(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
2024 年 5 月 16 日 (16.05.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/099346 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/4439 (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01) *A61P 7/00* (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01) *A61P 19/06* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01) *A61P 37/08* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/130416

(22) 国际申请日: 2023 年 11 月 8 日 (08.11.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211395835.2 2022年11月8日 (08.11.2022) CN

(71) 申请人: 中 山 大 学 **(SUN YAT-SEN UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中 国 广 东 省 广 州 市 海 珠 区 新 港 西 路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 银 巍 **(YIN, Wei)**; 中 国 广 东 省 广 州 市 海 珠 区 新 港 西 路 135 号 C/o 中 山 大 学, Guangdong 510275 (CN)。 陈 晨 **(CHEN, Chen)**; 中 国 广 东 省 广 州 市 海 珠 区 新 港 西 路 135 号 C/o 中 山 大 学, Guangdong 510275 (CN)。 黄奕俊**(HUANG, Yijun)**; 中国广东省广州市海珠区新港西路135号C/o中山大学, Guangdong 510275 (CN)。 颜光美**(YAN, Guangmei)**; 中国广东省广州市海珠区新港西路135号C/o中山大学, Guangdong 510275 (CN)。

(74) 代理人: 广 州 文 冠 倪 律 知 识 产 权 代 理 事 务 所 （普 通 合 伙） **(WINGUAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS)**; 中 国 广 东 省 广 州 市 天 河 区 林 和 西 路 9 号 耀 中 广 场 A 塔 2317 室, Guangdong 510610 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 在修改权利要求的期限届满之前进行，在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

WO 2024/099346 A1

(54) **Title:** USE OF INDAZOLE COMPOUND IN TREATMENT OF INFLAMMASOME ACTIVATION-MEDIATED DISEASES

(54) 发明名称: 吲唑类化合物在治疗炎症小体激活介导的疾病中的应用

(57) **Abstract:** The present invention provides use of a compound as represented by formula I or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof in the preparation of a drug for treating ASC-caspase-1 pathway-based inflammasome activation-mediated diseases. In particular, the compound of the present invention is preferably lonidamine, and is used for treating gout, multiple sclerosis or septicemia.

(57) 摘要: 本 发 明 提 供 式 I 的 化 合 物 或 其 药 学 上 可 接 受 的 盐 或 酯 在 制 备 用 于 治 疗 基 于 ASC-caspase-1 通 路 的 炎 症 小 体 激 活 介 导 的 疾 病 的 药 物 中 的 应 用， 特 别 地， 本 发 明 的 化 合 物 优 选是氯尼达明，其用于治疗痛风、多发性硬化或败血症。

说明书

发明名称: 吲唑类化合物在治疗炎症小体激活介导的疾病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及吲唑类化合物的医药用途，具体涉及氯尼达明及其类似物在在治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病中的应用。

背景技术

[0002] 氯尼达明(Lonidamine,LND)是吲唑-3-羧酸的衍生物，可以抑制糖酵解途径限速酶己糖激酶。LND首先被报道为避孕药的候选药物，然后由于其抑制糖酵解的反Warburg效应而被用作抗肿瘤药物。最近，在缺血性中风和关节炎的动物模型中观察到LND的抗炎作用，但其确切作用机制尚未完全阐明。

[0003] 炎症小体是细胞内的多分子蛋白复合物，对微生物感染和内源性危险信号引起的先天免疫识别做出反应，是炎症反应的关键步骤之一。炎症小体由模式识别受体(pattern recognition receptor，PRR)、适配器蛋白即凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD，ASC)和caspase-1组成。目前已经确定了几种PRRs，包括核苷酸结合的寡聚结构域NOD(nucleotide-binding oligomerization domain)蛋白、含亮氨酸丰富的重复(LRR)蛋白NLR(leucine-rich repeat(LRR)-containing protein)家族成员NLRP1(NLR family,pyrin domain containing 1)、NLRP3(NLR family,pyrin domain containing 1)和NLRC4(NLR Family CARD Domain Containing 4)，以及黑色素瘤2缺失蛋白(proteins absent in melanoma 2,AIM2)和Pyrin。其中，NLRP3可以对各种各样的刺激作出反应，包括细菌、病毒、细胞外ATP、污染物、代谢失调和组织损伤。一旦被激活，传感器就会与ASC结合，并促进ASC低聚化形成ASC斑点(ASC specks)，进而招募caspase-1前体并激活caspase-1。被激活的caspase-1最终导致促炎症介质IL-1β和IL-18的成熟和分泌，并裂解gasdermin D(GSDMD)来诱导细胞焦亡。

[0004] ASC细胞内寡聚化形成ASC斑点是多种炎症小体组装与激活所必需。此外，细胞外的ASC斑点已被证实具备炎症信号功能，包括可诱导中性粒细胞的浸润、

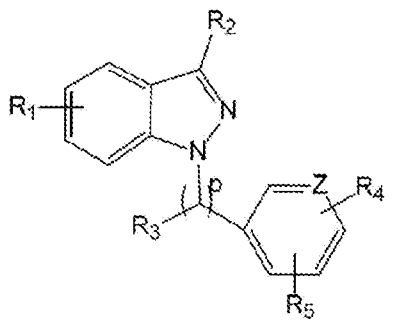
加速Aβ沉积以及调节适应性免疫。在慢性呼吸道疾病或自体炎症疾病患者的血清中检测到ASC寡聚体增加，在蛛网膜下腔出血和创伤性脑损伤患者的脑脊液中同样检测到ASC寡聚体，因此细胞外的ASC斑点可作为这些疾病的潜在生物标志物。这些发现强烈表明，靶向ASC可能是治疗炎症性疾病的一个新策略。

[0005] 为防治炎症小体相关疾病，不同作用靶点的炎症小体抑制剂被设计并研发。一些化合物可以直接结合NLRP3来阻断炎症小体的激活，包括MCC950、CY-09、OLT1177、tranilast和oridonin。而glyburide、BHB和fenamate通过抑制NLRP3的上游激活信号来抑制炎症小体的活化。然而，由于这些上游信号参与了多种多样的生物过程，这些化合物会产生脱靶效应与毒副作用。例如，高选择性和强效的NLRP3抑制剂MCC950由于肝脏毒性，在治疗类风湿性关节炎的II期临床试验中被终止。目前，这些炎症小体抑制剂在实验性动物模型上显示出治疗效果，但还没有在临床上应用于各种炎症相关疾病治疗。此外，以其他非NLRP3靶点的炎症小体抑制剂少见报道。

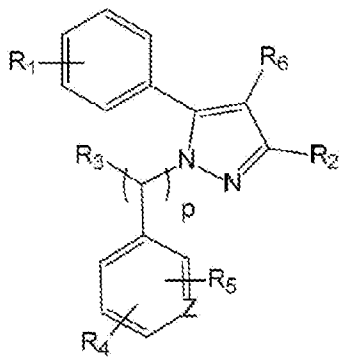
[0006] 发明内容

[0007] ASC的寡聚化是炎症小体组装的关键事件，而炎症小体的失调激活已经被证明与多种疾病发生发展和预后有关。不愿受理论约束，发明人认为阻断ASC寡聚化阻止了炎症小体组装事件及ASC斑点形成，从而抑制炎症小体的失调激活，可用于治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病。

[0008] 本发明的一个方面提供式Ia或Ib的化合物在制备用于治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病中的应用，



(Ia)



(Ib)

[0009] 其中：R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基；R_3为H或C_{1-3}烷基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基；R_6为H或C_{1-3}烷基；Z选自C、N、O和S；p为1、2或3；并且所述基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。

[0010] 本发明的另一个方面提供一种治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的方法，所述方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的式Ia或Ib所示的化合物，其中各取代基定义如上所述，并且所述基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。

[0011] 本发明的另一个方面提供用于治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的式Ia或Ib所示的化合物，其中各取代基定义如上所述，并且所述基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。

[0012] 本发明的另一个方面提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163、W169和L192中的至少一个处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定(SEQ ID NO:1)。

[0013] 本发明的另一个方面提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，包括识别与ASC蛋白的I115、F163、W169和L192中的至少一个氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0014] 本发明的其他方面将可从以下说明书中的详细描述中容易得到。

附图说明

[0015] 图1.LND减轻了EAE的炎症损伤。(a)如材料和方法中所述，用MOG35～55肽和百日咳毒素诱发小鼠EAE。EAE诱导后，每天给予溶剂或LND的小鼠的临床

评分；n＝12。(b)EAE诱导后的体重变化；n＝12。(c)代表性的H&E和Luxol Fast Blue(LFB)染色。比例尺＝100μm。(d)$CD45^+$在活细胞中的比例以及$CD45^+CD4^+$、$CD45^+CD8^+$和$CD45^+CD11b^+$细胞在中枢神经系统单核细胞群中的比例；这些细胞是在EAE诱导后第15天分离的。(e)如材料和方法中所述，用MOG35～55肽和百日咳毒素诱导小鼠的EAE。EAE发病后，每天给小鼠注射溶剂或LND的临床评分；n＝10。(f)EAE诱导后的体重变化；n＝10。(g)$CD45^+$在活细胞中的比例和$CD45^+CD4^+$、$CD45^+CD8^+$和$CD45^+CD11b^+$细胞在中枢神经系统单核细胞群中的比例；这些细胞是在EAE诱导后第15天分离的。*P＜0.05；**P＜0.01；***P＜0.001；****P＜0.0001；NS，不显著。a、c、d、e、h和i为非配对t检验，g和j为多重非配对t检验。

[0016] 图2.LND抑制体内炎症小体的激活。(a and b)EAE诱导后脊髓组织中GSDMD和caspase−1的免疫组织化学染色(a)和定量分析(b)。(c and d)ELISA分析腹腔注射LPS(15mg/kg)4小时后小鼠血清中的IL−1β(c)和IL−18(d)，无论是否用LND预处理，n＝15。数据以平均值±SEM表示。*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001；****P<0.0001；NS，不显著。数据通过单因素方差分析和Tukey's检验进行分析。

[0017] 图3.LND是NLRP3炎症小体的广谱抑制剂。LPS刺激的BMDMs(a)和J774A.1细胞(b)用LND处理0.5小时，然后用ATP(5mM)刺激0.5小时，其上清液(SN)中成熟的IL−1β和裂解的caspase−1(p20)的Western blot分析。BMDMs(a)和J774A.1细胞(b)裂解液中IL−1β前体和caspase−1前体的Western blot分析。(c and d)ELISA分析BMDMs上清液中的IL−1β(c)和IL−18(d)。(e and f)ELISA分析J774A.1细胞上清液中的IL−1β(e)和TNF−α(f)。(g)GSDMD的Western blot分析。(h)GSDMD−N灰度值的定量分析。(i和j)BMDMs(i)和J774A.1细胞(j)的上清液中LDH的释放。(k−m)用LND预处理30分钟，然后用LPS刺激3小时的J774A.1细胞中IL−1β、IL−18和TNF−α的mRNA水平。(o and p)LPS刺激的BMDMs用或不用LND(200μM)预处理30分钟，然后用尼日利亚菌素、ATP、MSU或imiquimod进行刺激。Western blot分析上清中成熟的IL−1β和裂解的caspase−1(p20)以及BMDMs裂解液中的IL−1β前体和caspase−1前体(o)。ELISA分析BMDMs上清液中的IL−1β(p)。数据以平

均值±SEM表示。*P＜0.05；**P＜0.01；***P＜0.001；****P＜0.0001；NS，不显著。数据通过单因素方差分析和Tukey's检验进行分析。

[0018] 图4.LND抑制NLRP3炎症小体的激活不依赖于HK2。(a)通过qRT-PCR分析LPS刺激的BMDMs中LND靶向基因的mRNA水平，用LND处理30分钟，然后用ATP刺激3小时。(b)用不同剂量的ATP处理LPS刺激的BMDMs 30分钟后，用Western blot分析HK2的表达。(c)用对照siRNA或HK2特异性siRNA转染LPS刺激的BMDMs 24小时后，用ATP刺激，Western blot分析上清液(supernatant,SN)中的IL-1β和裂解的caspase-1(p20)以及裂解液中IL-1β前体、caspase-1前体和HK2的含量。(d)ELISA分析BMDMs上清液中的IL-1β。(e)对LPS刺激的J774A.1细胞转染对照siRNA或HK2特异性siRNA24小时后用ATP刺激，上清中的IL-1β和裂解的caspase-1(p20)以及原IL-1β、原caspase-1和HK2的裂解液进行Western blot分析。(f)ELISA分析J774A.1细胞上清液中的IL-1β。(g)对HK2敲除小鼠的LPS加ATP刺激的BMDMs的培养上清液(SN)中的IL-1β和裂解的caspase-1(p20)进行Western blot分析对这些细胞裂解液中的IL-1β前体、caspase-1前体和HK2进行Western blot分析。(h)用LND处理30分钟，然后用ATP刺激的HK2敲除小鼠的LPS刺激的BMDMs的培养上清液中IL-1β和裂解的caspase-1(p20)的Western blot分析。对这些细胞裂解液中的IL-1β前体、caspase-1前体和HK2进行Western blot分析。(i)ELISA分析BMDMs上清液中的IL-1β。数据以平均值±SEM表示，*P＜0.05；**P＜0.01；***P＜0.001；****P＜0.0001；NS，不显著。数据通过单因素方差分析和Tukey's检验进行分析。

[0019] 图5.LND阻止ASC斑点的形成。(a)用FACS检测用或不用LND处理的LPS和ATP刺激的BMDMs中ROS^+细胞的百分比。(b)在ATP处理30分钟前，用LND(0.2mM)处理LPS刺激的BMDMs 30分钟。对抗NEK7抗体免疫沉淀的细胞裂解液中的NLRP3蛋白的Western blot分析，以评估NLRP3-NEK7的相互作用。(c)在ATP处理前30分钟，用LND(0.2mM)处理LPS刺激的BMDMs，30分钟。对抗NLRP3抗体免疫沉淀的细胞裂解液中的ASC蛋白进行Western blot分析，以评估ASC-NLRP3的相互作用。(d)在ATP处理前30分钟，用LND(0.2mM)处理LPS刺激的BMDMs，30分钟。对抗ASC抗体免疫沉淀的细胞裂解液中的caspase-1蛋白的

Western blot分析，以评估caspase−1和ASC的相互作用。(e和f)LPS刺激的BMDMs用LND(0.2mM)处理30分钟，然后用ATP刺激30分钟。用抗ASC抗体对NP−40不溶性沉淀中交联的ASC进行Western blot(e)和定量分析(f)。(g)用不同剂量的LND处理的LPS刺激的BMDMs中ASC斑点的免疫荧光分析。蓝色代表Hoechst 33342的核染色。箭头指征ASC斑点。比例尺＝10微米(h)用LND处理和ATP刺激后，含有ASC斑点的LPS刺激的BMDMs的百分比。显示的数据代表了所有测量的平均值±SEM。(i)在不同LND浓度存在下，人源重组ASC蛋白寡聚体的负染电子显微镜图像。(j)EAE小鼠脊髓中ASC的免疫荧光分析。白色箭头指征ASC斑点。比例尺＝25μm。(k)LPS刺激的BMDMs用LND(0.2mM)处理0.5小时，然后用炎症小体激活剂(ATP(5mM，30分钟)，poly(dA:dT)(1μg/ml，8小时)，MDP(200ng/ml，8小时)或鞭毛蛋白(200ng/ml，8小时))刺激。ELISA分析BMDMs上清液中的IL−1β。数据以平均值±SEM表示。*P＜0.05；**P＜0.01；***P＜0.001；****P＜0.0001；NS，不显著。数据通过单因素方差分析和Tukey's检验进行分析。

[0020] 图6.LND直接与ASC结合以抑制NLRP3的组装。(a)使用Ligand scout软件建立ASC与LND的对接模型。LND被显示为棍状，颜色为绿色。ASC的CARD结构域以卡通形式显示，颜色为粉红色，而相互作用的部位为橙色。黄色虚线代表氢键。(b)显示LND与重组ASC蛋白结合的图是用Biacore的SPR分析得到的。不同浓度的LND以叠加图的形式呈现。(C)LPS刺激的BMDMs用蛋白裂解液裂解，并与LND在4℃下孵育过夜。用pronase酶(20ng/μg蛋白)进行DARTS检测，并通过Western blot分析。(d)不同ASC突变体转染HEK293细胞中ASC斑点的分析。(e)用ASC突变体转染的HEK293细胞共聚焦成像。蓝色信号对应于Hoechst33342染色，红色信号对应于ASC。

具体实施方式

[0021] 定义

[0022] 术语“卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘或其基团。当未限定卤代数量时，可以是任何合适的数量，例如一卤代、二卤代、三卤代；当未限定卤代位置

时，可以是任何合适的位置，例如卤代苯基可以是在邻位、对位、间位或其组合的卤代。

[0023] 术语“烷基”是指饱和的直链或支链烃链。对于具有特定数量的碳原子的烷基，该术语包含对应的正烷基及其各种异构体形式(如有)。例如，具有3个碳原子的烷基(C_3烷基)包括正丙基(丙基)和异丙基。C_{1-3}烷基包括甲基、乙基、丙基、异丙基。

[0024] 术语“C_{1-3}烷基氨基”是指被C_{1-3}烷基取代的氨基，可以是被一个或两个C_{1-3}烷基取代的氨基，例如甲基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、甲基乙基氨基等。

[0025] 术语“卤代C_{1-3}烷基”是指被卤素取代的C_{1-3}烷基，可以是被一个或多个卤素同时取代的C_{1-3}烷基，例如氟甲基、二氟甲基、三氟甲基等。

[0026] 术语“羧基苯基”是指被羧基取代的苯基，可以是被一个或多个羧基取代的苯基。

[0027] 术语“酰肼基”是指$-C(O)-NH-NH_2$。

[0028] 术语“治疗有效量”指一种本发明的共轭物或其组合物的在适用于任何医学治疗的合理效益/风险比下在动物中的细胞的至少一个亚群中有效产生某些所希望的治疗效果的量。

[0029] 术语“药学上可接受的”指位于正确医学判断的范围内、适于与人类和动物的组织接触而无过量毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症、与一个合理效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0030] 术语“药学上可接受的载体”是指参与将所述共轭物从身体的一个器官或部位携载或运载到身体的另一个器官或部位的一种药学上可接受的材料、组合物或运载体，如一种液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂或溶剂包封材料。每种载体必须在与该组合物的其他成分相容并且对患者无害的意义上是“可接受的”。

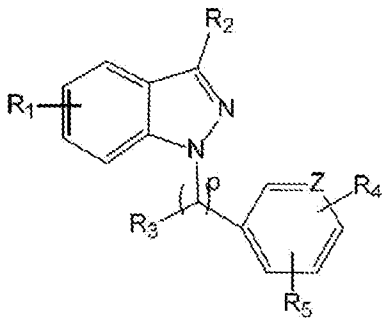
[0031] 术语“治疗”涵盖预防、治疗以及治愈。接受这一治疗的患者通常是任何有需要的动物，包括灵长类动物(特别是人类)以及其他哺乳动物，如马、牛、猪、羊、家禽和宠物。

[0032] 术语“基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病”是指由炎症小体异常激活介导的疾病，该炎症小体异常激活基于ASC低聚化形成ASC斑点(ASC specks)，进而招募caspase-1前体并激活caspase-1这一途径。被激活的caspase-1最终导致促炎症介质IL-1β和IL-18的成熟和分泌，并裂解gasdermin D(GSDMD)来诱导细胞焦亡。

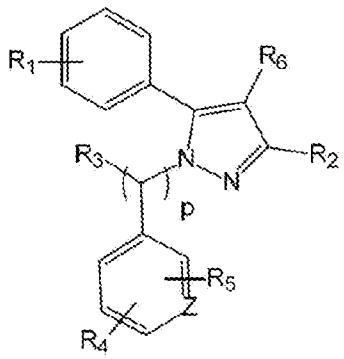
[0033] 术语“式I”包括式Ia和式Ib，“式II”包括式IIa和IIb，“式III”包括式IIIa和IIIb，“式IV”包括式IVa、IVb和式IVc。

[0034] 吲唑类化合物及其类似物

[0035] 本发明的一个方面提供式Ia或Ib所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，



(Ia)



(Ib)

[0036] 其中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰胂基；R_3为H或C_{1-3}烷基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基；R_6为H或C_{1-3}烷基；Z选自C、N、O和S；p为1、2或3；其中所述基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病，优选地所述疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

[0037] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰胂基，优选为羧基；R_3为H或C_{1-3}烷基，优选为氢或甲基；R_4和R_5独立

地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H或C_{1-3}烷基，优选为H；Z选自C、N、O和S，优选为C或N，更优选为C；p为1、2或3，优选为1。

[0038] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2为羧基；R_3为H或C_{1-3}烷基，优选为氢或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H或C_{1-3}烷基，优选为H；Z选自C、N、O和S，优选为C或N，更优选为C；p为1、2或3，优选为1。

[0039] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选为羧基；R_3为H或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H或C_{1-3}烷基，优选为H；Z选自C、N、O和S，优选为C或N，更优选为C；p为1、2或3，优选为1。

[0040] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选为羧基；R_3为H或C_{1-3}烷基，优选为氢或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H或C_{1-3}烷基，优选为H；Z选自C、N、O和S，优选为C或N，更优选为C；p为1、2或3，优选为1。

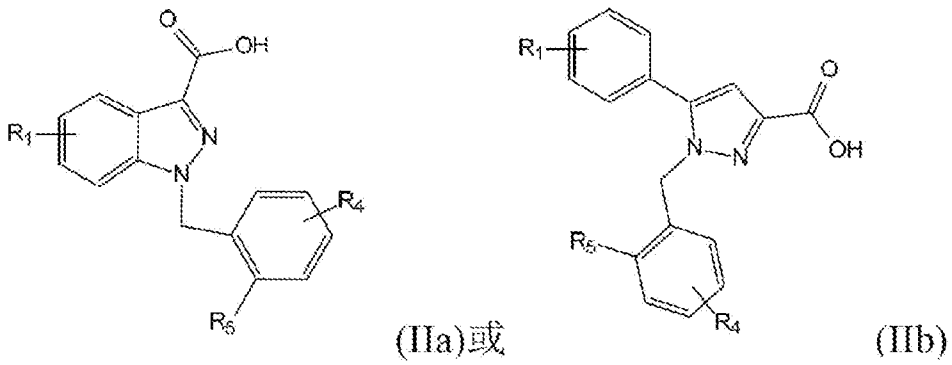
[0041] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选为羧基；R_3为H或C_{1-3}烷基，优选为氢或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H；Z选自C、N、O和S，优选为C或N，更优选为C；p为1、2或3，优选为1。

[0042] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选为羧基；R_3为H或C_{1-3}烷基，优选为氢或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H或C_{1-3}烷基，优选为H；Z是C或N；p为1、2或3，优选为1。

[0043] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选为羧基；R_3为H或C_{1-3}烷基，优选为氢或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H或C_{1-3}烷基，优选为H；Z是C或N；p为1。

[0044] 在一些实施方式中，在式Ia或Ib的结构式中，R_1选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_2为羧基；R_3为H或甲基；R_4和R_5独立地选自氢、甲基、氟和氯；R_6为H；Z为C；p为1。

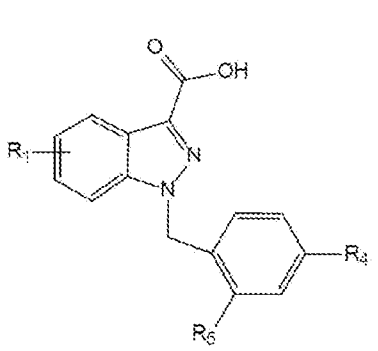
[0045] 在本发明的一些实施方式中，提供式IIa或IIb所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，



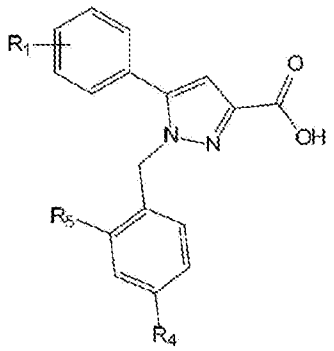
[0046] 其中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}

烷基，优选选自甲基、氟和氯；并且其中所述基于ASC−Caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病，优选地所述疾病选自：哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

[0047] 在本发明的一些实施方式中，提供式(IIIa)或(IIIb)所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，



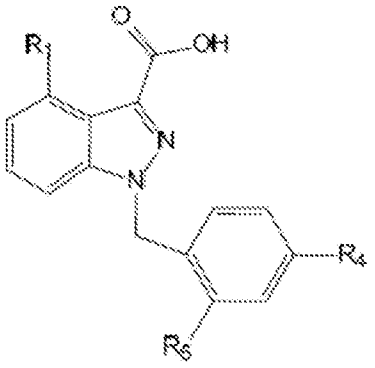
(IIIa)或



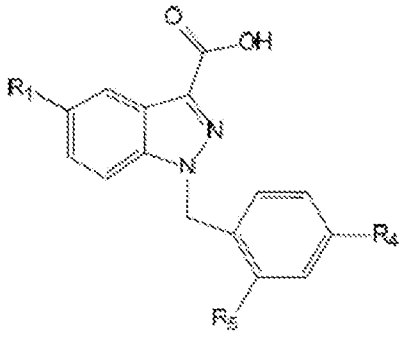
(IIIb)

[0048] 其中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选选自甲基、氟和氯，更优选为氟或氯；并且其中所述基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病，优选地所述疾病选自：哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

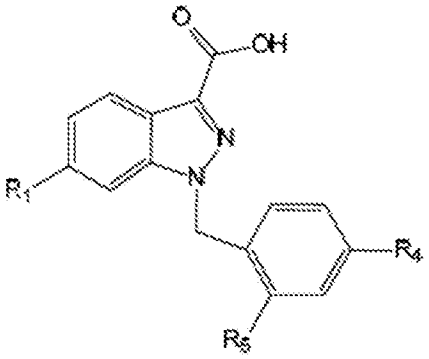
[0049] 在本发明的一些实施方式中，提供式IVa、IVb或IVc所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，



(IVa),



(IVb),



(IVc),

[0050] 其中，R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；更优选选自氢、氟、氯和二氟甲基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选选自氟和氯，更优选均为氯；并且其中所述基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病，优选地所述疾病选自：哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

[0051] 在一些实施方式中，式I的化合物选自以下任何一种(括号内的数字表示PubChem CID)：

[0052] 6-氯-1-[(2,4-二氯苯基)甲基]吲唑-3-羧酸(11501294)；

[0053] 5-(4-氯苯基)-1-[1-(2,4-二氯苯基)乙基]吡唑-3-羧酸(67565577)；

[0054] 1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-5-(二氟甲基)吲唑-3-羧酸(66888740)；

[0055] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-氟吲唑-3-羧酸(71221361)；

[0056] 1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸(39562)；

[0057] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(氟甲基)吲唑-3-羧酸(57633631)；

[0058] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(二氟甲基)吲唑-3-羧酸(11667849)；

[0059] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]吲唑-3-羧酸盐(25271808)；

[0060] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-碘吲唑-3-羧酸(71216306)；

[0061] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-4-(二甲基氨基)吲唑-3-羧酸(66900636)；

[0062] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-(氟甲基)吲唑-3-羧酸(66887973)；

[0063] 1-(2,4-二氯苯基)-6-氟吲唑-3-羧酸(11652993)；

[0064] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(57633606)；

[0065] 1-[(2-氯-4-甲基苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(66888424)；

[0066] 1-(2,4-二氯苯基)-3-(4-氯苯基)-1H-吡唑-5-羧酸(54148749)；

[0067] 1-[1-(2,4-二氯苯基)乙基]-1H-吲唑-3-羧酸(58796770)；

[0068] 1-[(2,6-二氯-3-吡啶基)甲基]-1H-吲唑-3-羧酸(58796750)；

[0069] 1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-(二氟甲基)吲唑-3-羧酸(66888818)；

[0070] 1-[(2-氯-4-甲基苯基)甲基]-6-甲基吲唑-3-羧酸(89564538)；

[0071] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(11567264)；

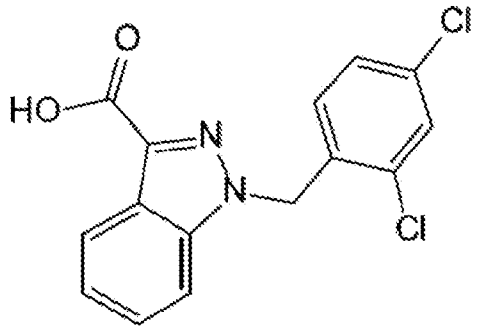
[0072] 5-(4-氯苯基)-1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-4-甲基吡唑-3-羧酸(54033453)；

[0073] 1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(57633637)；

[0074] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(二甲基氨基)吲唑-3-羧酸(11537863)；

[0075] 1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-甲基吲唑-3-羧酸(11667156)。

[0076] 在优选的实施方式中，式I的化合物是1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸(即，氯尼达明，结构式如下式V所示)或其药学上可接受的盐或酯。



(V)

[0077] 基于ASC−Caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病

[0078] 本发明提供如上所述的式I至式V的任一化合物在制备用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，其中所述基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。

[0079] 在优选的实施方式中，本发明提供如上所述的式I至式V的任一化合物在制备用于治疗痛风的药物中的应用。

[0080] 在优选的实施方式中，本发明提供如上所述的式I至式V的任一化合物在制备用于治疗多发性硬化的药物中的应用。

[0081] 在优选的实施方式中，本发明提供如上所述的式I至式V的任一化合物在制备用于治疗败血症的药物中的应用。

[0082] 在优选的实施方式中，本发明提供1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，其中所述基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。

[0083] 在优选的实施方式中，本发明提供1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，其中所述基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

[0084] 在优选的实施方式中，本发明提供1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗痛风的药物中的应用。

[0085] 在优选的实施方式中，本发明提供1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗多发性硬化的药物中的应用。

[0086] 在优选的实施方式中，本发明提供1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗败血症的药物中的应用。

[0087] 药物组合物

[0088] 本发明的另一个方面提供一种药物组合物，其包含式I至式V的任一所示的任一化合物或其药学上可接受的盐或酯以及药学上可接受的载体。

[0089] 本发明的式I至式V的任一所示的任一化合物或其药学上可接受的盐或酯可以被配制用于药物用途。药学上可接受的组合物包括治疗有效量的以上所述化合物中的一种或多种，单独使用或与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)、赋形剂和/或稀释剂配制在一起。

[0090] 可以通过从其他药物类推将根据本发明的化合物配制为用于以任何便利方式给药以在人类或兽医学中使用。

[0091] 治疗方法及用途

[0092] 本发明的另一个方面提供一种治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的方法，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的本文所述的任一种式I至式V的任一化合物，所述疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。在优选的实施方式中，所述疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。在特别优选的实施方式中，所述疾病是痛风。在特别优选的实施方式中，所述疾病是多发性硬化。在另一特别优选的实施方式中，所述疾病是败血症。

[0093] 优选地，所述式I至式V的化合物是1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接受的盐或酯。因此，在一些实施方式中，本发明提供一种治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的方法，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接

受的盐或酯，所述疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。在一些实施方式中，本发明提供一种治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的方法，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯，所述疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。在优选的实施方式中，本发明提供一种治疗多发性硬化的方法，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯。在优选的实施方式中，本发明提供一种治疗败血症的方法，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯。

[0094] 本发明的另一个方面提供了用于治疗基于ASC−Caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的本文所述的任一种式I至式V的任一的化合物，所述疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。在优选的实施方式中，所述疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。在特别优选的实施方式中，所述疾病是多发性硬化。在另一特别优选的实施方式中，所述疾病是败血症。

[0095] 优选地，所述式I至式V的化合物是1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯。因此，在一些实施方式中，本发明提供用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯，所述疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。在一些实施方式中，本发明提供用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯，所述疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。在优选的实施方式中，本发明提供用于治疗痛风的1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯。在优选的实施方

式中，本发明提供用于治疗多发性硬化的1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接受的盐或酯。在优选的实施方式中，本发明提供用于治疗败血症的1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸或其药学上可接受的盐或酯。

[0096] 本发明提供的式I至式V的任一化合物可通过例如US20070015771A1描述的方法制备(其实施例8至39提供了吲唑类化合物的详细制备方法)，通过引用将该专利文献整体合并至本文中。

[0097] 多发性硬化(multiple sclerosis，MS)是一种以中枢神经系统(CNS)炎性脱髓鞘病变为主要特点的免疫介导性疾病，病变主要累及白质。其病因尚不明确，可能与遗传、环境、病毒感染等多种因素相关。MS病理上表现为CNS多发髓鞘脱失，可伴有神经细胞及其轴索损伤，MRI上病灶分布、形态及信号表现具有一定特征性。MS病变具有时间多发(DIT)和空间多发(DIS)的特点。

[0098] MS的临床分类主要有：临床孤立综合征(CIS)是指首次的临床发作，常常累及单侧视神经、脊髓、脑干，也可以累及大脑半球，病灶可以1个也可以多个。患者经历首次发作后并非全部进展为MS，CIS患者需要严密随访。缓解复发型(RRMS)：在疾病早期阶段，患者常常有反复的发作，多数病人发作后症状完全缓解，称为RRMS。60-80%的患者会经历缓解复发的阶段。继发进展型(SPMS)：患者经历反复的发作后，症状不能完全缓解，残留的症状逐渐累积出现不可逆的神经功能残疾，即进入进展期，故称为继发进展型。进展复发型(PRMS)：部分患者一开始症状就逐步累积，同时在病程中出现典型的发作症状，称为进展复发型。原发进展型(PPMS)：患者从疾病开始就表现为隐匿的慢性的神经功能残疾的进展，病程超过1年，常常表现为慢性进展性脊髓病变，故称为原发进展型。急性MS是MS的急性变异性，来势凶猛，短时间内快速进展，常常同时出现多发的大病灶。本发明预期用于任何一种临床分型的MS。

[0099] 败血症(也称为脓毒症)是可能变得危及生命的对感染的全身炎症反应。当身体对感染的反应失去平衡时，就会出现败血症，而释放到血流中以对抗感染的化学物质会导致炎症并严重伤害身体自身的组织和器官。在最严重的情况下，这会导致败血性休克(此时也称为“败血症-3”)，其中血液循环和细胞损伤极大地增加了死亡率。

[0100] 败血症是复杂的病症并且不断被重新定义。在2016年，败血症和针对败血症的第三次国际共识定义被重新定义。由于全身炎症反应综合症(SIRS)的特异性和敏感性较差，因此SIRS被序贯器官衰竭评估(SOFA)取代，SOFA由于其大量性而最初通过qSOFA评分进行评估。qSOFA的评分范围为0至3分，针对每个测试阳性的生命体征为1分。这些qSOFA生命体征标准是呼吸频率≥22次呼吸/分钟，动脉收缩压小于或等于100/mmHg，以及精神状态改变(格拉斯哥昏迷量表评分低于15)。已经确定qSOFA评分至少为2的患者的院内死亡率为24％，以及qSOFA评分低于2的患者的院内死亡率为3％。通常，如果qSOFA评分至少为2，那么患者将通过完整的SOFA测试进行评估。SOFA测试的评分范围为0至24，并且涉及评估特定器官系统(呼吸系统、心血管系统、肝脏系统、肾脏系统、凝血系统和中枢神经系统)。如果SOFA评分也大于或等于2，则认为患者为败血症。

[0101] 高尿酸血症引起痛风、肾衰竭等。目前，高尿酸血症的治疗主要使用了别嘌呤醇、非布司他等黄嘌呤氧化酶抑制剂。痛风发作是由于血液中的尿酸变得过量、尿酸的晶体在关节堆积，由此引起强烈的炎症而发病，并伴有剧烈的疼痛。降尿酸药和急性痛风发作存在关联性，已知血清尿酸的急剧降低会产生软骨和软组织的尿酸钠晶体的短暂的局部沉淀，导致急性痛风发作。即，已知以往的降尿酸药可能诱发痛风发作。因此，根据患者的不同，有时也会因痛风发作而需要中止治疗或变更治疗方针。本发明预期可用于治疗痛风。

[0102] 突变蛋白及其用途

[0103] 本发明的另一个方面提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163、W169和L192中的至少一个处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0104] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0105] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在F163处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0106] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在W169处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0107] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0108] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115和F163处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0109] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115和W169处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0110] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115和L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0111] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在F163和W169处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0112] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在F163和L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0113] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在W169和L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0114] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163和W169处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0115] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163和L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0116] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在F163、W169和L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0117] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163、W169和L192处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0118] 在以上任一ASC突变蛋白的实施方式中，ASC突变蛋白还包含在T166，L178和S195的一个或多个处的氨基酸残基突变。

[0119] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163、T166、W169、L178、L192和S195处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0120] 在一些实施方式中，本发明提供一种ASC突变蛋白，其包含I115A、F163A、T166A、W169A、L178A、L192A和S195A突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[0121] GenBank:BAA87339.2的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，其中优选的突变位点所在的氨基酸残基以粗体显示。

[0122] SEQ ID NO:1

```
MGRARLAILD ALEMLTAEEL RKFKLKLLSV PLREGYGRIP RGALLGMDAL DLTDKLVGFY      60
LETYGAELTA RVLRDNGLQE MAGQLQAATH QGSGLAPAST QAPQSAAAEP GLSFIDQARE     120
ALIARVTHVE WLLGALYGFV LTGEQNQAVR AEPTNPARMP KLFSFTPAWN WTCFDLLLQA     180
LRESQSYLVE LEPS                                                       194
```

[0123] 本发明预期，所提供的ASC突变蛋白可用于例如疾病治疗和药物筛选。例如，在一些实施方式中，提供一种治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的方法，所述疾病优选选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的所述ASC突变蛋白或其编码核酸。该ASC突变蛋白与野生型ASC蛋白竞争以减少形成ASC寡聚体和/或斑点的数量。

[0124] 在一些实施方式中，提供一种治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的方法，所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的碱基编辑器，所述碱基编辑器导致ASC编码基因发生突变，所述突变包含在I115、F163、W169和L192处的至少一个氨基酸残基突变，以形成本发明所述的任一ASC突变蛋白。所述碱基编辑器例如是腺苷碱基编辑器(ABE)或胞苷碱基编辑器(CBE)。在优选的实施方式中，所述碱基编辑器通过质粒、病毒(例如腺病毒、腺相关病毒载体或慢病毒载体)等载体递送至细胞。在优选的实施方式中，所述由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

[0125] 基于计算机的药物筛选方法

[0126] 本发明的再一个方面提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115、F163、W169和L192中的至少一个氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0127] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0128] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的F163氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0129] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的W169氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0130] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的L192氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0131] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115和F163氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0132] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115和W169氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0133] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115和L192氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0134] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115、F163和W169氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0135] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115、F163和L192氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0136] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的F163、W169和L192氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0137] 在一些实施方式中，本发明提供一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，所述方法包括识别与ASC蛋白的I115、F163、W169和L192氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0138] 在以上的任一基于计算机的筛选用于治疗由ASC-caspase-1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法中，所述方法包括识别还与ASC蛋白的T166、L178和S195中的至少一个氨基酸残基相互作用的候选药物。

[0139] 实施例

[0140] 许多NLRP3的炎症小体抑制剂已被设计和开发用于治疗炎症小体相关疾病，而靶向ASC可能是一种新的有前景的策略。在这里，我们发现一种用作抗肿瘤药物的小分子糖酵解抑制剂氯尼达明(Lonidamine,LND)显著减弱多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)和败血症这两个炎症小体相关疾病损伤。此外，LND阻断了多种类型的炎症小体激活，而且这种阻断作用不依赖于包括己糖激酶2(HK2)在内的LND已知靶点。我们的结果进一步揭示，LND直接与炎症小体配体ASC结合并抑制其寡聚化。我们的研究结果表明，LND是一种直接靶向ASC的广谱炎症小体抑制剂，为临床治疗炎症小体驱动的疾病提供了一种新的治疗方法。我们证明LND通过直接靶向ASC，以不依赖于HK2的方式阻断炎症小体的激活，并在多种炎症小体相关疾病的动物模型中显示出治疗效果，包括多发性硬化症和脓毒症。

[0141] 试剂和抗体：抗IL-1β抗体(AF-401-NA)来自RD Systems，抗GSDMD(ab209845)和抗NEK7抗体(ab133514)来自Abcam，抗caspase-1(AG-20B-0042B)和抗ASC抗体(AG-25B-0006)来自Adipogen，抗α-tubulin抗体(ARG65693)来自Arigo。LPS(大肠杆菌O111:B4；#L2630)、ATP(A6419)和nigericin(481990)均来自Sigma。LND(AF-1890)和咪喹莫特(R-837)从Selleck获得。MSU晶体(tlrl-msu)、muramyld二肽(tlrl-mdp)、来自S.typhimurium的鞭毛蛋白(tlrl-stfla)和poly(dA:dT)/LyoVecTM均来自Invivogen。抗hexokinase 2抗体(NBP2-02272)来自Novus。抗NLRP3抗体(15101)来自Cell Signaling Technology。Goat抗rabbit IgG(HRP)(arg65351)，Donkey抗goat IgG(HRP)(arg65352)和Goat抗Mouse IgG抗体(HRP)(arg65350)均来自Arigo。双琥珀酰亚胺(DSS)购自Thermo Scientific。

[0142] 小鼠：C57BL/6J小鼠来自广东省医学实验动物中心(广州，中国)。条件性敲除己糖酶II小鼠(B6.129P2(Cg)-Hk2tm1.1Uku/Kctt,HK2 CKO flox/flox)从欧洲小鼠突变库(EMMA，项目编号：02074)引进，由广东药明生物技术有限公司培育。(B6J.B6n(Gg)-cx3cr1tm1.1(CRE)jung/j,Cx3cr1-Cre T)小鼠来自赛业(广州)生物科技有限公司。本研究中的所有动物实验都得到了中山大学机构动物护理与使用委员会和实验动物伦理委员会的批准(编号：SYSU-IACUC-2022-B0070)。

[0143] 细胞培养和刺激：从6-8周龄的小鼠骨髓中分离出BMDMs，在含有10％FBS和20％L929细胞(ATCC)上清液的DMEM培养基中培养7至8天。用CX3CR1-cre×HK2flox/flox小鼠选择性地敲除单核-巨噬细胞系中的HK2，然后从这HK2敲除小鼠中分离出原代BMDMs。J774A.1细胞来自ATCC，在含有10％FBS的DMEM中培养。

[0144] 为了诱导炎症小体的激活，将BMDMs(5×10^5个细胞/mL)和J774A.1细胞(3×10^5个细胞/mL)置于6孔板中并培养过夜，第二天早上将培养基换成新鲜的DMEM。然后，用LPS(500ng/mL)诱导细胞3小时。之后，向培养物中加入LND孵育30分钟，然后，用ATP(5mM)刺激细胞30分钟，用MSU(150μg/mL)、Iiquimod(100μM)和nigericin(10μM)刺激4小时，用poly(dA:dT)(2μg/mL，6小时)、MDP(500ng/mL，6小时)和鞭毛蛋白(1μg/mL，6小时)。细胞提取物和收集的上清液通过Western blot进行分析。

[0145] LPS诱导的脓毒症模型：在腹腔注射LPS(15mg/kg)(Sigma-Aldrich，L2630)前0.5小时，对8周龄雄性C57BL/6小鼠腹腔注射LND(40mg/kg和60mg/kg)或溶剂对照(β-环糊精)。4小时后，小鼠被安乐死，根据试剂商的说明，用ELISA试剂盒测量血清中IL-1和IL-18的水平。

[0146] EAE的诱导和评估：这种建模方法是基于以前的研究。在8周大的雌性C57BL/6小鼠背侧皮下注射150μg乳化在CFA(5μg/mL)中的MOG_{35-55}肽(RS合成公司)。24小时后腹腔注射百日咳毒素(每只小鼠500ng，List labs)。7天后进行第二次MOG和百日咳注射。从疾病诱发开始，每天腹腔注射LND(60mg/kg)。在相同的时间点，对溶剂组的小鼠注射β-CD。每天对动物进行监测和评分，直到它们被安乐死。临床评分的评估如下。0＝无症状，1＝尾巴强直性丧失，2＝步态

不稳，3＝后肢瘫痪，4＝前肢瘫痪，5＝奄奄一息或死亡。如果分数介于两点之间，则使用0.5分的分级。

[0147] ASC寡聚化检测：BMDMs种6孔板，用冰PBS清洗，并加入500μL冰缓冲液(20mM HEPES-KOH，pH 7.5，150mM KCl 1%NP40，蛋白酶抑制剂)。细胞在4℃下裂解30分钟，并取出50μL裂解液用于Westernblot检测。然后，剩余的裂解液在4℃下2500×g离心10分钟。将颗粒重悬在500微升冰PBS中。然后，将2mM的琥珀酰亚胺酯(Thermo Fisher A39267)加入重悬的颗粒中，并在室温下旋转孵化30分钟。然后在4℃下以2500×g离心10分钟。去除上清液，并将交联的沉淀重新悬浮在30μL Laemmli缓冲液中。将样品在100℃下煮沸10分钟，并通过Westernblot法进行分析。

[0148] ELISA法：根据试剂商的说明分析细胞培养上清液和血清中的小鼠IL-1β(LIANKE BIOTECH,EK201B/3)、IL-18(LIANKE BIOTECH,EK218)和TNF-α(LIANKE BIOTECH,EK282/3)。

[0149] 免疫沉淀(IP)：LPS(500ng/ml)刺激BMDMs 30分钟之后，用LND处理，再用ATP刺激30分钟，将细胞重悬在含有蛋白酶抑制剂的IP裂解缓冲液(Beyotime，P0013J)中。然后，在4℃下以12,000g离心10分钟。将上清液与一抗或正常的兔/鼠IgG在4℃下孵育过夜。第二天，用蛋白G珠在4℃下沉淀抗体-蛋白复合物2小时，并进行免疫印迹分析。

[0150] 免疫组化染色：根据免疫组化(IHC)染色试剂盒(Abcam,ab80436,Cambridge,MA,USA)制造商的说明，对大脑和脊髓样本进行分析。简而言之，在去石蜡和水化后，将切片放在3%的过氧化氢中15分钟，并进行20分钟的抗原修复，之后冷却到室温。分别用H&E、Nissl或LFB对切片进行染色。在含有背景还原剂的抗体稀释液(DAKO,S3022,Santa Clara,CA,USA)中，将样品与指定的一抗在4℃下孵育过夜。然后，在用PBS清洗3次后，切片依次用二氨基联苯胺(DAB)底物-变色剂混合物和苏木精进行染色。

[0151] 使用倒置显微镜(Eclipse Ti-U，日本尼康)进行拍摄。使用Image-Pro Plus软件(6.0版，Media Cybernetics,Inc.,Silver Springs,MD,USA)进行图像分析。

[0152] 免疫荧光染色：在组织切片过程中，大脑和脊髓被常规地分离和固定。然后，将样本嵌入石蜡中并切成5μm厚的切片。去石蜡和水化后，将切片进行抗原修复20分钟并冷却至室温。在带有背景消除试剂的抗体稀释液(DAKO，S3022，Santa Clara，CA，USA)中，将样品与指定的一抗在4℃下孵育过夜。用PBS清洗样品3次，并与指定的荧光结合的二抗(Molecular Probes,Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL,USA)孵育1小时。然后，清洗样品并用Hoechst 33342(5μg/mL,Sigma-Aldrich)染色15分钟，用PBS清洗三次后，用水溶性封片剂封片。使用尼康A1光谱共聚焦显微镜(尼康，日本)对切片进行拍照。

[0153] 实时逆转录PCR：使用TRIzol®试剂(Invitrogen，15596)提取细胞的总RNA，然后使用oligo(dT)和RevertAid逆转录酶(Thermo Fisher Scientific，EP0442)进行逆转录。使用SuperReal PreMix SYBR Green(Tiangen，FP205)和7500快速实时PCR系统(Applied Biosystems，美国)进行实时PCR。通过比较Ct法(RQ=2-ΔCt)计算和分析相对mRNA表达水平。引物的序列如下。

目标	序列:()中的数字表示 SEQ ID NO: #
HK1	CCCCACCGTCAACATGATCG(2),GAAATCCCCCTTTTCTGAGCC(3)
HK2	CTGTTTCTGGAAACTTGAGGCCC(4), AGAGATACTGGTCAACCTTCTGC(5)
HK3	CTGAATCTCCCAGGAATGCTT(6), TGCCTGTCAGTGTTACCCAC(7)
SDHA	GAACACTCCAAAAACAGACCTGC(8), TCCACCACTGGGTATTGAGTAG(9)
SDHB	ATTTACCGATGGGACCCAGAC(10), GTCCGCACTTATTCAGATCCAC(11)
SDHC	CCCACCTGAATGCTCAGCTTT(12), AGAGGACGGTTTGAACTCGTG(13)
SDHD	TGGTCAGACCCGCTTATGTG(14), GGTCCAGTGGAGAGATGCAG(15)
VDAC1	GAGTATGGGCTGACGTTTACAG(16), GAGCTTCAGTCCACGAGCAAG(17)
VDAC2	CACTGGTAAAGTTAGCGGGAC(18), CCAGAGTGTTATCGGTGTTCCA(19)
VDAC3	GGGAAAGCATCAGGCAACCTA(20), GTCTGTATTCCACTTTTGGGTGA(21)
MPC1	ATGAGTACGCACTTCTGGGG(22), CGCCCACTGATAATCTCTGGA(23)
MPC2	AATTGAGGCCGCTTTACAACC(24), CACACACCAATCCCCATTTCA(25)
IL-1β	TGCCACCTTTTGACAGTGATG(26), AAGGTCCACGGGAAAGACAC(27)
IL-18	GACTCTTGCGTCAACTTCAAGG(28), CAGGCTGTCTTTTGTCAACGA(29)
TNF-α	TCTGTCTACTGAACTTCGGGGTG(30), ACTTGGTGGTTTGCTACGACG(31)
β-actin	CTAGGCACCAGGGTGTGATG(32), GTACATGGCTGGGGTGTTGA(33)

[0154] 流式细胞仪：为了分析中枢神经系统的浸润性免疫细胞，用组织匀浆仪研磨MOG_{35-55}免疫小鼠的大脑组织和脊髓，形成单细胞悬浮液，通过300目滤膜过滤。离心后，用37%的percoll重新悬浮单细胞悬液，并在1000×g、室温、最低加速度设置和无制动的情况下离心30分钟。从最低层分离出单核细胞。将细胞悬浮在含有1%FBS的PBS中。清洗三次，并用细胞表面标志物抗体染色，进行流式细胞分析。使用了以下抗体。CD45-BV510(BD，563891)，CD4-FITC(BioLegend，100406)，CD8-Alexa Fluor 700(BD，557959)，以及CD11b-BV421(BioLegend，101236)。通过流式细胞仪(CytoFLEX,Beckman Coulter)进行流式细胞分析。根据正向和侧向散射以及Fixable Viability Stain 780(BD，565388)，排除细胞碎片和死细胞。

[0155] 细胞死亡检测：细胞处理后，收集培养基，根据试剂商的说明，使用Cyto Tox96非放射性细胞毒性试验(Promega,G1780)评估LDH的释放。

[0156] siRNA介导的BMDMs基因干扰：小干扰RNA购自RiboBio(Guangzhou RiboBio Co.,Ltd.)。根据试剂商的说明，用Lipofectamine™RNAiMAX(Invitrogen,13778)进行RNA干扰。对达到60～70%汇合度的细胞进行RNA干扰。RNA干扰后48小时收集样品，并按上述方法进行Western blot或实时PCR检测。siRNA的序列如下。

siRNA 名称	**序列：()中的数字表示 SEQ ID NO: #**
siHK1-001	GCTGCTGAATAAAGCCATT (34)
siHK1-002	GCTTATGAAGAACCTTCTT (35)
siHK2-001	CCAAAGATGTCTCGGATAT (36)
siHK2-002	GCAACATCCTGATCGATT (37)

[0157] DARTS检测：DARTS是根据已发表的实验步骤进行的。将BMDMs(5×10^5个细胞/mL)铺在10cm的大皿中，培养过夜，第二天早上将培养基换成新鲜的DMEM。然后，用LPS诱导细胞4小时，用M-PER(Thermo，78501)裂解缓冲液裂解。裂解液在4℃下以12,000×g离心10分钟，并进行BCA蛋白浓度检测以确定蛋白浓度。将裂解物与LND在4℃下孵育过夜。每个反应使用80μg的蛋白裂解液。然后，每μg蛋白质加入20ng的pronase酶(Sigma，PRON-RO)并在室温下孵育30分钟。加入20×蛋白酶抑制剂终止消化，并将样品在冰上孵育10分钟。接下

来，向样品中加入5×SDS-PAGE加载缓冲液，以达到最终浓度为1×SDS-PAGE缓冲液。蛋白质样品通过Western blot进行分析。

[0158] 用LigandScout进行分子模拟对接：从PDB数据库中下载了全长的人类ASC(PDB代码2KN6)的结构，并使用Ligandscout 4.4.7软件进行分析。使用默认设置将LND与ASC的CARD结构域对接。分子图形由PyMOL制备。

[0159] LND结构类似物分子模拟对接：我们从NCBI数据库中搜索并下载了与LND结构类似的化合物111个，对上述化合物进行了构象优化(MMF94力场，Ligandscout)，获得LND结构类似化合物库。我们对ASC的结构数据(PDB：2kn6)进行了可能的结合口袋搜寻(Calculate Pocket Ligandscout)，参数为：Buriedness 0.18,Threshold 0.30。在CARD结构域构建了结合口袋。最后，我们把LND结构类似化合物库中的化合物对接(docking)进结合口袋(AutoDock Vina 1.1)，并打分(Binding affinity score)。对接参数：Exaustiveness 40,Max.Number of modes 10,Max.energy difference 3，对接结果按照亲和力大小进行排序。

[0160] 透射电镜：纯化表达的ASC蛋白样品(6μM)，分别加入TEV酶(6UI)，同时加入不同浓度的LND，在4℃孵育过夜。将一滴10μl样品放置在干净的Parafilm上，并将一个网孔铜纯碳涂层网格浮在顶部10分钟。然后，转移网格并与1%乙酸铀酰进行对比5分钟。在使用透射电子显微镜FEI Tecnai G2Spirit(ThermoFisher Scientific Company，OR，USA)检查之前，去除多余的流体并使其干燥。所有图像均使用Radius软件和Xarosa数码相机(EMSIS GmbH，Münster，Germany)采集。

[0161] 表面等离子体共振(SPR)分析：实验在Biacore T100中进行。重组的人ASC蛋白(Zeye Biotechnology)被固定在CM5传感器芯片(BR100530，Cytiva)上。将LND溶于基本运行缓冲液(含1%DMSO的PBS)，在25℃下以5μL/分钟的流速注入流动池。在每个浓度之间用基本运行缓冲液清洗传感器芯片。ASC蛋白被固定在同一芯片的不同通道中，以同样的方式注入空白的基本运行缓冲液得到的反应值被用作对照。用Biacore T100评估软件计算相互作用的动力学参数和亲和力常数。

[0162] 实施例1.LND减轻了实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的炎性损伤。

[0163] 应用EAE模型证明了LND的抗炎作用。从第一次免疫注射髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein,MOG)35～55肽之日起，用对EAE小鼠进行LND给药，直到实验的终点。我们发现在EAE疾病的高峰期，LND明显改善了EAE小鼠的神经系统缺陷(图1a)，并抑制了体重下降(图1b)。此外，组织学分析显示LND减少了单核细胞在脊髓中的浸润，减少了神经元的脱髓鞘(图1c)。

[0164] 外周免疫细胞对中枢神经系统的大量浸润是EAE的主要病理特征之一，通过流式细胞仪分析各组重的脊髓和脑组织中外周免疫细胞的比例来分析LND是否能减少这种EAE损伤。流式细胞仪分析显示，用LND治疗的小鼠中枢神经系统的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和髓系细胞($CD45^+CD11b^+$)的浸润明显减少(图1d)。为了进一步评估LND对EAE的治疗效果，在EAE小鼠发病后再给予LND，发现LND明显降低了EAE的严重程度(图1e)以及减轻了体重下降(图1f)。同样，LND给药治疗后，小鼠中枢神经系统中来自外周循环的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的浸润显著减少，并减少了浸润中枢神经组织的髓系细胞(图1g)。这些结果显示，LND治疗有效抑制炎症并明显减弱了EAE所致的神经损伤。

[0165] 实施例2.LND抑制炎症小体的激活。

[0166] 炎症小体是无菌性炎症信号的主要传感器，是炎症反应的一个关键触发因素，我们进一步研究了LND在体内抑制炎症小体激活的可能性。在上述EAE小鼠脊髓中，我们发现在LND处理后增加的GSDMD和caspase−1水平明显降低(图2a和2b)。这表明，LND阻止了EAE小鼠中枢神经系统组织的炎症小体激活。除了中枢神经系统炎症疾病，我们进一步研究了LND介导的对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的败血症模型中炎症小体的抑制作用。腹腔注射LPS可诱发小鼠NLRP3依赖性炎症和脓毒症休克。如图2c和2d所示，LND处理明显缓解了LPS诱导的IL−1β和IL−18的血清水平的增加。

[0167] 上述结果表明，LND抑制了体内炎症小体的激活。

[0168] 实施例3.LND抑制了不同激动剂诱导的NLRP3炎症小体激活。

[0169] 应用LPS和ATP诱导小鼠骨髓来源巨噬细胞(Bone marrow derived macrophages,BMDMs)的NLRP3炎症小体激活的经典模型，在加入ATP之前用LND预处理0.5小时，来探究LND对炎症小体激活的抑制作用。免疫印迹结果显

示，在BMDMs(图3a)和J1774A.1细胞(图3b)中，LND剂量依赖性地抑制了ATP诱导的caspase−1前体裂解为其生物活性形式P20以及IL−1β前体裂解成其生物活性形式P17。此外，酶联免疫吸附试验(ELISA)结果还表明，LND抑制了BMDMs和J1774A.1细胞中IL−1β(图3c)和IL−18(图3d)的细胞外分泌(图3e)，但对不依赖于炎症小体产生的细胞因子TNF−α释放没有影响(图3f)。LND还抑制了细胞焦亡执行蛋白GSDMD的裂解(图3g和3h)和随后的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)释放(图3i和图3j)。这些结果表明，LND显著抑制LPS和ATP诱导的NLRP3炎症小体的激活和细胞焦亡。接下来，我们探究了LND是否影响了LPS诱导的炎症小体激活的启动阶段。当BMDMs在LPS刺激3小时前用LND预处理时，LND既不影响pro−IL−1β、NLRP3、pro−IL−18或TNF−α的mRNA水平的增加(图3k−3m)，也不抑制pro−IL−1β和NLRP3的蛋白丰度增加(图3n)，说明LND对炎症小体激活的启动阶段没有影响。

[0170] 除了ATP和LPS刺激以外，NLRP3炎症小体还可以被其他危险相关分子模式激活，如尼日利亚菌素和尿酸结晶(monosodium urate,MSU)，这些激活剂依赖于钾离子外流。用LND处理可抑制由尼日利亚菌素和MSU引发的caspase−1裂解和IL−1β的分泌(图3o和3p)。此外，咪喹莫特是一种不依赖于钾离子外流的NLRP3炎症小体激活剂，LND还抑制了咪喹莫特诱导的caspase−1和IL−1β的激活(图3o和3p)。

[0171] 总之，这些结果表明LND可以抑制各种不同激动剂诱导的NLRP3炎症小体激活。

[0172] 实施例4.LND不依赖于HK2来抑制NLRP3炎症小体的激活。

[0173] LND通过抑制HK2的活性来抑制糖酵解，另外LND还有其他作用靶点，包括电压依赖性阴离子通道(voltage−dependent anion channel,VDAC)、线粒体丙酮酸载体(mitochondrial pyruvate carrier,MPC)和单羧酸转运体(monocarboxylate transporters,MCT)以及琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase,SDH)。为了研究LND通过哪个靶点来抑制NLRP3炎症小体激活，我们进一步测试LPS和ATP诱导的NLRP3炎症小体激活模型中这些已知的LND靶点的mRNA水平。结果显示，只有HK2的mRNA水平(图4a)增加，而LND的其他靶点没有变化(图4a)。免疫印

迹试验也证实，LPS和ATP处理诱导了HK2的蛋白水平(图4b)，提示HK2可能在NLRP3炎症小体的激活中发挥作用。

[0174] 意外的是，在BMDMs(图4c和4d)和J1774A.1细胞(图4e和4f)中，由siRNA介导的对HK2的干扰并没有减少caspase-1的裂解和IL-1β的产生。此外在来自野生型(WT)小鼠和HK2基因敲除小鼠的BMDMs中，LPS和ATP诱导的NLRP3炎症小体的激活程度相当(图4g)，且LND仍然减弱了HK2基因敲除小鼠的BMDMs中NLRP3的激活(图4h和4i)。这个结果表明，LND抑制NLRP3炎症小体的激活不依赖于HK2。

[0175] 实施例5.LND选择性地阻断了ASC的寡聚化。

[0176] 然后我们进一步探讨了LND抑制炎症小体激活的可能机制。钾离子外流和活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生等一系列的上游事件可以触发NLRP3炎症小体的激活。LND可以抑制依赖或独立于钾离子外流的不同激活剂诱导的NLRP3炎症小体激活(图3)。此外，LND在抑制炎症小体激活时并没有抑制ROS的产生(图5a)。这些结果表明，LND不作用于NLRP3炎症小体的这些上游激活事件。

[0177] 然后，我们分析了LND直接作用于炎症小体组装的可能性。最近，NIMA相关激酶7(NIMA-related kinase 7,NEK7)被认为是NLRP3炎症小体的一个重要组成部分，NEK7与NLRP3的相互作用被证明是NLRP3寡聚化和炎症小体组装的关键。然而，LND对BMDMs中NEK7和NLRP3之间的结合没有影响(图5b)。ASC介导的NLRP3和caspase-1的连接是炎症小体组装的另一个关键步骤。我们发现，LND没有阻断NLRP3和ASC之间的相互作用(图5c)，但抑制了ASC和caspase-1之间的结合(图5d)。然后我们进一步检查了LND对炎症小体激活必要步骤ASC寡聚化的影响，发现LND剂量依赖性的抑制ATP诱导的ASC寡聚化(图5e和5f)。此外，在BMDMs的炎症小体激活过程中，ASC寡聚化在核周围形成一个大斑点(即ASC斑点(ASC specks)，图5g和5h)，而用LND预处理明显抑制了这种ASC斑点的形成(图5g和5h)。为了探索LND阻断ASC寡聚化的能力，我们加入不同浓度LND的情况下，观察纯化的人重组ASC蛋白中体外形成ASC寡聚体的能力。电子显微镜分析表明，LND显著抑制ASC寡聚体的形成。此外，在EAE小鼠的

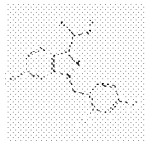
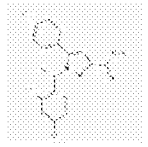
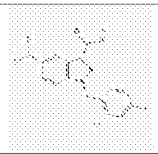
脊髓中LND治疗下降了小胶质细胞中ASC斑点增加(图5i)。除了NLRP3炎症小体，ASC的寡聚化还参与了AIM2、NLRP1和NLRC4等其他类型的炎症小体激活。因此，我们也测试了LND是否能抑制其他炎症小体的激活，结果表明LND抑制了由MDP(一种NLRP1炎症小体激活剂)、鞭毛蛋白(一种NLRC4炎症小体激活剂)或poly(dA:dT)(一种AIM2炎症小体激活剂)诱发的IL-1β的分泌(图5j)。综上所述，这些结果证实LND可以阻断ASC的寡聚化，是广谱炎症小体抑制剂，并且提示LND有可能直接与ASC结合。

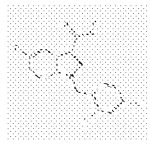
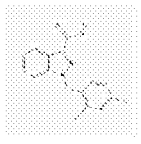
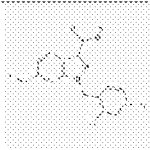
[0178] 实施例6.LND直接结合ASC蛋白

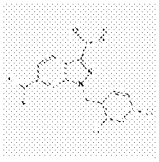
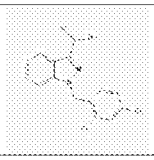
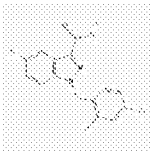
[0179] 为了研究LND是否直接与ASC结合，我们应用ASC的晶体结构(PDB 2KN6)进行分子建模分析。结果显示，LND很容易与CARD口袋对接，并与ASC蛋白的I115、F163、T166、W169、L178、L192和S195等多个氨基酸残基位点相互作用(图6a)。其中，已经有报道表明W169、L178和L192对ASC的寡聚化至关重要。因此，LND可能通过与这些氨基酸的相互作用来抑制ASC的寡聚化和随后的ASC对caspase-1前体的招募。应用表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)实验来分析LND和重组人ASC蛋白的直接相互作用，结果显示LND以剂量依赖的方式直接与ASC结合(图6b)。然后应用药物亲和力反应靶标稳定性(drug affinity responsive target stability,DARTS)方法来确认LND和ASC的直接相互作用。我们发现，LND保护ASC免受pronase蛋白酶介导的蛋白质降解，但不保护NLRP3和pro-caspase-1(图6c)。这些结果显示，LND通过选择性与ASC而不是NLRP3和pro-caspase-1结合，来抑制炎症小体激活。为了进一步探究模拟对接到的氨基酸残基对于ASC聚合体的重要性，我们在ASC-EGFP质粒中通过定点诱变突变这些位置，将位点突变质粒转染进HEK293T细胞中以研究ASC寡聚体的形成。除了T166，L178和S195以外，I115，F163，W169和L192位点突变都显著减少了ASC寡聚体和斑点的数量(图6d，e)，而不影响蛋白表达(图3d)，因此表明LND结合位点对ASC斑点形成至关重要，并发现了抑制ASC聚合的新位点。

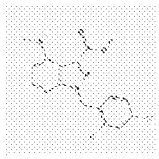
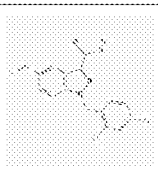
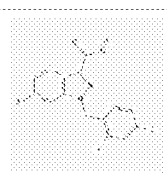
[0180] 实施例7.LND及其类似物与ASC蛋白的亲和力分析

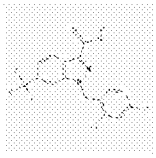
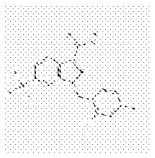
[0181] 对LND的结构类似物与ASC CARD结构域进行分子模拟对接分析，部分化合物的对接结果按照亲和力排序如下。

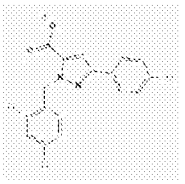
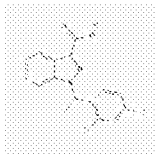
PubChem CID	名称	亲和力（kcal/mol）	亲和力评分	结构
115012294	6-氨-1-[(2,4-二氯苯基)甲基]吲哚-3-羧酸	-6.7	-27.37	
67565577	5-(4-氯苯甲)-1-[1-(2,4-二氯苯甲)乙基]吡唑-3-羧酸	-5.1	-26.92	
66888740	1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-5-(二氟甲基)吲哚-3-羧酸	-5.3	-26.9	

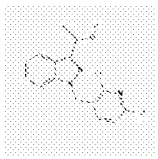
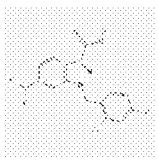
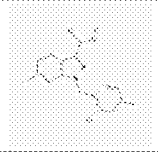
PubChem CID	名称	亲和力（kcal/mol）	亲和力评分	结构
71221361	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-氟吲哚-3-羧酸	-6.4	-26.1	
39362	吸入性溶剂(UNII)	-6.4	-25.58	
57633631	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(氟甲基)吲哚-3-羧酸	-4.9	-25.22	

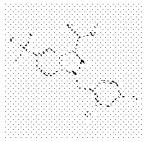
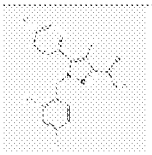
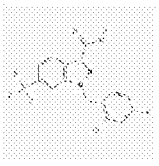
PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
11667849	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(二氟甲基)吲哚-3-羧酸	-5.2	-25.13	
25271808	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]吲哚-3-羧酸盐	-6.5	-25.08	
71216306	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-硝基吲哚-3-羧酸	-6.2	-25.02	

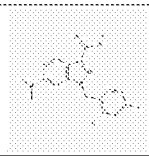
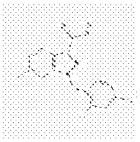
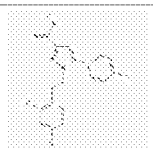
PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
60950636	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-4-(二甲基氨基)吲哚-3-羧酸	-6	-24.5	
66887973	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-(氨甲基)吲哚-3-羧酸	-5.6	-23.3	
13652093	1-(2,4-二氯苯基)-6-氧吲哚-3-羧酸	-6.7	-24	

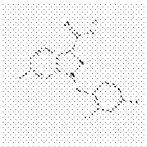
PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
57033606	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲哚-3-羧酸	-5.3	-25.77	
66858424	1-[(2-氯-4-甲基苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲哚-3-羧酸	-5.4	-23.63	

PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
54148749	1-(2,4-二氯苯基)-5-(4-氯苯基)-1H-吡唑-5-羧酸	-5.4	-22.4	
58796776	1-[1-(2,4-二氯苯基)乙基]-1H-吲哚-3-羧酸	-6.3	-22.34	

PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
58796759	1-[(2,6-二氯-3-硝基苯基)甲基]-1H-吲哚-3-羧酸	-5.3	-21.48	
66858818	1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲哚-3-羧酸	-5.4	-21.28	
89564538	1-[(2-氯-4-甲基苯基)甲基]-6-甲基吲哚-3-羧酸	-5.2	-20.95	

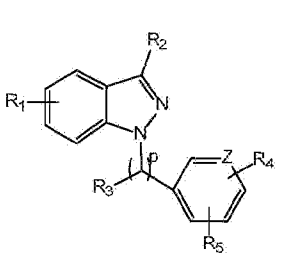
PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
11507264	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-(三氟甲基)吲哚-3-羧酸	-4.8	-20.46	
54033453	5-(4-氯苯硫)-1-[(2,4-二氯苯硫)甲基]-4-甲基吡啶-2-羧酸	-5.2	-20.43	
57633637	1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲哚-3-羧酸	-5.4	-20.38	

PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
11537863	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(三甲基硅烷基)吲哚-3-羧酸	-4.5	-20.34	
11667156	1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-甲基吲哚-3-羧酸	-4.9	-20.31	
67565578	5-(4-氯苯硫)-1-[(2-(2,4-二氯苯基)乙基]吲哚-3-羧酸	-5.2	-20.19	

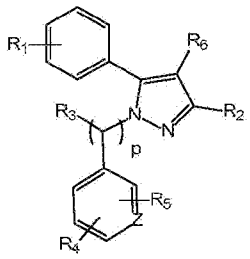
PubChem CID	名称	亲和力 (kcal/mol)	亲和力评分	结构
58182923	1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-甲基吲哚-3-羧酸	-5.3	-20.03	

权利要求书

[权利要求 1] 式Ia或Ib所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用，



(Ia)



(Ib)

其中：

R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基；R_3为H或C_{1-3}烷基；R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基；R_6为H或C_{1-3}烷基；Z选自C、N、O和S；p为1、2或3；并且

其中所述基于ASC−caspase−1通路的炎症小体激活介导的疾病不是以下任一种疾病：癌症、关节炎、急性中枢神经系统损伤、阿尔兹海默症、不孕不育症、黄斑病变、良性前列腺增生和艾滋病。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的应用，其中R_1选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基。

[权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的应用，其中R_2为羧基或酰肼基。

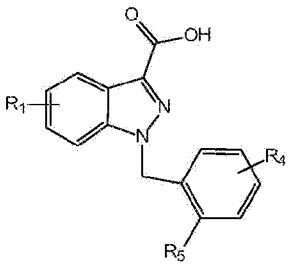
[权利要求 4] 根据权利要求1−3任一项所述的应用，其中R_3为氢或甲基。

[权利要求 5] 根据权利要求1−4任一项所述的应用，其中R_4和R_5独立地选自氢、甲基、氟和氯。

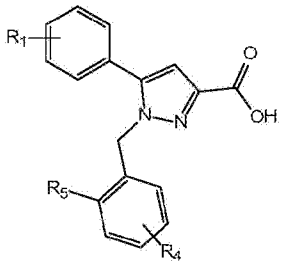
[权利要求 6] 根据权利要求1−5任一项所述的应用，其中Z选自C和N。

[权利要求 7] 根据权利要求1−6任一项所述的应用，其中p为1。

[权利要求 8] 根据权利要求1所述的应用，其中所述化合物为式IIa或IIb所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯，



(IIa)或



(IIb)

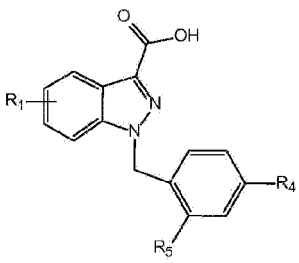
其中，

R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；

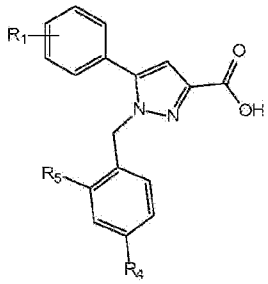
R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；

R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选选自甲基、氟和氯。

[权利要求 9] 根据权利要求1所述的应用，其中所述化合物为式(IIIa)或(IIIb)所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯，



(IIIa)或



(IIIb)

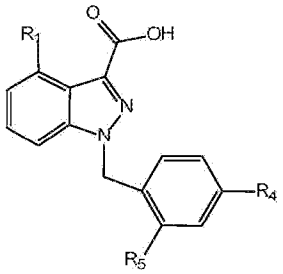
其中，

R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；

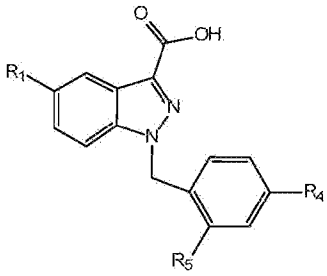
R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；

R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选选自甲基、氟和氯，更优选为氟或氯。

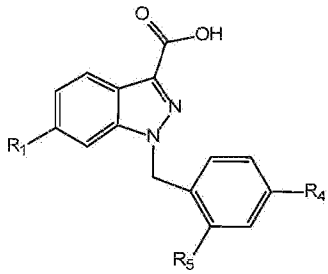
[权利要求 10] 根据权利要求1所述的应用，其中所述化合物为式IVa、IVb或IVc所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯，



(IVa),



(IVb),



(IVc),

其中，

R_1选自氢、卤素、C_{1-3}烷基、氨基、C_{1-3}烷基氨基和卤代C_{1-3}烷基；

R_2选自羧基、C_{1-3}烷基和酰肼基，优选选自氢、氟、氯、碘、甲基、乙基、氨基、二甲基氨基、氟代甲基、三氟甲基和二氟甲基；更优选选自氢、氟、氯和二氟甲基；

R_4和R_5独立地选自氢、卤素和C_{1-3}烷基，优选选自氟和氯，更优选均为氯。

[权利要求 11] 根据权利要求1-10任一项所述的应用，其中所述化合物选自：

6-氯-1-[(2,4-二氯苯基)甲基]吲唑-3-羧酸(11501294)；

5-(4-氯苯基)-1-[1-(2,4-二氯苯基)乙基]吡唑-3-羧酸(67565577);

1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-5-(二氟甲基)吲唑-3-羧酸(66888740);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-氟吲唑-3-羧酸(71221361);

1-[(2,4-二氟苯基)甲基]吲唑-3-羧酸(39562);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(氟甲基)吲唑-3-羧酸(57633631);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(二氟甲基)吲唑-3-羧酸(11667849);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]吲唑-3-羧酸盐(25271808);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-碘吲唑-3-羧酸(71216306);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-4-(二甲基氨基)吲唑-3-羧酸(66900636);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-(氟甲基)吲唑-3-羧酸(66887973);

1-(2,4-二氯苯基)-6-氟吲唑-3-羧酸(11652993);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(57633606);

1-[(2-氯-4-甲基苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(66888424);

1-(2,4-二氯苯基)-3-(4-氯苯基)-1H-吡唑-5-羧酸(54148749);

1-[1-(2,4-二氯苯基)乙基]-1H-吲唑-3-羧酸(58796770);

1-[(2,6-二氯-3-吡啶基)甲基]-1H-吲唑-3-羧酸(58796750);

1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-(二氟甲基)吲唑-3-羧酸(66888818);

1-[(2-氯-4-甲基苯基)甲基]-6-甲基吲唑-3-羧酸(89564538);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-5-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(11567264);

5-(4-氯苯基)-1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-4-甲基吡唑-3-羧酸(54033453);

1-[(2-氯-4-氟苯基)甲基]-6-(三氟甲基)吲唑-3-羧酸(57633637);

1-[(2,4-二氯苯基)甲基]-6-(二甲基氨基)吲唑-3-羧酸(11537863);

1−[(2,4−二氯苯基)甲基]−6−甲基吲唑−3−羧酸(11667156)；以及它们各自的药学上可接受的盐或酯。

[权利要求 12] 根据权利要求11所述的应用，其中所述化合物选自：

6−氯−1−[(2,4−二氯苯基)甲基]吲唑−3−羧酸(11501294)；

5−(4−氯苯基)−1−[1−(2,4−二氯苯基)乙基]吡唑−3−羧酸(67565577)；

1−[(2−氯−4−氟苯基)甲基]−5−(二氟甲基)吲唑−3−羧酸(66888740)；

1−[(2,4−二氯苯基)甲基]−5−氟吲唑−3−羧酸(71221361)；

1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸(39562)；以及

它们各自的药学上可接受的盐或酯。

[权利要求 13] 根据权利要求11所述的应用，其中所述化合物是1−[(2,4−二氟苯基)甲基]吲唑−3−羧酸或其药学上可接受的盐或酯。

[权利要求 14] 根据权利要求1、8、9或10所述的应用，其中所述由ASC−caspase−1炎症小体通路激活介导的疾病选自哮喘、过敏性气道炎症、痛风、多发性硬化和败血症。

[权利要求 15] 根据权利要求1、8、9或10所述的应用，其中所述由ASC−caspase−1炎症小体通路激活介导的疾病选自痛风、多发性硬化和败血症。

[权利要求 16] 根据权利要求1、8、9或10所述的应用，其中所述由ASC−caspase−1炎症小体通路激活介导的疾病是痛风。

[权利要求 17] 根据权利要求1、8、9或10所述的应用，其中所述由ASC−caspase−1炎症小体通路激活介导的疾病是多发性硬化。

[权利要求 18] 根据权利要求1、8、9或10所述的应用，其中所述由ASC−caspase−1炎症小体通路激活介导的疾病是败血症。

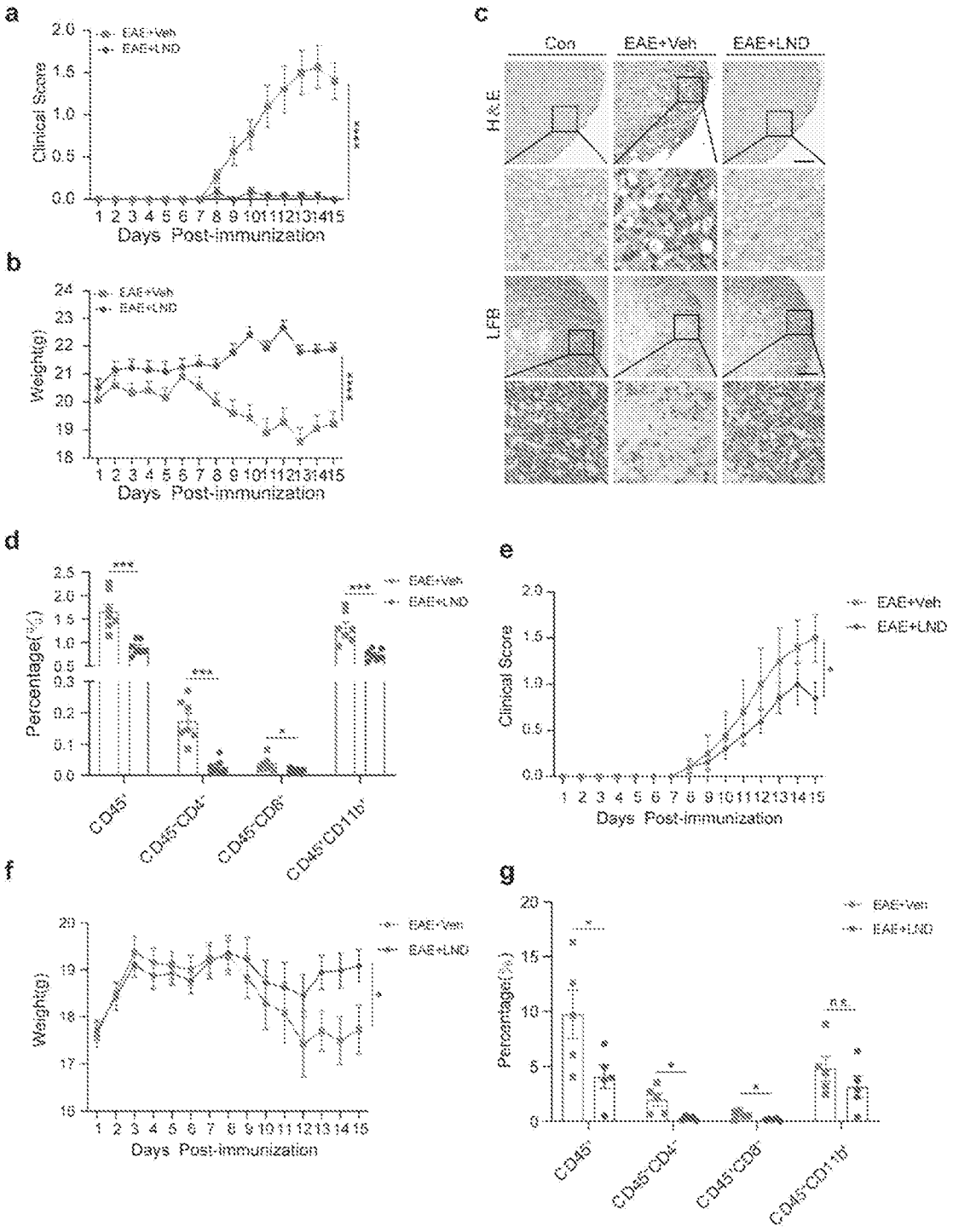
[权利要求 19] 一种ASC突变蛋白，其包含在I115、F163、W169和L192中的至少一个处的氨基酸残基突变，所述ASC突变蛋白相对于野生型蛋白具有减少的ASC寡聚体和/或斑点的数量，其中所述氨基酸残基编号根据GenBank:BAA87339.2确定。

[权利要求 20] 一种基于计算机的筛选用于治疗由ASC−caspase−1炎症小体通路激活介导的疾病的药物的方法，包括识别与ASC蛋白的I115、F163、W169和L192中的至少一个氨基酸残基相互作用的候选药物。

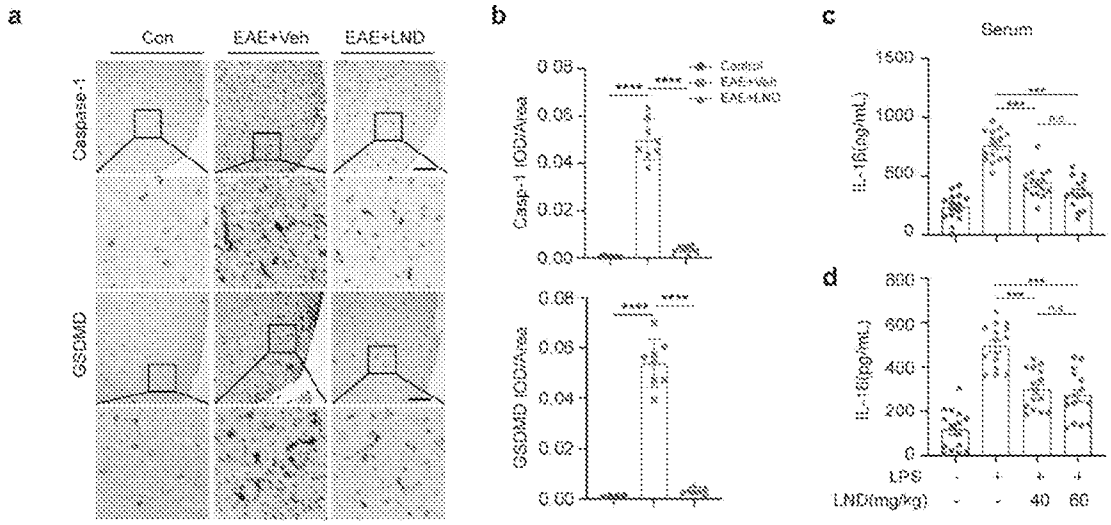
WO 2024/099346 PCT/CN2023/130416

细则 26,
16.11.2023

[图 1]



[图 2]

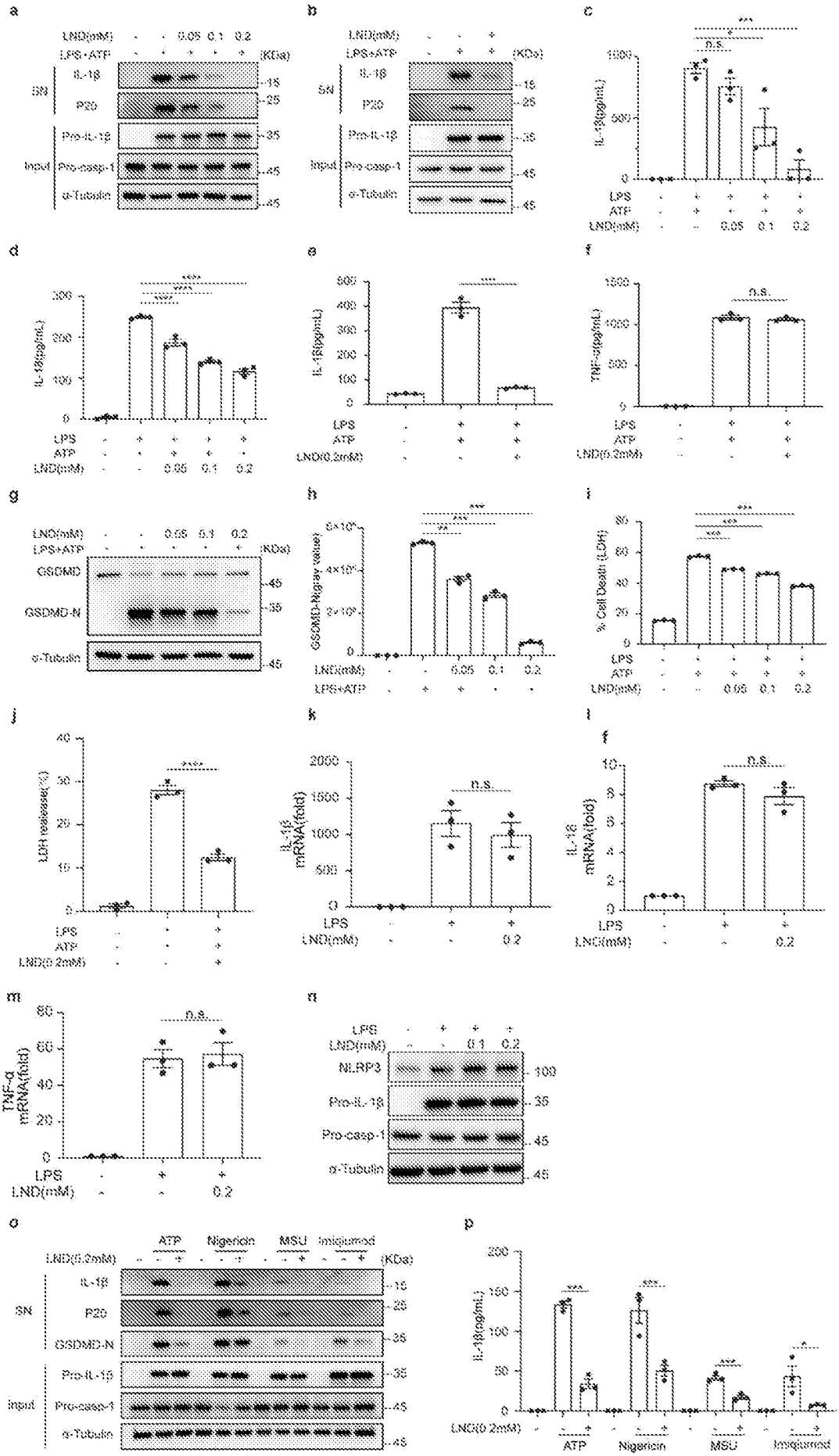


细则 26,
16.11.2023

WO 2024/099346 PCT/CN2023/130416

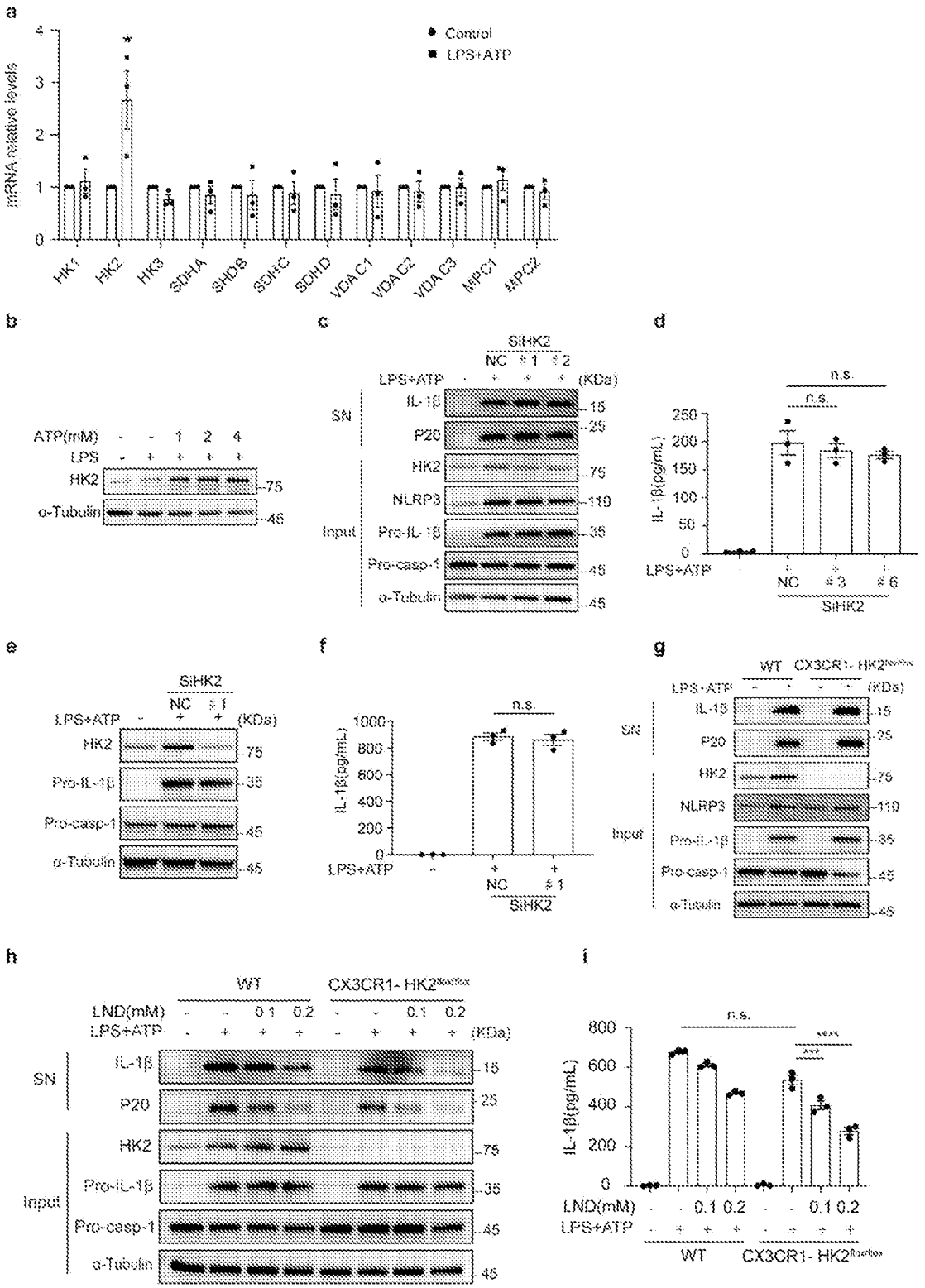
[图 3]

细则 26,
16.11.2023

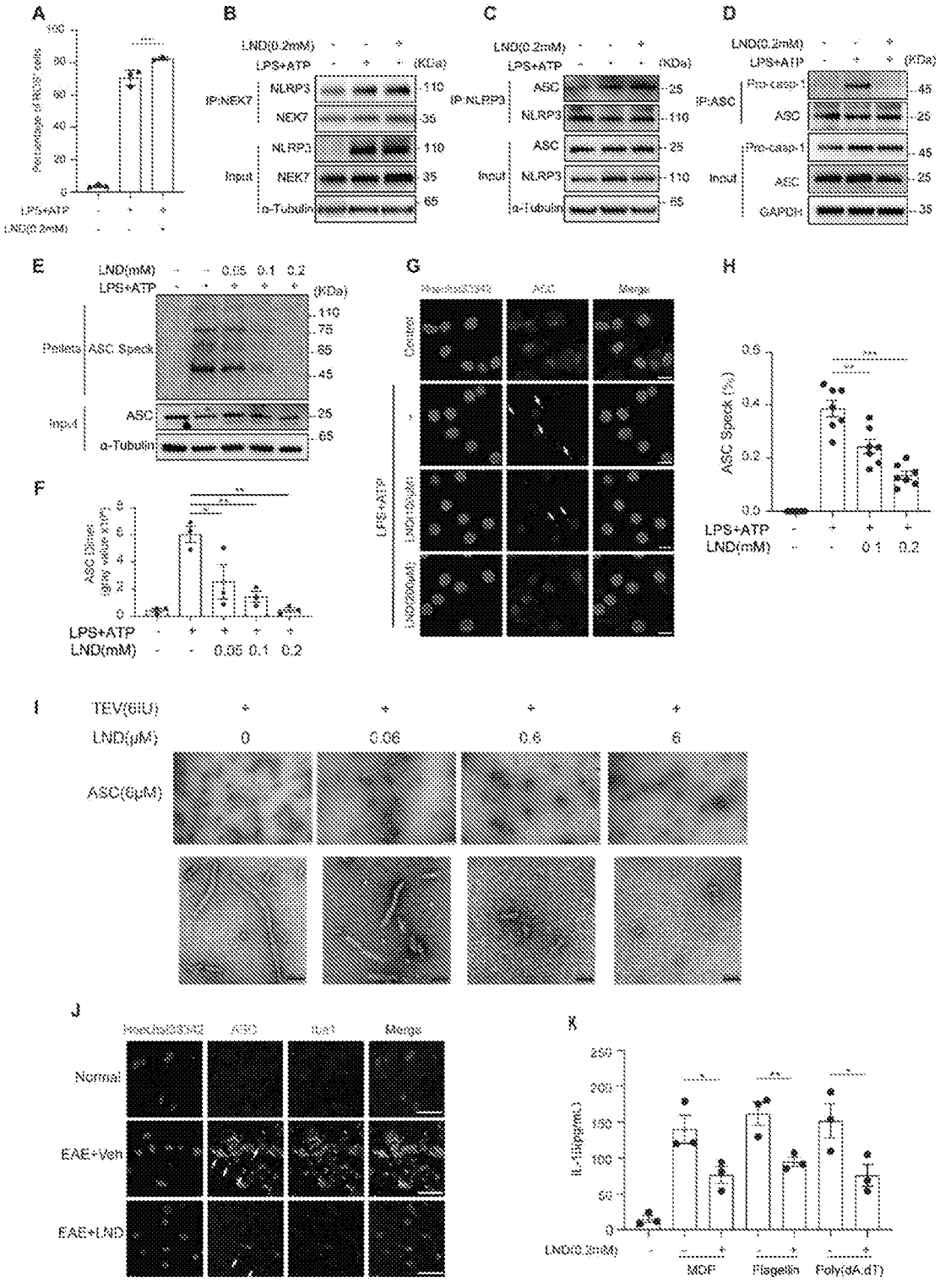


[图 4]

细则 26,
16.11.2023



[图 5]

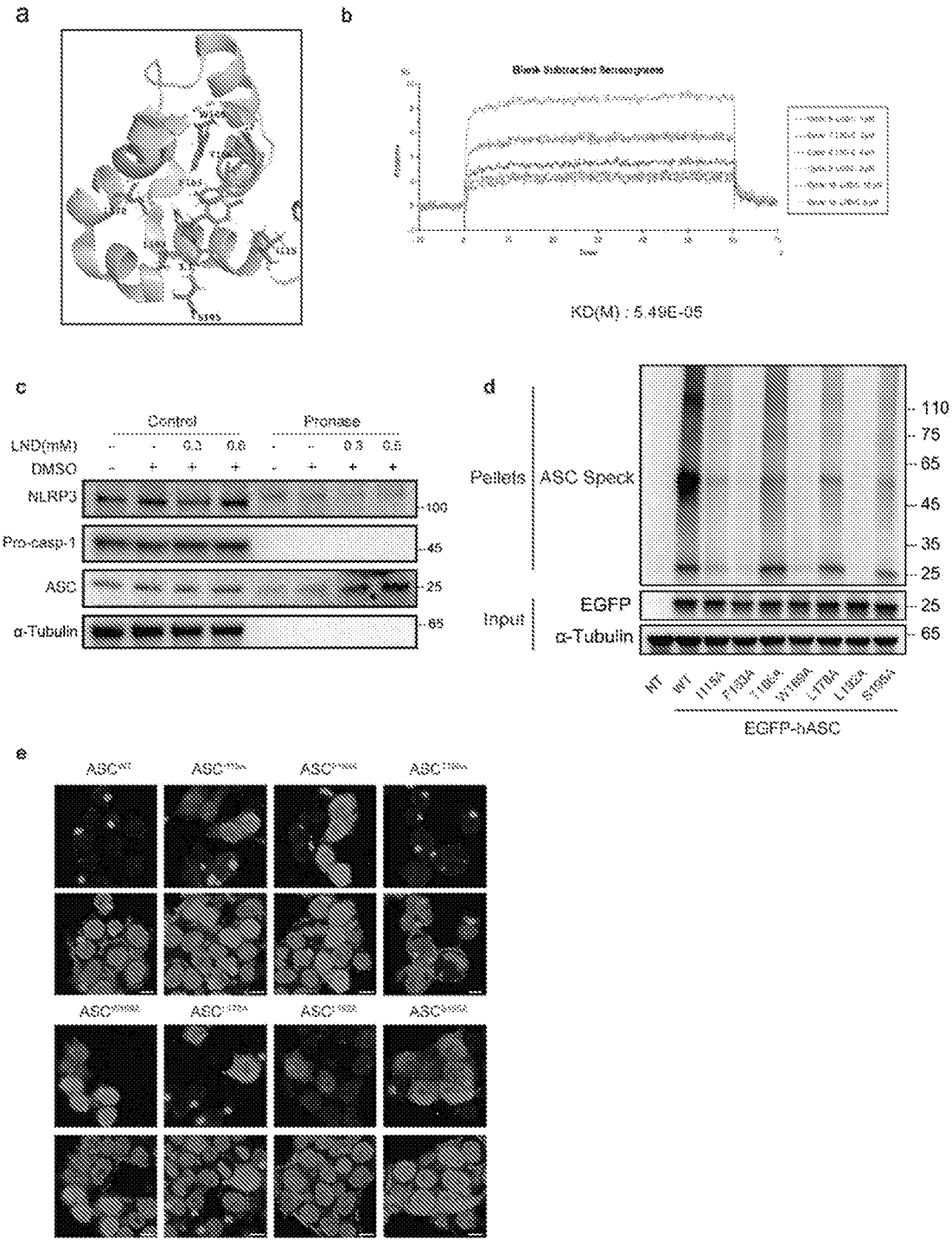


细则 26,
16.11.2023

WO 2024/099346 PCT/CN2023/130416

细则 26,
16.11.2023

[图 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/130416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/4439(2006.01)i; A61K31/416(2006.01)i; A61K31/415(2006.01)i; C07K14/47(2006.01)i; C12Q1/68(2018.01)i; A61P11/06(2006.01)i; A61P7/00(2006.01)i; A61P19/06(2006.01)i; A61P25/00(2006.01)i; A61P37/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K; A61P; C07K; C12Q

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

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

CNTXT, ENTXT, ENTXTC, DWPI, NCBI-BLAST, 中国专利序列数据库, National Sequence Database of Chinese Patent, CNKI, REGISTRY, CAPLUS: 中山大学, ASC, 哮喘, 过敏, 痛风, 多发性硬化, 败血, 权利要求11化合物结构检索, search for the structure of the compound of claim 11, asthma+, gout+, +arthriti+, sclerotic, sclerosis, septic+, sepsis, allergic, anaphylactic, I115, F163, W169, L192, 对SEQ ID NO: 1进行检索, search for SEQ ID NO: 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CHEN, Chen et al. "Directly Targeting ASC by Lonidamine Alleviates Inflammasome-Driven Diseases" *Journal of Neuroinflammation,* Vol. 19, No. (1), 28 December 2022 (2022-12-28), pages 315(1-17) ISSN: 1742-2094, page 1/17, abstract, page 11/17, left-hand column, paragraph 3, and page 13/17, figure 6	1-20
X	WO 2022061008 A2 (ESCIENT PHARMACEUTICALS INC.) 24 March 2022 (2022-03-24) abstract, and description, page 15, line 13 to page 17, line 26, page 28, lines 9-23, page 39, line 17 to page 40, line 21, page 49, line 16 to page 50, line 21, and pages 89-91, tables	1-17
X	CN 110114351 A (VETTORE LLC) 09 August 2019 (2019-08-09) abstract, claim 9, and description, paragraph [0279]	1-18

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 February 2024	**08 March 2024**

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Paula M. Soriano-Teruel et al. "Identification of an ASC Oligomerization Inhibitor for the Treatment of Inflammatory Diseases" *Cell Death and Disease,* Vol. vol. 12, 13 December 2021 (2021-12-13), pages 1155(1-11) page 1/11, abstract, and page 4/11, left-hand column, paragraph 4	19-20
X	LI, Yang et al. "Cryo-EM Structures of ASC and NLRC4 CARD Filaments Reveal a Unified Mechanism of Nucleation and Activation of Caspase-1" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* Vol. 115, No. (43), 23 October 2018 (2018-10-23), pp. 10845-10852 page 10845, abstract, and page 10847, figure 2	19-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/130416

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/130416

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The claims of the present application comprise two inventions as follows:

Group I: Claims 1-18 set forth the use of a compound as shown in formula Ia or Ib or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof in the preparation of a drug for treating an ASC-caspase-1 pathway-based inflammasome activation-mediated disease.

Group II: Claim 19 sets forth an ASC mutant protein, and claim 20 sets forth a computer-based drug screening method.

The technical solutions of the two groups of claims do not have a same special technical feature, do not have a technical relationship therebetween, do not fall within a single general inventive concept, and lack unity of invention.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☑ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/130416

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022061008 A2	24 March 2022	WO 2022061008 A3	28 April 2022
		EP 4213839 A2	26 July 2023
		JP 2023541944 A	04 October 2023
		CN 116438162 A	14 July 2023
CN 110114351 A	09 August 2019	IL 267183 A	29 August 2019
		JP 2020500916 A	16 January 2020
		JP 7123929 B2	23 August 2022
		PH 12019501261 A1	24 February 2020
		US 2019112275 A1	18 April 2019
		US 11292767 B2	05 April 2022
		RU 2019115930 A	12 January 2021
		RU 2019115930 A3	05 May 2021
		WO 2018111904 A1	21 June 2018
		KR 20190093213 A	08 August 2019
		KR 102615828 B1	20 December 2023
		IL 279949 A	01 March 2021
		MX 2019006893 A	09 October 2019
		AU 2017375960 A1	27 June 2019
		AU 2017375960 B2	10 March 2022
		CA 3046212 A1	21 June 2018
		US 2018162822 A1	14 June 2018
		US 10214492 B2	26 February 2019
		US 2022251047 A1	11 August 2022
		BR 112019011825 A2	22 October 2019
		ZA 201904522 B	20 December 2023
		EP 3551625 A1	16 October 2019
		EP 3551625 A4	16 September 2020
		SG 11201904955 A1	27 June 2019
		IN 201937023519 A	09 August 2019
		ID 201908115 A	22 November 2019
		HK 40015139 A0	28 August 2020
		MX 391489 B	08 April 2022
		RU 2771875 C2	13 May 2022
		CN 110114351 B	20 September 2022

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/130416

A. 主题的分类

A61K31/4439(2006.01)i；A61K31/416(2006.01)i；A61K31/415(2006.01)i；C07K14/47(2006.01)i；C12Q1/68(2018.01)i；A61P11/06(2006.01)i；A61P7/00(2006.01)i；A61P19/06(2006.01)i；A61P25/00(2006.01)i；A61P37/08(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K; A61P; C07K; C12Q

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））

CNTXT, ENTXT, ENTXTC, DWPI, NCBI-BLAST, 中国专利序列数据库, CNKI, REGISTRY, CAPLUS: 中山大学，ASC，哮喘，过敏，痛风，多发性硬化，败血，权利要求11化合物结构检索，asthma+，gout+，+arthriti+，sclerotic，sclerosis，septic+，sepsis，allergic，anaphylactic，I115，F163，W169，L192，对SEQ ID NO:1进行检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	Chen Chen等. "Directly targeting ASC by lonidamine alleviates inflammasome-driven diseases" Journal of Neuroinflammation, 第19卷，第1期，2022年12月28日 (2022-12-28)，第315（1-17）页 ISSN：1742-2094, 第1/17页摘要，第11/17页左栏第3段，第13/17页图6	1-20
X	WO 2022061008 A2 (ESCIENT PHARMACEUTICALS INC) 2022年3月24日 (2022-03-24) 摘要，明书第15页第13行-第17页第26行，第28页第9-23行，第39页第17行-第40页第21行，第49页第16行-第50页第21行，第89-91页表格	1-17
X	CN 110114351 A (维托尔股份有限公司) 2019年8月9日 (2019-08-09) 摘要，权利要求9，说明书第[0279]段	1-18

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“D” 申请人在国际申请中引证的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2024年2月28日	2024年3月8日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 王莹 电话号码 (+86) 010-62084568

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	Paula M. Soriano-Teruel等. "Identification of an ASC oligomerization inhibitor for the treatment of inflammatory diseases" Cell Death and Disease, 第12卷，2021年12月13日 (2021 - 12 - 13)，第1155（1-11）页 第1/11页摘要，第4/11页左栏第4段	19-20
X	Yang Li等. "Cryo-EM structures of ASC and NLRC4 CARD filaments reveal a unified mechanism of nucleation and activation of caspase-1" Proc Natl Acad Sci, 第115卷，第43期，2018年10月23日 (2018 - 10 - 23)，第10845-10852页 第10845页摘要，第10847页图2	19-20

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/130416

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

本申请权利要求书包括了两项发明，其中：

第一组：权利要求1-18请求保护式Ia或Ib所示的化合物或其药学上可接受的盐或酯在制备用于治疗基于ASC-caspase-1通路的炎症小体激活介导的疾病的药物中的应用。

第二组：权利要求19请求保护ASC突变蛋白，权利要求20请求保护基于计算机的筛选药物方法。

这两组权利要求的技术方案之间没有相同的特定技术特征，技术上无相互关联，不属于一个总的发明构思，不具备单一性。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☑ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/130416

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)
WO	2022061008	A2	2022年3月24日	WO	2022061008	A3	2022年4月28日
				EP	4213839	A2	2023年7月26日
				JP	2023541944	A	2023年10月4日
				CN	116438162	A	2023年7月14日
CN	110114351	A	2019年8月9日	IL	267183	A	2019年8月29日
				JP	2020500916	A	2020年1月16日
				JP	7123929	B2	2022年8月23日
				PH	12019501261	A1	2020年2月24日
				US	2019112275	A1	2019年4月18日
				US	11292767	B2	2022年4月5日
				RU	2019115930	A	2021年1月12日
				RU	2019115930	A3	2021年5月5日
				WO	2018111904	A1	2018年6月21日
				KR	20190093213	A	2019年8月8日
				KR	102615828	B1	2023年12月20日
				IL	279949	A	2021年3月1日
				MX	2019006893	A	2019年10月9日
				AU	2017375960	A1	2019年6月27日
				AU	2017375960	B2	2022年3月10日
				CA	3046212	A1	2018年6月21日
				US	2018162822	A1	2018年6月14日
				US	10214492	B2	2019年2月26日
				US	2022251047	A1	2022年8月11日
				BR	112019011825	A2	2019年10月22日
				ZA	201904522	B	2023年12月20日
				EP	3551625	A1	2019年10月16日
				EP	3551625	A4	2020年9月16日
				SG	11201904955	A1	2019年6月27日
				IN	201937023519	A	2019年8月9日
				ID	201908115	A	2019年11月22日
				HK	40015139	A0	2020年8月28日
				MX	391489	B	2022年4月8日
				RU	2771875	C2	2022年5月13日
				CN	110114351	B	2022年9月20日