 所述蛋白靶向降解嵌合分子的合成方法，其特征在于，合成路线如下：



其中，n 为 1~5 中任一自然数。

4. 权利要求 1 所述的蛋白靶向降解嵌合分子在制备治疗 BCR-ABL 和/或 CRBN 阳性的白血病的药物中的应用。

5. 权利要求 2 所述的蛋白靶向降解嵌合分子在制备光照调控降解 BCR-ABL 和/或 CRBN 蛋白的试剂或药物方面的应用。

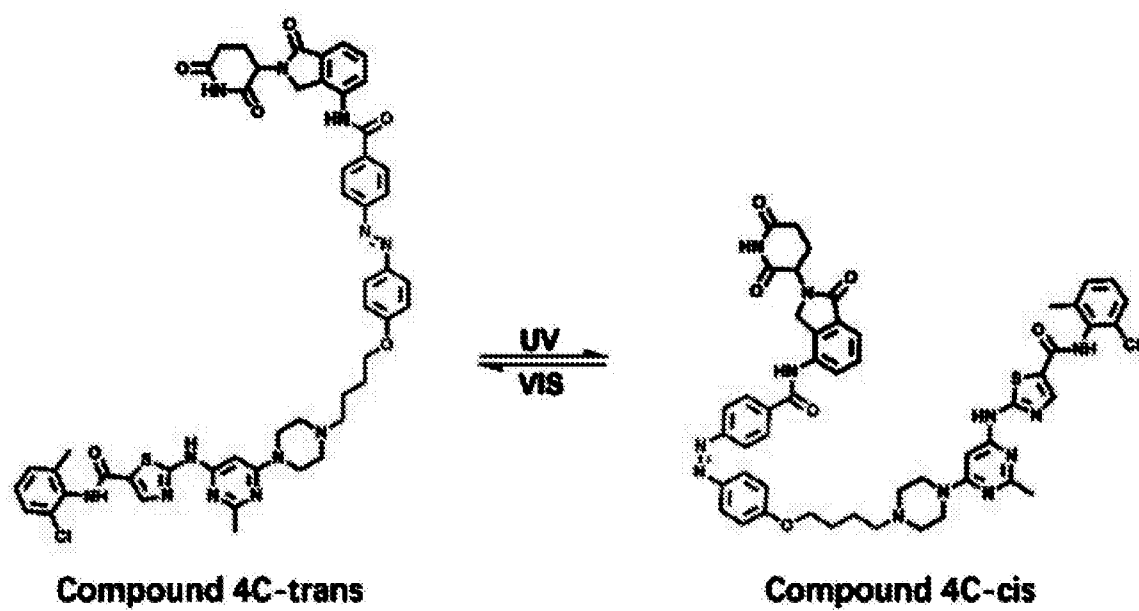


图 1

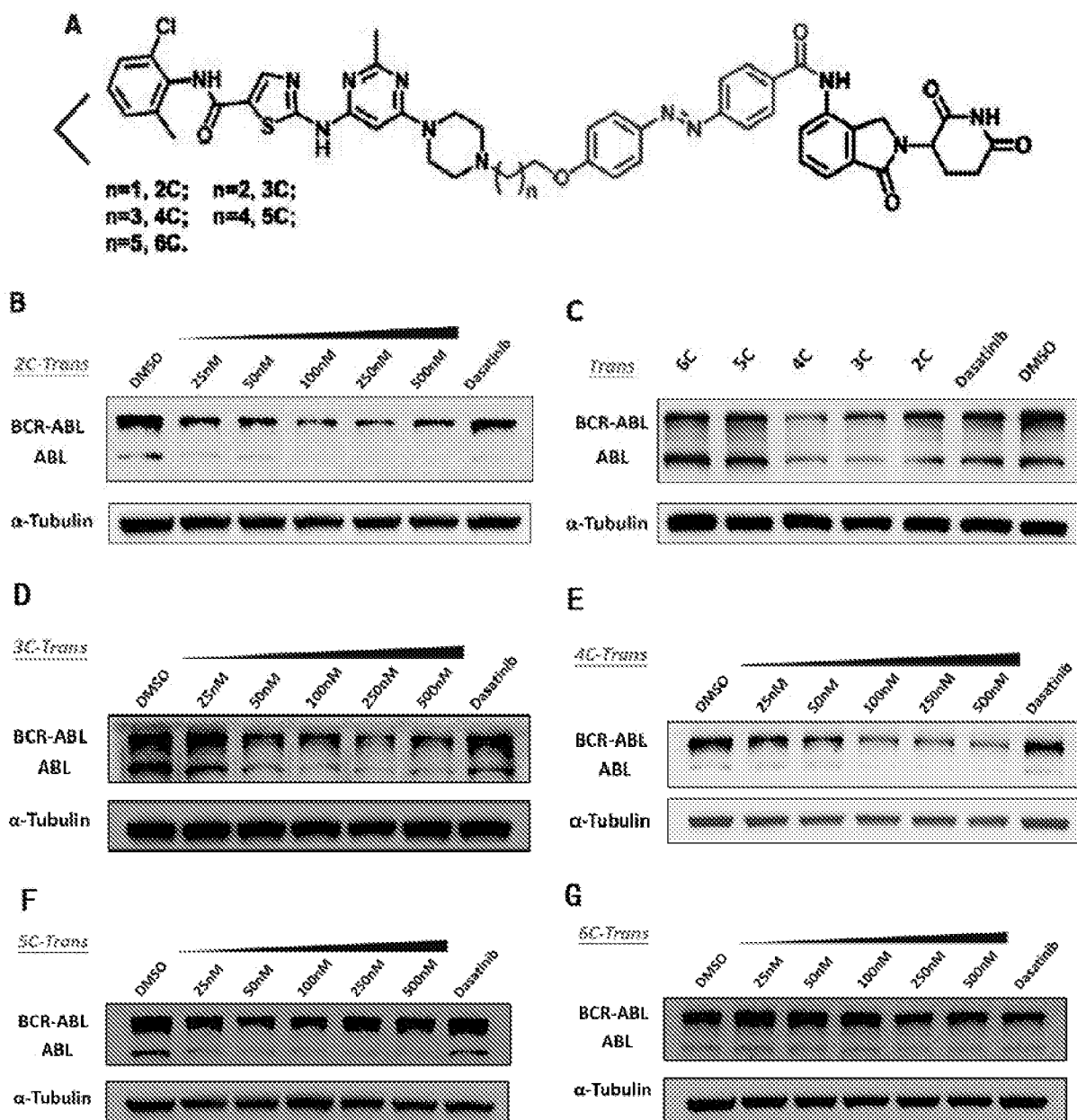


图 2

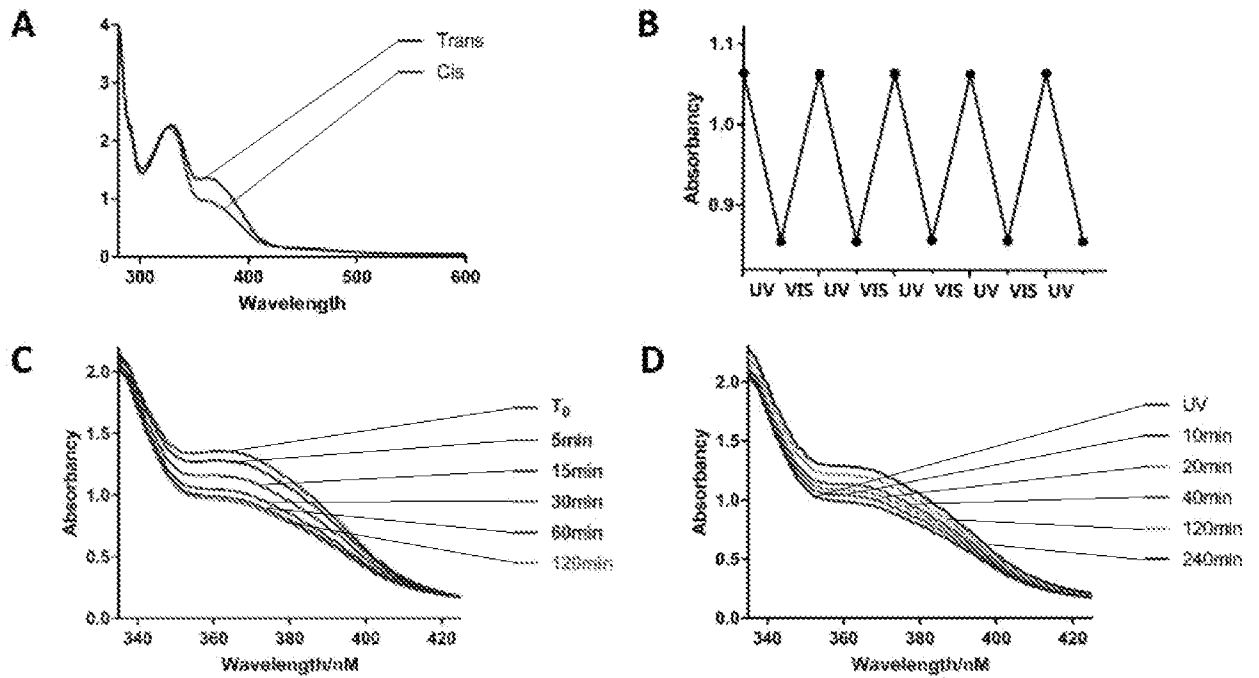


图 3

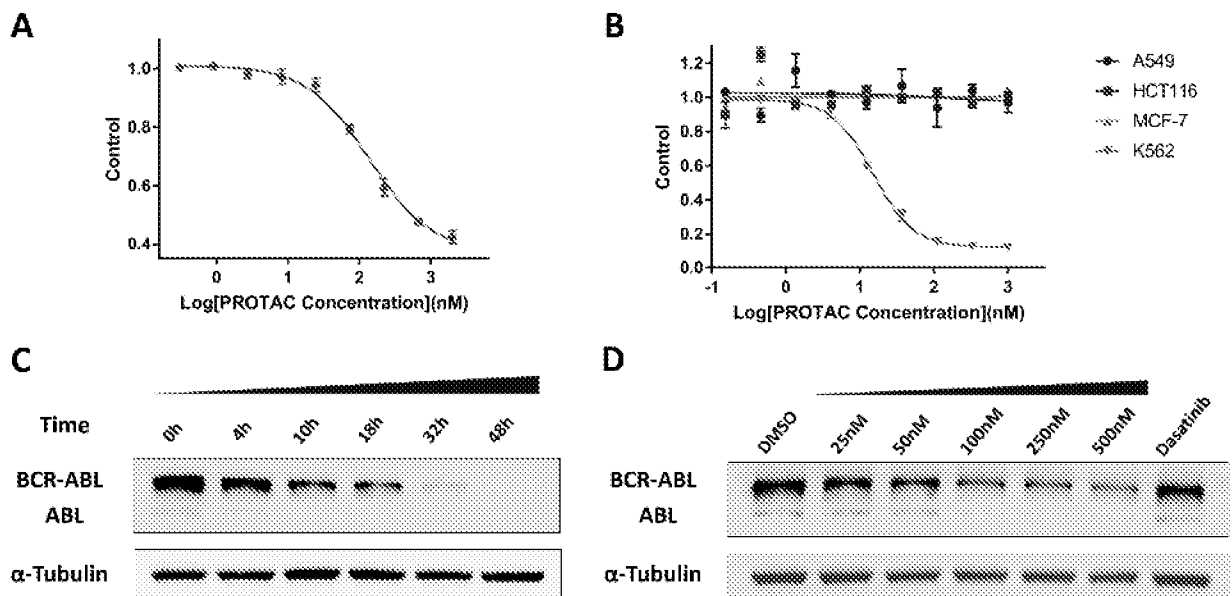


图 4

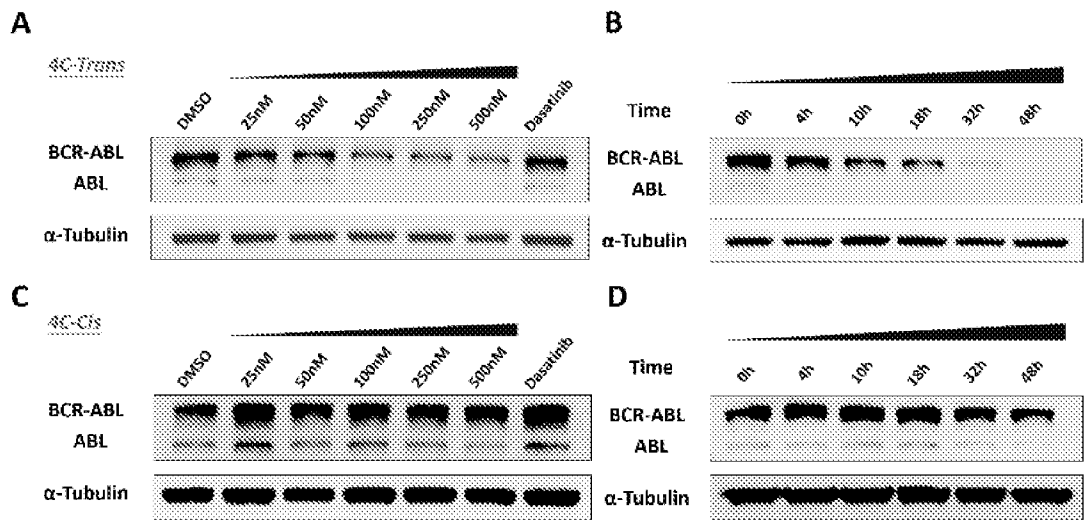


图 5

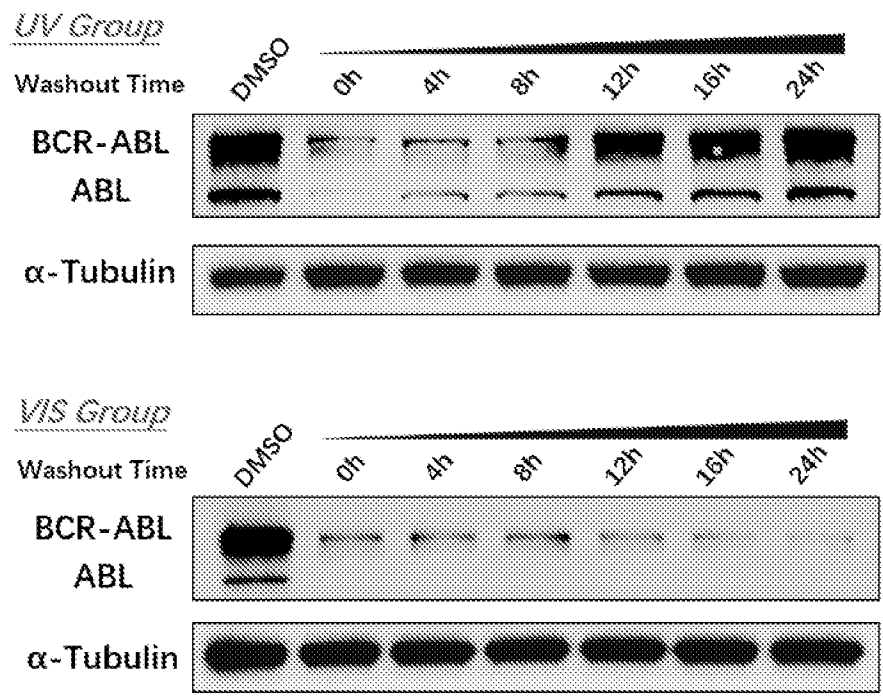


图 6

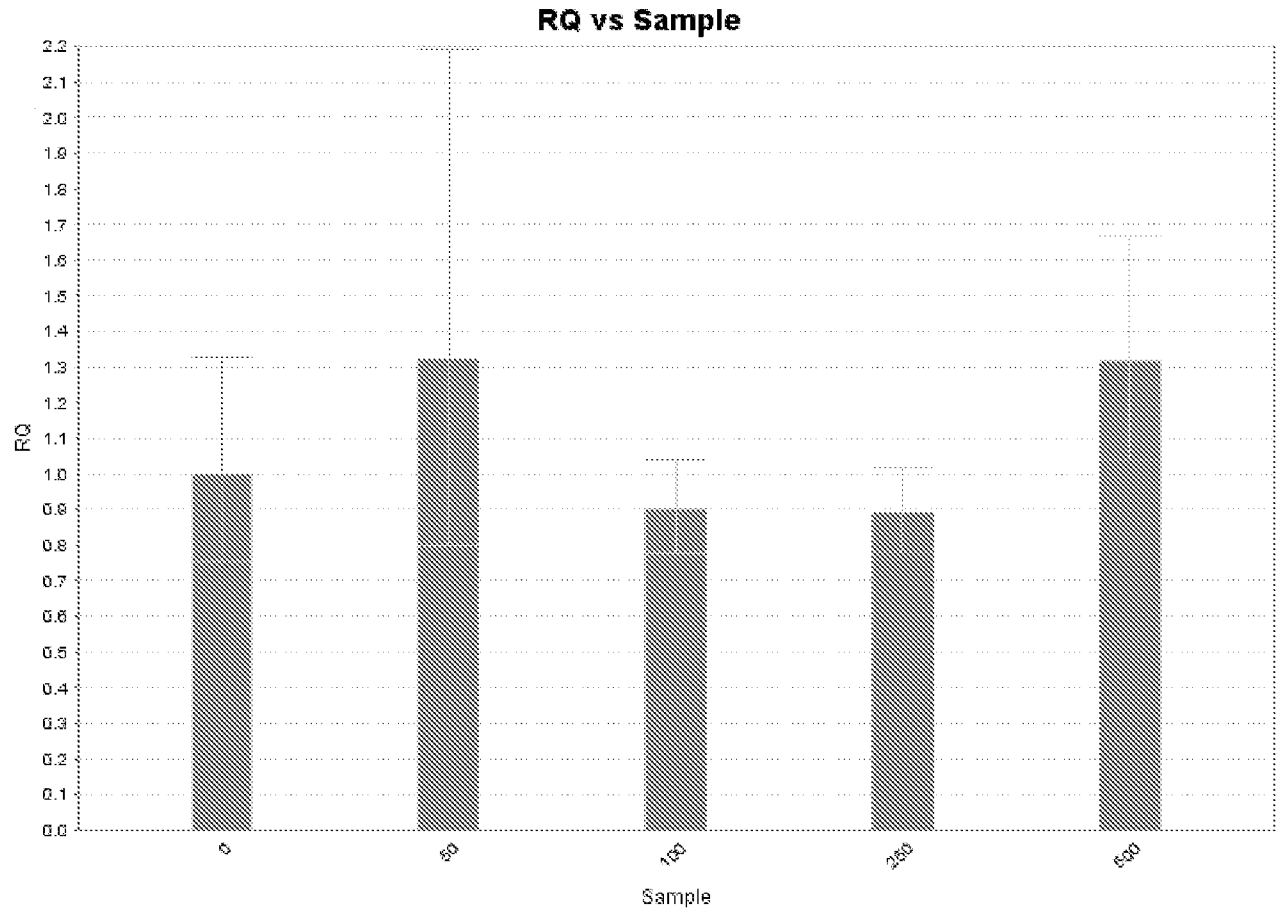


图 7

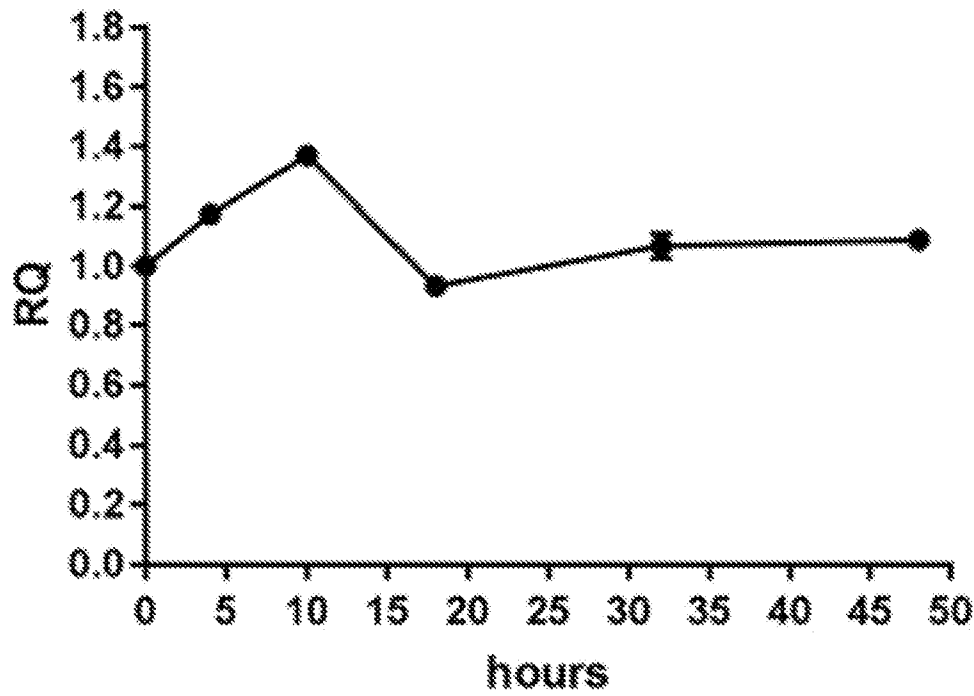


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/104300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 417/14(2006.01)i; A61K 41/00(2006.01)i; A61P 35/02(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)

C07D A61K A61P

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

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

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, STN(REGISTRY), STN(CAPLUS): 蛋白靶向降解嵌合, 癌症, 肿瘤, 白血病, PROTAC, cancer, tumor; STN结构式检索, STN structural formula search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107540608 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 05 January 2018 (2018-01-05) claims 1-12, and description, paragraphs [0006]-[0008]	1-5
A	CN 107382862 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 24 November 2017 (2017-11-24) claims 1-14, and description, paragraphs [0006]-[0008]	1-5
A	CN 107922927 A (UNIV TOKYO SCIENCE FOUND) 17 April 2018 (2018-04-17) description, paragraph [0026], and tables 1-82	1-5
A	CN 108610295 A (FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF DALIAN MEDICAL UNIV; UNIV DALIAN MEDICAL) 02 October 2018 (2018-10-02) claims 1-8	1-5
A	WO 03062220 A1 (NOVARTIS AG et al.) 31 July 2003 (2003-07-31) claims 1-20, and description, p. 8, second-to-last paragraph	1-5
PX	CN 109761970 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 17 May 2019 (2019-05-17) claims 1-5	1-5



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

20 November 2019

Date of mailing of the international search report

02 December 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/104300

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107540608	A	05 January 2018	None			
CN	107382862	A	24 November 2017	None			
CN	107922927	A	17 April 2018	BR	112017027246	A2	28 August 2018
				KR	20180021080	A	28 February 2018
				IL	256217	D0	28 February 2018
				EP	3312273	A4	03 July 2019
				AU	2016279493	A1	14 December 2017
				SG	11201710272V	A	30 January 2018
				WO	2016204197	A1	22 December 2016
				JP	WO2016204197	A1	31 May 2018
				CA	2988379	A1	22 December 2016
				EP	3312273	A1	25 April 2018
				US	2018164289	A1	14 June 2018
CN	108610295	A	02 October 2018	None			
WO	03062220	A1	31 July 2003	EP	1470120	A1	27 October 2004
				EP	2194049	A1	09 June 2010
				IL	208399	D0	30 December 2010
				JP	2005519908	A	07 July 2005
				CA	2474104	C	17 April 2012
				CN	101468984	A	01 July 2009
				GB	0201508	D0	13 March 2002
				US	2014323494	A1	30 October 2014
				ES	2294293	T3	01 April 2008
				PT	1470120	E	03 March 2008
				DE	60318013	T2	13 November 2008
				US	2010222362	A1	02 September 2010
				BR	0307058	A	28 December 2004
				IL	162979	A	30 December 2010
				KR	100778163	B1	28 November 2007
				EP	1470120	B1	12 December 2007
				US	2005209452	A1	22 September 2005
				US	2011294820	A1	01 December 2011
				CN	100467461	C	11 March 2009
				KR	20040081467	A	21 September 2004
				PT	2194049	E	10 November 2014
				CN	1646519	A	27 July 2005
				EP	2194049	B1	13 August 2014
				ES	2503734	T3	07 October 2014
				AT	380807	T	15 December 2007
				IL	208399	A	28 February 2013
				DE	60318013	D1	24 January 2008
				KR	20070058019	A	07 June 2007
				US	7557105	B2	07 July 2009
				JP	2009051837	A	12 March 2009
				CA	2474104	A1	31 July 2003
				US	2009239879	A1	24 September 2009
				JP	5027076	B2	19 September 2012
				MX	PA04007130	A	29 October 2004
				EP	1783126	A2	09 May 2007
				EP	1783126	A3	26 November 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/104300

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 4213595 B2	21 January 2009
CN 109761970 A	17 May 2019	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/104300

A. 主题的分类 C07D 417/14(2006.01)i; A61K 41/00(2006.01)i; A61P 35/02(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) C07D A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, WPI, EPDOC, CNKI, STN(REGISTRY), STN(CAPLUS):蛋白靶向降解嵌合, 癌症, 肿瘤, 白血病, PROTAC, cancer, tumor; STN结构式检索																							
C. 相关文件 <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>A</td> <td>CN 107540608 A (大连理工大学) 2018年 1月 5日 (2018 - 01 - 05) 权利要求1-12, 说明书第[0006]-[0008]段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107382862 A (大连理工大学) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 权利要求1-14, 说明书第[0006]-[0008]段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107922927 A (学校法人东京理科大学) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 说明书[0026]段、表1-表82</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108610295 A (大连医科大学附属第一医院 大连医科大学) 2018年 10月 2日 (2018 - 10 - 02) 权利要求1-8</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 03062220 A1 (NOVARTIS AG等) 2003年 7月 31日 (2003 - 07 - 31) 权利要求1-20, 说明书第8页倒数第2段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109761970 A (UNIV CHINA PHARMA) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 权利要求1-5</td> <td>1-5</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	A	CN 107540608 A (大连理工大学) 2018年 1月 5日 (2018 - 01 - 05) 权利要求1-12, 说明书第[0006]-[0008]段	1-5	A	CN 107382862 A (大连理工大学) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 权利要求1-14, 说明书第[0006]-[0008]段	1-5	A	CN 107922927 A (学校法人东京理科大学) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 说明书[0026]段、表1-表82	1-5	A	CN 108610295 A (大连医科大学附属第一医院 大连医科大学) 2018年 10月 2日 (2018 - 10 - 02) 权利要求1-8	1-5	A	WO 03062220 A1 (NOVARTIS AG等) 2003年 7月 31日 (2003 - 07 - 31) 权利要求1-20, 说明书第8页倒数第2段	1-5	PX	CN 109761970 A (UNIV CHINA PHARMA) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 权利要求1-5	1-5
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 107540608 A (大连理工大学) 2018年 1月 5日 (2018 - 01 - 05) 权利要求1-12, 说明书第[0006]-[0008]段	1-5																					
A	CN 107382862 A (大连理工大学) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 权利要求1-14, 说明书第[0006]-[0008]段	1-5																					
A	CN 107922927 A (学校法人东京理科大学) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 说明书[0026]段、表1-表82	1-5																					
A	CN 108610295 A (大连医科大学附属第一医院 大连医科大学) 2018年 10月 2日 (2018 - 10 - 02) 权利要求1-8	1-5																					
A	WO 03062220 A1 (NOVARTIS AG等) 2003年 7月 31日 (2003 - 07 - 31) 权利要求1-20, 说明书第8页倒数第2段	1-5																					
PX	CN 109761970 A (UNIV CHINA PHARMA) 2019年 5月 17日 (2019 - 05 - 17) 权利要求1-5	1-5																					
☐ 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 2019年 11月 20日		国际检索报告邮寄日期 2019年 12月 2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 张英姝 电话号码 86-(10)-53962163																					

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/104300

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	107540608	A	2018年 1月 5日	无			
CN	107382862	A	2017年 11月 24日	无			
CN	107922927	A	2018年 4月 17日	BR	112017027246	A2	2018年 8月 28日
				KR	20180021080	A	2018年 2月 28日
				IL	256217	D0	2018年 2月 28日
				EP	3312273	A4	2019年 7月 3日
				AU	2016279493	A1	2017年 12月 14日
				SG	11201710272V	A	2018年 1月 30日
				WO	2016204197	A1	2016年 12月 22日
				JP	W02016204197	A1	2018年 5月 31日
				CA	2988379	A1	2016年 12月 22日
				EP	3312273	A1	2018年 4月 25日
				US	2018164289	A1	2018年 6月 14日
CN	108610295	A	2018年 10月 2日	无			
WO	03062220	A1	2003年 7月 31日	EP	1470120	A1	2004年 10月 27日
				EP	2194049	A1	2010年 6月 9日
				IL	208399	D0	2010年 12月 30日
				JP	2005519908	A	2005年 7月 7日
				CA	2474104	C	2012年 4月 17日
				CN	101468984	A	2009年 7月 1日
				GB	0201508	D0	2002年 3月 13日
				US	2014323494	A1	2014年 10月 30日
				ES	2294293	T3	2008年 4月 1日
				PT	1470120	E	2008年 3月 3日
				DE	60318013	T2	2008年 11月 13日
				US	2010222362	A1	2010年 9月 2日
				BR	0307058	A	2004年 12月 28日
				IL	162979	A	2010年 12月 30日
				KR	100778163	B1	2007年 11月 28日
				EP	1470120	B1	2007年 12月 12日
				US	2005209452	A1	2005年 9月 22日
				US	2011294820	A1	2011年 12月 1日
				CN	100467461	C	2009年 3月 11日
				KR	20040081467	A	2004年 9月 21日
				PT	2194049	E	2014年 11月 10日
				CN	1646519	A	2005年 7月 27日
				EP	2194049	B1	2014年 8月 13日
				ES	2503734	T3	2014年 10月 7日
				AT	380807	T	2007年 12月 15日
				IL	208399	A	2013年 2月 28日
				DE	60318013	D1	2008年 1月 24日
				KR	20070058019	A	2007年 6月 7日
				US	7557105	B2	2009年 7月 7日
				JP	2009051837	A	2009年 3月 12日
				CA	2474104	A1	2003年 7月 31日
				US	2009239879	A1	2009年 9月 24日
				JP	5027076	B2	2012年 9月 19日
				MX	PA04007130	A	2004年 10月 29日
				EP	1783126	A2	2007年 5月 9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/CN2019/104300

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)
EP 1783126 A3 2008年 11月 26日			
JP 4213595 B2 2009年 1月 21日			
CN 109761970 A	2019年 5月 17日	无	